



Ecole Doctorale des Sciences Chimiques

Thèse de doctorat d'Université

Anne de Poulpiquet de Brescanvel

Biopiles enzymatiques H₂-O₂ : Nanostructuration de l'interface électrochimique pour l'immobilisation des enzymes rédox

Date de soutenance : 4 décembre 2014

Devant la commission d'examen formée par :

M. Michaël Holzinger	Chargé de recherche	Examineur
M. Philippe Knauth	Professeur	Examineur
M. Alexander Kuhn	Professeur	Examineur
Mme Corinne Lagrost	Chargée de recherche	Rapportrice
Mme Elisabeth Lojou	Directrice de recherche	Directrice de Thèse
M. Nicolas Plumeré	Junior Group Leader	Rapporteur
M. Marius Réglie	Directeur de recherche	Examineur

Laboratoire de Bioénergétique et Ingénierie des Protéines

Centre National de la Recherche Scientifique

Table des Matières

Table des Matières.....	iii
Liste des abréviations.....	xiii
Introduction générale.....	1

Synthèse Bibliographique : Des biocatalyseurs pour une nouvelle génération de biopiles H₂-O₂ 7

A- Un vecteur énergétique prometteur : le dihydrogène H₂.....	9
I- Avantages du dihydrogène.....	9
II- Sources d'H ₂	9
I-1- Production à partir des combustibles fossiles.....	9
I-2- Production par électrolyse de l'eau.....	9
I-3- Production à partir de la biomasse.....	10
I-4- Sources naturelles d'H ₂	10
III- Utilisations du dihydrogène pour la production d'énergie.....	11
IV- Principe de fonctionnement de la pile à combustible.....	12
V- Un catalyseur problématique.....	13
B- Les Biopiles enzymatiques	15
I- Les multiples avantages des enzymes.....	15
II- Principes et grandeurs caractéristiques.....	15
III- Transfert électronique entre l'enzyme et l'électrode.....	17
IV- Quelles enzymes pour quels substrats ?.....	19
IV-1- Cathode.....	19
IV-2- Anode.....	19
V- Des performances « sur la paille » aux applications concrètes	20
VI- Limitations actuelles des biopiles : des défis à relever	21
C- L'Electrode, une plateforme pour l'immobilisation fonctionnelle des enzymes.....	24
I- Les modifications volumiques, micro et nanostructuration : motivations	24
I-1- Limite de la densité de courant catalytique	25

I-2- Amélioration de l'efficacité du transfert électronique direct (TED)	26
I-3- Stabilisation du biocatalyseur	27
II- Quels matériaux utiliser pour structurer l'électrode ?	27
II-1- Matériaux carbonés	28
II-1-a- Nanotubes de carbone	28
II-1-b- Carbone mésoporeux organisé	29
II-1-c- Nanoparticules de carbone	29
II-1-d- Graphène	30
II-2- Métaux et oxydes métalliques	30
III- Conception de l'électrode	31
III-1- Structuration de l'interface	32
III-2- Modification de la chimie de surface des matériaux d'électrode.....	32
III-2-a- Pourquoi modifier la chimie de surface ?	32
III-2-b- Stratégies de modification	33
III-3- Immobilisation de l'enzyme	35
III-3-a- Adsorption.....	35
III-3-b- Encapsulation (polymères, sols-gels)	36
III-3-c- Liaison covalente	36
III-3-d- Affinité : Interaction hôte-invité	37
IV- Conséquences sur les performances et limitations.....	38
IV-1- Augmentation des densités de courant grâce à la nanostructuration de l'électrode.....	38
IV-2- Amélioration du transfert direct d'électrons.....	40
IV-3- Stabilisation de l'enzyme.....	42
IV-4- Diffusion de l'enzyme et de son substrat.....	42
D- Une bioanode pour la biopile H₂-O₂ : les Hydrogénases à [NiFe].....	45
I- Structure.....	45
II- Mécanisme d'oxydation de H ₂	46
II-1- Le Cycle catalytique.....	46
II-2- Apports de l'électrochimie	47
III- Immobilisation fonctionnelle des hydrogénases	49
III-1- Contrôle de l'orientation de l'hydrogénase à l'interface.....	50
III-2- Immobilisation dans des électrodes tridimensionnelles.....	52
IV- Sensibilité à l'O ₂ et au CO	54
V- Les Hydrogénases tolérantes à l'O ₂	54

V-1- Caractéristiques.....	55
V-2- Bases moléculaires de la résistance à l'oxygène.....	55
V-2-a- Centre actif [Ni-Fe].....	55
V-2-b- Canaux de diffusion des gaz.....	56
V-2-c- Cavités hydrophiles.....	57
V-2-d- Centre [FeS] proximal.....	57
V-2-e- Rôle des super-complexes d'hydrogénases.....	59
VI- L'Hydrogénase I d' <i>Aquifex aeolicus</i>	59
VI-1- Propriétés structurales.....	60
VI-2- Cycle catalytique d'oxydation de l'H ₂ en électrochimie.....	61
VI-3- Une Hydrogénase exceptionnellement tolérante.....	63
VI-3-a- Activité à haute température.....	63
VI-3-b- Tolérance à l'O ₂	63
VI-3-b-i- Observations.....	63
VI-3-b-ii- Le site actif à [Ni-Fe].....	64
VI-3-b-iii- Les centres [FeS].....	65
VI-3-c- Tolérance au CO.....	65
E- Une biocathode pour la biopile H₂-O₂ : les Bilirubine oxydases.....	67
I- Les bilirubine oxydases (BODs), des MCOs à forte potentialité.....	68
II- Un catalyseur efficace pour la réduction électroenzymatique de l'O ₂	70
II-1- Connexion directe.....	70
II-1-a- Aspect fondamental.....	70
II-1-b- Des Biocathodes efficaces.....	71
II-2- Connexion médiée.....	72
III- Mécanisme de réduction de l'O ₂	73
III-1- Le Site actif.....	73
III-2- Transferts électroniques.....	74
IV- Influence des ions halogénures.....	76
V- La BOD de <i>Bacillus pumilus</i> (<i>Bp</i> BOD).....	79
V-1- Identification et propriétés.....	79
V-2- Propriétés électrochimiques.....	79
V-3- Thermostabilité.....	80
V-3-a- En catalyse homogène.....	80
V-3-b- En catalyse hétérogène.....	80
V-4- Résistance à l'urate et au NaCl.....	80

F- Les biopiles H₂-O₂	82
I- L'Idée.....	82
II- La Preuve du concept	84
III- Evolution des performances.....	85
III-1- Densités de puissance	88
III-2- Stabilité	89
III-3- Simplification du système.....	90
IV- Limitations	91
 Bibliographie	 xvii
 Objectifs de la thèse	 94

Résultats : des biocatalyseurs pour une nouvelle génération de biopiles H₂-O₂98

A- Oxydation de l'hydrogène : Immobilisation de l'hydrogénase membranaire d'<i>Aquifex aeolicus</i> (Aa Hase 1)	100
I- <i>Aa</i> Hase 1, une hydrogénase membranaire : spécificités de l'orientation.....	100
I-1- Orientation sur électrode d'oxyde d'indium et d'étain (ITO).....	101
I-2- Une distribution d'orientations sur les surfaces chargées expliquée par un moment dipolaire faible et fluctuant.....	103
II- Immobilisation de l' <i>Aa</i> Hase 1 à l'électrode nanostructurée : les nanoparticules (CNPs) et nanotubes de carbone (CNTs)	107
II-1- Nanoparticules de carbone	108
II-1-a- Préparation de l'électrode couche par couche	108
II-1-b- Optimisation des paramètres	110
II-1-c- Conclusion.....	112
II-2- Nanotubes de carbone (CNTs)	113
II-2-a- Propriétés structurales des différents CNTs	113
II-2-b- Caractérisation du film de SW-CNTs-COOH formé à l'électrode	114
II-2-c- Propriétés vis-à-vis de la catalyse d'oxydation de l'H ₂	116
II-2-d- Influence du pH sur l'activité de l'hydrogénase immobilisée sur les SW-CNTs-COOH.....	117
II-2-e- Optimisation des densités de courant pour l'hydrogénase	119
II-2-f- Stabilisation du signal.....	120

II-2-f-i- Membrane polymère.....	121
II-2-f-ii- Liaison covalente.....	123
II-2-g- Les Nanotubes de carbone : conclusion	126
III- Immobilisation de l'Aa Hase 1 à l'électrode nanostructurée : les nanofibres de carbone (CNFs)	127
III-1- Propriétés physico-chimiques des CNFs.....	128
III-1-a- Structure.....	129
III-1-b- Porosité	130
III-1-c- Propriétés de surface	131
III-1-c-i- Analyse des fonctions de surface grâce à la thermo-désorption programmée couplée à la spectrométrie de masse (TPD-MS)	131
III-1-c-ii- Caractérisation de l'hydrophobicité grâce à l'isotherme d'adsorption-désorption d'eau.....	132
III-2- Caractérisation électrochimique du film de CNFs formé sur l'électrode.....	133
III-2-a- Structure du film de CNFs	134
III-2-b- Propriétés d'adsorption du film de CNFs	136
III-2-c- Stabilité du film de CNFs.....	137
III-3- Optimisation des densités de courant pour l'Aa Hase 1.....	138
III-3-a- Comparaison des fibres de chimie de surface différente.....	138
III-3-b- Différents protocoles.....	139
III-3-b-i- Adsorption de l'Aa Hase 1 sur le film de CNFs	140
III-3-b-ii- Biohybride hydrogénase/CNFs ex situ	142
III-4- Le transport de masse.....	144
III-4-a- Limitation.....	144
III-4-b- Analyse grâce à l'électrode tournante.....	147
III-4-c- Flux d'H ₂ dans l'électrolyte	150
III-5- Paramètres d'adsorption de l'hydrogénase sur les CNFs_H2.....	153
III-5-a- Cinétique d'adsorption.....	153
III-5-b- Isotherme d'adsorption	154
III-5-c- Influence de la température sur l'oxydation catalytique de l'H ₂	155
III-5-d- Influence du pH sur l'oxydation catalytique de l'H ₂	156
III-6- Quantification de l'enzyme adsorbée sur les CNFs_H2	157
III-6-a- Adsorption de l'hydrogénase sur les CNFs en suspension : dosage du surnageant par le test de Bradford	157
III-6-b- Adsorption de l'hydrogénase sur le film de CNFs formé à l'électrode : présence d'hydrogénase dans le surnageant vérifiée par gel bleu natif.....	159
III-7- Stabilité du signalélectroenzymatique d'oxydation de l'H ₂ sur les films de CNFs	160

III-8- Conclusion sur l'utilisation des CNFs comme plateforme pour l'Aa Hase 1 et perspectives : vers une porosité contrôlée	162
IV- Problématique de l'oxydation médiée de l'H ₂ par l'hydrogénase d' <i>A. aeolicus</i> sur les électrodes nanostructurées à base de carbone	163
IV-1- Le Bleu de méthylène (BM) pour l'Aa Hase 1 immobilisée sur les CNPs et les CNTs	165
IV-2- Différents médiateurs pour l'Aa Hase 1 immobilisée sur les CNFs	169
IV-2-a- Les Phénothiazines	169
IV-2-b- Le Benzyle viologène	171
IV-2-c- Le Ferrocène-méthanol	172
IV-2-d- Problématique du courant médié : conclusion	174
V- Stabilisation du signal électrochimique	175
V-1- Influence du détergent sur la stabilité de l'Aa Hase 1	175
V-1-a- DDM en solution	176
V-1-b- Revêtement de DDM sur l'électrode de PG	178
V-1-c- Conclusion	179
V-2- Influence de la liaison de l'enzyme à l'électrode	179
V-2-a- Pyrènes	179
V-2-b- Réduction de sels de diazonium	181
V-2-b-i- Modification de l'électrode	182
V-2-b-ii- Liaison covalente de l'hydrogénase sur le film organique	183
V-2-c- Conclusion : stabilisation de la liaison de l'enzyme à l'électrode	186
B- Réduction de l'oxygène : Immobilisation de la bilirubine oxydase de <i>Bacillus pumilus</i> (<i>Bp</i> BOD)	188
I- Structure	188
II- Réduction électrochimique de l'O ₂ par la <i>Bp</i> BOD : optimisation de la biocathode	189
II-1- Différents protocoles	190
II-2- Comparaison des différentes fibres : CNFs_O2 ; CNFs_H2 ; CNFs_H2O2	191
II-3- Isotherme d'adsorption	192
II-4- Cinétique d'adsorption	193
II-5- Influence du pH sur la réduction catalytique de l'O ₂	194
II-6- Influence de la température sur la réduction catalytique de l'O ₂	195
II-7- Influence de l'apport du substrat : oxygène pur ou air, bullage ou solution saturée	196
II-8- Stabilité de la bioélectrode à haute température	198
III- Courant direct et courant médié par l'ABTS	199

IV- Influence des ions Cl^- sur les bilirubine oxydases bactérienne de <i>Bacillus pumilus</i> et fongique de <i>Myrothecium verrucaria</i>	200
IV-1- Mise en évidence de deux formes « resting ».....	202
IV-1-a- Etats du cuivre observés en spectroscopie UV-visible	202
IV-1-b- Suivi électrochimique de la réduction enzymatique du dioxygène	203
IV-1-b-i- BOD de <i>Bacillus pumilus</i>	203
IV-1-b-ii- BOD de <i>Myrothecium verrucaria</i>	205
IV-2- Influence du pH sur l'inhibition par les chlorures à haut potentiel.....	206
IV-2-a- Activité d'oxydation de l'ABTS mesurée en spectroscopie UV-visible	206
IV-2-b- Suivi électrochimique de la réduction du dioxygène par la BOD en phase hétérogène	207
IV-3- Mécanisme d'interconversion des formes « resting ».....	210
IV-3-a- Influence du potentiel sur l'activation pour la catalyse de la forme « alternative resting »	210
IV-3-b- Conditions oxydantes	210
IV-4- Conclusion.....	212
C- La Biopile $\text{H}_2\text{-O}_2$.....	214
I- Dispositif expérimental.....	214
II- Nature, pH et molarité de l'électrolyte	216
III- Evolution des performances de la biopile avec la température	218
IV- Stabilité du système	220
V- Origine biocatalytique des courants	221
VI- Importance des CNFs.....	222
VII- Conclusions	222
Bibliographie.....	xxxix
Conclusion et perspectives.....	224
<hr/>	
Matériels et méthodes	232
<hr/>	
A- Enzymes	234
I- L'Hydrogénase d' <i>Aquifex aeolicus</i>	234
I-1- Culture bactérienne.....	234

I-2- Biochimie	234
I-2-a- Purification de l'hydrogénase	234
I-2-b- Dosage protéique	235
I-2-c- Electrophorèse sur gel d'acrylamide	235
I-2-c-i- Condition dénaturante	235
I-2-c-ii- Condition native	235
I-2-c-iii- Révélation des gels	235
I-2-d- Tests d'activité hydrogénase	236
I-2-d-i- En cuve	236
I-2-d-ii- Sur gel en condition native	236
I-2-d-iii- Par électrochimie	236
I-2-e- Spectrométrie de masse (Trappe à ions)	237
I-2-f- Le Détergent DDM	237
I-2-f-i- Quantification du DDM	237
I-2-f-ii- Absorption du DDM par le traitement Bio-Beads	237
II- Les Bilirubine oxydases	237
II-1- Purification des enzymes	237
II-2- Spectres UV-vis	238
II-3- Mesure de l'activité des BODs	239
B- Matériaux	239
II- Les nanoparticules de carbone (CNPs)	239
II- Les nanotubes de carbone (CNTs)	239
II-1- Origine des CNTs	239
II-2- Fonctionnalisation des SW-CNTs (SW-CNTs-COOH)	240
III- Les nanofibres de carbone (CNFs)	240
III-1- Synthèse des CNFs	240
III-2- Traitements thermiques	240
III-3- Caractérisation des CNFs	240
III-3-a- Microscopie électronique à transmission et à balayage	240
III-3-b- Diffraction aux rayons X	241
III-3-c- Isothermes d'adsorption de l'azote	241
III-3-d- Désorption programmée en température couplée à la spectrométrie de masse (TPD-MS)	241
III-3-e- Isothermes d'adsorption d'eau	241

C- Electrochimie	242
I- Instrumentation	242
II- Conception des électrodes	242
II-1- Electrodes d'oxyde d'indium et d'étain (ITO)	242
II-1-a- Traitements	242
II-1-b- Mesure d'angles de contact	242
II-1-c- Adsorption de l'hydrogénase	243
II-1-d- ITO modifiée par les CNPs	243
II-2- Electrodes de graphite pyrolytique (PG)	243
II-2-a- PG nue	243
II-2-b- Film de DDM	244
II-2-c- Réduction des sels de diazonium	244
II-2-d- Electrodes de PG modifiées par des CNTs	244
II-2-d-i- SW-CNTS-COOH	244
II-2-d-ii- Couplage covalent de l'enzyme sur les SW-CNTs-COOH	244
II-2-c- Electrodes de PG modifiées par des CNFs	245
II-2-c-i- Hydrogénase	245
II-2-c-ii- Modification par le pyrène pour l'hydrogénase	245
II-2-c-iii- Bilirubine oxydase	245
II-2-c-ii- Electrodes de la biopile	245
III- Conditions opératoires des expériences électrochimiques	246
III-1- Hydrogénase	246
III-2- Bilirubine oxydase	246
IV- La Biopile H ₂ -O ₂	246
D- Bioinformatique	247
I- Modélisation de l'hydrogénase	247
II- Modèle de la BOD	247
E- Cas particuliers	247
I- L'Hydrogénase	247
I-1- Optimisation de la bioanode	247
I-2- Comparaison des types de fibres	248
II- La Bilirubine oxydase	248
II-1- Optimisation de la biocathode	248

II-2- Comparaison des types de fibres	248
II-3- Influence du NaCl sur les BODs	248
Annexes.....	250

Liste des abréviations utilisées

A

Aa Hase 1 : (*Aquifex aeolicus hydrogenase 1*) hydrogénase 1, tolérante à l'O₂, d'*Aquifex aeolicus*

ABTS : 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)

AFC : (*Alkaline Fuel Cell*) Pile à combustible alcaline

AFHYPAC : Association Française de l'Hydrogène et des Piles à Combustible

AQS : Anthraquinone

ATP : adénosine triphosphate

B

BFC: (*Bio Fuel Cell*) Biopile à combustible

BOD : Bilirubine oxydase

Bp BOD: Bilirubine oxydase de *Bacillus pumilus*

BRGM : Bureau de Recherches Géologiques et Minières

Bs BOD: Bilirubine oxydase de *Bacillus subtilis*

C

CA : Chronoampérométrie

CDH : cellulose déshydrogénase

CEA : Commissariat à l'Energie Atomique

CNT: (*Carbon NanoTube*) Nanotube de carbone

CV : (*Cyclic Voltammetry*) Voltammétrie cyclique

CVD : (*Chemical Vapor Deposition*) Dépôt chimique en phase vapeur

CYTCOX : (*Cytochrome c Oxidase*) oxydase à cytochrome c

D

DMP : Diméthoxyphénol

E

EDF : Electricité De France

Ec Hyd-1 : (*Escherichia coli Hydrogenase I*) Hydrogénase 1, tolérante à l'O₂, d'*Escherichia coli*

ENDOR : Terre du milieu (source J.R.R. Tolkien)

F

FAD : Flavine Adénine Dinucléotide

FDH : Fructose Déshydrogénase

G

GDH : Glucose Déshydrogénase

GOX : Glucose Oxydase

I

IEA : (*International Energy Agency*) Agence internationale de l'énergie

IR : Infra-rouge

K

KB : (*Ketjen Black*) Noir de carbone

L

LAC : Laccase

LBL : (*Layer by Layer*) méthode d'assemblage couche par couche

M

MCFC : (*Molten Carbonate Fuel Cell*) Pile à combustible à carbonate fondu

MEG : (*Metals Economics Group*) source d'information et d'analyse minières mondiales, auteur de la base de données MineSearch

Mo BOD : Bilirubine oxydase de *Magnaporthe oryzae*

Mv BOD : Bilirubine oxydase de *Myrothecium verrucaria*

MW-CNT : (*Multi-Wall Carbon NanoTube*) Nanotube de carbone multiparois

O

OCV : (*Open Circuit Voltage*) Tension en circuit ouvert

P

PAC : Pile à Combustible

PAFC : (*Phosphoric Acid Fuel Cell*) Pile à combustible à acide phosphorique

PECVD : (*Plasma Enhanced Chemical Vapor Deposition*) Dépôt chimique en phase vapeur assisté par plasma

PEMFC : (*Proton Exchange Membrane Fuel Cell*) Pile à combustible à membrane échangeuse de protons

PFV : (*Protein Film Voltammetry*) Voltammétrie d'un film protéique

PG : (*Pyrolytic Graphite*) Electrode de graphite pyrolytique

PQQ : Pyrroloquinoléine Quinone

R

Re MBH : (*Ralstonia eutropha Membrane-bound Hydrogenase*) Hydrogénase ancrée à la membrane, tolérante à l'O₂, de *Ralstonia eutropha*

RRDE: (*Rotating Ring Disc Electrode*) Electrode tournante à disque et à anneau

S

SAM : (*Self Assembled Monolayer*) Monocouche autoassemblée

SEIRA : (*Surface Enhanced Infra-Red Absorption*) spectroscopie infra-rouge exaltée de surface

S. enterica Hyd-5 : (*Salmonella enterica Hydrogenase 5*) hydrogénase tolérante à l'O₂ de *Salmonella enterica*

SGZ : Syringaldazine

SOFC : (*Solid Oxide Fuel Cell*) Pile à combustible à oxyde solide

SPR : (*Surface Plasmon Resonance*) Résonance des plasmons de surface

SW-CNT : (*Single-Wall Carbon NanoTube*) Nanotube de carbone monoparoi

T

TED : Transfert d'électrons direct

TEM : Transfert d'électrons médié

TNC : (*Trinuclear Center*) Centre cuivre trinuéaire formé des ions cuivre T2 et T3

Tt BOD : Bilirubine oxydase de *Trachyderma tsunodae*

U

UV: Ultra-violet

UV-vis: spectroscopie UV-visible

Introduction générale

Introduction générale

La consommation énergétique au niveau mondial repose essentiellement sur le charbon, le gaz naturel et le nucléaire pour la production d'électricité, et sur le pétrole pour le secteur des transports. Il en découle des problèmes liés à l'épuisement des ressources énergétiques, à l'augmentation constante de la demande en énergie, et à l'impact environnemental de sa production et de sa consommation.

L'épuisement des ressources en combustibles fossiles et nucléaires est prévisible à plus ou moins long terme. Les ressources prises en compte sont les réserves prouvées et considérées comme exploitables à un coût raisonnable avec la technologie existante. On considère ainsi qu'au rythme de consommation actuel, les ressources de pétrole seront épuisées d'ici une cinquantaine d'années ([source site d'EDF](#)). Les ressources de gaz couvriraient les besoins des 70 prochaines années, et le charbon, au rythme actuel d'extraction, pourrait encore être exploité pendant 230 ans. Quant aux ressources conventionnelles d'uranium, elles permettraient de faire fonctionner le parc nucléaire mondial pendant une cinquantaine d'années ([source site du CEA](#)).

Les ressources sont de plus inégalement réparties, entraînant la dépendance énergétique de certaines régions. L'Europe souffre ainsi d'une dépendance croissante vis-à-vis de l'importation de pétrole : elle importait environ un million de barils par jour en 2013, et en importera vraisemblablement près d'un million six-cent mille par jour en 2019. Il en découle non seulement des problèmes de coûts, mais surtout des problèmes géopolitiques, en particulier dans le cas du pétrole avec l'instabilité politique des principaux pays exportateurs comme l'Irak ou la Lybie ([source IEA](#)).

Avec la croissance de la population mondiale et l'industrialisation grandissante de pays émergents tels que l'Inde et la Chine, une explosion de la demande en énergie est encore à prévoir : elle pourrait augmenter de plus de 45% d'ici à 2030. D'ici à 2019, la demande en pétrole approchera par exemple 100 millions de barils par jour, soit une augmentation de 1,3% par an en moyenne ([source IEA](#)).

L'impact environnemental de la production actuelle d'énergie n'est enfin pas négligeable. L'utilisation des combustibles fossiles est en grande partie responsable de l'augmentation de la concentration des gaz à effet de serre (CO_2 , CH_4 , N_2O). A lui seul, le CO_2 issu de la combustion des énergies fossiles représente plus de 50% de l'augmentation des gaz à effet de serre, et sa durée de vie dans l'atmosphère est de plusieurs siècles ([source CEA](#)). La conséquence majeure est le réchauffement climatique constaté et à venir: les scénarios prévoient une augmentation d'1 à 4°C de la température globale d'ici à 2100 ([GIEC 2014 volume 2](#)). Quant aux combustibles nucléaires, ils sont à l'origine de la production de déchets radioactifs, pour le moment confinés et entreposés dans des conditions

strictes. Cette solution n'est cependant pas viable compte tenu de la radioactivité à long terme de certains des éléments, qui peut s'étendre sur plusieurs milliers d'années (source CEA).

La nécessité de trouver des solutions énergétiques pour l'avenir se fait donc pressante. Pour anticiper l'épuisement des réserves, il s'agit d'une part d'augmenter l'efficacité énergétique (augmenter les rendements, diminuer les pertes) pour les ressources déjà exploitées, et d'autre part de diversifier les sources d'énergie. De plus, il est absolument nécessaire de développer des énergies propres. La part des énergies renouvelables (hydraulique, éolien, solaire photovoltaïque, géothermie, biomasse) augmente ainsi pour la production d'électricité. La France s'est par exemple fixé l'objectif d'augmenter à 23% la part des énergies renouvelables d'ici à 2020. Dans ce contexte, le dihydrogène H_2 , molécule exceptionnellement énergétique dont la combustion ne produit que de l'eau, se présente comme un vecteur énergétique prometteur.

L'objectif de ma thèse s'inscrit dans le cadre de l'utilisation de l'hydrogène comme vecteur d'énergie grâce à un dispositif novateur, les biopiles enzymatiques H_2-O_2 . Elle concerne plus précisément l'étude de l'immobilisation d'enzymes redox à des matériaux carbonés pour la conception des bioélectrodes. Ce manuscrit se découpe en trois parties principales : tout d'abord une étude bibliographique, puis une présentation des résultats obtenus et enfin une description des matériels et méthodes utilisés.

Dans l'exposé bibliographique, je présenterai les avantages de l' H_2 comme vecteur énergétique, les piles à combustible et le concept de biopile enzymatique. Je dresserai l'état de l'art sur les biopiles enzymatiques. Je détaillerai les modifications de la structure et de la chimie de surface des électrodes. J'introduirai ensuite les deux classes d'enzymes mises en jeu dans le cas des biopiles H_2-O_2 , les hydrogénases à [Ni-Fe] et les bilirubine oxydases. Pour les premières, je mettrai l'accent d'une part sur les hydrogénases tolérantes à l' O_2 et les bases moléculaires de cette tolérance, d'autre part sur l'électrochimie des hydrogénases. Concernant les BODs, je tenterai de clarifier à l'aide de la littérature le mécanisme de réduction de l' O_2 , l'influence des ions halogénures, et le comportement électrochimique de ces enzymes. Enfin, je ferai le point sur l'état de l'art sur les biopiles H_2-O_2 , les récents développements et les limitations actuelles de ces systèmes.

Les études expérimentales d'une bioanode basée sur l'hydrogénase à [Ni-Fe] hyperthermophile tolérante à l' O_2 d'*Aquifex aeolicus* pour l'oxydation de l' H_2 , puis d'une biocathode basée sur la bilirubine oxydase thermostable de *Bacillus pumilus* pour la réduction de l' O_2 , et enfin d'une biopile H_2-O_2 mettant en jeu ces deux électrodes, seront ensuite successivement présentées et discutées.

Concernant la bioanode je chercherai dans un premier temps à valider le modèle proposé d'orientation de l'hydrogénase, à l'aide de l'électrochimie sur un substrat d'ITO, et de la modélisation

moléculaire. Je montrerai ensuite comment l'immobilisation de l'enzyme dans des réseaux nanostructurés formés de nanoparticules, de nanotubes, puis de nanofibres de carbone permet une connexion directe et efficace de l'enzyme, tout en affranchissant en partie du besoin d'une orientation spécifique. Je mettrai l'accent sur les processus limitant l'efficacité de l'hydrogénase dans ces matériaux, en particulier la limitation par le transport du substrat gazeux. Je proposerai finalement une analyse originale quant à la médiation de l'oxydation de l'hydrogène dans ce type de matériaux 3D.

L'étude de la biocathode s'articulera en deux points principaux. Tout d'abord je déterminerai les paramètres optimaux de connexion de l'enzyme sur les nanofibres de carbone pour la réduction catalytique de l'O₂ en l'absence de médiateur. Ensuite, une analyse électrochimique fine de l'influence des ions chlorures sur l'activité de réduction de l'O₂ par la bilirubine oxydase sera présentée. Cette analyse permettra de définir différents états de la BOD en fonction de paramètres tels que pH, température, potentiel. Je montrerai pour la première fois le lien entre l'inhibition de la BOD par les chlorures à bas pH et une forme « resting » récemment mise en évidence chez d'autres BODs.

Une biopile H₂-O₂ basée sur ces deux électrodes sera alors décrite. Je détaillerai l'importance des différents paramètres physico-chimiques et des conditions opératoires pour la conception d'une biopile H₂-O₂ fonctionnant à haute température. Je montrerai finalement les performances de cette biopile et en analyserai les limitations.

Synthèse Bibliographique :

Des biocatalyseurs pour une
nouvelle génération de piles à
combustible H₂-O₂

A- Un vecteur d'énergie prometteur : le dihydrogène H₂

I- Avantages du dihydrogène

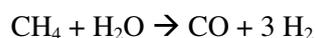
Le dihydrogène, appelé communément hydrogène, est un gaz incolore, inodore et non corrosif. Il n'est pas polluant puisque sa combustion ne produit que de l'eau. Mais c'est surtout une molécule extrêmement énergétique : sa combustion libère 120 MJ.kg⁻¹ (contre 45 MJ.kg⁻¹ pour l'essence). L'hydrogène a pourtant mauvaise réputation car il peut s'enflammer ou exploser au contact de l'air en milieu confiné. Toutefois les risques sont limités grâce à sa petite taille qui lui permet de diffuser très rapidement dans l'air, évitant son accumulation.

II- Sources d'H₂

Elément le plus abondant dans l'univers et le troisième plus abondant sur terre, le dihydrogène est cependant rarement isolé à l'état moléculaire. C'est donc un vecteur secondaire d'énergie. Il est produit essentiellement par reformage des combustibles fossiles, par électrolyse de l'eau et à partir de la biomasse.

II-1- Production à partir des combustibles fossiles

95% du dihydrogène est produit aujourd'hui par reformage des combustibles fossiles, principalement par vaporeformage du gaz naturel (40 à 50% [1]). Il s'agit d'une méthode de raffinage qui consiste à soumettre le carburant gazeux à de la vapeur d'eau, à une température de 800 à 1000°C et une pression de 13 à 20 bars, en présence d'un catalyseur à base de nickel. Le vaporeformage du méthane est décrit par les équations chimiques suivantes [1]:

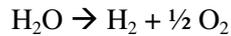


Le procédé nécessite des étapes de prétraitement du combustible brut avant le reformage en gaz de synthèse, puis de purification du mélange gazeux produit. Le vaporeformage est une méthode peu coûteuse puisque la production seule coûte 1,5 € / kg(H₂). Elle présente cependant le double inconvénient de libérer du CO₂ et de dépendre des combustibles fossiles.

II-2-Production par électrolyse de l'eau

Le dihydrogène est également produit par électrolyse de l'eau. Cette méthode consiste à imposer un potentiel de 1,7 à 2,1 V entre deux électrodes constituées d'un métal inerte dans la zone de

pH et de potentiel considérée, par exemple le platine. L'eau est alors dissociée électrochimiquement en dihydrogène et dioxygène suivant l'équation :



Ce procédé n'est pour le moment pas très rentable : pour des électrolyseurs industriels, le coût fluctue entre 5 et 30 €/kg H₂ suivant le prix de l'électricité. L'électrolyse de l'eau pourrait être un moyen de stocker de l'énergie pour les énergies alternatives, ce qui est expérimenté sur la plateforme Myrte (source site du CEA).

II-3-Production à partir de la biomasse

La production d'H₂ à partir de la biomasse est une méthode émergente. La biomasse est transformée soit par gazéification, soit biologiquement ou photo-biologiquement par l'intermédiaire de microorganismes [1]. Il existe plusieurs méthodes biologiques. La photobiolyse de l'eau par des micro-algues et des cyanobactéries libère de l'hydrogène selon l'équation :



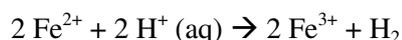
Lors de la photofermentation, des organismes anaérobies produisent de l'hydrogène en transformant des substrats organiques en présence de lumière. Lors de la fermentation sombre, l'hydrogène est libéré comme produit secondaire de la conversion de déchets organiques en acides organiques par des microorganismes anaérobies stricts ou facultatifs. L'hydrogène peut enfin être produit par électrolyse microbienne de la matière organique. Ce procédé couple une cathode à laquelle a lieu la réduction électrochimique des protons à une anode qui oxyde des substrats organiques en CO₂, grâce à un biofilm microbien qui joue le rôle d'électro-catalyseur. Le couplage de la fermentation et de l'électrolyse microbienne devrait permettre d'augmenter les rendements de conversion des sucres en H₂, mais cette méthode est pour le moment encore en étude en laboratoire.

Ces techniques ont l'avantage de reposer sur des ressources renouvelables, voire de permettre le recyclage de déchets, et d'avoir un bilan global neutre en gaz à effet de serre.

II-4-Sources naturelles d'H₂

Enfin, des sources naturelles de dihydrogène existent bel et bien: si elles étaient exploitables, l'hydrogène pourrait être considéré comme un vecteur primaire d'énergie. En 2002, d'intenses flux d'hydrogène émis par des «fumeurs noirs», cheminées d'où sortent des fluides hydrothermaux mêlés de gaz, ont été découverts sur la dorsale de l'Atlantique Nord [2]. Ces sources océaniques sont cependant difficilement exploitables. Des sources « terriennes » ont également été mises en évidence dans des roches ophiolitiques dans des aquifères à la surface de la Terre. Le dihydrogène est dégagé par une réaction chimique : le fer ferreux (notamment de l'olivine) est oxydé en fer ferrique (contenu

notamment dans la serpentine) et les protons de l'eau sont simultanément réduits en dihydrogène selon l'équation [3] :



Plus récemment des sources ont été découvertes dans les zones cratoniques qui dégagent un flux en production continue de 40 000 m³ par jour. L'exploitation ne nécessiterait pas de forage profond, et cette ressource renouvelable a de plus l'avantage d'être répartie équitablement sur la Terre (<http://sciences.blogs.liberation.fr/home/2013/04/lhydrogene-natif-une-nouvelle-source-denergie-.html>).

III- Utilisations du dihydrogène pour la production d'énergie

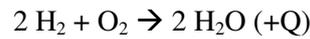
Au XIX^{ème} siècle, le dihydrogène est utilisé comme constituant du gaz de ville, dédié notamment à l'éclairage. De nos jours l'H₂ liquide sert de combustible pour la fusée Ariane, et l' H₂ gazeux peut être utilisé comme combustible dans les moteurs (BMW, Mazda). Mais son pouvoir énergétique le désigne surtout comme carburant privilégié pour les piles à combustibles. Un peu d'histoire...

En 1838, le Pr. C. F. Schönbein réalise une électrolyse de l'eau dans un tube en U en utilisant deux électrodes en platine. Lorsqu'il cesse d'imposer un courant, il remarque qu'un courant électrique circule en sens inverse. Son ami et correspondant, le juriste Sir W. Grove poursuit les expériences : en 1843, il présente la première pile à combustible (PAC) utilisant H₂ comme carburant et O₂ comme comburant dans *The London and Edinburgh Philosophical Magazine and Journal of Science*. D'autres intellectuels se montrent visionnaires : en 1875, Jules Verne écrit dans *l'Île mystérieuse* « Je crois qu'un jour l'hydrogène et l'oxygène fourniront une source inépuisable de lumière et de chaleur, d'une intensité dont le charbon n'est pas capable », et en 1884, le futur prix Nobel W. Ostwald déclare « La pile à combustible est une invention plus importante pour l'humanité que la machine à vapeur, et enverra bientôt le générateur Siemens dans les musées. ».

Ostwald se trompe. En 1859, l'américain Erwin Drake avait creusé le premier puits de pétrole en Pennsylvanie : le combustible de l'avenir était découvert. En 1897, Rudolf Diesel invente le premier moteur à combustion interne, et la pile à combustible est oubliée... Jusqu'aux travaux de l'ingénieur F. T. Bacon, qui, en 1953, réalise le premier prototype de PAC de puissance notable (de l'ordre du kW). Cette technologie est cependant peu exploitée : seule la NASA, dans les années 1960, utilise des PACs pour l'alimentation électrique de ses véhicules spatiaux Gemini et Apollo.

IV- Principe de fonctionnement de la pile à combustible

Depuis, la technologie des PACs a progressé et s'est diversifiée mais le principe demeure invariable. Dans un dispositif constitué essentiellement de deux électrodes séparées par un électrolyte et connectées à un circuit extérieur (Figure 1), la combustion électrochimique de l'H₂ produit de l'électricité et libère simultanément de la chaleur et de l'eau selon la réaction chimique globale :



Les réactions aux deux électrodes, thermodynamiquement favorables, sont à température modérée cinétiquement limitées, ce qui entraîne la nécessité d'utiliser des catalyseurs.

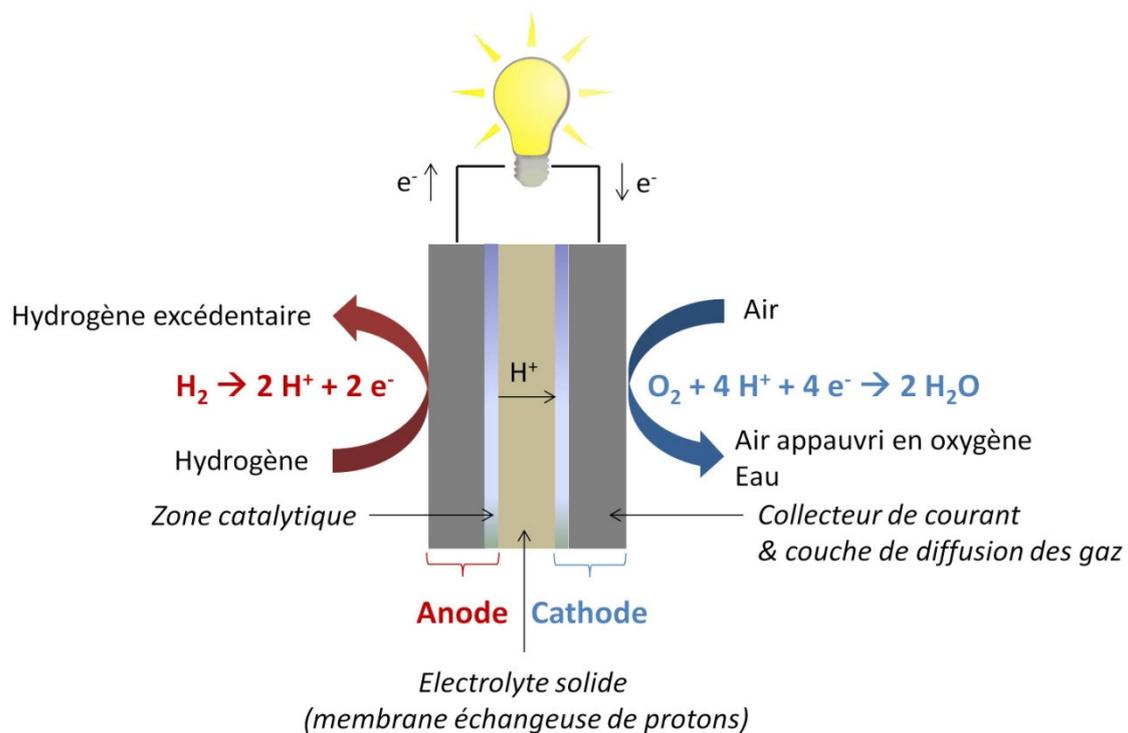


Figure 1- Principe de fonctionnement de la pile à combustible à membrane échangeuse de protons (PEMFC)

On distingue cinq principaux types de PACs utilisant le dihydrogène comme combustible. Leurs caractéristiques principales sont rappelées dans le tableau 1.

Type de pile à combustible	Electrolyte (Espèce ionique échangée)	Température de fonctionnement	Applications (gamme de puissance)
PEMFC (Pile à combustible à membrane échangeuse de protons)	Membrane polymère (H ⁺)	60-120°C	Portable, transports, stationnaire (10-100 MW)
PAFC (Pile à combustible à acide phosphorique)	Acide phosphorique (H ⁺)	160-220°C	Transports, stationnaire (200 kW-10 MW)
AFC (Pile à	Solution de potasse	50-250°C	Espace, transports,

<i>combustible alcaline)</i>	(HO ⁻)		stationnaire (1-100 kW)
MCFC (<i>Pile à combustible à carbonate fondu</i>)	Sels fondus (CO ₃ ²⁻)	650°C	Stationnaire (500 kW-10 MW)
SOFC (<i>Pile à combustible à oxyde solide</i>)	Céramique (O ²⁻)	600-1000°C	Transports, stationnaire (1 kW-10 MW)

Tableau 1- Principaux types de piles à combustible et leurs applications (source AFHYPAC 2013)

V- Un catalyseur problématique

L'utilisation de l'H₂ dans le secteur des transports reposerait essentiellement sur la technologie PEMFC, qui travaille à température modérée et présente de très bons rendements électriques. Pour la PEMFC, les réactions aux deux électrodes nécessitent l'emploi d'un catalyseur, généralement le platine. Or ce dernier coûte excessivement cher, environ 35 €.g⁻¹ (contre environ 30 €.g⁻¹ pour l'or et 50 ct.g⁻¹ pour l'argent) et son cours est très fluctuant.

De plus, la production mondiale du platine était de 192 tonnes en 2013, dont 140 tonnes pour l'Afrique du Sud, selon le US Geological survey. Or les électrodes des PACs contiennent environ 0,4 mg Pt.cm⁻² pour des performances de 0,7-0,8 W.cm⁻². Un véhicule léger équipé d'un moteur électrique de 75 kW utiliserait donc environ 40 g de platine, pour un coût de 1400 €, et la fabrication de 6 millions de véhicules avec cette technologie consommerait la totalité de la production mondiale. Enfin, les réserves de platine, qui s'élèvent à 42 615 tonnes (sources BRGM et MEG-MineSearch), ne suffiraient pas à renouveler entièrement le parc automobile mondial estimé à plus d'un milliard et 15 millions de véhicules en 2010 (source Freyssenet M., Parc automobile mondial, par continent et par pays, 1898-2011. Édition numérique, freyssenet.com, 2013 et mises à jour, 253Ko. ISSN 7116 0941).

Par ailleurs, un autre inconvénient non négligeable du platine est sa dégradation très rapide en présence d'un taux de monoxyde de carbone supérieur à 10 ppm à 80°C (source AFHYPAC). Or le dihydrogène issu du reformage des combustibles fossiles est accompagné de monoxyde de carbone à des taux non négligeables.

Le développement de la technologie des PACs H₂-O₂ ne se fera donc que si de nouveaux catalyseurs prouvent leur capacité à remplacer le platine. Des publications récentes décrivent l'utilisation de métaux non nobles pour l'oxydation du dihydrogène [4-5]. En particulier, les carbures de molybdène et de tungstène, les sulfures métalliques, les alliages de palladium et de nickel, et surtout d'iridium et de vanadium, montrent des performances prometteuses en termes d'activité et de stabilité. Pour la réduction du dioxygène, les macrocycles à base de porphyrine de fer ou de cobalt, les carbures, nitrures et oxydes de fer et de manganèse, et les chalcogénures de ruthénium, sont les

possibilités les plus étudiées. Néanmoins aucune de ces alternatives n'est pour le moment aussi efficace que le platine.

La nature offre une solution séduisante. En effet, dans la biodiversité, de nombreux microorganismes sont capables d'oxyder l'hydrogène et/ou de réduire l'oxygène pour générer un gradient de protons nécessaire à la production de l'ATP, leur réserve d'énergie. Ces réactions du métabolisme sont catalysées par des enzymes de la famille des oxydoréductases, des catalyseurs qui présentent les avantages d'être spécifiques, abondants, biodégradables et renouvelables. L'utilisation de ces biocatalyseurs mène au concept de *biopile à combustible* développé dans la partie suivante.

B- Les Biopiles enzymatiques

On définit une *pile biochimique à combustible*, conventionnellement abrégée en *biopile à combustible (BFC)*, comme une pile à combustible dans laquelle la réaction à l'une ou à l'autre des électrodes, ou aux deux, est catalysée par un agent biologique [6]. Ce dernier peut être une cellule entière, un organite cellulaire comme la mitochondrie, ou une enzyme. Dans la suite de ce manuscrit, on s'intéressera quasi exclusivement aux biopiles *enzymatiques* à combustible.

I- Les multiples avantages des enzymes

Les enzymes sont des électrocatalyseurs très actifs : des fréquences de turnover supérieures à 5000 s^{-1} sont ainsi proposées pour les hydrogénases à [Ni-Fe] [7]. On trouve dans la biodiversité des enzymes capables d'opérer dans des intervalles de pH et de température étendus avec de faibles surtensions, le pH pouvant varier de 0 à 14 et la température de 0 à 80°C . La grande diversité des enzymes permet aussi d'envisager l'utilisation de substrats variés, renouvelables, et dont les produits sont biodégradables. Extrêmement spécifiques vis-à-vis de leurs substrats, les enzymes peuvent dispenser de la compartimentation, coûteuse mais nécessaire dans les piles à combustible usuelles pour éviter les réactions croisées et les phénomènes de passivation qui peuvent avoir lieu aux électrodes de platine. Elles permettent ainsi la simplification de la conception d'une biopile, et sa miniaturisation. Enfin, elles sont biodégradables et renouvelables : contrairement au platine, une mise à l'échelle de leur utilisation se montrerait avantageuse économiquement.

II- Principe et grandeurs caractéristiques

Une biopile à combustible, comme une PAC classique, combine l'oxydation d'un carburant à l'anode à la réduction d'un comburant à la cathode : la première réaction libère des électrons consommés par la seconde, générant un courant électrique (Figure 2). Les réactions électrochimiques aux deux électrodes sont catalysées par des biocatalyseurs.

Une biopile à combustible est caractérisée par sa tension E_{cell} (V), par l'intensité du courant I (A) ou la densité surfacique de courant j ($\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$) traversant les électrodes, et par la puissance P (W) ou la densité surfacique de puissance $P_{\text{surfacique}}$ ($\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$), qui est le produit de ces deux facteurs :

$$P = E_{\text{cell}} \times I$$

$$P_{\text{surfacique}} = E_{\text{cell}} \times j$$

La tension E_{cell} à un courant I donné s'exprime comme la différence entre la force électromotrice thermodynamique $E_{\text{thermodynamique}}$, donnée par la différence entre les potentiels

thermodynamiques des enzymes (ou, le cas échéant, de leurs cofacteurs ou des médiateurs nécessaires au transfert électronique), et les sommes des surtensions d'activation $\eta_{act}(I)$, des surtensions dues au transport de matière $\eta_{conc}(I)$, et des pertes ohmiques dues aux diverses résistances internes R.

$$E_{cell} = E_{thermodynamique} - \sum \eta_{act}(I) - \sum \eta_{conc}(I) - I \sum R$$

La tension en circuit ouvert, souvent nommée OCV pour « Open Circuit Voltage », est la tension à courant nul [8]. Les performances d'une biopile sont généralement décrites par son OCV, sa puissance maximale, les courbes de polarisation ($E=f(j)$) et de puissance ($P_{surfacique}=f(j)$). Toutes ces caractéristiques sont résumées sur la figure 3.

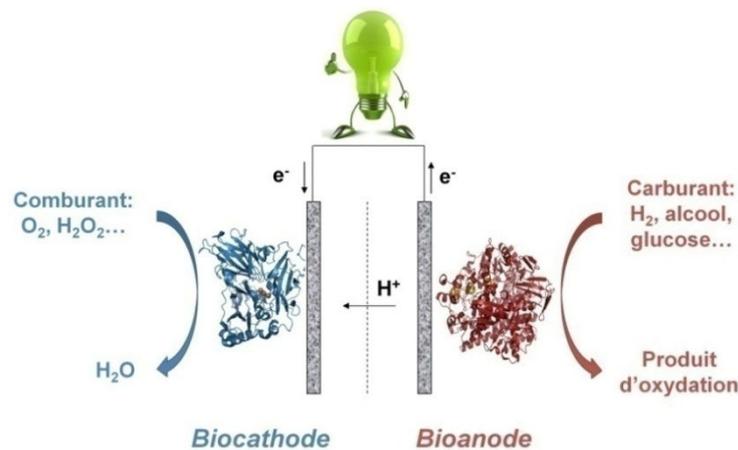


Figure 2- Schéma de principe d'une biopile à combustible

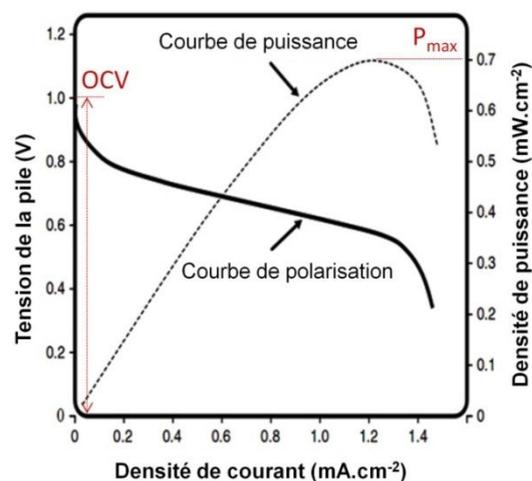


Figure 3- Variations de la tension et de la densité de puissance d'une biopile à combustible en fonction de la densité de courant (reproduit et adapté de <http://nptel.ac.in/courses/103102015/2>)

III- transfert électronique entre l'enzyme et l'électrode

La connexion électrique entre le catalyseur et l'électrode s'avère être l'un des défis majeurs du développement des biopiles enzymatiques. Dans le premier dispositif développé par Yahiro en 1964, qui repose sur l'oxydation à l'anode du glucose en gluconolactone par une glucose oxydase (GOX), la réduction du dioxygène est catalysée par la cathode en platine. La solution électrolytique contient le catalyseur anodique, la GOX, qui réalise donc la catalyse en phase homogène de l'oxydation du substrat, le glucose. Les électrons générés par la réaction sont cédés à l'électrode lors de collisions entre l'enzyme et l'électrode. La puissance générée est très faible : 99 nW.cm^{-2} [9]. En 1981, Plotkin *et al.* proposent un dispositif reposant également sur la catalyse enzymatique en phase homogène. Néanmoins, une molécule redox ajoutée en solution permet de jouer le rôle d'accepteur d'électrons pour l'enzyme. En cédant ensuite les électrons à l'électrode, elle assure le transfert électronique. La puissance est augmentée d'un ordre de grandeur : $1,5 \mu\text{W.cm}^{-2}$ [10]. En 1999, ce principe de médiation du transfert électronique est repris par Katz *et al.*, qui, de plus, greffent les enzymes à la surface de l'électrode, permettant d'obtenir une puissance de $3 \mu\text{W.cm}^{-2}$ pour la première biopile combinant des enzymes à l'anode et à la cathode [11].

Désormais l'enzyme est le plus souvent immobilisée à la surface de l'électrode, l'échange d'électrons entre l'enzyme et l'électrode peut alors avoir lieu selon deux mécanismes : le transfert d'électrons direct (TED) ou le transfert d'électrons médié (TEM), représentés schématiquement sur la figure 4.

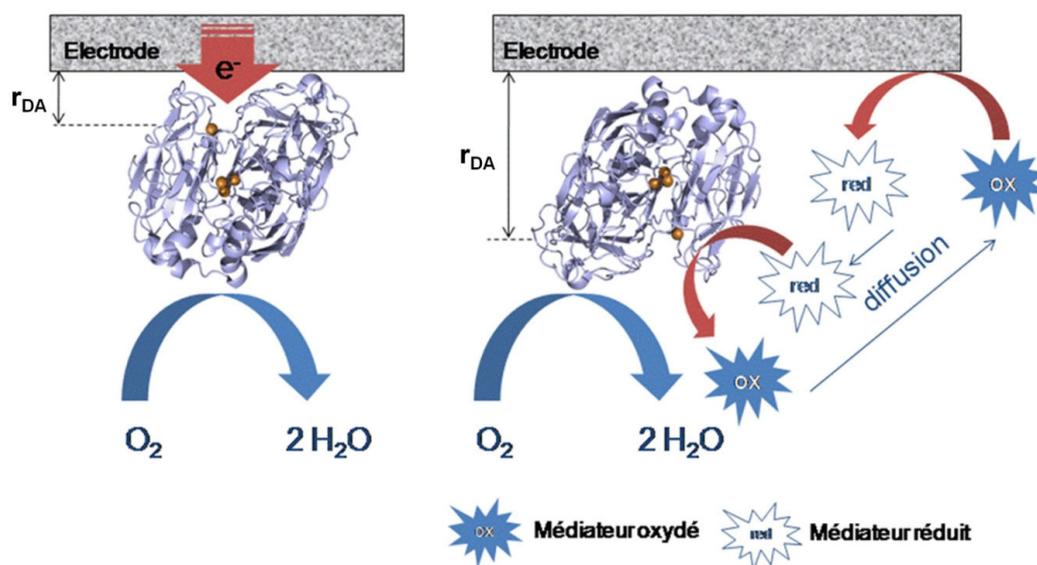


Figure 4- Mécanismes d'échange d'électrons entre l'enzyme et l'électrode : TED (à gauche) et TEM (à droite). Dans l'exemple, l'enzyme est une laccase, qui réalise la réduction à quatre électrons du dioxygène, et le médiateur peut être l'ABTS.

Dans le premier cas (TED), les électrons sont cédés directement à l'électrode lors de l'oxydation enzymatique du carburant, ou reçus directement de l'électrode lors de la réduction du comburant. Les mécanismes de transfert électronique interfacial sont dans ce cas expliqués par la théorie semi-classique de Marcus [12], selon laquelle la vitesse de transfert électronique interfacial est gouvernée par la force motrice de la réaction (ΔG°), l'énergie de réorganisation nucléaire (λ), et le couplage électronique (H_{DA}) entre le donneur D et l'accepteur A, selon :

$$k = \frac{1}{h} \frac{H_{DA}^2}{\sqrt{4\pi\lambda RT}} e^{-\frac{(\Delta G^\circ + \lambda)^2}{4\lambda RT}}$$

Cette vitesse de transfert électronique est proportionnelle au carré de la fonction de couplage électronique H_{DA} . Le modèle le plus simple dans le cas des protéines est le « square-barrier model », d'après lequel H_{DA} décroît exponentiellement avec la distance r_{DA} entre le donneur et l'accepteur, selon :

$$H_{DA}^2 = (H_{DA}^0)^2 e^{-\beta(r_{DA} - r_0)}$$

Où H_{DA}^0 est le couplage électronique à la distance de Van-der-Waals (r_0). Le paramètre tunnel β exprime l'efficacité de la protéine pour le transfert électronique. Il dépend de la structure de la protéine et varie entre 0,8 et 1,6 Å⁻¹ [12].

L'efficacité du transfert électronique décroît donc exponentiellement avec l'augmentation de la distance entre l'électrode et le centre redox de l'enzyme capable d'échanger les électrons avec l'extérieur. Cette expression théorique est vérifiée expérimentalement pour des protéines immobilisées sur des monocouches auto-assemblées (SAMs) d'alcanes : la constante de vitesse de transfert électronique apparent entre la protéine et l'électrode décroît exponentiellement avec l'augmentation du nombre de groupements méthyles [12-13]. Le TED n'est donc possible que si l'enzyme possède un centre redox suffisamment proche de la surface, et est positionnée dans une orientation favorable. Expérimentalement, le TED est enregistré jusqu'à une distance maximale de 15 Å entre le dernier relais électronique de l'enzyme et la surface de l'électrode. La catalyse démarre alors à un potentiel correspondant à celui du site redox de l'enzyme, modulé par la distance de ce site redox à l'électrode. La distribution d'orientations des enzymes à l'électrode se traduit par une distribution des vitesses de transfert électronique [14].

Dans le second cas (TEM), le transfert électronique peut se faire *via* une petite molécule redox mobile, le médiateur redox, qui joue le rôle de navette électronique entre un centre redox de l'enzyme et l'électrode. Ce médiateur peut diffuser librement ou être lié à une structure (polymère, gel...) qui lui permet de garder une certaine mobilité. La catalyse démarre alors au potentiel du médiateur redox, ce qui permet de distinguer les deux mécanismes. Le TEM est possible quand les potentiels redox de

l'enzyme et du médiateur sont suffisamment proches. Les performances sont optimales si la différence de potentiel ΔE° entre le centre redox de l'enzyme et le médiateur est aux alentours de 50 mV [15].

IV- Quelles enzymes pour quels substrats ?

Les électrocatalyseurs enzymatiques potentiels sont des oxydoréductases, enzymes impliquées dans les réactions du métabolisme qui mettent en jeu des transferts d'électrons. Dans quelques cas, qui ne seront pas décrits ici, seul le catalyseur anodique est d'origine biologique. Le platine est alors généralement utilisé à la cathode pour la réduction catalytique du dioxygène [9-10, 16-17] Quand, au contraire, seul le catalyseur cathodique est d'origine biologique, l'anode peut être une électrode de zinc [18-19], ou l'oxydation anodique du dihydrogène peut être réalisée par une électrode de platine [20].

IV-1- Cathode

A l'exception de quelques rares dispositifs utilisant le peroxyde d'hydrogène [21], le comburant est la plupart du temps le dioxygène. La réduction du dioxygène dans des biopiles à combustible est catalysée par des biocatalyseurs pour la première fois en 1999. Ces derniers sont une laccase (LAC) [20] ou une oxydase à cytochrome c (CYTCOX) [11], le transfert d'électrons étant médié respectivement par l'ABTS ou le cytochrome c. Les enzymes majoritairement utilisées depuis, en transfert direct ou en transfert médié, sont les LACs [22-27] et les bilirubine oxydases (BOD) [28-34].

IV-2- Anode

Les carburants sont essentiellement les sucres (glucose, lactose, fructose), le pyruvate, le lactate, certains alcools (méthanol, éthanol) et le dihydrogène [8, 35].

Depuis la première biopile à combustible, développée en 1964 par Yahiro [9], la GOX demeure un des catalyseurs préférentiels des bioanodes enzymatiques [32, 36-37]. Le but est notamment de concevoir des dispositifs implantables utilisant le glucose, un métabolite de densité énergétique élevée ($15,5 \text{ MJ.kg}^{-1}$) continuellement renouvelé dans les liquides physiologiques [38]. Les glucose déshydrogénases (GDH), enzymes dépendantes d'un cofacteur comme la pyrroloquinoléine quinone (PQQ) ou le flavine adénine dinucléotide (FAD), sont également très utilisées pour oxyder le même substrat [38-39]. L'oxydation du fructose peut quant à elle être réalisée par les fructose déshydrogénases (FDH) [32, 34, 40]. Les GDHs et FDHs présentent l'avantage de ne pas réduire l'oxygène, contrairement à la GOX. Elles évitent donc la compétition entre les réactions d'oxydation du substrat et de réduction de l' O_2 qui peuvent provoquer une baisse de potentiel en circuit ouvert, et une diminution des courants à un potentiel donné. L'oxydation d'autres substrats,

pyruvate, lactate, alcools, est réalisée respectivement par les pyruvate [41], lactate [42] et alcool [10, 43-45] déshydrogénases.

Enfin, la réaction anodique peut être l'oxydation du dihydrogène catalysée par les hydrogénases. L'utilisation de ce carburant présente, outre les avantages déjà cités, celui d'augmenter la tension de cellule, la différence de potentiel thermodynamique entre l'hydrogène et l'oxygène étant 1,23 V, soit le maximum atteignable en solution aqueuse.

V- Des performances « sur la paille » aux applications concrètes

Depuis le développement de la première biopile, de nombreuses études dans différents laboratoires à travers le monde ont permis l'évolution des techniques et des performances. Le tableau 2 décrit les caractéristiques de quelques biopiles enzymatiques parmi les plus puissantes à ce jour. La première ligne reporte, pour comparaison, les caractéristiques de la première biopile à anode et cathode enzymatiques développée en 1999. Il est à noter que les performances en termes de stabilité sont largement dépendantes de la méthode utilisée pour les évaluer : ainsi on peut difficilement comparer une opération continue à une opération ponctuelle répétée. L'évaluation de la stabilité en opération continue elle-même, généralement réalisée par chronoampérométrie à un potentiel fixé, dépend de la valeur de ce potentiel. Par ailleurs le calcul des densités de courants fait souvent débat : elles sont ici calculées par rapport à la surface géométrique de l'électrode, usage le plus largement répandu.

La capacité des systèmes à alimenter des dispositifs réels a dans certains cas été évaluée. Ceci peut se faire indirectement, par l'intermédiaire par exemple d'un condensateur chargé par la biopile qui, lors de sa décharge alimente un dispositif électronique [46]. L'alimentation directe nécessite généralement, pour obtenir une tension suffisante, la mise en série de plusieurs biopiles. Ainsi la mise en série de 4 biopiles fructose-O₂ permet le fonctionnement de DELs de 1,8 V pendant une soixantaine de jours [40] ; ou encore la mise en série de 3 biopiles fructose-O₂ flexibles conduit à un système délivrant une puissance maximale de 0,64 mW (2,6 mW.cm²) à 1,21 V capable d'allumer une DEL [32]. Enfin, des efforts de miniaturisation ont également été réalisés [32, 47-50]. Le dispositif cité précédemment a par exemple pour dimensions finales 1 x 0,2 x 0,11 cm³ [32]. De la même façon, une biopile développée à base de papier [48] ne mesure que 1,5x1,5cm² pour une épaisseur très faible puisqu'il s'agit d'une unique feuille de papier modifiée par un dépôt de nanotubes de carbone.

L'implantation de biopiles glucose-oxygène dans de nombreux organismes vivants démontre par ailleurs la capacité des dispositifs à opérer dans des conditions physiologiques de disponibilité des substrats, de T°, de pH, de concentration en NaCl, ainsi que la biocompatibilité des implants et la possibilité d'extraire de l'énergie des organismes vivants. En 2010 une biopile glucose-O₂, implantée

pour la première fois dans un rat, délivre 6 μW à une tension de 0,25 V [51]. Suivent alors des implantations dans des palourdes [52], des escargots [47], des cafards [53]... des homards, qui, montés en série, se montrent capables d'alimenter une montre [54], puis à nouveau dans des rats qui alimentent à leur tour des dispositifs électroniques [55].

VI- Limitations actuelles des biopiles : des défis à relever

Les densités de puissance délivrées, n'excédant pas le mW dans les dispositifs les plus performants, demeurent négligeables par rapport aux centaines de kW que sont capables de générer les piles à combustible conventionnelles. Les applications envisagées sont donc de moindres puissances : dispositifs portables, capteurs autosuffisants, petits appareils électroniques... De plus la stabilité des systèmes, évaluée sur des durées relativement courtes, laisse encore à désirer.

Pour que cette alternative énergétique soit viable, la puissance et la stabilité des systèmes doivent être améliorées. Ces objectifs imposent l'optimisation de l'immobilisation et de la connexion électrique de l'enzyme, la maximisation du nombre d'enzymes connectées efficacement à l'électrode, ainsi que la stabilisation de l'enzyme et de son immobilisation.

Année	Catalyseur anodique	Catalyseur cathodique	Matériau d'électrode	Conditions opératoires	Substrats	Membrane	Densité de puissance max	Potentiel en circuit ouvert	Stabilité	Réf.
1999	GOX + PQQ	CYTCOX + cytochrome c	Or + SAMs	∅	1 mM glucose - air	Non	5 $\mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$ à 60 mV	112 mV	Performances constantes sur 48h	[11]
2004	GOX dans polymère d'osmium	LAC dans polymère d'osmium	Fibres de carbone	sans agitation ; 100 mM citrate pH 5 ; 37°C	15 mM glucose - air	Non	400 $\mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$ à 0,88 V	1 V	∅	[56]
2007	FDH <i>Gluconobacter sp.</i>	LAC <i>Rhus vernicifera</i>	Noir de carbone (anode) / aérogel de carbone (cathode)	Agitation ; tampon McIlvaine pH 5 ; 25°C	200 mM fructose - O ₂	Non	850 $\mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$ à 0,41 V	0,79 V	Après 12 h, P=63% P _{initiale}	[40]
2009	GDH <i>Bacillus sp.</i> / NADH / Diaphorase <i>Bacillus stearrowthermophilus</i> / VK3	BOD <i>Myrothecium verrucaria</i> / K ₃ Fe(CN) ₆	Feuilles de fibres de carbone	1 M phosphate pH 7	0,4 M glucose - air	Oui	1,45±0,24 mW.cm ⁻² à 0,3 V	0,8 V	∅	[57]
2010	GOX <i>Aspergillus niger</i>	BOD <i>Trachyderma tsunodae</i>	Nanotubes de carbone (CNT) constituant des fibres microporeuses	sans agitation ; PBS 20 mM pH 7,2 ; 140mM NaCl ; 37°C	15 mM glucose - air	Non	740 $\mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$	0,73 V	20% de perte après 150 h d'opération	[37]

Année	Catalyseur anodique	Catalyseur cathodique	Matériau d'électrode	Conditions opératoires	Substrats	Membrane	Densité de puissance max	Potentiel en circuit ouvert	Stabilité	Réf.
2011	GOX <i>Aspergillus niger</i>	LAC <i>Trametes versicolor</i>	Disques de CNTs compressés	100 mM phosphate pH 7 ; 20°C	50 mM glucose – air	Non	1,3 mW.cm ⁻² à 0,6 V	0,95 V	Stabilité sur 30 jours sans opération	[58]
2013	FDH <i>Gluconobacter</i>	BOD <i>Myrothecium verrucaria</i>	Tissu carboné: + CNTs (anode) / + noir de carbone (cathode)	Electrolyte: hydrogel Mc Ilvaine 250 mM pH 5 ; cathode respirante	500 mM fructose – air	Non	950 μW.cm ⁻² à 0,36 V	0,74 V	Pertes importantes sur quelques heures	[32]
2014	FDH <i>Gluconobacter japonicus</i>	BOD <i>Myrothecium verrucaria</i>	Papier de carbone : + cryogel de carbone (anode) / + noir de carbone + bilirubine (cathode)	sans agitation ; 1 M citrate pH 5 ; 23 ± 2 °C ; cathode respirante	500 mM D-fructose – air	Non	2,6 mW.cm ⁻² à 0,46 V	0,79 V	Ø	[59]

Tableau 2- Caractéristiques et performances de quelques biopiles enzymatiques

C- L'électrode : une plateforme pour l'immobilisation fonctionnelle des enzymes

I- Les modifications volumiques, micro et nano-structuration : motivations

Les difficultés liées à l'utilisation d'enzymes comme électrocatalyseurs découlent de la fragilité des structures protéiques, mais aussi de l'anisotropie de leurs propriétés électroniques, et de leur taille importante qui limite l'efficacité catalytique surfacique. Une immobilisation performante doit maintenir l'activité catalytique de l'enzyme et permettre une connexion électrique efficace entre le site actif et l'électrode. La figure 5 représente les densités de courant à l'électrode et les constantes de vitesse de transfert électronique dans quatre cas limites de l'immobilisation de l'enzyme à l'électrode.

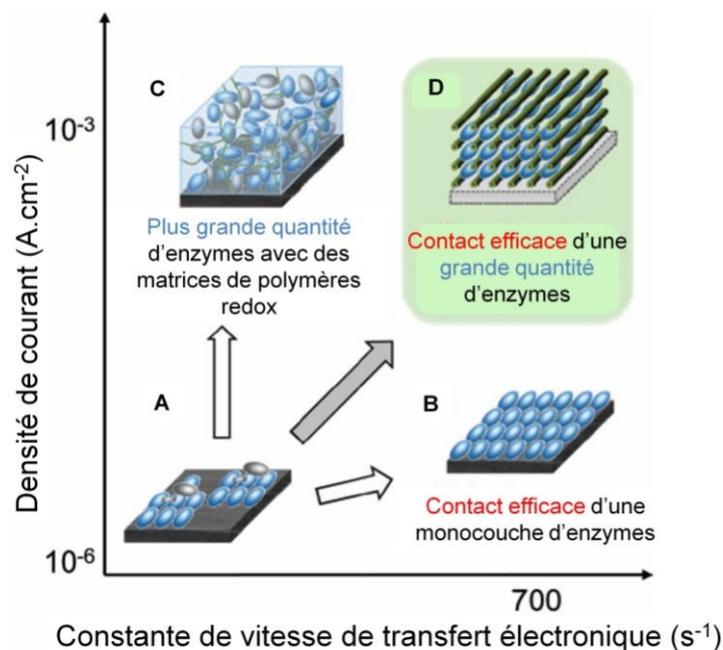


Figure 5- Représentation schématique de différents cas de figures de l'immobilisation d'enzymes à l'électrode adapté de [60].

Dans le cas A, une monocouche non compacte d'enzymes est immobilisée de façon aléatoire à la surface de l'électrode, conduisant à une faible densité de courant et une constante de vitesse de transfert électronique peu élevée. L'optimisation de l'efficacité du contact électronique, notamment grâce à la maîtrise de l'orientation de l'enzyme, conduit au cas B où une monocouche compacte d'enzymes est immobilisée de façon efficace à la surface de l'électrode. L'augmentation de la quantité d'enzymes immobilisées, grâce par exemple à l'utilisation d'une matrice polymère redox, conduit au cas C où un grand nombre d'enzymes est immobilisé sur une surface donnée. Le cas idéal est

représenté par le cas D où l'optimisation simultanée de ces deux paramètres est réalisée, permettant d'obtenir des constantes de vitesse de transfert électronique et des densités de courant élevées.

Les développements dans ce domaine s'articulent donc autour de deux problématiques : comment améliorer l'efficacité du contact électronique, ce qui suppose notamment la maîtrise de l'orientation de l'enzyme (Figure 5 B), et comment augmenter les quantités d'enzymes immobilisées sur une surface donnée, c'est-à-dire développer des méthodes permettant de connecter plus qu'une monocouche (Figure 5 C).

I-1- Limite de la densité de courant catalytique

L'immobilisation d'une monocouche d'enzymes redox à une électrode plane conduit à des densités de courant dont la limite supérieure théorique s'exprime selon l'équation suivante :

$$J_{max} = k_{cat} \times n \times F \times \Gamma_{max}$$

Où k_{cat} est la constante catalytique de turnover de l'enzyme, n le nombre d'électrons échangés, F la constante de Faraday, et Γ_{max} la concentration maximale d'enzymes à la surface de l'électrode. Or pour une monocouche d'enzymes, cette concentration maximale est définie par

$$\Gamma_{max} = \frac{n_{max,enzyme}}{S_{géométrique}}$$

Où $n_{max,enzyme}$ est la quantité de matière correspondant à une monocouche dense d'enzymes à l'électrode, et $S_{géométrique}$ la surface géométrique de cette électrode. La quantité $n_{max,enzyme}$ est elle-même donnée par :

$$n_{max,enzymes} = \frac{S_{géométrique}}{N \times S_{enzyme}}$$

Où N est le nombre d'Avogadro, et S_{enzyme} est la surface occupée par une enzyme à l'électrode. Le courant maximal peut donc s'exprimer en fonction uniquement de paramètres caractéristiques de l'enzyme :

$$J_{max} = k_{cat} \times n \times F \times \frac{I}{N \times S_{enzyme}}$$

En considérant un cas modèle où une enzyme de grande taille peut être assimilée à une sphère de diamètre 5 nm, une valeur raisonnable de $k_{cat} = 1000 \text{ s}^{-1}$ [61] et un nombre d'électrons $n=2$, comme c'est par exemple le cas pour l'oxydation de H_2 , la densité de courant maximale obtenue est $J_{max} \approx 1,6 \text{ mA.cm}^{-2}$. Une biopile enzymatique délivrant cette intensité surfacique et une tension de $V = 1,23 \text{ V}$, ce qui est la limite thermodynamique en solution aqueuse, délivrerait une densité de puissance limitée à la valeur restreinte de $P_{max} \approx 2 \text{ mW.cm}^{-2}$.

Cette valeur maximale correspond de plus à un cas optimal où la surface électroactive de l'électrode correspond à sa surface géométrique, où cette surface est totalement couverte par les enzymes, et où ces dernières sont elles-mêmes toutes électroactives et orientées de façon optimale. En réalité, les densités de courant mesurées à l'électrode plane varient selon le type d'enzyme mais dépassent rarement la centaine de microampères par centimètre carré.

I-2- Amélioration de l'efficacité du transfert électronique direct (TED)

Le TED n'est obtenu que lorsque la distance entre un relais électronique de l'enzyme et la surface de l'électrode est inférieure à la distance tunnel (cf. paragraphe B III) [62]. A une électrode plane, il n'est donc pas toujours possible de connecter directement l'enzyme à l'électrode, soit parce que le site actif de l'enzyme est trop profondément enfoui dans la protéine, comme cela a été décrit à de nombreuses reprises pour la glucose oxydase [63-66], soit parce qu'il est difficile d'orienter correctement l'enzyme pour positionner les relais électroniques à proximité de la surface [67].

L'utilisation de médiateurs redox comme navettes électroniques entre l'enzyme et l'électrode, peut permettre de surmonter ces limitations, d'améliorer la cinétique de transfert électronique et d'augmenter les densités de courant. L'immobilisation des enzymes dans des hydrogels redox à base de complexes d'osmium est notamment une stratégie efficace [68-69]. Ces hydrogels fournissent un environnement hydrophile qui aide à préserver l'activité enzymatique et facilite la diffusion des substrats et produits dans la matrice polymère. Le déplacement des charges dans le polymère s'effectue essentiellement par collision des centres redox. Cette méthode permet de s'affranchir à la fois des problèmes liés à l'orientation de l'enzyme et à la diffusion des médiateurs. Elle assure la connexion efficace de plus d'une monocouche d'enzymes. Ce procédé peut de plus être mis en œuvre pour différentes enzymes : BOD [70], LAC [71], GDH [72]... grâce à la possibilité de moduler le potentiel redox du complexe d'osmium.

La connexion directe des enzymes présente néanmoins des avantages non négligeables. Tout d'abord, les médiateurs redox sont souvent polluants, parfois toxiques ; de plus ce sont des molécules peu stables dont la durée de vie peut limiter celle du dispositif [73-75]. Les surtensions étant par ailleurs en général plus faibles sans médiateur redox, les biopiles peuvent atteindre de plus grandes différences de potentiel. Par ailleurs, favoriser uniquement le TED permet la simplification du système, notamment grâce à la possibilité de s'affranchir de la membrane nécessaire dans les BFCs pour éviter les réactions parasites lorsque les médiateurs sont en solution. Enfin, d'un point de vue fondamental, l'introduction de médiateurs ne permet pas l'étude par électrochimie des mécanismes catalytiques des enzymes, puisque la cinétique enzymatique est limitée par l'interaction entre l'enzyme et le médiateur.

La nanostructuration de l'électrode permet d'améliorer le TED de deux façons. D'une part, grâce à leurs dimensions nanométriques proches de celles des enzymes, certains nanomatériaux peuvent s'approcher suffisamment du site actif ou d'un relais électronique de l'enzyme pour agir comme des nanofils conducteurs connectant l'enzyme à l'électrode [76-78]. La nanostructuration de la surface est donc une façon d'améliorer l'efficacité du transfert électronique interfacial, en minimisant la distance du site actif de l'enzyme à l'électrode, et en optimisant ainsi les vitesses de transfert d'électrons. D'autre part, l'immobilisation de l'enzyme dans un réseau tridimensionnel restreint les problèmes liés à des orientations défavorables ou non spécifiques de l'enzyme à l'interface. Dans un tel environnement en effet, à condition que les pores ou les mailles soient de taille adaptée, la proportion d'orientations dans lesquelles tout point de la surface de l'enzyme est suffisamment proche de la surface de l'électrode pour permettre le TED est démultipliée [47, 79-81]. Enfin, la conductivité électronique de l'interface entre le catalyseur et l'électrode peut être améliorée par l'addition de matériaux conducteurs [82-84].

I-3- Stabilisation du biocatalyseur

La nanostructuration peut enfin avoir pour but de stabiliser l'immobilisation du biocatalyseur, soit en fournissant des sites réactifs permettant l'ancrage de la protéine, soit en définissant un environnement confiné qui stabilise la structure de la protéine [31, 81]. Ce dernier point présente le double avantage de réduire à la fois le décrochage ou le réarrangement de l'enzyme à la surface de l'électrode, et la dénaturation de l'enzyme qui provoque la perte d'activité catalytique. Ainsi la BOD de *Trachyderma tsunodae* (*Tt* BOD) immobilisée dans un matériau carboné mésoporeux se montre stable pendant 18 heures d'opération continue, alors qu'une perte de 50% est observée en 2 heures lorsque l'enzyme est immobilisée à une électrode de carbone vitreux. Ce matériau confère donc à la *Tt* BOD immobilisée la même stabilité qu'en solution. Les performances en termes de stabilisation dépendent néanmoins fortement de l'enzyme et du type de nanostructuration mis en jeu.

II- Quels matériaux utiliser pour structurer l'électrode?

La nano ou microstructuration de l'électrode doit permettre de connecter plus d'enzymes sur une surface géométrique donnée, et donc en théorie d'obtenir de plus grandes densités de courant. Pour augmenter la surface développée de l'électrode sans modifier sa surface géométrique, il est possible de développer un réseau tridimensionnel formé par l'arrangement de nanoparticules, ou de créer un matériau solide poreux. Les matériaux utilisés doivent présenter une grande porosité ou un rapport surface/volume élevé, une bonne conductivité électrique, posséder des sites suffisamment réactifs pour immobiliser efficacement l'enzyme, ou du moins pouvoir subir des traitements modifiant leur chimie de surface.

II-1- Matériaux carbonés

Les matériaux carbonés sont les plus usités en raison de leur facilité d'utilisation et de modification, de leur prix peu élevé par rapport à la plupart des matériaux bruts, et surtout de leur biocompatibilité. Les matériaux carbonés les plus répandus, représentés sur la figure 6, sont les nanotubes de carbone multiparois (MW-CNTs) [29, 32, 34, 48, 58, 83, 85-87] ou monoparois (SW-CNTs) [22, 30, 78, 82, 88-93], le graphène [27, 65, 76], le noir de carbone [30, 34, 40, 94], d'autres nanoparticules de carbone [42, 87, 95-96], le carbone mésoporeux [31, 81, 97-98]. Leurs propriétés dépendent majoritairement de leur architecture et de leurs conditions de synthèse.

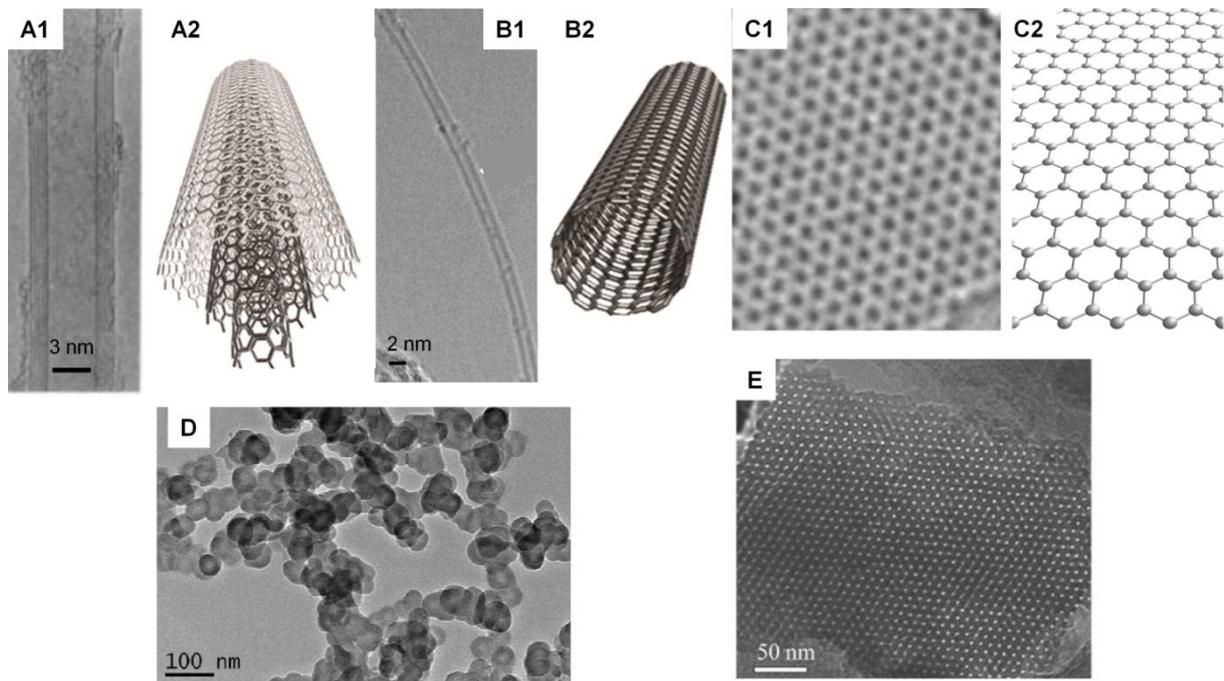


Figure 6- Matériaux carbonés A : MWCNT, A1 : Image MET [99], A2 : structure modèle ; B : SWCNT, B1 : Image MET [100], B2 : structure modèle ; C : Graphène, C1 : Image SECM (site de Berkeley), C2 : structure modèle ; D : noir de carbone, Image MET [101] ; E : Carbone mésoporeux [102].

II-1-a- Nanotubes de carbone

Les nanotubes de carbone, découverts en 1991 [99], peuvent être synthétisés par évaporation par arc, pulvérisation cathodique, dépôt chimique en phase vapeur (CVD) et dépôt chimique en phase vapeur assisté par plasma (PECVD). On distingue les nanotubes monoparois (SW-CNTs) constitués d'un unique feuillet de graphène enroulé sur lui-même, et les nanotubes multiparois (MW-CNTs) comportant deux feuillets ou plus distants de $3,4 \text{ \AA}$ [103]. Les diamètres sont de 0,4 à 3 nm pour les SW-CNTs, et de 1,4 à plus de 100 nm pour les MW-CNTs [104]. Ils combinent une résistance mécanique remarquable à des propriétés électroniques exceptionnelles dues à l'hybridation sp^2 des atomes de carbone. La conductivité des SW-CNTs varie ainsi globalement de 50 à 600 S.cm^{-1} [105].

De plus, ils sont très stables chimiquement et électrochimiquement, ce qui rend possible leur utilisation dans des conditions opératoires variées et sur une grande fenêtre de potentiel.

Suivant leur chiralité, c'est-à-dire l'orientation selon laquelle le feuillet de graphène est enroulé autour de son axe, les SW-CNTs ont un comportement métallique ou semi-conducteur. L'étude de l'immobilisation de l'hydrogénase [FeFe] de *Clostridium acetobutylicum* dans des réseaux de SW-CNTs a montré l'importance du comportement métallique pour un couplage électronique efficace avec l'enzyme [82]. Les densités des courants de réduction des protons et d'oxydation de l'hydrogène se montrent en effet plus élevées d'au moins un ordre de grandeur lorsque la proportion de nanotubes métalliques est importante. Néanmoins, la séparation des deux types de SW-CNTs étant difficile, ces derniers sont le plus souvent utilisés sous la forme de mélanges de proportions aléatoires [106]. Tous les MW-CNTs sont en revanche métalliques. Ceci ne suffit cependant pas à expliquer les différences encore peu comprises aujourd'hui entre les comportements des SW-CNTs et des MW-CNTs en bioélectrochimie [107]. Une tendance est difficile à établir, les SW-CNTs sont préférés pour certaines enzymes; pour certaines autres les MW-CNTs se montrent plus adaptés.

Dans des CNTs idéaux, seules les extrémités ouvertes seraient suffisamment réactives pour permettre le piégeage de protéines. En réalité, ce piégeage est aussi possible grâce aux défauts structuraux dans les parois des CNTs. Ces derniers peuvent également subir des traitements qui modifient leur chimie de surface ou créent des défauts supplémentaires. De nombreux sites d'ancrage des protéines sont ainsi créés, ce qui dans certains cas peut cependant fragiliser les CNTs ou altérer leur conductivité [108].

II-1-b Carbone mésoporeux organisé

Les matériaux mésoporeux sont caractérisés par des pores dont le diamètre est compris entre 2 et 50 nm. Parmi eux, le carbone mésoporeux organisé présente une porosité ordonnée. Il offre la possibilité d'ajuster la taille des pores par le choix du gabarit adapté lors de la synthèse, et d'obtenir une distribution hiérarchisée des tailles de pores. Celle-ci peut être adaptée en fonction de l'objectif à atteindre : diffusion efficace de l'enzyme, du substrat et du produit, piégeage de l'enzyme ou du médiateur. Elle peut également être ajustée en fonction de la taille de l'enzyme. Un volume total de pores élevé et une surface spécifique élevée (jusqu'à 2000 m².g⁻¹, en comparaison de 300 m².g⁻¹ pour les SW-CNTs [37]) peuvent être atteints. Ces matériaux sont en revanche en général moins conducteurs que les autres matériaux carbonés ($\approx 30 \text{ S.cm}^{-1}$) [109].

II-1-c- Nanoparticules de carbone

Le noir de carbone est constitué de particules sphériques dont les tailles varient de 10 à 500 nm, ce qui leur confère une aire spécifique électroactive élevée (jusqu'à 300 m².g⁻¹) [30]. Ces

particules très conductrices présentent en général une très grande capacité d'adsorption, qui permet l'immobilisation des enzymes par simple adsorption.

II-1-d- Graphène

Le graphène est un matériau très utilisé depuis une dizaine d'années pour l'immobilisation d'enzymes. C'est un cristal de carbone bidimensionnel dans lequel les atomes, liés par des liaisons sp^2 , sont disposés dans une configuration hexagonale. Il se comporte comme un semi-métal, présente une très grande conductivité électrique [110], et des stabilités mécanique et chimique exceptionnelles [65]. Les électrodes fabriquées à partir de graphène présentent une distribution de sites actifs bien plus uniforme que les électrodes de graphite [111-112]. Des structures tridimensionnelles sont formées grâce à l'empilement de plaquettes bidimensionnelles de graphène liées par des liaisons de Van der Waals [113]. L'intérêt fondamental du graphène en bioélectrochimie reste néanmoins encore à prouver.

II-2- Métaux et oxydes métalliques

Ces matériaux, ne constituant pas l'objet principal de ce mémoire, ne seront pas présentés en détail. Quelques exemples méritent néanmoins d'être mentionnés : les nanoparticules d'or [95, 114-119], les électrodes d'or nano-, méso-, ou macroporeux [120-121], les matrices de silice mésoporeuses [63, 122], ou les oxydes métalliques mésoporeux (SnO_2 , TiO_2 , l'oxyde d'indium et d'étain (ITO)) [123].

Bien que plus coûteuses que les matériaux carbonés, les nanoparticules d'or présentent des propriétés intéressantes. Leur conductivité électronique est élevée, leur surface spécifique importante grâce à leur taille nanométrique variant de 3,5 [118] à environ 20 nm [114-115, 117]. De plus, les propriétés de surface des nanoparticules telles que la charge électrique ou l'hydrophobicité peuvent être ajustées grâce à des modifications par des monocouches auto assemblées (SAMs) de thiols portant les fonctions terminales désirées. Enfin, d'un point de vue fondamental, les propriétés intrinsèques de l'or offrent la possibilité de coupler les études électrochimiques à des études spectroscopiques : SPR en exploitant l'effet de résonance plasmonique de surface, SEIRA en exploitant l'effet d'exaltation de l'absorption infrarouge.

Comme les carbones mésoporeux, les matrices de silice mésoporeuses possèdent une grande porosité, des tailles de pores ajustables, et une surface spécifique élevée. Elles sont en général bien moins conductrices que les matériaux carbonés, mais leur conductivité peut être améliorée par un revêtement de carbone [124].

III- Conception de l'électrode

III-1- Structuration de l'interface

Les propriétés de l'électrode structurée ne dépendent pas seulement des propriétés intrinsèques des matériaux utilisés, mais également de la méthode adoptée pour former ou modifier sa surface.

Les électrodes peuvent être constituées de matériaux qui sont en eux-mêmes très ordonnés. C'est le cas des électrodes d'or et de carbone mésoporeux, dont la structuration repose sur l'utilisation de gabarits eux-mêmes très ordonnés durant la phase de synthèse. On peut donc ajuster la taille des pores en utilisant les gabarits adéquats, ou concevoir une porosité multi-échelle. Cette dernière, réalisée par exemple grâce à l'utilisation des mousses de silice monolithiques comme gabarit solide [31], assure une bonne diffusion de l'enzyme et du substrat dans les pores et les canaux les plus larges, et une adsorption optimale de l'enzyme dans les pores les plus petits.

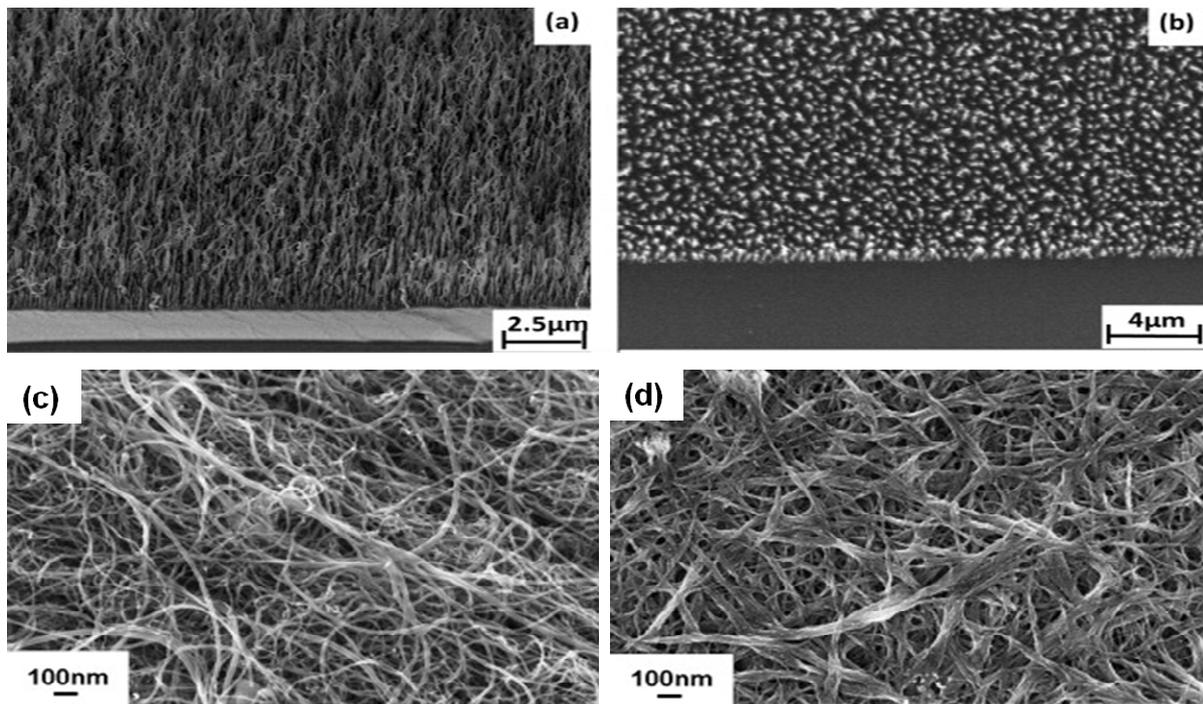


Figure 7- Images MET d'une vue de côté (a) et d'une vue de dessus (b) d'une forêt de CNTs alignés verticalement à faible grossissement (extrait de [125]) ; images MET d'un dépôt aléatoire de MW-CNTs (c) et de SW-CNTs (d) (extrait de [126]).

Quand des nanomatériaux sont utilisés pour structurer l'interface, l'ordre de la structure obtenue dépend sensiblement de la méthode de dépôt des particules à la surface de l'électrode plane. Certaines techniques conduisent à une interface ordonnée. C'est le cas des méthodes de Langmuir-Blodgett [83], des formations de films par dépôt électrophorétique [127], de la méthode d'auto assemblage couche par couche (LBL) qui consiste à plonger séquentiellement une électrode dans des

suspensions de nanomatériaux puis de polyélectrolyte de charges opposées [95-96, 128]. Les CNTs peuvent également être synthétisés directement sur le support conducteur de l'électrode par déposition chimique en phase vapeur, et constituer ainsi une forêt de CNTs alignés verticalement [85], comme le montre la figure 7 (a et b). Cette forêt peut également être obtenue en faisant croître les CNTs sur un support non adhésif de telle sorte qu'ils puissent être arrachés de ce substrat tout en conservant leur structure ordonnée [77]. Des monocouches ordonnées et homogènes ont aussi été obtenues par greffage de diazoniums sur une électrode de graphite permettant l'accroche covalente de nanoparticules d'or [84].

Cependant, le plus souvent, les nanomatériaux sont déposés de façon moins définie et s'auto arrangent à l'interface pour former une structure aléatoire (figure 7, c et d). Les nanomatériaux sont alors dispersés en phase liquide, puis soumis aux ultra-sons, pour former une suspension colloïdale dont un petit volume est déposé à la surface de l'électrode [78, 93, 114-115]. Différentes substances naturelles ou synthétiques peuvent être employées pour obtenir une suspension plus homogène, conduisant à un dépôt plus ordonné. En particulier, une meilleure dispersion des CNTs est assurée en utilisant des surfactants [32, 82], des polymères organiques [40, 94], des biopolymères biocompatibles comme le chitosane [30, 129] ou la cellulose, des lipides [86] ou même de l'ADN [89-90] comme liants. Une porosité multi échelle peut être obtenue en mélangeant des particules de tailles et formes différentes [76].

Enfin, la taille des pores entre les nanomatériaux peut être contrôlée par l'introduction de nanosphères de polystyrène de diamètre choisi. En suspension avec un nanomatériau carboné avant le dépôt sur l'électrode [130], ou déposées avec le nanomatériau carboné par dépôt électrophorétique [127], ces nanosphères sont ensuite éliminées grâce à un traitement thermique ou chimique, ne laissant que le squelette carboné. Un juste équilibre doit être trouvé dans les proportions respectives du matériau carboné et des nanosphères de polystyrène pour fournir la porosité désirée tout en évitant l'affaissement du réseau [130].

III-2- Modification de la chimie de surface des matériaux d'électrode

III-2-a- Pourquoi modifier la chimie de surface ?

La forte anisotropie des propriétés électroniques de l'enzyme impose de minimiser la distance entre le site actif et l'électrode pour améliorer le transfert électronique interfacial, et maximiser le transfert direct d'électrons à l'électrode. La nanostructuration de l'électrode est en partie introduite afin de lever ce verrou. Les modifications de la chimie de surface de l'électrode peuvent apporter un avantage supplémentaire, en permettant de contraindre et contrôler l'orientation de l'enzyme à la surface, grâce à des interactions favorisant un positionnement approprié [67, 131-132].

Un des enjeux majeurs des dispositifs électro-enzymatiques étant leur stabilité sur le long terme, il est également essentiel de stabiliser à la fois la protéine et son immobilisation à l'électrode. Il faut donc créer des interactions qui favorisent la fixation par liaisons faibles, ou des fonctions qui permettent la formation de liaisons covalentes [131]. Il est aussi possible de stabiliser la protéine en lui fournissant un environnement adapté, par exemple des imitations du substrat, comme l'antracène pour une laccase [133], ou du partenaire physiologique, comme une couche lipidique pour les protéines membranaires [134].

Le but de la modification (amélioration de l'orientation, de la stabilisation...) détermine, plus que le choix de la méthode, le choix de la fonction chimique terminale souhaitée à la surface de l'électrode, une même fonction chimique pouvant être greffée de différentes façons.

III-2-b- Stratégies de modification

Différentes méthodes ont été adoptées pour modifier chimiquement la surface de l'électrode : formation de monocouches auto-assemblées (SAMs), traitements oxydants, liaison par interactions π - π de composés aromatiques, réduction de sels de diazonium...

La formation de SAMs par chimisorption de groupements thiols sur les surfaces d'or fournit des monocouches ordonnées de longueur et de fonctions terminales modulables. Cette technique a permis notamment le contrôle de l'orientation de diverses enzymes : des hydrogénases [134-135], des bilirubine oxydases [136], des laccases [84]. Ses limitations sont liées en particulier à la relative faiblesse de la liaison S-Au, à laquelle est associée une énergie de liaison d'environ 185 kJ.mol^{-1} pour la cystéamine [137]. La désorption des SAMs à bas potentiel ou en milieu réducteur, ou la déstabilisation par la température, sont les conséquences possibles.

De nombreux traitements oxydants rendent possible la génération de fonctions superficielles oxygénées comme les groupements carboxyliques, cétones, quinones ou hydroxyles sur les surfaces de carbone. On peut citer le traitement par des solutions d'acide sulfurique ou nitrique bouillant [138], les traitements par l'air ou l'oxygène à des températures comprises entre 500 et 800°C [138], les traitements par plasma d' O_2 radiofréquence [139-140], ou encore les traitements oxydants électrochimiques qui utilisent le matériau carboné comme anode au potentiel de formation de l' O_2 dans des solutions aqueuses, de l'acide nitrique ou du dichromate de potassium [141-142]. Le nombre exact de fonctions formées par ces méthodes relativement agressives est cependant difficile à déterminer. De plus une corrosion de la surface est souvent observée, la rugosité de surface est altérée et les fibres et CNTs peuvent être détruits.

Les composés polyaromatiques s'adsorbent fortement sur les surfaces de graphite via des liaisons π - π (Figure 8) avec les cycles des plans de graphène, la force de l'adsorption augmentant avec le

nombre de cycles aromatiques [143-144]. En particulier le pyrène, composé de 4 cycles aromatiques très peu soluble dans l'eau, se montre très stable vis-à-vis de la désorption dans un électrolyte aqueux lorsqu'il est adsorbé sur une électrode de graphite [145]. La surface d'un nanotube de carbone étant constituée d'atomes de carbone dans un arrangement similaire à celui des plans de graphène, les groupements aromatiques peuvent se lier de la même manière irréversiblement aux parois des CNTs [132]. Les molécules polyaromatiques substituées par diverses fonctions chimiques permettent donc une fonctionnalisation non covalente des plans de graphite et des parois des nanotubes, qui présente l'avantage de préserver la structure du matériau [132].

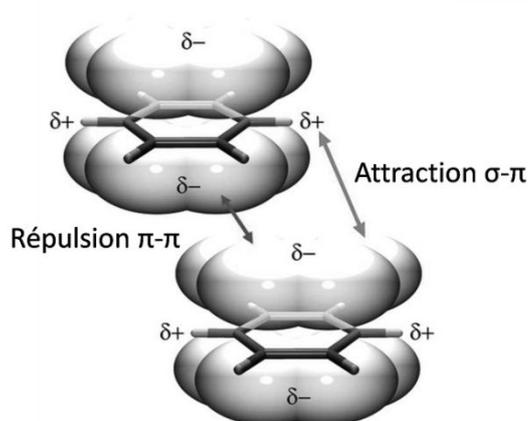


Figure 8 - Représentation schématique des interactions π-π, dont la résultante est une force faiblement attractive entre deux noyaux aromatiques.

La réduction des sels de diazonium est une technique développée par le groupe du Professeur Savéant en 1992 [146], dans l'objectif d'éviter les traitements oxydants mentionnés ci-dessus. Les matériaux carbonés peuvent ainsi être modifiés en milieu organique ou aqueux [146], et différents métaux dont l'or peuvent subir cette modification en milieu aprotique [147-148]. L'application d'un potentiel réducteur provoque la réduction à un électron du diazonium, le radical formé réagit avec la surface de carbone et une molécule de N₂ est libérée. Cette réaction mène à la liaison covalente de groupes aryles à la surface de l'électrode, qui demeure conductrice après modification [146]. De plus, les sels peuvent facilement être synthétisés in situ avant la réduction [147, 149]. La modification obtenue a l'avantage d'être très stable grâce à la force de la liaison covalente C-C, à laquelle est associée une énergie de liaison de 340 kJ.mol⁻¹ [150]. Elle persiste lorsque l'électrode est laissée sur la paillasse pendant plusieurs mois, et même après ultrasonication dans divers solvants organiques [146]. Cette méthode est polyvalente puisqu'il est possible de greffer une grande variété de groupes aryles, eux-mêmes chimiquement modifiables après l'étape de réduction [146]. Des couches organiques mixtes peuvent également être créées à la surface grâce à des stratégies de protection-déprotection [151-153].

III-3- Immobilisation de l'enzyme

Les différentes méthodes d'immobilisation, résumées dans la figure 9, reposent sur les interactions possibles entre l'enzyme et l'électrode.

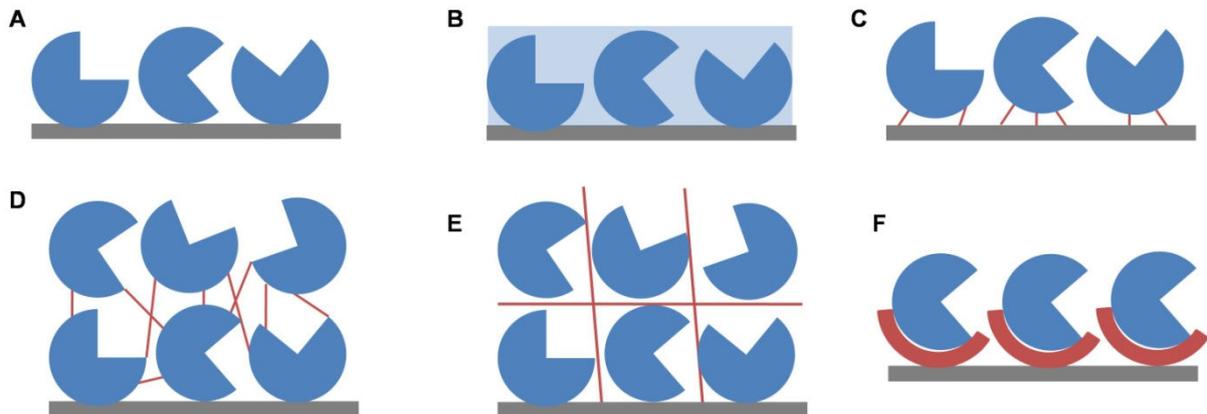


Figure 9- Différentes méthodes d'immobilisation de l'enzyme, représentée par le « camembert » bleu, à l'électrode : A : adsorption ; D : piégeage dans un sol-gel ou un hydrogel ; C : liaison covalente ; D : cross-linking ; E : piégeage dans un polymère ; F : auto-assemblage par affinité

On peut distinguer grossièrement les méthodes physiques et méthodes chimiques. Les premières comptent l'adsorption (physisorption) (Figure 9 A), le piégeage dans un hydrogel ou un sol-gel (Figure 9 B) et l'encapsulation. La liaison covalente (Figure 9 C), le cross-linking (Figure 9 D), le piégeage dans un polymère par électropolymérisation (Figure 9 E) constituent les principales méthodes chimiques. Plusieurs d'entre elles ont été adoptées pour l'immobilisation d'enzymes sur des électrodes nanostructurées.

III-3-a- Adsorption

La méthode la plus simple, et a priori la plus douce pour l'enzyme, est l'adsorption (physisorption), qui ne fait intervenir que des interactions faibles (liaisons électrostatiques, hydrophobes-hydrophobes ou de Van der Waals). Elle peut être réalisée sur des matériaux non modifiés [77, 82, 114-115]. Une influence néfaste de l'adsorption sur le matériau nu sur l'activité de certaines enzymes a cependant été montrée [25, 91]. La difficulté à attacher des enzymes sur des surfaces d'or ou de carbone non modifiées est aussi décrite [117]. D'autres approches ont donc été développées, comme l'utilisation de surfactants et de polymères biocompatibles [30, 40, 86, 89-90, 94], ou l'immobilisation après modification de la surface du matériau pour fournir à l'enzyme un environnement plus favorable et éviter la désorption. A titre d'exemples, la horseradish peroxydase est immobilisée sur un composite formé de microfibrilles de carbone et de CNTs modifiés par le pyrène hexanoïque acide, les carboxylates étant introduits pour augmenter l'hydrophilicité de la surface [154]. La BOD peut aussi être immobilisée sur des SW-CNTs modifiés par divers dérivés du pyrène

[155], la liaison du pyrène sur les SW-CNTs étant vérifiée par spectroscopie Raman avant adsorption de l'enzyme.

L'adsorption de l'enzyme peut être réalisée soit en incubant des nanoparticules dans la solution enzymatique avant dépôt sur électrode [25, 93], ou par incubation de l'électrode modifiée dans la solution enzymatique [30, 40, 82, 115], ou encore par dépôt d'une goutte de la solution d'enzyme sur l'électrode modifiée [78, 93, 129].

III-3-b- Encapsulation (polymères, sol-gels)

Des polymères tels que le Nafion® [27, 63], l'Eastman AQTM [156] ou la cellulose [58] permettent de former des membranes qui assurent un confinement étroit de l'enzyme à l'électrode. Bien que souvent utilisés en bioélectrochimie, ces polymères non conducteurs présentent des inconvénients non négligeables. Selon la charge de surface des enzymes, le Nafion® et l'Eastman AQTM, eux-mêmes chargés, peuvent n'être pas compatibles. Dans le cas du Nafion®, la taille des mailles du polymère n'est le plus souvent pas adaptée aux enzymes. Elle peut cependant être ajustée grâce à l'addition d'ions présentant une forte affinité avec les fonctions sulfonates, comme les bromures d'ammonium quaternaires. Cette modification a permis l'immobilisation fonctionnelle de plusieurs enzymes déshydrogénases (alcool, aldéhyde, glucose déshydrogénases) dans des membranes à base de Nafion® [157].

L'enzyme peut également être encapsulée dans des matrices inorganiques telles que les sol-gels de silice, ou dans des matrices polymères obtenues par électropolymérisation. Le TED est alors plus difficilement obtenu, mais peut être amélioré grâce au piégeage simultané de nanoparticules conductrices dans la matrice organique [87]. Le sol gel de silice peut ainsi être formé après adsorption de l'enzyme sur des SW-CNTs disposés aléatoirement [155] ou sur des forêts de nanotubes alignés verticalement [158].

III-3-c- Liaison covalente

Il est aussi possible de lier coalement l'enzyme à l'électrode. Cette méthode nécessite la fonctionnalisation préalable de la surface des nanomatériaux pour créer les fonctions chimiques nécessaires à la réaction, ou la modification de l'enzyme par ingénierie moléculaire [159-160]. Les méthodes de fonctionnalisation des surfaces utilisées sont essentiellement la liaison de pyrènes par interactions π - π [29, 47], le traitement acide, l'incubation dans des solutions de thiols pour créer des SAMs [114-115, 117], la réduction de sels de diazonium [84, 129].

Toutes ces méthodes sont suivies par une étape de liaison covalente qui fait la plupart du temps intervenir un cross-linker pour promouvoir la liaison entre un groupe réactif de l'enzyme et les fonctions chimiques portées par l'électrode modifiée. Différentes liaisons covalentes peuvent être

formées, suivant les fonctions mises en jeu à la surface de l'enzyme et de l'électrode. Par exemple l'activation de fonctions carboxyliques par un carbodiimide permet la formation de liaisons amides avec des amines ; l'oxydation des parties glycosylées fournit des groupements carbonyles qui peuvent former des liaisons imines avec les amines.

Quelques exemples faisant appel à des modifications de matériaux carbonés méritent d'être mentionnés. La liaison covalente d'une enzyme à un matériau carboné modifié par un dérivé du pyrène est ainsi introduite en 2008 par Göbel *et. al* [131]. Des MW-CNTs sont modifiés par π -stacking de différents composés aromatiques portant des groupements carboxyliques, en particulier la pyrroloquinoline quinone (PQQ). L'enzyme, une BOD, est alors liée covalamment aux composés aromatiques portés par les CNTs. En utilisant également la modification de CNTs par π -stacking de composés aromatiques, quelques études sont réalisées par la suite avec d'autres enzymes : la BOD de *M. verrucaria* [29, 161], la laccase de *T. verrucaria* [161] ou l'hydrogénase Hyd-1 d'*E. coli* [29].

La réduction de sels de diazonium permet de greffer une grande diversité des fonctions sur l'électrode, et donc d'adapter la modification de surface à l'enzyme que l'on désire lier. Cette méthode a ainsi été utilisée pour générer des fonctions permettant l'accroche covalente de diverses enzymes. On peut citer, sans être exhaustif, des glucose oxydases [162-163], des laccases [164], des hydrogénases à [NiFe] ou à [FeFe] [85, 165-166], une horseradish peroxydase [167], une cellobiose déhydrogénase [78].

III-3-d- Affinité : Interaction hôte-invité

Quand la structure tridimensionnelle de l'enzyme est connue et le permet, la modification de la chimie de surface peut avoir pour cible une interaction spéciale avec une région de l'enzyme. Un tel procédé tire ainsi parti de la poche hydrophobe entourant le cuivre T1 des laccases : un groupement polyaromatique hydrophobe peut en effet interagir avec cette cavité en imitant les interactions « hôte-invité » [133, 168-169]. La grande affinité entre l'enzyme et l'électrode qui en résulte entraîne une amélioration de la réduction bioélectrocatalytique de l'O₂ par la laccase connectée en TED, et la stabilisation du système même sans liaison covalente.

Ces groupements peuvent être introduits grâce à la liaison π - π sur des MW-CNTs hydroxylés de dérivés du pyrène portant un groupement anthracène [170], ou la fonction 1-(2-anthraquinonylaminométhyle), ou encore 1-[bis (2-anthraquinonyl)aminométhyle] [171]. Les fonctions nécessaires peuvent être également introduites par réduction des sels de diazoniums correspondants [133, 168, 172]. Les composés qui se révèlent les plus efficaces sont l'anthracène-2-diazonium [133] et le chrysène-2-diazonium [168].

IV- Conséquences sur les performances et limitations

IV-1- Augmentation des densités de courant grâce à la nanostructuration de l'électrode

La plupart des études bioélectrochimiques montrent que la nano ou microstructuration des électrodes contribue à augmenter les densités de courant. Certains exemples sont donnés dans le tableau 3. Il est cependant toujours difficile de comparer les résultats, dans la mesure où différentes définitions de la surface peuvent être utilisées pour le calcul des densités de courant (surface géométrique, surface développée, etc.).

L'amélioration observée peut parfois être reliée à une augmentation de l'activité enzymatique dans l'environnement nanostructuré [63, 90]. C'est par exemple le cas de la glucose déshydrogénase immobilisée dans un réseau de SW-CNTs entourés d'ADN dont l'activité mesurée en spectrométrie UV-vis se révèle plus de deux fois supérieure à l'activité mesurée en l'absence de SW-CNTs entourés d'ADN. Cependant, l'augmentation des densités de courant est généralement obtenue grâce à une augmentation de la quantité d'enzymes par unité de surface projetée. La nanostructuration de l'électrode permet l'augmentation des densités de courant par augmentation de l'aire surfacique électroactive de l'électrode. Le nombre d'enzymes connectées devrait donc *a priori* augmenter proportionnellement : on constate en réalité que ce n'est pas le cas, car le ratio entre surface et nombre d'enzymes est fortement dépendant de la taille de l'enzyme et de son affinité pour le matériau. La surface électroactive de l'électrode avant et après nanostructuration est dans la plupart des cas évaluée, en mesurant soit le courant capacitif en voltammétrie cyclique, soit la capacité de double couche en spectroscopie d'impédance électrochimique. L'augmentation des densités de courant est souvent très inférieure à l'augmentation de la surface. Par exemple, Miyake *et al.* décrivent une modification par des MW-CNTs conduisant à une multiplication par 100 de la capacité de double couche, et seulement par 10 du courant catalytique d'oxydation du fructose [32]. Dans d'autres cas, lorsque les électrodes sont recouvertes de SW-CNTs, la surface développée augmente proportionnellement à la quantité de CNTs tandis que les densités de courant catalytique atteignent rapidement un plateau [93].

Deux raisons principales peuvent expliquer ce phénomène. Tout d'abord, un manque de porosité adaptée du réseau tridimensionnel peut empêcher les enzymes d'accéder à toute la surface développée. Le nombre d'enzymes immobilisées n'augmente donc pas proportionnellement à l'aire développée, donc les densités de courant non plus. Une deuxième explication est que le nombre d'enzymes augmente effectivement proportionnellement à la surface, mais toutes les enzymes immobilisées ne participent pas au courant électrique, soit parce qu'elles ne sont pas connectées efficacement pour transférer directement les électrons à l'électrode, soit parce qu'elles sont dénaturées par l'immobilisation [81], soit encore parce qu'elles sont trop profondément enfouies dans le réseau

tridimensionnel et inaccessibles au substrat. En réalité très peu d'études ont rationnellement décrit ce phénomène [82], si bien qu'il peut encore être considéré comme un défi à relever.

Enzyme	Nanostructure	Densité de courant (mA.cm ⁻²)	Rapport $i_{\text{nanostructure}}/i_{\text{nue}}$	Référence
BOD	Carbone mésoporeux	2,1 ($\omega=1000$ rpm)	500	[31]
	SW-CNTs	0,9 ($\omega=0$)	300	[88]
[FeFe] Hase (production de H ₂)	SW-CNTs métalliques	≈12 ($\omega=5000$ rpm)	200	[82]
[NiFe] Hase (oxydation de H ₂)	SW-CNTs	1 ($\omega=0$)	10	[93]
	SW-CNTs	0,6 ($\omega=0$)	30	[88]
	MW-CNTs	4,1 ($\omega \rightarrow \infty$)	32,8	[85]
FDH	KB	10 ($\omega=0$)	100	[94]
CDH	AuNPs	0,015 ($\omega=0$)	30	[117]

Tableau 3- Exemples d'augmentation des densités de courant en TED obtenues grâce à la nanostructuration des électrodes

Dans certains travaux, le nombre d'enzymes *électroactives* immobilisées a été calculé par intégration des pics du signal non catalytique. Wang *et al.* calculent ainsi que l'immobilisation de la GOX sur de la silice mésoporeuse conduit à des quantités d'enzymes correspondant à trois fois une monocouche saturée, c.à.d. $5,23 \cdot 10^{-12}$ mol.cm⁻² [63]. Dans une autre étude, des films d'hybrides MW-CNTs/hydrogénase sont formés par la méthode de Langmuir-Blodgett. Les centres [FeS] des hydrogénases sont alors détectés par électrochimie, ce qui montre que l'addition de MW-CNTs permet d'immobiliser 3 fois plus d'enzymes, soit $4,23 \cdot 10^{-11}$ mol.cm⁻² [83]. Il faut noter qu'il s'agit d'un des très rares cas dans lesquels les signaux non catalytiques d'une hydrogénase ont pu être détectés.

Le nombre d'enzymes *actives* effectivement immobilisées à l'électrode a pu être déterminé grâce à des tests d'activité, et a ensuite été comparé au nombre d'enzymes qui prennent part au courant électrique. Ceci donne une estimation de la mesure dans laquelle la nanostructuration de l'électrode permet réellement un couplage électronique efficace entre l'enzyme et l'électrode. Par exemple les SW-CNTs entourés d'ADN permettent d'immobiliser 4 fois plus d'enzymes qu'une électrode plane, tandis qu'une multiplication par seulement 3 du courant est enregistrée [89-90].

D'autres dosages, qui permettent de déterminer la quantité *totale* d'enzymes immobilisées et non seulement la quantité électroactive, ont également été réalisés. Par exemple, un dosage par la méthode de Lowry a montré que la modification d'une électrode par l'addition de MW-CNTs conduisait à une multiplication par 4 de la quantité d'enzymes [90]. Le nombre de molécules d'hydrogénases à [NiFe] immobilisées dans une forêt de MW-CNTs a été quantifié grâce à la microscopie AFM, montrant la présence d'au minimum une enzyme tous les 20 nm [85]. Le couplage de l'observation par AFM à l'électrochimie montre que le courant catalytique est multiplié par 8 tandis que le nombre d'enzymes est multiplié par 33 comparé à une électrode de PG nue [85].

Enfin dans certains cas, l'estimation du nombre d'enzymes montre que l'espace occupé par les enzymes reste très inférieur à la surface développée. Mano *et al.* calculent ainsi que la quantité de BOD immobilisée dans l'électrode mésoporeuse correspond à l'occupation de seulement 20% de la surface développée accessible à l'enzyme, mesurée par porosimétrie par intrusion de mercure [31].

Nous pouvons donc conclure que les deux facteurs mentionnés ci-dessus sont responsables de la disproportion enregistrée entre l'augmentation des densités de courant, et l'augmentation correspondante de la surface : l'aire développée n'est pas entièrement saturée par les enzymes, et toutes les enzymes immobilisées ne participent pas au courant électrique.

IV-2- Amélioration du transfert direct d'électrons

Les dimensions adaptées des nanoparticules [65], ou le fait d'immobiliser l'enzyme dans un réseau tridimensionnel conducteur [30-31, 47, 77, 98] permettent effectivement dans certains cas de favoriser un processus de TED.

Le cas de la glucose oxydase vaut particulièrement la peine d'être mentionné. Un certain nombre d'études décrivent la connexion électronique directe de l'enzyme à l'électrode grâce à l'utilisation de nanoparticules. Dans certains cas, il est clair que ces nanomatériaux permettent l'immobilisation fonctionnelle de l'enzyme à l'électrode puisque des courants à la fois catalytiques et non catalytique au potentiel du site actif FAD sont enregistrés. Lorsque la GOX est liée covalamment, l'oxydation du glucose peut être accompagnée d'une décroissance de la valeur de K_M et de l'activité catalytique apparente. Ces variations des paramètres catalytiques de l'enzyme supposent des changements structuraux encore inexpliqués [160]. Dans d'autres cas en revanche, la preuve d'une connexion directe est plus discutable puisque le signal non-catalytique correspondant au signal redox réversible de la FAD ne se traduit pas en vague catalytique en présence de substrat et en l'absence de médiateur redox [27, 159, 173]. Le signal redox non-catalytique peut alors plutôt être attribué à de l'enzyme dénaturée qui libère la FAD [78].

Une façon de promouvoir le TED est de stimuler une orientation favorable de l'enzyme grâce à des interactions spécifiques, qu'elles soient électrostatiques [65, 78], hydrophobes [83] ou covalentes [85, 88].

Ces interactions peuvent être permises par les modifications de la chimie de surface décrites plus haut. Ainsi, en favorisant l'orientation optimale de la laccase, la modification de l'électrode par réduction de l'anthracène-2-diazonium multiplie par 6 les courants catalytiques mesurés avec la laccase de *Pycnoporus cinnabarinus* [133]. De la même manière, la modification de l'électrode avec le chrysène-2-diazonium multiplie par 4 les courants catalytiques mesurés avec la laccase de *Trametes versicolor* [168]. De façon intéressante, une électrode modifiée avec l'anthracène-2-diazonium se révèle inadaptée pour l'immobilisation de l'hydrogénase de *Ralstonia metallidurans*, ce qui souligne la spécificité du couplage [133]. La horseradish peroxydase immobilisée sur un matériau carboné modifié par le pyrène-acide hexanoïque adopte également une orientation préférentielle, qui permet la réduction de H_2O_2 à des potentiels de 610 mV vs. Ag/AgCl à pH 7 [154]. De la même manière, l'effet du pyrène sur le TED pour une BOD immobilisée sur des SW-CNTs est drastique. La réduction de l' O_2 en l'absence de pyrène est très lente, et $i_{max}=200 \mu A.cm^{-2}$; en présence de pyrène elle est beaucoup plus rapide et $i_{max}=400 \mu A.cm^{-2}$ [158].

Dans les cas où l'enzyme est liée covalamment à l'interface, il faut souligner que l'orientation de l'enzyme est déterminée par la position des acides aminés qui peuvent réagir chimiquement avec l'interface pour former une liaison covalente. La présence des fonctions réactives désirées à proximité d'un relais électronique à la surface de l'enzyme rend possible un positionnement favorable dans lequel la distance entre l'électrode et le relais électronique est minimisée [88]. De plus, comme le montre une étude réalisée par Gutierrez-Sanchez et al. [129] la nature de la liaison covalente peut promouvoir une orientation plus ou moins favorable selon les acides aminés qu'elle met en jeu. Dans cette étude la laccase de *Trametes hirsuta* est immobilisée sur un composite formé de microfibrilles de carbone et de CNTs par liaisons covalentes amides ou imines. Le premier type de liaison, qui met en jeu les fonctions carboxyliques de la surface de la protéine, promeut une orientation défavorable pour le TED pour une grande proportion d'enzymes. Le deuxième type de liaison, qui fait intervenir des fonctions aldéhydes générées par l'oxydation de la couche glycosylée de l'enzyme, se révèle favorable au TED. Les propriétés structurales de l'enzyme peuvent expliquer ces deux résultats. En effet, les groupements carboxyles qui interviennent dans la formation des liaisons amides sont majoritairement situés à l'opposé du site accepteur d'électrons de la laccase, le cuivre T1. Au contraire, les fonctions aldéhydes mises en jeu dans la formation des fonctions imines sont situées à proximité de ce cuivre T1.

IV-3- Stabilisation de l'enzyme

La stabilité des électrodes enzymatiques a dans plusieurs cas été améliorée grâce à la nanostructuration de l'électrode. Il doit être souligné que ce paramètre est difficile à évaluer, car l'instabilité d'un signal électroenzymatique peut mettre en jeu plusieurs facteurs (dénaturation de l'enzyme, détachement de l'enzyme de l'électrode, instabilité du revêtement de l'électrode...) dont les participations respectives sont difficiles à discriminer.

L'accroissement de stabilité peut être dû à une diminution du décrochage de l'enzyme de l'électrode, en particulier lorsque les modifications permettent une liaison covalente entre l'enzyme et l'électrode [29, 85, 161].

Dans les travaux qui n'utilisent pas de cross-linker, la meilleure stabilité peut être reliée au confinement étroit de l'enzyme à l'électrode [58], ou à des défauts particuliers de la surface des nanomatériaux, qui optimisent le piégeage de l'enzyme et mènent à des stabilités semblables à celles observées en solution [31]. L'encapsulation dans un sol gel peut permettre également l'amélioration de la stabilité du signal [155].

Cette amélioration peut enfin être reliée à un environnement plus favorable grâce à l'amélioration des liaisons électrostatiques [78], ou hydrophobes [133, 168] ou à d'autres phénomènes pour l'instant difficilement explicables comme dans le cas des CNTs-ADN [90]. L'immobilisation de l'enzyme peut aussi amener une meilleure résistance aux inhibiteurs [58] ou aux protéases présentes dans le sérum comme la trypsine [90], probablement grâce à la protection du site actif dans un environnement nanostructuré.

IV-4- Diffusion de l'enzyme et de son substrat

Un autre point à considérer est le contrôle du transport de matière dans le réseau tridimensionnel conducteur qui forme l'électrode. La structure doit permettre la diffusion des molécules d'enzymes, lorsque l'enzyme est immobilisée après la formation du réseau, et le transport des substrats vers l'enzyme ainsi que des produits depuis l'enzyme.

Les quantités d'enzymes immobilisées étant augmentées, le transport de masse dans l'électrode 3D peut devenir limitant dans le cas d'enzymes extrêmement actives. Ce phénomène est couramment décrit et étudié via les équations de Levich ou de Koutecky-Levich [31, 174]. D'autres modèles sont développés pour mieux rendre compte de la porosité de l'électrode [175]. Mano *et al.* [31] et Bartlett *et al.* [174] ont récemment décrit comment le transport de masse contrôle la réaction de réduction du dioxygène avec respectivement une BOD et une laccase immobilisées dans des réseaux carbonés tridimensionnels. Dans ces cas, les densités de courant peuvent être augmentées par la

rotation de l'électrode [31, 174] ou par agitation de l'électrolyte [98]. Toutefois, ces méthodes consommatrices d'énergie ne peuvent être envisagées dans le contexte des EBFCs, de telle sorte que des méthodes plus viables doivent être trouvées.

Les pores de la matrice carbonée contribuent à augmenter l'efficacité des électrodes modifiées en permettant la diffusion radiale. Mais les performances, et particulièrement le courant catalytique, sont influencées par la taille des pores [98]. La difficulté est donc d'adapter la taille des pores : des pores de taille supérieure à celle de l'enzyme peuvent amener son décrochage et une faible stabilité, tandis que des pores trop étroits empêchent une diffusion efficace de l'enzyme [98] et peuvent être obstrués par les molécules d'enzymes [176]. Dans ce cas, ces dernières n'ont pas accès à l'environnement stabilisant du matériau mésoporeux et perdent rapidement leur activité [177]. La porosité hiérarchisée proposée par le groupe de Mano [31] permet, grâce aux différentes tailles de pores, d'adapter un même matériau à la fois à la diffusion efficace de l'enzyme, à son confinement étroit, et à la diffusion du substrat. Une porosité multi-échelles peut également être obtenue en mélangeant des particules de différentes tailles. Par exemple, un matériau carboné de structure hiérarchisée a été obtenu grâce à la croissance de CNTs sur des microfibrilles de carbone [129], fournissant une surface développée élevée pour l'immobilisation de l'enzyme, et permettant la diffusion efficace du substrat vers le biocatalyseur. Une autre étude décrit l'utilisation simultanée de SW-CNTs dont les dimensions sont $D=1,1$ nm et $L=0,5-100$ μm , et de particules de noir de carbone sphériques de diamètre moyen 40-50 nm possédant une porosité interne [30]. Le résultat est un matériau composite très conducteur dans lequel les particules sphériques fournissent une aire développée élevée et sont connectées électriquement entre elles grâce aux SW-CNTs. Cette structure présente aussi une porosité favorable qui permet à l'enzyme diffusant dans la matrice d'être ensuite immobilisée efficacement dans les nanopores des particules de noir de carbone.

Une étude de Miyake *et al.* propose une autre méthode pour tirer parti de la surface développée des SW-CNTs, en montrant qu'une forêt de CNTs peut s'arranger dynamiquement autour de molécules d'enzymes en solution [22]. Par ailleurs, d'autres études décrivent l'adsorption des enzymes sur les nanoparticules avant la formation du réseau 3D à l'électrode [25, 93], ce qui permet de s'affranchir de la diffusion de l'enzyme, et pourrait en même temps réduire les risques de détachement de l'enzyme, sans pour autant régler les problèmes de diffusion du substrat.

Dans le cas d'un substrat gazeux, une solution peut être l'utilisation d'une électrode respirante. Cette dernière constitue une paroi de la cellule électrochimique, et communique sur une face avec l'électrolyte, sur l'autre avec l'environnement extérieur. Cette seconde face permet l'approvisionnement direct en substrat gazeux.

Cette étude bibliographique met en évidence que les biocatalyseurs ne peuvent être considérés comme de simples nanoparticules. Leur taille, l'anisotropie de leurs propriétés électroniques,

l'enfouissement possible de leur site actif, les particularités dues à leur nature protéique, sont autant de spécificités non négligeables lorsqu'il s'agit d'utiliser les enzymes comme catalyseurs. Seule la connaissance approfondie des enzymes mises en jeu peut donc permettre des avancées dans les procédés biotechnologiques.

D- Une bioanode pour la biopile H₂-O₂ : les Hydrogénases à [NiFe]

Les hydrogénases sont les métalloenzymes qui catalysent la réaction réversible de conversion de l'hydrogène en protons dans de nombreux microorganismes. Elles se distinguent par le contenu de leur site actif constitué d'un ou de deux atomes de fer (hydrogénases à [Fe] ou à [FeFe]) ou d'un atome de nickel et d'un atome de fer (hydrogénase à [NiFe]) ; par leur activité de production ou d'oxydation de l'hydrogène ; et par leur localisation dans les cellules bactériennes [79]. Les hydrogénases à [NiFe], très répandues chez les bactéries et les archées, sont surtout mises en jeu dans l'oxydation de H₂ afin de mettre le fort pouvoir réducteur de ce substrat à disposition de l'organisme. Chez certaines de ces hydrogénases, une des cystéines coordonnant le nickel est remplacée par une sélénocystéine, définissant le sous-groupe d'hydrogénases à [NiFeSe] [178]. Les hydrogénases à [FeFe] sont quant-à elles surtout impliquées *in vivo* dans la production de H₂ pour stocker le surplus d'électrons accumulés pendant la fermentation [179].

Les hydrogénases à [NiFe] peuvent elles-mêmes être classées en 4 groupes déterminés par la phylogénie moléculaire : le groupe 1 contient les hydrogénases membranaires et solubles consommatrices d'H₂ ; le groupe 2 les hydrogénases cyanobactériennes consommatrices d'H₂ et les hydrogénases capteurs d'H₂ ; le groupe 3 les hydrogénases réductrices de F₄₂₀, NAD(P)⁺, méthylviologène, et les hydrogénases bidirectionnelles réductrices de NAD(P)⁺ ; et le groupe 4 les hydrogénases énergétiques [180]. Ce mémoire se focalisera essentiellement sur les hydrogénases à [NiFe] du groupe 1.

I- Structure

Les hydrogénases à [NiFe] sont des enzymes de haut poids moléculaire (≈ 100 kDa) qui ont en commun une structure constituée de deux sous-unités : une grande sous-unité, dans laquelle le site actif est profondément enfoui, et une plus petite sous-unité qui contient trois relais électroniques composés d'atomes de fer et d'atomes de soufre [79] (Figure 10). Ces trois relais électroniques sont désignés comme centres [FeS] promixal, médian et distal, d'après leur distance respective au site actif.

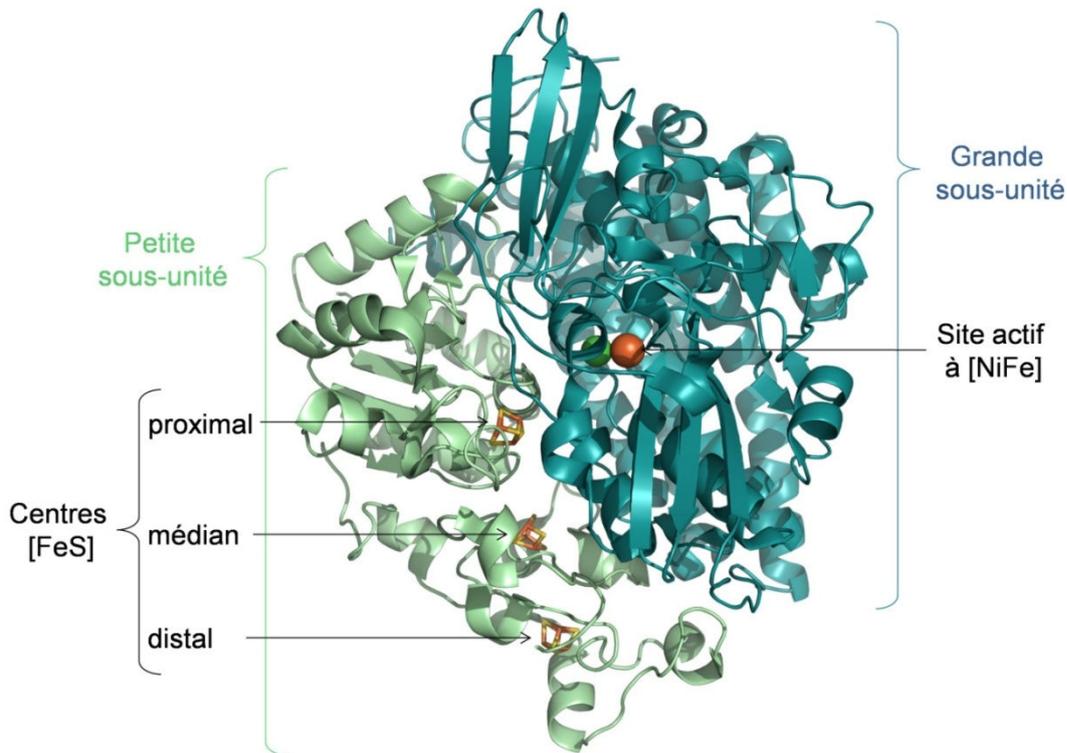


Figure 10 - Structure d'une hydrogénase à [NiFe] (hydrogénase sensible à l' O_2 de *Desulfovibrio fructosovorans* (Pdb ID : 1FRF)). La grande sous-unité est indiquée en bleue, la petite sous-unité en vert. Le site actif est représenté par les sphères verte (atome de nickel) et marron (atome de fer). Les centres [FeS] sont représentés par des bâtonnets jaunes (atomes de soufre) et marron (atomes de fer).

Le site actif est constitué d'un atome de nickel et d'un atome de fer. L'atome de nickel est coordonné par quatre cystéines dont deux coordonnent aussi le fer. Celui-ci est lié à deux ligands CN^- et un ligand CO (Figure 11) [180]. Ces ligands sont responsables de bandes bien distinctes en spectroscopie infrarouge (IR), qui offrent la possibilité de suivre les différents états d'oxydation du site actif.

II- Mécanisme d'oxydation de H_2

II-1- Le Cycle catalytique

H_2 est amené à travers des canaux hydrophobes au site actif [NiFe] où a lieu sa rupture hétérolytique. Les électrons libérés sont alors conduits via les relais électroniques FeS, séparés par moins de 13 Å, du site actif à la surface de la protéine où ils sont cédés au partenaire physiologique. Les protons sont amenés vers la solution via des voies constituées essentiellement d'acides aminés protonables et de molécules d'eau [180].

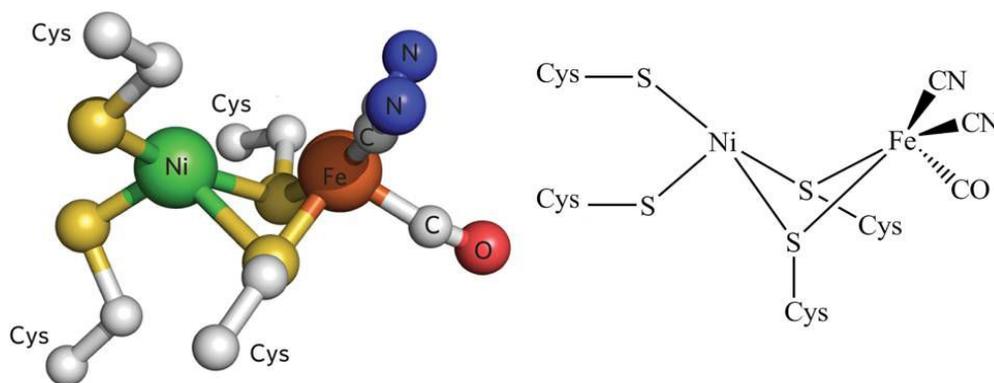


Figure 11- Structure du site actif à [NiFe]. Les atomes de soufre sont indiqués en jaune, les atomes de carbone en blanc

Le mécanisme catalytique d'oxydation de l' H_2 a été élucidé notamment grâce à la RPE et à l'IR. Le cycle catalytique est décrit par le cercle noir dans la figure 12. H_2 se lie au site actif lorsque celui-ci est dans une forme oxydée $Ni^{2+}-Fe^{2+}$ active appelée $Ni-SI_a$. Le Ni polarise H_2 , provoquant sa rupture hétérolytique. L'état Ni-R ($Ni^{2+}-Fe^{2+}$), dans lequel un ion hydruure pont le nickel et le fer, est formé. L'ion H^+ résultant est lié au soufre d'une cystéine. Une oxydation à un électron et la libération du proton conduisent à la forme Ni-C dans laquelle un hydruure pont les ions Ni^{3+} et Fe^{2+} . Une oxydation supplémentaire à un électron et la libération du proton issu de l'hydruure pontant complètent le cycle catalytique. L'oxydation de la forme active $Ni-SI_a$ conduit aux états Ni-A et Ni-B inactifs, dans lesquels le nickel et le fer sont pontés par une espèce oxygénée [180]. Ces deux derniers états seront décrits plus en détail par la suite.

II-2- Apports de l'électrochimie

La bioélectrocatalyse par les hydrogénases est découverte à la fin des années 70 par un groupe russe [181]. Les hydrogénases font partie des premières enzymes avec lesquelles du TED est obtenu, grâce à la proximité du FeS distal de la surface de la protéine. Dans un travail pionnier, l'hydrogénase de *Thiocapsa roseopersicina* est immobilisée sur du noir de carbone [182] et un premier mécanisme d'oxydation de l' H_2 peut être proposé. L'électrochimie se présente tout d'abord comme un outil permettant d'étudier les propriétés fondamentales des enzymes. Dans l'optique plus appliquée de la transformation électrochimique de l'énergie, la nécessité d'optimiser les méthodes d'immobilisation des hydrogénases à l'électrode s'impose par la suite.

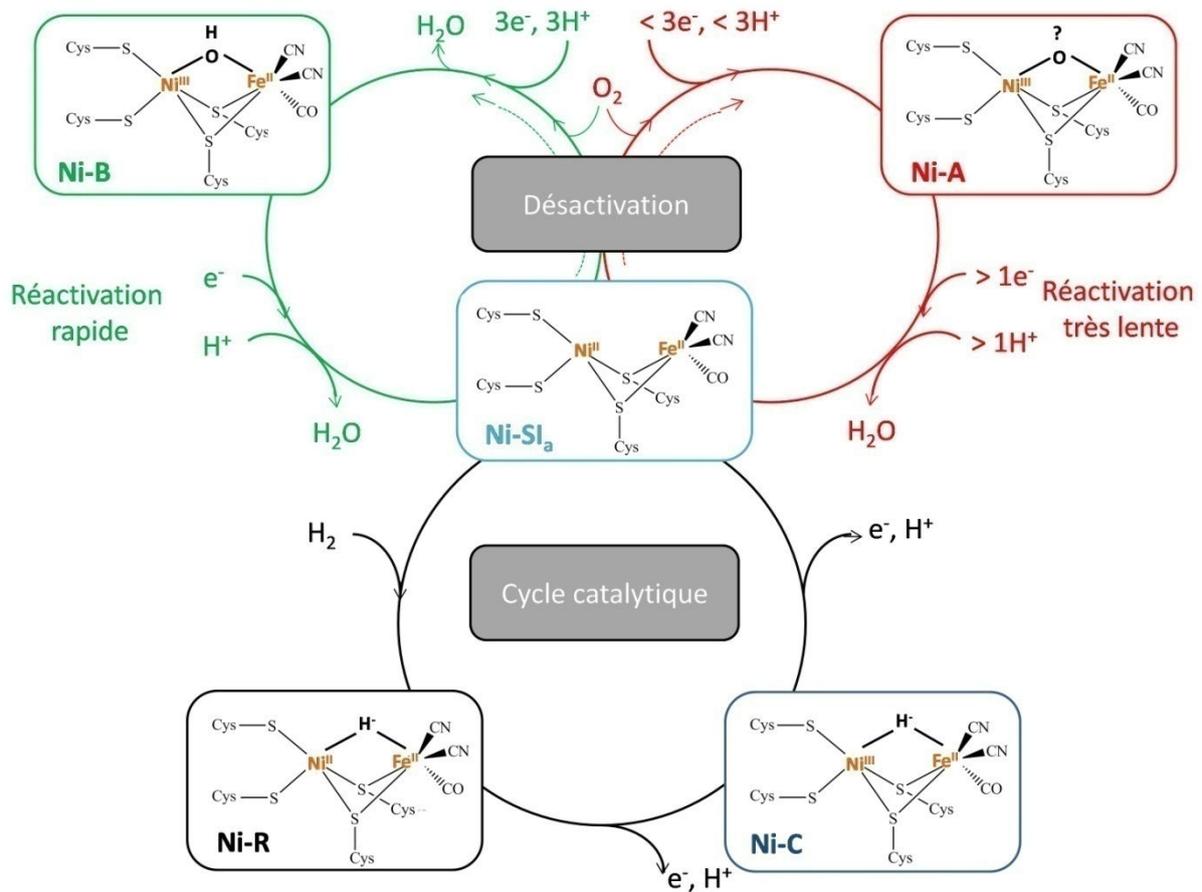


Figure 12- Schéma du mécanisme général d'oxydation de l'hydrogène par une hydrogénase à [NiFe], et du mécanisme de désactivation/réactivation par l'oxygène. Adapté de [180].

La voltammétrie d'un film protéique (PFV), mise au point par Hagen puis Armstrong dans les années 1990 [79], repose sur l'adsorption de l'hydrogénase sur une électrode de graphite. Sur cette électrode de rugosité non négligeable, certaines molécules sont orientées favorablement au TED, et le contrôle du potentiel de l'électrode permet de contrôler le débit et la direction du flux d'électrons, ainsi que l'état redox de certains sites de l'enzyme. Ce contrôle permet d'influencer les vitesses catalytiques ainsi que l'activation de l'enzyme, son inactivation et sa sensibilité aux inhibiteurs. Cette technique donne ainsi accès à des données cinétiques essentielles sur l'oxydation de H₂ par les hydrogénases, qui viennent compléter les données spectroscopiques. Les hydrogénases à [Ni-Fe] d'*Allochromatium vinosum*, des *Desulfovibrio vulgaris, gigas* et *fructosovorans* [7] ont été particulièrement étudiées par cette méthode.

De nombreuses informations peuvent être extraites de l'étude électrochimique des hydrogénases. Il est ainsi possible d'avoir accès aux constantes catalytiques K_M [183] et k_{cat}. Pour déterminer cette dernière constante, il est cependant nécessaire de connaître la quantité d'enzymes électroactives immobilisée à l'électrode. Les signaux non catalytiques n'étant que très rarement

déTECTABLES, on l'estime en général inférieure à 2 pmol.cm^{-2} [7]. Les fréquences de turnover ne peuvent donc être déterminées avec précision, mais sont évaluées entre 100 et $10\,000 \text{ s}^{-1}$ [184]. Pour comparaison, une étude couplant AFM et électrochimie de l'hydrogénase à [Fe-Fe] de *Clostridium acetobutylicum* immobilisée sur des SAMs de différentes longueurs permet d'estimer une fréquence de turnover de l'enzyme de $21\,000 \text{ s}^{-1}$ [185].

L'électrochimie permet également l'étude du biais catalytique en faveur de l'oxydation de H_2 , la mesure de l'influence du pH et de la température sur l'activité de l'enzyme, la comparaison de l'efficacité catalytique des hydrogénases et du platine, qui sera détaillée dans le chapitre F, ou la détermination des étapes cinétiquement limitantes du mécanisme d'oxydation électroenzymatique de l'hydrogène [7]. On peut noter aussi les informations données par la forme bien particulière du voltammogramme d'oxydation électroenzymatique de l'hydrogène par une hydrogénase à [NiFe], caractérisé par un pic qui reflète la formation des états inactifs du site actif (Figure 13). Enfin l'électrochimie permet l'étude rationnelle des inhibiteurs, en particulier de la sensibilité à l' O_2 , au CO et à l' H_2S des hydrogénases à [Ni-Fe].

III- Immobilisation fonctionnelle des Hydrogénases

Les études électrochimiques fondamentales sont en général réalisées avec des électrodes de PG sur lesquelles l'hydrogénase est simplement adsorbée. Cette méthode ne permet cependant pas le contrôle de l'orientation de l'hydrogénase. De plus, de faibles densités de courant sont obtenues et le signal décroît au cours du temps. Ce dernier aspect a d'abord été attribué à la désorption progressive de l'enzyme [7], mais des études couplées d'électrochimie et de spectroscopie suggèrent la prédominance d'autres facteurs, comme sa réorientation ou sa dénaturation. En particulier, des études de SEIRA d'une hydrogénase liée covalamment sur une électrode d'or modifiée par des SAMs montrent que la diminution du courant n'est pas due à une perte du film protéique mais à une modification lente du site actif qui induit une baisse de l'activité de l'enzyme, probablement à cause de traces résiduelles d' O_2 [186].

La majorité des immobilisations des hydrogénases à l'électrode se font en vue d'obtenir du TED. La possibilité d'établir du TEM n'est néanmoins pas abandonnée, et des résultats récents relancent la recherche dans ce domaine qui sera détaillé dans la partie résultats. Afin d'obtenir majoritairement du TED, des efforts sont donc faits pour contrôler l'orientation des hydrogénases. Afin d'augmenter les densités de courant, les électrodes sont modifiées en particulier pour permettre l'immobilisation des enzymes dans des réseaux 3D conducteurs.

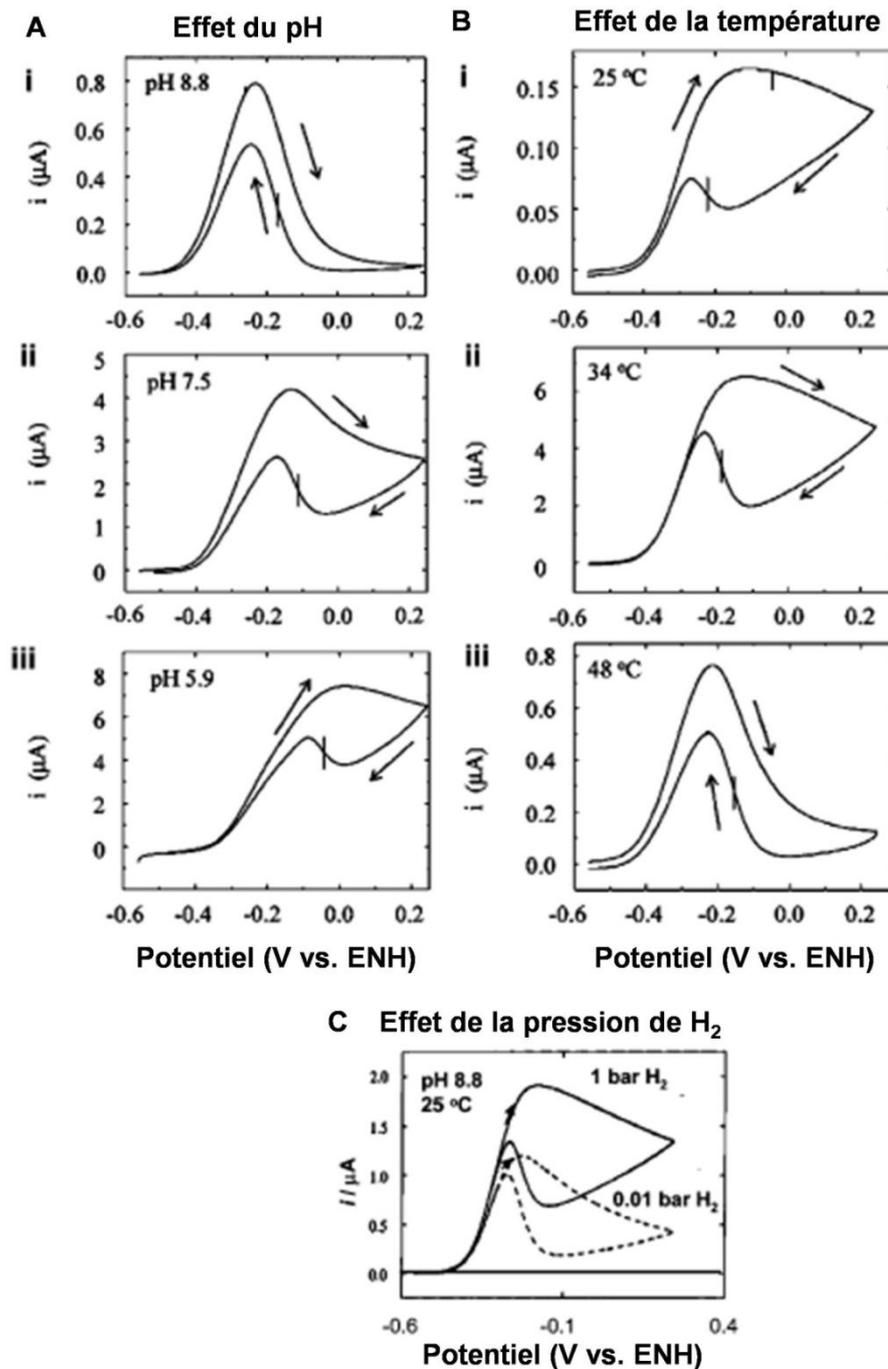


Figure 13 – Formes du voltammogramme d'oxydation de l'H₂ par l'hydrogénase à [Ni-Fe] d'*Allochromatium vinosum* immobilisée sur une électrode de PG. Les flèches indiquent le sens de la variation de potentiel, le tiret vertical indique la position du potentiel E_{switch} . A : influence du pH à $T=45$ °C et 1 bar H₂. B : Influence de la température à pH 8,8 et 1 bar H₂. C : Influence de la pression de H₂ à pH 8,8 et $T=25$ °C. $\omega=2500$ rpm et $v=0,3$ mV.s⁻¹. Adapté de [7].

III-1- Contrôle de l'orientation de l'hydrogénase à l'interface

Chez les hydrogénases solubles de l'espèce *Desulfovibrio*, une zone d'acides aminés anioniques, surtout des glutamates, entoure le centre [FeS] distal, vers lequel pointe un fort moment

dipolaire. En conditions physiologiques, ces propriétés permettent l'interaction de l'hydrogénase avec le cytochrome c_3 chargé positivement. Une interface positive doit donc permettre de positionner l'hydrogénase de façon favorable au TED. On rappelle pour les considérations de charges que l'on travaille en général avec l'hydrogénase à pH neutre. La chimie de surface de l'électrode peut être modifiée par réduction de sels de diazonium [85, 165] ou par traitement acide pour le carbone [93], ou par formation de SAMs pour l'or [134].

Une orientation favorable est ainsi observée pour l'hydrogénase de *Desulfovibrio gigas* grâce à des fonctions amines générées par réduction de sels de diazoniums à la surface d'une électrode de graphite. L'hydrogénase est orientée grâce à des interactions électrostatiques contrôlées par le pH (à pH 6 les amines de la surface de l'électrode sont protonées), puis liée covalamment par liaisons amides entre les fonctions amines de l'électrode et les carboxylates entourant le FeS distal [165]. Ce couplage est répété sur des MW-CNTs modifiés de la même façon [85] et sur une électrode d'or modifiée par une SAM formée à partir de 4-aminothiophénol [135]. D'autres travaux, portant sur l'hydrogénase de *Desulfovibrio fructosovorans*, discriminent l'orientation de l'hydrogénase grâce aux proportions respectives des courants direct et médié (TED/TEM). Des modifications d'une électrode d'or par des SAMs positives (resp. négatives) mènent ainsi à 95% de TED (resp. de TEM). Une orientation défavorable menant exclusivement à du TEM est également observée lorsque l'hydrogénase est immobilisée sur des CNTs-COOH qui fournissent une interface chargée négativement [80].

L'immobilisation à l'électrode est particulièrement délicate dans le cas d'enzymes associées à la membrane, à cause de leur complexité structurale et de la déstabilisation que peut entraîner leur séparation de l'environnement lipidique. L'hydrogénase à [NiFeSe] de *Desulfovibrio vulgaris Hildenborough* a par exemple la particularité d'être associée à la membrane cytoplasmique par une queue lipidique. Cette hydrogénase peut être orientée pour le TED grâce à une SAM de 4-aminothiophénol sur or. Dans une optique de stabilisation, l'enzyme est immobilisée sur la SAM en présence de phospholipides pendant que le détergent entourant la queue lipidique est retiré lentement [134, 187]. L'AFM couplée à l'électrochimie suggère que l'enzyme est tout d'abord liée covalamment sur la SAM, puis qu'une couche lipidique qui stabilise l'hydrogénase en incorporant la queue lipidique est formée au dessus des enzymes, ce que confirme une étude de SEIRA [187].

Dans le cas de l'hydrogénase membranaire *Aa Hase I*, du TED et du TEM sont observés simultanément lorsque l'enzyme est immobilisée sur les SAMs hydrophiles chargées ou neutres (Figure 14). Aucun des deux processus ne semble favorisé lorsque les chaînes alkyles sont suffisamment courtes (moins de dix groupements méthyles) [67, 93].

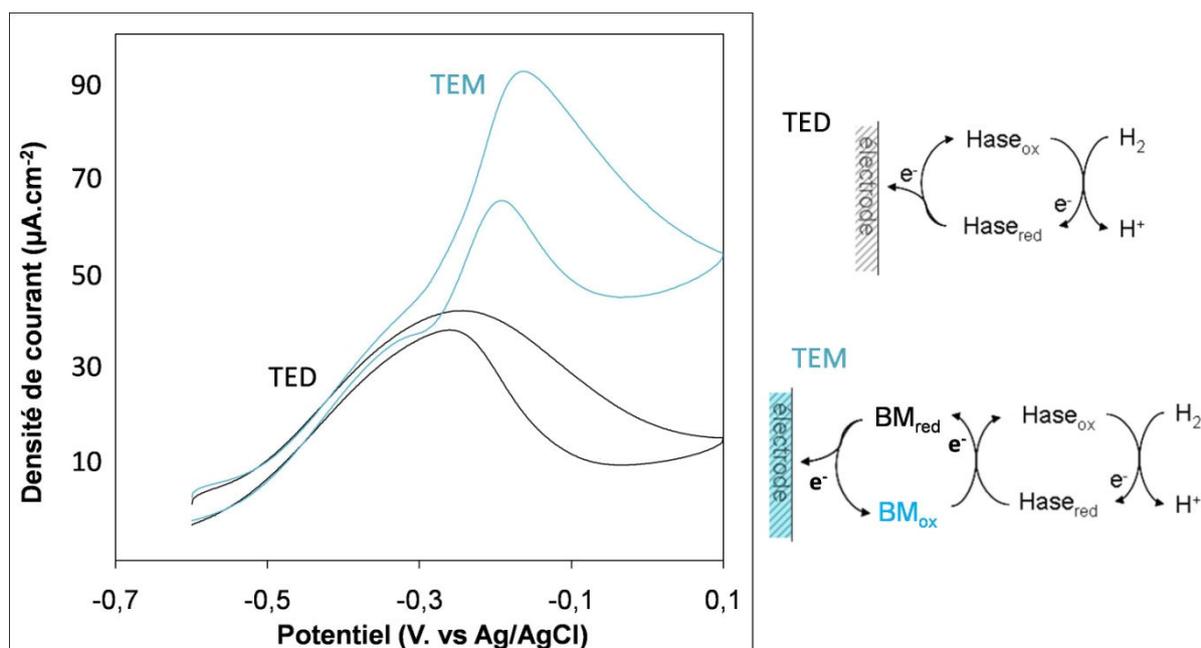


Figure 14 - A gauche : CV du courant direct (courbe noire) et du courant médie par le bleu de méthylène (courbe bleue) pour l'oxydation de H₂ par l'hydrogénase d'Aquifex aeolicus immobilisée sur une électrode d'or modifiée par des SAMs (6-mercaptohexanol). T=60°C ; Tampon Hepes 50 mM pH 6,8 ; ω=0 ; v=5mV.s⁻¹ ; [BM]=10µM. A droite : mécanismes de transfert d'électrons direct (en haut) et médie par le BM (en bas).

Ce résultat s'explique par l'absence de patch chargé à proximité du centre [FeS] distal, et donc par de multiples orientations de l'hydrogénase à la surface hydrophile. Au contraire, sur des SAMs hydrophobes, le TEM est largement favorisé quelle que soit la longueur de la chaîne alkyle (à partir de 3 groupements méthyles) [67, 93]. Des études PMIRRAS confirment par ailleurs la différence entre les orientations de l'Hase sur SAMs hydrophiles et hydrophobes, expliqués par la multiplicité d'orientations de l'hydrogénase sur les premières et une orientation préférentielle portant le centre [FeS] loin de la surface sur les secondes. Des expériences de chromatographie sur couche mince (CCM) montrent par ailleurs la présence de détergent très lié à l'enzyme. La queue hydrophobe du détergent se lie probablement à l'hélice transmembranaire hydrophobe située à moins de 15 Å du centre [FeS]. La tête hydrophile du détergent rend alors l'environnement de ce FeS hydrophile, ce qui a permis de proposer un modèle de l'immobilisation orientée de cette hydrogénase (Figure 15).

III-2- Immobilisation dans des électrodes tridimensionnelles

Dans l'optique de développer des biopiles à combustible, les densités de courant délivrées aux électrodes doivent être augmentées, ce qui nécessite d'augmenter le nombre d'enzymes immobilisées à l'électrode. La littérature n'offre que quelques exemples basés sur l'immobilisation d'hydrogénases à [NiFe] dans des réseaux tridimensionnels. Les hydrogénases concernées sont aussi bien solubles, comme celle de *Desulfovibrio gigas* [85], de *Desulfovibrio fructosovorans* [93, 126] ou de *Pyrococcus*

furiosus [188], que membranaires comme les hydrogénases 1 d'*Escherichia coli* [29, 189] ou d'*Aquifex aeolicus* [88].

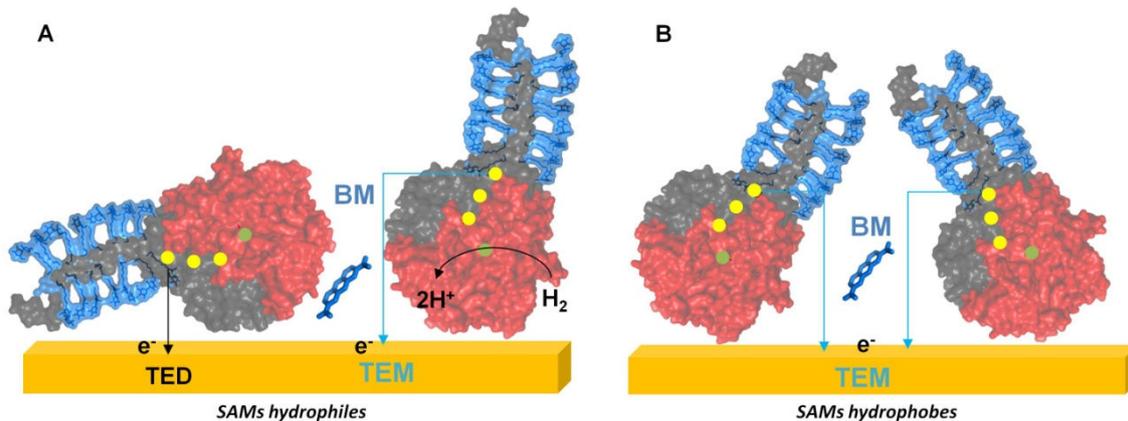


Figure 15 – Modèle de l'immobilisation orientée de l'hydrogénase 1 d'*Aquifex aeolicus* sur les SAMs hydrophiles (A) et hydrophobes (B). L'hélice transmembranaire entourée de DDM à proximité du centre [FeS] distal contrôle le transfert électronique pour l'oxydation de l'H₂. Le centre actif à [Ni-Fe] et les centres [FeS] sont représentés respectivement par les sphères vertes et jaunes.

La nanostructuration des électrodes est obtenue soit par utilisation d'un matériau tridimensionnel nanostructuré, soit par formation à l'électrode de réseaux tridimensionnels grâce à des nanoparticules. Ces modifications ont pour buts l'amélioration de l'orientation de l'hydrogénase [83, 85, 93], l'amélioration du transfert électronique entre l'hydrogénase et l'électrode [77, 83, 190], la stabilisation du signal [83], l'étude des limitations principales découlant de l'immobilisation d'enzymes, du transport de l'enzyme et du substrat, et du maintien de l'activité enzymatique [188], et l'augmentation des densités de courant [29, 189].

Les matériaux utilisés sont des nanotubes de carbone monoparois [77, 80, 88, 93, 126, 190], des nanotubes de carbone multiparois [29, 83, 85, 126, 190], des colonnes de graphite poreuses [188], ou du carbone mésoporeux compacté [189].

Une amélioration des performances est effectivement constatée dans la plupart des cas. Des expériences d'AFM permettent de visualiser l'hydrogénase disposée de façon homogène [83, 85]. Elles montrent aussi que le nombre d'hydrogénases immobilisées est démultiplié [85]. Cette observation est également reportée par Liu et *al.*, grâce à la détection du signal du centre [FeS] proximal [190]. Des augmentations des densités de courant peuvent le plus souvent être mesurées [29, 85, 88, 93, 189]. Dans un cas par exemple, une multiplication par 15 des densités de courant est enregistrée, et mise en corrélation avec l'augmentation de la surface développée [126]. Enfin une étude décrit la stabilité pendant 2 mois de la bioélectrode [83].

Les performances peuvent également être améliorées grâce aux modifications de la chimie de surface des nanomatériaux décrites dans le chapitre C. Par exemple, lorsque l'hydrogénase à [NiFe] de *D. gigas* est covalamment liée à des MW-CNTs modifiés par réduction de sels de diazonium, les performances sont constantes pendant un mois après une perte au cours des premiers jours attribuée aux enzymes non covalamment liées. En revanche, aucun courant catalytique n'est plus observé après 6 jours lorsque l'enzyme est adsorbée sur les MW-CNTs non modifiés [85].

IV- Sensibilité à l'O₂ et au CO

La principale difficulté de l'étude et de l'utilisation technologique des hydrogénases réside dans leur grande sensibilité à l'oxygène. Cependant, chez les hydrogénases à [NiFe], l'inactivation est réversible, contrairement aux hydrogénases à [FeFe] qui sont irréversiblement inactivées pendant la catalyse par des traces d'O₂. L'O₂ provoque chez les hydrogénases à [NiFe] la formation d'un mélange d'états oxydés inactifs [179], appelés respectivement Ni-A et Ni-B, détectables par RPE, et correspondant à un degré d'oxydation du site actif Ni³⁺-Fe²⁺. L'état Ni-A, dont le mécanisme de formation est représenté par le cercle rouge sur la figure 12, est dit « unready ». Il ne se réactive que lentement par passage prolongé à un potentiel réducteur. Dans cet état, un ligand dont la nature reste controversée pont le Ni et le Fe. Il a longtemps été admis qu'il s'agissait d'un groupement peroxy, mais ceci est contredit par la possibilité de former le Ni-A dans des conditions très oxydantes en l'absence d'oxygène [191]. L'état Ni-B, dont le mécanisme de formation est représenté par le cercle vert sur la figure 12, est dit « ready ». Il se réactive rapidement par passage à un potentiel modérément réducteur. L'état Ni-B peut également être formé en conditions oxydantes anaérobies. Dans cet état, un ligand hydroxy provenant de l'eau ou de l'oxygène pont le Ni et le Fe.

Le monoxyde de carbone est également un inhibiteur des hydrogénases sensibles à l'oxygène. C'est un inhibiteur compétitif à la fois lors de la production et de l'oxydation de H₂. En présence de 0,9 bar de CO, les hydrogénases d'*Allochromatium vinosum* et *Desulfovibrio gigas* perdent ainsi la totalité de leur activité [192]. Contrairement à l'O₂, le CO se lie réversiblement au site actif. L'activité de l'hydrogénase est immédiatement et complètement restaurée lorsque le CO est expulsé, sans qu'il soit nécessaire d'imposer un potentiel réducteur [192].

V- Les hydrogénases tolérantes à l'O₂

90 µM d'O₂ introduits au cours d'une expérience de voltammétrie cyclique suffisent à inhiber totalement l'oxydation du H₂ par les hydrogénases de *Desulfovibrio gigas* et d'*Allochromatium vinosum*. En revanche, 70% de l'activité d'oxydation du H₂ est conservée pour l'hydrogénase tolérante de *Ralstonia eutropha*. On définit ainsi une classe d'hydrogénases « tolérantes à l'O₂ », qui peuvent convertir H₂ en présence de l'O₂ [193]. Ces hydrogénases sont majoritairement issues de bactéries

aérobies ou aérobies facultatives, en particulier les bactéries Knallgas comme les Aquificales. La combustion du H₂ utilisant l'O₂ comme accepteur terminal d'électrons est essentielle au métabolisme énergétique de ces bactéries [179]. Les hydrogénases à [NiFe] régulatrices et réductrices de NAD(P)⁺, issues des groupes 2 et 3, sont des hydrogénases tolérantes à l'O₂. Au sein des hydrogénases à [NiFe] du groupe 1, une sous-classe d'hydrogénases périplasmiques ancrées à la membrane est également tolérante à l'O₂. Cette sous-classe est constituée notamment des hydrogénases de *Ralstonia eutropha* (Re MBH) [194], de l'hydrogénase 1 d'*Escherichia coli* (Ec Hyd-1) [195], de l'hydrogénase 1 d'*Aquifex aeolicus* (Aa Hase 1) [196], de l'hydrogénase d'*Hydrogenovibrio marinus* [197] et d'une hydrogénase de *Salmonella enterica* (*S. enterica* Hyd-5) [198]. On appellera ces hydrogénases « tolérantes » par opposition aux autres hydrogénases de la même classe qui seront désignées comme « sensibles ».

V-1- Caractéristiques

Les études spectroscopiques et électrochimiques montrent que chez les hydrogénases tolérantes à l'O₂, seul l'état oxydé inactif Ni-B est observé [180, 199] (Figure 16). Les hydrogénases tolérantes à l'O₂ présentent de plus une surtension plus importante pour l'oxydation électrocatalytique de H₂, et les potentiels des centres [Fe-S] sont plus élevés d'environ 200 mV que chez les hydrogénases sensibles. Enfin, ces hydrogénases sont également tolérantes au CO [178].

V-2- Bases moléculaires de la résistance à l'oxygène

Les hydrogénases tolérantes à l'oxygène possèdent des caractéristiques structurales communes qui les distinguent des hydrogénases sensibles. Ces caractéristiques ont été étudiées en détail afin de décrypter les mécanismes de tolérance.

V-2-a- Centre actif [Ni-Fe]

Les 1^{ère} et 2^{ème} sphères de coordination du site actif [Ni-Fe] sont communes aux hydrogénases sensibles et tolérantes, semblant exclure la participation du site actif à la résistance à l'oxygène. Cependant, comme cela a été montré par titration potentiométrique et PFV chez les hydrogénases d'*A. aeolicus*, *R. eutropha* et *E. coli*, la catalyse de l'oxydation de H₂ exige une surtension supérieure d'environ 100 mV à celle qui est nécessaire pour les hydrogénases sensibles [7, 199]. Par ailleurs, des études d'ENDOR et d'HYSCORE de l'Aa Hase 1 et de RPE de l'Ec Hyd-1 montrent que, dans le Ni_a-C, l'hydride pontant est lié de façon asymétrique et avec une interaction beaucoup plus faible entre le Ni et le Fe que chez les hydrogénases sensibles [178, 200].

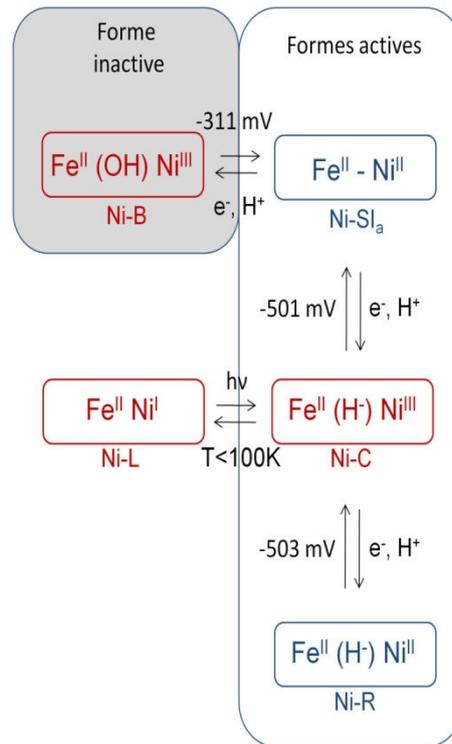


Figure 16- Etats du site actif de l'hydrogénase 1 d'*Aquifex aeolicus* et potentiels redox (vs. Ag/AgCl) des différentes transitions. Les noms attribués aux différents états sont indiqués sous les cadres dans lesquels sont reportés les degrés d'oxydation et les ligands. La couleur rouge correspond aux états détectables en RPE, la couleur bleue aux états silencieux en RPE. Adapté de [178]

V-2-b- Canaux de diffusion des gaz

L'hypothèse que les canaux de diffusion des gaz, qui servent à acheminer H_2 au site actif, seraient plus étroits chez les hydrogénases tolérantes, limitant ou empêchant le passage de O_2 , a longtemps prévalu [7]. Cette hypothèse découle de l'observation que chez les hydrogénases capteurs, qui sont également actives en présence d' O_2 , les résidus aminés valine et leucine situés à proximité du site actif et très conservés chez les hydrogénases sensibles, sont remplacés par les résidus isoleucine et phénylalanine plus volumineux [201].

Des mutations ponctuelles à divers points du canal ont été réalisées chez l'hydrogénase de *D. fructosovorans*, conduisant à une diffusion restreinte des inhibiteurs vers le site actif [202]. Un des mutants, dans lequel la valine 74 a été remplacée par une cystéine (Val74Cys), présente un comportement catalytique et une résistance au CO proches de ceux des hydrogénases tolérantes [203]. Toutefois, même les mutants les plus robustes ne peuvent résister qu'à des concentrations d' O_2 faibles en comparaison de celles que supportent les hydrogénases naturellement tolérantes. La réduction de la taille du canal ne suffit donc pas à assurer cette tolérance. De plus le canal de l'hydrogénase tolérante *Re* MBH s'avère plus large que celui des hydrogénases sensibles [179].

Dans une étude récente, la comparaison de 16 mutants de la valine 74 montre que la tolérance à l'O₂ est reliée aux vitesses d'inactivation/réactivation anaérobie. Les mutants qui s'(in)activent le plus rapidement en conditions anaérobies sont aussi ceux qui résistent le mieux à l'O₂. En particulier un résidu hydrophile à la position 74 accélère l'(in)activation aérobie et augmente la tolérance à l'O₂. Le mutant Val74His, dans lequel la valine 74 est remplacée par une histidine, se réactive aussi rapidement que l'Aa Hase 1. Cependant, contrairement à cette dernière, sa réactivation n'est pas complète à potentiel modérément réducteur [204].

V-2-c- Cavités hydrophiles

L'existence d'un réseau de cavités hydrophiles permettant l'évacuation de l'O₂ du site actif à la surface est visible dans les structures cristallographiques des hydrogénases de *R. eutropha* et *H. marinus* [194, 205]. Par ailleurs les structures cristallographiques de l'Hase d'*E. coli* dans les états oxydé et réduit montrent l'existence d'une chaîne dynamique de molécules d'eau à proximité du site actif [206]. Ces observations supportent l'hypothèse de la possibilité de la réduction du dioxygène en eau à proximité du site actif.

Grâce à l'utilisation d'isotopes de l'oxygène, une étude récente prouve la formation effective d'eau à partir de l'O₂ par *E. coli* Hyd1 incubée dans des mélanges H₂/O₂ [207]. L'hydrogénase pourrait donc être considérée comme une oxydase. Cependant la très faible vitesse de réduction de l'O₂ suggère que, physiologiquement, l'hydrogénase ne réduit l'O₂ que dans un but de détoxification.

V-2-d- Centre [FeS] proximal

Le centre [FeS] proximal est coordonné par 6 cystéines chez les hydrogénases tolérantes, au lieu de 4 chez les sensibles. L'atome de soufre de la fonction thiol d'une des cystéines supplémentaires substitue un des 4 ions sulfures S²⁻ du centre [FeS], tandis que la seconde cystéine coordonne un des atomes de fer. Le centre FeS peut alors adopter une configuration Cys₆[4Fe-3S] ouverte et flexible révélée par des études cristallographiques [194, 205-206], et non plus une configuration Cys₄[4Fe-4S] rigide (Figure 17).

Cette architecture permet deux transitions redox liées à des réarrangements structuraux à des potentiels physiologiquement pertinents, menant à trois états stables. L'état superoxydé est permis grâce à l'atome d'azote de la liaison amide entre deux cystéines. Lorsqu'il se déprotonne, il devient ligand du fer 2, déplaçant le soufre 3 [194, 205] (Figure 17). Ce réarrangement ne peut pas être réalisé par le centre [4Fe-4S] cubique des hydrogénases sensibles, qui ne permet qu'une seule transition redox et n'a donc accès qu'à deux états stables. Les 2 électrons fournis par ce relais électronique, ajoutés à deux électrons fournis respectivement par le centre [FeS] médial et le site actif, rendent alors possibles

la réduction au site actif du dioxygène, la libération d'une molécule d'eau, et la formation d'un hydroxyde pontant les atomes de Ni et de Fe, caractéristique de l'état Ni-B.

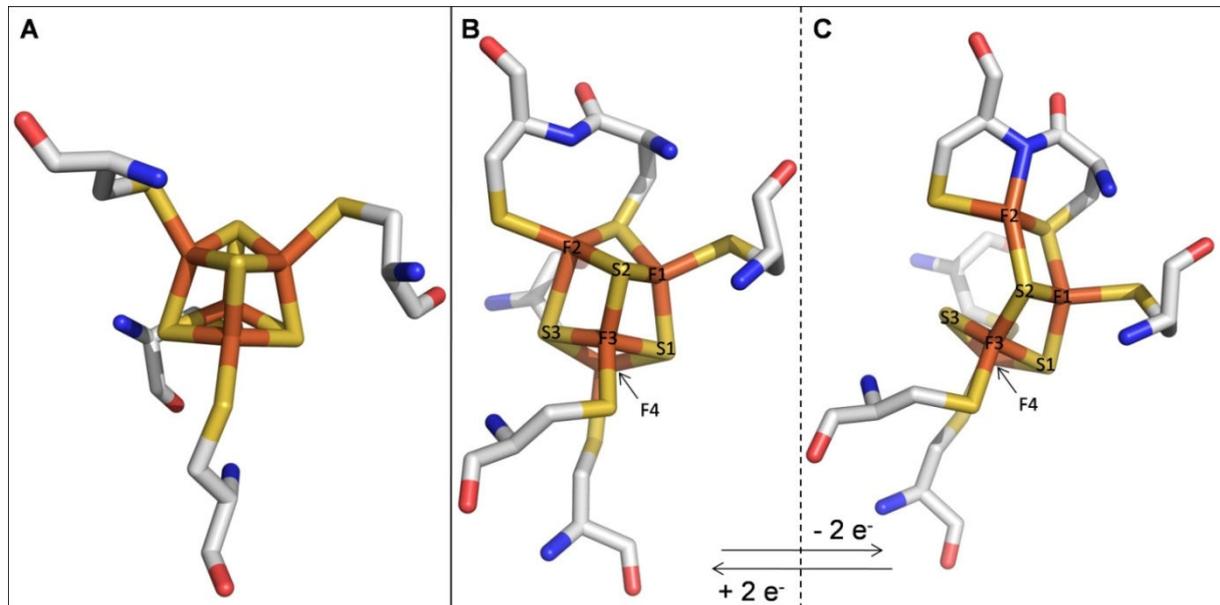


Figure 17- Comparaison des centres [Fe-S] proximaux de l'hydrogénase à [Ni-Fe] sensible à l'O₂ de *Desulfovibrio fructosovorans* (A, Pdb ID : 1FRF) et de l'hydrogénase à [Ni-Fe] tolérante à l'O₂ d'*Escherichia coli* dans ses formes réduite (B, Pdb ID : 3USE) et oxydée (C, Pdb ID : 3USC). Les atomes sont représentés par des bâtonnets jaunes pour le soufre, orange pour le fer, blancs pour le carbone, rouges pour l'oxygène et bleus pour l'azote. Les atomes de fer et les atomes de soufre inorganiques du centre [4Fe-3S] de l'hydrogénase d'*Escherichia coli* sont annotés respectivement F1, F2, F3 et F4 ; et S1, S2 et S3.

Des mutations des deux cystéines supplémentaires chez les hydrogénases *Re* MBH et *Ec*-Hyd1 conduisent à une hydrogénase plus sensible, mais cependant capable d'oxyder H₂ plusieurs minutes en présence d'O₂, et qui reste tolérante au CO. Ce résultat montre tout d'abord que d'autres facteurs que les cystéines supplémentaires déterminent la tolérance à l'O₂. Ensuite, il prouve que les deux cystéines sont nécessaires à l'activité bifonctionnelle du centre [4Fe-3S] [208], qui s'exprime d'une part par la conduction des électrons pendant la conversion du H₂, d'autre part par le stockage d'électrons pour la réactivation rapide du [Ni-Fe] après attaque par l'O₂. Chez l'*Aa* Hase 1, au moins une des transitions redox du [4Fe-3S] est dépendante du pH, ce qui montre qu'elle est couplée à un transfert de protons [209].

Il est cependant intéressant de remarquer que ce motif de six cystéines est également présent chez des enzymes issus d'organismes strictement anaérobies. Ces enzymes sont susceptibles de partager également la structure du [4Fe-3S] proximal. De plus, il semble que ce motif soit apparu avant l'émergence de l'oxygène moléculaire. Ce constat remet en question soit le lien entre le motif à 6 Cys et la tolérance à l'oxygène, soit l'histoire évolutive de la photosynthèse oxygénique [210].

Enfin, dans une étude récente de *S. enterica* Hyd-5 [198], la mutation ponctuelle de l'acide aminé histidine 229, très proche du FeS proximal, en alanine, affecte l'activité et les propriétés de tolérance à l'O₂ de l'enzyme. En particulier, la surtension pour l'oxydation du H₂, caractéristique des hydrogénases tolérantes, disparaît. Il est cependant difficile d'attribuer la tolérance à ce résidu His 229 puisqu'il est très conservé chez toutes les hydrogénases à [NiFe], y compris les hydrogénases sensibles. L'étude suggère que son importance est modulée par son association avec l'acide glutamique 73 voisin, conservé chez les hydrogénases tolérantes (à l'exception cependant de *Aa* Hase 1) et remplacé par une glutamine chez les hydrogénases sensibles, qui pourrait induire ou stabiliser un transfert de charge entre l'histidine et le FeS proximal.

V-2-e- Rôle des super-complexes d'hydrogénases

Les hydrogénases tolérantes d'*E. coli* et *H. marinus* cristallisent sous forme de dimère d'hétérodimères. Celle de *R. eutropha* cristallise comme monomère. Cependant, quand la solubilisation est réalisée avec un détergent doux (la digitonine), on peut isoler un supercomplexe formé de 3 hétérotrimères (grande et petite sous-unités associées au cytochrome b). Cette architecture pourrait permettre des transferts d'électrons intermoléculaires entre les hydrogénases actives, et les hydrogénases oxydées inactives. Ce transfert électronique permettrait la réactivation des hydrogénases inactivées dans des conditions oxydantes [179].

VI- L'hydrogénase I d'*Aquifex aeolicus*

Aquifex aeolicus est une bactérie hyperthermophile, microaérophile et chimiolithoautotrophe obligatoire isolée à partir d'une source hydrothermale des îles Vulcano. Elle est cultivée à 85°C sous atmosphère H₂/CO₂/O₂. Son métabolisme énergétique fait intervenir 3 hydrogénases à [NiFe], notées I, II et III [211].

On s'intéressera ici exclusivement à l'hydrogénase I (*Aa* Hase 1), une hydrogénase membranaire dont le site actif est exposé dans le périplasma. Cette hydrogénase fait partie d'une chaîne respiratoire qui couple l'oxydation de l'H₂ à la réduction de l'O₂ en eau [211] (Figure 18). Elle catalyse principalement la réaction dans le sens de l'oxydation du H₂, même si de faibles activités de réduction des protons ont pu être détectées par spectroscopie UV-visible avec le méthyl viologène (MV) réduit comme donneur d'électrons [211] ou par électrochimie en l'absence de H₂ à pH acide [93].

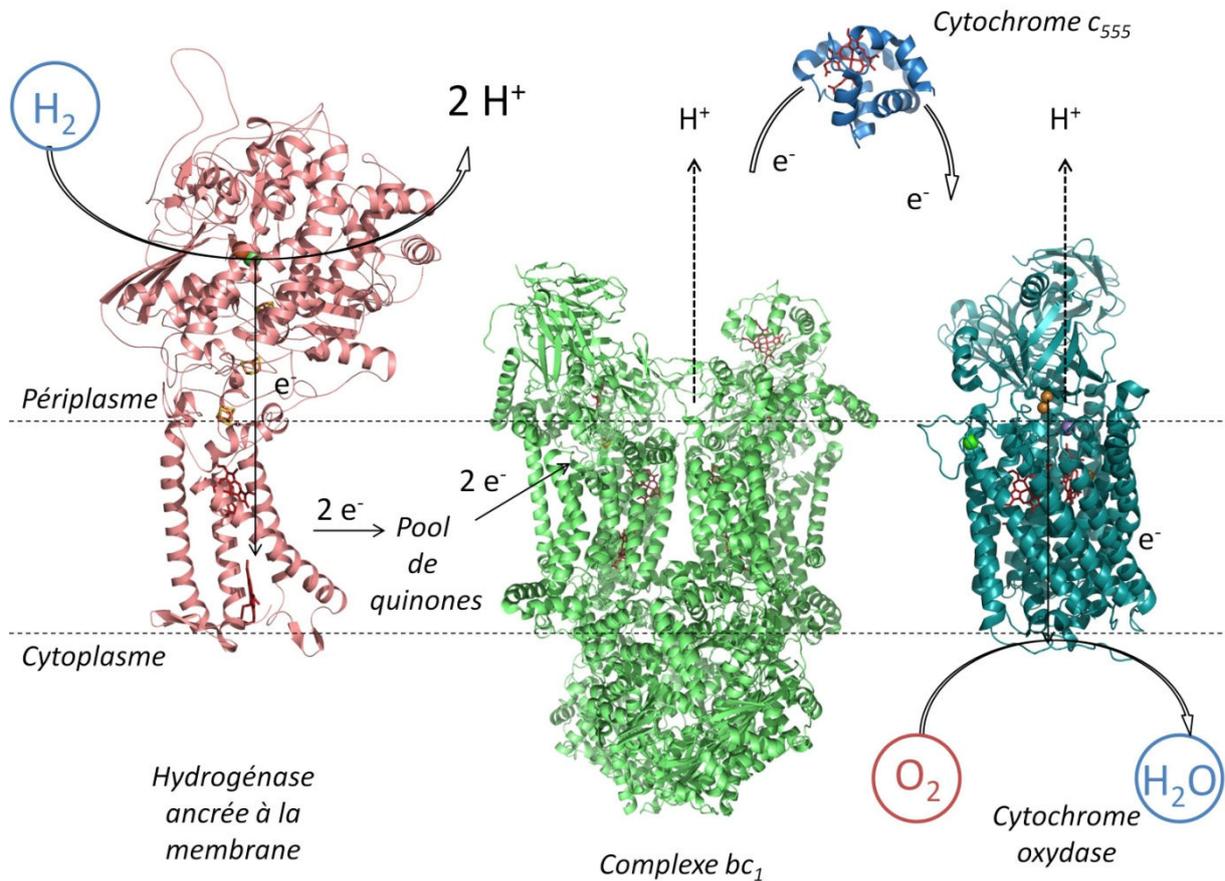


Figure 18- représentation de la chaîne respiratoire incluant l'hydrogénase 1 d'*A. aeolicus*. Hydrogénase : structure modèle basée sur la formiate déshydrogénase d'*E. coli* ; complexe bc_1 de *Saccharomyces cerevisiae* (pdb ID : 3CXH) ; cytochrome *c* oxydase de *Paracoccus denitrificans* (pdb ID : 3HB3) ; cytochrome c_{555} d'*A. aeolicus* (pdb ID : 2ZXY)

VI-1- Propriétés structurales

L'hydrogénase *Aa* Hase 1, dont la structure n'a pas été résolue, est constituée d'une grande sous-unité catalytique de 72 kDa contenant le site actif à [Ni-Fe], et d'une petite sous-unité de 39 kDa contenant les 3 centres [FeS]. La petite sous-unité comporte une hélice transmembranaire permettant l'interaction avec un cytochrome de type *b* dihémiq qui assure l'ancrage de l'hydrogénase à la membrane (Figure 19).

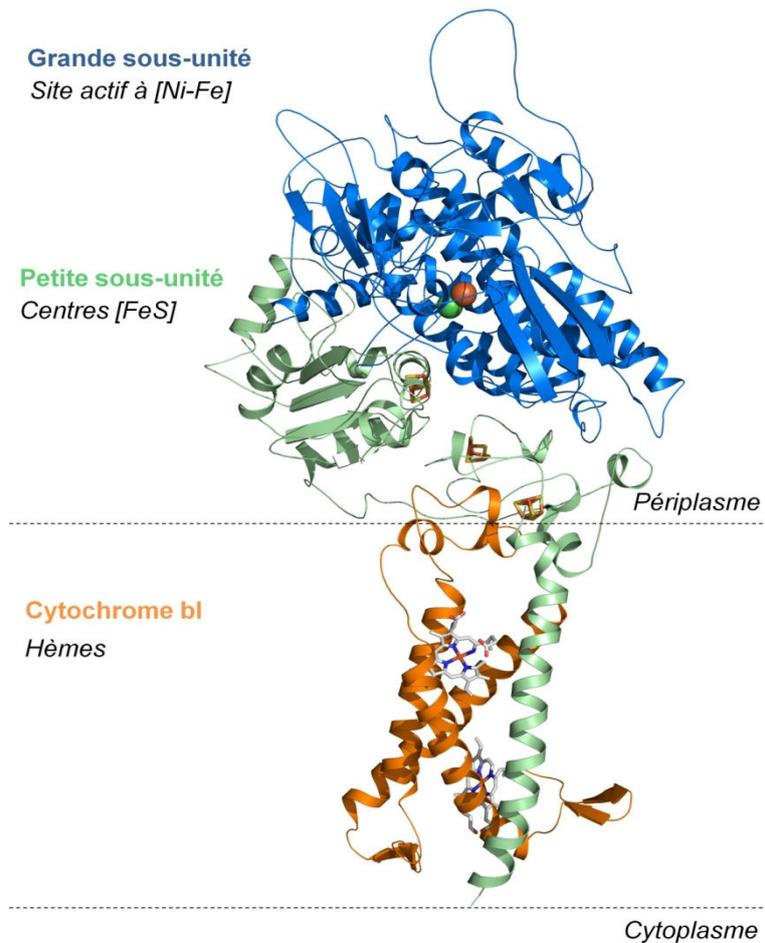


Figure 19- Modèle de l'hydrogénase Aa Hase 1. La grande sous-unité est représentée en bleu et la petite, qui comporte l'hélice transmembranaire, en vert ; le cytochrome b1 est représenté en jaune. Les centres [FeS] sont représentés par des bâtonnets jaunes (soufre) et marron (fer) ; le site actif [NiFe] par des sphères verte (nickel) et marron (fer), et les hèmes par des bâtonnets blancs (atomes de carbone), bleus (atomes d'azote), rouges (atomes d'oxygène) et marron (atomes de fer).

VI-2- Cycle catalytique d'oxydation de l' H_2 en électrochimie

L'immobilisation de l'hydrogénase est efficace à des électrodes de graphite pyrolytique (PG) [93, 212], PG modifié par des CNTs [93] ou un polymère redox [212], sur des SAMs [67], dans des électrolytes aqueux, des solvants organiques ou des liquides ioniques [213]. La forme du signal d'oxydation du dihydrogène est similaire lorsque l'hydrogénase est adsorbée sur PG [93], maintenue à l'électrode de PG grâce à une membrane de cellulose [212] ou adsorbée sur une électrode d'or modifiée par des SAMs [67]. Ceci souligne bien que ce signal électrocatalytique, représenté sur la figure 20, reflète les propriétés intrinsèques de l'enzyme.

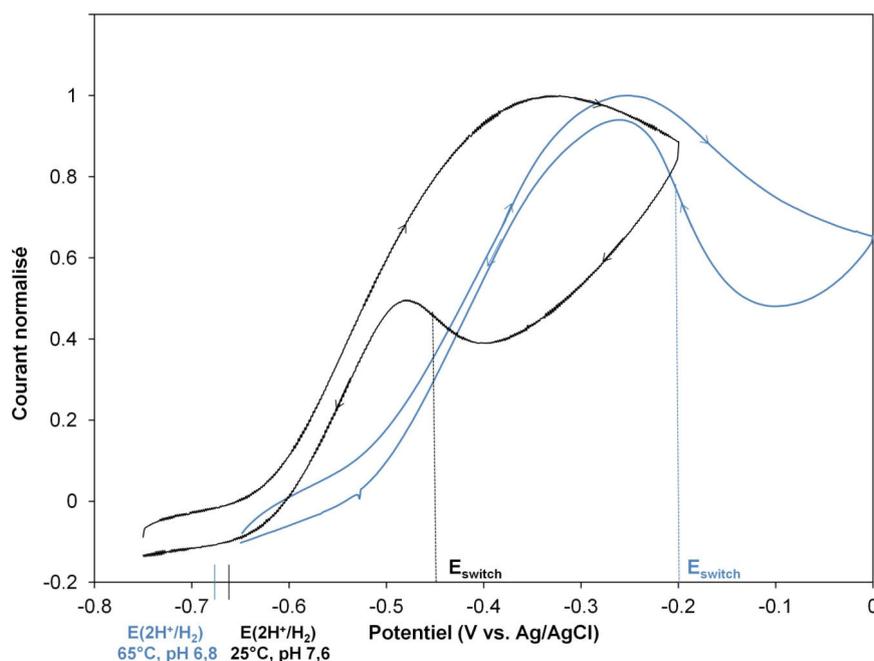


Figure 20- Voltammétrie cyclique de l'oxydation de H_2 par l'hydrogénase I d'*Aquifex aeolicus* (courbe bleue, $T=60^\circ C$; Tampon Hepes 50 mM pH 6,8) et par l'hydrogénase de *Desulfovibrio fructosovorans* (courbe noire, $T=25^\circ C$; Tampon Hepes 50 mM pH 7,6). Le sens du balayage est indiqué par les flèches. Les marqueurs bleu et noir sur l'axe des potentiels indiquent les potentiels thermodynamiques du couple H^+/H_2 à $65^\circ C$ et pH 6,8 et à $25^\circ C$ et pH 7,6. Les hydrogénases sont immobilisées sur électrode de PG; $\omega=0$; $\nu=5mV.s^{-1}$.

L'oxydation enzymatique de H_2 ne nécessite pas d'activation à bas potentiel et commence en l'absence de médiateur redox lorsque l'électrode est portée à un potentiel supérieur d'environ 100 mV au potentiel redox thermodynamique du couple H^+/H_2 . Ce potentiel de démarrage est proche de celui observé pour les hydrogénases tolérantes de *R. eutropha* et *E. coli*. Le courant catalytique augmente avec le potentiel, atteint un pic vers -250 mV vs. Ag/AgCl et décroît suite à la formation de l'état inactif Ni-B du site actif, qui incorpore un ligand hydroxo pontant le Ni et le Fe (Figure 21).

Ce procédé d'inactivation est cependant réversible, et au scan retour le courant croît de nouveau lorsque le potentiel revient à des valeurs plus cathodiques. Le potentiel E_{switch} , défini comme le potentiel auquel la pente maximale $(di/dE)_{max}$ est atteinte au cours du scan retour [7] est un paramètre thermodynamique caractéristique de l'enzyme : il est respectivement de -200 et -290 mV vs. Ag/AgCl à 60 et $25^\circ C$ pour l'hydrogénase d'*A. aeolicus* à pH 7,2 [93] (Figure 20).

La formation de l'état inactif Ni-B à haut potentiel est une caractéristique des Hases à NiFe. Si elle est observée chez les hydrogénases sensibles comme chez les tolérantes, les potentiels d'inactivation et de réactivation E_{switch} sont plus élevés chez les tolérantes que chez les sensibles. Pour comparaison, E_{switch} est de -450 mV vs. Ag/AgCl pour l'hydrogénase sensible à l' O_2 de *D. fructosovorans* à $25^\circ C$ dans les mêmes conditions [93]. De plus, la réactivation est également plus

rapide chez les hydrogénases tolérantes [199]. Cette inactivation ne fait pas intervenir l' O_2 puisqu'elle a lieu en conditions anaérobies. Pour l'hydrogénase tolérante *Ec-Hyd1*, une étude montre cependant que la formation du Ni-B est plus rapide en conditions aérobies [195].

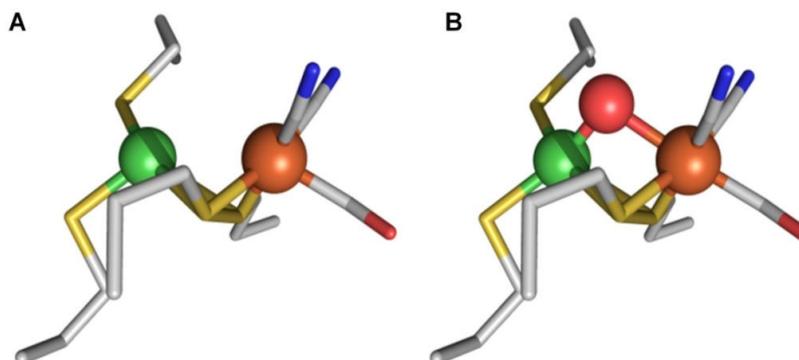


Figure 21- site actif à [NiFe] de l'hydrogénase d'*A. aeolicus* lors du cycle catalytique : A- forme active ; B- forme inactive

VI-3- Une hydrogénase exceptionnellement tolérante

VI-3-a- Activité à haute température

L'*Aa* Hase 1 catalyse l'oxydation de l' H_2 sur un large intervalle de température allant de 20 à 90°C. L'activité en catalyse homogène, évaluée en spectroscopie UV-vis avec le méthylviologène comme accepteur d'électrons, évolue avec la température et atteint un optimum à 80°C [211]. Lorsque l'Hase est immobilisée à une électrode de PG, les courants catalytiques d'oxydation électroenzymatique de l'hydrogène augmentent de 25 à 70°C [93].

VI-3-b- Tolérance à l' O_2

VI-3-b-i- Observations

Pour rappel, l'introduction d' O_2 pendant la catalyse électroenzymatique d'oxydation de l' H_2 provoque chez les hydrogénases sensibles une perte complète de l'activité. Après évacuation de l' O_2 , on ne retrouve pas d'activité tant que l'hydrogénase est maintenue à des potentiels oxydants. La réactivation est observée à des potentiels plus réducteurs. En chronoampérométrie on distingue 2 phases de réactivation : l'une rapide et l'autre lente, qui correspondent respectivement à la réactivation des états Ni-B et Ni-A.

Lorsque l'hydrogénase d'*A. aeolicus* est incubée pendant 2h en présence de l' O_2 à 37 ou 80°C avant la réalisation du test d'activité avec méthylviologène réduit comme accepteur d'électrons, aucune inactivation n'est remarquée [214]. Cependant, dans ce cas, O_2 est absent pendant le cycle

catalytique. Des expériences supplémentaires sont réalisées en électrochimie afin d'offrir l'opportunité au dioxygène d'agir pendant le cycle catalytique. Lorsque l'électrode est portée à un potentiel fixé à 0 V vs. Ag/AgCl, l'enregistrement en chronoampérométrie du courant délivré après injection dans l'électrolyte d'une solution saturée en air montre que la vitesse d'inactivation par O₂ est 5 fois plus faible pour l'hydrogénase d'*A. aeolicus* que pour l'hydrogénase de *D. fructosovorans* à 40°C et pH 7 [214]. Enfin, l'injection dans l'électrolyte d'une solution saturée en O₂ au cours du balayage anodique d'une expérience de voltammétrie cyclique ne provoque qu'une très faible chute du courant, ce dernier étant restauré lors du balayage cathodique [93] (Figure 22 A). En chronoampérométrie à +4 mV vs. Ag/AgCl, une perte d'activité de l'oxydation du H₂ est observée lors de l'injection d'une solution saturée en O₂ dans l'électrolyte (Figure 22 B). L'activité est cependant entièrement restaurée simplement en chassant l'oxygène, alors que pour les hydrogénases sensibles la réactivation exige un potentiel réducteur (environ -325 mV vs. Ag/AgCl) [199].

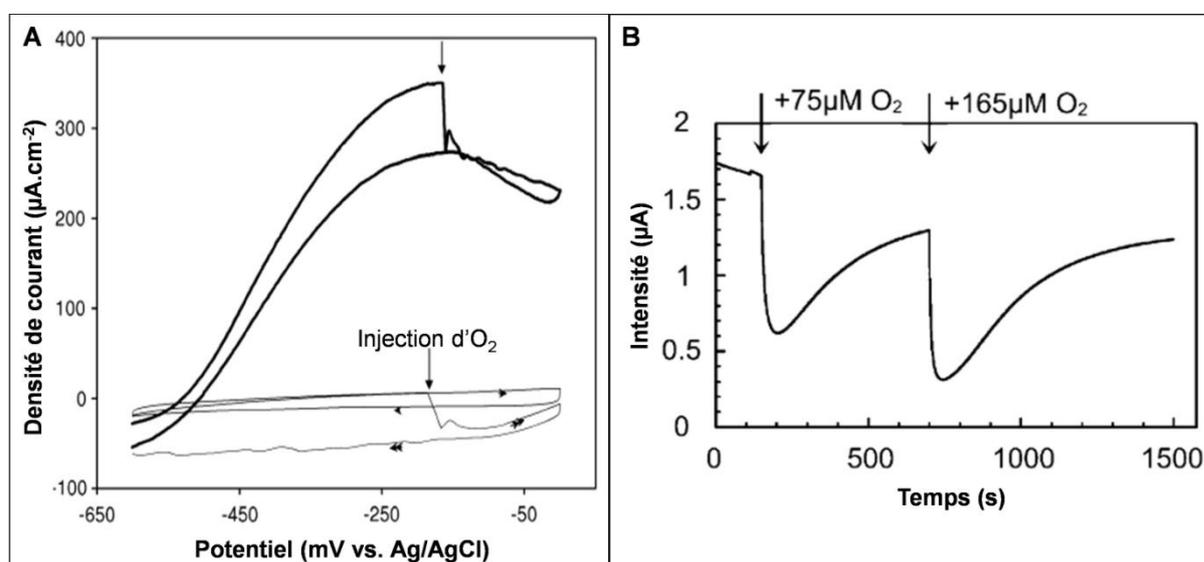


Figure 22- Influence de l'O₂ sur l'oxydation de l' H₂ par l'Aa Hase 1. A : voltammétrie cyclique de l'oxydation du H₂ par l'Aa Hase 1 (trait épais) et par l'électrode sans enzyme (trait fin). La flèche représente dans chaque cas l'injection d'une solution saturée en O₂. Tampon Hepes 50 mM ; pH 6,8 ; 60°C. Reproduit de [93]. B : Expérience de chronoampérométrie montrant la variation de l'activité (proportionnelle au courant) de l'Aa Hase 1 après addition d'O₂ dans l'électrolyte à E = 4 mV vs. Ag/AgCl ; pH 7 ; T=40°C ; 1 bar H₂. Reproduit de [199].

VI-3-b-ii- Le site actif à [NiFe]

Le site actif à [NiFe] possède la coordination commune aux hydrogénases sensibles et tolérantes: le nickel est coordonné par 4 cystéines dont deux pontent le Ni et le Fe, et le fer est coordonné par deux ligands CN⁻ et un ligand CO identifiés par FTIR [199]. Son potentiel est cependant plus élevé que celui des hydrogénases sensibles [199] (Tableau 4). Comme mentionné plus

haut, la valeur du potentiel E_{switch} est également plus élevée que chez les hydrogénases sensibles. Des études RPE et FTIR montrent par ailleurs la présence de la forme Ni-B et l'absence de la forme Ni-A du site actif pour l'enzyme « as prep » et soumise à des conditions oxydantes [199].

VI-3-b-iii- Les centres [FeS]

Deux ligands cystéines supplémentaires du centre [FeS] proximal ont été identifiés dans la séquence protéique [210], permettant de déduire la présence du motif à 6 cystéines. De plus, comme chez les autres hydrogénases tolérantes, des transitions redox inusuelles sont détectées. Deux transitions ont lieu dans un intervalle de potentiel très faible, et un état super-oxydé est formé. Ces éléments permettent de supposer la structure [4Fe-3S] de ce relais électronique. Les centres [FeS] médian et distal ont des propriétés électroniques semblables à ceux des hydrogénases sensibles, mais leurs potentiels sont plus élevés de la même manière que chez les autres hydrogénases tolérantes (Tableau 4) [209].

Hase	Potentiel apparent de la transition redox (mV vs. Ag/AgCl)							
	Site actif NiFe			FeS proximal			médian	Distal
	Ni-B / Ni-SI _b	Ni-SI _a / Ni-C	Ni-C / Ni-R	[4Fe-3S] 5+/4+	[4Fe-3S] 4+/3+	[4Fe-4S] 2+/1+	[3Fe-4S] 1+/0	[4Fe-4S] 2+/1+
<i>Df</i>	≈ -400	≈ -550	≈ -650	∅	∅	-546	-145	-546
<i>Aa</i>	-311	-501	-503	26	-121	∅	-142	-284

Tableau 4- Potentiels apparents des transitions redox du site actif et des centres [FeS] à pH 7 chez les hydrogénases sensible de *Desulfovibrio fructosovorans* [215] et tolérante d'*Aquifex aeolicus* [199, 216]. L'erreur est de ± 20 mV pour *Aquifex aeolicus*.

VI-3-c- Tolérance au CO

A l'instar des autres hydrogénases membranaires périplasmiques tolérantes à l'oxygène [192, 195], l'*Aa* Hase 1 se montre également tolérante au CO, un inhibiteur compétitif des hydrogénases à [NiFe] sensibles à l'O₂. Lorsqu'une solution saturée en CO est ajoutée au cours d'une expérience de voltammétrie d'oxydation de H₂ par l'hydrogénase immobilisée dans un réseau de SW-CNTs carboxylés, aucune diminution de l'activité électrocatalytique n'est observée [93] (Figure 23).

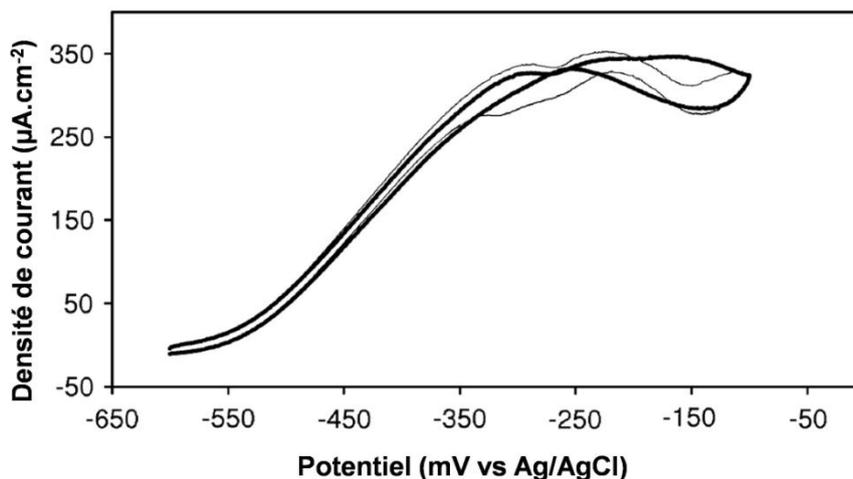


Figure 23 – Voltammogrammes de l'oxydation de l' H_2 par l'Aa Hase 1 avant (trait fin) et après (trait gras) l'ajout d'une solution saturée en CO. Tampon Hepes 50 mM ; pH 6,8 ; $T=60^\circ C$; $v=5 \text{ mV}\cdot s^{-1}$; $\omega=0 \text{ rpm}$. Reproduit de [93].

Les études de spectroscopie FTIR et électrochimie couplée infrarouge montrent pourtant que le CO a bien accès au site actif et peut s'y lier dans des conditions d'incubation prolongée dans des solutions saturées en CO. Cependant cette liaison est faible, et possible exclusivement lorsque le site actif est dans la forme Ni-SI_a. La formation de l'adduit Ni-SCO est réversible. La réduction et l'oxydation entraînent le départ du CO et la formation des états réduit Ni-R ou oxydé Ni-B. Chez les hydrogénases sensibles au contraire, l'inhibition n'est réversible que par exclusion du CO de la solution ou par illumination à températures cryogéniques [217].

E- Une Biocathode pour la biopile H₂-O₂ : les Bilirubine oxydases

La réduction enzymatique du dioxygène est réalisée dans la nature par deux familles d'enzymes : les oxydases terminales (quinol ou cytochrome oxydases), et les oxydases multi-cuivre (MCO). Les premières reçoivent les électrons d'un cytochrome ou d'un quinol pour la création d'un gradient de protons favorable à la synthèse de l'ATP [218]. Les secondes ont pour fonction l'oxydation de substrats organiques ou d'ions métalliques [219]. Les MCOs réduisent O₂ à un potentiel plus élevé que les oxydases terminales [219], à l'exception de certaines oxydases d'organismes extrémophiles. Elles sont de plus solubles, contrairement aux oxydases terminales membranaires, et sont donc des candidats plus intéressants comme catalyseurs dans les biopiles H₂-O₂.

I- Les bilirubine oxydases (BODs), des MCOs à forte potentialité

Les MCOs couplent la réduction à 4 électrons du dioxygène à l'oxydation à un électron de 4 molécules de substrat grâce à au moins 4 ions cuivre (dans la majorité des MCOs ces ions sont effectivement 4, mais certaines exceptions existent, comme la céruloplasmine qui compte par exemple 6 ions cuivre). Les centres cuivre sont organisés en un site mononucléaire de type T1 où a lieu l'oxydation du substrat, et un site trinucéaire (TNC) comportant un ion de type T2 et deux ions de type T3 où a lieu la réduction du dioxygène (Figure 24). La distinction entre les types de Cu se fait d'après les propriétés optiques et magnétiques des ions [219]. Un transfert de charge entre un ligand cystéine et le cuivre T1 Cu(II) se traduit par une bande caractéristique à 610 nm dans le spectre d'absorption UV-visible, responsable de l'intense couleur bleue de ces oxydases. Ce site est par ailleurs caractérisé en RPE par un A // exceptionnellement bas [220]. L'ion paramagnétique T2 est également détectable en RPE, mais est silencieux en spectroscopie UV-visible. Enfin, les ions T3 couplés de façon anti-ferromagnétique sont silencieux en RPE, mais responsables d'un épaulement à 330 nm dans le spectre d'absorption UV-visible, dû à un transfert de charge du ligand HO⁻ à un Cu(II) [220].

Le terme « MCOs » regroupe différentes classes d'enzymes parmi lesquelles les laccases, les ascorbate oxydases, la céruloplasmine et les nitrite réductases [219]. Les BODs (bilirubine : oxygène oxydoréductases EC 1.3.3.5) sont des MCOs découvertes en 1981[221] et ainsi dénommées en raison de leur capacité à oxyder un tétrapyrrole, la bilirubine, dans ses formes conjuguée et non-conjuguée, en plus de certains substrats traditionnels des laccases plus classiquement étudiées (polyphénols, anilines, thiophénols...) [222-223]. Elles se différencient des laccases notamment par leur meilleure

activité à pH neutre, leur résistance aux ions chlorure à pH neutre [222-223], et donc leur capacité à réduire l'oxygène dans des conditions physiologiques (c.à.d. ici les conditions de température, pH et concentration en chlorures des liquides physiologiques, classiquement 20 mM phosphate ; pH 7,2 ; 37°C ; 140 mM NaCl) [223-224]¹.

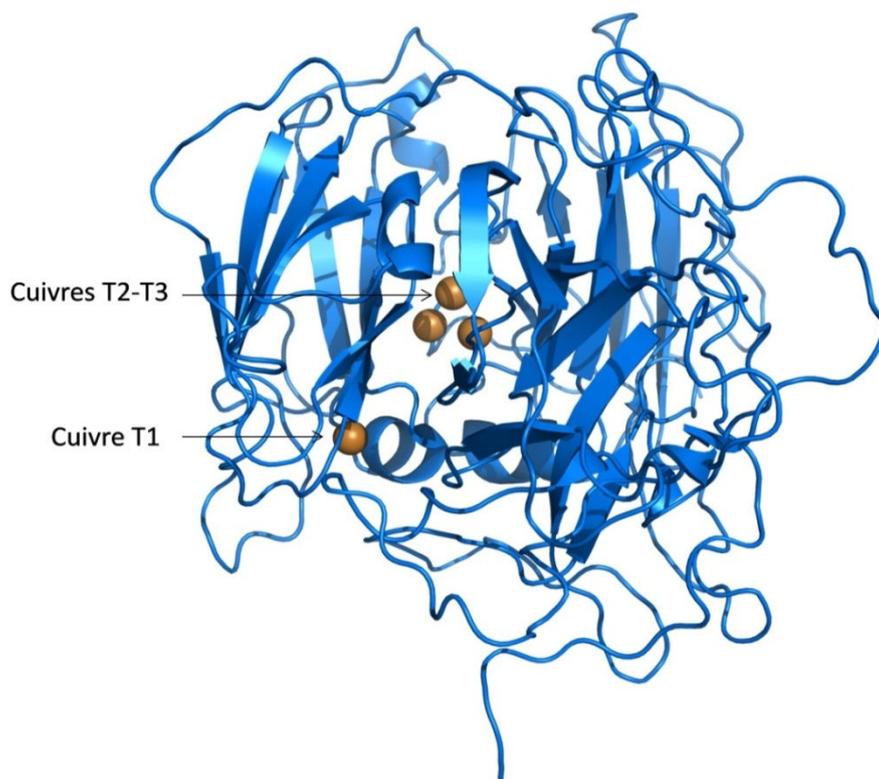


Figure 24- Structure cristallographique d'une bilirubine oxydase, la BOD de *Myrothecium verrucaria* (pdb ID : 3ABG)

organisme d'origine	poids moléculaire (kDa)	pH optimal (ABTS)	K_M (ABTS) (μM)	k_{cat} (ABTS) (s^{-1})	structure résolue (pdb ID)	Réf.
<i>Myrothecium verrucaria</i> (fungus)	66	6,5	250	115	Oui (3ABG, 2XLL)	[225-226]
<i>Trachyderma tsunodae</i> (fungus)	64	n.d.	n.d.	n.d.	Non	[227]

¹ Ce point est surtout important pour le développement des biopiles implantables, mais n'est de façon plus générale pas négligeable lors du choix des électrolytes des biopiles.

<i>Magnaporthe oryzae</i> (fungus)	64	4	429	664	Non	[228]
<i>Bacillus subtilis</i> (bactérie G+)	65	4	124	322	Oui (1GSK)	[229-230]
<i>Bacillus pumilus</i> (bactérie G+)	59	3	31,7	391	Non	[231-232]

Tableau 5- Quelques caractéristiques de BODs étudiées en électrochimie. Les paramètres cinétique k_{cat} et thermodynamique K_M sont exprimés relativement à l'ABTS choisi comme substrat modèle à cause de son utilisation fréquente comme médiateur redox en électrochimie.

Les BODs des champignons *Myrothecium verrucaria* (*Mv* BOD) [220, 233-235] et *Trachyderma tsunodae* (*Tt* BOD) [227, 235-236] ont été particulièrement étudiées, notamment à cause de leur disponibilité commerciale. Cependant, des bilirubine oxydases de diverses origines ont été identifiées, isolées et caractérisées. On citera les BODs fongiques de *Penicillium janthinellum* [222] ou *Magnaporthe oryzae* (*Mo* BOD) [237], ou les BODs bactériennes, notées « Cot A » pour endospore coat component A, des *Bacilli subtilis* (*Bs* BOD) [229], *licheniformis* [222] et *pumilus* (*Bp* BOD) [231]. Le tableau 5 regroupe quelques caractéristiques de certaines de ces BODs qui ont été étudiées en électrochimie.

II- Un catalyseur efficace pour la réduction électroenzymatique de l'O₂

Une particularité essentielle des BOD est leur capacité à oxyder la bilirubine, un produit de dégradation de l'hème, dont la quantification est notamment essentielle dans le diagnostic de la jaunisse. Ces enzymes ont donc été utilisées pour la construction de capteurs biochimiques [238] ou bioélectrochimiques [239] de la bilirubine [222]. Néanmoins, en raison des propriétés mentionnées plus haut d'activité et de résistance aux ions chlorure à pH neutre, les BODs se sont très rapidement également imposées comme catalyseurs de choix de la réduction du dioxygène pour les cathodes des biopiles à combustible.

En 2001, Tsujimura réalise la première cathode réduisant le dioxygène grâce à la *Mv* BOD immobilisée sur du feutre de carbone, via un transfert d'électrons médié par l'ABTS [240]. Si les mécanismes d'électrocatalyse de la BOD sont pour le moment moins investigués que pour l'hydrogénase, quelques idées fortes se dégagent de la littérature. Le site T1 accepteur d'électrons se situant à une distance approximative de 10 Å de la surface protéique, un processus de transfert

d'électrons direct comme médié est en théorie possible suivant la méthode d'immobilisation à l'électrode

II-1- Connexion directe

II-1-a- Aspect fondamental

Le courant direct de réduction de l'O₂ par une BOD est observé pour la première fois en 2004 [241]. La possibilité de connecter l'enzyme directement à une électrode rend alors possible l'utilisation de l'électrochimie comme outil pour investiguer le mécanisme de réduction de l'O₂. Ainsi l'utilisation d'une électrode tournante à disque et à anneau, qui permet la détection des intermédiaires réactionnels des réactions électrochimiques, montre l'absence de H₂O₂ dans le milieu. Ce résultat favorise l'hypothèse d'un mécanisme de réduction de l'oxygène à 4 électrons [242]. La mesure du potentiel du site T1 peut également être déterminée grâce à l'électrochimie directe [235-236]. Cette technique met enfin en évidence l'existence de formes distinctes de l'enzyme à l'état « resting » [234, 237].

II-1-b- Des Biocathodes efficaces

La connexion directe de plusieurs BODs est réalisée sur différents matériaux d'électrode : la *Tt* BOD est immobilisée sur du graphite [236], la *Mv* BOD sur des nanotubes de carbone multi-parois [243], une électrode respirante à base de noir de carbone [244] ou dans de l'or nanoporeux [245], la *Bp* BOD sur carbon cryogel [246]. Une forme caractéristique du signal obtenu en voltammétrie cyclique est donnée sur la figure 25. Les densités de courant de réduction de l'oxygène atteignent respectivement 60 $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ [236]; 0,35 $\text{mA}\cdot\text{cm}^{-2}$ [244]; 0,8 $\text{mA}\cdot\text{cm}^{-2}$ à 0 rpm [245] et 6 $\text{mA}\cdot\text{cm}^{-2}$ à 60°C et 3000 rpm [246]. On note une nette progression des densités de courant, grâce notamment à la nanostructuration de l'électrode et à l'apport adéquat de substrat.

Pour favoriser la connexion directe, le contrôle de l'orientation de la *Mv* BOD peut être réalisé en recouvrant le matériau d'électrode de son substrat naturel, la bilirubine, ou de certains de ses analogues [59, 225], en modifiant la surface par un mélange de fonctions acides 6,2-aminonaphtoïque (Figure 25) et 3-mercaptopropionique [136], ou par des composés portant des groupements carboxylates [29, 233]. L'efficacité de la catalyse électroenzymatique par la *Mv* BOD est en revanche diminuée par le greffage sur l'électrode de composés présentant un seul cycle aromatique ou des fonctions terminales hydrophobes [233].

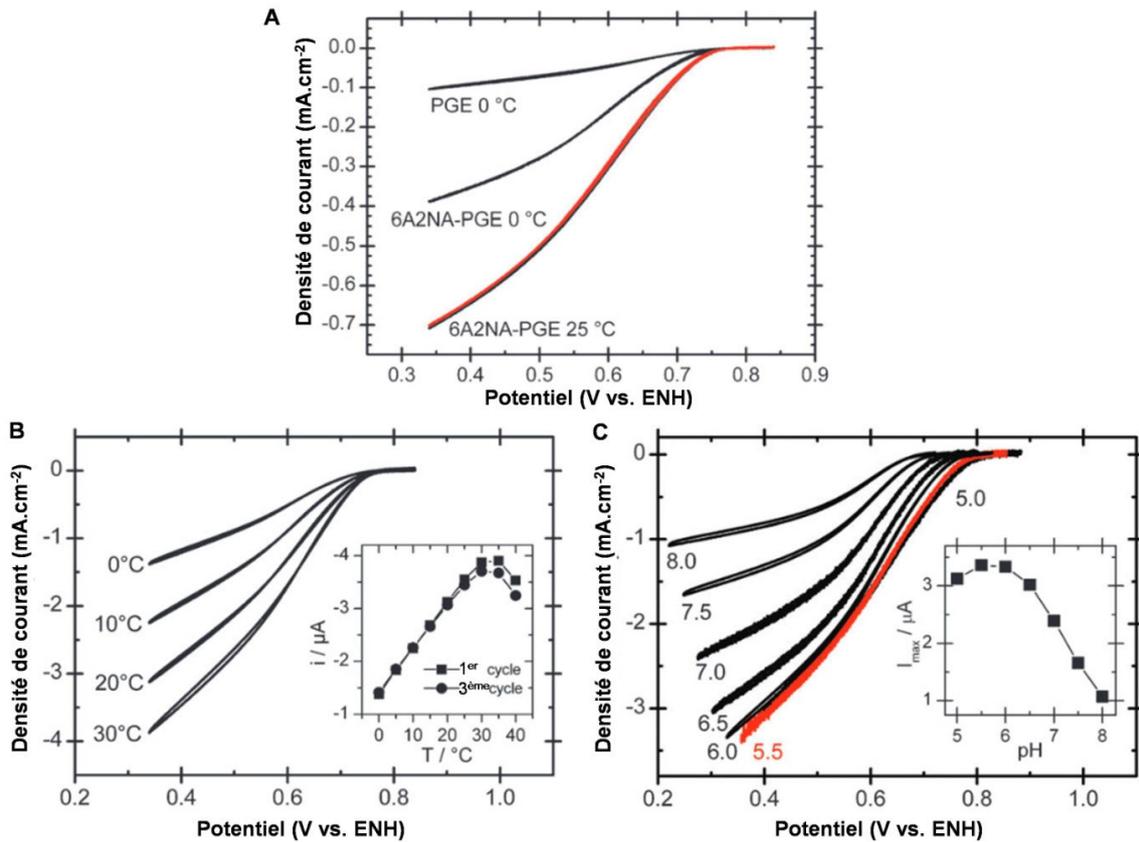


Figure 25 - Voltammogrammes de réduction de l' O_2 par la bilirubine oxydase de *Myrothecium verrucaria* immobilisée sur une électrode de PG. A : Influence de l'ajout d'acide 6,2-aminonaphtoïque (6A2NA) à la surface de l'électrode avant immobilisation de la BOD. Voltammétrie cyclique réalisée dans du citrate de sodium 100 mM pH 6,0 sous 1 bar d' O_2 . B : Influence de la température à pH 6,0 et 1 bar O_2 . L'encart montre l'évolution des courants mesurés à +340 mV vs. ENH. C : influence du pH à $T=0$ °C et 1 bar O_2 . L'encart montre l'évolution des courants mesurés à 535 mV par rapport au potentiel du couple O_2/H_2O . Dans tous les cas, $\omega=2500$ rpm et $v=5$ mV.s⁻¹. Adapté de [233].

La connexion directe des BODs sur l'or nu est plus controversée. Certaines études décrivent une dénaturation de la *Mv* BOD au contact direct de l'or nu [136, 233], ou l'impossibilité d'immobiliser fonctionnellement la *Tt* BOD sur cette surface [236], sans que les raisons en soient explicitées. Une étude décrit cependant la réduction directe de l' O_2 par la *Mv* BOD immobilisée sur de l'or monocristallin non modifié. La forme du voltammogramme est alors semblable à ce qui est enregistré lorsque la *Mv* BOD est immobilisée à une électrode de graphite, et les valeurs des densités de courant sont également cohérentes [247]. Dans un autre cas l'immobilisation de la *Mv* BOD sur de l'or nu est également fonctionnelle pour le TED, mais ce résultat est attribué à la modification de la morphologie de l'électrode, notamment par l'intermédiaire de nanoparticules ou grâce à la conception de matériaux nanoporeux [245].

II-2- Connexion médiée

La connexion médiée est quant à elle réalisée via l'utilisation d'un médiateur redox, notamment l'ABTS [240, 248-249], ou le $K_3[Fe(CN)_6]$ [236]. L'immobilisation de la *Tt* BOD sur des SAMs anioniques hydrophiles conduit par exemple à l'orientation du centre T2-T3 vers l'électrode. La réduction de l' O_2 n'est observée dans ce cas qu'après ajout d'un médiateur. L'or nu et les autres types de SAMs (cationiques, hydrophobes) ne permettent pas l'immobilisation fonctionnelle de la *Tt* BOD [236]. Au contraire, du TEM est observé lorsque la *Mv* BOD est immobilisée sur des SAMs hydrophobes ou chargées positivement [247]. Compte tenu des différences observées entre les comportements de la *Mv* et de la *Tt* BOD, il paraît clair que l'orientation est spécifique à une enzyme. Le manque d'informations structurales sur la *Tt* BOD empêche néanmoins de définir les bases moléculaires de l'immobilisation orientée.

Lorsque la *Tt* BOD est immobilisée sur les SAMs anioniques hydrophiles, de l' H_2O_2 est détectée en l'absence de médiateur redox. Cependant l'origine de ce produit n'est pas claire : il pourrait provenir de la réduction incomplète de l' O_2 par la BOD, ou être lié à l'oxydation de la SAM [236]. On peut remarquer que ce phénomène a déjà été observé avec des laccases [250]. La réduction de l' O_2 par les laccases de *Trametes hirsuta* et de *Cerrena maxima* immobilisées sur des électrodes d'or nu débute à + 36 mV vs. Ag/AgCl, et une quantité d' H_2O_2 3 fois plus importante qu'en l'absence de laccase est libérée. Ce potentiel particulièrement bas et la formation d' H_2O_2 sont attribués à une orientation de la laccase sur l'électrode qui permettrait un transfert d'électrons directement au T2-T3 (sans passer par le T1) mais conduirait à une réduction incomplète de l' O_2 .

L'immobilisation dans un polymère hydrogel redox contenant des complexes osmium-pyridine de potentiel redox modulable permet également de connecter la BOD de façon médiée. Pour rappel, cette méthode proposée par le groupe d'Heller [251-253] permet de multiplier le nombre d'enzymes immobilisés durablement à l'interface et de réaliser une connexion électrique efficace sans tenir compte de leur orientation ou de leur distance à l'électrode. Mise au point dans un des laboratoires les plus impliqués dans l'étude des BODs, cette technique est largement utilisée pour l'électrochimie de ces enzymes. Elle a notamment été implémentée :

- pour la *Mv* BOD, ce qui permet d'obtenir des densités de courant de catalyse de la réduction de O_2 de 5 mA.cm^{-2} dans des conditions physiologiques (pH 7,4 ; 150 mM NaCl ; 37,5°C) [251] ;
- pour la *Tt* BOD, conduisant à des densités de courant de 3 mA.cm^{-2} [252] et des stabilités améliorées ;
- pour la *Bp* BOD [224, 231-232, 246], les courants atteignant $4,8 \text{ mA.cm}^{-2}$ (pH 5 ; électrolyte saturé en O_2 ; 70°C ; 4000 rpm) [232] ;

- pour la *Mo* BOD, permettant l'obtention de $1,3 \text{ mA.cm}^{-2}$ (1 atm O_2 ; 100 mM sodium phosphate ; pH 7,2 ; 37°C ; 500 rpm) [254].

III- Mécanisme de réduction de l' O_2

III-1- Le site actif

Le mécanisme de réduction du dioxygène par les BODs, et plus généralement par les MCOs, n'est pas totalement élucidé. Un mécanisme communément admis, décrit sur la figure 26, met en jeu deux transferts consécutifs à deux électrons. Le second transfert étant extrêmement rapide, on parle en réalité d'un mécanisme à quatre électrons [219]. O_2 se lie au TNC à l'état réduit, est immédiatement réduit par deux électrons conduisant à la formation de l'état « intermédiaire péroxy » de l'enzyme. Le clivage consécutif de la liaison O-O résulte en la formation de l'état « intermédiaire natif ». La régénération de l'état totalement réduit a lieu grâce à l'oxydation de 4 molécules de substrats [219, 255].

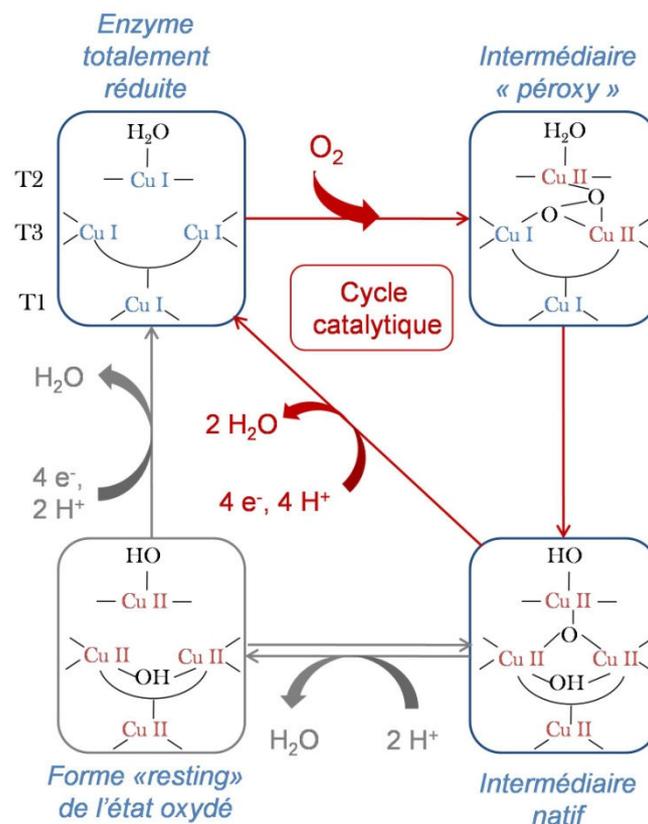


Figure 26- Mécanisme de réduction de l' O_2 par les MCOs. Les étapes du cycle catalytique sont indiquées par les flèches rouges, les flèches grises indiquent des étapes n'intervenant pas dans le cycle catalytique. Adapté de [219, 234]. Les ions H^+ sont issus d'acides aminés faiblement acides (aspartate et glutamate) de la protéine.

Par ailleurs, l'existence d'une forme « resting » de l'enzyme, inactive pour la catalyse, a été décrite [219, 234]. Cette forme totalement oxydée est formée lentement. Sa réduction est lente également. Elle a d'abord été supposée ne pouvoir être réintégrée dans le cycle catalytique que par réduction [219]. La représentation adoptée sur la figure 26 est issue de l'étude de Cracknell *et al.*, selon laquelle cette forme est en équilibre avec la forme oxydée active, et peut donc être transformée en forme active sans étape de réduction [234]. Enfin, l'existence d'un état appelé « X », issu de l'intermédiaire peroxy, est également démontrée (non représenté sur la figure) [234].

III-2- Transferts électroniques

Le cuivre T1 est caractérisé par un unique potentiel redox de la transition $\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^+$, qui dépend de la géométrie du centre cuivre, de sa coordination, de la nature des ligands et en particulier de leur hydrophobicité [256]. Des études électrochimiques ont comparé la *Mv* BOD sauvage et un de ses mutants dans lequel le T1 est modifié pour présenter un potentiel plus faible. Elles démontrent que le T1 est bien le lieu d'interaction avec l'électrode, et donc d'oxydation du substrat [257].

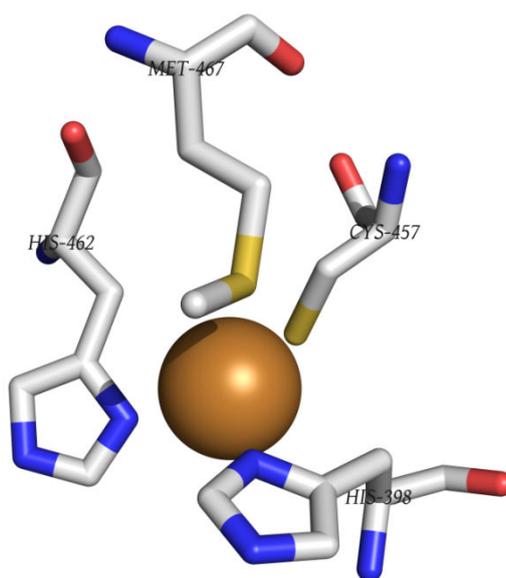


Figure 27- Environnement du cuivre T1 de la BOD de *Myrothecium verrucaria* (pdb ID : 3ABG)

Le potentiel redox du cuivre T1 a pu être déterminé dans certains cas par titration redox, par spectroélectrochimie ou par électrochimie directe. Le tableau 6 reporte les valeurs des potentiels des cuivre T1 de deux différentes BODs en fonction de la méthode utilisée. La nature des ligands n'est clairement pas l'unique facteur influençant le potentiel puisque le T1 des BODs de *Mv* et *Tr*, coordonnés respectivement par deux histidines, une méthionine, une cystéine (Figure 27), et par deux histidines, une méthionine, une phénylalanine, ont des potentiels très voisins. Par ailleurs, les fluctuations observées pour une même enzyme peuvent être attribuées à des effets de solvant, et, pour

l'électrochimie, à des variations de l'orientation de l'enzyme à l'électrode. On peut noter néanmoins que les potentiels observés en électrochimie directe en l'absence de substrat sont en accord avec le potentiel de réduction de l'O₂ en l'absence de médiateurs, montrant que l'électrode est le donneur primaire d'électrons en l'absence de médiateurs [236, 258-259].

Organisme	Potentiel redox du Cu T1 (vs. Ag/AgCl)	Méthode	Référence
<i>Myrothecium verrucaria</i>	460 mV (pH 7)	Titration redox	[235]
	404 mV (pH 7)	Electrochimie directe	[258]
	280 mV (pH 5,3)	Titration redox	[220]
	475±15 mV pH 7	Electrochimie directe	[259]
<i>Trachyderma tsunodae</i>	450 mV (pH 7)	Titration redox	[235]
	480 mV (pH 7)	Electrochimie directe	[236]
	405 mV (pH 6,8)	Titration redox	[227]

Tableau 6- Potentiels redox du Cu T1 des BODs de *Myrothecium verrucaria* et *Trachyderma tsunodae* évalués par différentes méthodes.

Après oxydation des substrats, les électrons sont transférés via un chemin protéique, constitué d'une cystéine et de deux histidines, du Cu T1 au TNC. Ces centres sont séparés d'environ 13 Å [219, 255] (Figure 28).

Les Cu T3 sont coordonnés chacun à 3 Histidines et liés dans l'état oxydé par un ion oxo ou hydroxo pontant. Le Cu T2 est coordonné à deux histidines et une molécule d'eau ou un ion hydroxide [255]. Les ions Cu du TNC pouvant adopter tous les états intermédiaires entre (Cu⁺)₃ et (Cu²⁺)₃, il est plus difficile de déterminer une signature redox caractéristique de ce site. Des transitions redox pouvant être attribuées à un des intermédiaires formés durant le cycle catalytique sont cependant détectées en électrochimie (Tableau 7).

Le potentiel assigné à un des états intermédiaires du TNC est donc inférieur au potentiel du Cu T1. Un mécanisme de transfert d'électron intramoléculaire faisant intervenir au moins une étape endergonique, avec le franchissement d'une barrière de potentiel d'environ 300 mV est proposé [236, 260]. Ce mécanisme a récemment été corroboré par des calculs de dynamique moléculaire et de mécanique quantique des énergies de réorganisation liées au transfert d'électrons du T1 au TNC [260]. Il reste néanmoins controversé [233] car il apparaît en contradiction avec le passage par l'intermédiaire peroxy très oxydant.

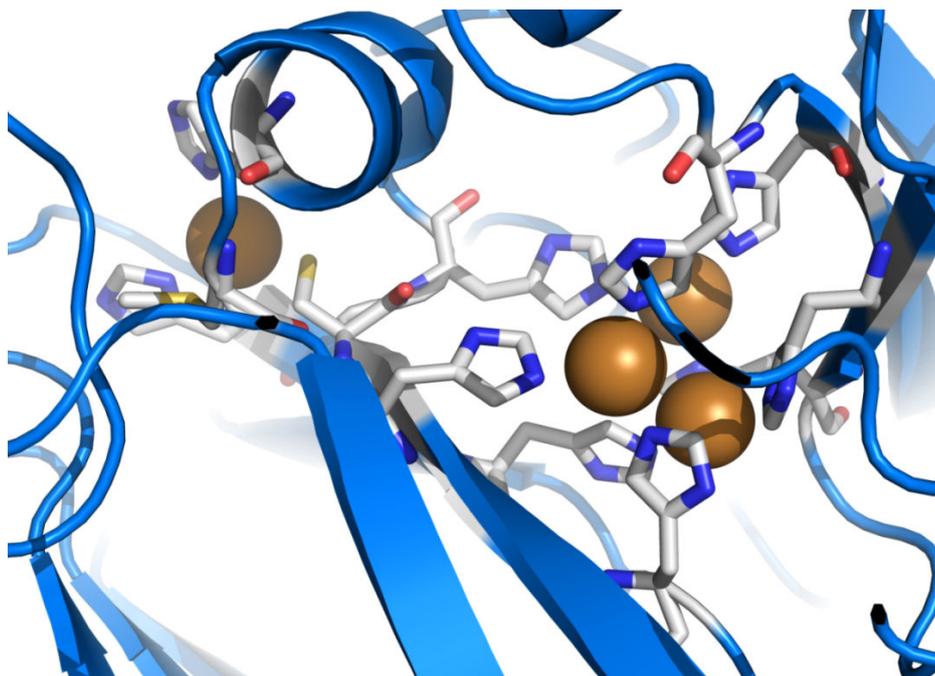


Figure 28- Environnement des cuivres et chemin cystéine-histidines pour le transfert d'électrons du site T1 au site T2-T3.

Organisme	Potentiel redox du TNC (vs. Ag/AgCl)	Méthode	Référence
<i>Myrothecium verrucaria</i>	254 mV (pH 7)	Spectroélectrochimie	[235]
	≈ 190 mV (pH 6,9)	Electrochimie directe	[260]
<i>Trachyderma tsunodae</i>	114 mV (pH 7)	Spectroélectrochimie	[235]
	184 mV (pH 7)	Electrochimie directe	[236]

Tableau 7- Potentiels redox du TNC de certaines BODs

IV- Influence des ions halogénures

Il est communément admis que les BODs présentent une meilleure résistance aux ions chlorure que les laccases. Ce point est cependant rarement décrit de façon rationnelle, les études de la tolérance de la BOD étant généralement réalisées dans des conditions particulières de potentiel et de pH. Par exemple, la *Mv* BOD immobilisée dans un polymère redox est insensible à des concentrations

en NaCl de 500 mM à pH 7,2 et 200 mV vs. Ag/AgCl [261], ou encore de 150 mM à pH 7,4 [251] ; la *Tt* BOD fournit des densités de courant catalytiques pour la réduction de O₂ de 3 mA.cm⁻² à 140 mV à pH 7,4 malgré la présence de 150 mM NaCl [252] ; ou encore la *Bp* BOD immobilisée dans un polymère hydrogel redox est insensible à 140 mM NaCl à pH7,2 [224].

Une étude de l'inhibition par différents anions (N₃⁻, SCN⁻, et les halogénures F⁻, Br⁻, Cl⁻) de l'activité de la *Tt* BOD pour l'oxydation de la bilirubine montre qu'ils agissent selon un mécanisme d'inhibition non compétitif vis-à-vis du substrat, ce qui conduit à penser que l'halogénure ne se lie pas à proximité du Cu T1 mais du TNC, empêchant le transfert électronique intramoléculaire. Cette liaison au T2/T3 est confirmée par l'étude par RPE des centres cuivre. Les paramètres RPE du Cu T2 sont en effet modifiés par l'addition des anions à la BOD dans la forme « resting » de l'état oxydé, contrairement aux paramètres RPE du Cu T1. Enfin, l'augmentation de l'inhibition avec la diminution de la taille des anions (SCN⁻ < N₃⁻ << Br⁻ < Cl⁻ < F⁻) est cohérente avec ce qui est observé pour les laccases [262]. Elle s'explique par l'accessibilité limitée au TNC des ions de taille importante [227], et la diminution de l'affinité de l'ion pour l'enzyme avec l'augmentation de son rayon.

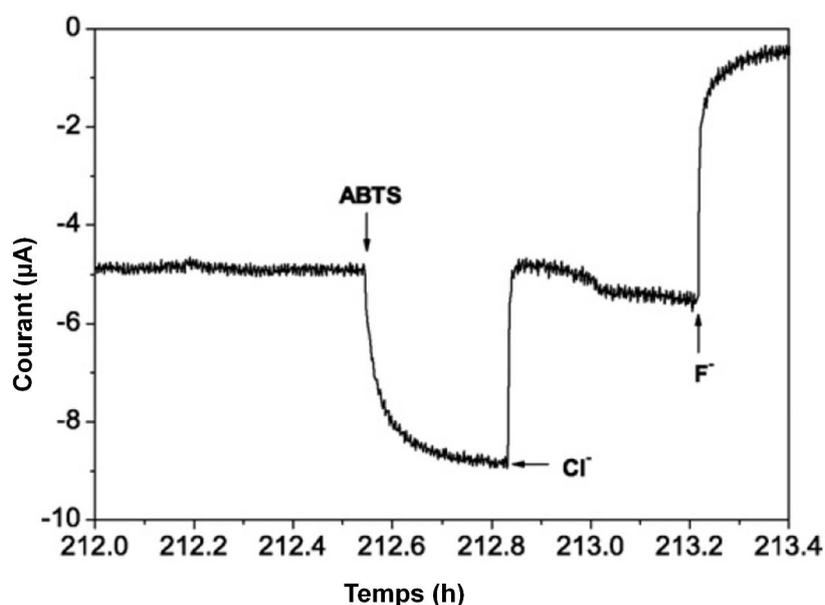


Figure 29 – Influence des ions halogénures sur le courant de réduction de l'O₂ par la laccase de *T. hirsuta* liée covalamment à une électrode modifiée par des groupements aminophényles. L'ajout d'ABTS (0,2 mM) provoque l'apparition d'un courant médié qui est inhibé par l'ajout de Cl⁻ (150 mM). On retrouve le courant direct initial, qui n'est donc pas inhibé par le Cl⁻. L'ajout de F⁻ (13 mM) provoque une perte totale du courant, donc l'inhibition du courant direct.

On peut comparer le comportement de la bilirubine oxydase à celui de la laccase vis-à-vis de l'inhibition par les anions. Immobilisée sur une électrode de graphite modifiée par aminophényle ou 2-

aminophénol, la laccase de *Trametes hirsuta* [164] est inhibée différemment suivant les halogénures. Les ions F^- inhibent à la fois le TED et le TEM, ce qui conforte l'idée qu'ils se lient au TNC, empêchant le transfert électronique entre le T1 et le TNC [263]. Au contraire, les ions Cl^- inhibent seulement le TEM, ce qui suggère qu'ils se lient au T1, bloquant l'accès du T1 au médiateur redox (Figure 29). Deux mécanismes d'inhibition sont donc proposés : le Cl^- serait compétitif et F^- non compétitif vis-à-vis du substrat [264].

Ces conclusions sont cohérentes avec l'étude de l'inhibition d'autres MCOs par RPE [220], qui montrent que les anions OH^- , F^- , N_3^- et CN^- se lient au TNC, provoquant la baisse du potentiel du TNC. D'autres études de MCOs, la superoxyde dismutase [265] ou la ceruloplasmine humaine [266], reportent un changement du potentiel des ions cuivre dû à la liaison des anions au T2/T3. De façon cohérente, le potentiel du signal non catalytique assigné au T2 de la *Mv* BOD décroît en présence de F^- [260]. En revanche, l'observation est différente pour la *Tt* BOD orientée avec le centre T2-T3 vers l'électrode, qui ne présente qu'un signal non catalytique en l'absence de médiateur. L'ajout de F^- montre très peu d'influence sur le signal non catalytique observé en voltammétrie cyclique dans des conditions anaérobies, et sur le signal catalytique de réduction de O_2 observé en voltammétrie cyclique en présence d'un médiateur [236]. Dans ce dernier cas, on remarque que le TEM est possible, donc l'accès au T1 n'est pas bloqué. De plus, on peut supposer que l'orientation particulière de la BOD limite l'accès de F^- au TNC, ce qui conforterait l'idée que les ions F^- se lient au TNC et non pas au T1.

Cependant l'étude des spectres UV-visible de la BOD dans la forme « resting » de l'état oxydé montre une augmentation de la bande à 610 nm, caractéristique du T1, et une diminution de l'épaule à 330 nm, caractéristique des T3, en présence des anions à l'exception de l'ion F^- . La liaison de l'anion au T2/T3 induirait un changement structural provoquant le déplacement d'un électron du Cu T1 vers le TNC. Ce mécanisme, déjà observé pour la ceruloplasmine [266], est possible si le cuivre T1 est partiellement réduit. Or des expériences de spectroscopie UV-vis et de RPE ont montré que le cuivre T1 est dans un équilibre oxydé/réduit. Cet équilibre dépend du pH : lorsque le pH augmente, la proportion de Cu^+ augmente comme le montrent la diminution de la bande à 600 nm et de la proportion de Cu^{2+} détectable en RPE [267]. A pH 6,8 l'oxydation complète de l'enzyme par H_2O_2 révèle que 13% du Cu T1 est réduit dans la forme resting [227].

Les BODs ne sont donc pas insensibles aux halogénures. Un mécanisme d'inhibition non compétitif vis-à-vis du substrat est proposé. Comme pour les laccases, l'effet des halogénures dépend de leur taille. Néanmoins, des explications doivent être trouvées à la résistance aux ions Cl^- observée en électrochimie.

V- La BOD de *Bacillus pumilus* (*Bp* BOD)

V-1- Identification et propriétés

Bacillus pumilus est une bactérie mésophile à Gram positif capable de former dans certaines conditions de stress des endospores qui permettent sa survie. On peut donc logiquement attendre que les enzymes extraites de l'enveloppe de ces endospores présentent des propriétés de résistance particulières. Identifiée en 2011 par Reiss *et al.* et classifiée comme laccase [268], l'enzyme CotA (pour « endospore coat component A ») de *B. pumilus* présente une activité d'oxydation de la bilirubine mise en évidence par le groupe de Nicolas Mano [231] qui l'a donc classifiée comme bilirubine oxydase. Surproduite dans *Escherichia coli* et purifiée en une étape, cette enzyme de 61 kDa présente les caractéristiques physiques et biochimiques recensées respectivement dans les tableaux 8 et 9.

Propriétés optiques			Propriétés magnétiques	
absorbance à 600 nm (T1 Cu(II))	absorbance à 330 nm (T3 Cu(II))	absorbance ratio 607nm/278 nm	T1 (Cu(II))	T2 (Cu(II))
16700 cm ⁻¹	30300 cm ⁻¹	17	$g_{//}=2230 \text{ cm}^{-1}$ $A_{//}=78.10^{-4} \text{ cm}^{-1}$	$g_{//}=2248 \text{ cm}^{-1}$ $A_{//}=195.10^{-4} \text{ cm}^{-1}$

Tableau 8- Propriétés physiques de la *Bp* BOD

Substrat	ABTS	DMP	SGZ	bilirubine conjuguée	bilirubine non conjuguée
pH optimal	3,2	6,8	6,2	5	7
k_{cat}	391 s ⁻¹	57 s ⁻¹	116 s ⁻¹	66,8 s ⁻¹	70 s ⁻¹
K_M	31,7 μM	822 μM	45 μM	35,1 μM	22 μM

Tableau 9- Propriétés biochimiques de la *Bp* BOD déterminées par mesure de l'activité en spectroscopie UV-vis à 37°C.

V-2- Propriétés électrochimiques

Connectée à une électrode via un polymère d'osmium, la *Bp* BOD montre sa capacité à opérer la réduction électroenzymatique du dioxygène via un transfert d'électrons médié [224, 231-232]. Dans les proportions optimales du mélange enzyme/polymère/cross-linker, la réduction de l'O₂ démarre à un potentiel plus faible que pour la *Tt* BOD (420 mV contre 500 mV à pH 7,2 ; 37°C), la *Tt* BOD étant généralement considérée comme la BOD la plus efficace pour la réduction de l'O₂ en H₂O [68, 231]. Après optimisation de la procédure d'immobilisation, la *Bp* BOD délivre en revanche une intensité

plus élevée que la *Tt* BOD (987 contre 500 $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ à 200 mV vs. Ag/AgCl ; 37°C ; 100 mM phosphate pH 7,2 ; 500 rpm) [224]. La différence entre les potentiels de réduction s'explique, comme décrit plus haut, par la nature du ligand axial du T1 : une méthionine faiblement coordinante pour la *Bp* BOD, une phénylalanine non coordinante pour la *Tt* BOD [231]. La mesure du courant médié par le complexe d'osmium lié au polymère en fonction du pH montre un optimum à pH 4. Une relative efficacité de la catalyse est conservée à pH 7, où un tiers du courant obtenu à pH 4 est enregistré [232].

V-3- Thermostabilité

V-3-a- En catalyse homogène

Les BODs bactériennes CotA sont les BODs qui présentent la meilleure thermostabilité. Les temps de demi-vie des BODs fongiques de *M. verrucaria* et *T. tsunodae* ne sont par exemple que de 15 minutes à 60°C [269] et 90 minutes à 37°C respectivement [231]. En revanche un temps de demi vie pour l'oxydation de l'ABTS supérieur à 100 minutes à 80°C a été reporté pour la CotA de *B. subtilis* [269]. La même enzyme n'a rien perdu de son activité d'oxydation de la bilirubine après avoir été maintenue 30 min à 84°C [229]. De la même manière, un temps de demi-vie supérieur à 90 minutes à 80°C est observé pour la *Bp* BOD, et celle-ci présente encore 10% de son activité initiale d'oxydation de l'ABTS après 245 minutes d'incubation dans du tampon phosphate-citrate à pH 4 à 80°C [231]. De plus, son activité mesurée dans du tampon phosphate-citrate pH 4 entre 10 et 85°C avec l'ABTS comme substrat croît jusqu'à 75°C [232], température à laquelle l'activité atteint un plateau.

V-3-b- En catalyse hétérogène

La plupart des MCOs actives pour la réduction électrochimique du dioxygène opèrent à des températures modérées. Néanmoins la BOD de *B. subtilis* a montré une activité efficace à l'électrode dans l'intervalle de température 45-50°C [270-271]. En accord avec le comportement observé en solution, les performances d'une cathode réalisée avec la *Bp* BOD immobilisée dans un hydrogel d'osmium sont accrues avec la température jusqu'à 70°C [232].

V-4- Résistance à l'urate et au NaCl

La *Bp* BOD est très résistante à l'urate, substance à l'origine de l'instabilité en milieu physiologique d'électrodes basées sur la *Tt* BOD. Cette propriété de résistance a permis le développement d'une cathode pour la réduction électroenzymatique de l' O_2 capable d'opérer de manière efficace dans le sérum [224]. Celle-ci fournit près d'1 $\text{mA}\cdot\text{cm}^{-2}$ et conserve 90% de son activité après 3h20 d'opération continue à 100 mV vs. Ag/AgCl et 500 rpm.

Enfin, la résistance au NaCl des BODs a été évoquée plus haut. Pour des concentrations élevées de NaCl (de l'ordre de 1 M), on constate cependant une baisse de l'activité. La *Bp* BOD semble plus tolérante que la *Tt* BOD [231] : à pH 7 et 25°C la première conserve en effet 50% de son activité d'oxydation de la syringaldazine (SGZ) en présence d'1 M de NaCl, tandis que la seconde conserve 40% de son activité en présence de 0.8 M de NaCl. On peut noter cependant que les mesures de résistance au NaCl ont été effectuées à pH neutre, bien que la *Bp* BOD montre une activité optimale à pH 4. Ce point fera l'objet d'une étude fondamentale au cours de cette thèse.

F- Les Biopiles H₂-O₂

I- L'Idée

Comme expliqué dans la partie B, les enzymes sont des électrocatalyseurs intéressants, de par les propriétés remarquables de spécificité, sélectivité, leur constante de turnover par site actif élevée, et leur capacité à opérer dans des conditions variées avec de faibles surtensions. L'accroissement des connaissances fondamentales des hydrogénases, tant sur le plan des mécanismes catalytiques que sur celui de l'immobilisation fonctionnelle, permet aujourd'hui de faire fonctionner les biopiles H₂-O₂. Cette étude bibliographique se focalisera essentiellement sur les propriétés des bioanodes implémentées dans des biopiles H₂-O₂, qui reposent sur l'utilisation novatrice d'hydrogénases. Les biocathodes réductrices d'oxygène ont en effet déjà fait l'objet de nombreuses études, qui montrent en particulier que la BOD est plus efficace que le platine pour la réduction du dioxygène dans des conditions physiologiques [33]. Ces dix dernières années, de nombreuses biopiles utilisant une BOD à la cathode ont ainsi été développées [272]. Ces biocathodes interviennent dans les biopiles éthanol-O₂ [273], fructose-O₂ [40], glucose-O₂ [47, 58, 114, 120, 274]. Un point complet sera ensuite fait sur toutes les biopiles H₂-O₂ actuellement décrites dans la littérature.

L'idée que les hydrogénases pourraient remplacer les catalyseurs conventionnels dans des piles à combustible apparaît dès les années 1970s [275]. L'efficacité potentielle de ces enzymes, en termes d'activité catalytique, de surtensions et de résistance aux inhibiteurs est ensuite étudiée, et permet d'envisager leur utilisation effective en biopile.

Avant même que n'apparaissent les structures cristallographiques d'Hases tolérantes à O₂, la pertinence de l'utilisation de l'Hase par rapport aux nanoparticules de platine est étudiée. Il est montré que les hydrogénases sont au moins aussi actives que le platine, du moins dans certaines conditions de pression d'H₂ et de surtension. L'hydrogénase d'*A. vinosum* immobilisée sur une électrode de graphite est ainsi comparée à du platine sur support d'or ou de carbone pour l'oxydation catalytique de l'H₂. Les électrodes sont portées à 38 mV vs. Ag/AgCl (242 mV vs. NHE), le pH de l'électrolyte est 7 et la température 40°C. La figure 30 A montre que sous une pression d'H₂ égale à 1 bar, les densités de courant en fonction de la vitesse de rotation sont similaires pour la bioélectrode et l'électrode platinée [184]. Dans une autre étude, des électrodes sont modifiées par l'hydrogénase de *Desulfomicrobium baculatum* ou par du platine déposé à la concentration surfacique de 7 µg.cm⁻² sur du carbone vulcan [276]. La figure 30 B compare les courants obtenus pour l'oxydation catalytique de l'H₂. Dans le premier cas, l'électrode est stationnaire et opère dans du tampon phosphate à pH 7 ; dans le second, l'électrode tourne à 900 rpm et opère dans l'acide sulfurique à 0,5 M. Dans les deux cas H₂ bulle dans la solution. Si l'activation est plus lente pour l'hydrogénase, les densités de courant à haut potentiel

sont équivalentes. La pente du signal de l'hydrogénase peut être attribuée à la distribution d'orientations à l'électrode de l'hydrogénase dont les propriétés de transfert électronique sont anisotropes [14], problème qui ne se pose pas avec les nanoparticules de platine. De plus, il faut considérer que l'activité électrocatalytique du platine est divisée par environ 100 en milieu neutre : dans ces conditions, l'hydrogénase est donc beaucoup plus active que le platine.

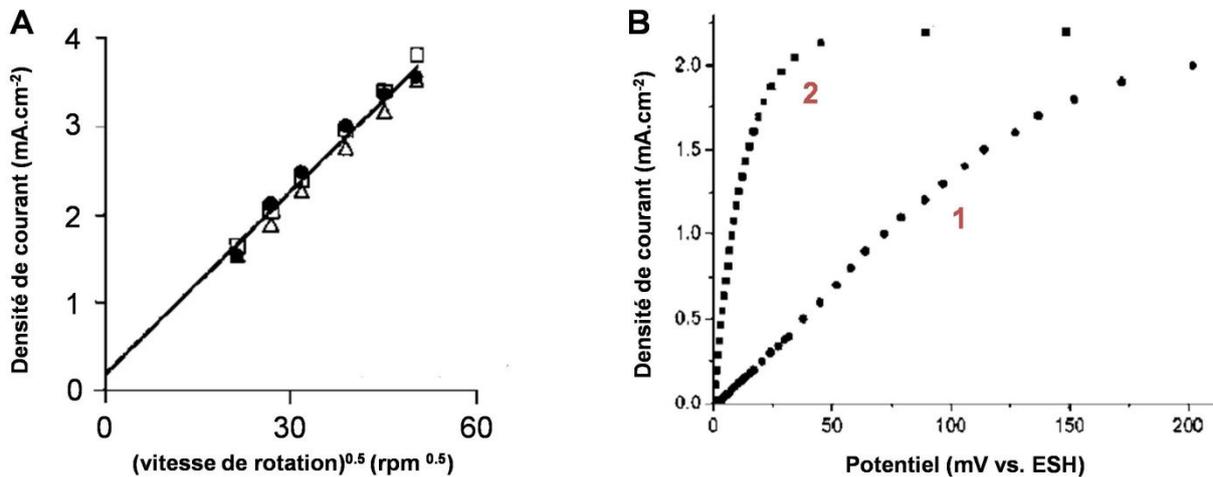


Figure 30- Efficacités comparées d'hydrogénases et du platine pour l'oxydation catalytique du H₂. A : courbes de Koutecky Levich comparant l'hydrogénase d'*Allochromatium vinosum* immobilisée sur du graphite (●) à du platine déposé sur graphite (□) ou sur or (Δ) pour une pression d'H₂ P_{totale}=1bar ; E=0,242 V vs. ESH ; T=45°C ; pH 7. Reproduit de [184]. B : Comparaison de l'hydrogénase de *Desulfomicrobium baculatum* immobilisée sur filaments de carbone (courbe 1) et du platine déposé sur vulcan (courbe 2). Reproduit de [276]

Enfin, une étude compare l'activité d'oxydation de l'H₂ du platine et de l'hydrogénase membranaire de *R. eutropha* dans des conditions de faibles pressions en H₂, et en présence de mélanges gazeux d'H₂ et d'O₂. Elle montre qu'en raison d'une très forte affinité pour H₂ (K_M=6μM), l'enzyme conserve une activité d'oxydation de H₂ bien plus élevée que le platine à de faibles pressions d'H₂ et des surtensions peu élevées. De même, à de faibles surtensions, l'activité d'oxydation d'H₂ conservée en présence d'un mélange H₂/O₂ est bien plus importante pour l'enzyme (80 % pour l'enzyme contre 40 % pour le platine dans le cas d'un mélange 80% H₂/20% O₂) [277].

Les hydrogénases montrent par ailleurs de faibles surtensions pour l'oxydation de H₂ : une bioélectrode modifiée par des hydrogénases atteint le potentiel d'équilibre de H₂, déterminé grâce à la loi de Nernst dans des conditions données de pression en H₂ et pH [278]. La catalyse d'oxydation de l'H₂ commence très près du potentiel du couple 2H⁺/H₂ pour les hydrogénases sensibles à l'O₂, environ 100 mV plus haut pour les hydrogénases tolérantes [277].

Enfin, les hydrogénases se montrent plus résistantes envers le CO dont des traces suffisent à inhiber irréversiblement le platine. Ce gaz est présent à hauteur de 1 à 2,5 % dans l'H₂ issu du reformage du pétrole. Or 0,1% de CO suffit à diviser par 10 l'efficacité électrocatalytique du platine

en 10 minutes. Les hydrogénases quant à elles ne montrent pas d'inhibition notable jusqu'à 0,1% de CO. Au-delà, seules les hydrogénases sensibles à l'O₂ sont inhibées, mais de façon réversible. Ainsi, même après une exposition au CO pur, une électrode en nano filament de carbone modifiée par l'Hase de *Thiocapsa roseopersicina* retrouve son activité sous atmosphère de H₂ [278]. Les hydrogénases sont également plus résistantes envers l'H₂S présent dans les biogaz, et capables d'oxyder l'hydrogène directement dans le milieu microbien [276], ce qui en fait des catalyseurs intéressants pour extraire de l'énergie des déchets organiques [279].

Avant les années 2000 néanmoins, l'implémentation d'hydrogénases dans une biopile demeure de l'ordre du concept, la réalisation technique étant compliquée par l'extrême sensibilité à l'oxygène de ces enzymes. En 2004, Karyakin dépose un brevet concernant les biopiles H₂-O₂ basées sur l'immobilisation d'hydrogénases et de laccases à des électrodes de carbone séparées par une membrane de Nafion® [280]. De façon sans doute surprenante, même des hydrogénases sensibles à l'O₂ sont concernées. Mais il faut attendre la découverte des hydrogénases tolérantes pour voir l'application du concept prendre réellement son essor.

II- La preuve du concept

La première pile utilisant l'hydrogène comme combustible, l'oxygène comme comburant et des catalyseurs biologiques à la fois à l'anode et à la cathode a été développée en 2001 [248]. Ce dispositif n'est cependant pas entièrement enzymatique, puisque si le catalyseur cathodique est une BOD, le catalyseur anodique est constitué de cellules entières de *Desulfovibrio vulgaris Hildenborough*. L'oxydation de l'H₂ à l'anode est donc réalisée par la « machinerie » enzymatique mettant en jeu plusieurs hydrogénases. La connexion électrique des catalyseurs est réalisée via l'utilisation de médiateurs redox (MV ou AQS à l'anode, ABTS à la cathode). Très rapidement par la suite, l'identification puis la purification d'hydrogénases tolérantes à l'oxygène [194-196] a rendu possible ce qui quelques années auparavant pouvait sembler techniquement irréalisable : le développement de biopiles H₂-O₂ entièrement enzymatiques.

Ce développement est revendiqué pour la première fois en 2002 par une équipe russe [281]. Malheureusement pour la communauté scientifique, l'article ne donne aucun détail, ni sur l'origine des enzymes, ni sur la manière concrète de mise en œuvre du dispositif, ni sur les méthodes utilisées pour évaluer ses performances, si bien qu'il est difficile d'évaluer et de décrire ce travail avec objectivité. En 2005, l'équipe du Prof. Armstrong à Oxford [192] montre que l'hydrogénase tolérante de *R. eutropha* maintient une forte proportion des courants d'oxydation de H₂ en présence de taux importants de CO et O₂. Cette hydrogénase est mise en tandem avec la laccase de *Trametes versicolor*. Deux électrodes de graphite pyrolytique sur lesquelles sont immobilisées chacune des enzymes sont plongées dans un béccher contenant l'électrolyte sous atmosphère d'air et d'H₂. Le

branchement d'une résistance montre que le courant circule. En 2006, une expérience similaire est reproduite avec la même laccase et l'hydrogénase tolérante de *Ralstonia metallidurans*, toutes deux immobilisées sur du graphite pyrolytique [282]. Les deux électrodes sont mises en contact par un film fin d'électrolyte de façon à maximiser la diffusion des gaz. Le concept prouve son applicabilité : 3 biopiles montées en série délivrent une OCV de 2,7 V et se montrent capables de faire fonctionner une montre pendant 24h.

III- Evolution des performances

En une dizaine d'années, plusieurs hydrogénases résistantes et diverses oxydases à multi cuivres sont impliquées dans le développement des biopiles H₂-O₂, et l'évolution des performances de ces dernières est extrêmement rapide. En 2005, la première biopile génère une puissance de 5 μW.cm⁻² [192]. Dans les études suivantes, les auteurs s'attachent plus à comprendre les mécanismes et les limitations du système biotechnologique qu'à optimiser les performances. En 2006 la puissance ne dépasse pas 5,2 μW.cm⁻² [282], en 2010 elle atteint 63 μW.cm⁻² [283]. En 2012, les premiers efforts d'augmentation des densités de puissance permettent d'obtenir successivement 119 ± 11,5 μW.cm⁻² [29] puis 300 μW.cm⁻² [88]. En 2013 le pas décisif du mW.cm⁻² est franchi [189]. En 2014, deux résultats marquants ouvrent la voie à de nouvelles recherches sur ce type de biopiles. D'une part, une équipe japonaise développe la première biopile H₂-O₂ utilisant la configuration des piles à combustible classiques à membrane échangeuse de protons. Cette configuration lui permettrait de multiplier la densité de puissance de deux ordres de grandeur, et d'atteindre une valeur de 180 mW.cm⁻² [284]. D'autre part, une biopile utilisant à l'anode une hydrogénase sensible à l'O₂ est développée [285]. L'enzyme est immobilisée à l'électrode grâce à un hydrogel contenant des groupements viologènes, qui assurent à la fois la connexion en TEM et la réduction de l'O₂ parvenant à l'anode. Cette stratégie permet de protéger l'hydrogénase de l'O₂ et des hauts potentiels, et de s'affranchir de la membrane séparatrice.

L'ensemble des biopiles développées jusqu'à aujourd'hui est répertorié dans le tableau 10. On peut remarquer à la fois la nette progression des performances sur une courte période, et la diversification des techniques mises en œuvre. Plusieurs objectifs ont motivé les recherches dans ce domaine, et permis leur aboutissement :

- 1- Compréhension du fonctionnement de la biopile et mise en évidence de ses limitations ;
- 2- Augmentation des densités de puissance du dispositif ;
- 3- Amélioration de sa stabilité ;
- 4- Simplification du système.

Année	Catalyseur cathodique	Catalyseur anodique	Matériau d'électrode	Conditions opératoires	Substrat	Membrane	Densité de puissance maximale	Potentiel en circuit ouvert	Stabilité	Réf.
2001	Cellules de <i>Desulfovibrio vulgaris</i> / MV	<i>Mv</i> BOD / ABTS	Feutre de carbone	50mM phosphate pH 7 ; RT	100% H ₂ - 100% O ₂	Oui (Nafion)	0,9 mW.cm ⁻²	1,17 V	sur 2h	[248]
2002	Hydrogénase (?)	LAC (?)	Noir de carbone	pH _{anodique} 8 ; pH _{cathodique} 4,2	non précisé	Oui (PK membrane)	320 μW.cm ⁻²	1,35 V(*)	Opération 1 semaine sans variation	[281]
2005	<i>Re</i> MBH	<i>Tv</i> LAC	Graphite	100 mM citrate pH5	Air et H ₂	Oui	5 μW	970 mV	> 15 min à R fixée à 330 kΩ	[192]
2006	CH34 (<i>Rm</i>) MBH	<i>Tv</i> LAC	Graphite	100 mM citrate pH5	3% de H ₂ dans l'air	Non	5,2 μW.cm ⁻²	950 mV	Fonctionnement d'une montre pendant 24h	[282]
2010	Hyd. 1 <i>E. coli</i>	<i>Mv</i> BOD	PGE, avec diazoniums pour la BOD (6-amino-2-naphtoïc acid)	100mM phosphate pH5 ; RT	(A) 100% H ₂ - 100% O ₂ (B) 96% H ₂ - 4%O ₂ (C) 4%H ₂ - air	(A) Oui (B) et (C) Non	(A) 63 μW.cm ⁻² (B) 12,9 μW.cm ⁻² (C) 10,1 μW.cm ⁻²	(A) 990mV (B) 950mV (C) 930mV	∅	[283]

2012	<i>E. coli</i> Hyd. 1	Mv BOD	MW-CNTs // pyrène acide butyrique	100mM phosphate pH 5 ; RT	80% H ₂ - 20% air	Non	119 ± 11 μW.cm ⁻²	1,1 V	opération à 0,98 V: 60% conservés après 24h	[29]
2012	<i>Aa</i> MBH 1	Mv BOD	SW-CNTs cuts COOH	50mM Hepes pH6,8 ; T _{anodique} =60°C ; T _{cathodique} =25°C	100% H ₂ - 100% O ₂	Oui (Nafion)	300 μW.cm ⁻²	1,1 V	opération à 0,65V: >60% conservés après 24h	[88]
2013	<i>E. coli</i> Hyd. 1	Mv BOD	carbone mésoporeux compacté	100 mM phosphate, pH6 ; 25°C	78% H ₂ - 22% air	Non	1,67 ± 0,24 mW.cm ⁻²	1,068 ± 0,002 V	opération à 0,8V: 90% conservés après 24h, 54% après 7 jours	[189]
2014	Hydrogénase à [NiFe] de <i>Citrobacter</i> sp. S-77	Platine	Noir de carbone sur tissu de carbone	PEMFC MEA ; 60°C	H ₂ et O ₂ saturés en humidité ; 200 mL.min ⁻¹	Oui (Nafion en configuration MEA)	180 mW.cm ⁻²	0,95 V	∅	[284]
2014	Hydrogénase à [NiFe] sensible à l'O ₂ de <i>Desulfovibrio Miyazaki F / MV</i>	Mv BOD	Hydrogel redox sur GC (anode) / tissu de carbone (cathode)	pH 7 ; 40°C	90% H ₂ - 5% O ₂ - 5% N ₂ (1500 cm ³ .min ⁻¹)	Non	178 ± 19 μW.cm ⁻²	0,947 ± 0,003 V	∅	[285]

Tableau 10 - Paramètres et performances des biopiles H₂-O₂ décrites dans la littérature. Seuls les systèmes faisant intervenir des catalyseurs biologiques à l'anode sont décrits.

III-1- Densités de puissance

La densité de puissance se définit comme le produit de la différence de potentiel entre les électrodes par la densité de courant traversant les électrodes. Afin d'augmenter les densités de puissance il est donc théoriquement possible d'influer sur ces deux paramètres.

En réalité, la différence de potentiel est fixée par le choix des catalyseurs et des conditions opératoires (pH, température, concentrations des substrats). La marge d'action sur ce paramètre est donc limitée. On peut néanmoins noter l'exemple de la biopile proposée en 2002 par [281], où une différence de potentiel en circuit ouvert supérieure à la limite thermodynamique en milieu aqueux est obtenue grâce à l'utilisation de tampons de pH différents dans les compartiments anodique et cathodique.

Le paramètre le plus susceptible d'être optimisé est donc la densité de courant. Comme décrit plus haut, cette dernière peut être augmentée essentiellement de deux manières : par l'amélioration de la connexion de l'enzyme à l'électrode, et par l'immobilisation des enzymes à des électrodes de grande surface développée, idéalement des électrodes tridimensionnelles. Nous avons déjà montré comment l'utilisation de surfaces rugueuses ou nanostructurées permettait de multiplier le nombre d'enzymes immobilisées à l'électrode, et d'augmenter la probabilité d'obtenir un contact électronique efficace entre l'enzyme et l'interface. Les recherches menées en ce sens pour les enzymes en général, et les hydrogénases en particulier, ont été étendues aux anodes des biopiles.

Ainsi, en 2012, l'utilisation d'électrode nanostructurée tridimensionnelle permet à l'équipe du Prof. Armstrong d'augmenter les performances de la biopile H₂-O₂ d'un ordre de grandeur, en termes de densité de puissance et de stabilité [29]. Les électrodes utilisées sont à base de graphite recouvert de MW-CNTs, choisis pour leur grand rapport surface/volume lié à d'excellentes propriétés conductrices. Dans le même dispositif, et dans les mêmes conditions opératoires, les densités de puissance sont $12 \pm 4 \mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$ pour les enzymes simplement adsorbés à l'électrode, et $119 \pm 11 \mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$ grâce à ces électrodes modifiées. La même année, la première biopile développée au BIP met en œuvre des électrodes de graphite également modifiées par des SW-CNTs, coupés et fonctionnalisés par traitement acide, pour une accroche covalente des enzymes. La densité de puissance maximale est alors de $300 \mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$, soit une multiplication par 300 par rapport au même dispositif dans lequel les enzymes sont simplement adsorbées à des électrodes de graphite pyrolytique [88].

Un autre matériau carboné plus adapté à la formation d'un réseau à porosité hiérarchisée est ensuite proposé [189]. Le compactage d'une nanopoudre de carbone mésoporeux graphitisé permet la formation d'un matériau qui offre une remarquable accessibilité aux enzymes. En effet, lorsque la hauteur de la pastille obtenue par compactage du carbone mésoporeux est divisée par deux après adsorption de l'enzyme, la densité de courant est exactement divisée par deux. Ceci prouve

l'homogénéité de la pénétration de l'enzyme dans la pastille, ainsi qu'une bonne accessibilité du substrat au sein du matériau.

Enfin, le résultat extraordinaire obtenu par l'équipe japonaise, soit une densité de puissance de 180 mW.cm⁻², est attribué à la fois à la configuration PEMFC adoptée et à un turnover de l'enzyme d'une valeur des plus exceptionnelles : 893 000 molécules de H₂ sont en effet oxydées chaque seconde par chaque molécule d'hydrogénase immobilisée sur du noir de carbone. Les auteurs revendiquent donc une efficacité massique de l'hydrogénase qui surpasse de loin celle du platine. Sur la base de la masse du nickel et du fer uniquement, l'hydrogénase présente une efficacité de 7830 A.mg⁻¹, contre 7,5 A.mg⁻¹ pour le platine. Ce travail soulève cependant quelques questions. Tout d'abord, les courbes de polarisation pour évaluer les performances sont effectuées à une vitesse de balayage de 50 mV.s⁻¹, ce qui permet quelques doutes quant à l'obtention de l'état stationnaire. Ensuite, l'électrode enzymatique est directement en contact avec la membrane de Nafion extrêmement acide et donc agressive pour les enzymes en l'absence de solution électrolytique tamponnée. Par ailleurs, une étude précédente décrivait la faible thermostabilité de l'hydrogénase utilisée, l'hydrogénase à [NiFe] de *Citrobacter* sp. S-77 [286], or les mesures sont effectuées ici à 60°C. Enfin, cette hydrogénase, qui présente une séquence très proche de celle de l'hydrogénase Hyd-2 d'*E. coli* classifiée comme sensible, et un phénotype comparable à celui des hydrogénases sensibles à l'O₂ en terme d'inhibition par le CO, se montre capable d'opérer sans aucun problème sous O₂ [284]. Les bases moléculaires de l'activité très élevée de cette enzyme en présence d'O₂ restent donc à élucider. Si des études plus approfondies, à la fois de l'enzyme, des mécanismes catalytiques impliqués et de la procédure d'immobilisation, lèvent le doute sur ces questionnements et confirment ce résultat, les biopiles H₂/O₂ verront leur crédibilité grandement augmentée.

III-2- Stabilité

La faible stabilité des biopiles enzymatiques relève d'une part de la fragilité intrinsèque des molécules enzymatiques, et d'autre part de l'instabilité de l'immobilisation de l'enzyme à l'électrode. Dans le cas des biopiles H₂-O₂, des dommages irréversibles subis par le site actif à NiFe lorsque l'hydrogénase immobilisée à l'électrode est soumise à un potentiel fixe ou à un balayage de potentiel sont également démontrés. C'est également le cas de la BOD, comme le montrent des expériences d'électrochimie couplées à des mesures de microbalance à quartz avec module de dissipation (QCM-D) pour la *Mv* BOD. Le mécanisme principal à l'origine des pertes enregistrées dans signal électrocatalytique de réduction de l'O₂ n'est pas une perte de masse du film enzymatique, donc une perte d'enzymes, mais un réarrangement structural qui provoque une perte d'activité de l'enzyme [287].

Les efforts pour améliorer la stabilité des dispositifs ont cependant essentiellement porté sur le deuxième point : assurer une liaison stable entre l'enzyme et le matériau de l'électrode. La première méthode utilisée repose sur la liaison covalente des enzymes à l'électrode [29]. Des pyrènes portant des fonctions acide butyrique sont liés irréversiblement aux MW-CNTs par liaisons π - π . Grâce à cette modification, les deux enzymes peuvent être liées aux électrodes par des liaisons amides entre les lysines de surface et les groupements -COOH. La BFC conserve 60% de sa densité de puissance après 24 h d'opération continue en pile au potentiel de 0,98V. L'anode conserve 70-80% de son activité initiale, et la cathode 50-70%. L'immobilisation covalente a également été utilisée pour la première biopile développée au BIP [88]. Cette fois, les enzymes sont liées en une étape aux électrodes via des liaisons amides entre les fonctions carboxyliques générées par traitement oxydant à la surface des SW-CNTs, et les lysines et les arginines de surface des enzymes. Grâce à cette liaison, la biopile délivre encore plus de 60% de la densité de courant initiale après 24h d'opération continue au potentiel de 0,65 V.

La liaison covalente nécessite cependant la présence d'une densité suffisante et contrôlée de fonctions de surfaces sur les électrodes, et des résidus aminés adaptés à proximité des relais électroniques à la surface de l'enzyme. Dans le cas du matériau de carbone mésoporeux compacté [189], c'est la porosité adaptée du matériau qui assure une stabilisation de l'enzyme dans le réseau. Un test de dosage de protéines par la méthode de Bradford, réalisé après avoir plongé l'anode dans un tampon sous agitation magnétique pendant 12 heures, montre que la quantité d'enzyme relarguée de l'électrode est inférieure à 2 μ g. La perte de puissance serait donc due à l'inactivation de l'enzyme au cours du temps, et non pas à une perte progressive d'enzyme. La consommation très rapide d'H₂ par l'Hase génère dans l'environnement confiné du réseau une forte proportion d'O₂ par rapport à H₂ qui serait délétère même pour une hydrogénase tolérante. Dans cette biopile en effet, ce problème est d'autant plus critique que l'absence de membrane de Nafion permet à l'O₂ d'être présent en quantité non négligeable à l'anode. L'hydrogénase pourrait être protégée par encapsulation dans des polymères portant des entités MV, grâce à la réduction de l'O₂ par les molécules de MV d'une couche superficielle du polymère [285].

III-3- Simplification du système

Afin de réduire les coûts, la complexité de l'ingénierie, et de permettre la miniaturisation, il est nécessaire de simplifier au maximum la biopile. Dès les premières étapes, des simplifications sont permises grâce à la possibilité d'obtenir du courant direct, aussi bien avec l'hydrogénase qu'avec les oxydases à multi-cuivres, ce qui permet de s'affranchir de médiateurs redox. Néanmoins, dans le cas récent où l'hydrogénase mise en jeu est sensible à l'O₂, la présence du MV est nécessaire pour empêcher l'inactivation aérobie de l'hydrogénase [285].

La connexion directe, ou médiée grâce à un médiateur lié, combinée à la spécificité des enzymes vis-à-vis de leur substrat et à l'utilisation d'hydrogénases résistantes à l'oxygène, permet de s'affranchir de l'utilisation d'une membrane polymère entre les compartiments anodique et cathodique. Lorsque l'hydrogène et l'oxygène sont introduits dans l'électrolyte, il est alors nécessaire de les mélanger dans des proportions non explosives. L'intervalle d'explosivité étant de [4,1-78] % en volume de H₂ dans l'air, il convient de veiller rigoureusement à la composition du mélange de substrats. Cette simplification a déjà été adoptée par Armstrong dans ses études en 2006 [282], 2010 [283] et 2012 [29]. Les conditions opératoires les plus efficaces sont obtenues pour un mélange non explosif H₂/O₂ riche en H₂ : 80% d'H₂ et 20% d'air c.à.d. 4% d'O₂.

IV- Limitations

Les limitations résultent d'une part des difficultés liées à l'utilisation des enzymes comme catalyseurs, et d'autre part de l'ingénierie du procédé BFC. Les premières découlent notamment de la grande taille moléculaire des enzymes, de l'anisotropie de leurs propriétés de transport d'électrons, et de leur faible stabilité.

L'immobilisation des enzymes aux électrodes n'est pour le moment pas optimale. La constante de turnover de l'hydrogénase immobilisée dans le carbone mésoporeux [189] est évaluée à 6 s⁻¹, soit une valeur bien inférieure à la valeur attendue. Compte tenu de la grande activité de l'hydrogénase, une constante de turnover supérieure à 100 s⁻¹ même en présence de traces d'O₂ serait en effet raisonnable. Pour la BOD, une valeur de 0,4 s⁻¹ est calculée, ce qui s'explique par la faible concentration de l'O₂. Il faut noter cependant que ces calculs prennent en compte toutes les enzymes introduites, c.à.d. celles qui sont connectées efficacement, mais également celles qui sont inactives, celles qui ne sont pas connectées, et celles auxquelles le substrat ne parvient pas. Les valeurs estimées sont donc des limites inférieures des valeurs réelles.

Le transport de substrat vers les biocatalyseurs se montre également problématique. Tout d'abord, la concentration des gaz dissous demeure faible. Par ailleurs, s'affranchir de la membrane séparatrice impose de se maintenir dans des conditions de mélange non explosif des substrats H₂ et O₂, et donc pauvre en l'un des deux substrats. La biopile développée par Armstrong en 2012 utilise un mélange pauvre en oxygène (4% O₂) : dans ces conditions, des expériences utilisant des électrodes tournantes montrent clairement que le système est limité par la cathode [29]. Dans une étude ultérieure [189], l'adaptation des tailles relatives de l'anode et de la cathode permet de surmonter cette limitation. Pour des électrodes de CMC de même taille, le mélange pauvre en O₂ et les conditions de pH plus favorables à l'hydrogénase (pH 6) provoquent une grande disproportion entre les courants anodique et cathodique, qui s'élèvent respectivement à 4,60 ± 0,32 mA.cm⁻² et 1,23 ± 0,12 mA.cm⁻².

La multiplication par 3 de la taille de la cathode permet d'augmenter les densités de courant délivrées à cette dernière et d'équilibrer le système.

Par ailleurs, en l'absence de membrane, une réduction non-enzymatique de l'O₂ peut se produire à l'anode, comme le décrit [283] où l'O₂ se réduit à électrode de graphite aux potentiels négatifs. Cette réaction, en compétition avec l'oxydation de H₂, peut provoquer une diminution de l'OCV, particulièrement dans le cas où l'anode est limitante, c.à.d. $j_{\max \text{ anodique}} < j_{\max \text{ cathodique}}$.

Dans ce cas, le dispositif est aussi limité par une caractéristique intrinsèque de l'hydrogénase. L'anode peut en effet se comporter comme un interrupteur suite à la formation d'un état inactif du site actif de l'hydrogénase. Ce phénomène a été décrit par Armstrong lors d'une étude des caractéristiques de la biopile pour différents mélanges de substrat [283]. Dans le cas d'un mélange faible en H₂, provoquant la limitation anodique, l'imposition de résistances faibles provoque la chute de la densité de puissance de la biopile. De plus le retour à une résistance élevée ne permet pas de retrouver le potentiel anodique initial. L'augmentation de potentiel de l'anode est alors enregistrée, ce qui provoque la formation de l'état inactif Ni-B d'autant plus rapidement que la concentration en O₂ est plus élevée, l'état « ready » Ni-B étant formé bien plus rapidement par réaction avec O₂ que par oxydation électrochimique anaérobie [195]. En présence d'un excès d'O₂ et d'un défaut de H₂, l'état inactif n'est pas réactivé sans source extérieure d'électrons. Cependant, la connexion d'une seconde anode réactive la première anode, et permet de retrouver rapidement les performances initiales (Figure 31).

Un phénomène similaire, mais cette fois irréversible, a également été observé au BIP [88]. Dans le cas d'une limitation anodique, une décroissance de P_{\max} est observée au cours de polarisations successives. De plus, lorsqu'aucun potentiel n'est plus imposé, l'OCV n'est pas restauré. Les dommages sont irréversibles puisque les performances ne sont pas restaurées après application d'un potentiel négatif à l'anode. L'action de l'O₂ peut ici être négligée puisqu'une membrane de Nafion sépare les compartiments anodique et cathodique, et que l'anode opère sous 100% de H₂. Une inactivation non réversible de l'Aa Hase 1, déjà observée lorsque cette dernière était soumise à des potentiels supérieurs à 200 mV vs. Ag/AgCl [212]. Or, ici aussi, la diminution de la tension de la pile provoque une augmentation du potentiel de l'anode, qui peut atteindre jusqu'à 400 mV vs. Ag/AgCl. En revanche, à des potentiels modérés, une réactivation photoinduite de l'hydrogénase lors de la catalyse d'oxydation de l'H₂ peut être constatée [288]. Le mécanisme proposé fait intervenir un état intermédiaire du site actif dont l'irradiation provoque la perte du ligand hydroxyde caractéristique de l'état inactif.

Trois solutions peuvent être apportées au problème d'inactivation réversible de l'hydrogénase à hauts potentiels:

- 1- La connexion d'une seconde anode, décrite à la page précédente, qui réactive la première anode, et permet de retrouver rapidement les performances initiales (Figure 31) [283].
- 2- La réactivation photoinduite, constatée pour l'hydrogénase tolérante d'*Aquifex aeolicus* dans des conditions de catalyse [288].
- 3- La connexion de l'hydrogénase via le MV lié à l'hydrogel redox, puisque l'hydrogénase, n'étant plus soumise au potentiel de l'électrode, est protégée des potentiels positifs [285].

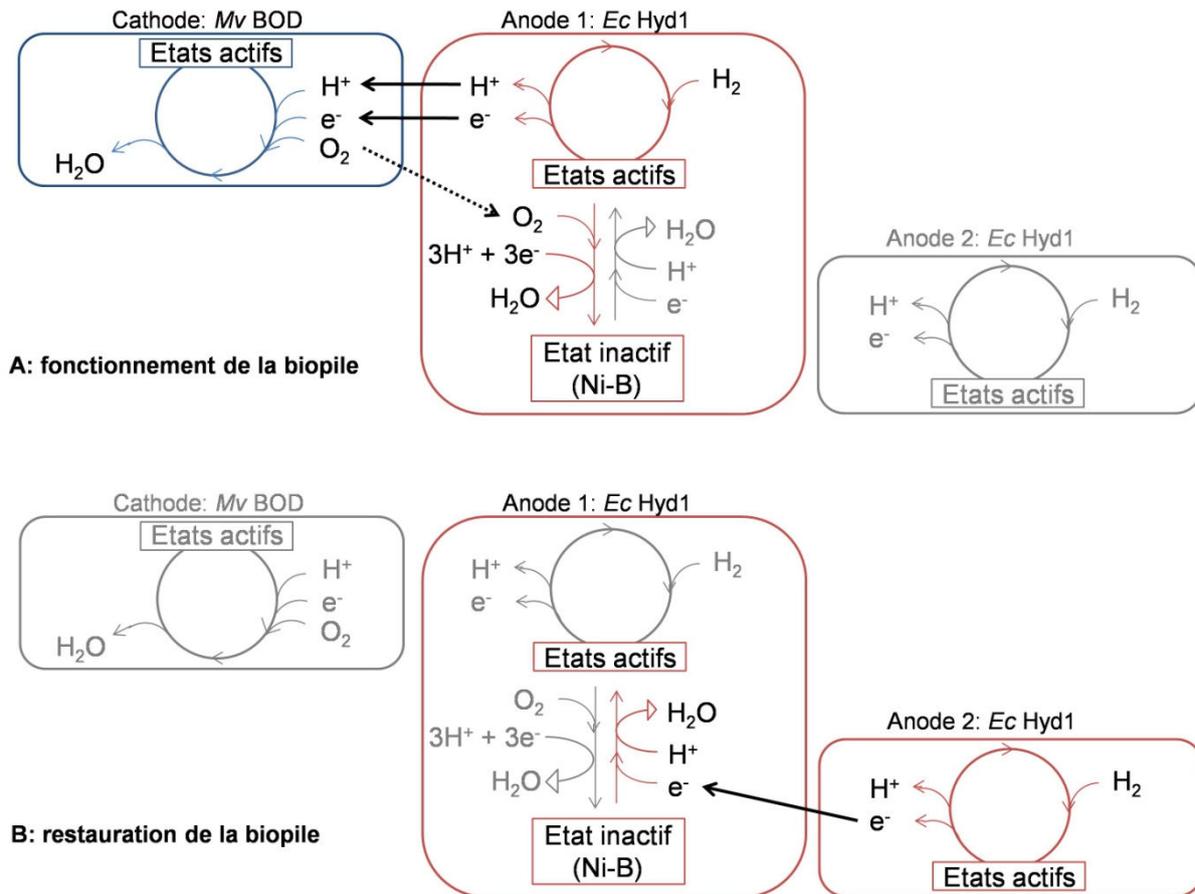


Figure 31- Schéma des réactions se produisant aux électrodes pour deux modes de fonctionnement du dispositif. A : fonctionnement de la biopile, une résistance élevée est imposée entre l'anode 1 et la cathode, l'anode 2 étant déconnectée du circuit. B : restauration de la biopile après inactivation de l'anode 1, une résistance faible est imposée entre les anodes 1 et 2, la cathode étant déconnectée du circuit. Reproduit et adapté de [283]

Bibliographie

- [1] R. Chaubey, S. Sahu, O.O. James, S. Maity, A review on development of industrial processes and emerging techniques for production of hydrogen from renewable and sustainable sources, *Renew. Sust. Energ. Rev.*, 23 (2013) 443-462.
- [2] J.L. Charlou, J.P. Donval, Y. Fouquet, P. Jean-Baptiste, N. Holm, Geochemistry of high H₂ and CH₄ vent fluids issuing from ultramafic rocks at the Rainbow hydrothermal field (36 degrees 14 ' N, MAR), *Chem. Geol.*, 191 (2002) 345-359.
- [3] C. Vacquand, A. Prinzhofer, E. Deville, Characterization of natural hydrogen sources in ophiolitic context, *Geochim. Cosmochim. Acta*, 74 (2010) A1068-A1068.
- [4] A. Brouzgou, S.Q. Song, P. Tsiakaras, Low and non-platinum electrocatalysts for PEMFCs: Current status, challenges and prospects, *Appl. Catal. B-Environ.*, 127 (2012) 371-388.
- [5] A. Serov, C. Kwak, Review of non-platinum anode catalysts for DMFC and PEMFC application, *Appl. Catal. B-Environ.*, 90 (2009) 313-320.
- [6] T.G. Young, Hadjipet.L, M.D. Lilly, THEORETICAL ASPECTS OF BIOCHEMICAL FUEL CELLS, *Biotechnology and Bioengineering*, 8 (1966) 581-&.
- [7] K.A. Vincent, A. Parkin, F.A. Armstrong, Investigating and exploiting the electrocatalytic properties of hydrogenases, *Chemical Reviews*, 107 (2007) 4366-4413.
- [8] M.H. Osman, A.A. Shah, F.C. Walsh, Recent progress and continuing challenges in bio-fuel cells. Part I: Enzymatic cells, *Biosens. Bioelectron.*, 26 (2013) 3087-3102.
- [9] A.T. Yahiro, S.M. Lee, D.O. Kimble, BIOELECTROCHEMISTRY .I. ENZYME UTILIZING BIO-FUEL CELL STUDIES, *Biochimica Et Biophysica Acta*, 88 (1964) 375-&.
- [10] E.V. Plotkin, I.J. Higgins, H.A.O. Hill, METHANOL DEHYDROGENASE BIOELECTROCHEMICAL CELL AND ALCOHOL DETECTOR, *Biotechnology Letters*, 3 (1981) 187-192.
- [11] E. Katz, I. Willner, A.B. Kotlyar, A non-compartmentalized glucose vertical bar O₂ biofuel cell by bioengineered electrode surfaces, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 479 (1999) 64-68.
- [12] L.J.C. Jeuken, Conformational reorganisation in interfacial protein electron transfer, *Biochim. Biophys. Acta-Bioenerg.*, 1604 (2003) 67-76.
- [13] Q.J. Chi, J.D. Zhang, J.E.T. Andersen, J. Ulstrup, Ordered assembly and controlled electron transfer of the blue copper protein azurin at gold (111) single-crystal substrates, *J. Phys. Chem. B*, 105 (2001) 4669-4679.
- [14] C. Leger, A.K. Jones, S.P.J. Albracht, F.A. Armstrong, Effect of a dispersion of interfacial electron transfer rates on steady state catalytic electron transport in [NiFe]-hydrogenase and other enzymes, *J. Phys. Chem. B*, 106 (2002) 13058-13063.
- [15] A. Heller, Miniature biofuel cells, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 6 (2004) 209-216.

- [16] D.P. Hickey, F. Giroud, D.W. Schmidtke, D.T. Glatzhofer, S.D. Minter, Enzyme Cascade for Catalyzing Sucrose Oxidation in a Biofuel Cell, *Acs Catalysis*, 3 (2013) 2729-2737.
- [17] M.T. Meredith, S.D. Minter, Inhibition and Activation of Glucose Oxidase Bioanodes for Use in a Self-Powered EDTA Sensor, *Anal. Chem.*, 83 (2011) 5436-5441.
- [18] M. Skunik-Nuckowska, K. Grzejszczyk, K. Stolarczyk, R. Bilewicz, P.J. Kulesza, Integration of supercapacitors with enzymatic biobatteries toward more effective pulse-powered use in small-scale energy harvesting devices, *Journal of Applied Electrochemistry*, 44 (2014) 497-507.
- [19] K. Stolarczyk, M. Kizling, D. Majdecka, K. Zelechowska, J.F. Biernat, J. Rogalski, R. Bilewicz, Biobatteries and biofuel cells with biphenylated carbon nanotubes, *Journal of Power Sources*, 249 (2014) 263-269.
- [20] G.T.R. Palmore, H.H. Kim, Electro-enzymatic reduction of dioxygen to water in the cathode compartment of a biofuel cell, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 464 (1999) 110-117.
- [21] C. Agnes, B. Reuillard, A. Le Goff, M. Holzinger, S. Cosnier, A double-walled carbon nanotube-based glucose/H₂O₂ biofuel cell operating under physiological conditions, *Electrochem. Commun.*, 34 (2013) 105-108.
- [22] T. Miyake, S. Yoshino, T. Yamada, K. Hata, M. Nishizawa, Self-Regulating Enzyme-Nanotube Ensemble Films and Their Application as Flexible Electrodes for Biofuel Cells, *J. Am. Chem. Soc.*, 133 (2011) 5129-5134.
- [23] M.T. Meredith, D.Y. Kao, D. Hickey, D.W. Schmidtke, D.T. Glatzhofer, High Current Density Ferrocene-Modified Linear Poly(ethylenimine) Bioanodes and Their Use in Biofuel Cells, *Journal of the Electrochemical Society*, 158 (2011) B166-B174.
- [24] M. Minson, M.T. Meredith, A. Shrier, F. Giroud, D. Hickey, D.T. Glatzhofer, S.D. Minter, High Performance Glucose/O₂ Biofuel Cell: Effect of Utilizing Purified Laccase with Anthracene-Modified Multi-Walled Carbon Nanotubes, *Journal of the Electrochemical Society*, 159 (2012) G166-G170.
- [25] W. Wei, P.P. Li, Y. Li, X.D. Cao, S.Q. Liu, Nitrogen-doped carbon nanotubes enhanced laccase enzymatic reactivity towards oxygen reduction and its application in biofuel cell, *Electrochem. Commun.*, 22 (2012) 181-184.
- [26] A. Zebda, S. Tingry, C. Innocent, S. Cosnier, C. Forano, C. Mousty, Hybrid layered double hydroxides-polypyrrole composites for construction of glucose/O₂ biofuel cell, *Electrochim. Acta*, 56 (2011) 10378-10384.
- [27] W. Zheng, H.Y. Zhao, J.X. Zhang, H.M. Zhou, X.X. Xu, Y.F. Zheng, Y.B. Wang, Y. Cheng, B.Z. Jang, A glucose/O₂ biofuel cell base on nanographene platelet-modified electrodes, *Electrochem. Commun.*, 12 (2010) 869-871.
- [28] J. Shim, G.Y. Kim, S.H. Moon, Covalent co-immobilization of glucose oxidase and ferrocenedicarboxylic acid for an enzymatic biofuel cell, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 653 (2011) 14-20.
- [29] S. Krishnan, F.A. Armstrong, Order-of-magnitude enhancement of an enzymatic hydrogen-air fuel cell based on pyrenyl carbon nanostructures, *Chemical Science*, 3 (2012) 1015-1023.

- [30] J. Filip, J. Sefcovicova, P. Gemeiner, J. Tkac, Electrochemistry of bilirubin oxidase and its use in preparation of a low cost enzymatic biofuel cell based on a renewable composite binder chitosan, *Electrochim. Acta*, 87 (2013) 366-374.
- [31] V. Flexer, N. Brun, O. Courjean, R. Backov, N. Mano, Porous mediator-free enzyme carbonaceous electrodes obtained through Integrative Chemistry for biofuel cells, *Energy Environ. Sci.*, 4 (2011) 2097-2106.
- [32] T. Miyake, K. Haneda, S. Yoshino, M. Nishizawa, Flexible, layered biofuel cells, *Biosens. Bioelectron.*, 40 (2013) 45-49.
- [33] N. Mano, F. Mao, A. Heller, A miniature membrane-less biofuel cell operating at +0.60 V under physiological conditions, *Chembiochem*, 5 (2004) 1703-1705.
- [34] K. Haneda, S. Yoshino, T. Ofuji, T. Miyake, M. Nishizawa, Sheet-shaped biofuel cell constructed from enzyme-modified nanoengineered carbon fabric, *Electrochim. Acta*, 82 (2012) 175-178.
- [35] T. Tamaki, Enzymatic Biofuel Cells Based on Three-Dimensional Conducting Electrode Matrices, *Topics in Catalysis*, 55 (2012) 1162-1180.
- [36] V. Flexer, N. Brun, M. Destribats, R. Backov, N. Mano, A novel three-dimensional macrocellular carbonaceous biofuel cell, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 15 (2013) 6437-6445.
- [37] F. Gao, L. Viry, M. Maugey, P. Poulin, N. Mano, Engineering hybrid nanotube wires for high-power biofuel cells, *Nature Communications*, 1 (2010) 7.
- [38] S. Cosnier, A. Le Goff, M. Holzinger, Towards glucose biofuel cells implanted in human body for powering artificial organs: Review, *Electrochem. Commun.*, 38 (2014) 19-23.
- [39] R.D. Milton, F. Giroud, A.E. Thumser, S.D. Minteer, R.C.T. Slade, Hydrogen peroxide produced by glucose oxidase affects the performance of laccase cathodes in glucose/oxygen fuel cells: FAD-dependent glucose dehydrogenase as a replacement, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 15 (2013) 19371-19379.
- [40] Y. Kamitaka, S. Tsujimura, N. Setoyama, T. Kajino, K. Kano, Fructose/dioxygen biofuel cell based on direct electron transfer-type bioelectrocatalysis, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 9 (2007) 1793-1801.
- [41] D. Sokic-Lazic, S.D. Minteer, Pyruvate/Air Enzymatic Biofuel Cell Capable of Complete Oxidation, *Electrochemical and Solid State Letters*, 12 (2009) F26-F28.
- [42] F. Gao, X.Y. Guo, J. Yin, D. Zhao, M.G. Li, L. Wang, Electrocatalytic activity of carbon spheres towards NADH oxidation at low overpotential and its applications in biosensors and biofuel cells, *Rsc Advances*, 1 (2011) 1301-1309.
- [43] L. Deng, L. Shang, D. Wen, J.F. Zhai, S.J. Dong, A membraneless biofuel cell powered by ethanol and alcoholic beverage, *Biosens. Bioelectron.*, 26 (2010) 70-73.
- [44] R.A. Rincon, C. Lau, H.R. Luckarift, K.E. Garcia, E. Adkins, G.R. Johnson, P. Atanassov, Enzymatic fuel cells: Integrating flow-through anode and air-breathing cathode into a membrane-less biofuel cell design, *Biosens. Bioelectron.*, 27 (2011) 132-136.

- [45] M. Masuda, Y. Motoyama, K. Murata, N. Nakamura, H. Ohno, Preparation of an Electrode Modified with an Electropolymerized Film as a Mediator of NADH Oxidation and Its Application in an Ethanol/O₂ Biofuel Cell, *Electroanalysis*, 23 (2011) 2297-2301.
- [46] B. Reuillard, A. Le Goff, C. Agnes, M. Holzinger, A. Zebda, C. Gondran, K. Elouarzaki, S. Cosnier, High power enzymatic biofuel cell based on naphthoquinone-mediated oxidation of glucose by glucose oxidase in a carbon nanotube 3D matrix, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 15 (2013) 4892-4896.
- [47] L. Halamkova, J. Halamek, V. Bocharova, A. Szczupak, L. Alfonta, E. Katz, Implanted Biofuel Cell Operating in a Living Snail, *J. Am. Chem. Soc.*, 134 (2012) 5040-5043.
- [48] L.L. Zhang, M. Zhou, D. Wen, L. Bai, B.H. Lou, S.J. Dong, Small-size biofuel cell on paper, *Biosens. Bioelectron.*, 35 (2012) 155-159.
- [49] C.F. Pan, Y. Fang, H. Wu, M. Ahmad, Z.X. Luo, Q.A. Li, J.B. Xie, X.X. Yan, L.H. Wu, Z.L. Wang, J. Zhu, Generating Electricity from Biofluid with a Nanowire-Based Biofuel Cell for Self-Powered Nanodevices, *Advanced Materials*, 22 (2010) 5388-+.
- [50] D. Wen, X.L. Xu, S.J. Dong, A single-walled carbon nanohorn-based miniature glucose/air biofuel cell for harvesting energy from soft drinks, *Energy Environ. Sci.*, 4 (2011) 1358-1363.
- [51] P. Cinquin, C. Gondran, F. Giroud, S. Mazabrard, A. Pellissier, F. Boucher, J.P. Alcaraz, K. Gorgy, F. Lenouvel, S. Mathe, P. Porcu, S. Cosnier, A Glucose BioFuel Cell Implanted in Rats, *Plos One*, 5 (2010) 7.
- [52] A. Szczupak, J. Halamek, L. Halamkova, V. Bocharova, L. Alfonta, E. Katz, Living battery - biofuel cells operating in vivo in clams, *Energy Environ. Sci.*, 5 (2012) 8891-8895.
- [53] K. Shoji, Y. Akiyama, M. Suzuki, T. Hoshino, N. Nakamura, H. Ohno, K. Morishima, Insect biofuel cells using trehalose included in insect hemolymph leading to an insect-mountable biofuel cell, *Biomedical Microdevices*, 14 (2012) 1063-1068.
- [54] K. MacVittie, J. Halamek, L. Halamkova, M. Southcott, W.D. Jemison, R. Lobeld, E. Katz, From "cyborg" lobsters to a pacemaker powered by implantable biofuel cells, *Energy Environ. Sci.*, 6 (2013) 81-86.
- [55] A. Zebda, S. Cosnier, J.P. Alcaraz, M. Holzinger, A. Le Goff, C. Gondran, F. Boucher, F. Giroud, K. Gorgy, H. Lamraoui, P. Cinquin, Single Glucose Biofuel Cells Implanted in Rats Power Electronic Devices, *Scientific Reports*, 3 (2013) 5.
- [56] V. Soukharev, N. Mano, A. Heller, A four-electron O₂-electroreduction biocatalyst superior to platinum and a biofuel cell operating at 0.88 V, *J. Am. Chem. Soc.*, 126 (2004) 8368-8369.
- [57] H. Sakai, T. Nakagawa, Y. Tokita, T. Hatazawa, T. Ikeda, S. Tsujimura, K. Kano, A high-power glucose/oxygen biofuel cell operating under quiescent conditions, *Energy Environ. Sci.*, 2 (2009) 133-138.
- [58] A. Zebda, C. Gondran, A. Le Goff, M. Holzinger, P. Cinquin, S. Cosnier, Mediatorless high-power glucose biofuel cells based on compressed carbon nanotube-enzyme electrodes, *Nature Communications*, 2 (2011) 6.

- [59] K. So, S. Kawai, Y. Hamano, Y. Kitazumi, O. Shirai, M. Hibi, J. Ogawa, K. Kano, Improvement of a direct electron transfer-type fructose/dioxygen biofuel cell with a substrate-modified biocathode, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 16 (2014) 4823-4829.
- [60] S. Yoshino, T. Miyake, T. Yamada, K. Hata, M. Nishizawa, Molecularly Ordered Bioelectrocatalytic Composite Inside a Film of Aligned Carbon Nanotubes, *Advanced Energy Materials*, 3 (2013) 60-64.
- [61] D.L. Nelson, M.M. Cox, *Principles of Biochemistry*, 6th ed. 2012.
- [62] C.C. Page, C.C. Moser, X.X. Chen, P.L. Dutton, Natural engineering principles of electron tunnelling in biological oxidation-reduction, *Nature*, 402 (1999) 47-52.
- [63] K.Q. Wang, H. Yang, L. Zhu, J.H. Liao, T.H. Lu, W. Xing, S.Y. Xing, Q. Lv, Direct electrochemistry and electrocatalysis of glucose oxidase immobilized on glassy carbon electrode modified by Nafion and ordered mesoporous silica-SBA-15, *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, 58 (2009) 194-198.
- [64] K.Q. Wang, H. Yang, L. Zhu, Z.S. Ma, S.Y. Xing, Q. Lv, J.H. Liao, C.P. Liu, W. Xing, Direct electron transfer and electrocatalysis of glucose oxidase immobilized on glassy carbon electrode modified with Nafion and mesoporous carbon FDU-15, *Electrochim. Acta*, 54 (2009) 4626-4630.
- [65] B. Liang, L. Fang, G. Yang, Y.C. Hu, X.S. Guo, X.S. Ye, Direct electron transfer glucose biosensor based on glucose oxidase self-assembled on electrochemically reduced carboxyl graphene, *Biosens. Bioelectron.*, 43 (2013) 131-136.
- [66] O. Courjean, F. Gao, N. Mano, Deglycosylation of Glucose Oxidase for Direct and Efficient Glucose Electrooxidation on a Glassy Carbon Electrode, *Angewandte Chemie-International Edition*, 48 (2009) 5897-5899.
- [67] A. Ciaccafava, P. Infossi, M. Ilbert, M. Guiral, S. Lecomte, M.T. Giudici-Ortoni, E. Lojou, Electrochemistry, AFM, and PM-IRRAS Spectroscopy of Immobilized Hydrogenase: Role of a Hydrophobic Helix in Enzyme Orientation for Efficient H₂ Oxidation, *Angewandte Chemie-International Edition*, 51 (2012) 953-956.
- [68] N. Mano, F. Mao, A. Heller, Characteristics of a miniature compartment-less glucose-O₂ biofuel cell and its operation in a living plant, *J. Am. Chem. Soc.*, 125 (2003) 6588-6594.
- [69] B.A. Gregg, A. Heller, CROSS-LINKED REDOX GELS CONTAINING GLUCOSE-OXIDASE FOR AMPEROMETRIC BIOSENSOR APPLICATIONS, *Anal. Chem.*, 62 (1990) 258-263.
- [70] H. Shin, S. Cho, A. Heller, C. Kang, Stabilization of a Bilirubin Oxidase-Wiring Redox Polymer by Quaternization and Characteristics of the Resulting O₂ Cathode, *Journal of the Electrochemical Society*, 156 (2009) F87-F92.
- [71] N. Mano, V. Soukharev, A. Heller, A laccase-wiring redox hydrogel for efficient catalysis of O₂ electroreduction, *J. Phys. Chem. B*, 110 (2006) 11180-11187.
- [72] V. Flexer, N. Mano, Wired Pyrroloquinoline Quinone Soluble Glucose Dehydrogenase Enzyme Electrodes Operating at Unprecedented Low Redox Potential, *Anal. Chem.*, 86 (2014) 2465-2473.
- [73] P.N. Bartlett, V.Q. Bradford, R.G. Whitaker, ENZYME ELECTRODE STUDIES OF GLUCOSE-OXIDASE MODIFIED WITH A REDOX MEDIATOR, *Talanta*, 38 (1991) 57-63.

- [74] D. Dicu, L. Muresan, I.C. Popescu, C. Cristea, I.A. Silberg, P. Brouant, Modified electrodes with new phenothiazine derivatives for electrocatalytic oxidation of NADH, *Electrochim. Acta*, 45 (2000) 3951-3957.
- [75] E. Madej, P. Wardman, Pulse radiolysis and cyclic voltammetry studies of redox properties of phenothiazine radicals, *Radiation Physics and Chemistry*, 75 (2006) 990-1000.
- [76] J.L. Chen, X.L. Zheng, F.J. Miao, J.N. Zhang, X.Q. Cui, W.T. Zheng, Engineering graphene/carbon nanotube hybrid for direct electron transfer of glucose oxidase and glucose biosensor, *Journal of Applied Electrochemistry*, 42 (2012) 875-881.
- [77] T. Kihara, X.Y. Liu, C. Nakamura, K.M. Park, S.W. Han, D.J. Qian, K. Kawasaki, N.A. Zorin, S. Yasuda, K. Hata, T. Wakayama, J. Miyake, Direct electron transfer to hydrogenase for catalytic hydrogen production using a single-walled carbon nanotube forest, *International Journal of Hydrogen Energy*, 36 (2011) 7523-7529.
- [78] F. Tasca, W. Harreither, R. Ludwig, J.J. Gooding, L. Gorton, Cellobiose Dehydrogenase Aryl Diazonium Modified Single Walled Carbon Nanotubes: Enhanced Direct Electron Transfer through a Positively Charged Surface, *Anal. Chem.*, 83 (2011) 3042-3049.
- [79] E. Lojou, Hydrogenases as catalysts for fuel cells: Strategies for efficient immobilization at electrode interfaces, *Electrochim. Acta*, 56 (2011) 10385-10397.
- [80] E. Lojou, X. Luo, M. Brugna, N. Candoni, S. Dementin, M.T. Giudici-Ortoni, Biocatalysts for fuel cells: efficient hydrogenase orientation for H₂ oxidation at electrodes modified with carbon nanotubes, *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 13 (2008) 1157-1167.
- [81] V. Flexer, F. Durand, S. Tsujimura, N. Mano, Efficient Direct Electron Transfer of PQQ-glucose Dehydrogenase on Carbon Cryogel Electrodes at Neutral pH, *Anal. Chem.*, 83 (2011) 5721-5727.
- [82] D. Svedruzic, J.L. Blackburn, R.C. Tenent, J.D.R. Rocha, T.B. Vinzant, M.J. Heben, P.W. King, High-Performance Hydrogen Production and Oxidation Electrodes with Hydrogenase Supported on Metallic Single-Wall Carbon Nanotube Networks, *J. Am. Chem. Soc.*, 133 (2011) 4299-4306.
- [83] Q. Sun, N.A. Zorin, D. Chen, M. Chen, T.X. Liu, J. Miyake, D.J. Qian, Langmuir-Blodgett Films of Pyridyldithio-Modified Multiwalled Carbon Nanotubes as a Support to Immobilize Hydrogenase, *Langmuir*, 26 (2010) 10259-10265.
- [84] C. Gutierrez-Sanchez, M. Pita, C. Vaz-Dominguez, S. Shleev, A.L. De Lacey, Gold Nanoparticles as Electronic Bridges for Laccase-Based Biocathodes, *J. Am. Chem. Soc.*, 134 (2012) 17212-17220.
- [85] M.A. Alonso-Lomillo, O. Rudiger, A. Maroto-Valiente, M. Velez, I. Rodriguez-Ramos, F.J. Munoz, V.M. Fernandez, A.L. De Lacey, Hydrogenase-coated carbon nanotubes for efficient H₂ oxidation, *Nano Letters*, 7 (2007) 1603-1608.
- [86] Y.M. Yan, L. Su, L.Q. Mao, Multi-walled carbon nanotube-based glucose/O₂ biofuel cell with glucose oxidase and laccase as biocatalysts, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 7 (2007) 1625-1630.
- [87] K. Szot, W. Nogala, J. Niedziolka-Jonsson, M. Jonsson-Niedziolka, F. Marken, J. Rogalski, C.N. Kirchner, G. Wittstock, M. Opallo, Hydrophilic carbon nanoparticle-laccase thin film electrode for

mediatorless dioxygen reduction SECM activity mapping and application in zinc-dioxygen battery, *Electrochim. Acta*, 54 (2009) 4620-4625.

[88] A. Ciaccafava, A. De Poulpiquet, V. Techer, M.T. Giudici-Ortoni, S. Tingry, C. Innocent, E. Lojou, An innovative powerful and mediatorless H₂/O₂ biofuel cell based on an outstanding bioanode, *Electrochem. Commun.*, 23 (2012) 25-28.

[89] J.Y. Lee, H.Y. Shin, S.W. Kang, C. Park, S.W. Kim, Improvement of electrical properties via glucose oxidase-immobilization by actively turning over glucose for an enzyme-based biofuel cell modified with DNA-wrapped single walled nanotubes, *Biosens. Bioelectron.*, 26 (2011) 2685-2688.

[90] J.Y. Lee, H.Y. Shin, S.W. Kang, C. Park, S.W. Kim, Application of an enzyme-based biofuel cell containing a bioelectrode modified with deoxyribonucleic acid-wrapped single-walled carbon nanotubes to serum, *Enzyme and Microbial Technology*, 48 (2011) 80-84.

[91] V.A. Karachevtsev, S.G. Stepanian, A.Y. Glamazda, M.V. Karachevtsev, V.V. Eremenko, O.S. Lytvyn, L. Adamowicz, Noncovalent Interaction of Single-Walled Carbon Nanotubes with 1-Pyrenebutanoic Acid Succinimide Ester and Glucoseoxidase, *Journal of Physical Chemistry C*, 115 (2011) 21072-21082.

[92] S. Zanarini, M. Vinante, L. Pasquardini, A. Sanginario, M. Giorcelli, S. Bianco, C. Gerbaldi, J.R. Nair, L. Lunelli, L. Vanzetti, F. Paolucci, M. Marcaccio, L. Prodi, A. Tagliaferro, C. Pederzoli, D. Demarchi, P. Civera, Facile functionalization by pi-stacking of macroscopic substrates made of vertically aligned carbon nanotubes: Tracing reactive groups by electrochemiluminescence, *Electrochim. Acta*, 56 (2011) 9269-9276.

[93] X.J. Luo, M. Brugna, P. Tron-Infossi, M.T. Giudici-Ortoni, E. Lojou, Immobilization of the hyperthermophilic hydrogenase from *Aquifex aeolicus* bacterium onto gold and carbon nanotube electrodes for efficient H₂ oxidation, *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 14 (2009) 1275-1288.

[94] Y. Kamitaka, S. Tsujimura, K. Kano, High current density bioelectrolysis of D-fructose at fructose dehydrogenase-adsorbed and Ketjen black-modified electrodes without a mediator, *Chemistry Letters*, 36 (2007) 218-219.

[95] A. Lesniewski, M. Paszewski, M. Opallo, Gold-carbon three dimensional film electrode prepared from oppositely charged conductive nanoparticles by layer-by-layer approach, *Electrochem. Commun.*, 12 (2010) 435-437.

[96] K. Szot, J.D. Watkins, S.D. Bull, F. Marken, M. Opallo, Three dimensional film electrode prepared from oppositely charged carbon nanoparticles as efficient enzyme host, *Electrochem. Commun.*, 12 (2010) 737-739.

[97] C.X. Guo, F.P. Hu, X.W. Lou, C.M. Li, High-performance biofuel cell made with hydrophilic ordered mesoporous carbon as electrode material, *Journal of Power Sources*, 195 (2010) 4090-4097.

[98] Y. Hamano, S. Tsujimura, O. Shirai, K. Kano, Micro-cubic monolithic carbon cryogel electrode for direct electron transfer reaction of fructose dehydrogenase, *Bioelectrochemistry*, 88 (2012) 114-117.

[99] S. Iijima, HELICAL MICROTUBULES OF GRAPHITIC CARBON, *Nature*, 354 (1991) 56-58.

- [100] Z.A. Nima, M.W. Mahmood, A. Karmakar, T. Mustafa, S. Bourdo, Y. Xu, A.S. Biris, Single-walled carbon nanotubes as specific targeting and Raman spectroscopic agents for detection and discrimination of single human breast cancer cells, *Journal of Biomedical Optics*, 18 (2013) 11.
- [101] B. Guo, R. Zebda, S.J. Drake, C.M. Sayes, Synergistic effect of co-exposure to carbon black and Fe₂O₃ nanoparticles on oxidative stress in cultured lung epithelial cells, *Particle and Fibre Toxicology*, 6 (2009) 13.
- [102] H.Q. Li, R.L. Liu, D.Y. Zhao, Y.Y. Xia, Electrochemical properties of an ordered mesoporous carbon prepared by direct tri-constituent co-assembly, *Carbon*, 45 (2007) 2628-2635.
- [103] A. Walcarius, S.D. Minter, J. Wang, Y.H. Lin, A. Merkoci, Nanomaterials for bio-functionalized electrodes: recent trends, *Journal of Materials Chemistry B*, 1 (2013) 4878-4908.
- [104] R.H. Baughman, A.A. Zakhidov, W.A. de Heer, Carbon nanotubes - the route toward applications, *Science*, 297 (2002) 787-792.
- [105] A.F. Che, V. Germain, M. Cretin, D. Cornu, C. Innocent, S. Tingry, Fabrication of free-standing electrospun carbon nanofibers as efficient electrode materials for bioelectrocatalysis, *New Journal of Chemistry*, 35 (2011) 2848-2853.
- [106] N. Grobert, Carbon nanotubes - becoming clean, *Mater. Today*, 10 (2007) 28-35.
- [107] S. Sajjadi, H. Ghourchian, P. Rahimi, Different behaviors of single and multi wall carbon nanotubes for studying electrochemistry and electrocatalysis of choline oxidase, *Electrochim. Acta*, 56 (2011) 9542-9548.
- [108] K. Behler, S. Osswald, H. Ye, S. Dimovski, Y. Gogotsi, Effect of thermal treatment on the structure of multi-walled carbon nanotubes, *J. Nanopart. Res.*, 8 (2006) 615-625.
- [109] A. Mendez-Vilas, Fuelling the Future: Advances in Science and Technologies for Energy generation, transmission and storage, in: B.W. Press (Ed.)2012, pp. 285.
- [110] K.S. Novoselov, A.K. Geim, S.V. Morozov, D. Jiang, Y. Zhang, S.V. Dubonos, I.V. Grigorieva, A.A. Firsov, Electric field effect in atomically thin carbon films, *Science*, 306 (2004) 666-669.
- [111] L. Tan, K.G. Zhou, Y.H. Zhang, H.X. Wang, X.D. Wang, Y.F. Guo, H.L. Zhang, Nanomolar detection of dopamine in the presence of ascorbic acid at beta-cyclodextrin/graphene nanocomposite platform, *Electrochem. Commun.*, 12 (2010) 557-560.
- [112] M. Zhou, Y.M. Zhai, S.J. Dong, Electrochemical Sensing and Biosensing Platform Based on Chemically Reduced Graphene Oxide, *Anal. Chem.*, 81 (2009) 5603-5613.
- [113] K.V. Krishna, C. Menard-Moyon, S. Verma, A. Bianco, Graphene-based nanomaterials for nanobiotechnology and biomedical applications, *Nanomedicine*, 8 (2013) 1669-1688.
- [114] X.J. Wang, M. Falk, R. Ortiz, H. Matsumura, J. Bobacka, R. Ludwig, M. Bergelin, L. Gorton, S. Shleev, Mediatorless sugar/oxygen enzymatic fuel cells based on gold nanoparticle-modified electrodes, *Biosens. Bioelectron.*, 31 (2012) 219-225.
- [115] M. Falk, V. Andoralov, Z. Blum, J. Sotres, D.B. Suyatin, T. Ruzgas, T. Arnebrant, S. Shleev, Biofuel cell as a power source for electronic contact lenses, *Biosens. Bioelectron.*, 37 (2012) 38-45.

- [116] M. Falk, Z. Blum, S. Shleev, Direct electron transfer based enzymatic fuel cells, *Electrochim. Acta*, 82 (2012) 191-202.
- [117] H. Matsumura, R. Ortiz, R. Ludwig, K. Igarashi, M. Samejima, L. Gorton, Direct Electrochemistry of *Phanerochaete chrysosporium* Cellobiose Dehydrogenase Covalently Attached onto Gold Nanoparticle Modified Solid Gold Electrodes, *Langmuir*, 28 (2012) 10925-10933.
- [118] O. Yehezkeli, R. Tel-Vered, S. Reichlin, I. Willner, Nano-engineered Flavin-Dependent Glucose Dehydrogenase/Gold Nanoparticle-Modified Electrodes for Glucose Sensing and Biofuel Cell Applications, *Acs Nano*, 5 (2011) 2385-2391.
- [119] Y.B. Saint Come, H. Lalo, Z.J. Wang, G.W. Kohring, R. Hempelmann, M. Etienne, A. Walcarius, A. Kuhn, Interest of the Sol-Gel Approach for Multiscale Tailoring of Porous Bioelectrode Surfaces, *Electroanalysis*, 25 (2013) 621-629.
- [120] S. Boland, D. Leech, A glucose/oxygen enzymatic fuel cell based on redox polymer and enzyme immobilisation at highly-ordered macroporous gold electrodes, *Analyst*, 137 (2012) 113-117.
- [121] U. Salaj-Kosla, S. Poller, W. Schuhmann, S. Shleev, E. Magner, Direct electron transfer of *Trametes hirsuta* laccase adsorbed at unmodified nanoporous gold electrodes, *Bioelectrochemistry*, 91 (2013) 15-20.
- [122] D.I. Fried, F.J. Brieler, M. Froba, Designing Inorganic Porous Materials for Enzyme Adsorption and Applications in Biocatalysis, *Chemcatchem*, 5 (2013) 862-884.
- [123] C. Renault, C.P. Andrieux, R.T. Tucker, M.J. Brett, V. Balland, B. Limoges, Unraveling the Mechanism of Catalytic Reduction of O₂ by Microperoxidase-11 Adsorbed within a Transparent 3D-Nanoporous ITO Film, *J. Am. Chem. Soc.*, 134 (2012) 6834-6845.
- [124] H. Nishihara, Y. Fukuraa, K. Inde, K. Tsuji, M. Takeuchi, T. Kyotani, Carbon-coated mesoporous silica with hydrophobicity and electrical conductivity, *Carbon*, 46 (2008) 48-53.
- [125] Z.G. Zhu, L. Garcia-Gancedo, C. Chen, X.R. Zhu, H.Q. Xie, A.J. Flewitt, W.I. Milne, Enzyme-free glucose biosensor based on low density CNT forest grown directly on a Si/SiO₂ substrate, *Sensors and Actuators B-Chemical*, 178 (2013) 586-592.
- [126] J. Baur, A. Le Goff, S. Dementin, M. Holzinger, M. Rousset, S. Cosnier, Three-dimensional carbon nanotube-polypyrrole-[NiFe] hydrogenase electrodes for the efficient electrocatalytic oxidation of H₂, *International Journal of Hydrogen Energy*, 36 (2011) 12096-12101.
- [127] I. Mazurenko, M. Etienne, O. Tananaiko, V. Urbanova, V. Zaitsev, A. Walcarius, Electrophoretic deposition of macroporous carbon nanotube assemblies for electrochemical applications, *Carbon*, 53 (2013) 302-312.
- [128] A. Celebanska, A. Lesniewski, M. Paszewski, M. Jonsson-Niedziolka, J. Niedziolka-Jonsson, M. Opallo, Gold three dimensional film electrode prepared from oppositely charged nanoparticles, *Electrochem. Commun.*, 13 (2011) 1170-1173.
- [129] C. Gutierrez-Sanchez, W.Z. Jia, Y. Beyl, M. Pita, W. Schuhmann, A.L. De Lacey, L. Stoica, Enhanced direct electron transfer between laccase and hierarchical carbon microfibers/carbon nanotubes composite electrodes. Comparison of three enzyme immobilization methods, *Electrochim. Acta*, 82 (2012) 218-223.

- [130] H. Wen, H.M. Bambhania, S.C. Barton, Carbon nanotube-modified biocatalytic microelectrodes with multiscale porosity, *Journal of Applied Electrochemistry*, 42 (2012) 145-151.
- [131] G. Gobel, F. Lisdat, Organic interlayers for oxygen reducing electrodes based on bilirubin oxidase and MWCNT modified gold, *Electrochem. Commun.*, 10 (2008) 1691-1694.
- [132] R.J. Chen, Y.G. Zhang, D.W. Wang, H.J. Dai, Noncovalent sidewall functionalization of single-walled carbon nanotubes for protein immobilization, *J. Am. Chem. Soc.*, 123 (2001) 3838-3839.
- [133] C.F. Blanford, R.S. Heath, F.A. Armstrong, A stable electrode for high-potential, electrocatalytic O₂ reduction based on rational attachment of a blue copper oxidase to a graphite surface, *Chemical Communications*, (2007) 1710-1712.
- [134] C. Gutierrez-Sanchez, D. Olea, M. Marques, V.M. Fernandez, I.A.C. Pereira, M. Velez, A.L. De Lacey, Oriented Immobilization of a Membrane-Bound Hydrogenase onto an Electrode for Direct Electron Transfer, *Langmuir*, 27 (2011) 6449-6457.
- [135] O. Rudiger, C. Gutierrez-Sanchez, D. Olea, I.A.C. Pereira, M. Velez, V.M. Fernandez, A.L. De Lacey, Enzymatic Anodes for Hydrogen Fuel Cells based on Covalent Attachment of Ni-Fe Hydrogenases and Direct Electron Transfer to SAM-Modified Gold Electrodes, *Electroanalysis*, 22 (2010) 776-783.
- [136] M. Pita, C. Gutierrez-Sanchez, M.D. Toscano, S. Shleev, A.L. De Lacey, Oxygen biosensor based on bilirubin oxidase immobilized on a nanostructured gold electrode, *Bioelectrochemistry*, 94 (2013) 69-74.
- [137] S. Boland, P. Jenkins, P. Kavanagh, D. Leech, Biocatalytic fuel cells: A comparison of surface pre-treatments for anchoring biocatalytic redox films on electrode surfaces, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 626 (2009) 111-115.
- [138] E. Fitzer, R. Weiss, EFFECT OF SURFACE-TREATMENT AND SIZING OF C-FIBERS ON THE MECHANICAL-PROPERTIES OF CFR THERMOSETTING AND THERMOPLASTIC POLYMERS, *Carbon*, 25 (1987) 455-467.
- [139] J.F. Evans, T. Kuwana, INTRODUCTION OF FUNCTIONAL-GROUPS ONTO CARBON ELECTRODES VIA TREATMENT WITH RADIO-FREQUENCY PLASMAS, *Anal. Chem.*, 51 (1979) 358-365.
- [140] W.P. Hoffman, W.C. Hurley, T.W. Owens, H.T. Phan, ADVANTAGE OF THE SCANNING TUNNELING MICROSCOPE IN DOCUMENTING CHANGES IN CARBON-FIBER SURFACE-MORPHOLOGY BROUGHT ABOUT BY VARIOUS SURFACE TREATMENTS, *Journal of Materials Science*, 26 (1991) 4545-4553.
- [141] L.J. Kepley, A.J. Bard, ELLIPSOMETRIC, ELECTROCHEMICAL, AND ELEMENTAL CHARACTERIZATION OF THE SURFACE PHASE PRODUCED ON GLASSY-CARBON ELECTRODES BY ELECTROCHEMICAL ACTIVATION, *Anal. Chem.*, 60 (1988) 1459-1467.
- [142] C. Bourdillon, V. Thomas, D. Thomas, ELECTROCHEMICAL STUDY OF D-GLUCOSE OXIDASE AUTO-INACTIVATION, *Enzyme and Microbial Technology*, 4 (1982) 175-180.
- [143] A.P. Brown, F.C. Anson, MOLECULAR ANCHORS FOR ATTACHMENT OF METAL-COMPLEXES TO GRAPHITE ELECTRODE SURFACES, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 83 (1977) 203-206.

- [144] A.P. Brown, C. Koval, F.C. Anson, ILLUSTRATIVE ELECTROCHEMICAL BEHAVIOR OF REACTANTS IRREVERSIBLY ADSORBED ON GRAPHITE ELECTRODE SURFACES, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 72 (1976) 379-387.
- [145] H. Jaegfeldt, T. Kuwana, G. Johansson, ELECTROCHEMICAL STABILITY OF CATECHOLS WITH A PYRENE SIDE-CHAIN STRONGLY ADSORBED ON GRAPHITE-ELECTRODES FOR CATALYTIC-OXIDATION OF DIHYDRONICOTINAMIDE ADENINE-DINUCLEOTIDE, *J. Am. Chem. Soc.*, 105 (1983) 1805-1814.
- [146] M. Delamar, R. Hitmi, J. Pinson, J.M. Saveant, COVALENT MODIFICATION OF CARBON SURFACES BY GRAFTING OF FUNCTIONALIZED ARYL RADICALS PRODUCED FROM ELECTROCHEMICAL REDUCTION OF DIAZONIUM SALTS, *J. Am. Chem. Soc.*, 114 (1992) 5883-5884.
- [147] J. Lyskawa, D. Belanger, Direct modification of a gold electrode with aminophenyl groups by electrochemical reduction of in situ generated aminophenyl monodiazonium cations, *Chemistry of Materials*, 18 (2006) 4755-4763.
- [148] M.C. Bernard, A. Chausse, E. Cabet-Deliry, M.M. Chehimi, J. Pinson, F. Podvorica, C. Vautrin-UI, Organic layers bonded to industrial, coinage, and noble metals through electrochemical reduction of aryldiazonium salts, *Chemistry of Materials*, 15 (2003) 3450-3462.
- [149] S. Baranton, D. Belanger, In situ generation of diazonium cations in organic electrolyte for electrochemical modification of electrode surface, *Electrochim. Acta*, 53 (2008) 6961-6967.
- [150] S. Boland, K. Foster, D. Leech, A stability comparison of redox-active layers produced by chemical coupling of an osmium redox complex to pre-functionalized gold and carbon electrodes, *Electrochim. Acta*, 54 (2009) 1986-1991.
- [151] L. Santos, J. Ghilane, J.C. Lacroix, Formation of Mixed Organic Layers by Stepwise Electrochemical Reduction of Diazonium Compounds, *J. Am. Chem. Soc.*, 134 (2012) 5476-5479.
- [152] L.T. Nielsen, K.H. Vase, M.D. Dong, F. Besenbacher, S.U. Pedersen, K. Daasbjerg, Electrochemical approach for constructing a monolayer of thiophenolates from grafted multilayers of diaryl disulfides, *J. Am. Chem. Soc.*, 129 (2007) 1888-+.
- [153] Y.R. Leroux, F. Hui, J.M. Noel, C. Roux, A.J. Downard, P. Hapiot, Design of Robust Binary Film onto Carbon Surface Using Diazonium Electrochemistry, *Langmuir*, 27 (2011) 11222-11228.
- [154] W.Z. Jia, S. Schwamborn, C. Jin, W. Xia, M. Muhler, W. Schuhmann, L. Stoica, Towards a high potential biocathode based on direct bioelectrochemistry between horseradish peroxidase and hierarchically structured carbon nanotubes, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 12 (2010) 10088-10092.
- [155] M. Jonsson-Niedziolka, A. Kaminska, M. Opallo, Pyrene-functionalised single-walled carbon nanotubes for mediatorless dioxygen bioelectrocatalysis, *Electrochim. Acta*, 55 (2010) 8744-8750.
- [156] T. Lojou, P. Bianco, Buildup of polyelectrolyte-protein multilayer assemblies on gold electrodes. Role of the hydrophobic effect, *Langmuir*, 20 (2004) 748-755.
- [157] C.M. Moore, N.L. Akers, A.D. Hill, Z.C. Johnson, S.D. Minter, Improving the environment for immobilized dehydrogenase enzymes by modifying Nafion with tetraalkylammonium bromides, *Biomacromolecules*, 5 (2004) 1241-1247.

- [158] A. Zloczewska, M. Jonsson-Niedziolka, J. Rogalski, M. Opallo, Vertically aligned carbon nanotube film electrodes for bioelectrocatalytic dioxygen reduction, *Electrochim. Acta*, 56 (2011) 3947-3953.
- [159] M. Frascioni, A. Heyman, I. Medalsy, D. Porath, F. Mazzei, O. Shoseyoy, Wiring of Redox Enzymes on Three Dimensional Self-Assembled Molecular Scaffold, *Langmuir*, 27 (2011) 12606-12613.
- [160] J.T. Holland, C. Lau, S. Brozik, P. Atanassov, S. Banta, Engineering of Glucose Oxidase for Direct Electron Transfer via Site-Specific Gold Nanoparticle Conjugation, *J. Am. Chem. Soc.*, 133 (2011) 19262-19265.
- [161] R.P. Ramasamy, H.R. Luckarift, D.M. Ivnitski, P.B. Atanassov, G.R. Johnson, High electrocatalytic activity of tethered multicopper oxidase-carbon nanotube conjugates, *Chemical Communications*, 46 (2010) 6045-6047.
- [162] C. Bourdillon, M. Delamar, C. Demaille, R. Hitmi, J. Moiroux, J. Pinson, IMMOBILIZATION OF GLUCOSE-OXIDASE ON A CARBON SURFACE DERIVATIZED BY ELECTROCHEMICAL REDUCTION OF DIAZONIUM SALTS, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 336 (1992) 113-123.
- [163] M. Pellissier, F. Barriere, A.J. Downard, D. Leech, Improved stability of redox enzyme layers on glassy carbon electrodes via covalent grafting, *Electrochem. Commun.*, 10 (2008) 835-838.
- [164] C. Vaz-Dominguez, S. Campuzano, O. Rudiger, M. Pita, M. Gorbacheva, S. Shleev, V.M. Fernandez, A.L. De Lacey, Laccase electrode for direct electrocatalytic reduction of O₂ to H₂O with high-operational stability and resistance to chloride inhibition, *Biosens. Bioelectron.*, 24 (2008) 531-537.
- [165] O. Rudiger, J.M. Abad, E.C. Hatchikian, V.M. Fernandez, A.L. De Lacey, Oriented immobilization of *Desulfovibrio gigas* hydrogenase onto carbon electrodes by covalent bonds for nonmediated oxidation of H₂, *J. Am. Chem. Soc.*, 127 (2005) 16008-16009.
- [166] C. Baffert, K. Sybirna, P. Ezanno, T. Lautier, V. Hajj, I. Meynial-Salles, P. Soucaille, H. Bottin, C. Leger, Covalent Attachment of FeFe Hydrogenases to Carbon Electrodes for Direct Electron Transfer, *Anal. Chem.*, 84 (2012) 7999-8005.
- [167] R. Polsky, J.C. Harper, S.M. Dirk, D.C. Arango, D.R. Wheeler, S.M. Brozik, Diazonium-functionalized horseradish peroxidase immobilized via addressable electrodeposition: Direct electron transfer and electrochemical detection, *Langmuir*, 23 (2007) 364-366.
- [168] C.F. Blanford, C.E. Foster, R.S. Heath, F.A. Armstrong, Efficient electrocatalytic oxygen reduction by the 'blue' copper oxidase, laccase, directly attached to chemically modified carbons, *Faraday Discussions*, 140 (2008) 319-335.
- [169] N. Lalaoui, K. Elouarzaki, A. Le Goff, M. Holzinger, S. Cosnier, Efficient direct oxygen reduction by laccases attached and oriented on pyrene-functionalized polypyrrole/carbon nanotube electrodes, *Chemical Communications*, 49 (2013) 9281-9283.
- [170] F. Giroud, S.D. Minter, Anthracene-modified pyrenes immobilized on carbon nanotubes for direct electroreduction of O₂ by laccase, *Electrochem. Commun.*, 34 (2013) 157-160.

- [171] M. Bourourou, K. Elouarzaki, N. Lalaoui, C. Agnes, A. Le Goff, M. Holzinger, A. Maaref, S. Cosnier, Supramolecular Immobilization of Laccase on Carbon Nanotube Electrodes Functionalized with (Methylpyrenylaminomethyl)anthraquinone for Direct Electron Reduction of Oxygen, *Chemistry-a European Journal*, 19 (2013) 9371-9375.
- [172] M. Sosna, J.M. Chretien, J.D. Kilburn, P.N. Bartlett, Monolayer anthracene and anthraquinone modified electrodes as platforms for *Trametes hirsuta* laccase immobilisation, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 12 (2010) 10018-10026.
- [173] C.P. You, X. Xu, B.Z. Tian, J.L. Kong, D.Y. Zhao, B.H. Liu, Electrochemistry and biosensing of glucose oxidase based on mesoporous carbons with different spatially ordered dimensions, *Talanta*, 78 (2009) 705-710.
- [174] M. Sosna, L. Stoica, E. Wright, J.D. Kilburn, W. Schuhmann, P.N. Bartlett, Mass transport controlled oxygen reduction at anthraquinone modified 3D-CNT electrodes with immobilized *Trametes hirsuta* laccase, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 14 (2012) 11882-11885.
- [175] R.T. Bonnecaze, N. Mano, B. Nam, A. Heller, On the behavior of the porous rotating disk electrode, *Journal of the Electrochemical Society*, 154 (2007) F44-F47.
- [176] C.H. Lee, T.S. Lin, C.Y. Mou, Mesoporous materials for encapsulating enzymes, *Nano Today*, 4 (2009) 165-179.
- [177] S. Hudson, J. Cooney, B.K. Hodnett, E. Magner, Chloroperoxidase on periodic mesoporous organosilanes: Immobilization and reuse, *Chemistry of Materials*, 19 (2007) 2049-2055.
- [178] H.S. Shafaat, O. Rudiger, H. Ogata, W. Lubitz, [NiFe] hydrogenases: A common active site for hydrogen metabolism under diverse conditions, *Biochim. Biophys. Acta-Bioenerg.*, 1827 (2013) 986-1002.
- [179] J. Fritsch, O. Lenz, B. Friedrich, Structure, function and biosynthesis of O₂-tolerant hydrogenases, *Nature Reviews Microbiology*, 11 (2013) 106-114.
- [180] W. Lubitz, H. Ogata, O. Rudiger, E. Reijerse, Hydrogenases, *Chemical Reviews*, 114 (2014) 4081-4148.
- [181] M.R. Tarasevich, V.A. Bogdanovskaya, V.S. Bagotskii, S.D. Varfolomeev, A.I. Yaropolov, I.V. Berezin, BIO-ELECTRO-CATALYSIS ELECTROCHEMICAL IONIZATION OF HYDROGEN ON A PYROGRAPHITE ELECTRODE IN A SYSTEM INCLUDING HYDROGENASE, *Soviet Electrochemistry*, 13 (1977) 755-759.
- [182] A.I. Yaropolov, A.A. Karyakin, S.D. Varfolomeev, I.V. Berezin, MECHANISM OF H₂-ELECTROOXIDATION WITH IMMOBILIZED HYDROGENASE, *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 12 (1984) 267-277.
- [183] C. Leger, S. Dementin, P. Bertrand, M. Rousset, B. Guigliarelli, Inhibition and aerobic inactivation kinetics of *Desulfovibrio fructosovorans* NiFe hydrogenase studied by protein film voltammetry, *J. Am. Chem. Soc.*, 126 (2004) 12162-12172.
- [184] A.K. Jones, E. Sillery, S.P.J. Albracht, F.A. Armstrong, Direct comparison of the electrocatalytic oxidation of hydrogen by an enzyme and a platinum catalyst, *Chemical Communications*, (2002) 866-867.

- [185] C. Madden, M.D. Vaughn, I. Diez-Perez, K.A. Brown, P.W. King, D. Gust, A.L. Moore, T.A. Moore, Catalytic Turnover of FeFe -Hydrogenase Based on Single-Molecule Imaging, *J. Am. Chem. Soc.*, 134 (2012) 1577-1582.
- [186] D. Millo, P. Hildebrandt, M.E. Pandelia, W. Lubitz, I. Zebger, SEIRA Spectroscopy of the Electrochemical Activation of an Immobilized [NiFe] Hydrogenase under Turnover and Non-Turnover Conditions, *Angewandte Chemie-International Edition*, 50 (2011) 2632-2634.
- [187] O. Gutierrez-Sanz, M. Marques, I.A.C. Pereira, A.L. De Lacey, W. Lubitz, O. Rudiger, Orientation and Function of a Membrane-Bound Enzyme Monitored by Electrochemical Surface-Enhanced Infrared Absorption Spectroscopy, *Journal of Physical Chemistry Letters*, 4 (2013) 2794-2798.
- [188] W. Johnston, M.J. Cooney, B.Y. Liaw, R. Sapra, M.W.W. Adams, Design and characterization of redox enzyme electrodes: new perspectives on established techniques with application to an extremeophilic hydrogenase, *Enzyme and Microbial Technology*, 36 (2005) 540-549.
- [189] L. Xu, F.A. Armstrong, Optimizing the power of enzyme-based membrane-less hydrogen fuel cells for hydrogen-rich H₂-air mixtures, *Energy Environ. Sci.*, 6 (2013) 2166-2171.
- [190] A.R. Liu, T. Wakayama, C. Nakamura, J. Miyake, N.A. Zorin, D.J. Qian, Electrochemical properties of carbon nanotubes-hydrogenase conjugates Langmuir-Blodgett films, *Electrochim. Acta*, 52 (2007) 3222-3228.
- [191] A. Abou Hamdan, B. Burlat, O. Gutierrez-Sanz, P.P. Liebgott, C. Baffert, A.L. De Lacey, M. Rousset, B. Guigliarelli, C. Leger, S. Dementin, O₂-independent formation of the inactive states of NiFe hydrogenase, *Nature Chemical Biology*, 9 (2013) 15-+.
- [192] K.A. Vincent, J.A. Cracknell, O. Lenz, I. Zebger, B. Friedrich, F.A. Armstrong, Electrocatalytic hydrogen oxidation by an enzyme at high carbon monoxide or oxygen levels, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102 (2005) 16951-16954.
- [193] K.A. Vincent, A. Parkin, O. Lenz, S.P.J. Albracht, J.C. Fontecilla-Camps, R. Cammack, B. Friedrich, F.A. Armstrong, Electrochemical definitions of O₂ sensitivity and oxidative inactivation in hydrogenases, *J. Am. Chem. Soc.*, 127 (2005) 18179-18189.
- [194] J. Fritsch, P. Scheerer, S. Frielingsdorf, S. Kroschinsky, B. Friedrich, O. Lenz, C.M.T. Spahn, The crystal structure of an oxygen-tolerant hydrogenase uncovers a novel iron-sulphur centre, *Nature*, 479 (2011) 249-U134.
- [195] M.J. Lukey, A. Parkin, M.M. Roessler, B.J. Murphy, J. Harmer, T. Palmer, F. Sargent, F.A. Armstrong, How *Escherichia coli* Is Equipped to Oxidize Hydrogen under Different Redox Conditions, *Journal of Biological Chemistry*, 285 (2010) 3928-3938.
- [196] M. Guiral, T. Aubert, M.T. Giudici-Ortoni, Hydrogen metabolism in the hyperthermophilic bacterium *Aquifex aeolicus*, *Biochemical Society Transactions*, 33 (2005) 22-24.
- [197] K.S. Yoon, K. Fukuda, K. Fujisawa, H. Nishihara, Purification and characterization of a highly thermostable, oxygen-resistant, respiratory [NiFe]-hydrogenase from a marine, aerobic hydrogen-oxidizing bacterium *Hydrogenovibrio marinus*, *International Journal of Hydrogen Energy*, 36 (2011) 7081-7088.

- [198] L. Bowman, L. Flanagan, P.K. Fyfe, A. Parkin, W.N. Hunter, F. Sargent, How the structure of the large subunit controls function in an oxygen-tolerant [NiFe]-hydrogenase, *Biochem. J.*, 458 (2014) 449-458.
- [199] M.E. Pandelia, V. Fourmond, P. Tron-Infossi, E. Lojou, P. Bertrand, C. Leger, M.T. Giudici-Ortoni, W. Lubitz, Membrane-Bound Hydrogenase I from the Hyperthermophilic Bacterium *Aquifex aeolicus*: Enzyme Activation, Redox Intermediates and Oxygen Tolerance, *J. Am. Chem. Soc.*, 132 (2010) 6991-7004.
- [200] M.E. Pandelia, P. Infossi, M. Stein, M.T. Giudici-Ortoni, W. Lubitz, Spectroscopic characterization of the key catalytic intermediate Ni-C in the O₂-tolerant [NiFe] hydrogenase I from *Aquifex aeolicus*: evidence of a weakly bound hydride, *Chemical Communications*, 48 (2012) 823-825.
- [201] A. Volbeda, Y. Montet, X. Vernede, E.C. Hatchikian, J.C. Fontecilla-Camps, High-resolution crystallographic analysis of *Desulfovibrio fructosovorans* [NiFe] hydrogenase, *International Journal of Hydrogen Energy*, 27 (2002) 1449-1461.
- [202] P.P. Liebgott, F. Leroux, B. Burlat, S. Dementin, C. Baffert, T. Lautier, V. Fourmond, P. Ceccaldi, C. Cavazza, I. Meynial-Salles, P. Soucaille, J.C. Fontecilla-Camps, B. Guigliarelli, P. Bertrand, M. Rousset, C. Leger, Relating diffusion along the substrate tunnel and oxygen sensitivity in hydrogenase, *Nature Chemical Biology*, 6 (2010) 63-70.
- [203] P.P. Liebgott, A.L. de Lacey, B. Burlat, L. Cournac, P. Richaud, M. Brugna, V.M. Fernandez, B. Guigliarelli, M. Rousset, C. Leger, S. Dementin, Original Design of an Oxygen-Tolerant [NiFe] Hydrogenase: Major Effect of a Valine-to-Cysteine Mutation near the Active Site, *J. Am. Chem. Soc.*, 133 (2011) 986-997.
- [204] A. Abou Hamdan, P.P. Liebgott, V. Fourmond, O. Gutierrez-Sanz, A.L. De Lacey, P. Infossi, M. Rousset, S. Dementin, C. Leger, Relation between anaerobic inactivation and oxygen tolerance in a large series of NiFe hydrogenase mutants, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109 (2012) 19916-19921.
- [205] Y. Shomura, K.S. Yoon, H. Nishihara, Y. Higuchi, Structural basis for a [4Fe-3S] cluster in the oxygen-tolerant membrane-bound [NiFe]-hydrogenase, *Nature*, 479 (2011) 253-U143.
- [206] A. Volbeda, P. Amara, C. Darnault, J.M. Mouesca, A. Parkin, M.M. Roessler, F.A. Armstrong, J.C. Fontecilla-Camps, X-ray crystallographic and computational studies of the O₂-tolerant [NiFe]-hydrogenase 1 from *Escherichia coli*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109 (2012) 5305-5310.
- [207] P. Wulff, C.C. Day, F. Sargent, F.A. Armstrong, How oxygen reacts with oxygen-tolerant respiratory [NiFe]-hydrogenases, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111 (2014) 6606-6611.
- [208] T. Goris, A.F. Wait, M. Saggi, J. Fritsch, N. Heidary, M. Stein, I. Zebger, F. Lendzian, F.A. Armstrong, B. Friedrich, O. Lenz, A unique iron-sulfur cluster is crucial for oxygen tolerance of a [NiFe]-hydrogenase, *Nature Chemical Biology*, 7 (2011) 310-U387.
- [209] M.E. Pandelia, D. Bykov, R. Izsak, P. Infossi, M.T. Giudici-Ortoni, E. Bill, F. Neese, W. Lubitz, Electronic structure of the unique [4Fe-3S] cluster in O₂-tolerant hydrogenases characterized by Fe-57 Mossbauer and EPR spectroscopy, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110 (2013) 483-488.

- [210] M.E. Pandelia, W. Lubitz, W. Nitschke, Evolution and diversification of Group 1 [NiFe] hydrogenases. Is there a phylogenetic marker for O₂-tolerance?, *Biochim. Biophys. Acta-Bioenerg.*, 1817 (2012) 1565-1575.
- [211] M. Brugna-Guiral, P. Tron, W. Nitschke, K.O. Stetter, B. Burlat, B. Guigliarelli, M. Bruschi, M.T. Giudici-Ortoni, [NiFe] hydrogenases from the hyperthermophilic bacterium *Aquifex aeolicus*: properties, function, and phylogenetics, *Extremophiles*, 7 (2003) 145-157.
- [212] A. Ciaccafava, P. Infossi, M.T. Giudici-Ortoni, E. Lojou, Stabilization Role of a Phenothiazine Derivative on the Electrocatalytic Oxidation of Hydrogen via *Aquifex aeolicus* Hydrogenase at Graphite Membrane Electrodes, *Langmuir*, 26 (2010) 18534-18541.
- [213] A. Ciaccafava, M. Alberola, S. Hameury, P. Infossi, M.T. Giudici-Ortoni, E. Lojou, Hydrogen bioelectrooxidation in ionic liquids: From cytochrome c(3) redox behavior to hydrogenase activity, *Electrochim. Acta*, 56 (2011) 3359-3368.
- [214] M. Guiral, P. Tron, V. Belle, C. Aubert, C. Leger, B. Guigliarelli, M.T. Giudici-Ortoni, Hyperthermostable and oxygen resistant hydrogenases from a hyperthermophilic bacterium *Aquifex aeolicus*: Physicochemical properties, *International Journal of Hydrogen Energy*, 31 (2006) 1424-1431.
- [215] M. Rousset, Y. Montet, B. Guigliarelli, N. Forget, M. Asso, P. Bertrand, J.C. Fontecilla-Camps, E.C. Hatchikian, [3Fe-4S] to [4Fe-4S] cluster conversion in *Desulfovibrio fructosovorans* [NiFe] hydrogenase by site-directed mutagenesis, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95 (1998) 11625-11630.
- [216] M.E. Pandelia, W. Nitschke, P. Infossi, M.T. Giudici-Ortoni, E. Bill, W. Lubitz, Characterization of a unique [FeS] cluster in the electron transfer chain of the oxygen tolerant [NiFe] hydrogenase from *Aquifex aeolicus*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108 (2011) 6097-6102.
- [217] M.E. Pandelia, P. Infossi, M.T. Giudici-Ortoni, W. Lubitz, The Oxygen-Tolerant Hydrogenase I from *Aquifex aeolicus* Weakly Interacts with Carbon Monoxide: An Electrochemical and Time-Resolved FTIR Study, *Biochemistry*, 49 (2010) 8873-8881.
- [218] J. Pelmont, *Biodégradations et métabolisme: les bactéries pour les technologies de l'environnement*, EDP Sciences 2005.
- [219] E.I. Solomon, A.J. Augustine, J. Yoon, O₂ Reduction to H₂O by the multicopper oxidases, *Dalton Transactions*, (2008) 3921-3932.
- [220] F. Xu, W.S. Shin, S.H. Brown, J.A. Wahleithner, U.M. Sundaram, E.I. Solomon, A study of a series of recombinant fungal laccases and bilirubin oxidase that exhibit significant differences in redox potential, substrate specificity, and stability, *Biochimica Et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1292 (1996) 303-311.
- [221] S. Murao, N. Tanaka, A NEW ENZYME BILIRUBIN OXIDASE PRODUCED BY *MYROTHECIUM-VERrucARIA* MT-1, *Agricultural and Biological Chemistry*, 45 (1981) 2383-2384.
- [222] N. Mano, Features and applications of bilirubin oxidases, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 96 (2012) 301-307.

- [223] N. Mano, L. Edembe, Bilirubin oxidases in bioelectrochemistry: Features and recent findings, *Biosens. Bioelectron.*, 50 (2013) 478-485.
- [224] L. Edembe, S. Gounel, M. Cadet, F. Durand, N. Mano, A highly efficient O₂ cathode based on bilirubin oxidase from *Bacillus pumilus* operating in serum, *Electrochem. Commun.*, 23 (2012) 80-82.
- [225] J.A. Cracknell, T.P. McNamara, E.D. Lowe, C.F. Blanford, Bilirubin oxidase from *Myrothecium verrucaria*: X-ray determination of the complete crystal structure and a rational surface modification for enhanced electrocatalytic O₂ reduction, *Dalton Transactions*, 40 (2011) 6668-6675.
- [226] K. Mizutani, M. Toyoda, K. Sagara, N. Takahashi, A. Sato, Y. Kamitaka, S. Tsujimura, Y. Nakanishi, T. Sugiura, S. Yamaguchi, K. Kano, B. Mikami, X-ray analysis of bilirubin oxidase from *Myrothecium verrucaria* at 2.3 angstrom resolution using a twinned crystal, *Acta Crystallographica Section F-Structural Biology and Crystallization Communications*, 66 (2010) 765-770.
- [227] J. Hirose, K. Inoue, H. Sakuragi, M. Kikkawa, M. Minakami, T. Morikawa, H. Iwamoto, K. Hiromi, Anions binding to bilirubin oxidase from *Trachyderma tsunodae* K-2593, *Inorganica Chimica Acta*, 273 (1998) 204-212.
- [228] F. Durand, S. Gounel, C.H. Kjaergaard, E.I. Solomon, N. Mano, Bilirubin oxidase from *Magnaporthe oryzae*: an attractive new enzyme for biotechnological applications, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 96 (2012) 1489-1498.
- [229] S. Sakasegawa, H. Ishikawa, S. Imamura, H. Sakuraba, S. Goda, T. Ohshima, Bilirubin oxidase activity of *Bacillus subtilis* CotA, *Applied and Environmental Microbiology*, 72 (2006) 972-975.
- [230] F.J. Enguita, L.O. Martins, A.O. Henriques, M.A. Carrondo, Crystal structure of a bacterial endospore coat component - A laccase with enhanced thermostability properties, *Journal of Biological Chemistry*, 278 (2003) 19416-19425.
- [231] F. Durand, C.H. Kjaergaard, E. Suraniti, S. Gounel, R.G. Hadt, E.I. Solomon, N. Mano, Bilirubin oxidase from *Bacillus pumilus*: A promising enzyme for the elaboration of efficient cathodes in biofuel cells, *Biosens. Bioelectron.*, 35 (2012) 140-146.
- [232] E. Suraniti, S. Tsujimura, F. Durand, N. Mano, Thermophilic biocathode with bilirubin oxidase from *Bacillus pumilus*, *Electrochem. Commun.*, 26 (2013) 41-44.
- [233] L. dos Santos, V. Climent, C.F. Blanford, F.A. Armstrong, Mechanistic studies of the 'blue' Cu enzyme, bilirubin oxidase, as a highly efficient electrocatalyst for the oxygen reduction reaction, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 12 (2010) 13962-13974.
- [234] J.A. Cracknell, C.F. Blanford, Developing the mechanism of dioxygen reduction catalyzed by multicopper oxidases using protein film electrochemistry, *Chemical Science*, 3 (2012) 1567-1581.
- [235] A. Christenson, S. Shleev, N. Mano, A. Heller, L. Gorton, Redox potentials of the blue copper sites of bilirubin oxidases, *Biochim. Biophys. Acta-Bioenerg.*, 1757 (2006) 1634-1641.
- [236] P. Ramirez, N. Mano, R. Andreu, T. Ruzgas, A. Heller, L. Gorton, S. Shleev, Direct electron transfer from graphite and functionalized gold electrodes to T1 and T2/T3 copper centers of bilirubin oxidase, *Biochim. Biophys. Acta-Bioenerg.*, 1777 (2008) 1364-1369.
- [237] C.H. Kjaergaard, F. Durand, F. Tasca, M.F. Qayyum, B. Kauffmann, S. Gounel, E. Suraniti, K.O. Hodgson, B. Hedman, N. Mano, E.I. Solomon, Spectroscopic and Crystallographic

Characterization of "Alternative Resting" and "Resting Oxidized" Enzyme Forms of Bilirubin Oxidase: Implications for Activity and Electrochemical Behavior of Multicopper Oxidases, *J. Am. Chem. Soc.*, 134 (2012) 5548-5551.

[238] A. Kosaka, C. Yamamoto, Y. Morishita, K. Nakane, ENZYMATIC DETERMINATION OF BILIRUBIN FRACTIONS IN SERUM, *Clinical Biochemistry*, 20 (1987) 451-458.

[239] J. Klemm, M.I. Prodromidis, M.I. Karayannis, An enzymic method for the determination of bilirubin using an oxygen electrode, *Electroanalysis*, 12 (2000) 292-295.

[240] S. Tsujimura, B. Tatsumi, J. Ogawa, S. Shimizu, K. Kano, T. Ikeda, Bioelectrocatalytic reduction of dioxygen to water at neutral pH using bilirubin oxidase as an enzyme and 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonate) as an electron transfer mediator, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 496 (2001) 69-75.

[241] S. Tsujimura, T. Nakagawa, K. Kano, T. Ikeda, Kinetic study of direct bioelectrocatalysis of dioxygen reduction with bilirubin oxidase at carbon electrodes, *Electrochemistry*, 72 (2004) 437-439.

[242] S. Brocato, C. Lau, P. Atanassov, Mechanistic study of direct electron transfer in bilirubin oxidase, *Electrochim. Acta*, 61 (2012) 44-49.

[243] K. Schubert, G. Goebel, F. Lisdat, Bilirubin oxidase bound to multi-walled carbon nanotube-modified gold, *Electrochim. Acta*, 54 (2009) 3033-3038.

[244] G. Gupta, C. Lau, V. Rajendran, F. Colon, B. Branch, D. Ivnitski, P. Atanassov, Direct electron transfer catalyzed by bilirubin oxidase for air breathing gas-diffusion electrodes, *Electrochem. Commun.*, 13 (2011) 247-249.

[245] U. Salaj-Kosla, S. Poller, Y. Beyl, M.D. Scanlon, S. Beloshapkin, S. Shleev, W. Schuhmann, E. Magner, Direct electron transfer of bilirubin oxidase (*Myrothecium verrucaria*) at an unmodified nanoporous gold biocathode, *Electrochem. Commun.*, 16 (2012) 92-95.

[246] S. Tsujimura, E. Suraniti, F. Durand, N. Mano, Oxygen reduction reactions of the thermostable bilirubin oxidase from *Bacillus pumilus* on mesoporous carbon-cryogel electrodes, *Electrochim. Acta*, 117 (2014) 263-267.

[247] M. Tominaga, M. Ohtani, I. Taniguchi, Gold single-crystal electrode surface modified with self-assembled monolayers for electron tunneling with bilirubin oxidase, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 10 (2008) 6928-6934.

[248] S. Tsujimura, M. Fujita, H. Tatsumi, K. Kano, T. Ikeda, Bioelectrocatalysis-based dihydrogen/dioxygen fuel cell operating at physiological pH, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 3 (2001) 1331-1335.

[249] A. Habrioux, T. Napporn, K. Servat, S. Tingry, K.B. Kokoh, Electrochemical characterization of adsorbed bilirubin oxidase on Vulcan XC 72R for the biocathode preparation in a glucose/O₂ biofuel cell, *Electrochim. Acta*, 55 (2010) 7701-7705.

[250] M. Pita, S. Shleev, T. Ruzgas, V.M. Fernandez, A.I. Yaropolov, L. Gorton, Direct heterogeneous electron transfer reactions of fungal laccases at bare and thiol-modified gold electrodes, *Electrochem. Commun.*, 8 (2006) 747-753.

- [251] N. Mano, H.H. Kim, Y.C. Zhang, A. Heller, An oxygen cathode operating in a physiological solution, *J. Am. Chem. Soc.*, 124 (2002) 6480-6486.
- [252] N. Mano, H.H. Kim, A. Heller, On the relationship between the characteristics of bilirubin oxidases and O₂ cathodes based on their "wiring", *J. Phys. Chem. B*, 106 (2002) 8842-8848.
- [253] Y. Ackermann, D.A. Guschin, K. Eckhard, S. Shleev, W. Schuhmann, Design of a bioelectrocatalytic electrode interface for oxygen reduction in biofuel cells based on a specifically adapted Os-complex containing redox polymer with entrapped *Trametes hirsuta* laccase, *Electrochem. Commun.*, 12 (2010) 640-643.
- [254] M. Cadet, X. Brilland, S. Gounel, F. Louerat, N. Mano, Design of a Highly Efficient O₂ Cathode Based on Bilirubin Oxidase from *Magnaporthe oryzae*, *Chemphyschem*, 14 (2013) 2097-2100.
- [255] L. Rulisek, U. Ryde, Theoretical studies of the active-site structure, spectroscopic and thermodynamic properties, and reaction mechanism of multicopper oxidases, *Coordination Chemistry Reviews*, 257 (2013) 445-458.
- [256] K. Kataoka, R. Kitagawa, M. Inoue, D. Naruse, T. Sakurai, H.W. Huang, Point mutations at the type ICu ligands, Cys457 and Met467, and at the putative proton donor, Asp105, in *Myrothecium verrucaria* bilirubin oxidase and reactions with dioxygen, *Biochemistry*, 44 (2005) 7004-7012.
- [257] Y. Kamitaka, S. Tsujimura, K. Kataoka, T. Sakurai, T. Ikeda, K. Kano, Effects of axial ligand mutation of the type I copper site in bilirubin oxidase on direct electron transfer-type bioelectrocatalytic reduction of dioxygen, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 601 (2007) 119-124.
- [258] J. Filip, J. Tkac, The pH dependence of the cathodic peak potential of the active sites in bilirubin oxidase, *Bioelectrochemistry*, 96 (2014) 14-20.
- [259] M.C. Weigel, E. Tritscher, F. Lisdat, Direct electrochemical conversion of bilirubin oxidase at carbon nanotube-modified glassy carbon electrodes, *Electrochem. Commun.*, 9 (2007) 689-693.
- [260] S. Shleev, V. Andoralov, M. Falk, C.T. Reimann, T. Ruzgas, M. Srncic, U. Ryde, L. Rulisek, On the Possibility of Uphill Intramolecular Electron Transfer in Multicopper Oxidases: Electrochemical and Quantum Chemical Study of Bilirubin Oxidase, *Electroanalysis*, 24 (2012) 1524-1540.
- [261] H.H. Kim, Y.C. Zhang, A. Heller, Bilirubin oxidase label for an enzyme-linked affinity assay with O₂ as substrate in a neutral pH NaCl solution, *Anal. Chem.*, 76 (2004) 2411-2414.
- [262] F. Xu, Dioxygen reactivity of laccase - Dependence of laccase source, pH, and anion inhibition, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 95 (2001) 125-133.
- [263] F. Xu, R.M. Berka, J.A. Wahleithner, B.A. Nelson, J.R. Shuster, S.H. Brown, A.E. Palmer, E.I. Solomon, Site-directed mutations in fungal laccase: effect on redox potential, activity and pH profile, *Biochem. J.*, 334 (1998) 63-70.
- [264] A. Naki, S.D. Varfolomeev, MECHANISM OF THE INHIBITION OF LACCASE ACTIVITY FROM POLYPORUS-VERSICOLOR BY HALIDE-IONS, *Biochem.-Moscow*, 46 (1981) 1344-1350.
- [265] S. Ozaki, J. Hirose, Y. Kidani, ELECTRON-TRANSFER REACTION BETWEEN FE(CN)₆⁴⁻-FE(CN)₆³⁻ AND COPPER(II) COPPER(I) IONS IN BOVINE ERYTHROCYTE SUPEROXIDE-

DISMUTASE - PH-DEPENDENCE AND INHIBITION BY VARIOUS KINDS OF ANIONS, *Inorganic Chemistry*, 27 (1988) 3746-3751.

[266] G. Musci, M.C.B. Dipatti, L. Calabrese, MODULATION OF THE REDOX STATE OF THE COPPER SITES OF HUMAN CERULOPLASMIN BY CHLORIDE, *Journal of Protein Chemistry*, 14 (1995) 611-619.

[267] G. Zoppellaro, N. Sakurai, K. Kataoka, T. Sakurai, The reversible change in the redox state of type I Cu in *Myrothecium verrucaria* bilirubin oxidase depending on pH, *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 68 (2004) 1998-2000.

[268] R. Reiss, J. Ihssen, L. Thony-Meyer, *Bacillus pumilus* laccase: a heat stable enzyme with a wide substrate spectrum, *Bmc Biotechnology*, 11 (2011) 11.

[269] K. Hilden, T.K. Hakala, T. Lundell, Thermotolerant and thermostable laccases, *Biotechnology Letters*, 31 (2009) 1117-1128.

[270] T. Beneyton, Y. Beyl, D.A. Guschin, A.D. Griffiths, V. Taly, W. Schuhmann, The Thermophilic CotA Laccase from *Bacillus subtilis*: Bioelectrocatalytic Evaluation of O₂ Reduction in the Direct and Mediated Electron Transfer Regime, *Electroanalysis*, 23 (2011) 1781-1789.

[271] T. Beneyton, A. El Harrak, A.D. Griffiths, P. Hellwig, V. Taly, Immobilization of CotA, an extremophilic laccase from *Bacillus subtilis*, on glassy carbon electrodes for biofuel cell applications, *Electrochem. Commun.*, 13 (2011) 24-27.

[272] D. Leech, P. Kavanagh, W. Schuhmann, Enzymatic fuel cells: Recent progress, *Electrochim. Acta*, 84 (2012) 223-234.

[273] N.L. Akers, C.M. Moore, S.D. Minteer, Development of alcohol/O₂ biofuel cells using salt-extracted tetrabutylammonium bromide/Nafion membranes to immobilize dehydrogenase enzymes, *Electrochim. Acta*, 50 (2005) 2521-2525.

[274] M. Rasmussen, R.E. Ritzmann, I. Lee, A.J. Pollack, D. Scherson, An Implantable Biofuel Cell for a Live Insect, *J. Am. Chem. Soc.*, 134 (2012) 1458-1460.

[275] I.V. Berezin, S.D. Varfolomeev, A.I. Yaropolov, V.A. Bogdanovskaya, M.R. Tarasevich, BIOCHEMICAL FUEL-ELEMENTS - HYDROGENASE AS A CATALYST OF HYDROGEN OXIDATION IN SYSTEM MEDIATOR-CARBON ELECTRODE, *Doklady Akademii Nauk Sssr*, 225 (1975) 105-108.

[276] A.A. Karyakin, S.V. Morozov, E.E. Karyakina, N.A. Zorin, V.V. Perelygin, S. Cosnier, Hydrogenase electrodes for fuel cells, *Biochemical Society Transactions*, 33 (2005) 73-75.

[277] T.W. Woolerton, K.A. Vincent, Oxidation of dilute H₂ and H₂/O₂ mixtures by hydrogenases and Pt, *Electrochim. Acta*, 54 (2009) 5011-5017.

[278] A.A. Karyakin, S.V. Morozov, E.E. Karyakina, S.D. Varfolomeyev, N.A. Zorin, S. Cosnier, Hydrogen fuel electrode based on bioelectrocatalysis by the enzyme hydrogenase, *Electrochem. Commun.*, 4 (2002) 417-420.

[279] F.A. Armstrong, N.A. Belsey, J.A. Cracknell, G. Goldet, A. Parkin, E. Reisner, K.A. Vincent, A.F. Wait, Dynamic electrochemical investigations of hydrogen oxidation and production by enzymes and implications for future technology, *Chem. Soc. Rev.*, 38 (2009) 36-51.

- [280] A.A. Karyakin, M.Y. Karyakina, C.V. Morozov, M.Y. Vagin, S.D. Varfolomeev, Hydrogen - oxygen fuel cell based on immobilized enzymes, Google Patents, 2004.
- [281] M.R. Tarasevich, V.A. Bogdanovskaya, N.M. Zagudaeva, A.V. Kapustin, Composite materials for direct bioelectrocatalysis of the hydrogen and oxygen reactions in biofuel cells, *Russian Journal of Electrochemistry*, 38 (2002) 335-335.
- [282] K.A. Vincent, J.A. Cracknell, J.R. Clark, M. Ludwig, O. Lenz, B. Friedrich, F.A. Armstrong, Electricity from low-level H₂ in still air - an ultimate test for an oxygen tolerant hydrogenase, *Chemical Communications*, (2006) 5033-5035.
- [283] A.F. Wait, A. Parkin, G.M. Morley, L. dos Santos, F.A. Armstrong, Characteristics of Enzyme-Based Hydrogen Fuel Cells Using an Oxygen-Tolerant Hydrogenase as the Anodic Catalyst, *Journal of Physical Chemistry C*, 114 (2010) 12003-12009.
- [284] T. Matsumoto, S. Eguchi, H. Nakai, T. Hibino, K.-S. Yoon, S. Ogo, [NiFe]Hydrogenase from *Citrobacter* sp. S-77 Surpasses Platinum as an Electrode for H₂ Oxidation Reaction, *Angewandte Chemie*, 126 (2014) 9041-9044.
- [285] N. Plumeré, O. Rüdiger, A.A. Oughli, R. Williams, J. Vivekananthan, S. Pöller, W. Schuhmann, W. Lubitz, A redox hydrogel protects hydrogenase from high-potential deactivation and oxygen damage, *Nat Chem*, advance online publication (2014).
- [286] S. Eguchi, K.S. Yoon, S. Ogo, O₂-stable membrane-bound NiFe hydrogenase from a newly isolated *Citrobacter* sp S-77, *J. Biosci. Bioeng.*, 114 (2012) 479-484.
- [287] K. Singh, T. McArdle, P.R. Sullivan, C.F. Blanford, Sources of activity loss in the fuel cell enzyme bilirubin oxidase, *Energy Environ. Sci.*, 6 (2013) 2460-2464.
- [288] A. Ciaccafava, C. Hamon, P. Infossi, V. Marchi, M.T. Giudici-Ortoni, E. Lojou, Light-induced reactivation of O₂-tolerant membrane-bound Ni-Fe hydrogenase from the hyperthermophilic bacterium *Aquifex aeolicus* under turnover conditions, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 15 (2013) 16463-16467.

Objectifs de la thèse

Suite à la publication des structures cristallographiques de plusieurs hydrogénases à [NiFe] tolérantes à l'O₂, ces biocatalyseurs potentiels des biopiles enzymatiques H₂-O₂ ont été très étudiés ces dernières années, notamment dans l'objectif de décrypter les mécanismes de leur résistance à l'O₂. En revanche, peu d'études de ces enzymes membranaires ont été réalisées pour décoder les paramètres qui gouvernent leur immobilisation à des interfaces nanostructurées, ainsi que les limitations qui peuvent découler de l'utilisation de ces interfaces. Or ces dernières se montreraient avantageuses dans l'optique du développement des biopiles enzymatiques, en permettant d'augmenter considérablement le nombre d'enzymes connectées à l'électrode et donc en principe les densités de courant.

Ma thèse fait suite au travail réalisé au laboratoire par Alexandre Ciaccafava, qui, après avoir mis au point une méthode permettant de discriminer l'orientation de l'enzyme sur des surfaces planes, avait établi un modèle d'orientation de l'hydrogénase d'*Aquifex aeolicus* sur les surfaces chargées ou hydrophobes. Ce modèle avait mis en évidence une limitation pour la connexion directe de l'enzyme sur les électrodes planes, liée à l'absence d'orientation préférentielle sur les surfaces hydrophiles, et à une orientation préférentielle défavorable sur les surfaces hydrophobes.

Néanmoins, ce modèle était établi à partir de l'immobilisation de l'enzyme sur des monocouches auto-assemblées de thiols (SAM), dont la structure en fonction de l'hydrophobicité pouvait influencer sur le signal électrochimique en dehors de toute orientation de l'enzyme. Mon travail avait donc dans un premier temps pour objectif de prouver l'orientation spécifique de l'hydrogénase sur d'autres surfaces que les SAMs, et de valider les résultats par une approche de modélisation. Il s'est agi ensuite de lever la limitation liée à la distribution d'orientations sur les électrodes planes, en recherchant le réseau conducteur tridimensionnel de porosité la plus adaptée à la fois à l'immobilisation stable de l'enzyme et au transport des gaz. Pour former ces réseaux, trois types de nanomatériaux ont été étudiés : les nanoparticules, les nanotubes et les nanofibres de carbone. En particulier, les propriétés structurales et surfaciques des nanofibres de carbone ont été caractérisées par différentes méthodes physico-chimiques (microscopie, isothermes d'adsorption de N₂ et d'H₂O, TPD-MS, électrochimie), pour rationaliser les interactions entre l'hydrogénase et le matériau. Il s'est ensuite agi de développer une bioanode performante dans l'objectif de la conception d'une biopile H₂-O₂. L'étude électrochimique de l'oxydation de l'H₂ par l'hydrogénase immobilisée dans des réseaux de nanofibres de carbone devait permettre de définir les paramètres optimaux de conception de la bioanode, et de mettre en évidence les limitations de ces réseaux nanostructurés pour l'immobilisation de l'hydrogénase.

Par ailleurs, les bilirubine oxydases, qui couplent dans la nature la réduction enzymatique de l'O₂ à l'oxydation de substrats organiques, sont de plus en plus étudiées en bioélectrochimie. Une grande partie de ces études repose sur l'immobilisation des enzymes dans des hydrogels redox, l'échange électronique entre l'enzyme et l'électrode étant réalisé via des complexes d'osmium. La

connexion directe de la bilirubine oxydase de *Bacillus pumilus* n'avait notamment jamais été réalisée. Il est de plus communément admis que ces enzymes sont peu sensibles aux ions chlorures, mais rares sont les études qui le décrivent rationnellement. Un deuxième objectif de ma thèse était de développer une biocathode active à haute température. Pour cela, l'immobilisation de l'enzyme dans des réseaux de nanofibres de carbone était une solution prometteuse pour réaliser la connexion directe de la bilirubine oxydase thermostable de *Bacillus pumilus*. L'efficacité de cette stratégie a été évaluée grâce à l'étude électrochimique de la réduction de l' O_2 . Mon objectif était aussi d'étudier l'influence des ions chlorures sur l'activité de la bilirubine oxydase par spectroscopie UV-vis et électrochimie. Le rôle du pH, de la température et du potentiel m'apparaissaient comme des paramètres essentiels à considérer.

Enfin, le dernier objectif de ma thèse était la réalisation d'une biopile H_2-O_2 capable d'opérer à haute température. Dans ce but, les deux bioélectrodes développées au cours de ma thèse devaient être associées. L'étude devait permettre à terme de trouver le meilleur compromis entre les conditions opératoires optimales des deux enzymes, pour une biopile H_2-O_2 performante.

Résultats et discussions :

Immobilisation de l'hydrogénase
d'Aquifex aeolicus et de la bilirubine
oxydase de *Bacillus pumilus* à des
interfaces carbonées nanostructurées
pour le développement d'une biopile
 H_2-O_2

A- Oxydation de l'hydrogène : Immobilisation de l'hydrogénase membranaire d'*Aquifex aeolicus* (Aa Hase 1)

I- Aa Hase 1, une hydrogénase membranaire : spécificités de l'orientation

Les hydrogénases tolérantes à l'O₂ ont la particularité d'être membranaires. L'immobilisation de ces hydrogénases à l'électrode est en conséquence régie par l'hélice hydrophobe neutre. Un modèle de l'immobilisation de l'Aa Hase 1 avait ainsi été proposé avant mon arrivée, grâce à l'étude du comportement de l'enzyme sur différentes SAMs.

En effet, l'immobilisation de l'Aa Hase 1 à une électrode permet d'observer de façon différenciée les processus de TED et de TEM, en fonction du support et du médiateur. Les électrons sont cédés à l'électrode via le centre [4Fe-4S] distal, le relais électronique le plus éloigné du site actif et le plus proche de la surface de l'enzyme. Lorsque ce centre [FeS] est à une distance de l'électrode inférieure à la distance tunnel, les électrons sont cédés directement à l'électrode. Lorsqu'au contraire ce centre [FeS] est à une distance de l'électrode supérieure à la distance tunnel, les électrons ne peuvent être cédés à l'électrode que par l'intermédiaire d'une substance redox qui joue le rôle de navette électronique entre l'enzyme et l'électrode : un courant apparaît au potentiel du médiateur redox. L'utilisation d'un médiateur redox adéquat permet donc de discriminer grâce à l'électrochimie l'orientation de l'hydrogénase.

Cette étude avait permis de proposer un modèle de l'orientation de l'hydrogénase sur différentes surfaces fonctionnalisées. Cette orientation peut être expliquée par la présence de détergent neutre, utilisé au cours de la purification de l'hydrogénase, qui entoure l'hélice transmembranaire hydrophobe. Le détergent portant une tête hydrophile et une queue hydrophobe, une zone hydrophile se crée au niveau de l'hélice transmembranaire, elle-même située à proximité du centre [FeS] distal. Il s'ensuit une répulsion entre cette zone hydrophile et la surface hydrophobe, poussant l'hydrogénase à s'orienter préférentiellement de façon défavorable au TED [1]. En revanche, même pour une surface très hydrophile on observe à la fois du TED et du TEM, l'hydrogénase n'adopte donc pas d'orientation préférentielle.

Néanmoins, l'utilisation des SAMs pour la fonctionnalisation de la surface est limitée par l'instabilité des SAMs dans nos conditions réductrices (potentiel réducteur et présence d'H₂) et à haute

température (on travaille en général à 60 °C). J'ai donc cherché à valider ce modèle par l'étude de l'orientation de l'*Aa* Hase 1 sur d'autres surfaces et grâce à d'autres méthodes.

I-1- Orientation sur électrode d'oxyde d'indium et d'étain (ITO) (Collaboration R. Gadiou, IS2M, Mulhouse)

Les électrodes d'ITO sont constituées d'une plaque de silice (SiO_2) dont une face est revêtue d'une couche fine d'oxyde d'indium et d'étain (ITO). Il s'agit d'une solution solide transparente et incolore d'oxyde d'indium (In_2O_3) et d'oxyde d'étain (SnO_2), typiquement 90% In_2O_3 / 10% SnO_2 en masse. Une face de l'électrode est donc totalement isolante, la seconde montre une résistance de 8 à 12 $\Omega\cdot\text{cm}^{-1}$. Cet oxyde conducteur possède les avantages de la transparence, d'une grande conductivité électrique, d'une porosité homogène, d'une forme et d'une épaisseur ajustables. Il est naturellement très hydrophobe, mais peut subir des traitements chimiques ou thermiques qui améliorent son hydrophilicité [2]. C'est donc un matériau approprié pour valider le modèle d'orientation de l'hydrogénase.

Le mouillage de la surface d'un solide par une goutte de liquide, quantifié par l'angle de contact appelé θ sur la figure 1, résulte de l'équilibre entre les tensions de surface solide-vapeur γ_{sv} , solide-liquide γ_{sl} et liquide-vapeur γ_{lv} . Il donne une mesure de l'hydrophilicité de la surface. Pour un matériau hydrophile, le mouillage par une goutte d'eau est total (θ faible), pour un matériau hydrophobe, le mouillage est faible (θ élevé). Au cours de ce travail, l'électrode d'ITO subit des traitements thermique ou chimique afin de moduler son hydrophilicité, qui est ensuite évaluée par mesure de l'angle de contact (Figure 1 A, Tableau 1).

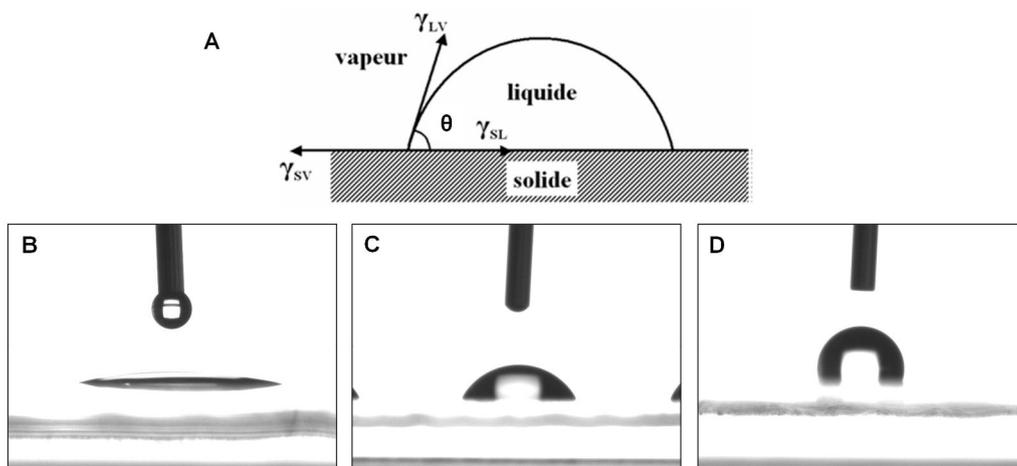


Figure 1- A : Représentation schématique de l'angle de contact lors de l'équilibre d'une goutte de liquide à la surface d'un solide (adapté de [3]) B, C, D : Mesures d'angles de contact sur ITO traité ou non. B : Mouillage total sur ITO traité à 500°C (matériau hydrophile) ; C : mouillage partiel sur ITO traité par EtOH/KOH/H₂O ; D : mouillage faible sur ITO non traité (matériau hydrophobe).

Traitement de l'électrode d'ITO	Angle mesuré (degrés)	
	immédiatement	après 24h à l'air
non traité	116.5 ± 2.43	
traitement solvants	52.3 ± 8.24	61.8 ± 5.16
traitement thermique	16.2 ± 0.82	28.4 ± 14.14

Tableau 1- Mesure de l'angle de contact d'une goutte d'eau déposée sur l'ITO non traité, sur l'ITO après traitement par des solvants (10 minutes dans l'éthanol pur, puis 10 minutes dans KOH 1 M, puis 10 minutes dans l'eau distillée), et sur l'ITO après traitement thermique (1 heure à T=500°C). Les mesures sont effectuées immédiatement après le traitement (après refroidissement) ; et après 24 heures d'exposition à l'air.

Le matériau, au départ très hydrophobe, est donc rendu plus hydrophile par le traitement dans les solvants (10 minutes dans l'éthanol pur, puis 10 minutes dans KOH 1 M, puis 10 minutes dans l'eau distillée), et très hydrophile par le traitement thermique (1 heure à T=500°C). Une exposition à l'air tend néanmoins à augmenter l'angle de contact (Tableau 1). Pour éviter cette évolution des propriétés de surface, les électrodes d'ITO sont conservées sous atmosphère d'argon immédiatement après le traitement. L'hydrogénase est alors déposée sur des électrodes et l'oxydation de H₂ est enregistrée en voltammétrie cyclique en l'absence de médiateur redox (TED) ou en présence d'un médiateur (TEM), le bleu de méthylène (BM) (Figure 2). Le tableau 2 recense la part du TED dans le courant total (somme du TED et du TEM).

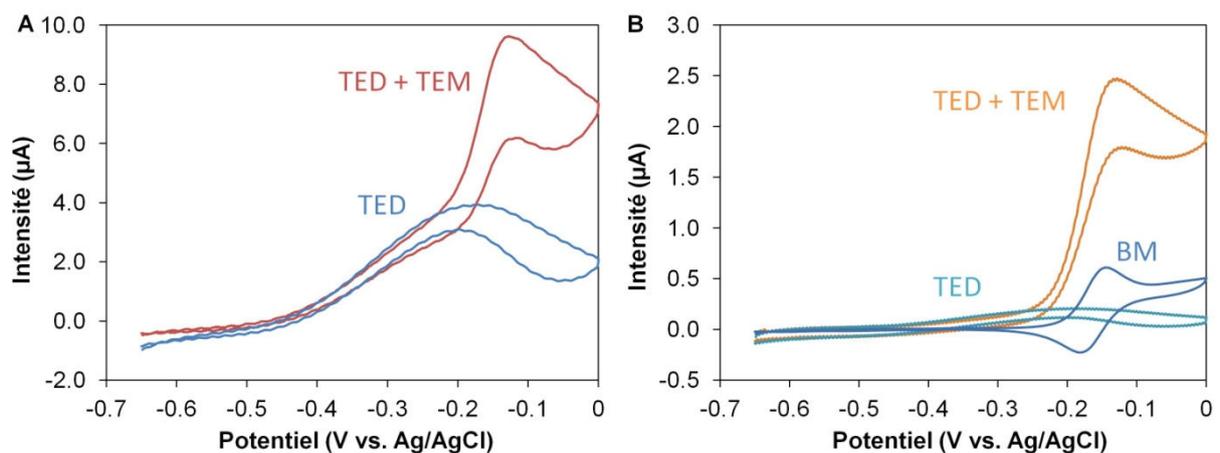


Figure 2 - Voltammétrie cyclique de l'oxydation du H₂ par l'Aa Hase 1 adsorbée sur une électrode d'ITO dans un électrolyte saturé en H₂. A : ITO traité par les solvants sans BM (courbe bleue) et en présence de 10 µM de BM (courbe rouge). B : ITO non traité sans BM (courbe turquoise) et en présence de 10 µM de BM (courbe orange). Le BM seul est représenté en bleu. Expériences de voltammétrie cyclique réalisées dans du tampon Hepes 50 mM pH 6,8 ; T= 60°C ; ω=0 rpm ; gaz en surpression au dessus de l'électrolyte ; v= 5 mV.s⁻¹

La proportion de TED augmente avec l'hydrophilicité de la surface de l'électrode, en accord avec ce qui est observé lorsque l'Aa Hase 1 est immobilisée sur des SAMs hydrophobes ou hydrophiles. En particulier, on remarque la quasi absence de TED pour une surface très hydrophobe : une orientation préférentielle de l'hydrogénase, portant le Fe-S distal loin de la surface de l'électrode,

est adoptée. Le modèle proposé sur les SAMs est donc validé sur ITO. Ce résultat est important car il lève certaines ambiguïtés quant à la stabilité des SAMs dans nos conditions d'étude, ou encore quant à la différence de compacité entre les SAMs chargées ou les SAMs hydrophobes.

Traitement de l'électrode d'ITO	Proportion de TED (%)
non traité	3
traitement solvants	45
traitement thermique	58

Tableau 2- Proportion du TED ($100 \times \text{TED} / (\text{TED} + \text{TEM})$) obtenu en voltammétrie cyclique d'oxydation du H_2 par l'hydrogénase *Aa Hase 1* immobilisée sur des électrodes d'ITO en fonction du traitement de surface subi par l'électrode.

I-2- Une distribution d'orientations sur les surfaces chargées expliquée par un moment dipolaire faible et fluctuant (Collaboration M. Baaden et S. Sacquin-Mora, IBPC, Paris)

Comme mentionné ci-dessus, l'hydrogénase n'adopte pas d'orientation préférentielle lorsqu'elle est immobilisée à une interface hydrophile. Cette observation est également vérifiée lorsque l'*Aa Hase 1* est immobilisée sur des SAMs hydrophiles, qu'elles soient neutres, chargées positivement ou chargées négativement [1], bien qu'une proportion $\text{TED}/(\text{TED} + \text{TEM})$ légèrement supérieure soit observée pour les SAMs chargées positivement [1]. Ce résultat contraste en revanche avec des expériences menées auparavant au laboratoire, qui montraient les orientations préférentielles adoptées par l'hydrogénase soluble sensible à l' O_2 de *Desulfovibrio fructosovorans* (*Df Hase*) [4-5]. Sur des SAMs positives, du TED était quasi exclusivement observé ; sur des SAMs négatives du TEM était quasi exclusivement observé. Ce résultat suggérait que dans le premier cas le centre [FeS] distal était positionné préférentiellement vers l'électrode, et que dans le second cas ce même centre [FeS] était préférentiellement éloigné de l'électrode. Nous avons cherché à rationaliser ce phénomène en étudiant les caractéristiques de charges des deux hydrogénases par des calculs de dynamique moléculaire.

Tout d'abord, le potentiel électrostatique des deux molécules est évalué, révélant 5 zones négatives de faibles dimensions réparties régulièrement pour l'*Aa Hase 1*, et 2 grandes zones négatives pour la *Df Hase*, dont l'une est située autour du FeS distal (Figure 3). Il a déjà été prouvé que cette zone, présente de façon générale chez les hydrogénases sensibles, était responsable de l'association avec le partenaire physiologique et promouvait une orientation favorable au TED [6]. Des interactions électrostatiques peuvent donc expliquer l'orientation favorable de la *Df Hase* sur les surfaces chargées positivement. L'absence de cette zone négative autour du centre [FeS] distal chez l'*Aa Hase 1* peut également expliquer que cette orientation ne soit pas préférentiellement adoptée sur une interface

positive. De façon similaire, l'absence de zone positive autour du centre [FeS] distal peut également expliquer que cette orientation ne soit pas préférentiellement adoptée sur une interface positive.

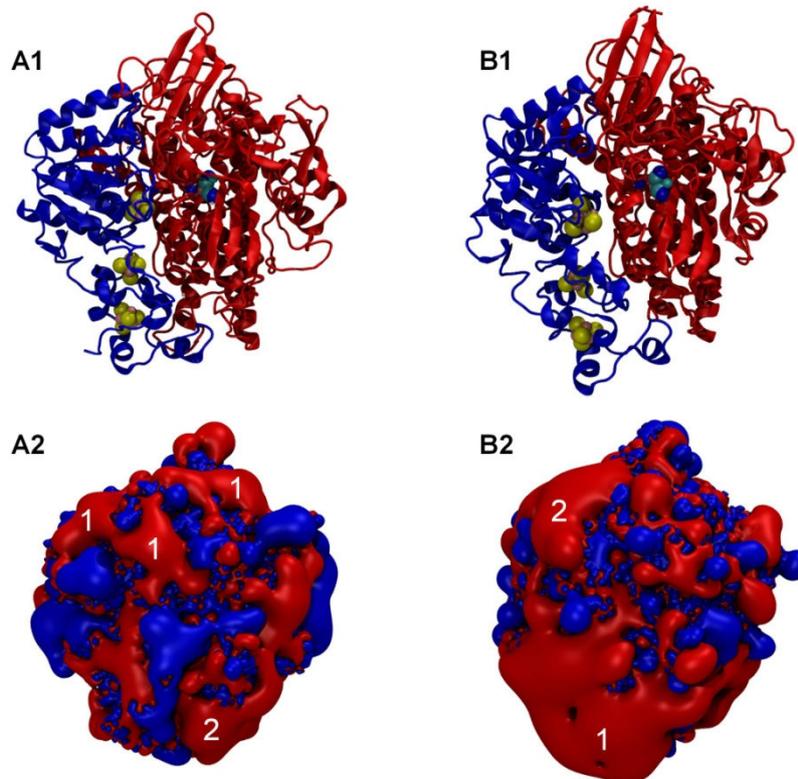


Figure 3- Caractéristiques de l'Aa Hase 1 (A) et de la Df Hase (B). A1 et B1 : Structures respectives de l'Aa Hase 1 (A1) et de la Df Hase (B1) indiquant la position des centres métalliques. La petite sous-unité est indiquée en bleu, la grande sous-unité est indiquée en rouge. Les centres métalliques sont indiqués par des sphères. A2 et B2 : Potentiels électrostatiques de surface à 2 kilo Teslas respectivement pour l'Aa Hase 1 (A2) et pour la Df Hase (B2). La couleur rouge indique les zones négatives, on distingue 2 des 5 zones pour l'Aa Hase 1, numérotées 1 et 2, et les deux zones négatives de la Df Hase, numérotées également 1 et 2. La couleur bleue indique les zones positives.

L'évolution du moment dipolaire au cours du temps, en termes de valeur et de direction, est ensuite étudiée pendant des simulations longues (2 μ s). La direction du moment dipolaire est caractérisée par les angles θ et φ (Figure 4). Un ion magnésium Mg^{2+} , dont le rôle exact n'est pas déterminé, est présent dans le domaine C-terminal des hydrogénases à [NiFe], à une distance approximative de 13 Å du site actif [7]. Une valeur de φ égale à 0° correspond à une orientation du dipôle vers l'ion Mg^{2+} , une valeur de θ égale à 0° correspond à une orientation du dipôle vers l'opposé du centre Fe-S distal.

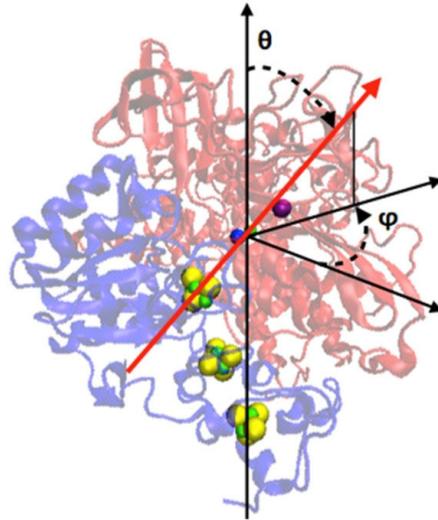


Figure 4 - Système de référence pour les coordonnées θ et ϕ du moment dipolaire de l'hydrogénase représenté par la flèche rouge.

Le comportement du moment dipolaire des deux protéines est très différent. La *Df* Hase présente un fort moment dipolaire dont l'intensité élevée (≈ 1200 Debye) varie peu au cours du temps (Figure 5), et dont la direction est caractérisée par un couple (θ, ϕ) dont les valeurs oscillent faiblement autour de $(45^\circ, 120^\circ)$ (Figure 6). En revanche l'*Aa* Hase 1 présente un faible moment dipolaire dont l'intensité (≈ 200 Debye) varie peu (Figure 5), mais dont la direction fluctue largement (Figure 6).

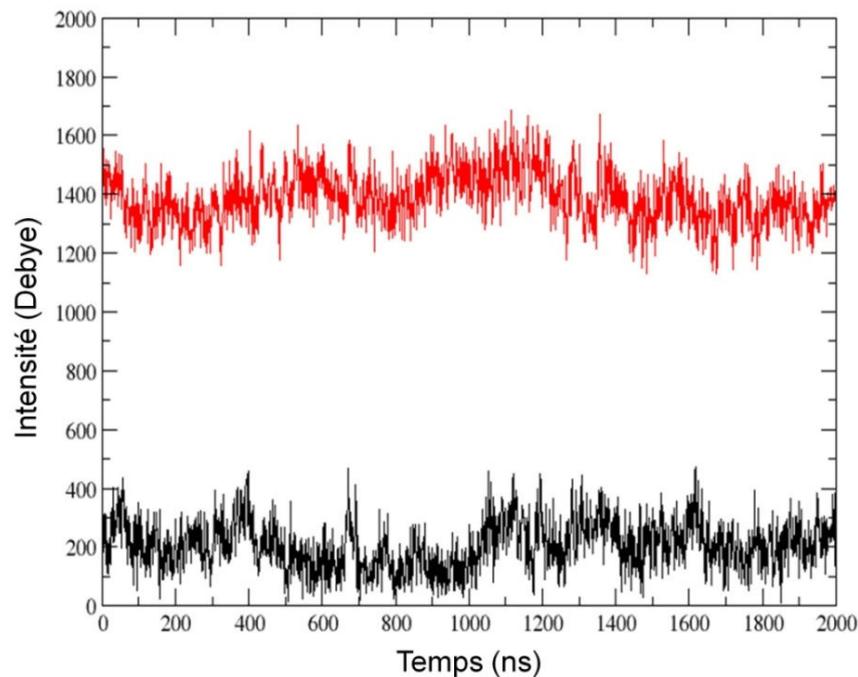


Figure 5- Evolution de l'intensité du moment dipolaire en fonction du temps pour la *Df* Hase (ligne rouge) et pour l'*Aa* Hase 1 (ligne noire).

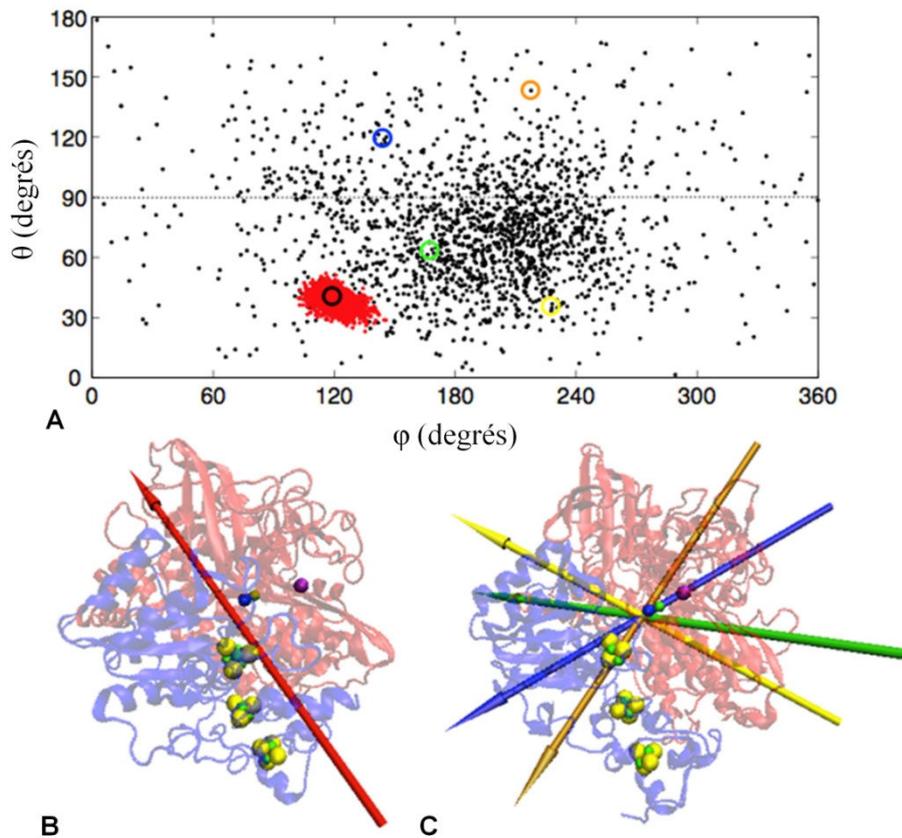


Figure 6 – A : Distribution d'orientations du moment dipolaire adoptées pendant les trajectoires pour l'*Aa* Hase 1 (points noirs) et pour la *Df* Hase (points rouges). B : Aperçu représentatif du moment dipolaire de la *Df* Hase correspondant au cercle noir sur le graphique A. C : Aperçus représentatifs du moment dipolaire de l'*Aa* Hase 1 correspondant aux cercles jaune, vert, bleu et orange sur le graphique A.

La valeur du couple (θ , ϕ) du moment dipolaire de la *Df* Hase correspond à l'orientation adoptée sur la figure 6 B, qui favorise le positionnement du centre [FeS] distal sur les surfaces positives, de façon cohérente avec les observations faites en électrochimie des hydrogénases immobilisées sur les SAMs. La fluctuation des valeurs du couple (θ , ϕ) du moment dipolaire de l'*Aa* Hase est quant à elle cohérente avec l'absence d'orientation préférentielle faite en électrochimie avec les SAMs chargées. Cependant, on constate que l'angle θ varie essentiellement dans l'intervalle $[0^\circ ; 90^\circ]$, suggérant une orientation légèrement plus favorable au DET sur les surfaces chargées positivement. Ce résultat est lui-aussi cohérent avec les mesures électrochimiques réalisées sur les SAMs [1] et sur les polymères [8].

Dans l'introduction, nous avons montré que l'hélice transmembranaire hydrophobe jouait un rôle essentiel dans l'orientation de l'hydrogénase sur les surfaces hydrophobes [1]. En revanche son rôle dans l'orientation sur les surfaces hydrophiles n'apparaît a priori pas prépondérant. Les calculs de dynamique moléculaire présentés ont été réalisés en omettant l'hélice. La charge nette de l'hélice est

+3, et sa distribution quasiment uniforme, il est donc improbable que le dipôle résultant perturbe le moment dipolaire global de la protéine. On cherche cependant à vérifier l'influence de l'hélice sur le moment dipolaire. Un modèle entier de l'Aa Hase 1 est construit en utilisant la structure du cytochrome d'*Escherichia coli* comme modèle de l'hélice transmembranaire. On suppose que l'hélice peut adopter différentes conformations en solution. Deux conformations sont donc générées : dans la première, l'hélice est orientée vers la grande sous-unité (Figure 7 A). Dans la seconde, l'hélice est orientée vers la petite sous-unité (Figure 7 B). Le moment dipolaire global de l'hydrogénase n'est que peu altéré par l'ajout de l'hélice (Figure 7 A et B).

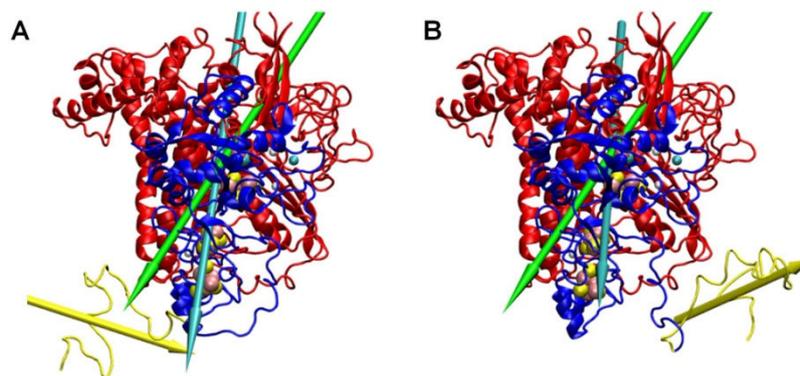


Figure 7 – Evolution du moment dipolaire de l'Aa Hase 1 en fonction de l'orientation de l'hélice. Les flèches représentent les moments dipolaires de l'hélice (flèche jaune), de la partie soluble (flèche verte) et de la protéine entière (flèche bleue). L'hélice est orientée vers la grande sous-unité (A) ou vers la petite sous-unité (B).

Bien que l'hélice soit proche du centre [FeS] distal, une région non-structurée longue de 20 acides aminés connecte l'hélice au domaine soluble. Cette boucle flexible permet vraisemblablement à l'hélice de se déplacer librement en solution, ce qui évite la répulsion stérique entre le centre [FeS] distal et la surface de l'électrode, et permet d'observer le TED avec les électrodes dont la surface est hydrophile.

II- Immobilisation de l'Aa Hase 1 à l'électrode nanostructurée : les nanoparticules (CNPs) et nanotubes de carbone (CNTs)

Dans le but d'améliorer l'efficacité du TED en levant la limitation due à l'absence d'orientation préférentielle sur une électrode plane, l'Aa Hase 1 est par la suite immobilisée à des électrodes dont la surface est modifiée par des nanoparticules qui forment des réseaux tridimensionnels et structurent l'électrode. On espère en effet qu'en immobilisant l'enzyme dans des pores de taille adaptée, tout point de la surface de l'enzyme sera suffisamment proche de l'électrode

pour permettre le TED. Dans un second temps, on cherche à augmenter le nombre d'enzymes connectées à l'électrode et les densités surfaciques de courant. Plusieurs types de matériaux carbonés vont être étudiés (les nanoparticules et les nanotubes de carbone, puis les nanofibres de carbone qui feront l'objet d'un chapitre particulier), afin de moduler les propriétés électriques, la chimie de surface et la porosité.

II- 1- Nanoparticules de carbone (Collaboration M. Opallo, Institut of Physical Chemistry, Varsovie, Poland)

Les nanoparticules de carbone (CNPs), ou noir de carbone, présentent les divers avantages des nanomatériaux carbonés : une grande surface développée, une bonne conductivité, la présence de nombreux sites réactifs. Elles peuvent être obtenues par exemple par pyrolyse en phase vapeur d'hydrocarbures [9]. Les nanoparticules utilisées ici ont un diamètre d'environ 8 nm, et sont rendues hydrophiles grâce à des fonctions phénylesulfonées positives (Figure 8 A) ou négatives (Figure 8 B). On notera CNPs(+) les CNPs portant les fonctions positives, et CNPs(-) les CNPs portant les fonctions négatives.

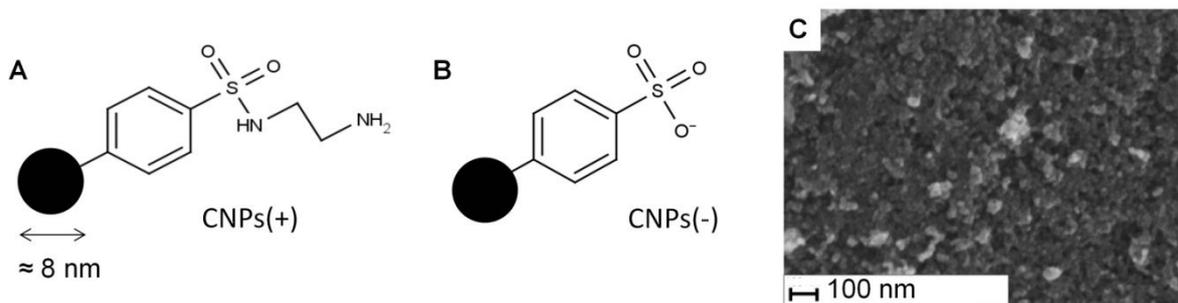


Figure 8- A : Représentation schématique des nanoparticules fonctionnalisées positivement (l'échelle n'est pas respectée) ; B : Représentation schématique des nanoparticules fonctionnalisées négativement (l'échelle n'est pas respectée) ; C : image MEB de l'électrode d'ITO recouverte par trois couches de CNP(+)/CNP(-) (reproduit de [10])

Le but de cette étude était à l'origine de transposer le modèle d'orientation sur des surfaces chargées positivement ou négativement au cas des réseaux tridimensionnels formés de nanoparticules chargées. Malheureusement, des problèmes de stabilité dans certaines configurations ne permettent d'étudier le réseau de nanoparticules que dans une configuration unique.

II-1-a- Préparation de l'électrode couche par couche

L'électrode est préparée par immersions rapides d'une lame d'ITO, rendue hydrophile par traitement thermique, dans les suspensions de nanoparticules. On définit une couche comme deux immersions successives, d'abord dans la suspension de CNPs(+), puis dans la suspension de CNPs(-).

On a donc toujours des CNPs(-) en surface de l'électrode. L'*Aa* Hase 1 est ensuite déposée sur ce film (Figure 9).

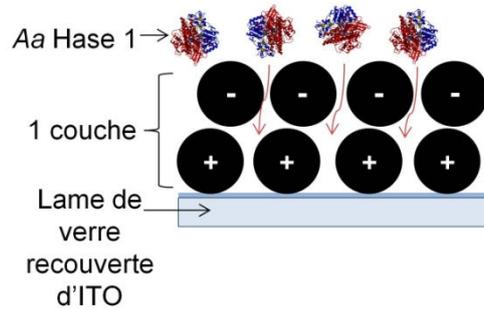


Figure 9 – Schéma explicatif de la construction de la bioélectrode

Un essai préliminaire est réalisé en omettant la dernière immersion dans les CNPs (-) de telle sorte que les CNPs(+) soient en surface. Le film se détache systématiquement : la disproportion des charges dans ce cas ne permet probablement pas de stabilisation. En utilisant ce protocole, il n'est donc pas possible d'étudier l'influence de la charge des CNPs sur l'immobilisation de l'hydrogénase, comme prévu initialement.

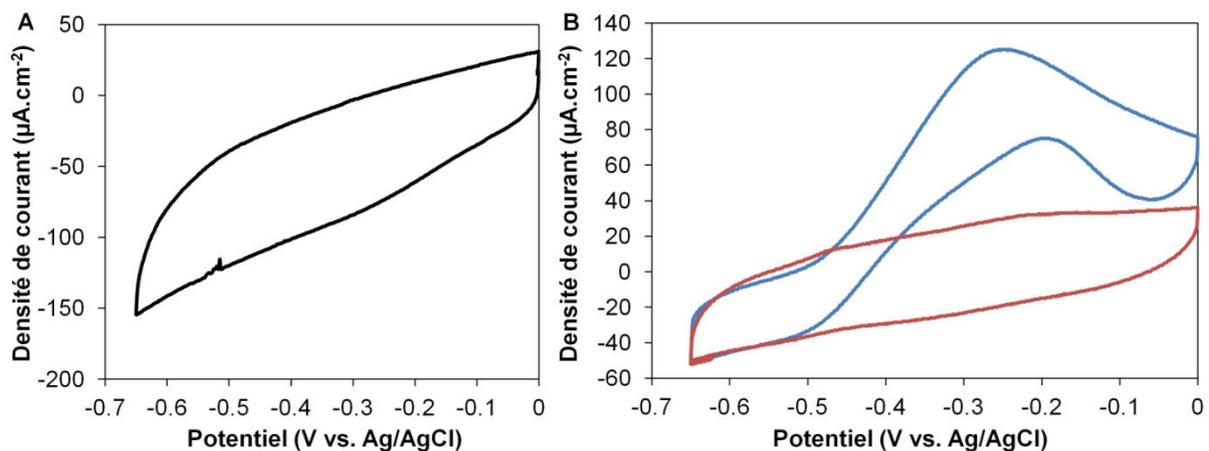


Figure 10- Voltammogrammes obtenus avec une électrode formée de trois couches de CNPs. A : sans hydrogénase, électrolyte saturé en H_2 ; B : avec hydrogénase, électrolyte saturé en H_2 (courbe bleue) et en N_2 (courbe rouge). Tampon Hepes 50 mM pH 6,8 ; $T=60^\circ C$; $\omega=0$ rpm ; gaz en surpression au dessus de l'électrolyte ; $v=5$ mV.s⁻¹

L'oxydation de l' H_2 n'est pas observée en l'absence d'hydrogénase (Figure 10 A). Lorsque l'*Aa* Hase 1 est adsorbée sur l'électrode, l'oxydation de l' H_2 a bien lieu en TED en l'absence de médiateur, et le voltammogramme présente la forme typique de l'oxydation de l' H_2 par les hydrogénases à [NiFe]. On observe en particulier le pic correspondant à l'inactivation à haut potentiel lors du balayage anodique et à la réactivation à potentiels réducteurs lors du balayage cathodique (Figure 10 B). La structure de l'électrode était déjà connue pour empêcher l'agrégation des enzymes

comme la bilirubine oxydase [10] ou la glucose oxydase [11]. Elle fournit donc également un environnement propice à l'adsorption de l'Aa Hase 1 dans une configuration favorable au TED.

II-1-b- Optimisation des paramètres

L'évolution des densités de courant capacitif et catalytique est ensuite étudiée en fonction du nombre de couches de CNPs formée à l'électrode. Dans une étude antérieure, la caractérisation du film de CNPs par AFM avait montré que l'épaisseur du film augmentait linéairement avec le nombre de couches. L'augmentation mesurée était d'environ 30 nm par couche, soit plus de la somme des diamètres de deux nanoparticules (16 nm) [11]. Une immersion dans la suspension de nanoparticules ne conduit donc pas à une monocouche de CNPs, mais plutôt à des agrégations de CNPs.

On constate que le courant capacitif, proportionnel à la surface développée de l'électrode à une vitesse de balayage donnée, augmente avec le nombre de couches de CNPs (Figure 11). Par ailleurs le courant catalytique augmente lui aussi (Figure 11), ce qui prouve que l'hydrogénase et son substrat parviennent à pénétrer dans le réseau formé par les nanoparticules. La surface accessible à l'enzyme augmente donc également.

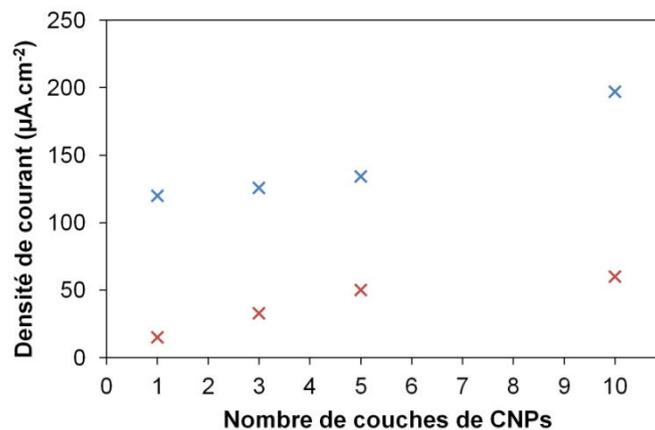


Figure 11- Evolution des densités de courant capacitif (croix rouges) et de courant de catalyse d'oxydation de l' H_2 par l'hydrogénase (croix bleues) en fonction du nombre de couches de CNPs déposées à l'électrode. Le courant capacitif est mesuré sur les voltammogrammes d'oxydation de H_2 par l'hydrogénase à $-0,6 V$ vs. Ag/AgCl, le courant catalytique est mesuré sur les mêmes voltammogrammes à $-0,2 V$ vs. Ag/AgCl. Expériences de voltammétrie cyclique réalisées dans du tampon Hepes 50 mM pH 6,8 ; $T=60^\circ C$; $\omega=0$ rpm ; gaz en surpression au dessus de l'électrolyte ; $v= 5 mV.s^{-1}$

Afin d'obtenir une meilleure répartition de l'enzyme dans le film de CNPs, des essais ont été réalisés en intercalant des couches de CNPs et d'hydrogénase. Un dépôt de CNPs sur l'ITO est suivi de l'adsorption de l'Aa Hase 1, cette procédure est répétée deux fois. Le rapport entre le courant catalytique et le courant capacitif est très faible. On suppose donc que ce protocole ne permet pas

l'optimisation de l'occupation de la surface électroactive de l'électrode, ou que les couches d'hydrogénase jouent un rôle d'isolant électrique entre les couches de CNPs.

La stabilité de la bioélectrode est évaluée par des cycles consécutifs de voltammétrie. Le courant de catalyse, mesuré au pic d'oxydation du H_2 , décroît de 17 % en 10 cycles pour une électrode formée d'une couche de CNPs et de 7,5% en 20 cycles pour une électrode formée de 3 couches de CNPs. L'augmentation du nombre de couches, et donc de la densité de charges à l'électrode, assurerait une multiplication des interactions électrostatiques entre l'hydrogénase et l'électrode, et une stabilisation de l'hydrogénase. Pour les électrodes formées de 10 couches de CNPs, un détachement du film ou des fissurations sont cependant observées après les expériences, très probablement à cause de l'instabilité du film épais à haute température. Les expériences suivantes sont donc réalisées avec des nombres de couches inférieurs.

Les expériences de voltammétrie cyclique réalisées en présence de KCl montrent une diminution du pic d'oxydation avec l'augmentation de la concentration de KCl (Figure 12). L'hydrogénase n'étant pas inhibée par le KCl, cette diminution peut être attribuée à un relargage de l'enzyme de l'électrode. Cette déstabilisation, consécutive à l'augmentation de la force ionique, tend à confirmer la nature électrostatique des interactions entre l'hydrogénase et les CNPs qui constituent l'électrode.

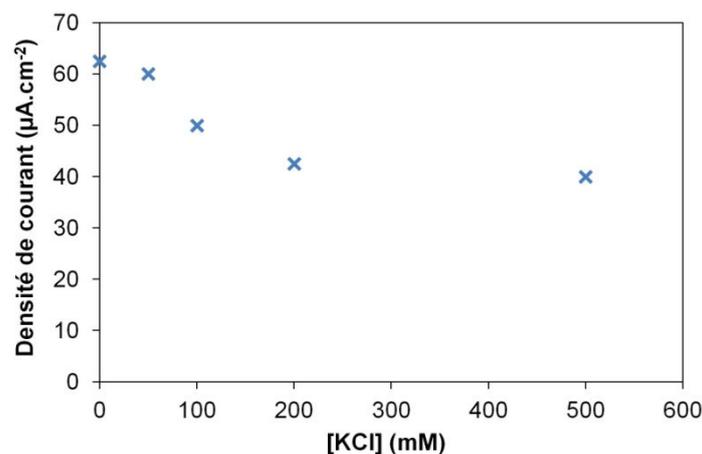


Figure 12- Influence de la force ionique sur le courant catalytique d'oxydation de l' H_2 par l'hydrogénase adsorbée sur 1 couche de CNPs. Les valeurs du courant catalytique correspondent aux valeurs mesurées sur les voltammogrammes à -0,2 V vs. Ag/AgCl. Expériences de voltammétrie cyclique réalisées dans du tampon Hepes 50 mM pH 6,8 ; $T=60^\circ C$; $\omega=0$ rpm ; gaz en surpression au dessus de l'électrolyte ; $v=5$ mV.s⁻¹

L'hydrogénase immobilisée sur les CNPs se montre active pour l'oxydation du H_2 sur une large gamme de températures (Figure 13). Le courant augmente avec la température de façon cohérente avec l'augmentation de l'activité de l'hydrogénase avec la température. Cette propriété de thermostabilité est donc conservée après immobilisation sur les couches de CNPs.

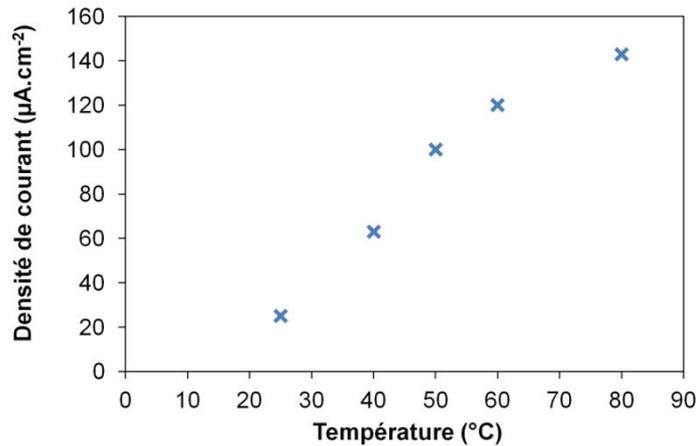


Figure 13 - Evolution en fonction de la température du courant catalytique d'oxydation de l'H₂ par l'hydrogénase adsorbée sur 3 couches de CNPs déposées à l'électrode. Les valeurs du courant catalytique correspondent aux valeurs mesurées sur les voltammogrammes à -0,2 V vs. Ag/AgCl. Expériences de voltammétrie cyclique réalisées dans du tampon Hepes 50 mM ; pH 6,8 ; $\omega=0$ rpm ; gaz en surpression au dessus de l'électrolyte ; $v=5$ mV.s⁻¹

Pour augmenter la stabilité de l'immobilisation de l'enzyme à l'électrode on réalise l'encapsulation de l'hydrogénase dans une matrice composite silice/CNPs(-), les CNPs assurant la formation du réseau tridimensionnel conducteur. Des matrices de silice hydrophobes sont élaborées par procédé sol-gel à partir de deux types de précurseurs alcooxysilanes: l'octyltriéthoxysilane (OTEOS), et le méthyltriméthoxysilane (MTMOS). Lorsque l'Aa Hase 1 est adsorbée sur l'électrode CNPs/OTEOS, l'oxydation de l'H₂ a bien lieu en TED en l'absence de médiateur, et le voltammogramme présente la forme typique de l'oxydation du H₂ par les hydrogénases à [Ni-Fe]. En revanche, aucun TED n'est observé lorsque l'Aa Hase 1 est adsorbée sur l'électrode CNPs/MTMOS. La stabilité est évaluée en voltammétrie cyclique sur 5 cycles. On enregistre une perte de $11,6 \pm 8,8\%$ du courant de pic. L'encapsulation dans le sol-gel ne stabilise donc pas l'immobilisation de l'enzyme à l'électrode.

II-1-c- Conclusion

Les nanoparticules de carbone constituent donc un premier pas vers la nanostructuration de l'électrode. L'oxydation de l'H₂ par l'Aa Hase 1 adsorbée dans le réseau de CNPs est observée en TED, et l'hydrogénase conserve sa propriété fondamentale d'hyperthermophilie. On constate l'augmentation des courants de catalyse avec la quantité de CNPs déposées à l'électrode. Néanmoins, ce phénomène est limité par des problèmes de stabilité mécanique des couches de CNPs pour les plus grandes épaisseurs. Des problèmes de stabilité mécanique empêchent également d'étudier indépendamment une interface positive ou négative. Enfin, l'encapsulation dans un sol gel de silice permet d'observer la catalyse par l'hydrogénase, mais aucune stabilisation n'est apportée.

II-2- Nanotubes de carbone (CNTs)

Avant mon arrivée au laboratoire, les CNTs avaient déjà été utilisés pour l'oxydation enzymatique de l' H_2 par les hydrogénases de *D. fructosovorans* et *A. aeolicus* [4-5]. En particulier, l'immobilisation de l'*Aa* Hase 1 dans des réseaux de SW-CNTs commerciaux carboxylés et de SW-CNTs purifiés et coupés au laboratoire par traitement acide conduisait à des multiplications respectivement par 4 et par 10 des densités de courant catalytiques d'oxydation de H_2 par rapport aux intensités obtenues lorsque l'hydrogénase était immobilisée sur PG [5]. L'intensité du courant catalytique i_k augmentait proportionnellement à la quantité de CNTs pour les plus faibles masses de CNTs déposés à l'électrode, puis atteignait un plateau, alors que la surface développée, mesurée à l'aide d'une sonde redox, continuait d'augmenter. Lorsque l'hydrogénase était mélangée avec les CNTs avant dépôt sur électrode, une stabilisation du signal sur quelques heures était observée. Cependant, les intensités enregistrées étaient plus faibles que lorsque l'adsorption de l'hydrogénase était réalisée après la formation du film de CNTs sur l'électrode. De plus, le signal adoptait une forme inhabituelle, caractérisée par l'apparition d'un plateau de courant sur l'intervalle de potentiel compris entre $E = -450$ mV et $E = 0$ mV. Aucune explication n'avait pu être donnée à ces phénomènes. Dans l'objectif de préciser les interactions entre l'*Aa* Hase 1 et les CNTs, et d'en déterminer les limitations, il est donc nécessaire de réexaminer l'oxydation de l' H_2 par l'hydrogénase immobilisée sur les CNTs.

II-2-a- Propriétés structurales des différents CNTs

On dispose au laboratoire de différents types de CNTs commerciaux : les nanotubes de carbone mono-paroi (SW-CNTs), les nanotubes de carbone multi-parois (MW-CNTs) et les nanotubes de carbone multi-parois fonctionnalisés par des groupements carboxyles (MW-CNTs-COOH). Les nanotubes de carbone mono-paroi fonctionnalisés par des groupements carboxyles (SW-CNTs-COOH) sont obtenus au laboratoire par traitement acide des SW-CNTs (cf. Matériel et méthodes). Le tableau 3 recense les propriétés structurales des différents CNTs.

	<i>SW-CNTs</i>	<i>SW-CNTs-COOH</i>	<i>MW-CNTs</i>	<i>MW-CNTs-COOH</i>
<i>Synthèse</i>	<i>CVD</i>	<i>CVD</i>	<i>CVD</i>	<i>CVD</i>
<i>Diamètre interne</i>	\emptyset	\emptyset	3-10 nm	\emptyset
<i>Diamètre externe</i>	1-2 nm	1-2 nm	10-30 nm	10 nm
<i>Longueur</i>	0,5-2 μ m	50 nm [4]	1-10 μ m	1,5 μ m
<i>Contenu en carbone</i>	> 90 %	\emptyset	> 90 %	> 95 %

Tableau 3 – Propriétés structurales et composition des différents nanotubes de carbone.

La figure 14 présente des observations au MET des SW-CNTs et des SW-CNTs-COOH. On distingue les particules de catalyseur, et des filaments de carbone assemblés en pelote avant le traitement acide (Figure 14 A) et en faisceau après le traitement acide (Figure 14 D). Les plus forts grossissements permettent de distinguer la paroi d'un nanotube (Figure 14 B).

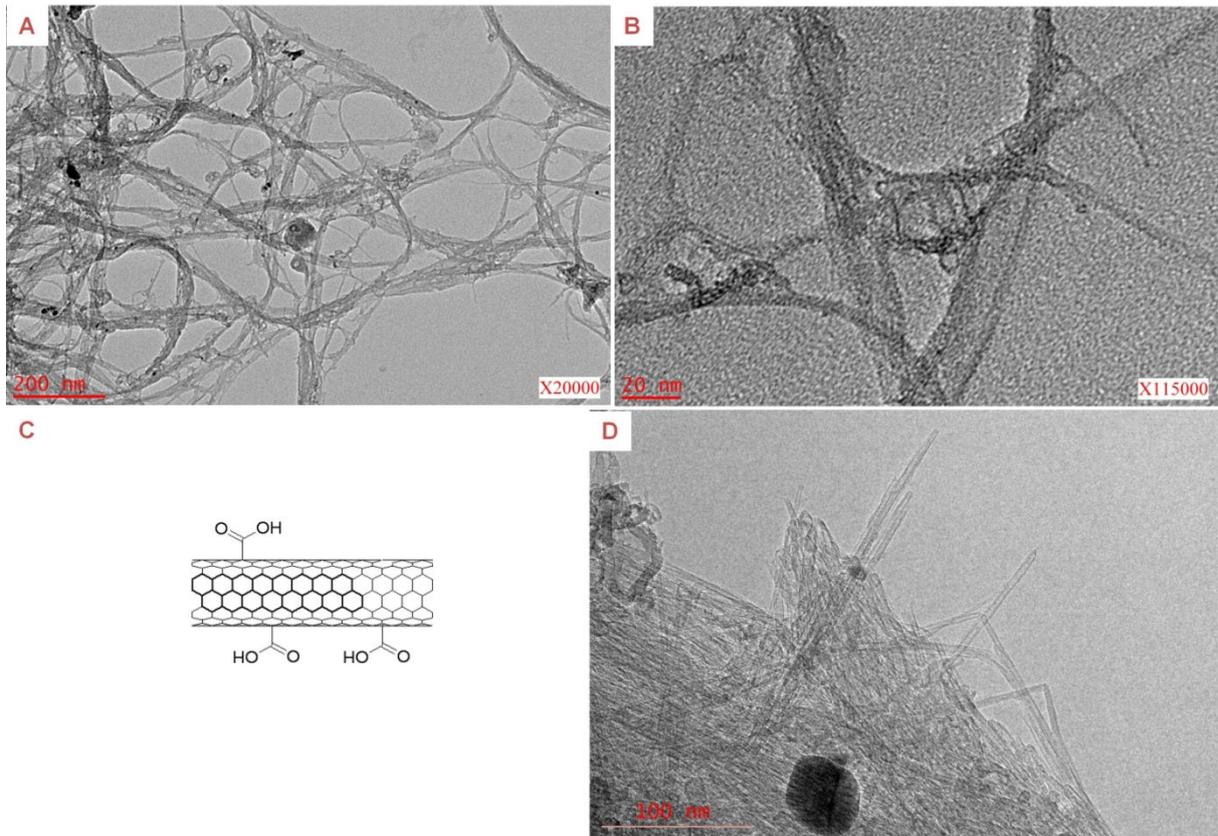


Figure 14- Observations MET des SW-CNTs. A et B : SW-CNTs non modifiés à différents grossissements. C : représentation schématique d'un SW-CNT modifié par traitement acide ; D : image MET de SW-CNTs-COOH. Les échelles sont indiquées en rouge, et les grossissements en rouge dans des cadres blancs.

II-2-b- Caractérisation du film de SW-CNTs-COOH formé à l'électrode

Les propriétés électrochimiques du film de CNTs à l'électrode sont évaluées à l'aide du bleu de méthylène (BM), molécule connue pour sa grande affinité pour les matériaux carbonés et médiateur classique pour l'oxydation de l' H_2 par l'*Aa* Hase 1. L'électroréduction du BM (Figure 15), qui implique le transfert d'un proton pour deux électrons, obéit à l'équation :

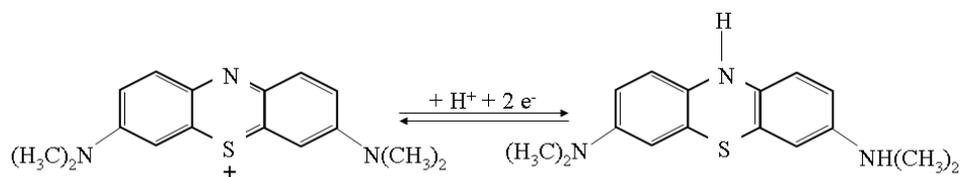


Figure 15 – Equation de la réaction d'oxydoréduction du BM

En utilisant comme électrode de travail une électrode de PG nue, l'électroréduction du BM se traduit par une vague redox à $E_m = -240$ mV vs. Ag/AgCl. Le potentiel moyen se décale de 25 mV par unité de pH, ce qui est proche de la prédiction de la loi de Nernst pour un mécanisme à un proton et deux électrons. L'intensité du pic augmente au cours des cycles consécutifs. Après stabilisation, la

variation de la hauteur du pic avec la vitesse de balayage est caractéristique de l'adsorption (Figure 16 A). Lorsque l'électrode est modifiée par un film de SW-CNTs, la vague redox est légèrement décalée vers les potentiels plus cathodiques (Figure 16 B). L'adsorption s'effectue toujours au cours de cycles consécutifs. Quand l'état stationnaire est atteint, la valeur maximale du courant est 20 fois plus élevée que sur PG nue, de façon cohérente avec l'augmentation de la surface développée de l'électrode (Tableau 4).

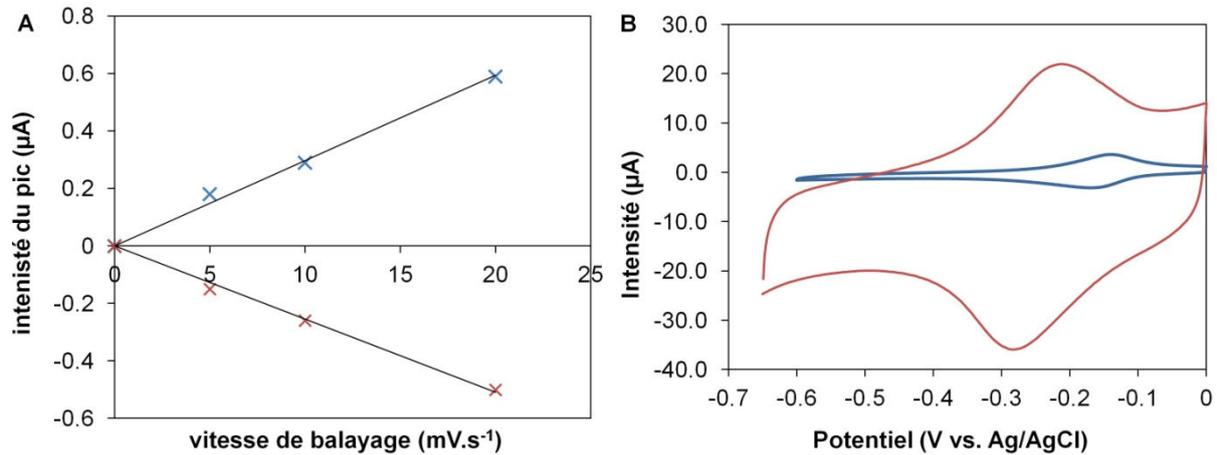


Figure 16 – Adsorption du BM sur l'électrode de PG et sur les SW-CNTs-COOH. A : Variation de la hauteur des pics d'oxydation et de réduction du BM avec la vitesse de balayage sur PG nue. B : Comparaison des CVs d'oxydoréduction du BM sur PG nue (courbe bleue) et sur SW-CNTs-COOH (courbe rouge). Pour plus de lisibilité, le signal sur PG nue a été multiplié par 10. Tampon Hepes 50 mM pH 6,8 ; T ambiante ; $\omega=0$ rpm ; électrolyte saturé en N_2 . B : $v=10 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$

Quand l'électrode modifiée est transférée dans un électrolyte sans BM, une diminution du signal catalytique est observée lors du premier cycle. Elle peut être attribuée à des molécules qui n'étaient pas fortement adsorbées dans le réseau de SW-CNTs-COOH. Le signal est ensuite stable au cours des cycles. Il varie linéairement avec la vitesse de balayage, ce qui démontre un procédé régi par l'adsorption. Il est de plus très stable avec le temps : on n'observe pas de décroissance du courant capacitif ou faradique sur 15 cycles, quel que soit le pH. La même stabilité est observée en présence de 200 mM NaCl dans l'électrolyte (Tableau 4). La stabilité du courant capacitif et la stabilité du courant d'oxydoréduction du BM permettent de conclure la bonne stabilité du film de SW-CNTs-COOH dans les conditions de pH et de concentration en sel étudiées.

Adsorption du BM				Après transfert			
1 ^{er} cycle		dernier cycle		1 ^{er} cycle		15 ^{ème} cycle	
I (μA)	Capacité (mF)	I (μA)	Capacité (mF)	I (μA)	Capacité (mF)	I (μA)	Capacité (mF)

sans NaCl, pH 6,8	2	2,5	48,1±2,7	2,5±0,1	40,5±2,7	2,2±0,1	40,5±3,1	2,2±0,1
[NaCl]=200 mM, pH 6,8	0,4±0,1	1,7±1,1	24±0,4	1,8±0,6	16,4±1,2	1,7±0,2	15,6±1,1	1,8±0,2
sans NaCl, pH 5	2,4±0,5	1,9±0,1	33,5±0,1	1,9±0,2	32,2±4,8	1,6±0,2	32,2±6	1,6±0,3
sans NaCl, pH 9	1,4	2,5±0	39,2±5,9	2,5±0,1	35,4±1,9	2,3±0,2	35,4±1,9	2,3±0,2

Tableau 4– Evolution avec le temps de la capacité et du courant de pic anodique du BM pour un film de SW-CNTs-COOH formé par 10 μL à la concentration 10 mg.mL^{-1} . Les courants sont mesurés en voltammétrie cyclique dans du tampon Britton Robinson à différents pH, en présence et en l'absence de NaCl. Température ambiante ; $\omega=0$ rpm ; électrolyte saturé en N_2 ; $v= 10 \text{ mV.s}^{-1}$

II-2-c- Propriétés vis-à-vis de la catalyse d'oxydation de l' H_2

Afin de choisir le matériau le plus approprié pour comprendre les interactions entre l'*Aa* Hase 1 et les CNTs, on compare tout d'abord l'affinité de l'hydrogénase pour les différents types de CNTs. On compare alors les signaux catalytiques d'oxydation de l' H_2 en voltammétrie cyclique lorsque l'hydrogénase est adsorbée sur les CNTs (Figure 17).

L'allure des CVs est comparable. Les courants capacitifs sont du même ordre de grandeur dans tous les cas, mais environ deux fois plus élevés pour le film de SW-CNTs-COOH, ce qui indique que l'aire développée est supérieure. Les intensités du courant catalytique enregistrées sont très faibles pour les MW-CNTs, et à peine améliorées pour les MW-CNTs-COOH. Elles sont deux fois plus élevées pour les SW-CNTs, et quintuplées par la fonctionnalisation par traitement acide.

L'environnement fourni par les groupements carboxylates des SW-CNTs-COOH est donc favorable à l'immobilisation fonctionnelle de l'*Aa* Hase 1, ce qui est cohérent avec les résultats obtenus sur les SAMs [1]. En revanche, on espérait de meilleurs résultats avec les MW-CNTs qu'avec les SW-CNTs, car les premiers sont métalliques alors que le comportement métallique ou semi-conducteur des seconds dépend de leur chiralité. De plus l'immobilisation de l'*Ec* Hyd 1 sur des MW-CNTs a permis d'augmenter considérablement les courants d'oxydation de l' H_2 par rapport à une électrode de PG [12]. Au contraire, l'électrocatalyse de l'oxydation de l' H_2 est très peu efficace quand l'*Aa* Hase 1 est immobilisée sur les MW-CNTs. Une possibilité est que la proportion de carbone amorphe dans le matériau commercial soit très importante, l'enzyme serait alors adsorbée par le carbone amorphe et non pas immobilisée sur les CNTs. Il en résulterait une mauvaise connexion électrique entre l'enzyme et l'électrode, et une catalyse électroenzymatique inefficace.

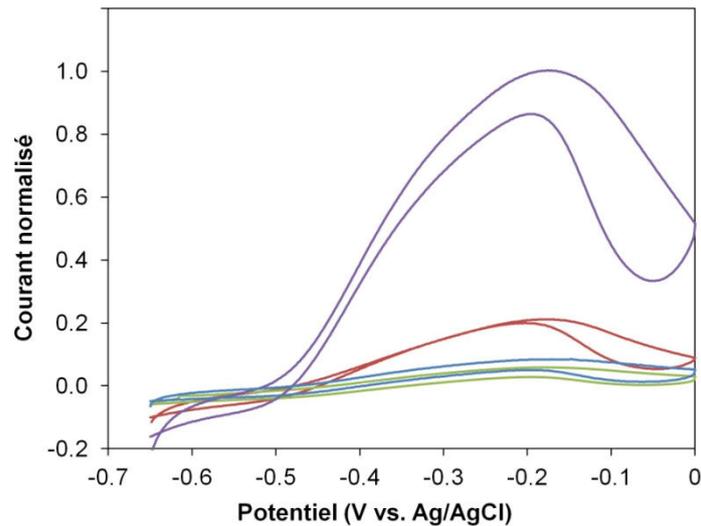


Figure 17 – Comparaison des voltammogrammes d'oxydation de l' H_2 par l'Aa Hase 1 adsorbée dans le film de CNTs : SW-CNTs (courbe rouge), SW-CNTs-COOH (courbe violette), MW-CNTs (courbe verte) et MW-CNTs-COOH (courbe bleue). Le film de CNTs est formé à la surface de graphite par dépôt de $5 \mu L$ d'une suspension de CNTs dans l'eau (environ 2 mg.mL^{-1}) et séchage. $5 \mu L$ d'une solution d'Aa Hase 1 à $2 \mu M$ sont alors déposés sur l'électrode ainsi modifiée qui est ensuite séchée sous N_2 . Les courants sont normalisés par rapport au courant maximal obtenu. Expériences de voltammétrie cyclique réalisées dans du tampon Hepes 50 mM pH 6,8 ; $T = 60^\circ C$; $\omega = 0 \text{ rpm}$; gaz en surpression au dessus de l'électrolyte ; $v = 5 \text{ mV.s}^{-1}$

II-2-d- Influence du pH sur l'activité de l'hydrogénase immobilisée sur les SW-CNTs-COOH

De façon générale, l'activité et la stabilité des enzymes sont affectées par le pH. La réaction catalysée par l'hydrogénase fait intervenir des protons, on peut donc attendre que le pH joue un rôle important pour l'efficacité électrocatalytique de cette enzyme. L'activité de l'Aa Hase 1 adsorbée sur les SW-CNTs-COOH est évaluée en électrochimie pour des pH variant de 5 à 9. On observe un décalage des potentiels de début de la catalyse et du pic avec la variation du pH. L'intensité atteint un maximum à pH 7. Le courant est très faible à pH 9 (Figure 18).

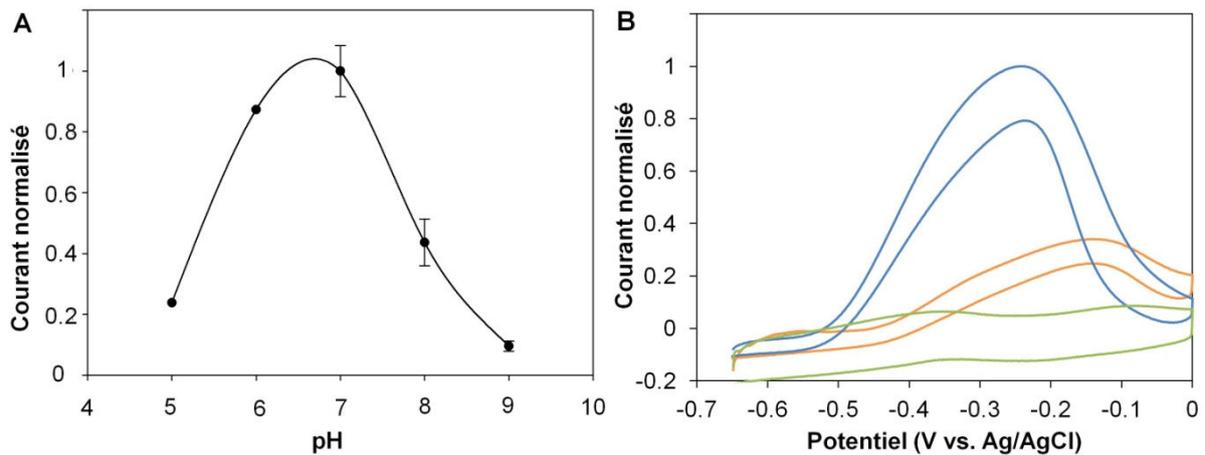


Figure 18 – Influence du pH sur le courant d'oxydation de l' H_2 l'Aa Hase 1 adsorbée sur les SW-CNTs-COOH. A : Comparaison du courant de pic obtenu en voltammétrie cyclique aux différents pH ; B : Comparaison du signal d'oxydation de l' H_2 par l'Aa Hase 1 à pH 7 (courbe bleue), à pH 5 (courbe orange) et à pH 9 (courbe verte). Voltammétrie cyclique réalisée dans du tampon Britton-Robinson équilibré à pH 7, 8 et 9 à l'aide de NaOH ; $T= 60^\circ C$; $\omega=0$ rpm ; gaz en surpression au dessus de l'électrolyte ; $v= 5$ mV.s⁻¹

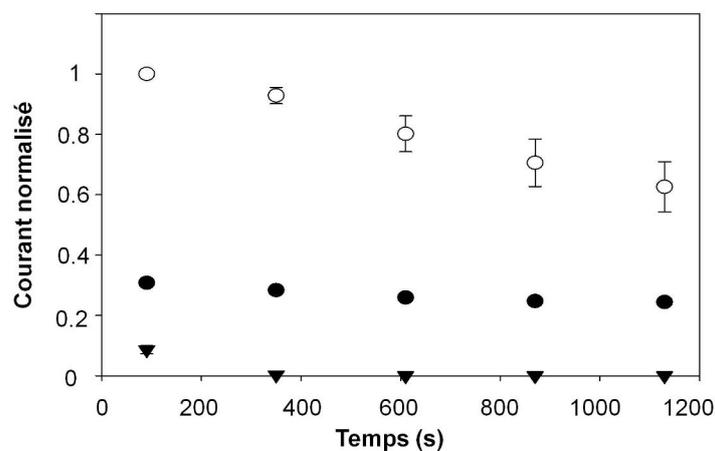


Figure 19 – Evolution au cours du temps des courants d'oxydation de l' H_2 par l'Aa Hase 1 adsorbée sur les SW-CNTs-COOH, évaluée en voltammétrie cyclique à pH 5 (●), 7 (○) et 9 (▼). Courants mesurés sur des cycles consécutifs de voltammétrie cyclique à $E = -0,2$ V vs. Ag/AgCl. Tampon Britton-Robinson équilibré à pH 5, 7 et 9 à l'aide de NaOH ; $T= 60^\circ C$; $\omega=0$ rpm ; gaz en surpression au dessus de l'électrolyte ; $v= 5$ mV.s⁻¹

La stabilité du signal est elle-même dépendante du pH (Figure 19), elle est d'autant plus importante que le pH est acide. L'activité en électrochimie de l'hydrogénase adsorbée sur les CNTs ne reflète pas seulement l'activité intrinsèque de l'hydrogénase mais également la force des interactions électrostatiques, qui dépendent de la charge de l'enzyme et de la charge de l'électrode au pH considéré. Les interactions électrostatiques varient avec les positions relatives du pH, du pKa des

acides carboxyliques qui sont compris entre 4 et 5, et du pI de l'enzyme qui est égal à 6,9. La stabilisation à pH acide reflète en particulier l'augmentation de la force des liaisons électrostatiques entre les groupements carboxylates déprotonés des SW-CNTs-COOH et l'hydrogénase dont la charge globale est positive. Au contraire, la charge globale de l'hydrogénase est négative à des pH basiques, ce qui induit des répulsions entre l'électrode et l'enzyme.

II-2-e- Optimisation des densités de courant pour l'hydrogénase

Dans l'optique du développement d'une biopile H_2 - O_2 performante, on cherche à optimiser les densités de courant de catalyse délivrées lors de l'oxydation de H_2 par l'Aa Hase 1 immobilisée dans le réseau de SW-CNTs. Pour cela on fait varier la quantité de SW-CNTs-COOH composant le film. 5 μ L d'une solution d'Aa Hase 1 à 2 μ M sont alors déposés sur l'électrode ainsi modifiée qui est ensuite séchée sous N_2 . La forme du CV reste inchangée par rapport au signal observé sur PG nue ou sur les SAMs (Figure 20).

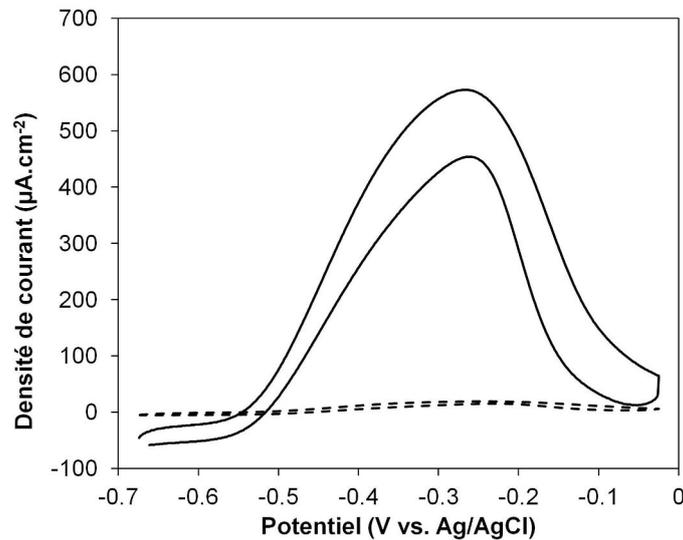


Figure 20 – Densités maximales d'oxydation de l' H_2 par l'Aa Hase 1 adsorbée sur les SW-CNTs-COOH (trait plein) et sur PG nue (trait pointillé). Expériences de voltammétrie cyclique réalisées dans du tampon Hepes 50 mM pH 6,8 ; $T=60^\circ C$; $\omega=0$ rpm ; gaz en surpression au dessus de l'électrolyte ; $v= 5$ mV.s⁻¹

La capacité, qui est proportionnelle à la surface développée, augmente linéairement avec la quantité de CNTs déposés à l'électrode (Figure 21). En revanche, l'intensité du signal catalytique n'augmente proportionnellement à la quantité de CNTs que pour les plus faibles masses de CNTs déposés à l'électrode. Ensuite elle atteint un plateau. On retrouve donc les résultats antérieurs, expliqués dans un premier temps par la saturation par les molécules d'Aa Hase 1 des sites d'ancrage disponibles sur les SW-CNTs-COOH. Pour les intensités maximales, le courant est multiplié par 30 par rapport aux densités de courant obtenues quand l'Aa Hase 1 est immobilisée sur PG nue (Figure 20).

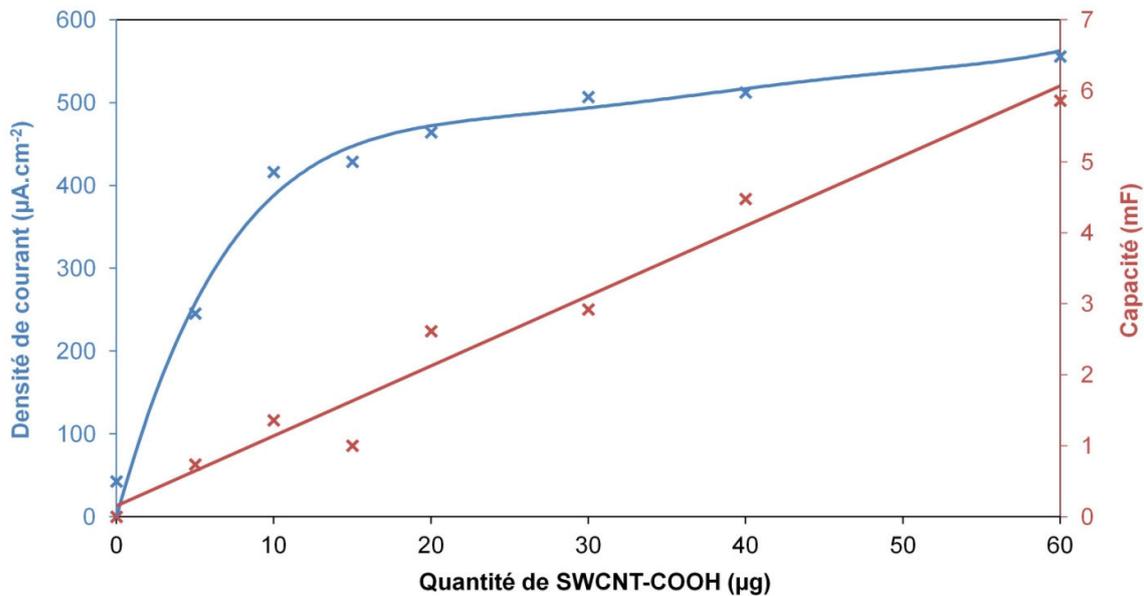


Figure 21 - Evolution de la capacité et du courant du pic d'oxydation de l' H_2 par l'Aa Hase 1 adsorbée dans le film de SW-CNTs-COOH en fonction de la quantité de SW-CNTs déposés à l'électrode. La capacité est calculée à partir du courant capacitif mesuré sur les voltammogrammes d'oxydation de H_2 par l'hydrogénase à $-0,6$ V vs. Ag/AgCl. Le courant catalytique est mesuré sur les mêmes voltammogrammes à $-0,2$ V vs. Ag/AgCl. Expériences de voltammétrie cyclique réalisées dans du tampon Hepes 50 mM pH 6,8 ; $T=60^\circ\text{C}$; $\omega=0$ rpm ; gaz en surpression au dessus de l'électrolyte ; $v=5$ mV.s⁻¹

II-2-f- Stabilisation du signal

Lorsque l'hydrogénase est simplement adsorbée sur les SW-CNTs-COOH, nous avons vu qu'une décroissance continue du signal est observée à pH neutre. Après 20 minutes de voltammétrie cyclique, le courant n'atteint plus que 62 % de l'intensité initiale. Cette perte n'est pas liée à l'instabilité du film de CNTs, comme l'ont prouvé les résultats obtenus avec le BM.

Après adsorption de l'hydrogénase, une membrane de dialyse en cellulose peut être ajustée à la surface de l'électrode. L'hydrogénase est alors confinée dans une couche mince à la surface de l'électrode. Aucune perte du signal électroenzymatique n'est observée dans cette configuration au cours de 20 minutes de voltammétrie cyclique. Or, en immobilisant l'hydrogénase de cette manière sur une électrode de PG nue, l'absence de stabilisation observée pendant trois heures de CV avait conduit à la conclusion que d'autres facteurs que le détachement de l'enzyme intervenaient dans la baisse du courant catalytique (réorientation, réorganisation du film d'enzymes, dénaturation de l'enzyme...) [8]. L'environnement fourni par les SW-CNTs-COOH pourrait donc favoriser la stabilité de l'activité de l'hydrogénase.

Pour de futures applications, on souhaite cependant trouver des alternatives à l'utilisation de la membrane de cellulose. Plusieurs méthodes sont donc étudiées.

II-2-f-i- Membrane polymère

La stabilité d'un film enzymatique sur une électrode est un des points clés du développement biotechnologique. Elle peut être améliorée grâce à l'utilisation de polymères comme le Nafion®. Il s'agit d'un copolymère composé d'un squelette en PTFE sur lequel sont ramifiés des groupes éther de perfluorovinyloxy terminés par des groupes sulfonates (Figure 22). Il possède une température d'utilisation maximum élevée (190° C) et des propriétés conductrices d'ions dues à l'intégration des groupes sulfonates qui permettent le mouvement des cations. En formant une matrice polymère perméable aux protons, il pourrait à la fois stabiliser l'immobilisation de l'hydrogénase à l'électrode, et protéger l'hydrogénase de l'O₂. Le Nafion a déjà été utilisé pour l'immobilisation d'enzymes comme la glucose oxydase [14-16]. L'immobilisation peut être réalisée de différentes manières : les enzymes peuvent être attachées sur la surface d'une électrode modifiée par le Nafion [14], immobilisées entre une membrane de Nafion et l'électrode, ou piégées dans une membrane de Nafion [15].

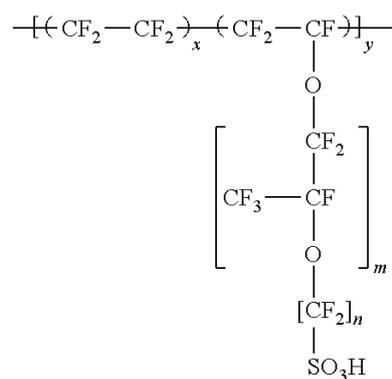


Figure 22 – Formule semi-développée du Nafion ®

Dans cette étude, l'*Aa* Hase 1 est adsorbée dans le film de SW-CNTs-COOH formé à l'électrode, puis une couche de Nafion diluée à 0,05%, 0,1% ou 0,5% est déposée sur le réseau de CNTs. Cette méthode est choisie car elle est moins susceptible de soumettre l'enzyme à l'environnement très acide du Nafion, qui pourrait réduire l'activité et la durée de vie de l'enzyme. La stabilité du courant catalytique n'est pas améliorée par les membranes de Nafion correspondant aux dilutions 0,05% et 0,1%. La concentration 0,5% ne permet pas d'observer un courant catalytique d'oxydation de l'H₂.

La perméabilité de cette membrane aux gaz est analysée en observant la réduction catalytique de l'O₂ sur les SW-CNTs-COOH à -0,4 V vs. Ag/AgCl. Le processus de réduction est peu affecté par l'ajout de la membrane. La diffusion des molécules d'H₂, dont la taille est inférieure à celle des molécules d'O₂, doit être au moins aussi efficace. Il est donc peu probable que le transport de gaz à travers la membrane soit limitant. On peut noter que cette observation implique aussi que des

membranes de Nafion à de telles dilutions ne pourraient pas jouer un rôle de protection de l'hydrogénase contre l'O₂. Par ailleurs, lorsque la membrane de Nafion est formée avant l'adsorption de l'hydrogénase, ou lorsque l'hydrogénase est mélangée au Nafion avant le dépôt sur l'électrode, aucun courant catalytique d'oxydation de l'H₂ ne peut être observé.

La question se pose de la compatibilité du Nafion avec l'activité de l'hydrogénase. Des gels Bleus Natifs (BN) sont réalisés pour évaluer l'influence de la concentration et de la durée d'incubation dans le Nafion sur l'activité de l'Aa Hase 1 (Figure 24). La technique utilisée est l'électrophorèse, qui consiste à faire migrer les protéines sur un support chimiquement inerte, ici un gel de polyacrylamide en conditions natives, grâce à l'application d'un potentiel entre deux électrodes. L'emploi du bleu de Coomassie G₂₅₀ dans l'échantillon permet d'uniformiser la charge des protéines. Elles sont alors séparées en fonction de leur poids moléculaire, tout en restant actives, ce qui permet de les identifier. Après l'électrophorèse, on réalise un test d'activité « in gel » permettant de mettre en évidence l'activité d'oxydation de l'H₂ avec le méthyle viologène (MV) oxydé comme accepteur d'électrons. Cette activité est révélée par l'ajout de chlorure de 2,3,5-triphényltétrazolium (2,3,5-TTC, Figure 23) qui, en étant réduit par le MV, donne le précipité rouge observé sur la figure 24.

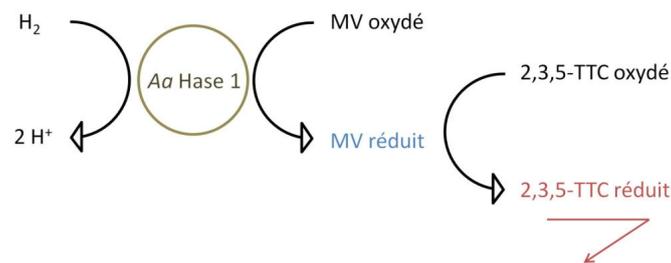


Figure 23 – Révélation de l'activité hydrogénase sur gel

Pour une durée d'incubation de l'ordre d'1 h à 4°C, le Nafion a peu d'influence sur l'activité. En revanche, après une incubation plus longue (24 h), l'activité de l'Aa Hase 1 a totalement disparu pour une concentration de Nafion de 0,5 %, et n'est plus que résiduelle pour la concentration plus faible de 0,1 % alors que l'hydrogénase seule est encore très active. Le Nafion dénature sans doute la molécule d'hydrogénase, cependant ce processus est lent à 4°C.

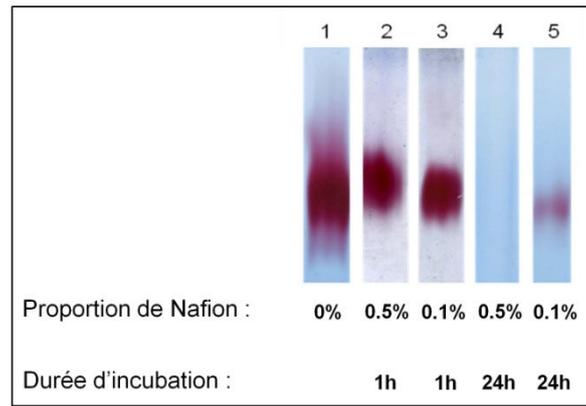


Figure 24 – Gels BN 5-15% montrant l'influence du Nafion® sur l'activité d'oxydation du H₂ de l'Aa Hase 1. 1 : Aa Hase 1 après 24 h à 4°C sans Nafion ; 2 : Aa Hase 1 après 1 h d'incubation dans du Nafion 0,5% à 4°C ; 3 : Aa Hase 1 après 1 h d'incubation dans du Nafion 0,1% à 4°C ; 4 : Aa Hase 1 après 1 h d'incubation dans du Nafion 0,5% à 4°C ; 5 : Aa Hase 1 après 24 h d'incubation dans du Nafion 0,1% à 4°C.

La durée totale d'exposition de l'hydrogénase au Nafion (séchage de l'électrode et expérience électrochimique) n'excédant en général pas une heure, d'autres facteurs doivent être responsables de l'absence d'activité électrochimique de l'hydrogénase recouverte par la membrane de Nafion 0,5%. Une première explication vient de la capacité du Nafion à concentrer les cations. Il peut donc concentrer les ions H⁺ produits par l'oxydation de l'H₂ à la surface de l'électrode, ce qui provoque une augmentation locale de l'acidité et une diminution de l'activité enzymatique [17]. Un autre facteur peut être l'isolation électrique de l'hydrogénase entourée par le polymère non conducteur.

La formation d'une membrane de Nafion après adsorption de l'Aa Hase 1 sur les SW-CNTs-COOH n'apporte donc pas d'amélioration de la stabilité du signal. Une perte de l'activité enzymatique est observée lorsque l'hydrogénase est incubée en présence de Nafion pendant des durées importantes, probablement à cause de la dénaturation de l'enzyme en milieu acide. Une possibilité à envisager pour l'avenir est l'introduction d'ions ammoniums quaternaires dans la suspension de Nafion [17]. Ces ions permettent de créer une porosité adaptée à l'enzyme. De plus, grâce à leur grande affinité pour les groupements sulfonates du Nafion, ils créent une quasi-neutralité au niveau des pores du polymère, qui fournirait un environnement plus tamponné à l'enzyme [17].

II-2-f-ii- Liaison covalente

Si l'instabilité du courant catalytique est essentiellement liée à une perte d'enzymes, la liaison covalente de l'enzyme à l'électrode devrait aboutir à une amélioration de la stabilité du système. Dans notre cas, la présence des groupements carboxyles des SW-CNTs-COOH à la surface de l'électrode doit permettre la formation de liaisons amides avec les amines de surface de l'enzyme. De plus, sept lysines ou arginines sont présentes dans une sphère de rayon 12 Å centrée sur le centre [Fe-S] distal, et

sont donc disponibles pour former des liaisons covalentes dans une configuration favorable au TED (Figure 25).

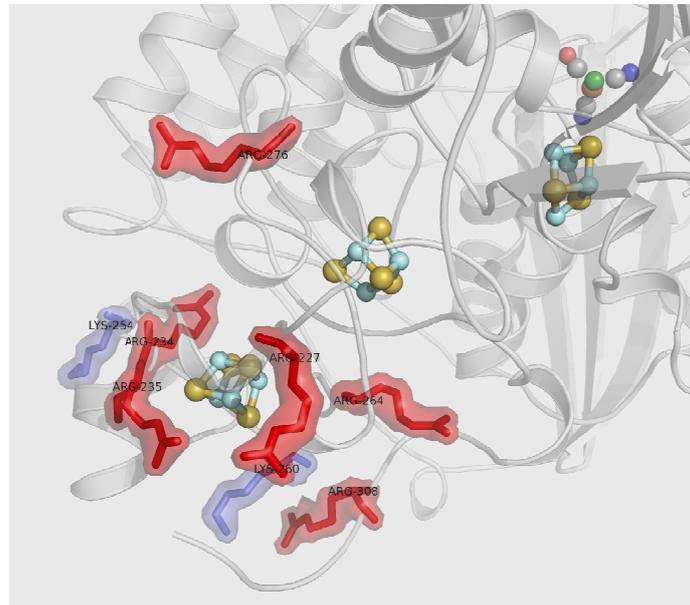


Figure 25 – Résidus aminés arginine (en rouge) et lysine (en bleu) présents dans une sphère de 12 Å de rayon centrée sur le centre [FeS] distal de l'Aa Hase 1. La modélisation est basée sur la structure de l'hydrogénase tolérante à l'O₂ de *Ralstonia eutropha* (PDB ID : 3 RGW).

On utilise l'agent couplant EDC-NHS (Figure 26) qui permet de lier les groupements carboxyles aux amines primaires. L'EDC-NHS a déjà été décrit dans plusieurs études notamment pour la liaison de l'hydrogénase tolérante à l'O₂ d'*E. coli* à des MW-CNTs modifiés par des pyrènes acide butyrique. Le couplage grâce au carbodiimide permet dans ce cas de maintenir un courant d'oxydation de l'H₂ stable pendant 100 h à -120 mV vs NHE et 2500 rpm [12].

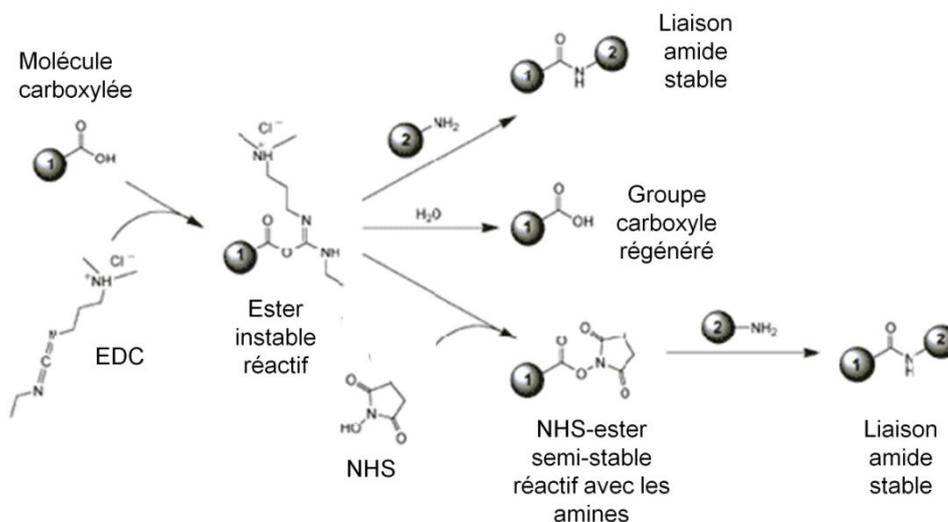


Figure 26 – Schéma décrivant la formation d'une liaison amide grâce à l'agent couplant EDC-NHS

Dans l'étude décrite ci-dessus, des concentrations très élevées d'EDC-NHS (400 et 100 mM respectivement) sont utilisées pour réaliser la liaison covalente [12]. Pour une immobilisation efficace et fonctionnelle dans le réseau de CNTs, le couplage doit cependant éviter l'agrégation des enzymes. Avant les études électrochimiques, on cherche donc à déterminer la concentration optimale d'agent couplant.

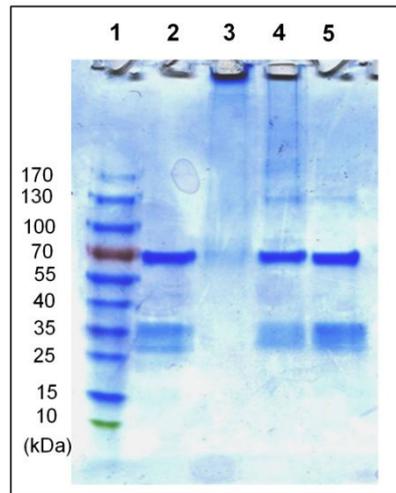


Figure 27 – Gel dénaturant polyacrylamide SDS (12%) montrant l'influence des concentrations d'EDC et de NHS sur l'agrégation des molécules d'Aa Hase 1. 1 : Marqueur de poids moléculaire ; 2 : Aa Hase 1 ; 3 : Aa Hase 1 en présence d'EDC-NHS 400-100 mM ; 4 : Aa Hase 1 en présence d'EDC-NHS 40-10 mM ; 5 : Aa Hase 1 en présence d'EDC-NHS 4-1 mM. L'hydrogénase est incubée 1 heure en présence d'EDC-NHS à température ambiante avant dépôt sur le gel.

Des activités d'oxydation de l' H_2 avec le MV comme accepteur d'électrons similaires à celles qui sont observées en l'absence d'agent couplant peuvent être observées en gel BN (5-15%) pour différentes concentrations d'EDC-NHS. Ce paramètre est contrôlé grâce à un gel SDS dénaturant (Figure 27). La grande (72 kDa) et la petite (34 kDa) sous-unités apparaissent effectivement lorsque l'hydrogénase est incubée dans l'EDC-NHS à des concentrations de 4-1 mM et 40-10 mM. En revanche on ne peut pas voir l'hydrogénase sur le gel lorsque l'hydrogénase est incubée dans l'EDC-NHS à des concentrations 400-100 mM. A ces concentrations très élevées d'agent couplant, l'enzyme ne migre pas mais reste dans le puits de dépôt, ce qui prouve son agrégation. Dans le cas de l'hydrogénase d'*E.coli*, ces concentrations pouvaient ne pas nuire à l'enzyme car l'interaction possible de l'EDC-NHS avec le tampon Tris/HCl pH 7,2 qui contient des fonctions amines devait réduire la concentration effective en agent couplant. En ce qui nous concerne, des concentrations de 40-10 mM sont donc utilisées par la suite pour un couplage covalent efficace.

La liaison covalente de l'Aa Hase 1 permet d'augmenter de manière significative la stabilité du signal d'oxydation de l' H_2 : 90% du courant initial sont conservés après 20 minutes de cyclage

continu (Figure 28). La perte peut dans ce cas être attribuée à une partie des molécules d'enzyme qui ne sont pas effectivement liées covalamment à l'électrode et se détachent, ou aux autres facteurs mentionnés plus haut : réorientation ou dénaturation de l'enzyme. Il reste difficile de discriminer la part respective de ces différents paramètres.

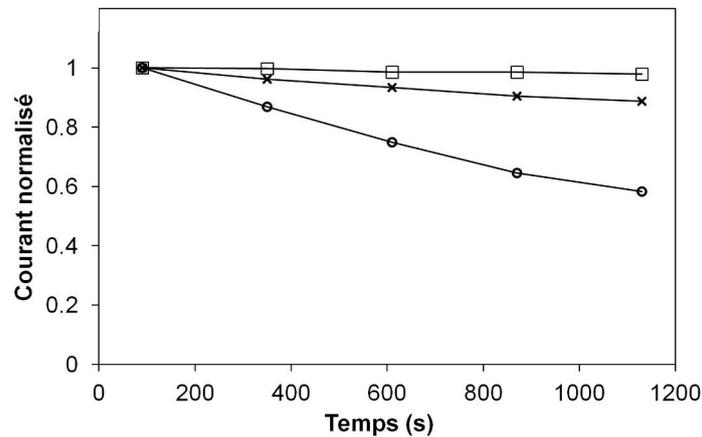


Figure 28- Comparaison de la stabilité du signal d'oxydation de H_2 par l'Aa Hase 1 immobilisée sur les SW-CNTs-COOH par simple adsorption (o), par liaison covalente (x) ou par adsorption et avec une membrane de dialyse (□) Courants mesurés sur des cycles consécutifs de voltammétrie cyclique à $E = -0,2 \text{ V vs. Ag/AgCl}$. Tampon Hepes 50 mM pH 6,8 ; $T = 60^\circ\text{C}$; $\omega = 0 \text{ rpm}$; gaz en surpression au dessus de l'électrolyte ; $v = 5 \text{ mV.s}^{-1}$

II-2-g- Les Nanotubes de carbone : conclusion

Les SW-CNTs-COOH montrent donc une bonne compatibilité avec l'Aa Hase 1, qui permet l'immobilisation de l'enzyme en conservant les propriétés d'oxydation électrocatalytique de l' H_2 . On n'observe pas d'altération de la forme du signal. Ils permettent l'augmentation des densités de courant, qui sont multipliées par 30 par rapport à la PG nue, grâce à l'augmentation de la surface développée de l'électrode. La stabilité n'est pas optimale lorsque l'enzyme est adsorbée sur les CNTs, mais elle peut être améliorée simplement (en une étape) par liaison covalente avec les groupements carboxylates. Cette méthode d'immobilisation conserve l'activité de l'hydrogénase.

Les densités de courant restent cependant limitées. Une des hypothèses est que la porosité du réseau tridimensionnel n'est pas adaptée à la diffusion de l'enzyme. Une autre limitation majeure est due à l'utilisation de matériaux d'origine commerciale qui présentent une forte irréproductibilité de structure et de composition d'un lot à l'autre. Ces limitations nous conduisent à nous tourner vers un autre matériau carboné synthétisé dans un laboratoire partenaire, dans l'optique de former des réseaux contrôlés de porosité hiérarchisée.

III- Immobilisation de l'Aa Hase 1 à l'électrode nanostructurée : les nanofibres de carbone (CNFs) (Collaboration Pr. R. Gadiou, IS2M, Mulhouse et R. Denoyel, Madirel, Marseille)

On désigne par le terme large de nanofibres de carbone (CNFs) les filaments carbonés dont le diamètre est inférieur à 500 nm. L'observation de ces matériaux est reportée pour la première fois par Hugues et Chambers en 1889 [18-20] puis par Schützenberger et Schützenberger en 1890 [19, 21]. Les CNFs résultent de la décomposition thermique des hydrocarbures et apparaissent au départ comme sous-produits indésirables du reformage du gaz naturel.

Les CNFs peuvent être obtenues par des méthodes physiques comme l'ablation par arc électrique ou l'ablation laser [22]. Néanmoins ces techniques présentent des rendements limités, et ne permettent pas de s'affranchir de la co-production d'impuretés. Les CNFs sont donc plus généralement et plus efficacement synthétisées par dépôt chimique en phase vapeur, noté par la suite CVD pour *chemical vapor deposition* [20, 22]. Cette technique, qui donne accès à des matériaux solides de grande pureté, repose sur la réaction sous vide et à haute température (400 à 1000°C) d'une source gazeuse de carbone (éthane, éthène, acétylène, monoxyde de carbone, gaz naturel), le précurseur, avec un métal de transition (Co, Fe, Ni), le catalyseur, déposé sur un substrat solide. On distingue plusieurs sortes de CNFs [18, 20-21] qui se différencient par leur structure. Les principales sont représentées sur la figure 29. Les CNFs en arêtes de poisson sont constituées de couches de graphène empilées de façon oblique par rapport à l'axe de la fibre ; les CNFs en plaquettes sont formées de couches de graphène empilées perpendiculairement à l'axe de la fibre ; les CNFs en ruban sont constituées de couches de graphène parallèles à l'axe. Le type de CNFs obtenues dépend des conditions de synthèse, et particulièrement du catalyseur utilisé.

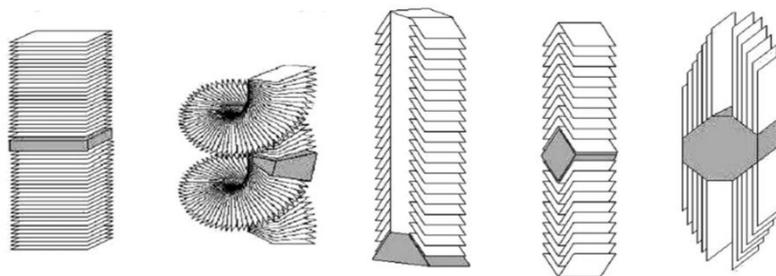


Figure 29 – schéma des différentes variétés de CNFs. De gauche à droite : structure en plaquettes ; structure en plaquettes en spirale ; structure en arêtes de poissons avec un cœur creux ; structure en arêtes de poissons avec un cœur plein ; structure en ruban.

A l'instar de tous les nanomatériaux, les CNFs présentent un très grand rapport surface/volume. Elles montrent d'autre part une grande résistance mécanique ainsi que des conductivités thermique et électrique élevées [23]. De plus, la chimie de surface de ces matériaux carbonés peut être contrôlée grâce à des traitements chimiques et thermiques [24].

Peu d'études décrivent l'utilisation de CNFs pour la bioélectrochimie. On peut noter la conception de biocapteurs de la ricine [25] et de la dopamine et de la sérotonine [26] basés sur un réseau de CNFs verticales. Ces CNFs sont synthétisées par dépôt chimique en phase vapeur assisté par plasma (PECVD) d'acétylène sur un support conducteur. Le diamètre des fibres est compris entre 50 et 100 nm, et leur hauteur est proche de 3 μm . Les auteurs utilisent leur biocompatibilité et leur bonne conductivité électrique pour concevoir des capteurs, qui permettent de détecter par spectroscopie d'impédance électrochimique (EIS) la liaison de l'anticorps puis de la protéine cible.

Par ailleurs, une biocathode pour la réduction de l'oxygène a été conçue à partir d'un tissu de CNFs construit par électro-filage d'un polymère suivi de traitements thermiques assurant sa stabilisation et sa carbonisation [27]. Le matériau résultant est composé de 40 % en masse de carbone, et possède une structure tridimensionnelle basée sur des fibres dont le diamètre varie de quelques dizaines de nm à plusieurs μm . L'adsorption d'un mélange de laccase et d'ABTS suivie de l'encapsulation dans un polymère, le polypyrrole, permet d'obtenir des courants de réduction de l'oxygène atteignant $1 \text{ mA}\cdot\text{cm}^{-2}$. On peut noter que le TED existe, mais que l'ajout d'ABTS augmente grandement les performances de la bioélectrode.

On s'intéressera par la suite exclusivement aux CNFs très graphitiques « en arêtes de poisson » qui présentent sur toute leur longueur des arêtes exposées très réactives. Cette morphologie facilite l'adsorption de protéines et permet la fonctionnalisation de la surface des CNFs. Les propriétés citées font de ces CNFs des matériaux particulièrement adaptés à la modification d'électrodes pour la catalyse électroenzymatique.

III-1- Propriétés physico-chimiques des CNFs

Les nanofibres de carbone en arêtes de poisson sont obtenues par CVD de l'éthylène catalysée par du nickel sur un support graphitique à 600°C . Dans une étape préliminaire, des particules de graphite ($10\mu\text{m}$ environ) sont rendues réactives par broyage sous atmosphère contrôlée (NO) et imprégnées de nitrate de nickel. La synthèse s'effectue ensuite en 2 étapes : le sel de nickel supporté sur la poudre carbonée est tout d'abord réduit sous atmosphère dihydrogène/argon à une pression de 150 Torr pendant une heure, puis le dépôt est réalisé en présence de dihydrogène sous une pression de 300 Torr pendant une demi-heure. Les diffractogrammes des CNFs prouvent que le sel de nickel a été totalement réduit en nickel métallique (Figure 30).

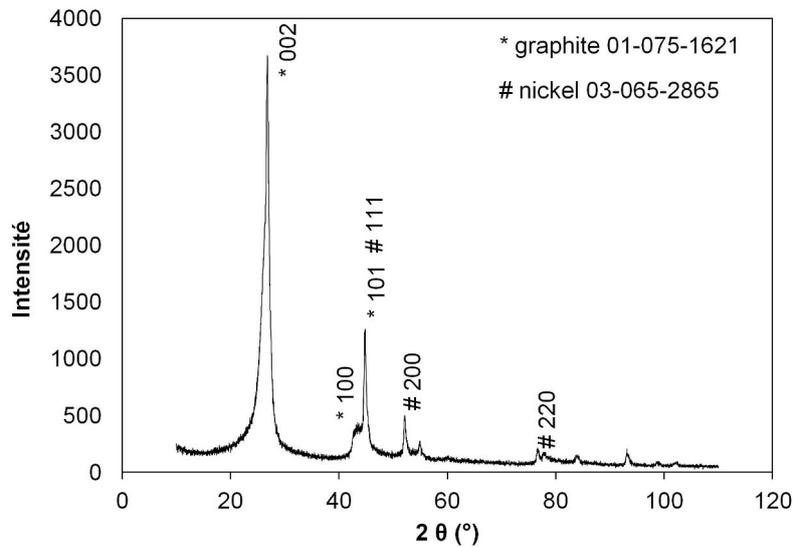


Figure 30 – Profil de diffraction aux rayons X des CNFs obtenues par CVD

Après la synthèse les fibres sont traitées à 495°C sous O₂ afin d'enlever les nanofibrilles accrochées en surface, de « nettoyer » ainsi cette surface et d'augmenter la porosité et donc la surface développée du matériau. La composition finale du matériau obtenu est de 79 % en masse de CNFs, 17 % en masse de graphite, et 4 % de nickel.

Dans la suite on comparera des CNFs issues de la même synthèse et ayant subi le même traitement sous dioxygène. Une fraction notée CNFs_O2 n'a subi que ce traitement. Une deuxième notée CNFs_H2O2 a subi un traitement supplémentaire à l'eau oxygénée pour créer en surface des fonctions -COOH ; et enfin une troisième notée CNFs_H2 a subi un traitement au dihydrogène pour augmenter l'hydrophobicité de la surface.

III-1-a- Structure

Les nanofibres obtenues ont un diamètre de l'ordre de 100 à 200 nm (Figure 31). Les observations au MET haute résolution révèlent une morphologie de type chevrons où les couches coniques de carbone sont empilées les unes sur les autres (Figure 31).

Le spectre XRD des fibres montre les plans (002), (100) et (101) du graphite, ce qui prouve que les couches de carbone des CNFs sont composées d'atomes liés par recouvrement des orbitales hybrides sp². L'espacement entre les couches de carbone, calculé d'après les mesures XRD, est évalué à 3,5 Å. Cette valeur est très proche de l'espacement de 3,35 Å des plans des structures graphitiques. Cette configuration doit donc conférer aux CNFs une conductivité électrique importante. De plus, la surface de ces fibres est principalement constituée d'atomes de carbone situés sur les arêtes des

couches de graphène, qui sont particulièrement réactifs. On attend donc que les CNFs développent des interactions spécifiques avec les molécules et biomolécules.

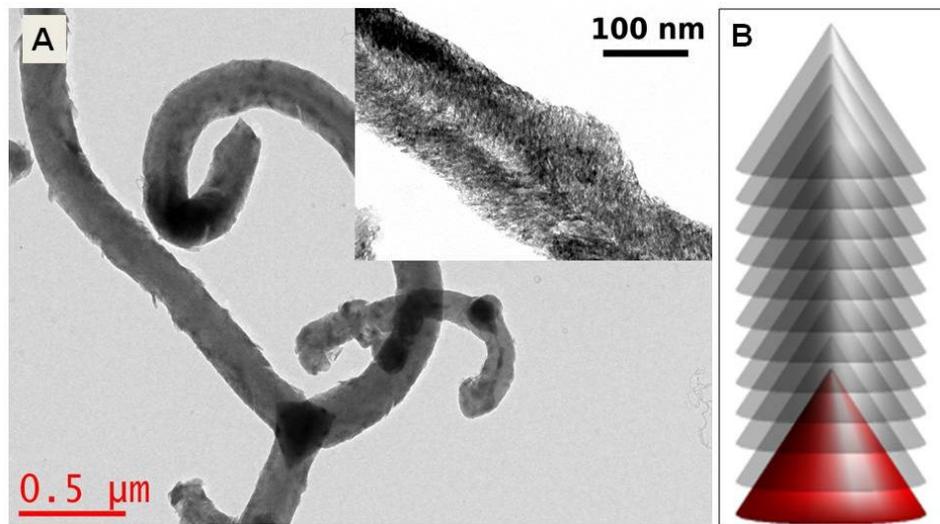


Figure 31 – Structure des CNFs. A : Observations au MET d'un échantillon de CNF-O₂ montrant le catalyseur de Nickel sous forme de tricône d'où partent trois fibres. L'encart montre un plus fort grossissement sur lequel on distingue la structure en chevrons schématisée en B.

III-1-b- Porosité

Les CNFs doivent servir à établir à l'électrode un film de porosité hiérarchisée, dans lequel les interstices entre les fibres serviraient de canaux pour permettre la diffusion de l'enzyme et de son substrat, et les pores des fibres fourniraient des points d'attache pour l'enzyme. Comme expliqué plus haut, on espère qu'immobiliser l'enzyme dans des pores de taille adaptée permettra de surmonter la limitation due à l'absence d'orientation préférentielle sur une électrode plane. La porosité intrinsèque des CNFs est donc un paramètre important. Elle peut être évaluée grâce aux isothermes d'adsorption de l'azote.

La surface développée des CNFs_{O₂}, évaluée par la loi BET, est de 131 m².g⁻¹. Contrairement au traitement par O₂, les traitements par H₂ et par H₂O₂ ne modifient pas cette surface, comme le montrent les isothermes d'adsorption de l'azote (Figure 32 A).

La marche à très basse pression sur les isothermes indique la présence d'un petit volume microporeux, c'est-à-dire de pores de taille inférieure à 2 nm (Figure 32 A). L'adsorption a cependant surtout lieu à des pressions relatives supérieures à 0,5, ce qui correspond à des mésopores dont la taille est comprise entre 2 et 25 nm.

Une analyse DFT permet de plus d'avoir accès à la distribution des tailles de pores cumulées (Figure 32 B). Le volume total des micropores est $V_{\text{micro}} = 0,03 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$; et le volume total des mésopores est $V_{\text{mésos}} = 0,27 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$. Ce dernier type de pores est surtout dû au vide entre les CNFs dans la poudre carbonée, et pourrait convenir pour l'adsorption des enzymes.

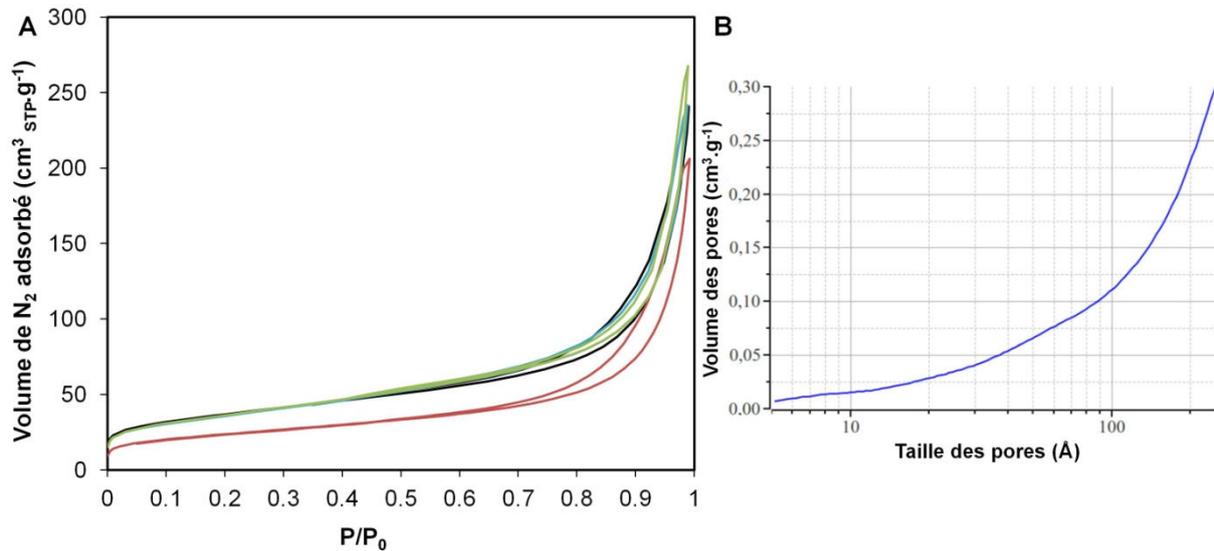


Figure 32- Porosité des CNFs. A : Isothermes d'adsorption de l'azote à 77K par les nanofibres de carbone après les différents traitements : immédiatement après synthèse (courbe rouge), après traitement par O_2 (courbe noire), après traitement par H_2 (courbe verte) et après traitement par H_2O_2 (courbe bleue). B : Distribution des tailles de pores cumulées obtenues par DFT.

III-1-c- Propriétés de surface

La connaissance des caractéristiques de surface permet de prévoir et de comprendre les interactions entre le matériau carboné et les enzymes. Il est donc important de déterminer les fonctions chimiques de la surface et de caractériser l'hydrophobicité du matériau.

III-1-c-i- Analyse des fonctions de surface grâce à la thermo-désorption programmée couplée à la spectroscopie de masse (TPD-MS)

La TPD-MS permet l'analyse de la chimie de surface d'un matériau carboné par décomposition thermique des fonctions oxygénées de surface en CO , CO_2 , H_2 et H_2O . La figure 33 présente l'analyse TPD-MS à vitesse de chauffe constante pour les trois types de CNFs. On constate que les trois profils de désorption sont très différents.

Les profils de désorption des CNFs_ O_2 et des CNFs_ H_2O_2 sont typiques des matériaux carbonés oxydés. Le profil de désorption du CO_2 des CNFs_ H_2O_2 montre un pic vers 350°C ,

caractéristique des groupements carboxyliques, et un pic vers 600°C qui montre la présence de fonctions lactones et anhydrides. Le profil de désorption du CO₂ des CNFs_O2 montre uniquement le pic à 600°C. On n'observe en revanche pas de pic vers 350°C, ce qui est cohérent pour un matériau oxydé à 495°C. Le pic à 500°C sur le profil de désorption du CO des CNFs_O2 et des CNFs_H2O2 peut être attribué à des fonctions éthers et phénols.

Au contraire, les profils de désorption des CNFs_H2 montrent que très peu de fonctions de surface sont présentes. La quantité totale d'oxygène désorbée pour les CNFs_H2 est de 81,5 μmol.g⁻¹, en comparaison de 355 μmol.g⁻¹ pour les CNFs_O2 et de 546,5 μmol.g⁻¹ pour les CNFs_H2O2.

D'après cette analyse, la surface des CNFs_H2 est vraisemblablement plus hydrophobe que celle des CNFs_O2 et des CNFs_H2O2. On s'attend également à ce que la surface de ces deux dernières soit plus acide, et à ce qu'elle soit chargée négativement dans un liquide à pH neutre. Au contraire, dans les mêmes conditions la surface des CNFs_H2 devrait être neutre ou chargée positivement.

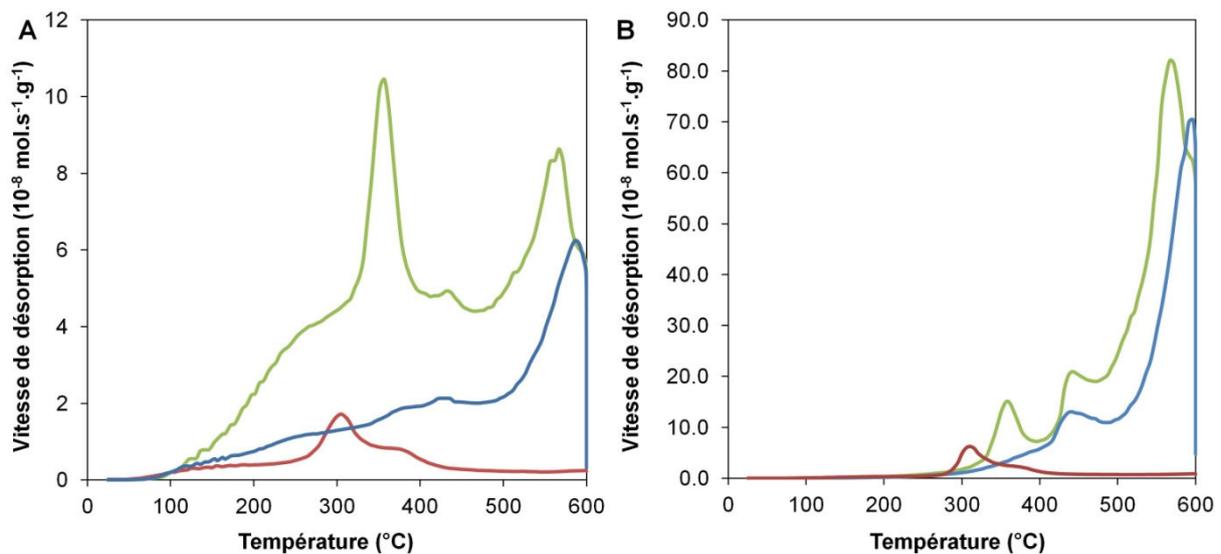


Figure 33 – Analyse par TPD-MS : profils de désorption du CO₂ (A) et du CO (B) des CNFs_O2 (courbes bleues) CNFs_H2 (courbes rouges) et CNFs_H2O2 (courbes vertes)

III-1-c-ii- Caractérisation de l'hydrophobicité grâce à l'isotherme d'adsorption-désorption d'eau

Les isothermes d'adsorption-désorption d'eau reflètent les interactions entre l'eau et le support solide étudié. Elles peuvent donc donner une idée de l'hydrophobicité d'un matériau. La figure 34 montre les isothermes d'adsorption-désorption d'eau pour les CNFs_H2 et les CNFs_O2.

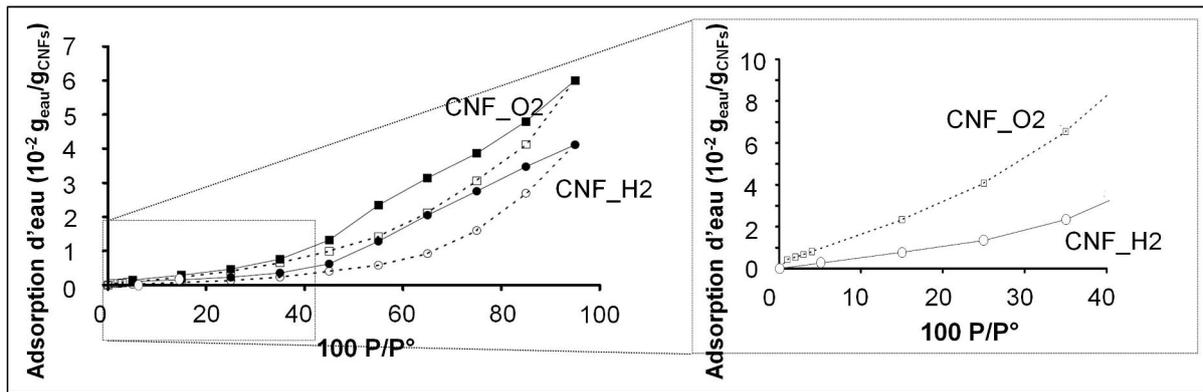


Figure 34 – Isothermes d'adsorption-désorption d'eau sur les CNFs_O2 et sur les CNFs_H2

La forme des isothermes est proche du type V de la classification IUPAC, ce qui laisse penser à un caractère hydrophobe. Cependant, les CNFs sont suffisamment hydrophiles pour permettre le mouillage par l'eau (elles ne flottent pas à la surface de l'eau).

Comme on s'y attendait, les CNFs_O2 adsorbent plus d'eau que les CNFs_H2 sur tout l'intervalle d'humidité relative. Ce paramètre prouve le caractère plus hydrophobe des CNFs_H2. C'est particulièrement vrai pour de faibles humidités relatives, pour lesquelles on peut supposer que la quantité d'eau adsorbée reflète la densité de site hydrophiles à la surface du matériau.

Alors qu'à une pression relative d'environ 0,2, l'azote forme une monocouche à la surface, la densité d'eau est plus faible que le dixième de la valeur théorique d'une monocouche (environ $0,28 \text{ mg.m}^{-2}$) pour les deux types de CNFs. La boucle d'hystérésis indique le remplissage des pores. Le volume correspondant est cependant très inférieur au volume total des pores ($0,3 \text{ cm}^{-3}.\text{g}$). Dans le cas de l'adsorption de l'eau sur des matériaux carbonés, l'hystérésis dans ce domaine de pressions relatives peut correspondre au remplissage des micropores et à un remplissage très faible des mésopores. Tous les pores ne sont donc pas remplis dans l'intervalle de pression analysé. Les différences de capacité d'adsorption entre les deux types de CNFs aux pressions relatives élevées signifient que les CNFs_H2 plus hydrophobes sont moins remplies d'eau à une pression d'équilibre donnée.

III-2- Caractérisation électrochimique du film de CNFs formé sur l'électrode

Avant de construire une bioélectrode utilisant les CNFs, on cherche à former un film homogène de CNFs à l'électrode pour étudier leur comportement en électrochimie en l'absence de biocatalyse. Pour cela on réalise une suspension de CNFs dans un mélange d'eau et de solvant organique, qui est rendue homogène par sonication. Une goutte de la suspension est déposée à l'électrode et séchée, cette opération est répétée un nombre variable de fois. Le nombre de fois où cette opération est répétée définit le nombre de « couches » de CNFs. On fait l'hypothèse que l'épaisseur du film de CNFs augmente avec le nombre de couches.

On détermine les proportions optimales d'eau et de solvant organique pour obtenir une suspension homogène et un mouillage adéquat sur l'électrode utilisée comme support : 50% d'eau et 50 % de DMF. Les CNFs couvrent alors entièrement la surface de graphite de l'électrode de PG. La concentration choisie de CNFs après optimisation est de 4 mg.mL⁻¹, la densité de chaque couche de CNFs est 285 µg.cm⁻² (sauf en cas de spécification différente). Cette densité correspond pour l'électrode de PG qui est la plus fréquemment utilisée à une masse de 20 µg.

III-2-a- Structure du film de CNFs

La figure 35 montre une observation au MEB caractéristique du film de CNFs sur l'électrode de PG. Le film de CNFs est dans ce cas composé de deux couches de CNFs. On peut constater que les CNFs s'arrangent sans former de faisceaux, comme c'est le cas lors de l'utilisation de CNTs sans surfactant. Cet arrangement permet la formation d'un réseau tridimensionnel avec une porosité inter-fibres de l'ordre de la centaine de nm, de façon cohérente avec la porosité inter-fibres déterminée dans la poudre de CNFs. Cette porosité devrait permettre la bonne pénétration et la diffusion dans le réseau de CNFs de l'*Aa* Hase 1, dont la dimension maximale est 6 nm (sans considérer l'hélice flexible et le détergent).

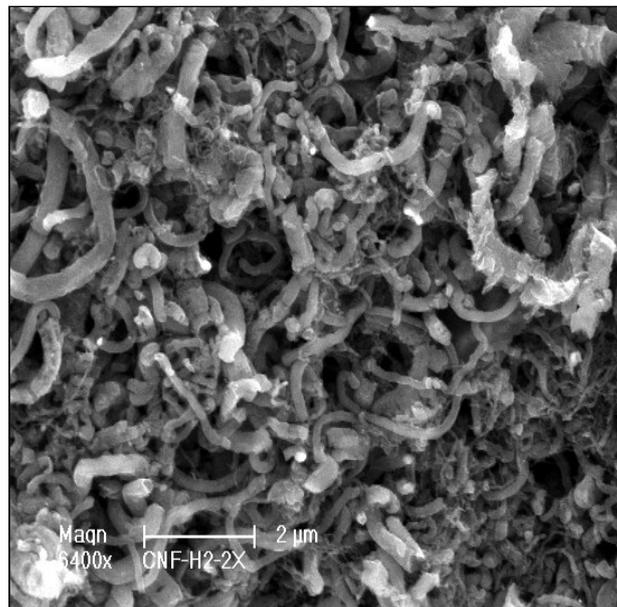


Figure 35 – Observation MEB d'un film de CNFs_H2 formé à la surface d'une électrode de PG composé de 40 µg (570 µg.cm⁻²) de CNFs_H2.

La spectroscopie d'impédance électrochimique (SIE) et la voltammétrie cyclique (CV) sont utilisées pour déterminer la surface développée par les CNFs à la surface de l'électrode. En présence de ferricyanure (Fe(CN)₆^{3-/4-}), le spectre d'impédance d'une électrode d'ITO modifiée par les CNFs est caractérisé par un demi cercle et une ligne droite dans le diagramme de Nyquist (Figure 36). Ce

diagramme peut être interprété d'après le circuit équivalent de Randles, caractéristique des procédés de transferts de charge et des procédés de diffusion dans le film poreux. On peut en extraire la résistance de transfert de charge R_{CT} (donnée par le diamètre du cercle), qui décroît avec l'augmentation de la quantité de CNFs déposée à l'électrode. Cette décroissance reflète l'augmentation de la surface électroactive développée par les CNFs. On peut également en extraire la capacité de double couche C_{DL} , donnée par l'inverse du produit $2\pi R_{CT}\Omega^*$, Ω^* étant la fréquence caractéristique correspondant au sommet du cercle. C_{DL} est directement proportionnelle à la surface développée de l'électrode. Pour des quantités de CNFs supérieures à $10 \mu\text{g}$, la faible valeur de la résistance de transfert de charge rend cette méthode difficilement exploitable.

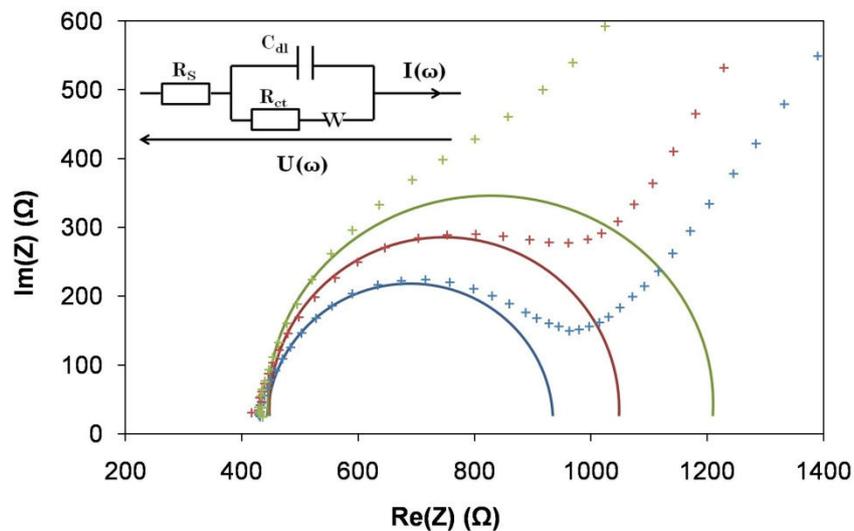


Figure 36- Diagramme de Nyquist obtenu par spectroscopie d'impédance électrochimique des films de CNFs_H2 déposés sur une électrode d'ITO en présence de $2 \text{ mM Fe(CN)}_6^{3-/4-}$. $10 \mu\text{g}$ ($72 \mu\text{g.cm}^{-2}$) (courbe bleue) ; $5 \mu\text{g}$ ($36 \mu\text{g.cm}^{-2}$) (courbe rouge) ; $2,5 \mu\text{g}$ ($18 \mu\text{g.cm}^{-2}$) (courbe verte) Mesure réalisée dans du tampon Hepes 50mM pH $7,2$ à température ambiante.

Pour les films formés de quantités de CNFs supérieures, la surface développée est donc évaluée à partir de la mesure du courant capacitif en CV, en l'absence de courant faradique. Les capacités du film, données par les mesures de SIE et de CV, augmentent linéairement avec la quantité de CNFs constituant le film (Figure 37). On peut donc en déduire une estimation de la surface électroactive développée par le film de CNFs, en choisissant comme facteur de proportionnalité la valeur de $25 \mu\text{F.cm}^{-2}$, raisonnable pour un matériau carboné [21]. Cette estimation donne une surface développée à l'électrode très proche des surfaces qui peuvent être calculées à partir de la surface BET des CNFs.

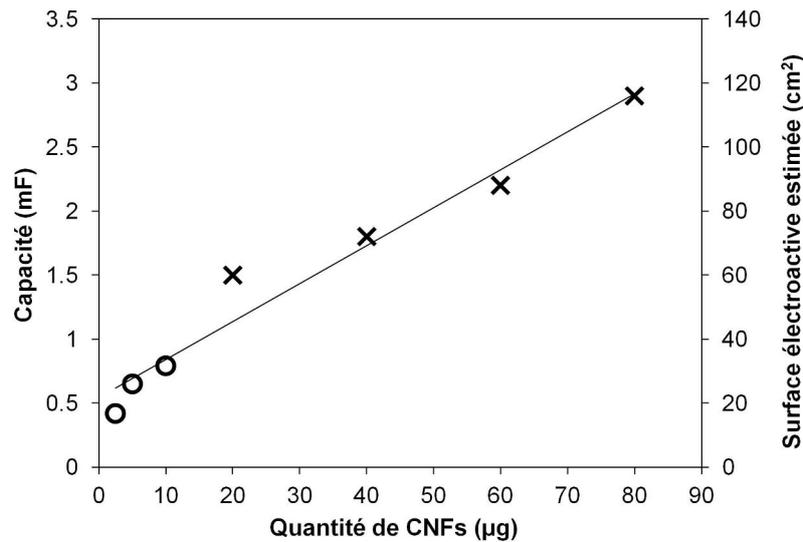


Figure 37 – Evolution de la capacité du film de CNFs_H2 en fonction de la quantité de CNFs qui le compose. La capacité est calculée à partir des mesures de SIE pour les plus petites quantités (o) et à partir des courants capacitifs en voltammétrie cyclique (x) pour les plus grandes quantités. La surface développée électroactive correspondante est déduite des valeurs de la capacité en choisissant un coefficient de proportionnalité de $25 \mu\text{F} \cdot \text{cm}^{-2}$ pour le matériau carboné [21].

III-2-b- Propriétés d'adsorption du film de CNFs

Pour explorer les propriétés d'adsorption du film de CNFs à l'électrode, on utilise le bleu de méthylène (BM), qui s'adsorbe par interactions π - π sur les matériaux carbonés graphitiques. Lorsqu'une voltammétrie cyclique est réalisée avec l'électrode modifiée par le film de CNFs dans une solution électrolytique contenant du BM à $10 \mu\text{M}$, le BM s'adsorbe à la surface des CNFs en s'accumulant au cours de cycles consécutifs. La stabilité du procédé redox du BM adsorbé sur les CNFs est mesurée au cours de cycles consécutifs de CV dans un électrolyte ne contenant pas de BM. Le courant du pic atteint encore 90 % après 10 cycles consécutifs à $5 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ (soit une durée de 45 minutes), ce qui traduit une adsorption stable de la molécule sur les CNFs.

En déterminant la charge correspondant au pic redox du signal, on peut calculer la quantité de BM adsorbée. La charge est de $4,3 \mu\text{C}$ pour l'électrode de PG nue, et atteint à l'équilibre $150 \mu\text{C}$ pour l'électrode modifiée par $40 \mu\text{g}$ de CNFs (soit deux couches de CNFs). La quantité de BM adsorbée est donc multipliée par 35. Si on considère que le BM est positionné parallèlement à l'axe des CNFs (Figure 38), que la surface occupée par une molécule de BM est 130 \AA^2 [28], la surface totale occupée par le BM doit être $24,4 \text{ cm}^2$, c.à.d. moins de la moitié de la surface totale des CNFs. On en déduit que la totalité de la surface électroactive développée par les CNFs ne sera *a fortiori* pas accessible à l'adsorption de l'hydrogénase. Il faut donc s'attendre à ce que la multiplication observée pour la

surface développée ne se traduit pas en multiplication du même ordre de grandeur pour les courants catalytiques d'oxydation de l' H_2 par l'*Aa* Hase 1 immobilisée sur les CNFs.

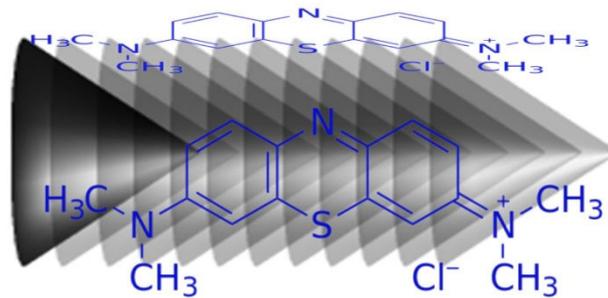


Figure 38- Représentation schématique du positionnement des molécules de BM parallèlement à l'axe des CNFs. Pour plus de visibilité l'échelle n'est pas respectée.

III-2-c- Stabilité du film de CNFs

La stabilité du courant capacitif, déterminé en voltammétrie cyclique en l'absence de courant faradique, est mesurée au cours de cycles consécutifs de voltammétrie cyclique. 98 % du courant capacitif initial sont encore mesurés après 10 cycles consécutifs à $5 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ (soit une durée de 45 minutes). On en déduit une bonne stabilité du film de CNFs.

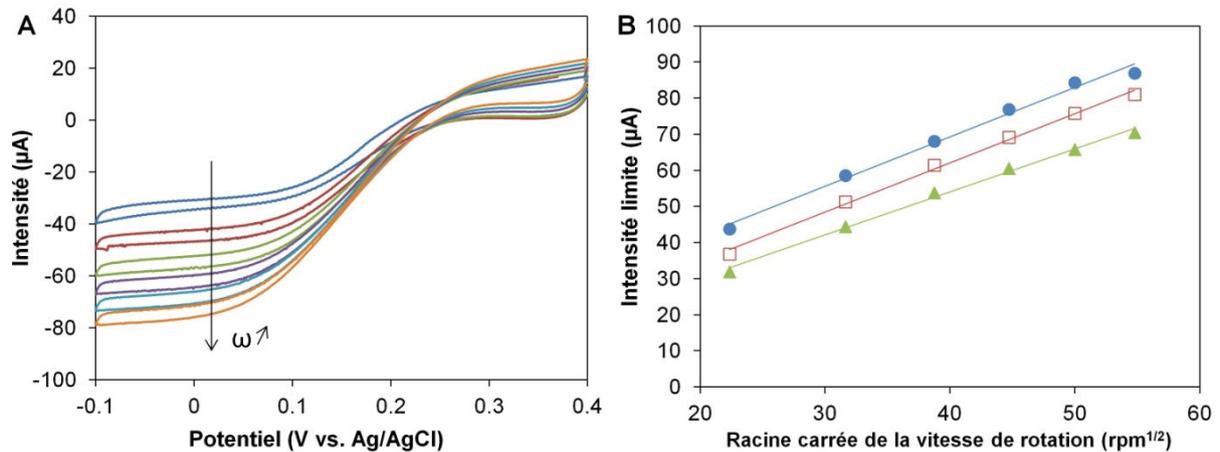


Figure 39 – Evolution du signal du $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ (2 mM) en fonction de la vitesse de rotation de l'électrode (500, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000 rpm) B : pour trois épaisseurs de fibres correspondant à 2 (points verts), 3 (points rouges) et 4 (points bleus) couches de CNFs. Mesures réalisées dans du tampon Hepes 50mM pH 7,2 à température ambiante.

On utilise par ailleurs une électrode tournante. Des films de CNFs sont formés sur la surface de PG. Lors de la rotation, le film de CNFs est soumis à des contraintes de traction dues à la force centrifuge. Pour des densités de CNFs allant jusqu'à $1140 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$, le courant de Lévich croît linéairement avec la racine carrée de la vitesse de rotation jusqu'à 3000 rpm (Figure 39). Le film possède donc une bonne stabilité mécanique, probablement grâce à des interactions π - π ou hydrophobes favorables.

III-3- Optimisation des densités de courant pour l'*Aa* Hase 1

III-3-a- Comparaison des fibres de chimie de surface différente

On cherche ensuite à concevoir une bioélectrode associant les CNFs et l'*Aa* Hase 1 pour l'oxydation électroenzymatique de l' H_2 . Rappelons brièvement les particularités des trois types de CNFs dont on dispose: les CNFs_O2 sont relativement hydrophiles grâce à la présence de fonctions phénols, anhydrides, lactones et éthers; les CNFs_H2 sont particulièrement hydrophobes; et la surface des CNFs_H2O2 porte une grande densité de groupements carboxyliques. Même si la nanostructuration de l'électrode lève en partie la limitation liée à l'orientation de l'enzyme, les chimies de surface des différentes CNFs doivent fournir des environnements plus ou moins favorables à l'efficacité et à la stabilité de l'immobilisation de l'*Aa* Hase 1. On compare donc l'efficacité de la catalyse d'oxydation de l' H_2 par l'*Aa* Hase 1 adsorbée sur les trois types de CNFs.

Un film de CNFs est formé à l'électrode qui est ensuite incubée dans une solution d'hydrogénase. On mesure alors le courant d'oxydation de l' H_2 par la bioélectrode en CV. L'oxydation directe de l' H_2 par l'*Aa* Hase 1 peut être observée avec les trois types de fibres. La forme du signal, comparable pour les CNFs_H2 et les CNFs_O2 (Figure 40), est très différente de la forme habituelle du signal de l'oxydation de l' H_2 par l'*Aa* Hase 1, avec notamment l'apparition d'un plateau de courant. On reviendra sur cette évolution dans la partie 4 de ce chapitre. Pour les CNFs_H2O2, la forme se rapproche du signal habituel. La figure 40 montre les densités relatives de courant obtenues pour les trois types de CNFs. Elles sont du même ordre de grandeur, quoique légèrement supérieures pour les CNFs_H2.

La stabilité du signal dépend très largement du type de fibres. Après dix cycles consécutifs de CV dans l'intervalle de -650 à 0 mV, à $5 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$, ce qui correspond à une durée totale de 45 minutes, on n'observe plus qu'une moyenne de 15 % de l'intensité initiale du signal pour les CNFs_O2. 33 et 60 % sont conservés respectivement pour les CNFs_H2O2 et pour les CNFs_H2. La décroissance peut être due à l'instabilité de l'immobilisation de l'enzyme à l'électrode, à sa réorientation au cours du temps ou sous champ électrique, ou à une altération du site actif de l'enzyme [29].

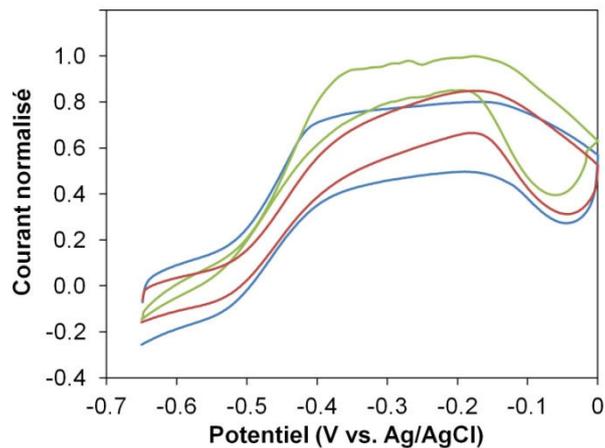


Figure 40 – Signal d'oxydation de l' H_2 par l'Aa Hase 1 adsorbée sur les CNFs_O2 (bleu) ; sur les CNFs_H2 (vert) et sur les CNFs_H2O2 (rouge). Mesures de CV réalisées dans du tampon Hepes 50mM ; pH 6,8 ; $T=60^\circ C$; $\omega=0$ rpm ; H_2 en surpression au dessus de l'électrolyte ; $v= 5$ mV.s⁻¹.

Les CNFs_H2O2 portent des groupements carboxyliques, comme les SW-CNTs-COOH. La liaison covalente de l'enzyme aux fibres grâce à l'EDC-NHS ne permet cependant aucune amélioration de la stabilité. Les fonctions -COOH doivent pourtant être formées sur les arêtes réactives des CNFs, et donc accessibles à l'hydrogénase. Une étude plus fine sera nécessaire dans l'avenir pour comprendre ce qui limite la réaction.

La comparaison des trois types de fibres suggère donc que l'environnement le plus favorable à l'immobilisation stable de l'Aa Hase 1 est fourni par les CNFs_H2 hydrophobes. Cette observation est cohérente avec la stabilité du signal catalytique enregistrée lorsque l'Aa Hase 1 était immobilisée sur les SAMs hydrophobes [1]. Dans ce cas néanmoins, l'oxydation de l' H_2 n'avait lieu que par un processus de TEM. Comme attendu, la formation d'un réseau 3D permet de lever la limitation par l'orientation de l'hydrogénase et donne accès à un processus de TED sur un matériau hydrophobe. Pour la suite des expériences on utilisera donc les CNFs_H2.

III-3-b- différents protocoles

Afin d'obtenir l'électrode la plus performante possible, en termes d'efficacité du TED, d'importance des densités de courant, et de stabilité du signal, deux protocoles différents sont comparés. Le premier protocole est celui qui a été utilisé dans le paragraphe précédent : un film de CNFs est formé sur la surface l'électrode de graphite pyrolytique (PG). L'électrode ainsi constituée est incubée dans un petit volume d'hydrogénase qui diffuse et s'adsorbe sur les CNFs de cette architecture. Le deuxième protocole repose sur l'adsorption d'hydrogénase sur les CNFs grâce au

mélange d'une solution d'hydrogénase et d'une suspension de CNFs, suivi par le dépôt du matériau biohybride ainsi constitué sur la surface de PG.

III-3-b-i- Adsorption de l'Aa Hase 1 sur le film de CNFs

Différentes architectures sont envisagées afin d'optimiser le film de CNFs en vue de l'adsorption de l'hydrogénase. Pour obtenir le meilleur compromis entre une bonne stabilité mécanique du film et l'augmentation de la surface développée, les CNFs sont déposées par couches successives de 5 μL à 4 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Une instabilité mécanique du film est néanmoins constatée à partir de 5 couches de CNFs.

La cinétique d'adsorption de l'Aa Hase 1 sur les CNFs_H2 est évaluée par mesure du courant catalytique d'oxydation de l' H_2 en voltammétrie cyclique, après incubation de l'électrode dans la solution d'Aa Hase 1 pour des durées croissantes (Figure 41). Le courant catalytique atteint un plateau après quelques minutes d'incubation. Cependant, la stabilité du signal est améliorée par des durées d'incubation plus longues, ce qui suggère une organisation en plusieurs étapes des enzymes dans le film de CNFs.

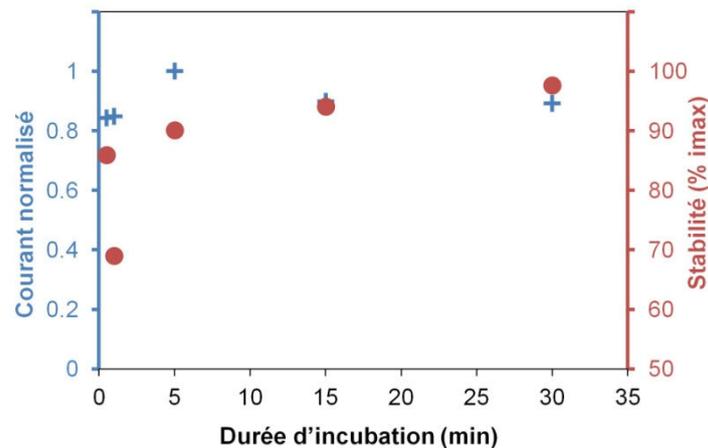


Figure 41 – Cinétique d'adsorption de l'Aa Hase 1 sur les CNFs_H2. Solution d'Aa Hase 1 à $2\mu\text{M}$, 3 couches de CNFs_H2 ($855\ \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$). Les courants sont mesurés sur les courbes de CV à $E = -0,3\ \text{V}$ vs. Ag/AgCl. En bleu : intensité du courant normalisée par rapport au maximum obtenu. En rouge : stabilité du courant, exprimée en pourcentage de l'intensité obtenue au premier cycle. Mesures réalisées dans du tampon Hepes 50mM ; pH 6,8 ; $T=60^\circ\text{C}$; $\omega=0\ \text{rpm}$; H_2 en surpression au dessus de l'électrolyte ; $v= 5\ \text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

L'isotherme d'adsorption de l'Aa Hase 1 sur les CNFs_H2 est évaluée par mesure du courant d'oxydation de l' H_2 en voltammétrie cyclique après incubation de l'électrode modifiée par les CNFs_H2 dans des solutions d'hydrogénase de différentes concentrations (Figure 42 A). Les densités de courant augmentent avec la concentration de la solution d'hydrogénase, mais un plateau est atteint à partir de $2\ \mu\text{M}$. Par ailleurs, les densités de courant augmentent avec la quantité de CNFs constituant le

film, ce qui peut être associé à l'augmentation du nombre de molécules d'Aa Hase 1 immobilisées dans le film de CNFs. Cependant, les densités de courant tendent à se stabiliser pour les plus grandes quantités de CNFs.

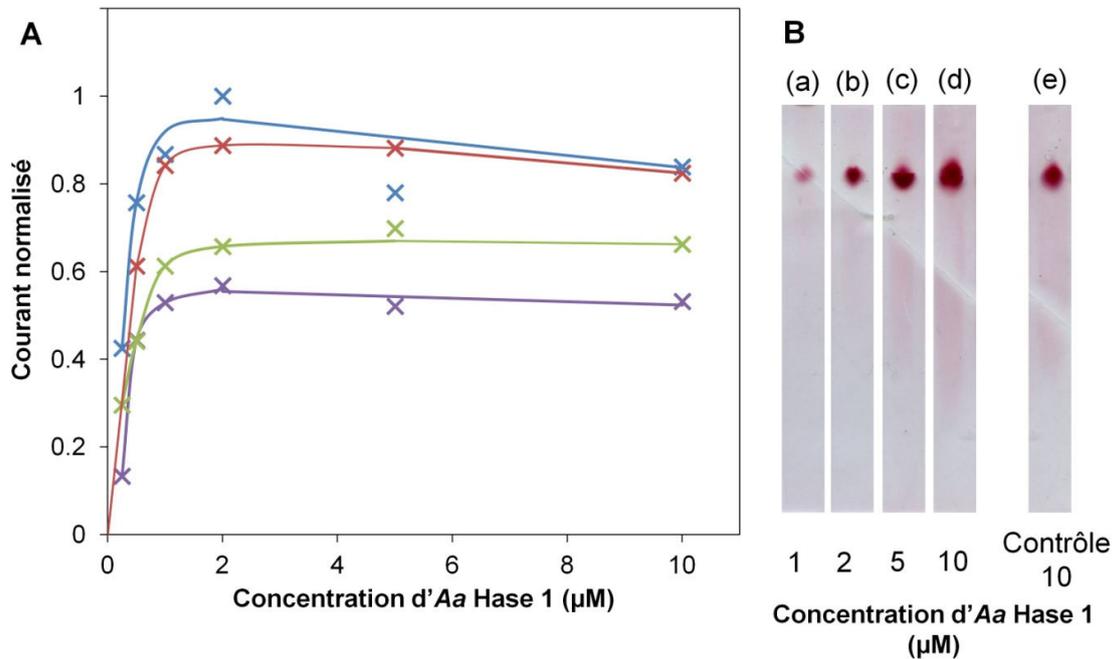


Figure 42 – A : Evolution du courant catalytique d'oxydation de l' H_2 par l'Aa Hase 1 adsorbée sur les CNFs_H2 en fonction de la concentration d'hydrogénase de la solution. Les couleurs indiquent différentes épaisseurs du film de CNFs_H2. Violet : 1 couche ($285 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) ; Vert : 2 couches ($570 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) ; Rouge : 3 couches ($855 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) ; Bleu : 4 couches ($1140 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$). Le courant catalytique est mesuré sur des courbes de CV à $-0,3 \text{ V vs. Ag/AgCl}$. Mesures réalisées dans du tampon Hepes 50mM ; pH 6,8 ; $T=60^\circ\text{C}$; $\omega=0 \text{ rpm}$; H_2 en surpression au dessus de l'électrolyte ; $v=5 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$. B : Activité d'oxydation de l' H_2 par l'Aa Hase 1 révélée sur gel bleu natif à 80°C avec le MV comme accepteur d'électron. Les bandes (a) à (d) correspondent à l'activité des solutions d'hydrogénase après incubation de l'électrode modifiée par les CNFs_H2. La bande (e) correspond au contrôle pour l'activité de l'hydrogénase de la solution à $10\mu\text{M}$.

Pour vérifier que l'hydrogénase est efficacement adsorbée sur les CNFs, les solutions dans lesquelles l'électrode a été incubée sont déposées sur gel bleu natif. Le test d'activité d'oxydation de l' H_2 par l'hydrogénase est réalisé avec le MV comme accepteur d'électrons (Figure 42 B). Cette méthode ne permet pas de quantifier l'enzyme restante, mais la couleur rouge caractéristique montre qu'il reste de l'hydrogénase même dans la solution à $1 \mu\text{M}$. La saturation du signal, enregistrée en électrochimie au-delà de $2\mu\text{M}$ d'hydrogénase, n'est donc pas due au manque de disponibilité de l'enzyme.

Une hypothèse peut expliquer cette contradiction entre les mesures électrochimiques et les mesures d'activité sur gel. Il est possible que l'enzyme s'adsorbe à la surface du film de CNFs et

bloque l'accès dans le réseau aux autres molécules. La limitation serait donc due à la difficulté de diffusion de l'enzyme. D'après l'observation au MEB (Figure 35), la taille des pores est pourtant comprise dans l'intervalle 100-200 nm, ce qui est plus élevé d'un ordre de grandeur que la taille de l'enzyme. Cependant, des études antérieures avec des films de carbone nanostructurés ont montré que, dans de telles conditions, on peut observer un bouchage des pores qui résulte de la compétition entre la diffusion des molécules dans la porosité et leur interaction avec la surface et avec les molécules déjà adsorbées [30]. Ce processus conduit à la limitation par le transport de masse de l'enzyme.

III-3-b-ii- Biohybride hydrogénase / CNFs *ex situ*

Cette manière de procéder devrait permettre à l'hydrogénase de s'adsorber sur les CNFs en optimisant l'occupation de la surface développée. En particulier, on devrait s'affranchir des phénomènes de limitation par le transport de l'enzyme. On s'attend donc à obtenir une électrode efficace vis-à-vis de la catalyse d'oxydation de l'hydrogène.

Ce protocole permet également d'observer l'oxydation de l' H_2 par l'*Aa* Hase 1. Pour une quantité de CNFs donnée (hormis la plus grande), les densités de courant augmentent avec la concentration d'enzyme. Pour les plus faibles concentrations d'hydrogénase, les densités de courant augmentent avec la quantité de CNFs. Mais pour des concentrations d'enzyme plus importantes, l'efficacité de la bioélectrode diminue quand la quantité de CNFs augmente. Par ailleurs, le film déposé à l'électrode est mécaniquement instable pour des concentrations d'*Aa* Hase 1 supérieures à 2 μM .

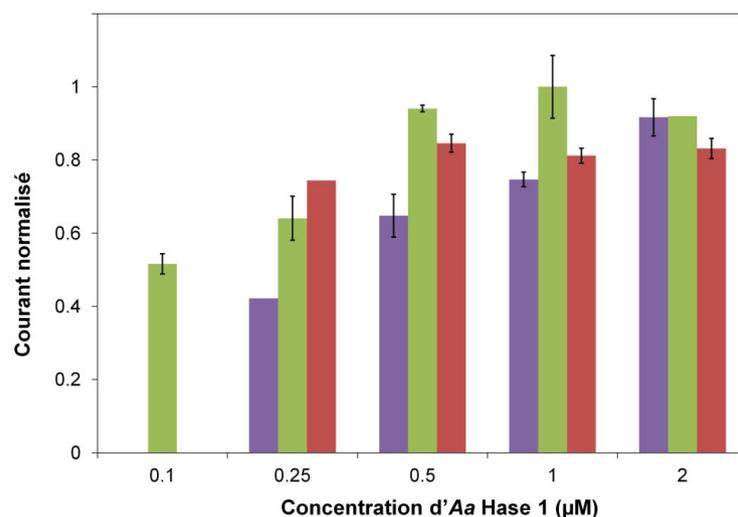


Figure 43 – Evolution du signal catalytique d'oxydation de l' H_2 par l'*Aa* Hase 1 en fonction de la concentration d'*Aa* Hase 1, pour différentes quantités de CNFs_H2 dans le mélange. Violet : 1 couche (285 $\mu g.cm^{-2}$) ; Vert : 2 couches (570 $\mu g.cm^{-2}$) ; Rouge : 3 couches (855 $\mu g.cm^{-2}$). Le courant catalytique est mesuré sur des courbes de CV à -0,3 V vs. Ag/AgCl. Mesures réalisées dans du tampon Hepes 50mM ; pH 6,8 ; T=60°C ; $\omega=0$ rpm ; H_2 en surpression au dessus de l'électrolyte ; $v=5$ mV.s⁻¹.

Les densités de courant enregistrées sont inférieures à celles qui étaient observées avec le protocole précédent: le maximum est $505 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$, contre $1,1 \text{ mA}\cdot\text{cm}^{-2}$. L'ajout d'un médiateur redox n'améliore pas les performances du système. La limitation n'est donc *a priori* pas due à une orientation défavorable de l'hydrogénase sur les CNFs.

Pour tâcher de comprendre la limitation des densités de courant, on compare par spectroscopie d'impédance électrochimique deux films composés de la même quantité de CNFs et d'hydrogénase, mais réalisés suivant les deux protocoles précédemment définis (le premier film est réalisé par adsorption *ex situ* de l'hydrogénase sur les CNFs, le second par adsorption d'hydrogénase sur le film de CNFs formé au préalable sur l'électrode). Le spectre obtenu est complexe, tout au moins dans le cas de l'adsorption de l'enzyme, suggérant la superposition de plusieurs phénomènes. On l'analyse néanmoins d'après le modèle de Randles. Pour la même quantité de CNFs, la résistance de transfert de charge (R_{TC}) passe de $1,2 \text{ k}\Omega$ pour le film de CNFs seul à $14 \text{ k}\Omega$ après adsorption de l'hydrogénase. Cette R_{TC} est bien plus élevée dans le cas de l'adsorption *ex situ* que dans le cas du dépôt successif d'hydrogénase et de CNFs, et atteint $40 \text{ k}\Omega$ (Figure 44). Ce résultat suggère que les molécules d'hydrogénase, de nature diélectrique, agissent comme un isolant entre les CNFs. L'efficacité du transfert électronique dans la bioélectrode est alors diminuée. On peut également expliquer l'instabilité mécanique du film, observée dans des concentrations relativement faibles d'hydrogénase, par la diminution des interactions stabilisantes entre les fibres en présence d'hydrogénase.

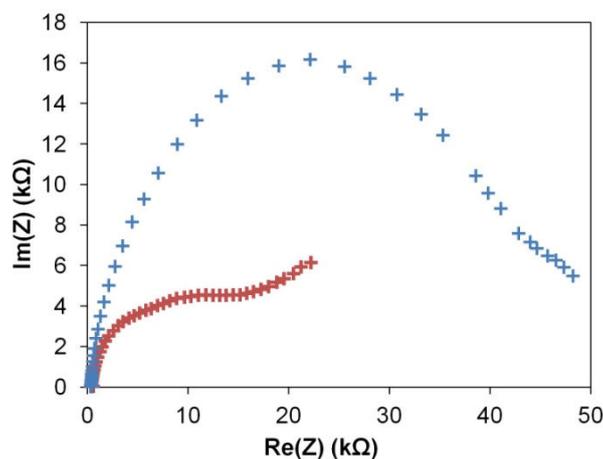


Figure 44 - Diagramme de Nyquist obtenu par spectroscopie d'impédance électrochimique du film de CNFs après adsorption de l'hydrogénase (points rouges), et du film formé par mélange de CNFs et d'hydrogénase (points bleus). Les quantités de CNFs et d'enzyme sont dans les deux cas respectivement $2,5 \mu\text{g}$ de CNFs et $12,5 \cdot 10^{-6} \mu\text{mol}$ d'hydrogénase. Mesure réalisée dans Hepes 50 mM pH 7,2 à température ambiante et en présence de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ (2 mM).

Par ailleurs, la solution d'enzyme contient du détergent utilisé au cours de la purification de l'hydrogénase. Des études antérieures de PM-IRRAS ont montré que le détergent non lié à l'enzyme est chassé lors de l'immobilisation de l'hydrogénase sur les surfaces hydrophobes. Avec ce protocole

néanmoins, il est contraint à l'intérieur du réseau de CNFs et peut peut-être également jouer le rôle d'isolant.

On tente également d'intercaler sur l'électrode des couches de CNFs, obtenues par dépôt et séchage d'une suspension de CNFs, et des couches d'hydrogénase, obtenues par adsorption d'une solution d'hydrogénase. Ce protocole se montre de la même manière moins efficace que le premier protocole vis-à-vis de l'oxydation de l' H_2 par l'*Aa* Hase 1.

III-4- Le transport de masse

III-4-a- Limitation

Les expériences décrites dans le paragraphe précédent ont mis en évidence un phénomène de limitation. De plus, lorsque l'hydrogénase est adsorbée sur les CNFs, à l'exception des CNFs_H2O2, la forme du signal de CV d'oxydation de l' H_2 est considérablement modifiée par rapport à ce qui est observé lorsque l'hydrogénase est adsorbée sur une électrode de graphite ou sur une électrode d'or modifiée par des SAMs (Figure 45).

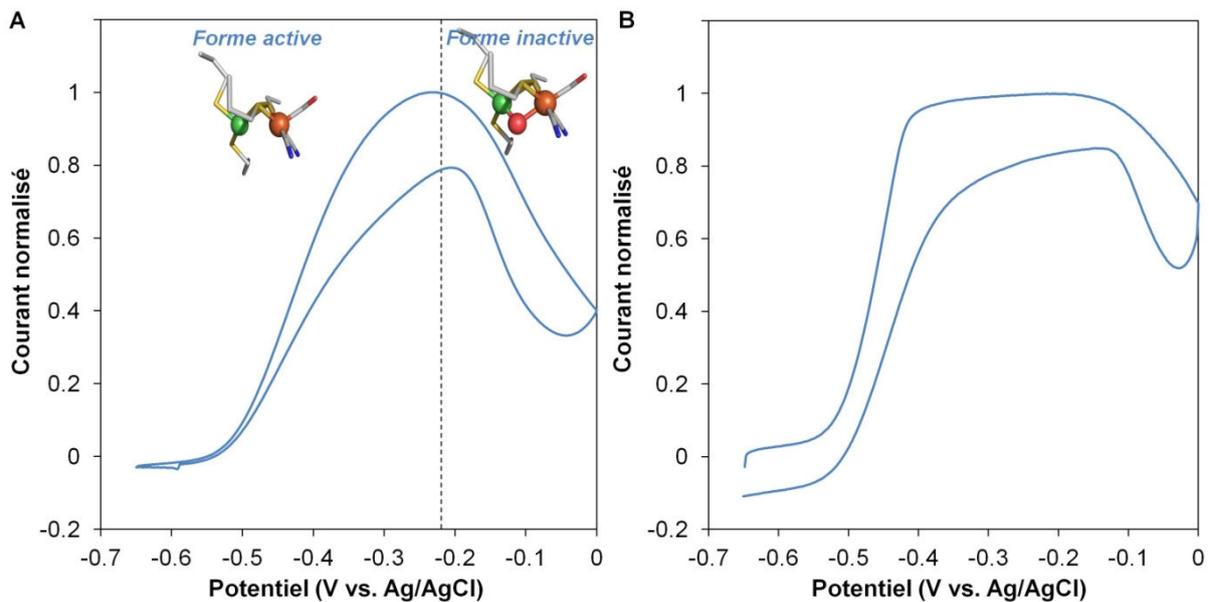


Figure 45 – Comparaison de la forme du signal d'oxydation de H_2 en voltammétrie cyclique par l'*Aa* Hase 1 adsorbée sur une électrode de graphite pyrolytique (A) ou sur les CNFs_H2 (B). Voltammétrie cyclique réalisée dans du tampon Hepes pH 7,2 ; $T = 60^\circ C$; électrolyte saturé en H_2 ; H_2 en surpression au dessus de l'électrolyte ; $v = 5 \text{ mV.s}^{-1}$.

Cette forme observée habituellement est caractéristique des états du site actif à [Ni-Fe] de l'hydrogénase, et reflète notamment la formation d'un état inactif (Figure 45 A). Lorsque l'hydrogénase est adsorbée sur les CNFs, la pente initiale du signal est supérieure (dans le cas de la normalisation des deux signaux, la pente est 2,5 fois supérieure avec les CNFs), le courant maximal

est atteint pour un potentiel inférieur, et on observe l'apparition d'un plateau avec une densité de courant constante sur un intervalle d'environ 300 mV. Cette forme avait déjà été observée dans le cas où l'hydrogénase était mélangée avec les CNTs [5].

La pente du signal observée habituellement avant la formation de l'état inactif est attribuée à une distribution continue d'orientations de l'hydrogénase à la surface de l'électrode. La distance entre le centre [FeS] distal et la surface peut donc en théorie prendre toutes les valeurs dans un intervalle. Il en résulte une distribution continue de constantes de vitesse catalytique apparentes, qui se traduit par une pente résiduelle dans le signal de CV [31]. Dans le cas où, au contraire, le centre [FeS] distal de l'hydrogénase serait à une distance minimale de la surface pour toutes les molécules d'hydrogénases, on tendrait vers le cas limite d'une orientation unique qui se traduit par une constante de vitesse catalytique apparente unique et donc par l'apparition d'un plateau à un potentiel voisin de celui du FeS distal. On peut supposer que ce cas se produit pour une porosité adaptée à l'immobilisation de l'enzyme, qui serait dans toutes les configurations étroitement entourée par le matériau conducteur.

Mais on peut également supposer que cette forme en plateau est seulement due à la limitation par le transport de masse du substrat. Ainsi, un plateau était également observé pour l'oxydation de l'H₂ par l'hydrogénase d'*E. coli* immobilisée sur des MW-CNTs sur une électrode statique et sans agitation de la solution. Il disparaissait lorsqu'une électrode tournante était utilisée.

Dans toutes les expériences réalisées précédemment, l'électrolyte est saturé en H₂, et H₂ est continuellement en surpression au dessus de l'électrolyte. Le substrat doit donc essentiellement être apporté par diffusion. Or le courant théorique maximal en régime uniquement diffusionnel peut être calculé d'après l'équation de Cottrell :

$$i(t) = \frac{nFAD_0^{1/2}C_0^*}{\pi^{1/2}t^{1/2}}$$

Où n est le nombre d'électrons échangés, F est la constante de Faraday, A est l'aire géométrique de l'électrode, D_0 est le coefficient de diffusion en solution de l'espèce considérée, et C_0^* est la concentration initiale de l'espèce redox (considérée homogène) [32]. On peut en déduire l'expression de l'intensité en fonction du potentiel, $i(E)$, à vitesse de balayage constante v . Lors du balayage anodique du 1^{er} scan, on a :

$$i(E) = \frac{nFAD_0^{1/2}C_0^*v^{1/2}}{\pi^{1/2}|E - E_0|^{1/2}}$$

($E \neq E_0$)

E_0 étant le potentiel auquel « commence » la réaction électrochimique. Ce potentiel est difficile à définir, par la suite on le définira comme le potentiel auquel la densité de courant catalytique atteint la valeur raisonnable de $j = 5 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$. Cette expression nous permet de calculer le courant théorique maximal pour l'oxydation de l' H_2 diffusant à l'électrode, et de le comparer au courant enregistré expérimentalement lors d'expériences de CV.

Une valeur raisonnable du coefficient de diffusion est $D_0 = 2 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$. On choisit pour C_0^* la valeur maximale donnée par la solubilité de l'hydrogène dans l'eau à 60°C : $C_0^* = 0,6 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$. La vitesse de balayage est $v = 5 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ et $E_0 = 0,56 \text{ V}$. Le courant théorique ainsi calculé est très inférieur au courant expérimental (sur la figure 46, on a additionné le courant calculé et le courant capacitif). Au contraire, dans le cas où l'hydrogénase est immobilisée sur une électrode de graphite, le courant limite théorique est légèrement supérieur au courant obtenu expérimentalement (Figure 46, courbes rouges).

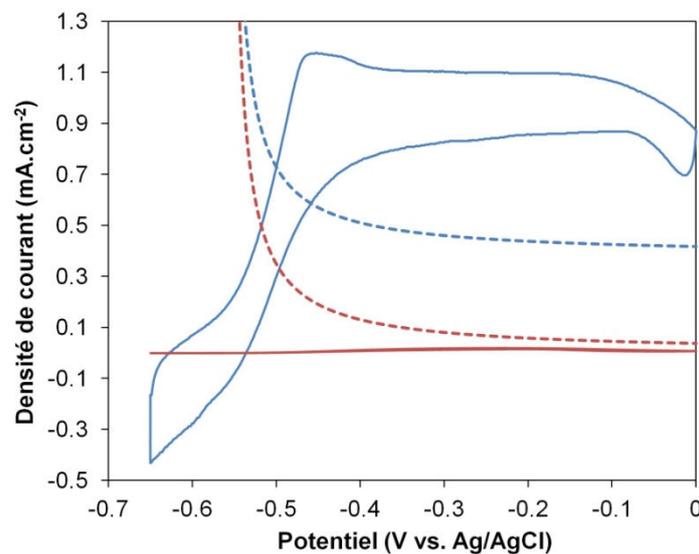


Figure 46 – Courbes de voltammétrie cyclique (trait plein) de l'hydrogénase adsorbée sur des CNFs_H2 (courbe bleue) et sur une électrode de PG (courbe rouge). Les courbes en trait pointillé indiquent le courant théorique maximal obtenu en régime uniquement diffusionnel calculé d'après l'équation de Cottrell pour une électrode modifiée par les CNFs (courbe bleue, somme du courant catalytique théorique et courant capacitif mesuré) et pour une électrode de graphite (courbe rouge). Voltammétrie cyclique réalisée dans du tampon Hepes pH 7,2 ; $T = 60^\circ\text{C}$; électrolyte saturé en H_2 ; H_2 en surpression au dessus de l'électrolyte ; $v = 5 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

Dans un régime uniquement diffusionnel, le courant ne peut pourtant pas excéder cette valeur limite. On en déduit que d'autres mécanismes de transport de matière sont en jeu. Il peut s'agir de convection naturelle due aux différences de températures. La cellule est en effet trempée dans un bain-marie à 60°C , on peut donc supposer l'existence d'un gradient de température à l'interface. On peut néanmoins supposer que le mécanisme principal soit la convection forcée imposée par le flux de gaz au dessus de l'électrolyte.

Un cas similaire est décrit dans la littérature. La réduction de l'oxygène est réalisée par une cathode enzymatique basée sur l'encapsulation de BOD et de SW-CNTs dans une matrice de silice. Les auteurs ont remarqué également que le courant catalytique observé excédait le courant théorique maximal donné par l'équation de Cottrell [33]. Les mouvements convectifs du liquide dans la cellule électrolytique ont alors été mesurés par vélocimétrie par imagerie de particules. Ces mesures montrent en particulier qu'un flux de gaz de $50 \text{ cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$, issu d'une buse située quelques mm au dessus de l'électrolyte, provoque des mouvements elliptiques de la solution. La vitesse de ces flux de matière atteint plusieurs centaines de $\mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$. Dans notre cas, un flux de gaz est également imposé à la surface de l'électrolyte, pour maintenir une surpression d' H_2 , et donc une concentration surfacique maximale. On en déduit que, de façon similaire au cas décrit, la convection n'est pas négligeable, ce qui explique qu'on puisse obtenir des densités de courant si élevées.

III-4-b- Analyse grâce à l'électrode tournante

Cette convection non maîtrisée n'est peut être néanmoins pas suffisante pour lever la limitation par le transport de masse. On réalise donc des expériences à l'aide d'une électrode tournante. La rotation a pour effet de diminuer considérablement l'épaisseur de la couche de diffusion à la surface de l'électrode. On compare à nouveau la forme des signaux de CV d'oxydation de l' H_2 par une hydrogénase adsorbée sur l'électrode de PG (Figure 47 A) et sur un film de CNFs (Figure 47 B). Pour comparer uniquement la forme des signaux, les courants sont normalisés par rapport au courant maximal obtenu. Un premier cycle est enregistré à vitesse de rotation nulle (courbes bleues) et un second cycle est enregistré à une vitesse de rotation de 1000 rpm (courbes rouges).

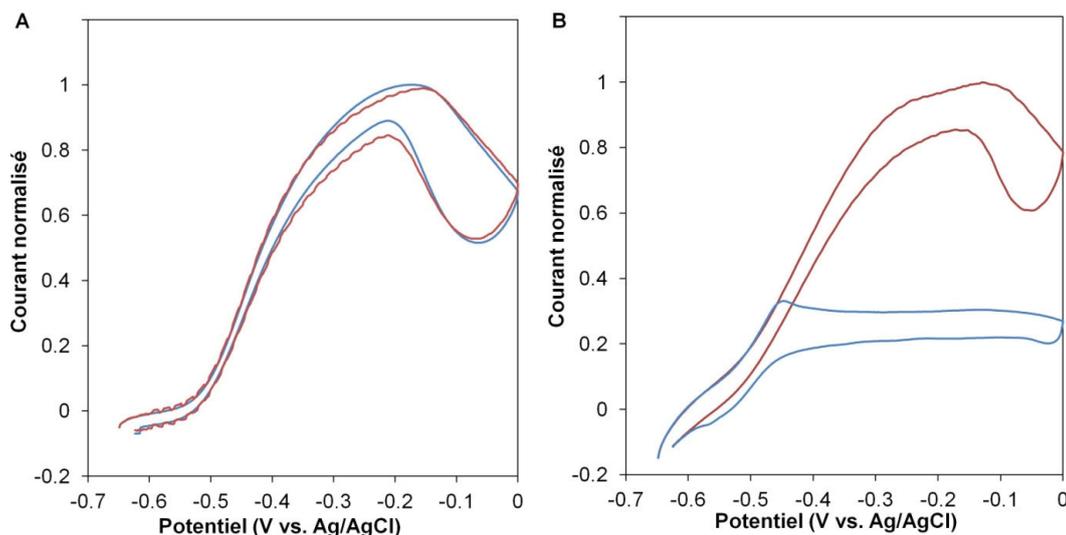


Figure 47 – Voltammétrie cyclique de l'oxydation de H_2 par l'Aa Hase 1 adsorbée sur une électrode de graphite pyrolytique (A) ou sur les CNFs_H2 (B) à $\omega = 0 \text{ rpm}$ (courbes bleues) et $\omega = 1000 \text{ rpm}$ (courbes rouges). Voltammétrie cyclique réalisée dans du tampon Hepes pH 7,2 ; $T = 60^\circ\text{C}$; électrolyte saturé en H_2 ; 1 atm H_2 en surpression au dessus de l'électrolyte ; $v = 5 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$.

Dans le cas de l'électrode de PG non modifié, une légère diminution du signal est observée entre les deux cycles consécutifs. Elle est également observée en l'absence de rotation et peut être attribuée à différents facteurs dont la perte de l'enzyme, sa désactivation et sa réorientation [8, 29]. Au contraire, lorsque l'hydrogénase est adsorbée sur les CNFs, la densité de courant est plus que doublée et la forme du plateau est bien moins prononcée. Ce résultat confirme que le plateau observé dans des conditions statiques est le résultat de la limitation par le transport de masse. Cette limitation est alors étudiée en fonction de la quantité de CNFs_H2 déposée à l'électrode, afin d'évaluer la limitation du transport à l'intérieur du film de CNFs_H2.

L'analyse de Koutecky-Levich est basée sur l'utilisation d'une électrode tournante (RPG) pour étudier les réactions limitées par le transport de masse. L'inverse de l'intensité i du courant à une RPG s'exprime comme la somme des inverses du courant cinétique en l'absence de limitation par le transport de masse i_k , et du courant limité par la diffusion i_l :

$$\frac{1}{i} = \frac{1}{i_l} + \frac{1}{i_k}$$

Le courant i_k est proportionnel à la racine carrée de la vitesse de rotation ω :

$$\frac{1}{i} = \frac{1}{a \omega^{1/2}} + \frac{1}{i_k}$$

L'expression complète fait intervenir deux termes de surface A et A' , qui doivent être distingués. A est en effet la surface projetée de l'électrode (issue d'un terme de flux de matière) et A' la surface électroactive de l'électrode (issue d'un terme de flux de charge) :

$$\frac{1}{i} = \frac{1}{0.62nFAD_0^{2/3} \nu^{-1/6} C_0^* \omega^{1/2}} + \frac{1}{nFA'k_f(E)C_0^*}$$

Dans cette équation, n est le nombre d'électrons échangés, F est la constante de Faraday, D_0 est le coefficient de diffusion de l'espèce considérée, C_0^* est la concentration initiale de l'espèce redox considérée (considérée homogène), $k_f(E)$ est la constante cinétique au potentiel considéré, et ν est le coefficient de viscosité cinématique de la solution.

Pour le film de CNFs le plus épais (3 couches de CNFs), l'inverse du courant catalytique est une fonction linéaire de l'inverse de la racine carrée de la vitesse de rotation, jusqu'à une vitesse de 1000 rpm. Cette droite dans le tracé de Koutecky-Levich caractérise un procédé contrôlé par le transport de masse (Figure 48). Le courant maximal prédit, donné par l'inverse de l'ordonnée à l'origine (limite quand $\omega \rightarrow \infty$), est de 6,5 mA.cm⁻².

Pour le film le plus fin (1 couche de CNFs), l'inverse du courant catalytique n'est une fonction linéaire de l'inverse de la racine carrée de la vitesse de rotation que pour les plus faibles vitesses. Les courants sont contrôlés par la cinétique de la réaction enzymatique pour des vitesses de rotation supérieures à 400 rpm. Le courant maximal théorique est cette fois de 1,2 mA.cm⁻².

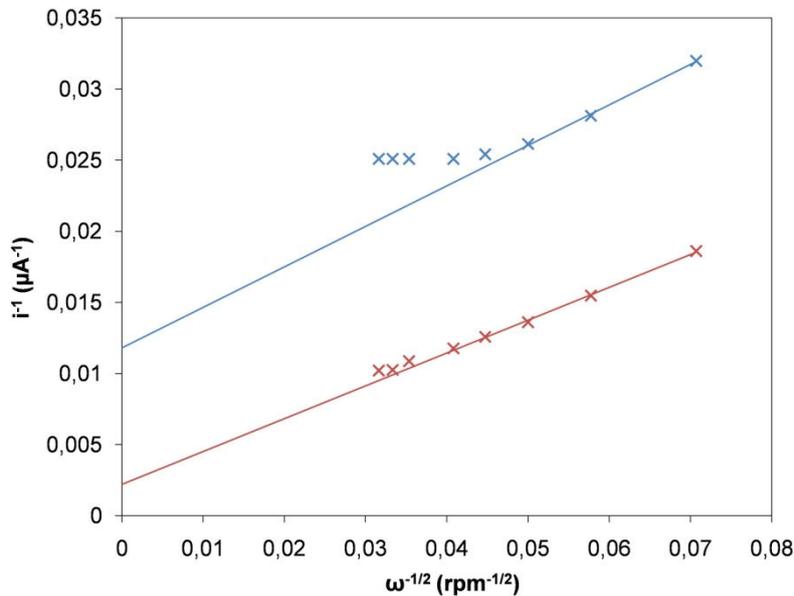


Figure 48 – Tracé de Koutecky-Levich : inverse de l'intensité du courant exprimée en fonction de l'inverse de la racine carrée de la vitesse de rotation de l'électrode. Les valeurs de l'intensité (à $E=-0,3$ V vs. Ag/AgCl) sont issues des courbes de voltammétrie cyclique de l'oxydation de H_2 par l'Aa Hase 1 adsorbée sur les CNFs_H2 déposées sur le support de PG d'une électrode tournante pour deux épaisseurs de films : 1 couche 285 $\mu g.cm^{-2}$ (courbe bleue) et 3 couches 855 $\mu g.cm^{-2}$ (courbe rouge). Voltammétrie cyclique réalisée dans du tampon Hepes pH 7,2 ; $T = 60^\circ C$ électrolyte saturé en H_2 ; 1 atm H_2 en surpression au dessus de l'électrolyte ; $v = 5 mV.s^{-1}$.

L'augmentation des densités de courant avec la vitesse de rotation montre que la porosité n'est pas encore optimisée pour un transport efficace de substrat. Cette dernière remarque est d'autant plus vraie que la densité du film de CNFs formé à l'électrode est importante.

On constate également que la pente des droites est quasiment égale pour les deux épaisseurs de films, de façon cohérente avec l'égalité des surfaces projetées des deux électrodes. En revanche, l'ordonnée à l'origine est plus faible pour le film le plus épais, ce qui traduit l'augmentation de la surface développée.

Ce comportement est cohérent avec les observations faites pour l'oxydation de l' O_2 en TED par une BOD immobilisée dans une électrode poreuse de matériau carboné [34]. L'évolution du courant avec la vitesse de rotation est également étudiée pour plusieurs épaisseurs de film. Pour toutes les épaisseurs, le courant augmente avec la vitesse de rotation de l'électrode. De la même manière, l'intervalle de vitesse correspondant au domaine de linéarité augmente avec l'épaisseur du film.

Dans ces deux cas, la dépendance de la densité de courant à la vitesse de rotation peut être expliquée à l'aide du modèle établi par Bonnacaze pour une électrode tournante poreuse [35]. L'évolution des courants avec la vitesse de rotation est alors une fonction de la variation du débit du fluide dans le milieu poreux, de la pénétration du réactif dans le milieu poreux, et de la variation associée du rapport entre le temps de réaction et le temps de résidence du fluide dans les pores, ces termes variant de façon non linéaire avec la vitesse de rotation. Cependant, contrairement à Bonnacaze, on n'observe pas ici de densités de courant supérieures à la limite prédite par Lévich.

L'augmentation de la densité de courant catalytique avec la vitesse de rotation de l'électrode est donc due à une augmentation de l'efficacité de la diffusion d' H_2 dans le film de CNFs. Il en résulte soit une augmentation du nombre de molécules d'hydrogénases qui participent au courant global, soit une augmentation de la constante catalytique apparente des hydrogénases qui participent à la catalyse. Pour pouvoir discriminer l'importance relative de ces deux mécanismes, il faudrait cependant pouvoir établir les profils de concentration d' H_2 dans les films mésoporeux, ainsi que des profils de répartition de l'enzyme dans le film.

c- Flux d' H_2 dans l'électrolyte

Cependant, dans l'optique de développer une biopile enzymatique, il convient de trouver une méthode moins énergivore que la rotation de l'électrode pour surmonter le problème de limitation par le transport de masse. L'agitation par un barreau magnétique ne peut être retenue non plus pour la même raison. L'injection du flux d'hydrogène directement dans l'électrolyte est une solution adaptée, qui a comme conséquence d'agiter la solution électrolytique et de fournir le substrat en permanence à proximité de l'électrode. On retrouve exactement l'évolution des signaux de CV d'oxydation de l' H_2 observée avec la rotation de l'électrode (Figure 49). L'injection du gaz en solution permet donc un apport efficace du substrat.

On vérifie dans ces conditions que le signal d'oxydation de l' H_2 par l'Aa Hase 1 adsorbée sur PG nue n'est pas affecté par le mode de transport de substrat, donc que ce phénomène n'est pas limitant. Ce phénomène peut se comprendre simplement, puisque le nombre d'hydrogénases connectées à l'électrode est bien moins important (même s'il n'est pas possible de le quantifier). La diffusion de l'hydrogène, et les phénomènes de convection non contrôlés évoqués plus haut suffisent donc dans ce cas à fournir le substrat suffisamment rapidement.

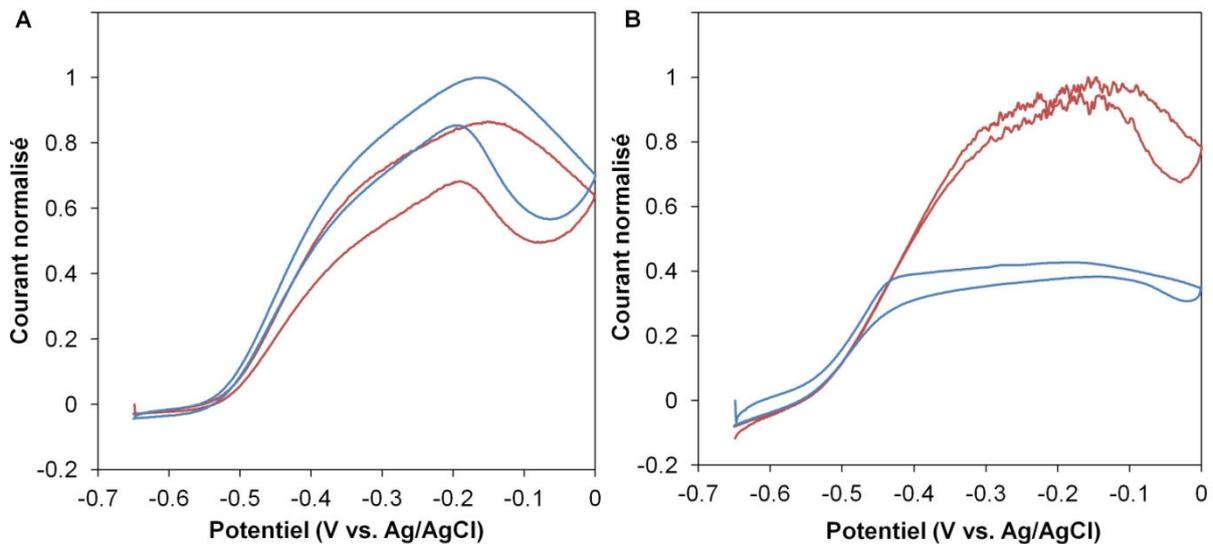


Figure 49 - Voltammétrie cyclique de l'oxydation de H_2 par l'Aa Hase 1 adsorbée sur une électrode de graphite pyrolytique (A) ou sur les CNFs_H2 (B) avec électrolyte saturé en H_2 ; 1 atm H_2 en surpression au dessus de l'électrolyte (courbes bleues) et bullage H_2 dans l'électrolyte (courbes rouges). Voltammétrie cyclique réalisée dans du tampon Hepes pH 7,2 ; $T = 60^\circ C$; $v = 5 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$; $\omega = 0 \text{ rpm}$.

Cette constatation conduit à évaluer l'importance de l'épaisseur du film de CNFs dans ce phénomène de limitation. On effectue une mesure de chronoampérométrie à un potentiel inférieur au potentiel de formation de l'état Ni-B, $-0,3 \text{ V vs. Ag/AgCl}$. Le mode d'apport de substrat alterne régulièrement entre la surpression au dessus de l'électrolyte et l'injection directe dans l'électrolyte, le flux étant maintenu constant (Figure 50). La réponse en courant à ce changement est immédiate, et d'autant plus importante que le film de CNFs est épais. La différence entre les courants maximaux obtenus dans les deux modes d'apport de substrat augmente avec l'épaisseur du film de CNFs (Figure 50 A). La proportion d'hydrogénases qui ne participent pas au signal, ou la proportion d'enzymes pour qui la concentration apparente d' H_2 est inférieure à K_M^1 et qui convertissent donc H_2 à une vitesse $v < V_{\max}^1$, augmente donc également. Dans ce mode d'apport du substrat, les courants maximaux obtenus augmentent également avec l'épaisseur du film de CNFs, ce qui montre bien que le nombre d'hydrogénases connectées augmente avec l'augmentation de la surface développée (Figure 50 B). Au contraire, une saturation est observée pour les plus grandes quantités de CNFs lorsque l' H_2 est uniquement en surpression au dessus de l'électrolyte. Ce résultat peut être rapproché de l'observation faite pour les SW-CNTs-COOH, où l'augmentation de la quantité de CNTs se traduisait par une augmentation de la surface développée mais une stabilisation des courants catalytiques. Dans le cas des CNTs cependant, l'hypothèse de l'indisponibilité de l'enzyme ne peut pas être totalement écartée puisqu'on a toujours travaillé avec une solution d'enzyme de concentration fixe.

¹ La vitesse v de conversion du substrat par une enzyme dépend de la concentration en substrat. Dans le modèle de cinétique enzymatique de Michaelis et Menten, V_{\max} est la vitesse maximale de conversion du substrat, et la constante de Michaelis K_M correspond à la concentration de substrat pour laquelle $v = V_{\max}/2$.

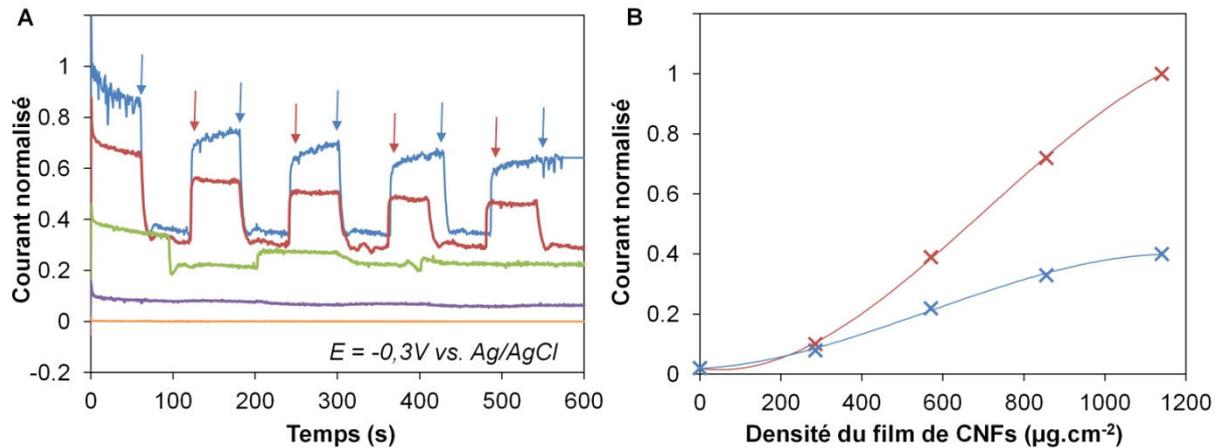


Figure 50 – Evolution de la densité de courant d'oxydation de l' H_2 à $-0,3 V$ vs. $Ag/AgCl$ par l'Aa Hase 1 adsorbée sur les CNFs_H2 en fonction du mode d'apport du substrat. A : Evolution du courant en réponse au changement régulier figuré par les flèches bleues (H_2 en surpression au dessus de l'électrolyte) et rouges (flux d' H_2 injecté dans l'électrolyte) pour différentes épaisseurs du film de CNFs : $1140 \mu g.cm^{-2}$ (courbe bleue), $855 \mu g.cm^{-2}$ (courbe rouge) ; $576 \mu g.cm^{-2}$ (courbe verte) ; $285 \mu g.cm^{-2}$ (courbe violette) et 0 (courbe orange). B : Evolution du courant maximal dans les conditions de flux d' H_2 injecté dans l'électrolyte (courbe rouge) et d' H_2 en surpression au dessus de l'électrolyte (courbe bleue), en fonction de la densité du film de CNFs formé à l'électrode. Tampon Hepes pH 6,8 ; $T = 60^\circ C$; électrolyte saturé en H_2 ; $1 atm H_2$ en surpression au dessus de l'électrolyte ; $v = 5 mV.s^{-1}$.

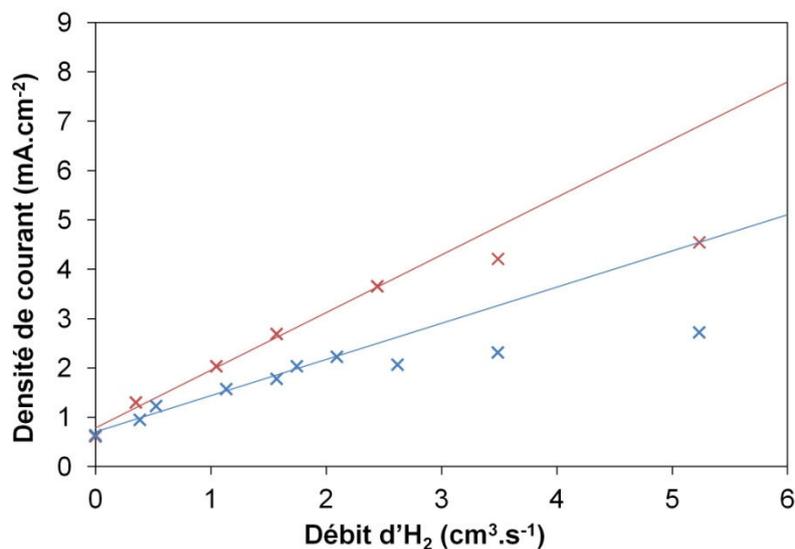


Figure 51- Evolution avec le débit d' H_2 des densités de courants d'oxydation de l' H_2 par l'Aa Hase 1 adsorbée sur les CNFs_H2 pour deux épaisseurs de films : 3 couche $855 \mu g.cm^{-2}$ (courbe bleue) et 4 couches $1140 \mu g.cm^{-2}$ (courbe rouge). Les courants sont mesurés à $-0,3 V$ vs. $Ag/AgCl$ sur les courbes de CV. Expériences réalisées dans du tampon Hepes pH 7,2 ; $T = 60^\circ C$; flux d' H_2 injecté dans l'électrolyte ; $v = 5 mV.s^{-1}$.

Une influence du débit de gaz sur les densités de courant est logiquement attendue. On fait donc varier le débit du flux d' H_2 injecté dans l'électrolyte afin de déterminer la condition donnant les densités de courant optimales. La figure 51 montre l'évolution des densités de courant en fonction du

débit d' H_2 pour deux épaisseurs du film de CNFs. L'évolution est linéaire pour les plus faibles débits, puis atteint une valeur limite qui dépend de l'épaisseur du film de CNFs. Le courant maximal atteint dans ces conditions est $4,5 \text{ mA}\cdot\text{cm}^{-2}$, ce qui est la valeur maximale jamais atteinte avec l'*Aa Hase 1*, et une des valeurs les plus élevées enregistrées dans la littérature pour une électrocatalyse enzymatique.

III-5- Paramètres d'adsorption de l'hydrogénase sur les CNFs_H2

Une fois déterminées les conditions optimales de composition de la bioélectrode et d'apport de l' H_2 , les cinétiques et isothermes d'adsorption, ainsi que les paramètres opératoires comme la température et le pH sont réexaminés.

III-5-a- Cinétique d'adsorption

L'électrode modifiée par un film de CNFs_H2 est incubée pendant différentes durées dans une solution d'hydrogénase. On évalue alors la cinétique d'adsorption de l'hydrogénase sur les CNFs_H2 par mesure du courant d'oxydation de l' H_2 en voltammétrie cyclique. Deux modes d'apport du substrat sont choisis : surpression d' H_2 au dessus d'un électrolyte saturé en H_2 , et injection directe de l' H_2 dans l'électrolyte (Figure 52). Le deuxième mode permet de constater deux phases de l'adsorption. Au cours des cinq premières minutes les courants augmentent rapidement, puis l'évolution est plus lente. Comme l'évolution des courants catalytiques et de la stabilité avec la durée d'adsorption le laissait suggérer (cf. paragraphe 3-b-i, Figure 41, p 133), on peut penser à une organisation en plusieurs étapes des enzymes dans le film de CNFs. Pour la suite des expériences, une durée d'incubation d'une heure est donc adoptée.

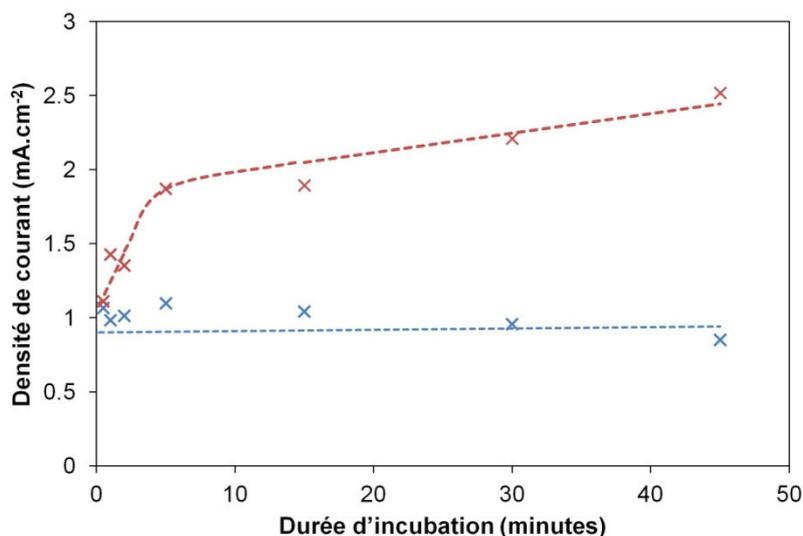


Figure 52 - Cinétique d'adsorption de l'*Aa Hase 1* sur les CNFs_H2, évaluée par mesure du courant d'oxydation de l' H_2 à $E=-0,3 \text{ V vs. Ag/AgCl}$ en voltammétrie cyclique dans un électrolyte saturé en H_2 et sous

suppression d'H₂ (points bleus), ou avec le flux d'H₂ injecté dans l'électrolyte (points rouges). Cinétique réalisée par incubation de l'électrode modifiée par les CNFs dans 15 µL de solution d'hydrogénase à 5 µM à 4°C. Voltammétrie cyclique réalisée dans du tampon Hepes 50 mM ; pH 6,8 ; T=60°C ; ω=0 rpm ; ν= 5 mV.s⁻¹.

III-5-b- Isotherme d'adsorption

L'isotherme d'adsorption de l'Aa Hase 1 sur les CNFs_H2 est à nouveau évaluée par mesure du courant d'oxydation de l'H₂ en voltammétrie cyclique après incubation de l'électrode modifiée par les CNFs_H2 dans des solutions d'hydrogénase de différentes concentrations (Figure 53). On observe une croissance rapide pour les concentrations d'hydrogénase inférieures ou égales à 2µM. Aux plus faibles concentrations, les points sont confondus pour les différentes quantités de CNFs constituant le film et les différentes conditions d'apport de substrat. On a ensuite apparition d'un plateau pour le film le plus fin, et d'une croissance plus lente pour le film le plus épais.

L'expérience d'isotherme d'adsorption précédente (cf. paragraphe III-3-b-i, Figure 42) avait montré qu'après adsorption de l'hydrogénase sur les CNFs, il restait de l'hydrogénase active même dans les solutions de plus faible concentration. Pourtant, dans des conditions favorables d'apport du substrat, on voit que la quantité d'hydrogénase adsorbée augmente avec la concentration de la solution jusqu'à 10 µM. Ce résultat signifie que, même pour les plus faibles concentrations, la totalité de l'enzyme n'est pas adsorbée alors que la surface des CNFs n'est pas saturée par l'hydrogénase. Ce fait découle peut être d'un problème de transport de l'enzyme dans le petit volume de solution qui peut pénétrer par capillarité dans le réseau de CNFs, puisque l'adsorption est réalisée sans agitation pour des raisons techniques. Cette hypothèse pourrait expliquer que l'utilisation d'une solution plus concentrée soit plus efficace. En effet, si l'enzyme est transportée par diffusion dans la solution, plus le gradient de concentration est important, plus la vitesse de diffusion est grande. En conséquence, plus la solution est concentrée, plus l'hydrogénase pénètre dans le réseau de CNFs et a accès à la surface développée à l'électrode. Pour la suite des expériences, une concentration de 5 µM est choisie comme un bon compromis entre la quantité d'hydrogénase utilisée et l'efficacité catalytique de la bioanode.

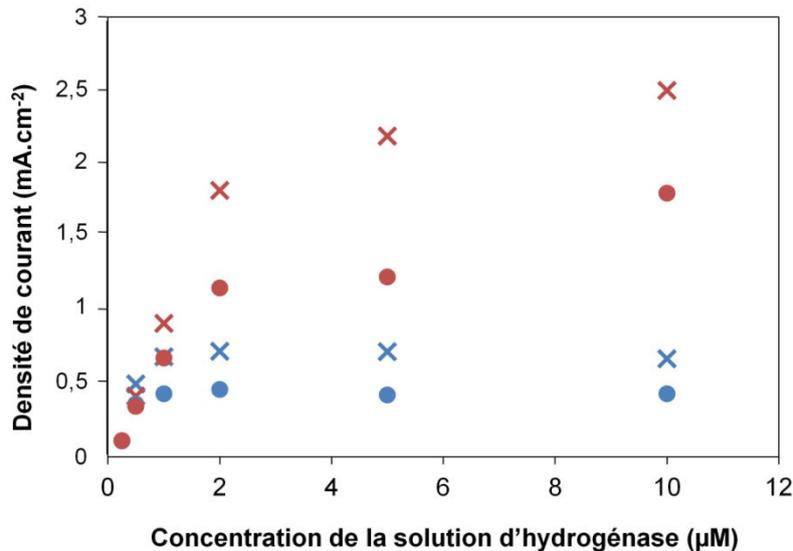


Figure 53 – Isotherme d'adsorption de l'Aa Hase 1 sur les CNFs_H2, évaluée par mesure du courant d'oxydation de l'H₂ à E=-0,3 V vs. Ag/AgCl en voltammétrie cyclique dans un électrolyte saturé en H₂ et sous suppression d'H₂ (points bleus), ou avec flux d'H₂ dans l'électrolyte (1 cm³.s⁻¹) (points rouges). Les disques indiquent les mesures pour une couche de CNFs (20 μg), et les croix pour trois couches de CNFs (60 μg). Isotherme réalisée par incubation de l'électrode modifiée par les CNFs dans 15 μL de solution d'hydrogénase à 4°C pendant une heure. Voltammétrie cyclique réalisée dans du tampon Hepes 50 mM ; pH 6,8 ; T=60°C ; ω=0 rpm ; ν= 5 mV.s⁻¹.

III-5-c- Influence de la température sur l'oxydation catalytique de l'H₂

L'influence de la température sur la catalyse électroenzymatique avait déjà été étudiée lorsque l'Aa Hase 1 était immobilisée sur PG, et sur PG modifiée par des CNTs [5] ou des CNPs. Sur les CNFs, on montre également que l'efficacité de la catalyse augmente avec la température de 30 à 70°C, comme l'indique l'expérience de CV représentée sur la figure 54. Les densités de courant de plateau sont multipliées par 1,7 entre 30 et 60°C. A partir de 70°C, bien que l'intensité maximale soit supérieure à ce qui est observé aux températures plus basses, on observe une altération de la forme du signal avec notamment une pente initiale plus faible (Figure 54). Cette altération de la pente fait penser à un transfert électronique plus lent, peut-être à cause d'une réorganisation du film d'hydrogénase avec la température. En catalyse homogène, un optimum de température de 80°C est observé [36]. L'hyperthermophilie de l'hydrogénase est donc conservée par l'adsorption sur les CNFs_H2.

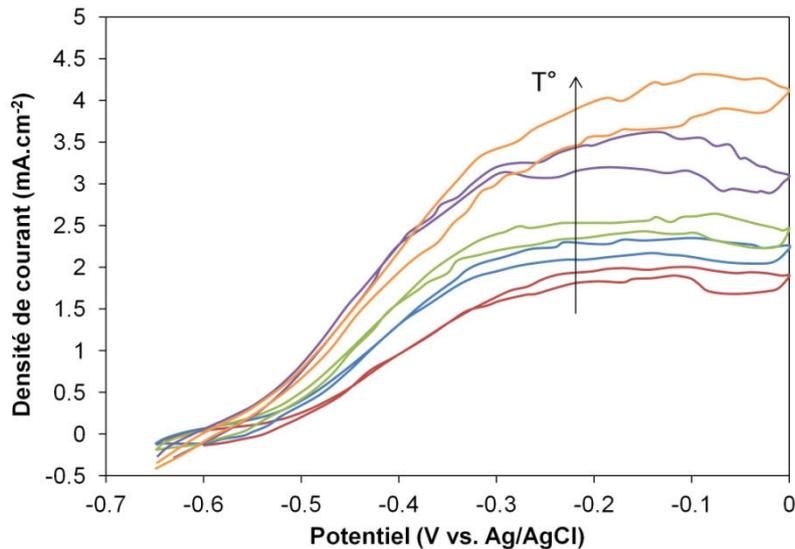


Figure 54 - Influence de la température sur les courants d'oxydation de H_2 par l'Aa Hase 1 adsorbée sur 3 couches de CNFs_H2 (60 μ g). La flèche indique l'augmentation de la température. CV à $T=30^\circ\text{C}$ (courbe rouge), $T=40^\circ\text{C}$ (courbe bleue), $T=50^\circ\text{C}$ (courbe verte) et $T=60^\circ\text{C}$ (courbe violette) et à $T=70^\circ\text{C}$ (courbe orange). CV réalisée dans du tampon Hepes pH 7,2 à température ambiante; $\omega=0$ rpm ; bullage H_2 dans l'électrolyte ; $v=5$ mV.s⁻¹.

III-5-d-Influence du pH sur l'oxydation catalytique de l' H_2

L'influence du pH de l'électrolyte sur le potentiel et l'intensité maximale du courant d'oxydation électroenzymatique de l'hydrogène par l'Aa Hase 1 adsorbée sur les CNFs_H2 est évaluée sur une gamme de pH acides à neutre. Le potentiel diminue de 0,06 V par unité de pH, ce qui est en accord avec la prédiction de la loi de Nernst pour l'oxydation à deux électrons de l' H_2 (Figure 55). L'intensité du courant croît lorsque le pH augmente de pH 4 à pH 7 (Figure 55), de façon cohérente avec l'augmentation d'activité observée de pH 5 à pH 7 lorsque l'Aa Hase 1 est immobilisée sur les SW-CNTs-COOH.

Lorsque l'Aa Hase 1 était immobilisée sur des SW-CNTs-COOH, on avait attribué au moins partiellement l'évolution des courants d'oxydation de l' H_2 avec le pH à l'évolution des interactions électrostatiques entre l'enzyme et les fonctions chimiques présentes à la surface de l'électrode. Dans le cas des CNFs_H2 hydrophobes, qui présentent peu de fonctions de surface, on suppose que l'adsorption est gouvernée par les propriétés texturales des CNFs et non pas par la chimie de surface. L'évolution des courants reflète donc vraisemblablement l'activité intrinsèque de l'Aa Hase 1.

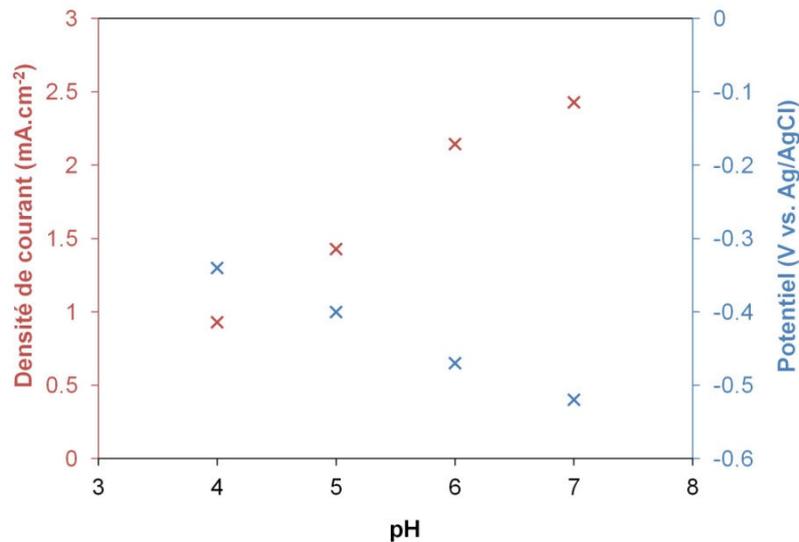


Figure 55 - Influence du pH sur le potentiel de catalyse (croix bleues) et sur les courants (croix rouges) d'oxydation de H_2 par l'Aa Hase 1 adsorbée sur 3 couches de CNFs_H2 (60 μg). Valeurs extraites d'expériences de CV : potentiel à $j = 5 \mu A.cm^{-2}$ et densité de courant à $E = -0,2 V$ vs. Ag/AgCl. $T=50^\circ C$; tampon phosphate-citrate (excepté tampon Hepes pour le pH 7); $\omega=0 rpm$; bullage H_2 dans l'électrolyte ; $v= 5 mV.s^{-1}$.

III-6- Quantification de l'enzyme adsorbée sur les CNFs_H2

La quantité d'enzyme effectivement adsorbée à l'électrode est une donnée essentielle pour connaître l'efficacité de l'immobilisation de l'hydrogénase sur le matériau, et permettre de déterminer la fréquence de turnover de l'enzyme dans une condition donnée. On peut ainsi espérer mieux discriminer les limitations du système.

Des essais de quantification préliminaires sont réalisés grâce au test d'activité en spectroscopie UV visible, en introduisant l'électrode modifiée par les CNFs et l'Aa Hase 1 dans l'orifice d'une cuve de spectroscopie. Ce test nécessite des conditions d'anaérobie stricte. Or des problèmes d'étanchéité et des problèmes d'homogénéité se posent lors de la mesure. Cette expérience n'est donc pas concluante et conduit à adopter d'autres méthodes de quantification.

III-6-a- Adsorption de l'hydrogénase sur les CNFs en suspension : Dosage du surnageant par le test de Bradford

Dans un premier temps, on réalise l'adsorption de l'*Aa* Hase 1 sur les fibres en suspension dans du tampon, ce qui va nous permettre de quantifier la capacité d'adsorption des CNFs pour l'hydrogénase. Les CNFs et l'*Aa* Hase 1 sont mélangés dans du tampon, et soumis à une agitation à température ambiante pendant 4h. Cette durée, plus longue que la durée adoptée en électrochimie, correspond au temps auquel l'équilibre est atteint d'après des cinétiques réalisées dans ces conditions avec d'autres protéines au sein du laboratoire IS2M (cytochrome c, BSA, glucose oxydase). Après décantation et centrifugation du mélange, on dose le surnageant par la méthode de Bradford.

Le test de Bradford est une méthode de dosage de protéines qui repose sur la liaison du colorant bleu de Coomassie aux protéines. Le colorant libre est brun. Lorsqu'il se lie aux acides aminés basiques et aromatiques des protéines, il prend une couleur bleue qui absorbe la lumière à la longueur d'onde de 595 nm. Pour doser une protéine, on réalise en général une courbe de calibration à l'aide d'une protéine soluble, la BSA. Néanmoins, dans le cas des protéines membranaires, le dosage peut être faussé par la présence de détergent qui empêche la liaison du bleu de Coomassie sur certains acides aminés et conduit donc à sous-estimer la quantité de protéines. Dans le cas de l'hydrogénase, le détergent est nécessaire pour solubiliser la protéine au cours de la purification, et on sait qu'il demeure en quantité non négligeable même après adsorption à l'aide de billes adsorbantes hydrophobes (BioBeads). On réalise donc une courbe de calibration à l'aide de l'hydrogénase elle-même (Figure 56).

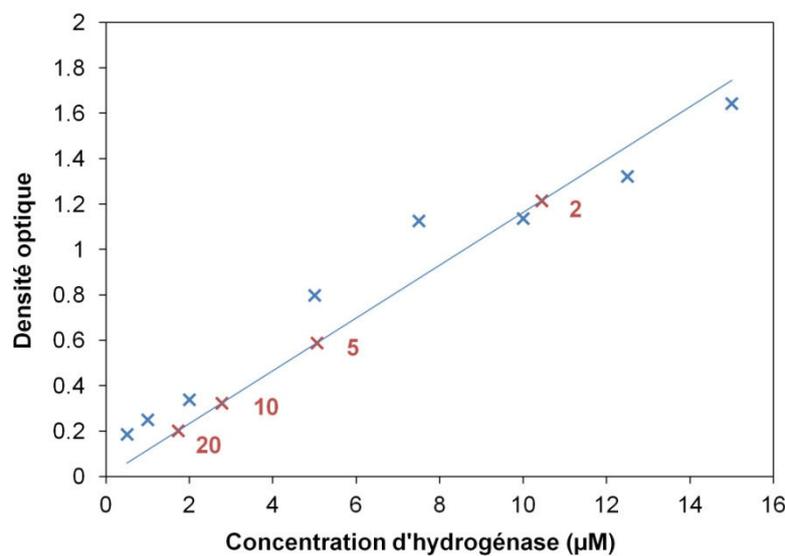


Figure 56 – Dosage de Bradford de l'*Aa* Hase 1 contenue dans le surnageant après adsorption sur les CNFs_H2. Courbe de calibration de l'*Aa* Hase 1 (points bleus et régression linéaire) et dosage du surnageant à différentes dilutions (points rouges). Les chiffres rouges indiquent le facteur de dilution du point correspondant.

La concentration d'*Aa* Hase 1 dans différentes dilutions (Figure 56) peut ensuite être déterminée. Par différence avec la valeur initiale, on calcule une quantité d'*Aa* Hase 1 adsorbée de

42,9 mg de protéine par gramme de CNFs. Pour les trois autres protéines citées plus haut, la capacité d'adsorption des CNFs est de $59,7 \pm 1,1$ mg de protéine par gramme de CNFs. Ces valeurs sont donc du même ordre de grandeur. Ces données suggèrent que l'adsorption est gouvernée par les propriétés texturales des CNFs_H2, ce qui est compréhensible puisque peu de fonctions oxygénées sont présentes à la surface des CNFs après le traitement thermique sous H₂.

La valeur plus faible dans le cas de l'Aa Hase 1 peut être attribuée au fait qu'il s'agit d'une protéine membranaire à laquelle est liée le détergent utilisé lors de la purification. Lors du dosage du détergent contenu dans la solution enzymatique, il est difficile de discriminer le détergent libre de celui lié à la protéine. Si le premier n'est théoriquement pas adsorbé dans le réseau de CNFs, le second est adsorbé avec l'enzyme. Il contribue donc à la masse totale adsorbée par les CNFs sans être pris en compte lors de la quantification par le dosage de Bradford.

III-6-b- Adsorption de l'hydrogénase sur le film de CNFs formé à l'électrode : présence d'hydrogénase dans le surnageant vérifiée par gel bleu natif

Lors des expériences d'électrochimie, l'Aa Hase 1 est adsorbée sur les CNFs_H2 après formation du film à l'électrode. Pour estimer l'efficacité de l'adsorption de l'hydrogénase dans ces conditions, on réalise un gel natif sur lequel sont déposées les solutions d'incubation après différentes durées d'incubation (Figure 57).

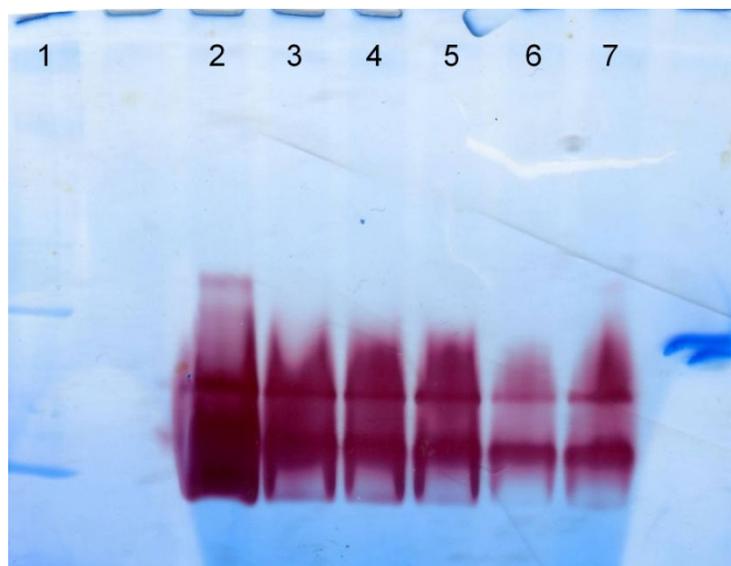


Figure 57 – Gel BN 5-15% du surnageant de la solution d'incubation de l'électrode modifiée par les CNFs. La couleur rouge caractérise l'activité d'oxydation de l'hydrogène par l'hydrogénase. 1 : échelle des poids moléculaires ; 2 : solution contrôle à 5 μ M ; 3 : surnageant après incubation de l'électrode pendant 30 minutes ; 4 : surnageant après incubation de l'électrode pendant 1 heure ; 5 : surnageant après incubation de

l'électrode pendant 2 heures ; 6 : surnageant après incubation de l'électrode pendant 4 heures ; 7 : surnageant après incubation de l'électrode pendant 6 heures.

Cette méthode en elle-même ne permet pas la quantification de l'hydrogénase restante, mais donne une idée de la cohérence entre l'adsorption ex situ et l'adsorption sur les CNFs du réseau tridimensionnel formé à l'électrode.

Dans cette expérience, l'électrode modifiée par les CNFs est incubée dans une solution d'hydrogénase de volume et de concentration calculés de telle sorte que la quantité d'hydrogénase présente corresponde à la quantité qui peut être adsorbée dans le film de CNFs en 4 h d'incubation, d'après le dosage de Bradford réalisé auparavant.

Le gel BN indique une activité de l'hydrogénase dans la solution pour toutes les durées d'incubation. Elle est cependant dans tous les cas moins intense que dans la solution contrôle, ce qui confirme qu'une partie de l'hydrogénase est bien adsorbée dans le réseau de CNFs. De plus, l'évolution de la couleur montre que la quantité d'hydrogénase restante diminue avec l'augmentation de la durée d'incubation et se stabilise vers 4h. Cependant, elle ne disparaît pas totalement, la quantité d'hydrogénase adsorbée est donc inférieure à ce qui était observé lors de l'adsorption dans la suspension de CNFs.

On peut expliquer cette contradiction apparente tout d'abord car on n'impose pas d'agitation, contrairement au cas de la suspension. Les molécules se déplacent donc uniquement par diffusion, ce qui est un phénomène lent. Ensuite, on peut supposer que l'accessibilité aux CNFs est plus contrainte dans le réseau que lorsque les CNFs sont séparées les unes des autres dans la suspension.

III-7- Stabilité du signal électroenzymatique d'oxydation de l'H₂ sur les films de CNFs

La stabilité du signal d'oxydation de l'H₂ par l'hydrogénase adsorbée sur CNFs_H2 est évaluée de plusieurs manières.

En CV, la décroissance de l'intensité catalytique s'effectue en deux phases : une phase rapide pendant les 20 premières minutes (perte de 1,75% par minute), une phase plus lente ensuite (perte de 0,2% par minute) (Figure 58 A). Au bout de dix cycles (soit 45 minutes), on n'observe plus que 60% de l'intensité initiale. Comme évoqué plus haut, cette décroissance peut être due à l'instabilité de l'immobilisation de l'enzyme à l'électrode, à sa réorientation, au réarrangement du film enzymatique sous l'effet du balayage de potentiel. On peut aussi penser à une réactivation incomplète de l'enzyme après l'inhibition à haut potentiel.

En effet, d'autres mesures de stabilité sont réalisées en chronoampérométrie, en soumettant l'électrode au potentiel fixe $E = -0.3 \text{ V vs. Ag/AgCl}$, potentiel auquel l'hydrogénase est majoritairement dans un état actif. Moins de 10% de perte sont observés en deux heures (Figure 58 B). Ce résultat souligne que la décroissance plus forte du signal en CV est liée à une fraction d'enzymes non réactivées après inactivation à haut potentiel. Des mesures effectuées au potentiel $E = -0.25 \text{ V}$ montrent que la décroissance est beaucoup plus rapide. Une perte de 65% du signal est ainsi observée en trente minutes. Elle peut être attribuée à la formation de l'état inactif Ni-B des hydrogénases.

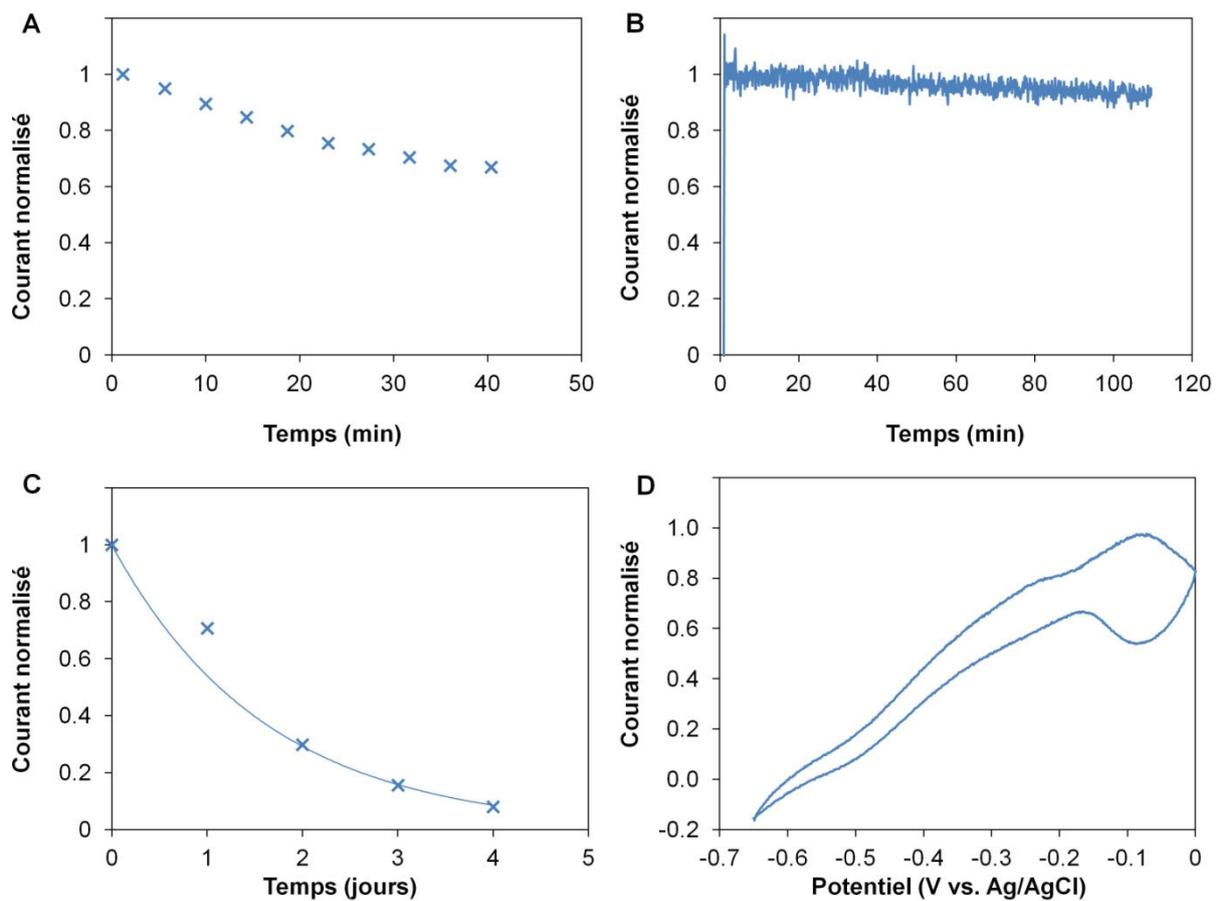


Figure 58 – Stabilité du signal d'oxydation électroenzymatique de l' H_2 par l'Aa Hase 1 adsorbée sur 3 couches de CNFs_H2 (60 μg). A : Evolution du courant à $E = -0,3 \text{ V vs. Ag/AgCl}$ mesuré au cours de cycles consécutifs de voltammétrie cyclique à $v = 5 \text{ mV.s}^{-1}$. Electrolyte saturé en H_2 , H_2 en surpression au dessus de l'électrolyte. B : Evolution du courant mesuré en chronoampérométrie à $-0,3 \text{ V vs. Ag/AgCl}$, Flux d' H_2 injecté dans l'électrolyte. C : Evolution au cours des jours du courant mesuré à $-0,3 \text{ V vs. Ag/AgCl}$ au cours de cycles de voltammétrie cyclique à $v = 5 \text{ mV.s}^{-1}$. Entre les mesures l'électrode est conservée dans du tampon Hepes saturé en N_2 à 4°C . Flux d' H_2 injecté dans l'électrolyte. D : Allure du CV d'oxydation de l' H_2 au bout de deux jours dans l'expérience précédente. Dans tous les cas, les courants sont normalisés par rapport au courant maximal atteint au cours de l'expérience. Tampon Hepes 50 mM ; $T = 60^\circ\text{C}$; $\text{pH} 6,8$; $\omega = 0 \text{ rpm}$.

Même dans le cas de la mesure par CV, la stabilité est cependant supérieure à celle observée lorsque l'hydrogénase était adsorbée sur les SW-CNTs-COOH. De la même manière, une bonne stabilité du signal est observée lorsque l'hydrogénase d'*E. coli* est immobilisée dans le carbone mésoporeux compacté. Cette stabilité est attribuée au grand nombre d'enzymes immobilisées, qui agirait comme un tampon contre l'inactivation quand le courant est limité par le transport de masse des gaz dissous [37]. Dans nos conditions de limitation par l'apport de substrat, on peut supposer également que le signal obtenu ne reflète pas uniquement l'évolution de l'activité des hydrogénases, mais est le résultat d'un équilibre entre la participation des enzymes à la catalyse et le substrat disponible. La stabilité ne signifierait donc pas forcément que les molécules sont toutes liées fortement à l'électrode et que leur activité est stable.

Enfin, la stabilité d'une bioélectrode est mesurée sur plusieurs jours, en réalisant une CV tous les jours (Figure 58 C). La décroissance est relativement rapide : au troisième jour on n'observe en effet plus que 40% de l'intensité initiale. Cette décroissance peut être attribuée plutôt à la dégradation de l'hydrogénase, comme en témoigne l'évolution de la forme du signal avec l'apparition progressive d'un deuxième pic à un potentiel plus cathodique (Figure 58 D). La désactivation de l'hydrogénase par l'O₂ est à rejeter puisque l'électrode est conservée dans un tampon saturé en N₂. La dénaturation résulte peut-être des chocs thermiques que subit l'électrode entre sa conservation à 4°C et l'expérience de CV à 60°C. Des études sont en cours au laboratoire pour déterminer les paramètres qui régissent l'instabilité de l'enzyme sur le long terme et trouver les moyens d'y remédier.

III-8- Conclusion sur l'utilisation de CNFs comme plateforme pour l'Aa Hase 1 et perspectives: vers une porosité contrôlée

Les CNFs sont un matériau intéressant pour la bioélectrochimie, grâce à leur réactivité, leur capacité d'adsorption des enzymes, leur excellente conductivité électrique et leur grande surface développée. Les CNFs_H2 forment à l'électrode un réseau tridimensionnel conducteur, qui a permis de développer une bioanode très efficace pour l'oxydation de l'H₂ par l'Aa Hase 1. Après optimisation, des courants de plus de 4 mA.cm⁻² ont pu être obtenus, ce qui constitue une des valeurs les plus élevées jamais relevées. Le phénomène de limitation par le transport de substrat au sein du matériau, qui est un point clé pour la biopile à combustible, a été par ailleurs mis en évidence et caractérisé.

Pour évaluer l'efficacité de la bioélectrode, la fréquence de turnover de l'enzyme immobilisée dans le réseau de CNFs_H2 est calculée. Il s'agit d'un calcul par défaut, puisque pour connaître la quantité d'enzymes mises en jeu, on utilise la valeur calculée d'après le dosage de Bradford. Or on a montré que cette méthode évaluait par excès la quantité de protéines mises en jeu.

On calcule une fréquence apparente de turnover de l'enzyme supérieure ou égale à 52 s^{-1} . Or on estime en général que la constante de turnover d'une hydrogénase à [NiFe] peut excéder 1000 s^{-1} . Le rendement de la bioélectrode par rapport au nombre de protéines engagé n'est donc pas bon. Il est probable qu'une partie des protéines soit fortement liée à l'électrode et puisse fonctionner correctement, et que les autres soient adsorbées en multi-couche et donc peu efficaces pour le transfert électronique. Il faudrait augmenter la surface disponible à l'adsorption de l'enzyme, tout en conservant une forte accessibilité à la fois de l'enzyme et du substrat. Le matériau peut être amélioré par modification de sa porosité pour le rendre plus mésoporeux. Il doit cependant garder une bonne tenue mécanique.

Dans cette optique, deux travaux méritent d'être mentionnés à titre d'exemple. Le premier décrit l'obtention d'une porosité contrôlée par dépôt sur des microfibres de carbone d'un film composite de nanotubes de carbone et de billes de polystyrène (PS), suivi d'un traitement thermique pour éliminer le PS [38]. Des expériences préliminaires effectuées de cette manière au laboratoire n'ont pas été concluantes, un travail d'optimisation est nécessaire. Le second travail décrit la formation d'une mésoporosité par dépôt électrophorétique de CNTs et de billes de PS, suivi traitement thermique pour éliminer le PS [39]. En ce qui nous concerne, un premier essai de dépôt électrophorétique des CNFs n'a pas été concluant. Une autre possibilité peut être de faire pousser verticalement les CNFs sur un support qui ne soit pas granulaire, mais qui apporte de la porosité et de la surface au système, par exemple un tissu de carbone. Ce travail est en cours au laboratoire.

IV- Problématique de l'oxydation médiée de l' H_2 par l'hydrogénase d'*A. aeolicus* sur des électrodes nanostructurées à base de carbone

L'oxydation médiée de l' H_2 par les hydrogénases n'est pas un concept nouveau. Elle prévalait avant que les équipes de Hagen puis d'Armstrong ne montrent la possibilité de connexion directe des enzymes. La médiation était alors effectuée soit par des médiateurs physiologiques, comme le cytochrome c_3 , soit par des médiateurs redox artificiels comme le méthyle viologène. Ces expériences constituaient la première approche d'oxydation électroenzymatique de H_2 , et ont permis de déterminer les constantes de vitesse entre l'enzyme et le médiateur [40].

L'objectif de trouver une solution pour immobiliser à la fois l'enzyme et le médiateur a ensuite conduit à la recherche de matrices hôtes. Des matrices comme les argiles se sont révélées intéressantes [41], mais présentaient l'inconvénient de n'être pas conductrices. L'immobilisation de certaines hydrogénases à [NiFe] dans des polymères redox a alors été réalisée. Les hydrogénases de *Thiocapsa*

roseopersicina [42], *Pyrococcus furiosus* [43], ou *Desulfovibrio fructosovorans* [44] ont ainsi été respectivement immobilisées sur [42-43] ou emprisonnée dans [44] des films de polypyrrole fonctionnalisé par des molécules de méthyle viologène qui assuraient la connexion médiée. Dans les trois cas une bonne stabilité en TEM était observée.

Plus récemment, l'immobilisation de l'Aa Hase 1 dans des films de bleu de toluidine (TBO) électropolymérisé a été tentée. Elle ne s'est cependant pas montrée efficace, à cause de la dénaturation irréversible de l'hydrogénase à haut potentiel lors de l'électropolymérisation. L'étude suggérait de plus la difficulté de médier l'oxydation de l'H₂ par la phénothiazine immobilisée via le polymère. Une compétition entre l'adsorption de l'hydrogénase et l'adsorption du polymère avait aussi été envisagée. Néanmoins l'immobilisation sur le polymère permettait l'amélioration de la stabilité du signal. Les auteurs proposaient que les molécules de TBO non polymérisé agissent comme médiateurs redox pour le TEM et comme promoteurs pour le TED [8]. Un effet de protection contre les ROS était même suggéré.

L'intérêt de la communauté hydrogénase n'était cependant pas porté sur la connexion médiée, car elle apporte trop peu de données sur les mécanismes catalytiques. Suite à l'identification des hydrogénases tolérantes à l'O₂, et à leur utilisation dans des procédés type biopiles, la discussion sur l'intérêt de la connexion médiée des hydrogénases à l'électrode a récemment été relancée. En particulier, une étude très récente présente l'immobilisation de l'hydrogénase à [NiFe] de *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F sensible à l'O₂ dans un hydrogel redox à base de groupements viologènes [45]. Les auteurs montrent que cette immobilisation protège l'hydrogénase à la fois de l'O₂ et des potentiels élevés. En effet, le transfert d'électrons entre les groupements viologènes et l'hydrogénase contrôle le potentiel auquel est soumis le site actif, et évite donc que ce site actif soit soumis à des potentiels trop élevés. Par ailleurs, dans des conditions de catalyse, l'O₂ est réduit par une couche de viologènes avant de parvenir à l'hydrogénase. Ces viologènes sont eux-mêmes réduits grâce aux électrons fournis par l'oxydation de l'H₂ par une couche superficielle d'hydrogénases.

Dans notre travail, l'Aa Hase 1 est immobilisée dans le réseau 3 D formé par les nanomatériaux carbonés. L'apparition du TEM permettrait non seulement l'augmentation du courant de catalyse, mais donnerait aussi une idée de l'efficacité de la connexion de l'enzyme. De plus, l'utilisation de médiateurs de potentiels redox différents pourrait apporter des réponses quant à la possibilité de faire « travailler » l'hydrogénase en médié à des potentiels où, connectée en TED, elle est inactivée. Cette connexion aurait de plus son intérêt pour la biopile où le potentiel de chaque électrode n'est pas contrôlé. Le potentiel de l'anode peut notamment atteindre des valeurs élevées lorsque l'anode est limitante.

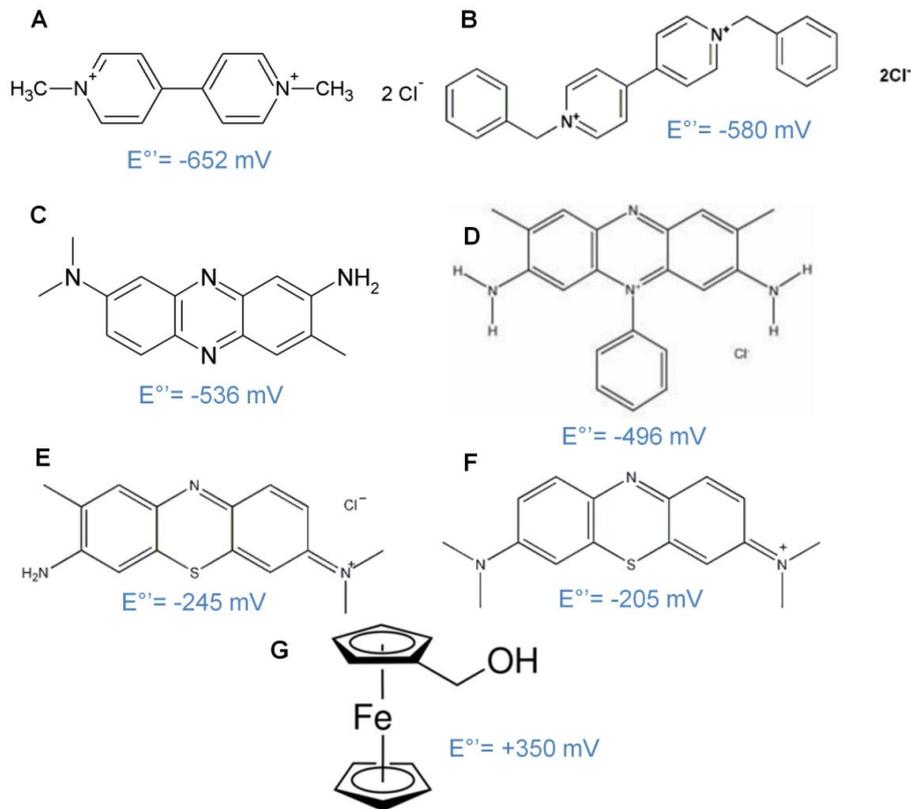


Figure 59- Molécules redox médiateurs potentiels de l'oxydation du H_2 par l'*Aa* Hase et leurs potentiels d'oxydoréduction standards apparents à pH 7 exprimés par rapport à l'électrode de référence Ag/AgCl. A : méthyle viologène (MV) ; B : Benzyle viologène (BV) ; C : rouge neutre ; D : safranine T ; E : bleu de toluidine (TBO) ; F : bleu de méthylène (BM) ; G : Ferrocène méthanol.

Les médiateurs utilisés jusqu'ici en électrochimie pour l'*Aa* Hase 1 sont majoritairement des phénothiazines : le bleu de méthylène (BM, Figure 59 A) [1], le bleu de toluidine [8] (TBO, Figure 59 B) ou le rouge neutre (NR, Figure 59 D) [46]. Au cours de ce travail, ces médiateurs ont été réévalués dans des conditions où l'hydrogénase est immobilisée sur des nanomatériaux carbonés. Un autre médiateur, le ferrocène méthanol, de potentiel redox plus élevé, a été étudié pour mieux comprendre la relation entre le potentiel du médiateur et les états actif/inactif de l'enzyme (Figure 59 G).

IV-1- Le Bleu de méthylène (BM) pour l'*Aa* Hase 1 immobilisée sur les CNPs et les CNTs

Le BM est un médiateur bien adapté à l'*Aa* Hase 1 en terme de potentiel. On rappelle que le potentiel des hydrogénases tolérantes à l' O_2 est plus élevé d'environ 100 mV à celui des hydrogénases sensibles. L'électroactivité de l'*Aa* Hase 1 a ainsi été démontrée pour la première fois grâce à une électrode de PG en présence d'hydrogénase et de BM en solution [5]. Ce médiateur a par ailleurs été utilisé pour discriminer les différentes orientations de l'*Aa* Hase 1 immobilisée sur les SAMs [1] et sur PG [46]. Cependant, le BM est une molécule également connue pour sa forte affinité pour les

matériaux carbonés, à cause des cycles aromatiques capables d'établir des liaisons π - π avec les cycles carbonés des plans de graphène.

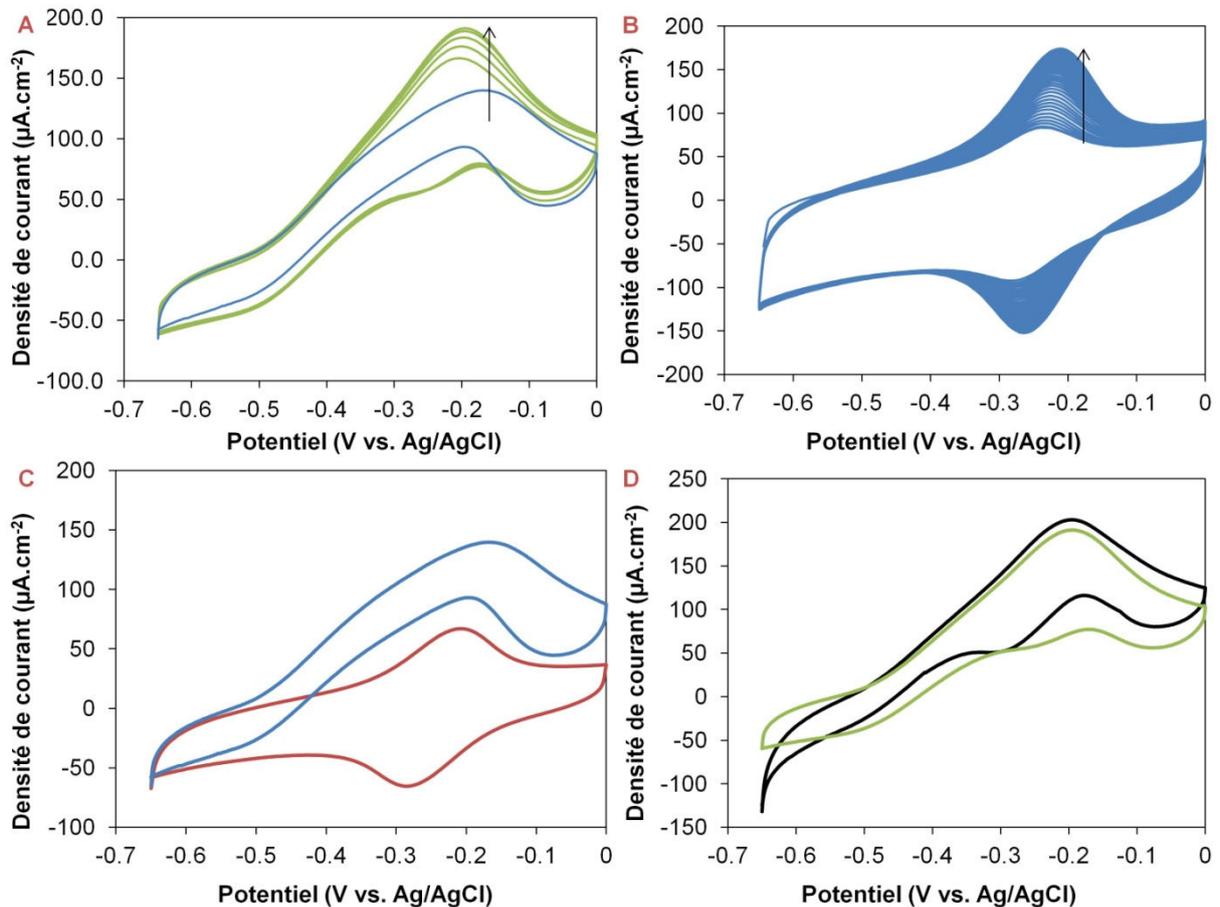


Figure 60 – Influence de l'ajout de BM en solution sur le courant d'oxydation de H_2 par l'Aa Hase 1 immobilisée sur 3 couches de CNPs. A : Voltammétrie cyclique réalisée avant l'ajout du BM (courbe bleue) et après ajout de BM ($15 \mu M$) dans l'électrolyte (courbe verte). La flèche montre l'augmentation de la taille du pic au cours des cycles. B : Accumulation du BM ($15 \mu M$ de BM en solution) en l'absence d'hydrogénase sur une électrode constituée de 3 couches de CNPs. La flèche montre l'augmentation de la taille du pic au cours des cycles. $v = 10 \text{ mV.s}^{-1}$. C : Superposition des voltammogrammes du BM seul en solution (courbe rouge) et de l'oxydation du H_2 par l'hydrogénase seule (courbe bleue) pour une électrode constituée de 3 couches de CNPs. D : Superposition du voltammogramme d'oxydation de H_2 par l'Aa Hase 1 immobilisée sur 3 couches de CNPs en présence de BM ($15 \mu M$) dans l'électrolyte (courbe verte correspondant au dernier cycle de la courbe verte, figure A), et du signal obtenu en effectuant la somme mathématique des signaux du BM seul (figure C, courbe rouge) et de l'oxydation du H_2 par l'hydrogénase seule (figure C, courbe bleue) pour une électrode constituée de 3 couches de CNPs. Expériences de voltammétrie cyclique réalisées dans du tampon Hepes 50 mM pH 6,8 ; $T = 60^\circ C$; $\omega = 0 \text{ rpm}$; gaz en surpression au dessus de l'électrolyte ; $v = 5 \text{ mV.s}^{-1}$ sauf en cas de spécification différente.

Lorsque l'hydrogénase est immobilisée sur une électrode de CNPs formée par couches successives, du BM est ajouté dans l'électrolyte afin d'étudier la cinétique d'oxydation de l' H_2 par

TEM. Après ajout de BM en solution, on remarque une augmentation progressive du pic d'oxydation au cours des cycles, un léger décalage de ce pic vers les potentiels plus anodiques, et l'apparition d'un pic de réduction à $E \approx -0,25 \text{ V vs. Ag/AgCl}$ (Figure 60 A). Le même phénomène est observé consécutivement à l'ajout de BM en solution lorsque l'hydrogénase est immobilisée sur une électrode formée de CNPs encapsulées dans une matrice de silice. Cette augmentation du signal au cours des cycles suggère l'implication d'un phénomène d'accumulation à l'électrode de CNPs. La seule espèce susceptible de s'accumuler est le BM, comme l'attestent les CV consécutives réalisées en l'absence d'hydrogénase (Figure 60 B). Cette accumulation résulte de liaisons π - π entre les cycles aromatiques du BM et les CNPs, et d'interactions électrostatiques entre les charges négatives des CNPs et les molécules cationiques de BM. De plus le pic d'oxydation du signal catalytique se décale vers le potentiel du BM (Figure 60 C). Cependant, comme proposé sur électrode de PG nue, cette augmentation progressive du signal peut être le résultat d'une augmentation du nombre d'hydrogénases électriquement connectées grâce au BM qui jouerait le rôle de fil conducteur, et non de médiateur redox.

Pour évaluer dans quelle mesure le BM participe au courant catalytique d'oxydation de l' H_2 par l'*Aa* Hase 1, on effectue l'addition mathématique des signaux de l'oxydation de H_2 en TED par l'*Aa* Hase 1 immobilisée sur les CNPs, et du BM accumulé sur les CNPs (Figure 60 C). Il en résulte une courbe de CV qui coïncide très fortement avec le signal d'oxydation de l' H_2 par l'*Aa* Hase 1 immobilisée sur les CNPs en présence de BM (Figure 60 D). Les différences observées peuvent être attribuées à la méthode de calcul employée, à la décroissance du signal d'oxydation de l' H_2 au cours des cycles, et aux variations observées entre différentes électrodes.

Le signal de catalyse d'oxydation de l' H_2 est ensuite étudié lorsque l'hydrogénase liée covalamment à l'électrode modifiée par des SW-CNTs-COOH est mise en présence de BM. Après ajout du BM en solution, on observe le redressement du signal de TED, et l'apparition d'un léger pic de réduction (Figure 61 A). De plus, on a l'apparition d'un courant à un potentiel plus proche de 0 qui peut être attribué à un signal de TEM par les molécules de BM diffusant en solution.

L'électrolyte est remplacé par un électrolyte sans BM, de manière à s'affranchir de la diffusion de BM en solution et au sein du matériau poreux. Le signal enregistré est alors similaire à celui qui est observé avec les CNPs (Figure 61 C). Le passage sous atmosphère de N_2 permet de constater l'accumulation du BM sur l'électrode (Figure 61 B). On effectue l'addition mathématique des signaux de l'oxydation de H_2 en TED par l'*Aa* Hase 1 immobilisée sur les CNTs, et du BM accumulé sur les CNTs (Figure 61 C). Il en résulte également une courbe qui coïncide avec le signal décrit en Figure 61 C (Figure 61 D). Les différences observées peuvent là aussi être attribuées à la méthode de calcul employée, à la décroissance du signal d'oxydation de H_2 au cours des cycles.

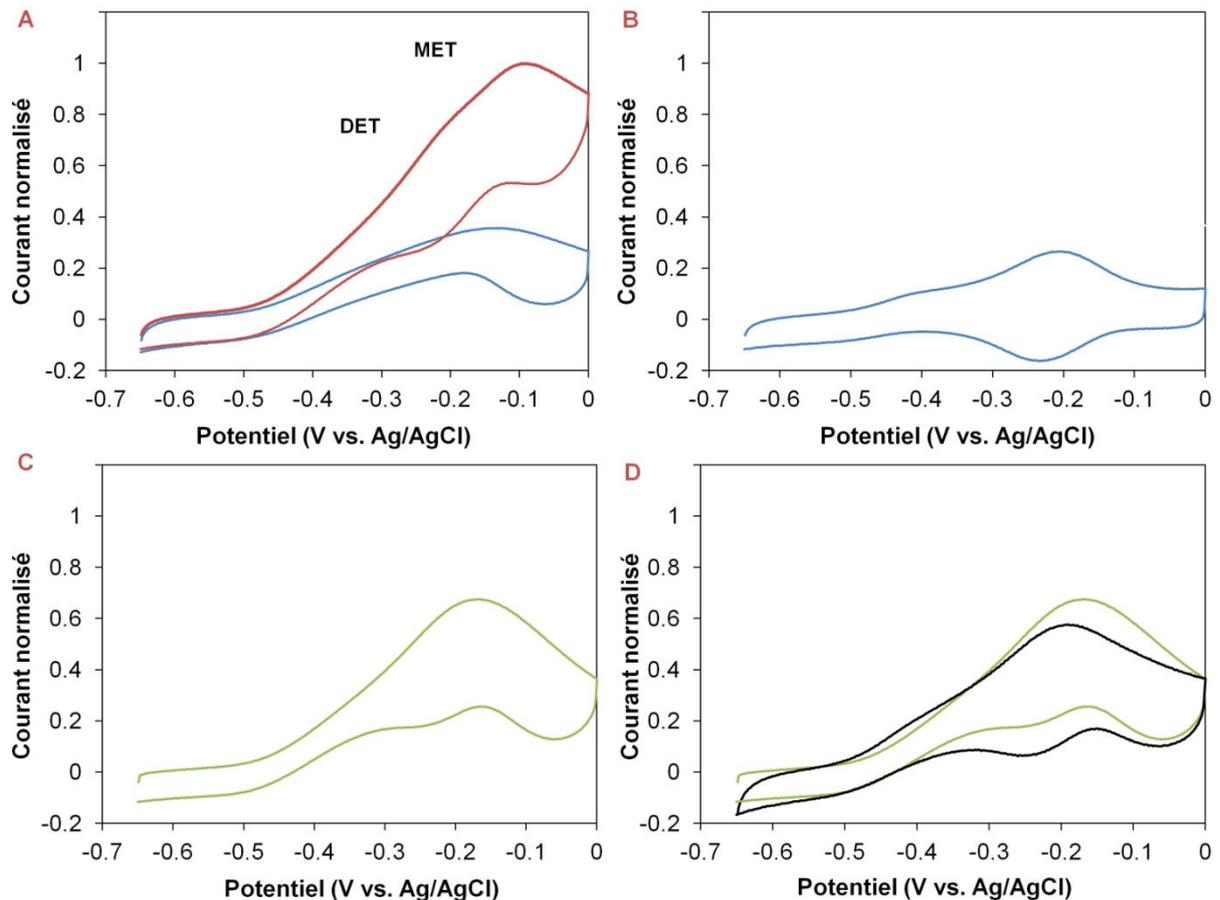


Figure 61 - Influence de l'ajout de BM en solution sur le courant d'oxydation de H_2 par l'Aa Hase 1 liée covalamment sur des SW-CNTs-COOH. A : CV réalisée avant (courbe bleue) et après (courbe rouge) plusieurs cycles réalisés en présence de BM ($10 \mu M$) dans l'électrolyte saturé en H_2 . B : Signal obtenu avec la même électrode après remplacement de l'électrolyte par un électrolyte sans BM saturé en N_2 . C : Même système qu'en B, électrolyte saturé en H_2 . D : Superposition du voltammogramme d'oxydation de H_2 par l'Aa Hase 1 immobilisée sur les SW-CNTs-COOH à la fin de l'adsorption du BM (courbe verte correspondant à la figure C), et du signal obtenu en effectuant la somme mathématique des signaux de l'oxydation du H_2 par l'hydrogénase seule (figure A, courbe bleue) et du BM seul (figure B, courbe bleue) (courbe noire). Expériences de CV réalisées dans du tampon Hepes 50 mM pH 6,8 ; $T = 60^\circ C$; $\omega = 0 \text{ rpm}$; gaz en surpression au dessus de l'électrolyte ; $v = 5 \text{ mV.s}^{-1}$

On peut donc raisonnablement conclure que la modification du signal d'oxydation de H_2 par l'Aa Hase 1 immobilisée sur CNPs ou CNTs observée après ajout du BM en solution ne résulte pas de l'apparition de TEM ou de l'augmentation du TED, mais de la superposition de deux phénomènes indépendants: l'oxydation de H_2 en TED par l'Aa Hase 1 liée covalamment sur les CNPs ou les CNTs, et l'accumulation du BM sur la surface inoccupée des matériaux carbonés. La très faible proportion de TEM dans cette configuration suggère que les hydrogénases électroactives sont toutes connectées dans une configuration favorable au TED. Une autre hypothèse est que l'affinité du BM pour l'électrode soit plus forte que l'affinité entre le BM et l'hydrogénase pour la médiation.

Dans la littérature, des études montrent l'influence favorable de l'adsorption du BM sur les CNTs, notamment pour augmenter l'efficacité du transfert de charge [47], amplifier un signal électrochimique, et augmenter sa sensibilité et sa stabilité [48]. Dans une deuxième expérience, le BM est donc préadsorbé sur les CNTs, avant immobilisation de l'*Aa* Hase 1 par adsorption. On n'observe pas d'augmentation notable de l'intensité du courant de catalyse comme c'est le cas avec l'électrode de PG, ni de TEM comme lorsque le BM peut diffuser en solution. En revanche on retrouve bien le signal observé lorsque le BM s'adsorbe sur les CNPs et CNTs. On a donc également superposition de deux phénomènes indépendants: l'oxydation de H₂ en TED par l'*Aa* Hase 1 immobilisée sur les CNTs, et l'oxydation/réduction du BM adsorbé sur les CNTs.

IV-2- Différents médiateurs pour l'*Aa* Hase 1 immobilisée sur les CNFs

IV-2-a- Les Phénothiazines

Lorsque l'*Aa* Hase 1 est adsorbée sur les CNFs, on n'observe pas de TEM après ajout du BM (Figure 62 A). Dans le cas des CNFs, l'existence du plateau lié à la limitation par transfert de masse montre clairement la superposition du signal redox du BM et de l'hydrogénase, le BM s'accumulant à l'électrode au cours du temps. Le même mécanisme est observé dans le cas où l'injection du flux d'H₂ dans l'électrolyte lève partiellement la diminution par le transfert de masse. On n'a donc pas d'interaction entre l'hydrogénase et le BM, ou en tous cas la constante de vitesse entre l'enzyme et le BM est très faible. Une fois de plus, deux hypothèses peuvent expliquer ce phénomène. Soit toutes les hydrogénases actives sont connectées directement à l'électrode, soit le BM a dans cette configuration plus d'affinité pour le matériau carboné que pour l'hydrogénase, et ne peut donc assurer son rôle de médiateur.

D'autres phénothiazines sont testées pour l'oxydation de l'H₂ par l'*Aa* Hase 1 immobilisée sur les CNFs. Le rouge neutre (NR) et la safranine T (ST), qui s'adsorbent eux aussi sur les CNFs au cours des cycles consécutifs, donnent des résultats similaires à ceux obtenus avec le BM. On observe, de la même manière, la superposition du signal redox du médiateur et de la catalyse par l'hydrogénase (Figure 62 B et C). Le phénomène peut être également expliqué par une affinité plus grande du NR et de la ST pour les CNFs que pour l'hydrogénase pour la médiation ; ou par une connexion directe de toutes les enzymes à l'électrode. Néanmoins, le potentiel plus négatif des deux phénothiazines peut aussi expliquer une mauvaise interaction avec l'hydrogénase.

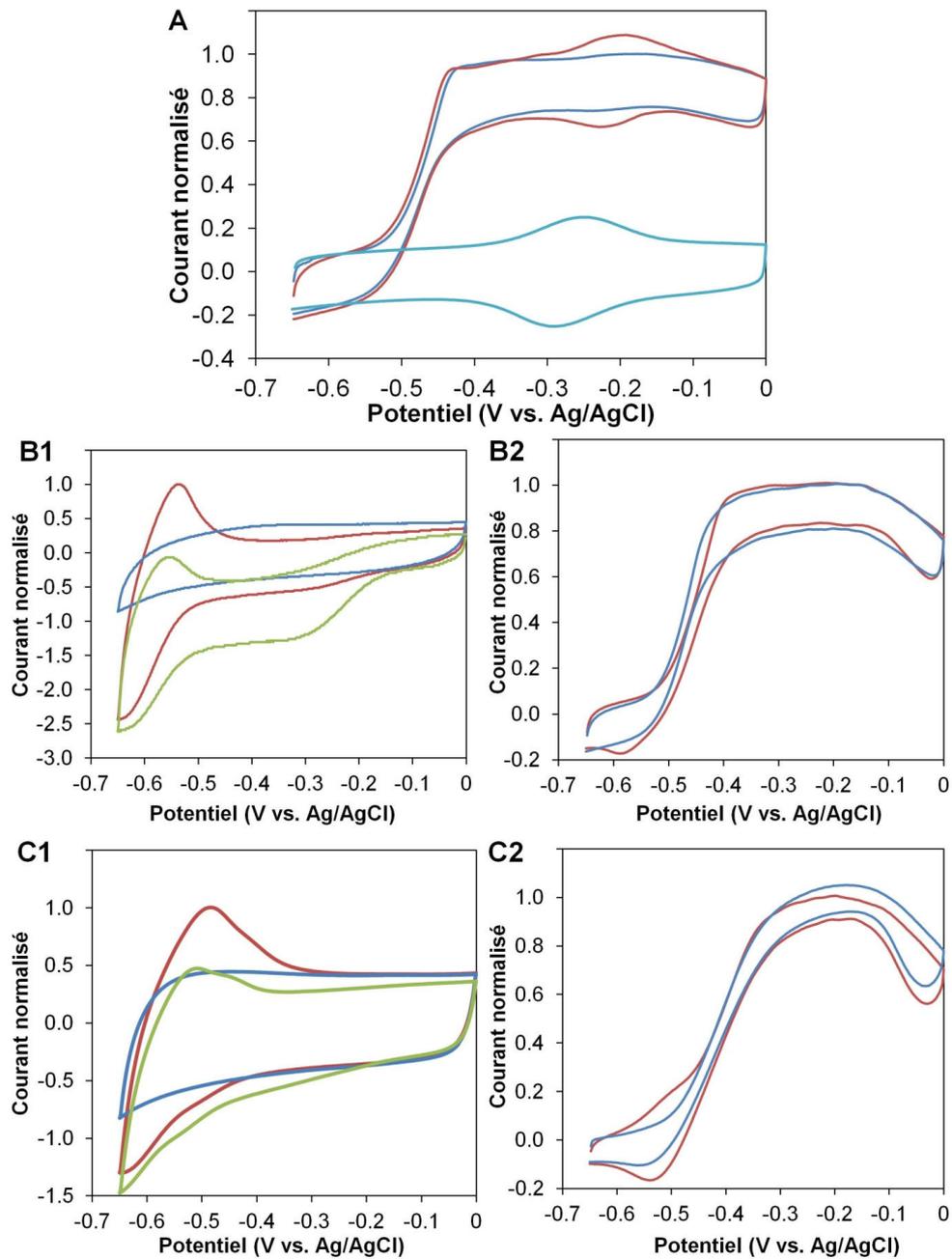


Figure 62 - Influence de l'ajout de phénothiazines en solution sur le courant d'oxydation de H_2 par l'Aa Hase 1 adsorbée sur les CNFs. A : Bleu de méthylène. BM seul à l'issue de dix cycles de CV (courbe turquoise), oxydation de l' H_2 par l'Aa Hase 1 en l'absence de BM (courbe bleue) et à l'issue de dix cycles en présence de $10 \mu M$ de BM en solution (courbe rouge). B : Rouge neutre. B1 : adsorption du NR sur les CNFs. CNFs seules (courbe bleue), en présence de $100 \mu M$ de NR (courbe rouge) et après transfert dans un électrolyte sans NR (courbe verte). B2 : Aa Hase 1 en l'absence de NR (bleu) et Aa Hase 1 en présence de $10 \mu M$ de NR (rouge). C : Safranine T. C1 : adsorption de la ST sur les CNFs. CNFs seules (courbe bleue), en présence de $100 \mu M$ de ST (courbe rouge) et après transfert dans un électrolyte sans ST (courbe verte). C2 : Aa Hase 1 en l'absence de ST (bleu) et Aa Hase 1 en présence de $10 \mu M$ de ST (rouge). CV réalisées dans du tampon Hepes 50 mM pH 6,8 ; $T = 60^\circ C$; $\omega = 0 \text{ rpm}$; H_2 en surpression dans l'électrolyte ; $v = 5 \text{ mV.s}^{-1}$. Le courant est normalisé par rapport au courant maximal obtenu en oxydation.

De façon intéressante, avec ces trois médiateurs, lorsque l'espèce redox est en solution dans l'électrolyte, on observe une stabilisation du signal électrochimique: aucune perte n'a lieu sur dix cycles. Ce résultat est semblable à ce qui avait été observé avec le TBO [8]. Plusieurs hypothèses peuvent être émises pour expliquer ce résultat. On peut penser à une connexion de l'enzyme via la phénothiazine qui n'agirait pas comme médiateur (pas d'échange électronique) mais comme promoteur. On peut aussi supposer que l'O₂ s'accumule localement dans le réseau poreux, créant des concentrations locales d'O₂ délétères même pour une hydrogénase tolérante [37]. Dans ce contexte, le médiateur réduirait l'oxygène à proximité de l'hydrogénase et empêcherait ainsi son inactivation.

Par ailleurs, on remarque un redressement de la pente du signal lorsque le BM en solution s'adsorbe sur les CNFs, ce qui peut être lié à une augmentation de la conductivité comme cela avait été observé pour les CNTs [47-48]. En revanche le BM pré-adsorbé sur l'électrode empêche l'immobilisation de l'hydrogénase : le signal d'oxydation de l'H₂ disparaît dès le deuxième cycle.

Une des hypothèses pour expliquer l'absence de TEM est l'adsorption des phénothiazines sur les matériaux carbonés, et donc un manque de flexibilité, qui les empêcherait d'agir comme médiateurs. Une solution peut être d'envisager des médiateurs immobilisés mais dont la partie redox serait suffisamment longue et flexible pour interagir avec l'hydrogénase. Ce travail est en cours au laboratoire.

IV-2-b- Le Benzyle viologène

Le benzyle viologène s'adsorbe également sur les CNFs (Figure 63 A). Cependant, contrairement au cas des phénothiazines, l'adsorption atteint rapidement un équilibre : un état stationnaire est obtenu dès le premier cycle. La charge calculée pour le pic d'adsorption à l'issue de 5 cycles est ainsi de 15 μC pour le BV et 40 μC pour la ST, au cours de cycles ultérieurs elle est fixe pour le BV et augmente encore pour la ST. A l'état d'équilibre de l'adsorption, il reste donc une grande fraction de BV en solution disponible pour le courant médié.

Lorsque le BV est ajouté en solution, pour une électrode modifiée par les CNFs sur lesquelles est adsorbée l'*Aa* Hase 1, on n'observe pas de signal redox caractéristique du médiateur. En revanche, le signal d'oxydation de l'H₂ est modifié, avec un décalage vers les potentiels plus oxydants et une augmentation de la densité du courant (Figure 63 B). Ce signal peut être attribué à du courant médié par le BV. Le potentiel du début de la catalyse, -0,48 V vs. Ag/AgCl, correspond au potentiel du pic du BV seul, mais est néanmoins supérieur de 100 mV au potentiel donné dans la littérature. La différence entre le TED et le TEM est faible, ce qui pourrait soutenir l'hypothèse de la connexion efficace de la majorité des enzymes actives immobilisées à l'électrode.

On peut aussi remarquer que le courant obtenu lors du balayage cathodique croise à deux reprises le courant obtenu lors du balayage anodique (les intersections sont indiquées par les flèches sur la figure 63 B). Ce phénomène, peut aussi être remarqué sur les courbes de CV de l'hydrogénase de *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F immobilisée dans le polymère rédox portant les groupements viologènes [45]. Il peut être lié à la différence de stabilité entre les formes réduite et oxydée du complexe transitoire formé entre l'enzyme et le médiateur.

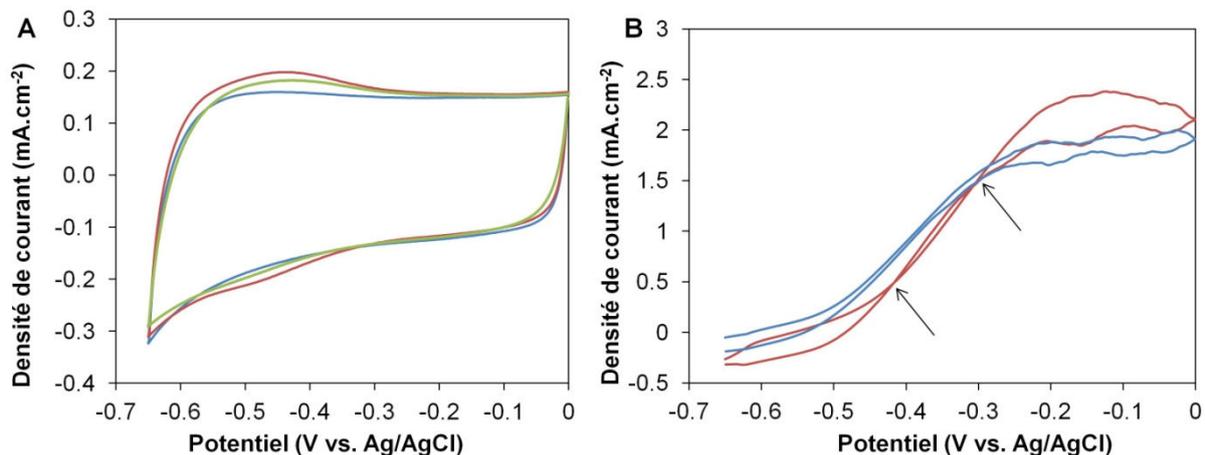


Figure 63 – A : adsorption du benzyle viologène sur les CNFs. CNFs seules (courbe bleue), en présence de 100 μM de BV (courbe rouge) et après transfert dans un électrolyte sans BV (courbe verte). B : Influence de l'ajout de benzyle viologène en solution sur le courant d'oxydation de l' H_2 par l'Aa Hase 1 adsorbée sur les CNFs_H2. Aa Hase 1 en l'absence de BV (bleu) et Aa Hase 1 en présence de 10 μM de BV (rouge). Les flèches indiquent le croisement des courbes obtenues lors du balayage aller et du balayage retour. CV réalisées dans du tampon Hepes 50 mM pH 6,8 ; $T = 60^\circ\text{C}$; $\omega = 0 \text{ rpm}$; flux d' H_2 dans l'électrolyte ; $v = 5 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$

IV-2-c- Le Ferrocène-méthanol

Par ailleurs, on peut supposer que les hydrogénases orientées à l'électrode de telle façon que le transfert direct d'électron soit impossible ne sont pas soumises au potentiel effectif de l'électrode, et ne subissent donc pas la désactivation réversible observée à haut potentiel. Dans ce cas, l'ajout d'un médiateur de potentiel redox approprié devrait permettre d'observer du courant médié à des potentiels auxquels l'hydrogénase est normalement désactivée.

On peut noter à ce propos que l'utilisation du BV comme médiateur dans des conditions où la proportion de TEM est important et où la limitation par le transport de masse est peu importante donne lieu à l'apparition d'un plateau en CV. On n'observe pas de désactivation au potentiel de formation de l'état NiB du site actif. De la même manière, l'utilisation d'un médiateur viologène pour l'hydrogénase de *D. vulgaris* Miyazaki F ne montre plus de désactivation à haut potentiel en CV. De plus des études de spectroscopie confirment l'hypothèse selon laquelle l'état inactif du site actif n'est plus formé : l'hydrogénase est « protégée des potentiels oxydants » par le médiateur [45].

On rappelle cependant que lorsque l'*Aa* Hase 1 est immobilisée sur les SAMs hydrophobes et connectée en TEM via le BM, la forme du signal électrochimique tend à montrer une inactivation et donc a priori la formation de la forme NiB. Ce résultat a d'ailleurs été également évoqué par les études sur l'hydrogénase de *D. vulgaris* Miyazaki F menées dans l'équipe du Pr. Schuhmann, et attribué au potentiel trop positif du BM comparé au viologène [45].

Nous avons étendu cette analyse par l'utilisation du ferrocène méthanol de potentiel très positif, $E^\circ = 0.35 \text{ V vs Ag/AgCl}$, et qui malgré l'existence de liaisons π délocalisées s'adsorbe peu sur les CNFs (Figure 64 B).

La Figure 64 donne l'évolution du courant catalytique de l' H_2 par l'*Aa* Hase 1 immobilisée sur les CNFs dans un domaine de potentiel compris entre -0.6 V et $+0.4 \text{ V}$ en présence de ferrocène méthanol. Le courant catalytique décroît au-delà de $-0,1 \text{ V}$, à cause de la formation de l'état NiB du site actif des hydrogénases connectées directement à l'électrode. Il augmente à nouveau au potentiel du ferrocène méthanol, et uniquement en présence de dihydrogène, ce qui démontre *a priori* l'existence d'une catalyse d'oxydation de l' H_2 , donnant lieu à un courant médié par le ferrocène méthanol (Figure 64 A).

Ce résultat signifie d'une part qu'une petite fraction d'enzymes n'est pas connectée à l'électrode de manière à permettre un transfert direct d'électrons, ce qui est cohérent avec l'observation faite avec le BV. Il suggère de plus que l'hydrogénase connectée via le médiateur n'est pas dans un état inactif, malgré le potentiel élevé de l'électrode et du médiateur. Cette hypothèse signifierait que le potentiel auquel est soumis le site actif est inférieur au potentiel de formation du NiB. Ce résultat devra maintenant être corroboré à des études spectrales prouvant l'existence d'une forme active de l'hydrogénase en présence de ferrocène. On peut penser par exemple orienter toutes les hydrogénases en TEM grâce à une SAM hydrophobe, et étudier par spectroscopie l'état du site actif.

Il est cependant nécessaire de comprendre si ce résultat est en contradiction avec ce qui est observé en utilisant le BM, de potentiel inférieur. Dans ce cas en effet, on observe la désactivation/réactivation de l'hydrogénase au potentiel de formation du Ni-B. Une première hypothèse suggère que cette désactivation/réactivation est due aux hydrogénases connectées directement à l'électrode. On doit écarter cette hypothèse, car il existe des cas où cette désactivation/réactivation est observée alors qu'aucune hydrogénase n'est connectée en direct (hydrogénase immobilisée sur des SAMs hydrophiles de chaînes longues, sur ITO). De la même manière, des études spectrales montrent la formation du NiB pour l'hydrogénase de *D. vulgaris* Miyazaki F immobilisée dans le polymère en l'absence de TED lorsque le médiateur est le BM.

Dans des conditions de catalyse (donc hors équilibre), lorsque l'enzyme est connectée indirectement à l'électrode via une espèce redox, le potentiel auquel est soumis le site actif n'est pas régi uniquement par la différence entre le potentiel redox du médiateur et le potentiel redox du site actif, il dépend aussi des constantes cinétiques de catalyse et d'échange électronique entre le médiateur et l'enzyme. Un médiateur de potentiel élevé, mais de faible constante cinétique d'échange électronique avec l'enzyme, pourrait donc tout de même permettre à une enzyme d'éviter la formation du NiB.

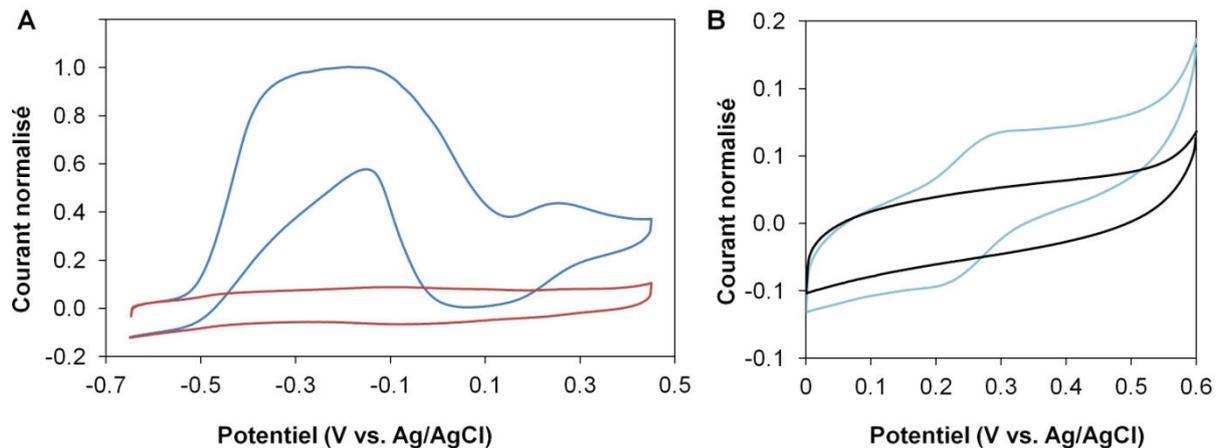


Figure 64- A : CV de l'Aa Hase 1 adsorbée sur des CNFs en présence de ferrocène méthanol (30 μM) dans du tampon Hepes saturé en H_2 (courbe bleue) ou en N_2 (courbe rouge). B : CV d'une électrode de PG modifiée par les CNFs dans un électrolyte contenant 30 μM de ferrocène méthanol (courbe turquoise) et après transfert dans un électrolyte sans ferrocène méthanol (courbe noire). L'échelle est adaptée pour montrer le signal redox qui est en réalité de même amplitude que sur la figure A courbe rouge. 50 mM Hepes pH 6,8 ; $T=60^\circ\text{C}$; $\omega=0$ rpm ; gaz en surpression au dessus de l'électrolyte ; $v=5$ $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$

IV-2-d- Problématique du courant médié : conclusion

Dans l'optique d'évaluer l'efficacité de la connexion de l'Aa Hase 1 dans les réseaux 3D, la problématique du TEM pour l'oxydation de l' H_2 par l'Aa Hase 1 immobilisée sur les matériaux carbonés a été abordée. Ce mécanisme s'est révélé compliqué par la forte affinité pour les nanomatériaux carbonés des phénothiazines, utilisées classiquement comme médiateurs d'oxydation de l' H_2 par l'Aa Hase 1. L'étude de l'oxydation de l' H_2 par l'Aa Hase 1 immobilisée sur les CNPs, les CNTs et les CNFs en présence de phénothiazines a permis de mettre en évidence la superposition de deux phénomènes indépendants: d'une part le redox des phénothiazines adsorbées, d'autre part le TED par l'Aa Hase 1. La recherche d'autres médiateurs a conduit à considérer le benzyle viologène (BV) comme une alternative acceptable. En effet, seule une faible proportion de BV s'adsorbe sur les matériaux carbonés, l'équilibre d'adsorption est rapidement atteint, et le BV en solution agit comme médiateur pour l'oxydation de l' H_2 par l'Aa Hase 1.

Suite à nos premières expériences en présence de poly-phénothiazine [8], la question se posait également de savoir dans quelle mesure une électrode basée sur une hydrogénase fonctionnant uniquement à l'aide d'un médiateur pouvait être portée à des potentiels positifs, auxquels une hydrogénase connectée en direct est inactivée. Une étude récente de la connexion médiée de l'hydrogénase de *D. vulgaris* Miyazaki F [45] suggère que cette possibilité dépend du potentiel du médiateur. En effet, lorsque cette hydrogénase sensible à l'O₂ est connectée via un viologène, l'inactivation n'est pas observée en électrochimie, et des études de spectroscopie montrent que les états inactifs NiA et NiB du site actif de l'enzyme ne sont pas formés. Cet effet protecteur n'est pas observé lorsque la connexion est réalisée via le BM de potentiel supérieur. Lorsque l'Aa Hase 1, immobilisée sur des SAMs ou sur ITO, est connectée via le BM, le signal électrochimique est également caractéristique de l'inactivation/réactivation du site actif de l'enzyme. En revanche, du courant médié a pu être observé en utilisant le ferrocène méthanol de potentiel très supérieur, ce qui signifierait que l'enzyme est encore active. Une étude cinétique fine serait nécessaire pour comprendre comment est régi le potentiel du site actif de l'enzyme lors de catalyse en connexion médiée.

V- Stabilisation du signal électrochimique

Un des points essentiels pour un développement crédible de procédés biotechnologiques utilisant des enzymes, comme les hydrogénases, est la stabilité du signal électroenzymatique. Cet objectif nécessite de travailler à la fois sur la stabilité de l'enzyme elle-même et de sa connectique à l'électrode.

V-1- Influence du détergent sur la stabilité de l'hydrogénase

Les détergents jouent un rôle essentiel dans l'extraction, la purification et la manipulation des protéines membranaires. Ce sont des molécules amphiphiles composées en général d'une tête hydrophile et d'une queue hydrophobe (Figure 65 A). La tête hydrophile assure la solubilité dans l'eau de la molécule de détergent. Elle peut être ionique, non-ionique ou zwitterionique. Un détergent non-ionique est en général doux et non dénaturant.

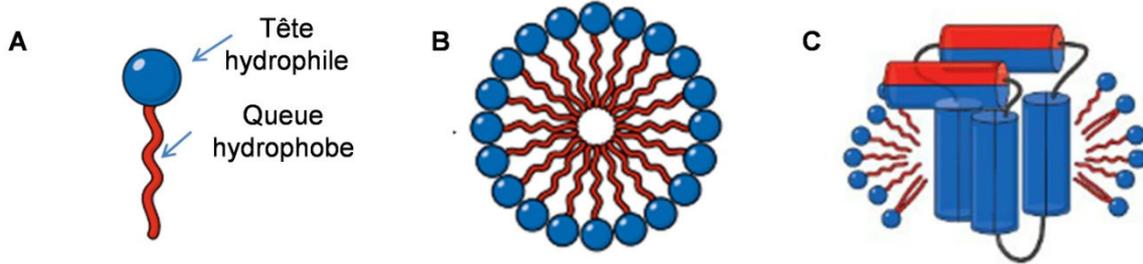


Figure 65 - A : Représentation schématique d'une molécule de détergent. B : Formation d'une micelle. C : Arrangement des molécules de détergent autour des domaines transmembranaires hydrophobes. Les domaines hydrophiles sont indiqués en rouge, les domaines hydrophobes en bleu.

A de faibles concentrations, les détergents sont présents en solution sous forme de monomères libres. Au-delà d'une concentration, appelée concentration micellaire critique (CMC), caractéristique de chaque détergent à une température donnée, les molécules additionnelles s'arrangent pour former des agrégats sphériques ou ellipsoïdiques appelés micelles, qui sont solubles dans l'eau (Figure 65 B). Ces agrégats sont des structures dynamiques dont le poids moléculaire est en général inférieur à 100 kDa. Lorsque le détergent est utilisé pour solubiliser une protéine, les molécules de détergent forment un tore autour des domaines transmembranaires hydrophobes (Figure 65 C). Cet arrangement empêche l'agrégation des protéines en solution aqueuse. On exprime en général la concentration de détergent d'une solution en multiples de la CMC.

L'hydrogénase membranaire d'*A. aeolicus* est purifiée à l'aide d'un détergent non-ionique, le Dodecyl-maltoside (DDM). Avant l'étape finale de concentration, l'excès de détergent est absorbé grâce à des absorbants hydrophobes (BioBeads). Le DDM est quantifié par chromatographie en couche mince suivie de mesures de densitométrie. Il est cependant impossible de connaître quelle proportion de détergent est liée à l'enzyme.

Notre objectif est donc de déterminer l'influence de la quantité de détergent sur la stabilité en solution de l'hydrogénase, puis sur l'oxydation de l' H_2 . La concentration initiale en DDM total est telle que $1 \mu M$ d'hydrogénase corresponde à 0,1 CMC de DDM.

V-1-a- DDM en solution

Dans un premier temps, l'hydrogénase est diluée à $1 \mu M$ dans un tampon Hepes contenant du DDM à différentes concentrations. La concentration totale en DDM est donc la somme de la concentration initiale du DDM dans le tampon Hepes, et de la concentration de DDM apportée par la solution d'enzyme (0,1 CMC). Les différentes solutions enzymatiques sont conservées plusieurs jours à $4^\circ C$, et la stabilité de l'enzyme est évaluée en mesurant chaque jour l'activité d'oxydation de l' H_2

par spectroscopie UV-vis (pour deux concentrations de DDM), et par électrochimie en adsorbant l'hydrogénase sur une électrode de PG (pour quatre concentrations de DDM).

Les solutions d'hydrogénase diluée dans du tampon Hepes sans DDM et avec 0,1 CMC de DDM présentent initialement les mêmes activités d'oxydation de l' H_2 . Cette activité décroît au cours des jours (Figure 66 A), ce qui peut refléter la dénaturation ou l'agrégation des molécules d'hydrogénase. On constate cependant que l'ajout, même faible de DDM, résulte en une décroissance moins rapide de l'activité.

Ce résultat est retrouvé en mesurant l'activité de l'hydrogénase en électrochimie. On constate que plus la fraction de DDM ajouté est importante, moins la décroissance du courant direct en CV sur PG est rapide (Figure 66 B). Au bout de 5 jours, l'hydrogénase diluée dans du tampon contenant 0,5 CMC de DDM conserve ainsi 80 % de son activité, tandis que l'hydrogénase diluée dans du tampon sans DDM n'en conserve plus que 10%. Cette stabilisation de l'activité de la protéine en solution peut s'expliquer par une stabilisation de la structure protéique grâce au détergent qui reconstitue partiellement l'environnement naturel de la protéine.

Les mesures d'activité en spectroscopie affichent cependant une décroissance plus rapide que les mesures d'activité en électrochimie. Cette observation peut s'expliquer par une plus faible sensibilité de la mesure, peut-être à cause d'une faible affinité du MV pour l'hydrogénase, ou de problèmes d'étanchéité, la manipulation devant se faire en conditions strictement anaérobies.

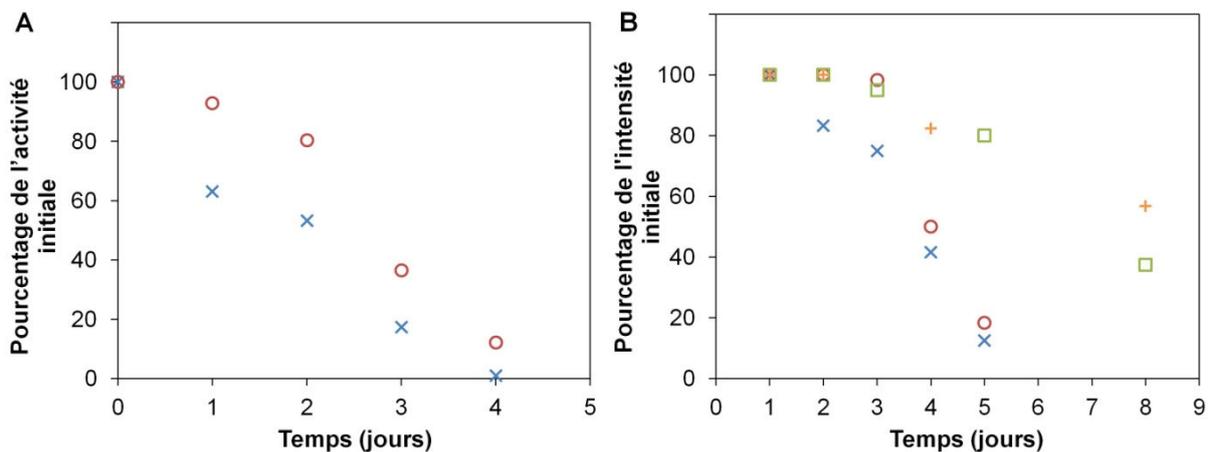


Figure 66 – Evolution de l'activité d'oxydation de l' H_2 de l'Aa Hase 1 pour différentes concentrations de DDM dans la dilution. 0 DDM (croix bleues) ; DDM 0,1 CMC (cercles rouges) ; DDM 0,5 CMC (carrés verts) et DDM 1 CMC (croix oranges). A : Mesures de l'activité en spectro UV-vis ; B : Mesures de l'activité en électrochimie avec Aa Hase 1 adsorbée sur une électrode de PG.

De plus, à partir de 1 CMC de DDM, on constate que l'intensité initiale de la catalyse est plus faible. On peut supposer que le DDM isole en partie l'hydrogénase de l'électrode. Diluer

l'hydrogénase dans un tampon contenant déjà du DDM permet donc d'augmenter sa stabilité, mais de trop fortes quantités de DDM ont une influence néfaste sur les courants en électrochimie.

V-1-b- Revêtement de DDM sur l'électrode de PG

Dans un deuxième temps, on cherche dans quelle mesure le DDM non lié à l'enzyme peut influencer le signal électrochimique. Quelques microlitres d'une solution de DDM dans le chloroforme sont déposés sur l'électrode de PG. L'évaporation du chloroforme est ensuite suivie de l'adsorption de l'hydrogénase sur l'électrode modifiée. Une membrane de dialyse est ajoutée pour confiner l'enzyme à proximité de l'électrode. En ajoutant cette membrane de dialyse, on s'affranchit des instabilités dues au décrochage de l'enzyme de l'électrode. L'oxydation électroenzymatique de l' H_2 est étudiée en TED en l'absence de médiateur, puis en TED et en TEM en présence de BM. On compare alors les courants obtenus au cours d'expériences de CV pour une électrode sans DDM, pour une électrode recouverte d'un film fin de DDM (2 μ L à 20 CMC), et pour une électrode recouverte d'un film épais de DDM (2 μ L à 50 CMC).

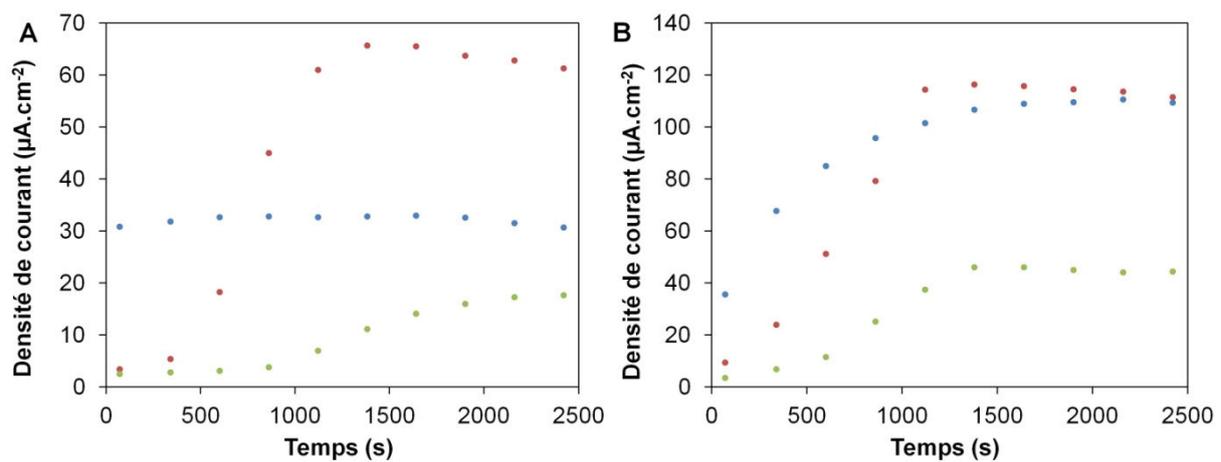


Figure 67 – Evolution du courant d'oxydation électroenzymatique de l' H_2 par l'Aa Hase 1 adsorbée sur une électrode de PG sans DDM (points bleus), modifiée par 2 μ L de DDM 20 CMC (points rouges) et par 2 μ L de DDM 50 CMC (points verts). A : Courant direct en l'absence de médiateur redox. B : Somme des courants direct et médié en présence de 10 μ M BM. Le courant est mesuré à -0,25 V vs. Ag/AgCl au cours de cycles consécutifs de voltammétrie cyclique à $v=5$ $mV.s^{-1}$. Tampon Hepes 50 mM ; $T=60^\circ C$; pH 6,8 ; $\omega=0$ rpm, électrolyte saturé en H_2 , suppression de H_2 au dessus de l'électrolyte.

Le courant obtenu en TED avec l'électrode sans DDM ne varie pas pendant 10 cycles (Figure 67 A). En revanche, les électrodes modifiées par le DDM nécessitent une période d'activation. Le courant catalytique n'apparaît qu'après respectivement deux et quatre cycles pour les films fin et épais de DDM (Figure 67 A). L'électrode modifiée par un film fin atteint puis dépasse en efficacité en TED l'électrode non modifiée (Figure 67 A). Une première explication peut être que le DDM ajouté a

permis au cours des cycles de désagréger des molécules d'hydrogénases qui sont ainsi rendues électroactives. Cependant on constate qu'en présence de BM, l'électrode non modifiée et l'électrode modifiée par le film fin présentent le même courant total (somme du TED et du TEM) (Figure 67 B). C'est donc le rapport $TED/(TED+TEM)$ qui est modifié par le film fin de DDM, ce qui laisse penser que la couche de DDM permet à l'enzyme une réorientation au cours des cycles. En revanche, la présence du film épais ne permet de restaurer des courants comparables ni en TED, ni en TEM, ce qui suggère qu'une quantité trop importante de DDM peut passiver l'électrode et empêcher un transfert électronique efficace.

V-1-c- Conclusion

Comme on pouvait s'y attendre, le détergent joue un rôle essentiel pour l'hydrogénase membranaire. D'une part, il assure la stabilisation de la protéine. Il se peut également qu'il participe à son orientation. Enfin, dans le contexte de la bioélectrochimie, à trop fortes concentrations, il isole l'électrode ce qui produit une baisse des courants.

V-2- Influence de la liaison de l'enzyme à l'électrode

Si l'instabilité du signal est liée à l'instabilité de la liaison de l'enzyme à l'électrode, on peut espérer augmenter cette stabilité en liant covalamment l'enzyme à l'électrode. Pour cela, il est nécessaire d'introduire à la surface de l'électrode des fonctions chimiques. L'accroche covalente de l'enzyme sur les CNTs fonctionnalisés a déjà permis une stabilisation de la bioélectrode. Deux nouveaux types de fonctionnalisation sont explorés au cours de ce travail: liaison à des fonctions portées par des molécules de pyrène, et liaison à des fonctions formées par réduction de sels de diazonium.

V-2-a- pyrènes

Les composés polyaromatiques s'adsorbent fortement sur les surfaces de graphite via des liaisons $\pi-\pi$ avec les cycles des plans de graphène, la force de l'adsorption augmentant avec le nombre de cycles aromatiques [49-50]. En particulier le pyrène, composé de 4 cycles aromatiques très peu soluble dans l'eau, se montre très stable vis-à-vis de la désorption dans un électrolyte aqueux lorsqu'il est adsorbé sur une électrode de graphite [51]. Les molécules polyaromatiques substituées par diverses fonctions chimiques permettent donc une fonctionnalisation non covalente des plans de graphite, et le choix des fonctions appropriées donne la possibilité de moduler les interactions avec les protéines. La liaison non covalente du pyrène présente l'avantage de préserver la structure du matériau [52].

Cette méthode a permis la liaison de plusieurs enzymes dont la BOD de *M. verrucaria* [12, 53], la laccase de *T. versicolor* [53] ou l'hydrogénase Hyd-1 d'*E. coli* [12]. Dans l'étude de Krishnan *et al.* [12], des liaisons covalentes sont réalisées entre les lysines de surface de la BOD de *M. verrucaria* et de l'Hyd-1 d'*E. coli* et les fonctions carboxyliques du pyrène acide butyrique lié par π -stacking sur des MW-CNTs. L'hydrogénase se montre très stable pendant 100 h à -120 mV vs NHE et 2500 rpm ; l'évaluation de la stabilité de la BOD à 340 mV vs NHE, 25°C, pH 5, 2500 rpm indique un temps de demi-vie de 35h.

Les molécules polyaromatiques comme les phénothiazines s'adsorbant très fortement sur les CNFs, on peut raisonnablement penser qu'il en sera de même pour le pyrène. Pour pouvoir réaliser des liaisons covalentes entre l'enzyme et les molécules de pyrène substituées, on choisit le pyrène-acide butyrique et le pyrène-acide carboxylique dont les groupements -COOH peuvent réagir pour former des liaisons amides avec les amines de surface de l'enzyme (cf. paragraphe II-2-f). On choisit de plus le pyrène-amine, dont les groupements -NH₂ peuvent réagir pour former des liaisons amides avec les fonctions carboxyliques de surface de l'enzyme (des acides aminés acide glutamique et acide aspartique). Dans les trois cas, l'EDC-NHS est utilisé comme agent couplant, et des contrôles sont réalisés sans EDC-NHS pour estimer l'influence de la liaison covalente.

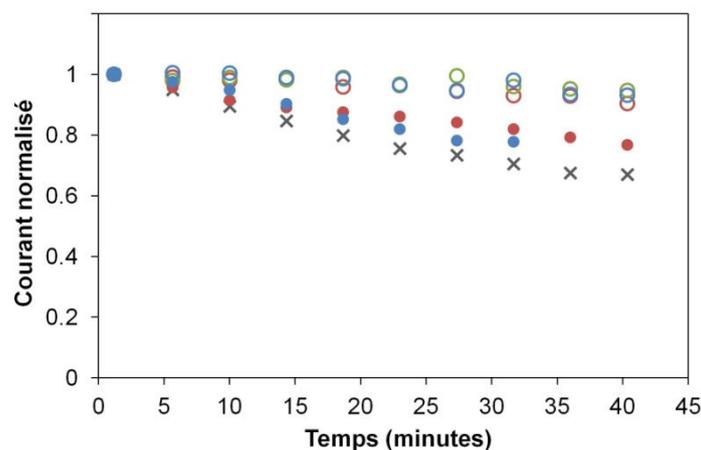


Figure 68 – Stabilité du signal d'oxydation de l'H₂ par l'Aa Hase 1 liée aux CNFs modifiées par les différents pyrènes. CNFs seules (croix) ; pyrène sans EDC-NHS (disques) ; pyrène avec EDC-NHS (cercles). Rouge : pyrène amine (symboles rouges), pyrène butyrique acide (symboles bleus) ; pyrène carboxylique acide (symboles verts). Valeurs du courant à E= -0,3 V vs. Ag/AgCl issues de courbes de CV ; Tampon Hepes 50 mM ; T=60°C ; pH 6,8 ; $\omega=0$ rpm, flux de H₂ dans l'électrolyte ; $v=5$ mV.s⁻¹.

Quelle que soit la fonction chimique substituant la molécule de pyrène, cette modification des CNFs permet d'augmenter la stabilité du signal d'oxydation de l'H₂. Plus de 90 % de l'intensité initiale est ainsi conservée après 45 minutes de cyclage continu entre -0,65 et 0 V vs. Ag/AgCl, contre 60% lorsque l'Aa Hase 1 est adsorbée sur les CNFs sans pyrène (Figure 68). La stabilisation peut être

en partie attribuée à la liaison covalente, comme le montrent les expériences réalisées sans EDC-NHS (Figure 68). Néanmoins, le signal est également plus stable quand l'hydrogénase est seulement adsorbée sur les CNFs modifiées par le pyrène. On note cependant que l'intensité du signal d'oxydation de l' H_2 est plus faible en présence de pyrène (une diminution d'environ 25% de l'intensité initiale est observée). Cette approche préliminaire sera complétée par des études en chronoampérométrie, ainsi que par une quantification des molécules de pyrène disponibles à l'aide d'une sonde redox.

V-2-b- Réduction de sels de diazonium (collaboration C. Lagrost, Y. Leroux)

Cette technique consiste en la réduction électrochimique de sels de diazonium, de type tétrafluoroborate de (4-R-phényl)diazonium, où R représente diverses fonctions chimiques, à une surface de carbone comme le carbone vitreux (GC), le graphite pyrolytique (HOPG), des poudres ou des fibres de carbone [54]. L'application d'un potentiel réducteur provoque la réduction à un électron du diazonium. Le radical formé réagit avec la surface de carbone et une molécule de N_2 est libérée (Figure 69). Cette réaction mène à la liaison covalente de groupes aryles à la surface de carbone.

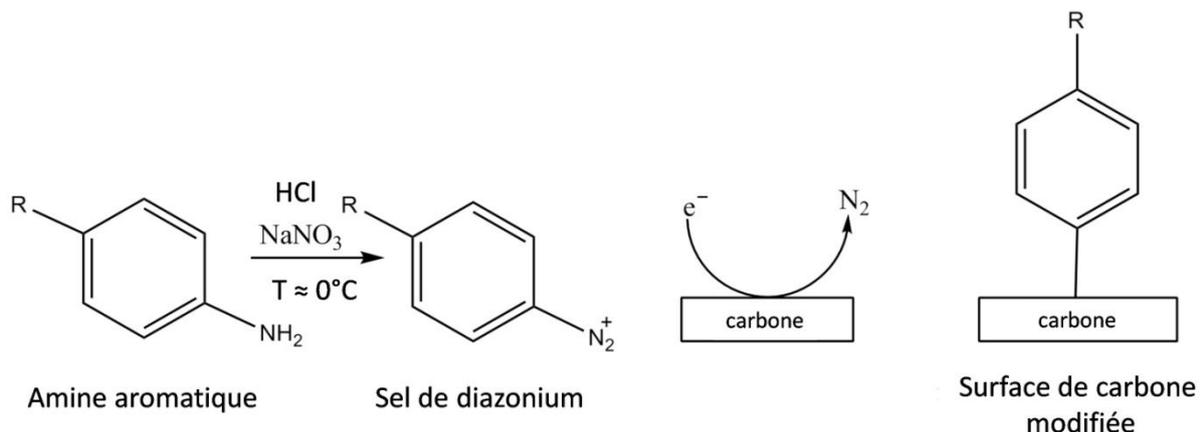


Figure 69 – schéma réactionnel de la réduction de sel de diazonium sur une surface de carbone précédée de la génération « in situ » du sel.

Cette méthode est polyvalente. Il est possible de greffer à la surface une grande variété de groupes aryles fonctionnalisés, et donc toute une palette de fonctionnalités. De plus l'étape de réduction peut être suivie de réactions chimiques classiques afin de modifier les fonctionnalités [54]. Des fonctions ont ainsi été générées pour permettre l'accroche covalente de diverses enzymes: des glucose oxydases [55-56], des laccases [57], des hydrogénases à $[NiFe]$ ou à $[FeFe]$ [6, 58-59], une horseradish peroxydase [60], une cellobiose déshydrogénase [61].

Notre objectif est de lier covalamment l'hydrogénase, en utilisant dans un premier temps l'électrode de PG comme substrat modèle. On souhaite introduire des groupements $-COOH$, de façon

à pouvoir réaliser la liaison covalente de l'enzyme grâce à l'agent couplant EDC-NHS qui s'est montré efficace dans le cas des SW-CNTs-COOH. L'aryle choisi est l'acide 4(4-aminophényl) butyrique, pour profiter de la flexibilité de la chaîne carbonée pour l'orientation fonctionnelle de l'hydrogénase.

V-2-b-i- Modification de l'électrode

Les sels peuvent facilement être synthétisés *in situ* avant la réduction (Figure 69): en milieux aqueux, une arylamine est convertie en sel de diazonium Ar-N^{2+} par traitement avec de l'acide chlorhydrique et du nitrite de sodium à des températures proches de 0°C [62]. La même réaction est possible dans de l'acétonitrile contenant des sels supports [63]. La réaction à la surface de carbone peut être réalisée en milieu organique (ACN) [54] ou en milieu aqueux. La réduction électrochimique est réalisée via l'application d'un balayage de potentiel en voltammétrie cyclique [54], ou l'application d'un potentiel fixe en chronocoulométrie.

Il est difficile de contrôler la réaction de réduction, et la croissance du film organique à la surface, qui peut avoir lieu par polymérisation. Des stratégies de protection peuvent être adoptées pour éviter cette dernière et former une monocouche ordonnée à la surface [64-65]. Sans contrôle particulier en revanche, la surface de l'électrode n'est donc en général pas recouverte d'une monocouche compacte de fonctions chimiques. L'épaisseur et la porosité de la couche déposée sur l'électrode sont influencées par la concentration des substrats lors de la génération des sels *in situ*, et par la durée de l'électrolyse et le potentiel appliqué en chronocoulométrie lors de la réduction [66]. En variant ces paramètres on a donc un contrôle grossier de l'épaisseur du film, et du nombre de fonctions greffées à l'électrode. Par exemple, pour la réduction pendant 300s respectivement à $-0,2\text{V}$ et -1 V de sels d'acide benzoïque diazonium générés *in situ*, l'épaisseur mesurée par AFM en mode contact est de ≈ 10 et $\approx 15\text{ nm}$ [66].

Dans ce travail, on réalise la synthèse *in situ* des diazoniums en milieux aqueux, en présence de nitrate de sodium et d'acide chlorhydrique à 0°C . La réduction est effectuée en imposant un potentiel fixe. En maintenant tous les autres paramètres constants, la densité de fonctions greffées à la surface, et donc l'épaisseur et la porosité du film organique sont modulées par la durée de l'électrolyse.

La réaction d'oxydo-réduction du ferrocyanure $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ à l'électrode obéit à un mécanisme de sphère interne. Il constitue donc une bonne sonde pour déterminer la formation d'une couche organique à la surface de l'électrode. Avant la réduction du diazonium à l'électrode de PG, le signal redox du $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ est très réversible, caractéristique d'un transfert d'électrons rapide ($\Delta E_p = 67 \pm 1,3\text{mV}$), et caractéristique d'une diffusion linéaire semi-infinie (Figure 70).

Après la réduction, pour les temps les plus courts, un écartement des pics et une décroissance de l'intensité du signal redox de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4+}$ sont observés. De plus, la sigmoïde obtenue est caractéristique d'une diffusion radiale de l'espèce. L'électrode se comporte comme un réseau d'ultra-microélectrodes, ce qui témoigne de la présence de micropores dans le film formé à la surface. Pour les temps les plus longs on n'observe plus le signal du $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4+}$, ce qui montre la formation d'un film compact à la surface (Figure 70).

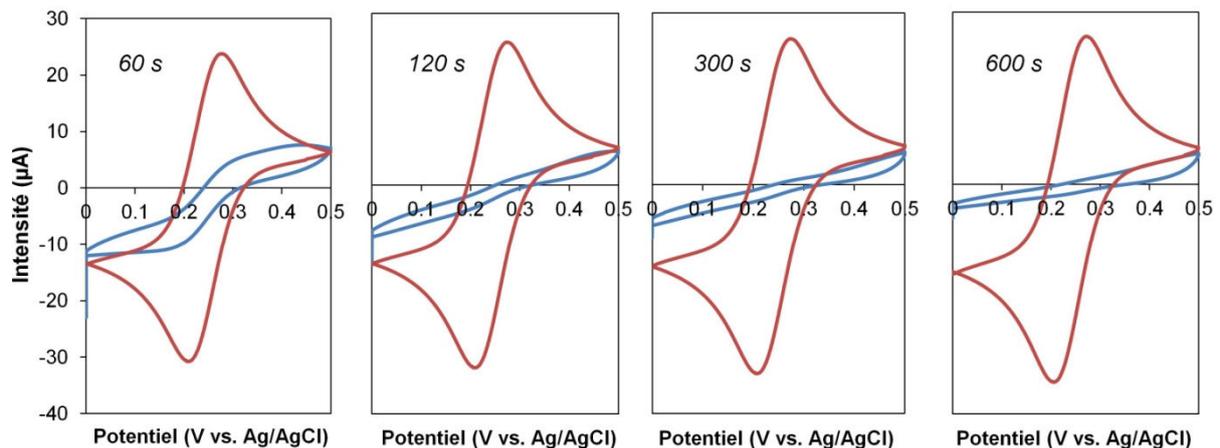


Figure 70 – Signal redox du $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ avant (courbe rouge) et après (courbe bleue) réduction du (4-acide acétique-phényl) diazonium à la surface de l'électrode de PG pour différentes durées de réduction indiquées en italique dans le cadre. $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ 5mM dans H_2O + KCl 100 mM ; Température ambiante ; $\omega=0$ rpm.

V-2-b-ii- Liaison covalente de l'hydrogénase sur le film organique

L'hydrogénase est liée à l'électrode grâce à l'agent couplant EDC-NHS. Pour toutes les épaisseurs de film, un courant d'oxydation direct de l' H_2 par l'*Aa* Hase 1 peut être observé en l'absence de médiateur redox (TED). L'ajout de BV provoque l'apparition d'un fort courant médié (TEM) (Figure 71 A). Les proportions de TED évoluent de façon inversement proportionnelle à la durée d'électrolyse, qu'on suppose proportionnelle à l'épaisseur de la couche (Figure 71 B).

Le courant total a la même intensité dans tous les cas. Il semble donc que la même quantité d'enzymes soit immobilisée à l'électrode quelle que soit l'épaisseur du film organique. Une explication peut être que seules les fonctions en surface du film soient accessibles pour la liaison covalente de l'hydrogénase, et que le nombre de fonctions de surface ne varie pas avec la durée de l'électrolyse.

On peut remarquer la difficulté à immobiliser l'enzyme de façon efficace pour le TED. De plus, les plus grandes proportions de TED sont obtenues pour des films présentant une certaine porosité. On peut se demander si l'enzyme connectée en TED est covalamment liée au film organique

à l'électrode, ou s'il s'agit d'une fraction d'enzymes adsorbée directement à l'électrode de PG dans les défauts du film. Lorsque l'*Aa Hase 1* était immobilisée sur les SAMs hydrophiles, on obtenait 50% de TED pour les nombre de groupements méthyles dans la chaîne alkyle inférieurs à 10, pour des nombres supérieurs la proportion de TED diminuait. On peut donc penser que la faible proportion de TED dans notre cas n'est pas seulement liée à l'orientation mais à une distance trop importante entre l'enzyme et l'électrode. Cette conclusion serait cohérente avec l'augmentation de l'épaisseur du film organique avec la durée d'électrolyse.

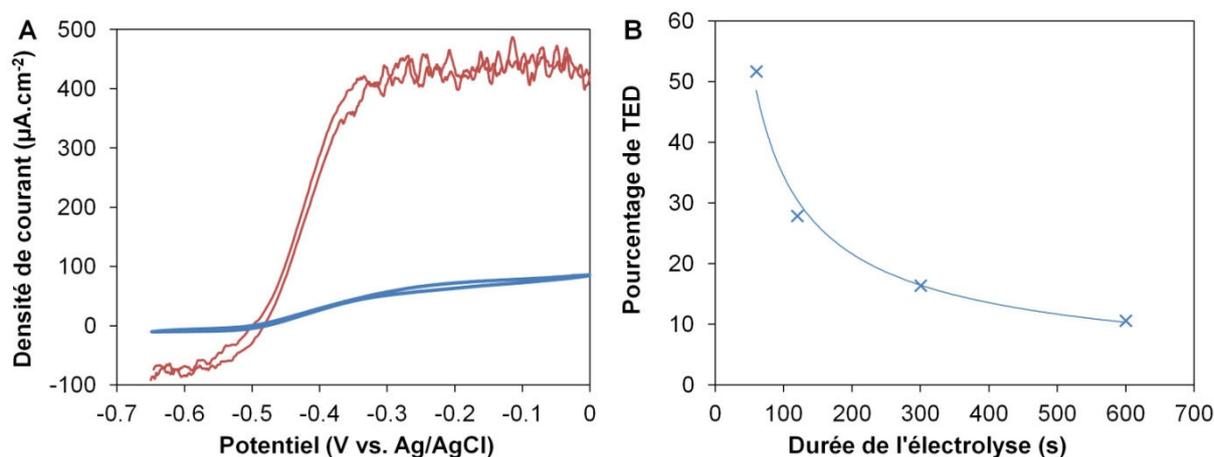


Figure 71 – Courant direct et courant médié pour l'oxydation de l' H_2 par l'*Aa Hase 1* liée covalamment à une électrode de PG modifiée par réduction de 4-acide butanoïque phényldiazonium. A : CV pour une électrode modifiée, temps d'électrolyse de 300 s, sans BV (courbe bleue) ou avec $15\ \mu\text{M}$ de BV (courbe rouge). B : Evolution de la proportion de TED en fonction de la durée de l'électrolyse. Tampon Hepes 50 mM ; $T=60^\circ\text{C}$; pH 6,8 ; $\omega=0\ \text{rpm}$, flux de H_2 dans l'électrolyte ; $v=5\ \text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

Quelques rares études décrivent la liaison covalente efficace pour le TED d'hydrogénases à une électrode modifiée par réduction de sels de diazonium [6, 58-59]. Dans les deux premiers cas [6, 58] une PG ou des MW-CNTs sont modifiés par des phénylamines formées par réduction du diazonium correspondant par voltammétrie cyclique en milieu organique. Dans le troisième cas, l'électrode de graphite pyrolytique (PG) est modifiée par des diazoniums portant des groupements carboxyles ou anilines obtenus par réduction spontanée des sels de diazoniums à la surface de l'électrode plongée dans la solution de diazoniums dans l'ACN [59]. Dans tous les cas les auteurs disent avoir formé à la surface une monocouche de fonctions organiques, bien qu'aucun contrôle microscopique ne le prouve.

Dans nos conditions, la stabilité du signal est évaluée en chronoampérométrie au potentiel $E = -0,3\ \text{V vs. Ag/AgCl}$. Moins de 3 % de perte sont observés en 30 minutes quand l'enzyme est liée covalamment via la plus grande densité de fonctions à l'électrode (Figure 72, courbe rouge). Lorsque l'hydrogénase est simplement adsorbée, et non plus liée covalamment, sur la PG modifiée par

réduction des sels de diazonium, les intensités initiales en TED sont divisées par un facteur variant entre 1,5 et 4. La stabilité du signal est également inférieure (Figure 72 B). Ce résultat souligne l'importance et l'efficacité de la liaison covalente réalisée grâce à l'agent couplant EDC-NHS, et suggère que la covalence permet de figer l'enzyme dans une conformation ou orientation favorable à la catalyse. Notons néanmoins que le seul ajout de BV en solution conduit à une nette amélioration de la stabilité du signal pour l'enzyme adsorbée sur PG nue (Figure 72, courbe turquoise). Ce résultat peut être corrélé aux observations antérieures d'augmentation de la stabilité du signal grâce à la présence d'un médiateur en solution [8]. L'hypothèse de maintien de l'enzyme dans une orientation favorable avait été suggérée. Etant donnée la forme du signal observé en CV (semblable à la courbe rouge, Figure 71), on peut plutôt penser dans nos conditions à une connexion médiée qui permettrait d'éviter la formation de l'état inactif du site actif de l'enzyme. La réduction de traces d'O₂ par le BV réduit peut aussi assurer une stabilisation de l'enzyme.

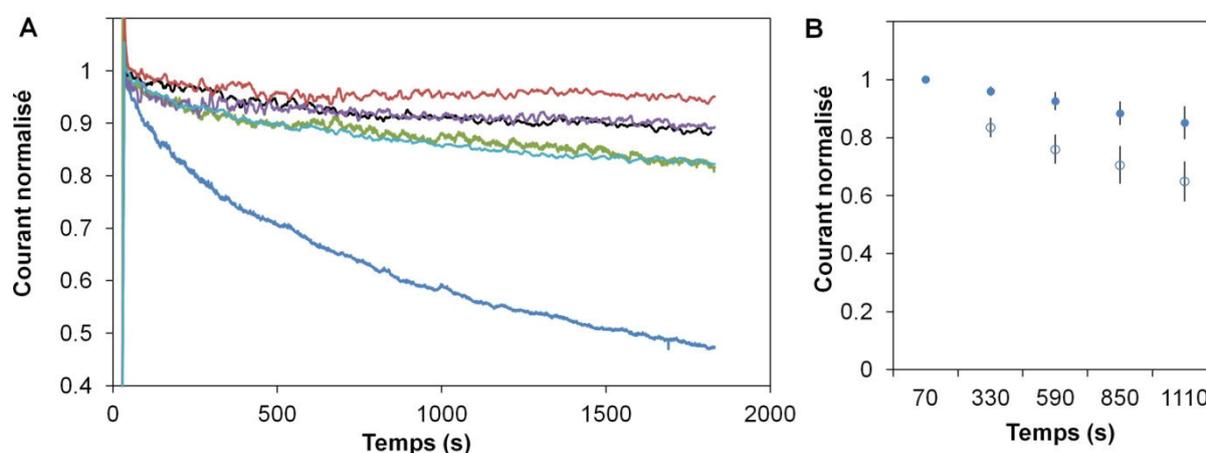


Figure 72 – A : Stabilité du signal d'oxydation de l'H₂ par l'Aa Hase 1 pour différentes durées de formation du film organique : PG nue sans BV (courbe bleue) ; PG nue avec BV (courbe turquoise) ; hydrogénase liée covalemment sur un film formé par une électrolyse de 60 s (courbe verte) ; 120 s (courbe noire) ; 300 s (courbe violette) et 600 s (courbe rouge). CA enregistrée à $E = -0,3$ V vs. Ag/AgCl. B : Comparaison de la stabilité du signal pour l'hydrogénase liée covalemment via EDC-NHS (marqueurs bleus pleins) ou simplement adsorbée sur le film organique (cercles bleus). Valeurs du courant à $E = -0,3$ V vs. Ag/AgCl issues de courbes de CV ; Tampon Hepes 50 mM ; $T = 60^\circ\text{C}$; pH 6,8 ; $\omega = 0$ rpm, flux de H₂ dans l'électrolyte ; $v = 5$ mV.s⁻¹.

A titre de comparaisons, lorsque l'hydrogénase à [Ni-Fe] de *D. gigas* est immobilisée sur une électrode de PG modifiée par réduction de sels de diazonium, 90% du courant initial est toujours observé après une semaine d'opération continue [6]. Avec l'électrode recouverte de MW-CNTs, les performances sont constantes pendant un mois après une perte au cours des premiers jours attribuée aux enzymes non covalemment liées, alors qu'aucun courant catalytique n'est plus observé après 6 jours lorsque l'enzyme est adsorbée sur les MW-CNTs non modifiés [58]. Lorsque les hydrogénases à [Fe-Fe] sont liées covalemment à l'électrode de PG modifiée par les 4-carboxybenzène, 60% de

l'intensité est conservée après 7 h de CA à $E = -366$ mV vs. Ag/AgCl contre moins de 30% dans le cas de la physisorption de l'enzyme. Dans ces exemples, les améliorations enregistrées sont clairement liées à la liaison covalente.

Nous avons également modifié nos films de fibres par réduction de sels de diazonium. L'objectif était non seulement d'obtenir une accroche covalente de l'enzyme, mais aussi d'étudier l'influence du bouchage progressif de la porosité du matériau carboné. Pour les temps les plus courts on observe une grande diminution du signal en TED. Pour les temps plus longs, les courants sont nuls en TED, et équivalents à ceux qui sont observés sur PG nue en TEM. On peut supposer que le film organique bouche les pores du film de CNFs. Il faudra donc dans l'avenir améliorer la technique de réduction. En particulier, on pourra tenter la réduction chimique des sels de diazoniums à la surface des CNFs en suspension dans l'eau grâce à un agent réducteur.

V-2-c- Conclusion : stabilisation de la liaison de l'enzyme à l'électrode

Deux stratégies différentes ont été testées pour augmenter la stabilité du signal électrochimique d'oxydation de l' H_2 par l'*Aa* Hase 1. Toutes deux reposent sur la modification de la chimie de surface des matériaux carbonés constituant l'électrode.

La première méthode a été appliquée pour l'électrode modifiée par les CNFs. Elle consiste en la liaison par π -stacking de dérivés du pyrène sur les CNFs, suivie de la liaison covalente de l'enzyme à ces molécules grâce à l'agent couplant EDC-NHS. Une stabilité du signal d'oxydation de l' H_2 par l'*Aa* Hase 1 immobilisée dans ces conditions est enregistrée. En revanche, l'intensité initiale du signal est plus faible que sur les CNFs non modifiées.

La seconde méthode, appliquée pour l'électrode de PG, assure le greffage de fonctions aryles à la surface de l'électrode grâce à la réduction de sels de diazoniums. Seuls de faibles courants ont été enregistrés en TED. La proportion de TED décroît avec l'augmentation de l'épaisseur du film organique, et la question se pose de savoir si le TED est dû à des molécules d'*Aa* Hase 1 adsorbées sur le graphite grâce à la porosité du film, ou liées covalamment à l'électrode. L'ajout d'un médiateur en solution a permis d'observer des courants importants et stables en TEM, confirmant la présence d'*Aa* Hase 1 à l'électrode. Cette étude préliminaire nécessitera des compléments en terme d'analyse microscopique du film formé, et d'étude de son apport pour la liaison covalente de l'hydrogénase.

B- Réduction de l'oxygène à haute température : immobilisation de la Bilirubine Oxydase de *Bacillus pumilus* (*Bp* BOD) (Collaboration N. Mano, CRPP, Bordeaux)

Les bilirubine oxydases (BOD) et les laccases (LAC) sont les deux enzymes les plus couramment utilisées pour la réduction de l'O₂ dans les BFCs enzymatiques. La BOD est préférée ici à la LAC à cause de sa meilleure activité à pH neutre, pH plus adapté à l'hydrogénase. La première biopile H₂-O₂ développée au BIP repose sur la BOD mésophile de *Myrothecium verrucaria* (*Mv* BOD). L'instabilité à haute température de cette enzyme impose de thermoréguler séparément les compartiments anodique et cathodique de la BFC, ce qui complique le système et rend les applications plus difficilement envisageables.

Afin de lever cette limitation technologique, nous nous sommes intéressés à la bilirubine oxydase de *Bacillus pumilus* (*Bp* BOD) identifiée en 2011 [67], et produite, purifiée et caractérisée par le groupe de Nicolas Mano [68]. Cette *Bp* BOD est en effet thermostable, aussi bien en catalyse homogène qu'en catalyse hétérogène lorsqu'elle est immobilisée à une électrode dans un hydrogel redox [68-69].

I- Structure

La structure de la *Bp* BOD n'est pas résolue à ce jour. Cette enzyme présente respectivement 67 et 26 % d'homologie de séquence avec les BODs de *Bacillus subtilis* et *Myrothecium verrucaria* [68]. Nous avons établi un modèle structural basé sur la structure de la *Bs* BOD (Figure 73).

Ce modèle structural permet d'évaluer la distribution des potentiels électrostatiques de surface de l'enzyme, et d'estimer ses propriétés de surface. Il sera ainsi possible de mieux prédire et expliquer les interactions de l'enzyme avec les matériaux. La protéine présente un fort moment dipolaire de 2073 Debye, qui pointe vers une zone positive située à l'opposé du cuivre T1 à la surface de la protéine (Figure 74 A). On remarque effectivement une zone largement négative autour du cuivre T1 (Figure 74 B) et une zone largement positive à son opposé (Figure 74 C). Par ailleurs les acides aminés hydrophobes forment des entités nombreuses mais isolées à la surface de la protéine (Figure 74 A).

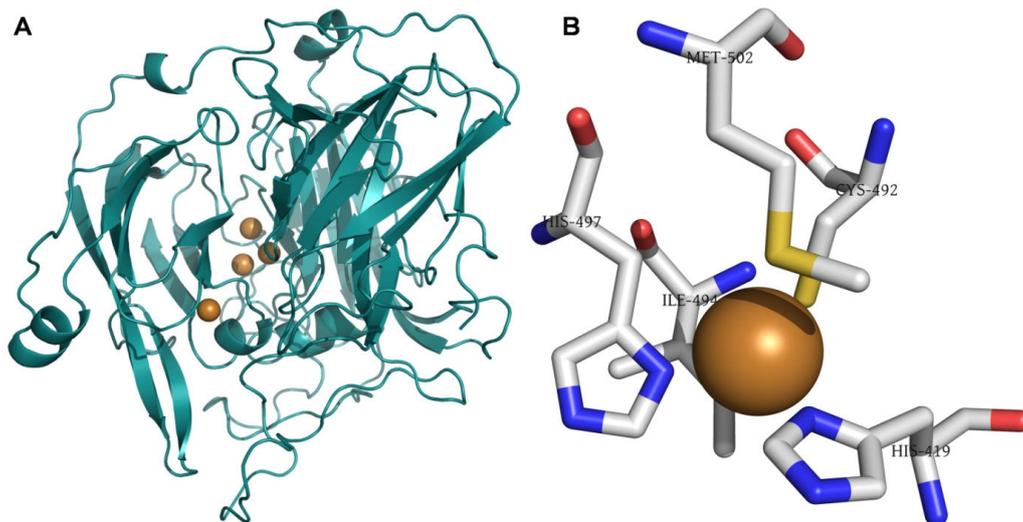


Figure 73- A : Structure modèle de la Bp BOD construite d'après la structure cristallographique de la Bs BOD (pdb ID : 1GSK chaîne A) B : Environnement du cuivre T1 de la Bp BOD (résidus situés à moins de 4 Å du T1)

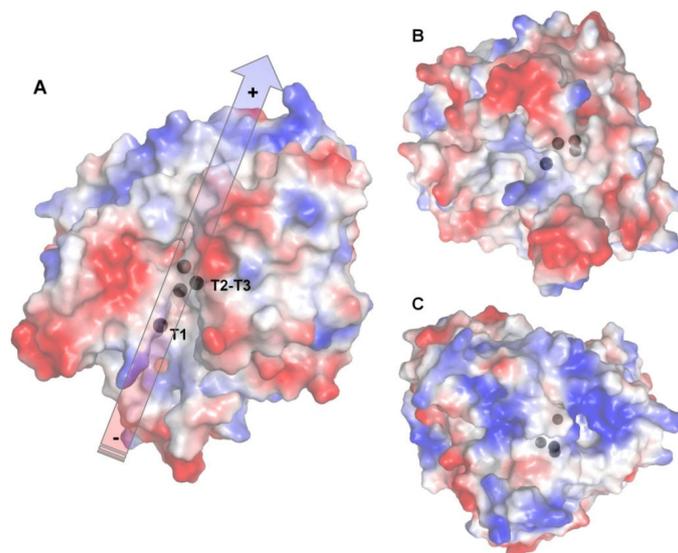


Figure 74- Potentiels électrostatiques de surface de la Bp BOD à pH neutre, d'après la structure modèle basée sur la structure cristallographique de la Bs BOD (pdb ID : 1 GSK chaîne A). A : Surface de l'enzyme dans le sens du moment dipolaire indiqué par la flèche ; B : Surface de l'enzyme autour du cuivre T1 ; C : Surface de l'enzyme à l'opposé du cuivre T1. Les acides aminés hydrophobes sont indiqués en blanc, les acides aminés positifs et négatifs sont indiqués respectivement par les couleurs bleue et rouge. Les atomes de cuivre apparaissent comme des sphères noires.

II- Réduction électrochimique de l'O₂ par la Bp BOD : Optimisation de la biocathode

Le courant direct de réduction de l'O₂ par la Bp BOD n'avait jamais été décrit dans la littérature. Il a néanmoins été observé pour plusieurs autres bilirubine oxydases (*Mv*, *Tt*, *Bs*, cf.

Synthèse Bibliographique) immobilisées sur divers matériaux carbonés. Dans l'optique du développement de la biopile, on cherche à développer une électrode très performante en TED. Notre objectif est de développer une biocathode basée sur la *Bp* BOD immobilisée sur les nanofibres de carbone (CNFs) afin d'homogénéiser la construction des deux électrodes de la future biopile. Les différents paramètres et conditions opératoires sont donc explorés.

II-1- Différents protocoles

Afin de déterminer le protocole le plus favorable à l'adsorption de la BOD sur les CNFs, 3 protocoles d'immobilisation de la BOD et des CNFs à l'électrode sont comparés :

- 1- Dépôt d'une goutte de la solution de BOD sur l'électrode modifiée par les CNFs ;
- 2- Dépôt d'un mélange de CNFs et de BOD sur l'électrode ;
- 3- Incubation de l'électrode modifiée par les CNFs dans une solution de BOD.

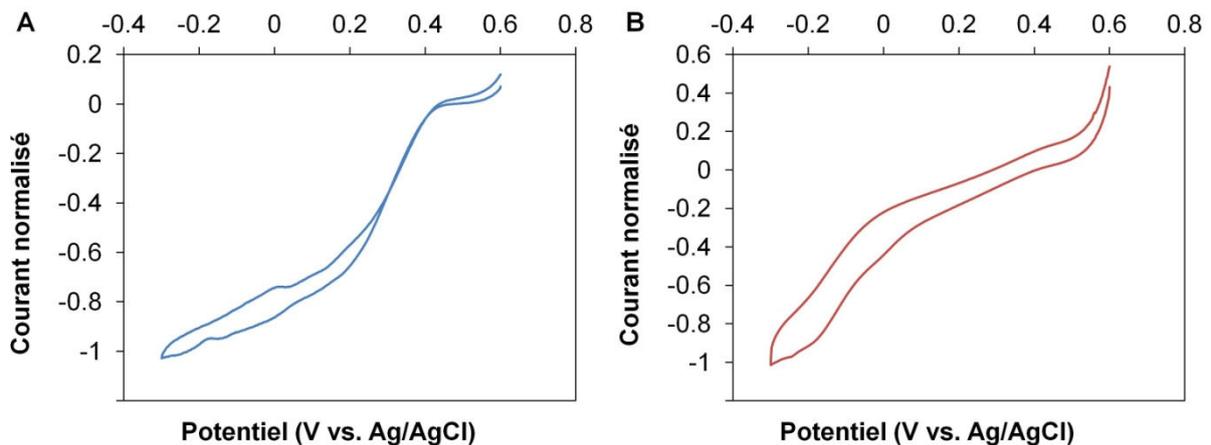


Figure 75- Comparaison de la réduction électroenzymatique de l' O_2 selon le protocole d'immobilisation de la BOD et des CNFs à l'électrode. Protocoles 1 et 2 (A) et protocole 3 (B). Le courant est normalisé par rapport au courant maximal obtenu dans chaque cas. Tampon Hepes pH 7,2 ; $T=40^\circ C$; $v=5 mV.s^{-1}$; $\omega=0 rpm$; électrolyte saturé en O_2 ; O_2 en surpression au dessus de l'électrolyte.

Dans le cas des protocoles 1 et 2, un courant de catalyse de réduction de l' O_2 est observé en l'absence de médiateur redox. La réduction électroenzymatique de l' O_2 démarre à 0,42 V vs. Ag/AgCl à pH 7 (Figure 75 A). La forme du signal catalytique est similaire pour ces deux protocoles (Figure 75 A). Ce potentiel ainsi que la forme du signal sont cohérents avec la littérature [68-69]. Dans le cas du protocole 3 on observe une catalyse faible à partir de 0,42 V et nettement plus marquée à partir de 0 V (Figure 75 B). On peut penser à une réduction enzymatique de l' O_2 à partir de 0,42 V suivie d'une réduction non enzymatique à partir de 0 V. Sans que les raisons en soient très claires, ce protocole ne permettrait pas une bonne incorporation de la BOD.

Par ailleurs, pour une quantité de BOD déposée équivalente, la densité de courant est deux fois plus élevée pour le protocole 1 que pour le protocole 2. Comme déjà discuté pour l'hydrogénase, on peut supposer que dans cette configuration, les molécules de BOD isolent électriquement les CNFs les unes des autres. C'est donc le protocole 1 qui est choisi pour la suite des expériences.

II-2- Comparaison des différentes fibres : CNFs_O2, CNFs_H2, CNFs_H2O2

Les trois types de fibres présentées dans le chapitre précédent sont susceptibles de fournir un environnement différent à la BOD. Elles peuvent donc privilégier différentes orientations, favorables ou non au TED, et stabiliser ou non l'enzyme. Pour déterminer le type de fibre le plus adapté à l'immobilisation fonctionnelle en TED de l'enzyme et à sa stabilité, les catalyses de réduction de l'O₂ par la Bp BOD adsorbée sur les trois types de fibres sont comparées.

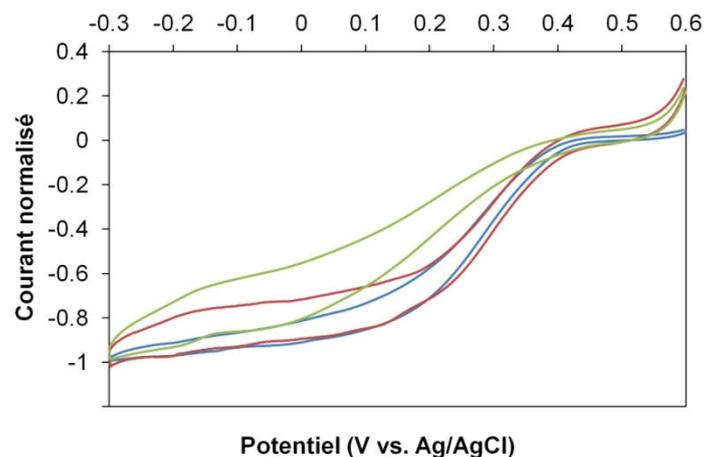


Figure 76- Comparaison du signal voltamétrique de réduction électroenzymatique de l'O₂ par la Bp BOD adsorbée sur les CNFs_ H₂O₂ (courbe verte), sur les CNFs_ O₂ (courbe rouge) et sur les CNFs_ H₂ (courbe bleue). Le courant est normalisé par rapport au courant maximal obtenu dans chacun des cas. Le film de CNFs est formé, par analogie avec la bioanode, par le dépôt de 5 µL de CNFs en suspension à 4 mg.mL⁻¹ dans un mélange H₂O-DMF 50-50 suivi du séchage à 60°C, cette opération étant répétée trois fois. 5µL de BOD à 5µM ; Tampon Hepes pH 7,2 ; T=40°C ; v=5 mV.s⁻¹ ; ω=0 rpm ; électrolyte saturé en O₂ ; O₂ en surpression au dessus de l'électrolyte.

En voltammétrie cyclique, les potentiels de début de la catalyse sont identiques dans les trois cas. Les densités de courant de plateau obtenues sont également comparables. En revanche, la réduction de l'O₂ est beaucoup plus lente, comme le montre la pente du signal divisée par deux, lorsque la BOD est immobilisée sur les CNFs_ H₂O₂ (Figure 76). On peut remarquer que le même phénomène avait été remarqué dans le cas de l'hydrogénase. Le transfert électronique semble donc moins efficace avec ces CNFs. Les isothermes d'adsorption de N₂ ont montré que la structure des CNFs n'a pas été altérée par le traitement au peroxyde d'hydrogène, la conductivité intrinsèque du

matériau doit donc également être préservée. En revanche, la différence entre les trois types de CNFs réside dans la densité de fonctions oxygénées de surface, qui est nettement supérieure pour les CNFs_H2O2.

Pour des protocoles identiques, et avant toute autre optimisation de la bioélectrode, les densités de courants maximales obtenues sont légèrement supérieures avec les CNFs_H2. Une moyenne sur 4 expériences donne $1,68 \pm 0,32 \text{ mA.cm}^{-2}$ pour les CNFs_H2 et $1,45 \pm 0,15 \text{ mA.cm}^{-2}$ pour les CNFs_O2. L'évaluation des propriétés de surface de la Bp BOD montre l'existence d'une zone négative à proximité du T1. Or la surface des CNFs_O2 est chargée négativement à pH neutre. Une orientation du T1 vers la surface des CNFs_O2 ne doit donc pas être favorisée, ce qui explique que des densités de courant moins importantes qu'avec les CNFs_H2 soient obtenues. Cette influence n'est cependant pas prépondérante puisque la différence est faible. De même que pour l'hydrogénase, on peut penser que l'immobilisation de l'enzyme dans une porosité adaptée permet de lever en partie la limitation liée à l'orientation de l'enzyme.

En revanche, la stabilité du signal en chronoampérométrie à $E = 0,2 \text{ V vs. Ag/AgCl}$ est supérieure sur les CNFs_O2. Après une heure d'opération, la BOD immobilisée sur les CNFs_H2 ne conserve plus que 36% de son activité initiale, tandis que la BOD immobilisée sur les CNFs_O2 conserve 48% de son activité initiale. Compte tenu de la nature soluble de la Bp BOD, on peut logiquement conclure que l'environnement hydrophile fourni par les CNFs_O2 stabilise l'immobilisation de la protéine, même si ce point reste à nuancer par la différence réelle d'hydrophilicité des deux types de fibres (cf. chapitre A III). Les CNFs_O2 sont donc choisies comme meilleur compromis pour l'immobilisation efficace et stable de la Bp BOD.

Il est à noter que les valeurs de densités de courant et de stabilité données ici sont celles obtenues avant les autres étapes d'optimisation de la bioélectrode, ce qui explique qu'elles soient inférieures aux valeurs qui seront données dans la suite de ce manuscrit.

II-3- Isotherme d'adsorption

La concentration de l'enzyme déposée sur l'électrode modifiée par les CNFs_O2 est un paramètre supplémentaire qui influe sur l'efficacité enzymatique globale. La figure 77 représente l'évolution des densités de courant de réduction de l'O₂ en fonction de la concentration d'enzyme présente dans la solution déposée à l'électrode.

On constate que les courants augmentent avec la concentration de BOD aux plus faibles concentrations, puis diminuent au-delà de 10 μM. Cette évolution peut être attribuée à l'agrégation de l'enzyme lors du séchage à grande concentration. Bien que ce phénomène ne soit pas démontré, on

peut penser à une compétition entre la cinétique d'adsorption et la cinétique d'agrégation, la seconde l'emportant dans le cas des solutions concentrées.

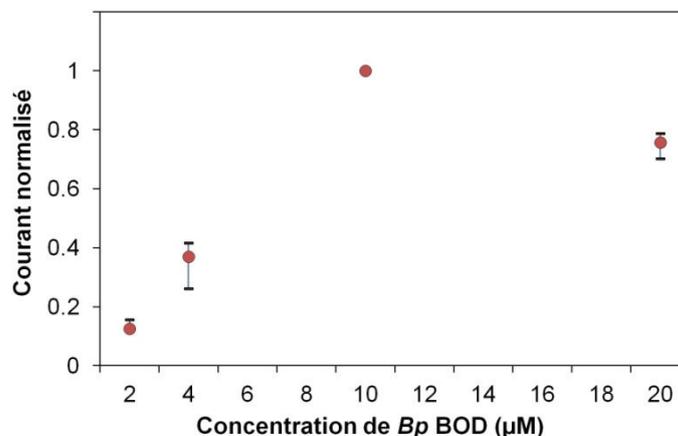


Figure 77- Evolution de la densité de courant de réduction de l'O₂ par la Bp BOD immobilisée sur les CNFs en fonction de la concentration de BOD dans la goutte de 5 µL déposée sur l'électrode à température ambiante. Valeurs des courants à E=0 V vs. Ag/AgCl moyennes, minimales et maximales sur 4 expériences, issues de voltammogrammes réalisés dans du Tampon Hepes pH 7,2 ; T=40°C ; v=5 mV.s⁻¹ ; ω=0 rpm ; électrolyte saturé en O₂; O₂ en surpression au dessus de l'électrolyte. Les courants sont normalisés par rapport au courant maximal obtenu dans chaque série d'expériences.

II-4- Cinétique d'adsorption

Une étude antérieure a montré que le courant de réduction de l'O₂ par la Bp BOD immobilisée dans un hydrogel d'osmium sur une électrode de carbone vitreux était influencé par la durée et la température de séchage, l'optimum étant de deux heures à 25°C [70]. Dans ce cas, l'optimum est un compromis entre la cinétique de formation de l'hydrogel et les conditions favorables à la préservation de l'activité enzymatique. Ces deux paramètres doivent donc être étudiés : il s'agit dans notre cas de trouver les conditions de durée et de température de séchage les plus favorables à une adsorption efficace et fonctionnelle de la Bp BOD sur les CNFs_O2.

Des essais sont réalisés à température ambiante (environ 25°C) et à 4°C pour différentes durées d'adsorption. La différence des résultats obtenus avec ces deux conditions est significative et très reproductible. Après séchage à température ambiante, l'intensité du plateau lors des expériences de voltammétrie cyclique de réduction de l'O₂ par la Bp BOD est en moyenne de 69 ± 3 % de l'intensité obtenue après séchage à 4°C. Cette différence peut en partie s'expliquer par une meilleure préservation de l'activité enzymatique lors de l'adsorption aux plus faibles températures. Néanmoins, l'enzyme étant thermostable, il ne s'agit vraisemblablement pas du facteur prédominant. On peut

penser que la température plus élevée force une adsorption plus rapide qui ne permet pas à l'enzyme de se stabiliser dans une conformation optimale.

L'influence de la durée de séchage à 4°C est ensuite évaluée (Figure 78). L'intensité du courant de réduction par la *Bp* BOD augmente avec la durée de séchage jusqu'à 6 h puis se stabilise. On peut noter qu'elle est toujours égale à la valeur maximale au bout de 48 h. L'augmentation de l'intensité du courant entre 2 et 6h, alors que le film semble sec, peut s'expliquer par la présence de solution dans la porosité du film, qui permet une lente organisation de l'enzyme adsorbée sur les CNFs.

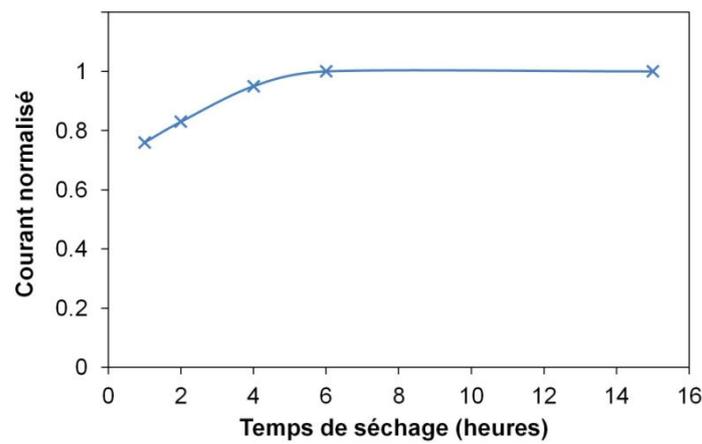


Figure 78 – Influence de la durée de séchage à 4°C sur les courants de réduction de l'O₂ par la *Bp* BOD adsorbée sur les CNFs_O2. Valeurs issues de CVs réalisés dans du tampon phosphate-citrate pH 4 ; T=50°C ; $v=5 \text{ mV.s}^{-1}$; $\omega=0 \text{ rpm}$; flux d'O₂ dans l'électrolyte. Les courants sont normalisés par rapport au courant maximal obtenu dans chaque série d'expériences.

On définit alors le protocole optimal d'immobilisation de la *Bp* BOD sur l'électrode modifiée par les CNFs_O2. Le film de CNFs_O2 est formé, par analogie avec la bioanode, par le dépôt de 5 μL de CNFs_O2 en suspension à 4 mg.mL^{-1} dans un mélange H₂O-DMF 50-50 suivi du séchage à 60°C, cette opération étant répétée trois fois. 10 μL de BOD à 10 μM sont déposés sur le film de CNFs_O2, l'adsorption est réalisée à 4°C pendant la nuit.

II-5- Influence du pH sur la réduction catalytique de l'O₂

Le pH de l'électrolyte influe à la fois le potentiel et l'intensité maximale du courant de réduction électroenzymatique du dioxygène. Le potentiel diminue de 0,05 V par unité de pH, ce qui est proche de la prédiction de la loi de Nernst pour la réduction à quatre électrons de l'O₂ (Figure 79), et cohérent avec ce qui est observé pour d'autres BODs [71]. Ces potentiels sont légèrement supérieurs à ceux observés lorsque la BOD de *Bp* est immobilisée dans un hydrogel redox [72]

L'intensité du courant croît lorsque le pH diminue de pH 7 à pH 4 (Figure 79). Ce résultat est cohérent avec ce qui est observé lorsque la BOD est immobilisée dans un polymère conducteur et connectée à l'électrode via des complexes d'osmium [69], ainsi qu'avec l'évolution de l'activité enzymatique d'oxydation de la bilirubine, le substrat naturel de la *Bp* BOD [68].

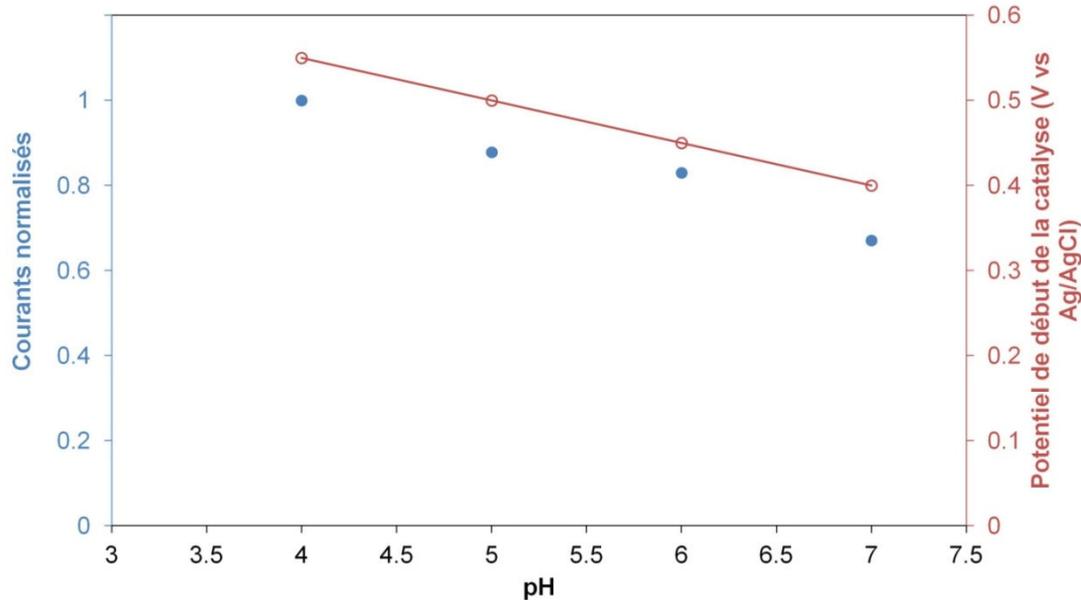


Figure 79- Influence du pH sur le potentiel de démarrage de la catalyse (cercles rouges) et sur les courants de réduction de l' O_2 (disques bleus) par la *Bp* BOD immobilisée sur les CNFs- O_2 (3 x 5 μ L CNFs 4 mg.mL⁻¹). Valeurs des courants à $E=0$ V vs. Ag/AgCl issues de voltammogrammes réalisés dans du tampon 100 mM phosphate- 200 mM citrate pH 4 à 7, $T=50^\circ\text{C}$, $\nu=5$ mV.s⁻¹ ; $\omega=0$ rpm ; électrolyte saturé en O_2 ; O_2 en surpression au dessus de l'électrolyte. Les courants sont normalisés par rapport au courant maximal obtenu.

La BOD est donc plus active aux pH acides. Cependant elle conserve à pH neutre 70 % de l'activité mesurée à pH 4, et se montre effectivement plus favorable que les LACs à un fonctionnement à pH neutre. Par exemple une électrode basée sur l'immobilisation de la laccase de *T. versicolor* dans un polymère d'osmium ne montre plus à pH 7,4 que 7% de l'activité observée à pH 5 [73].

II-6- Influence de la température sur la réduction catalytique de l' O_2

L'efficacité de la catalyse augmente avec la température de 30 à 60°C comme le montre l'expérience de voltammétrie cyclique représentée sur la figure 80. Les densités de courant sont multipliées par 2,7 entre 30 et 60°C. A des températures supérieures à 60°C, on observe une diminution des densités de courant maximales, et une altération de la forme du signal avec notamment une pente initiale plus faible (Figure 80).

En catalyse homogène, un optimum de température de 75°C et une multiplication par 4 de l'activité d'oxydation de l'ABTS entre 30 et 60°C ont été observés [69]. Lorsque la BOD est immobilisée dans un hydrogel et connectée via un complexe d'osmium, l'efficacité de la catalyse augmente avec la température de 37 à 70°C, et les densités de courant sont multipliées par 3 entre 37 et 70°C [69]. Même si le TED est conservé à haute température, il apparaît donc que l'immobilisation sur les CNFs et/ou la connexion directe affecte l'efficacité à haute température.

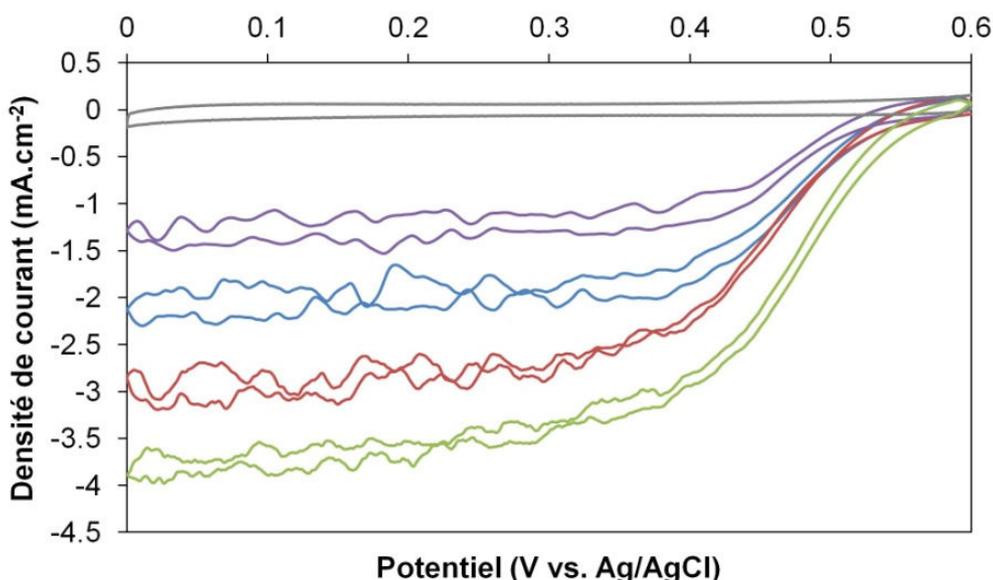


Figure 80- Influence de la température sur la catalyse de réduction de l'O₂ par la Bp BOD immobilisée sur les CNFs_ O₂ : 30°C (courbe violette), 40°C (courbe bleue), 50°C (courbe rouge) et 60°C (courbe verte). La courbe grise indique l'électrode modifiée par les CNFs sans enzyme à 60°C. Tampon 100 mM phosphate- 200 mM citrate ; pH 4 ; bullage O₂ dans la solution électrolytique ; $v=5 \text{ mV.s}^{-1}$; $\omega=0 \text{ rpm}$

II-7- Influence de l'apport du substrat : oxygène pur ou air, bullage ou solution saturée

Dans l'étude dédiée à la catalyse par l'hydrogénase, on a mis en évidence l'influence du transport de substrat sur l'efficacité de la catalyse (Chapitre A III-4). Cette observation est d'autant plus vraie pour les bilirubine oxydases dont l'affinité pour l'oxygène est relativement faible. Le $K_M(\text{O}_2)^2$ de la *Mv* BOD est par exemple de 0,65 mM à $E = 0,3 \text{ V vs. Ag/AgCl}$ et pH 5,35 [74], valeur très élevée par rapport aux $K_M(\text{H}_2)$ des hydrogénases qui sont par exemple respectivement de 0,57 et 0,09 μM pour les hydrogénases à [NiFe] tolérantes à l'O₂ des bactéries *Ralstonia eutropha* et *Ralstonia metallidurans* à $E = -0,3 \text{ V vs. Ag/AgCl}$, pH 5,5 et $T = 30^\circ\text{C}$ [75]. De plus le substrat se raréfie avec l'augmentation de la température, la solubilité de l'O₂ dans l'eau passant de 0,28 Mol.L^{-1} (9,1 g.L^{-1}) à 20°C à 0,17 Mol.L^{-1} (4,7 g.L^{-1}) à 60°C.

² On rappelle que la constante de Michaelis, K_M , permet de caractériser l'affinité de l'enzyme pour son substrat. De façon générale, plus le K_M est faible, plus l'affinité de l'enzyme pour son substrat est élevée.

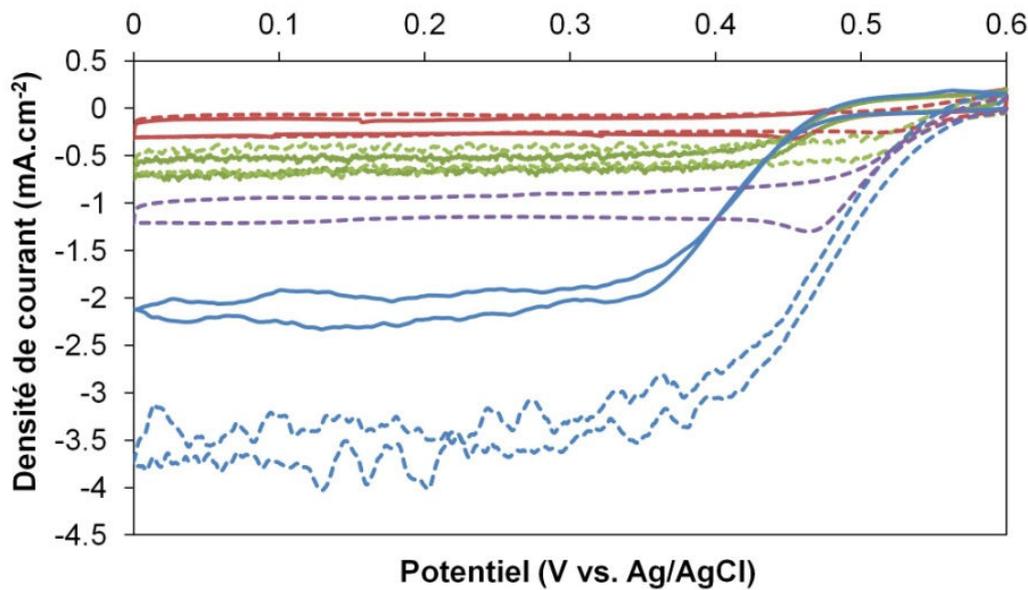


Figure 81- Influence de l'apport de substrat sur la catalyse de réduction de l'O₂ par la Bp BOD immobilisée sur des CNFs pour 4 modes d'apport du substrat : électrolyte saturé en air et surpression d'air (couleur rouge), bullage d'air dans la solution électrolytique (courbes vertes), solution électrolytique saturée en O₂ et surpression d'O₂ (en violet), bullage d'O₂ dans l'électrolyte (courbes bleues). Les mesures effectuées à pH4 et pH 6 sont indiquées respectivement par des tirets et par des lignes continues. Tampon 100 mM phosphate- 200 mM citrate pH 4 et 6 ; T=50°C ; v=5 mV.s⁻¹ ; ω=0 rpm

Lorsque la BOD est immobilisée dans le réseau de CNFs formé à l'électrode, la disponibilité du substrat influence effectivement fortement les densités de courant obtenues comme le montre la figure 81. Dans cette expérience, le substrat est fourni sous forme d'air ou d'oxygène pur, et de deux manières : en surpression au dessus de l'électrolyte de telle sorte que la solution demeure saturée, ou en bullage direct dans l'électrolyte de façon à forcer la convection (cf. chapitre A III-4). Aux deux pH étudiés, dans le cas de l'air, on constate que les densités de courant sont doublées par l'injection du flux de gaz directement dans l'électrolyte. Dans le cas de l'oxygène, elles sont triplées. Pour l'hydrogénase, dans des conditions équivalentes de débit, changer le mode d'apport de substrat conduisait seulement à doubler les densités de courant. Ce résultat souligne donc la grande dépendance de l'efficacité de la biocathode vis à vis de l'apport de substrat. Dans le contexte des biopiles H₂-O₂, il faut noter que le choix d'un mélange gazeux pauvre en O₂ a été fait à plusieurs reprises afin de s'affranchir de la membrane séparatrice [37, 45]. La cathode fonctionne donc loin du maximum de son efficacité dans ces conditions, et les deux électrodes sont équilibrées en termes de densités de courant grâce au surdimensionnement de la cathode.

Dans les conditions de surpression du gaz au dessus de l'électrolyte, un pic de réduction est observé avant le plateau (Figure 81, courbes rouges et violette). Cette forme du CV est caractéristique des conditions de limitation par le transport d'O₂ [76]. Effectivement, le pic disparaît lorsque le flux d'O₂ est injecté directement dans l'électrolyte, permettant de fournir convenablement le substrat.

II-8- Stabilité de la bioélectrode à haute température

La stabilité de la biocathode est étudiée par CV et chronoampérométrie. En CV, la stabilité du signal diminue avec la température (Figure 82). Ainsi, au bout de 30 minutes de cyclage continu, 90%, 80% et 70% de l'intensité initiale sont conservés respectivement à 50, 60 et 70°C.

Contrairement à l'oxydation de H₂ par l'hydrogénase, la stabilité du signal de réduction de l'O₂ est plus faible lorsqu'elle est évaluée en chronoampérométrie. Ainsi, lors de CA réalisées à E = 0,3 V vs. Ag/AgCl et T = 50°C, on observe une décroissance continue du signal de 19%.h⁻¹, sans stabilisation sur 2 h. Il est possible que cette perte soit liée à la formation en présence de NaCl d'une forme de l'enzyme inactive pour la catalyse, qui sera discutée dans le chapitre B II. La diffusion de faibles quantités de NaCl à travers le poreux de l'électrode de référence suffirait à la formation de cette forme. Pour confirmer cette hypothèse, il faudrait réaliser cette même expérience à l'aide d'une électrode de référence ne mettant pas en jeu d'ions Cl⁻.

Enfin, la stabilité d'une bioélectrode est mesurée sur plusieurs jours, en réalisant une CV tous les jours (Figure 82 B). Contrairement à la bioanode, la biocathode montre une bonne stabilité sur plusieurs jours. Au bout d'une semaine, on observe encore 65% de l'intensité initiale à E=0,1 V vs. Ag/AgCl, et 58 % à 0,3 V. En recherchant les bases moléculaires de la thermostabilité, il serait intéressant à l'avenir de pouvoir établir un lien entre la thermostabilité d'une enzyme et sa stabilité à l'électrode.

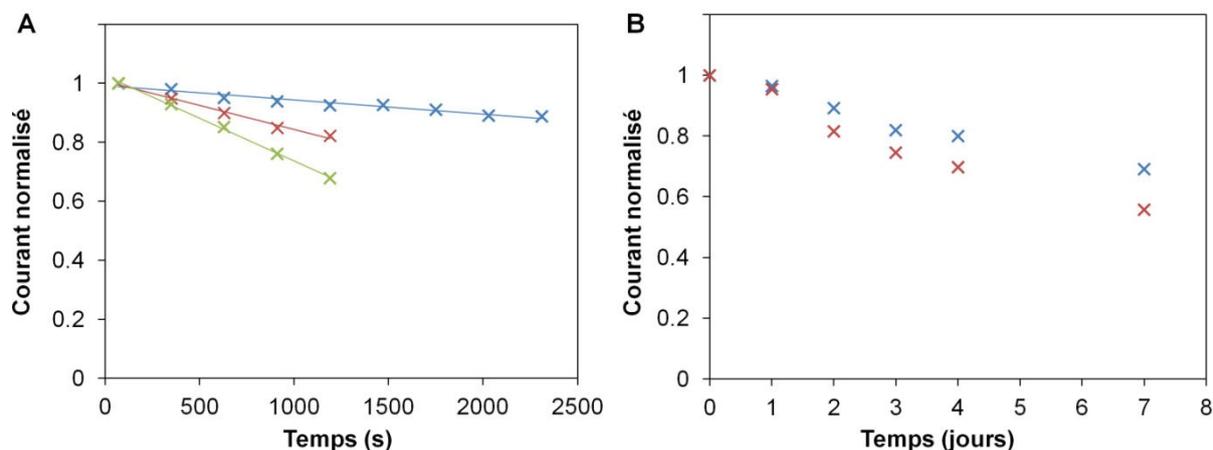


Figure 82- Stabilité du signal de réduction électroenzymatique de l'O₂ par la Bp BOD adsorbée sur 3 couches de CNFs_O2 (60 µg). A : Evolution du courant à E= 0,3 V vs. Ag/AgCl mesuré au cours de cycles consécutifs de voltammétrie cyclique à v=5 mV.s⁻¹ pour différentes températures : 50 °C (points bleus) ; 60°C (points rouges) et 70°C (points verts). B : Evolution au cours des jours du courant mesuré à 0,3 V (points rouges) et 0,1 V (points bleus) vs. Ag/AgCl au cours de cycles de voltammétrie cyclique à T=50°C et v=5 mV.s⁻¹. Entre les mesures l'électrode est conservée dans du tampon phosphate-citrate pH 7 à 4°C. Tampon phosphate-citrate 200-100 mM ; pH 4 ; ω=0 rpm ; Flux d'O₂ dans l'électrolyte.

III- Courant direct et courant médié par l'ABTS

Lorsque l'ABTS est ajouté dans la solution électrolytique, on observe en voltammétrie cyclique l'apparition d'un courant qui démarre à un potentiel légèrement supérieur au potentiel de réduction de l'O₂ par la BOD seule (0,58 V vs. Ag/AgCl à pH 4). La pente de ce signal et son intensité maximale sont également supérieures au signal du courant direct de réduction de l'O₂ par la BOD. Ces observations restent vraies que la BOD soit immobilisée sur PG nue (Figure 83 A) ou sur PG modifiée par des CNFs (Figure 83 B). Ce courant peut être attribué à la réduction de l'O₂ par une population d'enzymes qui n'est pas connectée directement à l'électrode et pour laquelle l'ABTS joue le rôle de donneur d'électrons. On observe donc un courant médié au potentiel de l'ABTS, et le courant de plateau correspond à la somme des courants direct et médié. Comme dans le cas du BV pour l'hydrogénase, l'ABTS s'adsorbe sur les CNFs, et l'équilibre d'adsorption est atteint rapidement. De la même manière, l'ABTS non adsorbé est donc disponible pour le courant médié.

Afin de s'assurer que le courant médié observé est bien dû à une population d'enzymes immobilisées à l'électrode, et non pas libérées en solution, deux contrôles sont effectués. Dans un premier contrôle, l'électrolyte est remplacé par du tampon sans ABTS, l'électrode est soigneusement rincée à l'eau distillée et une nouvelle mesure de voltammétrie est réalisée. Sans ajout d'ABTS, on retrouve le signal correspondant au courant direct. Après un nouvel ajout d'ABTS, on retrouve le signal correspondant à la somme des courants direct et médié. Dans un second contrôle, l'électrolyte est conservé, l'électrode de travail est remplacée par une électrode modifiée uniquement par des CNFs, et la mesure de voltammétrie est répétée. On n'observe pas de signal de réduction de l'O₂ malgré la présence de l'ABTS.

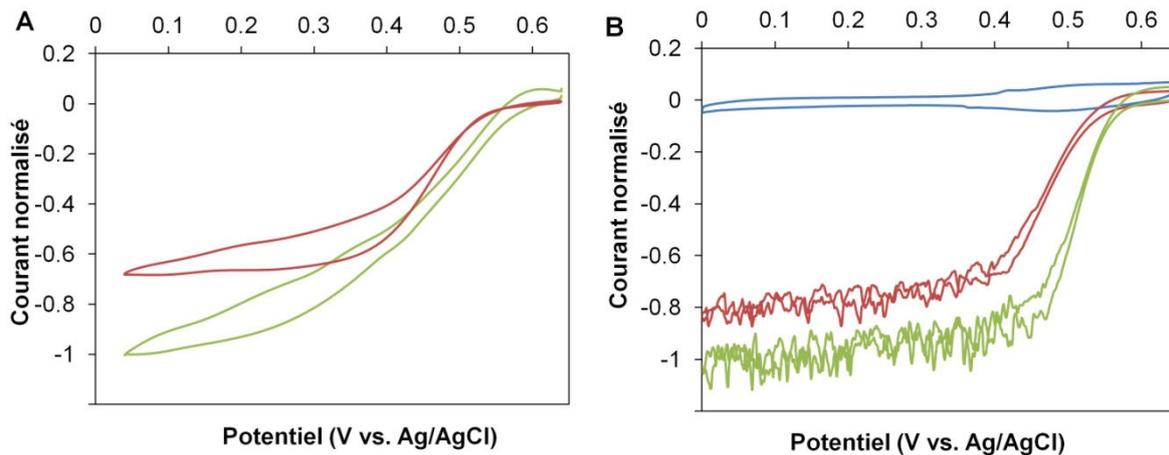


Figure 83- Courant direct (courbe rouge) et somme des courants direct et médié par l'ABTS (courbe verte) pour la réduction de l'O₂ par la Bp BOD immobilisée sur une électrode de PG (A) et sur une électrode de PG+CNFs (B). La courbe bleue indique le signal de l'ABTS seul. Tampon 100 mM phosphate - 200mM citrate pH 4 ; T = 50°C ; $\nu=5 \text{ mV.s}^{-1}$; $\omega=0 \text{ rpm}$; bullage d'O₂ dans l'électrolyte ; [ABTS] = 100 μM .

On peut donc conclure qu'une partie des enzymes immobilisées à l'électrode n'est pas orientée de façon à permettre la connexion directe. Cette fraction peut être approximativement quantifiée à partir des intensités respectives de courant direct (sans ABTS) et direct + médié (avec ABTS) en voltammétrie cyclique grâce à la formule :

$$\text{Fraction(\%)} = 100 \frac{I_{\text{MET+DET}} - I_{\text{DET}}}{I_{\text{DET+MET}}}$$

Une moyenne sur trois mesures donne $19.4 \pm 3.0\%$ d'enzymes mal orientées pour le TED sur les CNFs_O2. La porosité ne suffit donc pas à assurer la connexion directe de toutes les enzymes. On peut également penser que l'occupation de la porosité du réseau n'est pas optimale, et que certaines enzymes sont immobilisées en multi-couches, ce qui explique leur inefficacité pour le TED. Même si cette méthode ne donne qu'une approximation de la fraction d'enzymes qui ne participe pas au courant direct, la différence entre ce résultat et celui observé pour l'hydrogénase laisse penser que le matériau est moins adapté à la Bp BOD qu'à l'Aa Hase 1.

IV- Influence des anions Cl⁻ sur les bilirubine oxydases bactérienne de *Bacillus pumilus* et fongique de *Myrothecium verrucaria*

Une forme « de repos » de l'état oxydé de l'enzyme, appelée « resting oxidised », différente de la forme « intermédiaire natif » intervenant dans le cycle catalytique, a été mise en évidence dans certaines MCOs [80]. L'influence du potentiel et du pH sur l'équilibre entre ces deux formes et la cinétique de formation de la forme « resting oxidised », ont été plus particulièrement étudiées. Il en

ressort notamment que la proportion de cette forme et sa vitesse de formation sont d'autant plus élevées que le pH est faible. Une seconde forme de repos, nommée « alternative resting » a été mise en évidence dans certaines autres MCOs, notamment la BOD Cot A de *Bacillus subtilis* [81].

Récemment une étude des BODs de *Magnaporthe oryzae* et *Myrothecium verrucaria* a montré que ces deux formes pouvaient exister chez une même enzyme [81], et qu'elles pouvaient interconvertir sous certaines conditions notamment de potentiel et de présence d'ions chlorure. De plus, cette étude a conclu grâce à diverses techniques (RPE, électrochimie, XAS) que la forme « resting oxidized » correspond à un état complètement oxydé du TNC, tandis que la forme « alternative resting » n'est qu'un état partiellement oxydé (2 Cu^+ , 1 Cu^{2+}), le cuivre T1 étant oxydé dans les deux cas.

Cette différence de degrés d'oxydation du cuivre se traduit par des différences spectrales, rappelées dans le tableau 5, et des différences d'activité enzymatique. En spectroscopie UV-visible, un épaulement à 330 nm, correspondant à un hydroxyde pontant les deux cuivres T3, disparaît dans la forme alternative où les deux cuivres T3 sont pontés par un dioxygène (ou un seul atome d'oxygène). En électrochimie on observe pour la forme « alternative » un décalage du potentiel de la catalyse enzymatique de réduction du dioxygène vers les potentiels plus négatifs. Enfin, cette forme alternative se montre bien moins active vis-à-vis de l'oxydation de l'ABTS, substrat de haut potentiel.

	T1	T2	T3
	absorption à 600 nm	pas d'absorption UV	épaulement à 330nm
resting oxidized	$A_{//}$ exceptionnellement petit $g_{//}=2.22$ et $A_{//}=83.10^{-4} \text{ cm}^{-1}$	paramètres RPE "normaux" $g_{//}=2.22-2.27$ et $A_{//}=170-200.10^{-4} \text{ cm}^{-1}$	atomes de Cu couplés de façon antiferromagnétique
			$d(\text{Cu-Cu}) < 4 \text{ \AA}$
	absorption à 600 nm	pas d'absorption UV	pas d'épaulement à 330nm
alternative resting	$A_{//}$ exceptionnellement petit $g_{//}=2.22$ et $A_{//}=83.10^{-4} \text{ cm}^{-1}$	$A_{//}$ inhabituellement petit $A_{//}=80-100.10^{-4} \text{ cm}^{-1}$	atomes de Cu couplés de façon antiferromagnétique
			$d(\text{Cu-Cu}) > 4,7 \text{ \AA}$

Tableau 5- Caractéristiques spectrales des deux formes « resting » des BODs de *Magnaporthe oryzae* et *Myrothecium verrucaria* [81]. Les différences sont indiquées en bleu.

Par ailleurs, il est communément admis que les BODs présentent une meilleure résistance aux ions chlorure que les laccases : ce point est cependant rarement décrit de façon rationnelle, les études de la tolérance de la BOD étant notamment généralement réalisées dans des conditions particulières de

potentiel et de pH. Par exemple, la *Mv* BOD immobilisée dans un polymère redox est insensible à une concentration de NaCl de 500 mM à pH 7,2 et sous un potentiel de 0,2 V vs. Ag/AgCl [82] ou à une concentration de 150 mM NaCl à pH 7,4 [83]. De même, la *Tt* BOD fournit un courant de réduction d'O₂ de 3 mA.cm⁻² à 0.14 V à pH 7,4 malgré la présence de NaCl à la concentration de 150 mM [84]. Ou encore, la *Bp* BOD immobilisée dans un polymère hydrogel redox est insensible à une concentration de NaCl de 140 mM à pH 7,2 [85].

Notre objectif est ici d'explorer la relation entre la présence de NaCl et la formation de la forme « alternative resting ». Nous comparons le comportement électrochimique de cette forme chez les BODs de *Myrothecium verrucaria* et *Bacillus pumilus*. Nous analysons également l'influence du pH et de la température sur l'équilibre entre les deux formes. Enfin nous étudions l'influence du potentiel sur leur inter conversion, et notamment l'influence des conditions oxydantes sur la formation de la forme « alternative resting ».

IV-1- Mise en évidence des deux formes « resting »

IV-1-a- Etats du cuivre observés en spectroscopie UV-visible

Comme rappelé dans l'introduction, le spectre UV-visible des BODs se caractérise :

- par une bande d'absorption à 600 nm (cuivre T1 à l'état oxydé)
- par un épaulement à 330 nm (cuivre T3 à l'état oxydé uniquement dans la forme « resting oxidized ») [81]

A pH 4 et 7, les spectres d'absorption sont réalisés pour la BOD de *Bacillus pumilus* :

- à l'état « as prep »
- après réduction à l'aide de dithionite, suppression de l'excès de dithionite par centrifugation sur vivaspin et réoxydation
- en présence de NaCl

Le spectre UV-visible de la BOD de *Bacillus pumilus* réoxydée après réduction, montre à pH 4, outre la bande à 600 nm, un épaulement à 330 nm. Cet épaulement disparaît par ajout de NaCl (Figure 84). On observe le même épaulement à 330 nm lorsque les mesures sont effectuées à pH 7 (Figure 84), en revanche il ne disparaît pas par ajout de NaCl. Ces observations confirment l'existence de deux formes « resting » de la *Bp* BOD, qu'on nommera « resting oxidized » et « alternative resting form » par homologie avec la notation adoptée dans l'étude décrite plus haut [81]. Nos observations suggèrent de plus que l'équilibre entre ces deux formes est influencé par le pH.

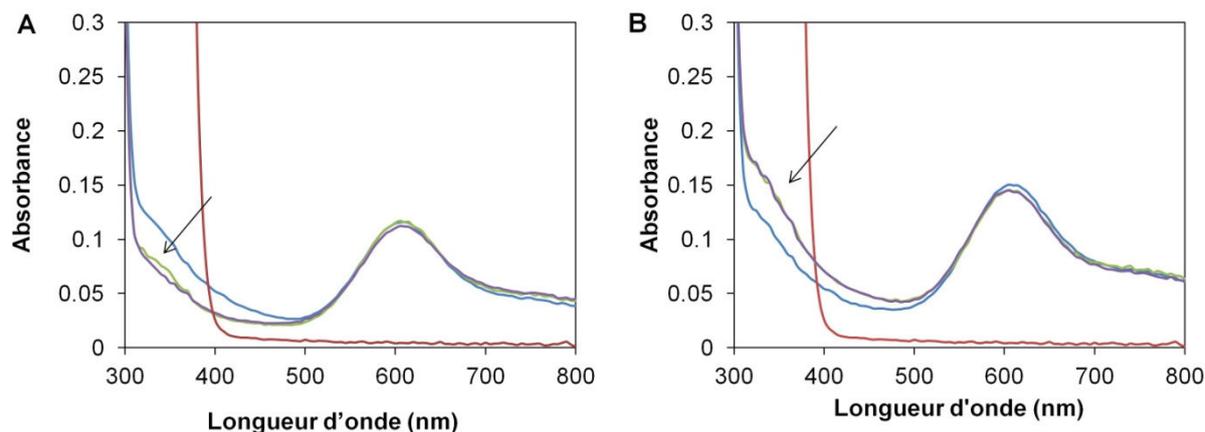


Figure 84- Spectre visible de la Bp BOD à pH 4 (à gauche) et à pH 7 (à droite) à T° ambiante. Enzyme « as prep » (courbe bleue), réduite (courbe rouge), réoxydée après réduction (courbe verte), après ajout de NaCl (courbe violette). La flèche indique l'épaule à 330 nm.

IV-1-b- Suivi électrochimique de la réduction enzymatique du dioxygène

La BOD est adsorbée sur des CNFs déposées sur une électrode de PG, de façon à pouvoir réaliser la réduction directe du dioxygène. Des expériences de voltampérométrie cyclique et de chronoampérométrie sont réalisées en la présence ou en l'absence de NaCl.

IV-1-b-i- BOD de *Bacillus pumilus*

Comme cela a été décrit plus haut l'enzyme adsorbée sur les CNFs_O2 se montre électroactive à pH neutre et acide avec un optimum à pH 4. En voltammétrie cyclique en l'absence de NaCl la réduction catalytique de O_2 démarre à $E_1 = +0.56$ V vs. Ag/AgCl à pH 4. Après addition de NaCl, lors du scan aller (*i.e.* E variant des potentiels positifs vers 0), le potentiel de la réduction catalytique de O_2 est décalé vers un potentiel E_2 plus cathodique. A pH 4 ce potentiel est $E_2 = +0,26$ V, il varie également avec le pH. Pour $0 < E < E_2$, l'intensité du courant tend vers la valeur observée en l'absence de NaCl tout en restant légèrement inférieure (Figure 85 A). Ceci corrobore l'hypothèse de l'existence de deux formes « resting » distinctes de l'enzyme, une forme totalement oxydée, « resting oxidised », activée à haut potentiel pour la réduction de l' O_2 ; et une forme partiellement oxydée, « alternative resting », activée à plus bas potentiel pour la réduction de l' O_2 . De façon intéressante, quel que soit le pH, le scan retour n'est que peu affecté par la présence de NaCl. On notera que la quantité de NaCl à partir de laquelle ce phénomène est observé et se stabilise dépend du pH, de la température et du temps d'incubation. Pour des quantités de NaCl inférieures à cette quantité, on a coexistence des deux formes puisque la réduction de O_2 démarre à E_1 mais est plus lente jusqu'à E_2 (Figure 85 B). Lorsque l'on rajoute du NaCl au-delà de cette quantité, on n'observe plus d'évolution de la forme du signal.

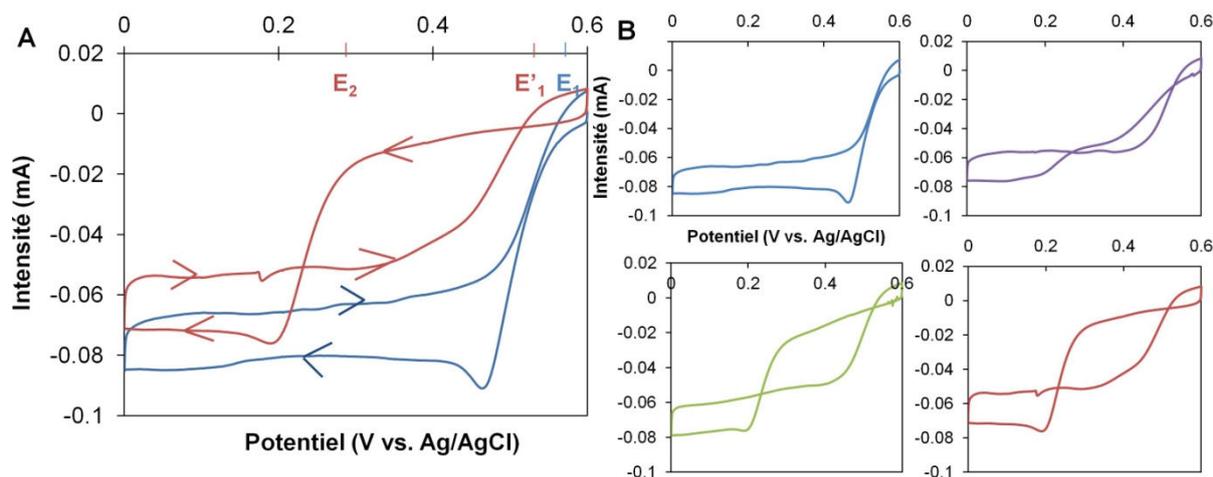


Figure 85- Influence de l'ajout de NaCl sur la réduction catalytique de l' O_2 par la BOD de *Bacillus pumilus* à pH 4. A : en absence (courbe bleue) et en présence (courbe rouge) de NaCl (15 mM) (le sens du balayage de potentiel est indiqué par des flèches). B : pour différentes concentrations de NaCl : 0 mM (bleu), 6 mM (violet), 10 mM (vert), 15 mM (rouge). Tampon phosphate-citrate pH 4, $T = 50^\circ\text{C}$, $\omega = 0$, électrolyte saturé en O_2 , O_2 en surpression. $v = 5 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

La conversion de la forme « alternative resting » en forme « resting oxidised » nécessite le passage à potentiels réducteurs. En effet, une électrode modifiée par la BOD et soumise à un cyclage dans NaCl puis transférée dans un électrolyte ne contenant pas de NaCl réduit O_2 au potentiel E_2 au premier cycle, puis à un potentiel E_1' légèrement inférieur à E_1 à partir du deuxième cycle (Figure 86). L'exclusion de NaCl de l'électrolyte ne suffit donc pas à restaurer la forme « resting oxidised ». Des observations similaires peuvent être faites pour une autre BOD bactérienne, la CotA de *Bacillus subtilis* (Figure 87). De plus, le phénomène décrit ici n'est pas un effet de la surface de l'électrode puisqu'il est observé que la BOD soit immobilisée sur des nanofibres de carbone ou sur une électrode de graphite pyrolytique (Figure 87).

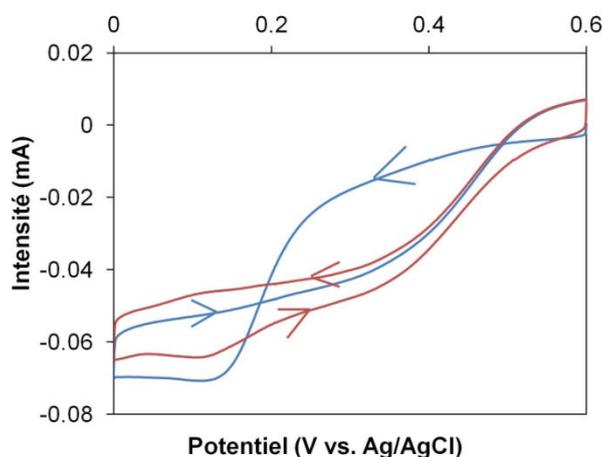


Figure 86- Réduction catalytique de l' O_2 par la BOD de *Bacillus pumilus* à pH 4 après transfert d'un électrolyte contenant du NaCl à la concentration 15 mM dans un électrolyte sans NaCl. Premier cycle (courbe bleue) et

second cycle (courbe rouge). Sens du balayage de potentiel indiqué par des flèches. Tampon phosphate-citrate pH 4, $T = 50^{\circ}\text{C}$, $\omega = 0$, électrolyte saturé en O_2 , O_2 en surpression. $v = 5 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

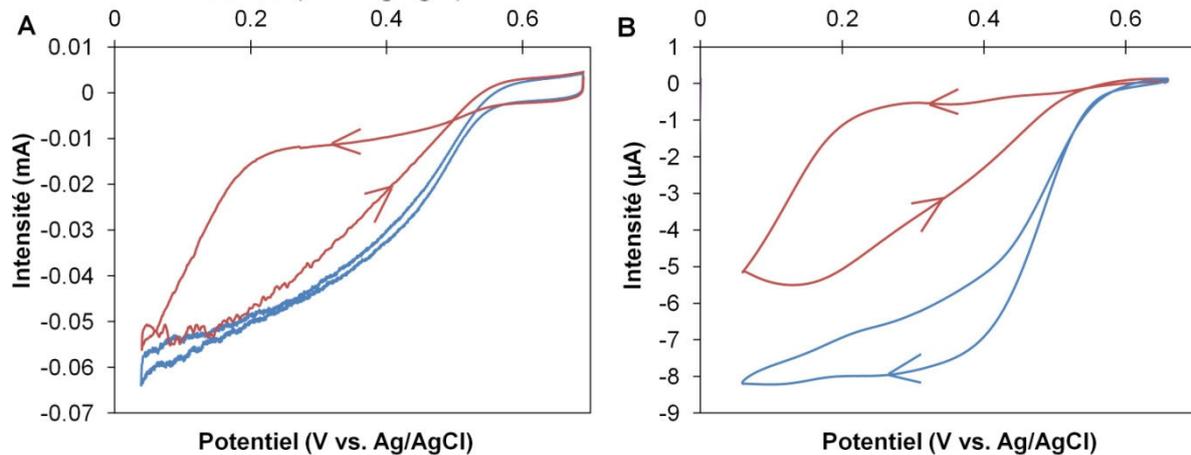


Figure 87 – A : Réduction catalytique de l' O_2 par la BOD de *Bacillus subtilis* adsorbée sur les CNFs ; B : Réduction catalytique de l' O_2 par la BOD de Bp adsorbée sur PG nue. CV réalisées en absence (courbe bleue) et en présence (courbe rouge) de NaCl (15 mM). Tampon phosphate-citrate pH 4 ; $T = 37^{\circ}\text{C}$; $\omega = 0$; flux d' O_2 dans l'électrolyte ; $v = 5 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

IV-1-b-ii- BOD de *Myrothecium verrucaria*

Le phénomène diffère de celui observé pour la BOD de *Bacillus pumilus*. En l'absence de NaCl, la réduction catalytique de O_2 démarre au potentiel $E_1 = 0,62 \text{ V vs. Ag/AgCl}$ à pH 4. Ce potentiel varie également avec le pH en accord avec la littérature [74, 86].

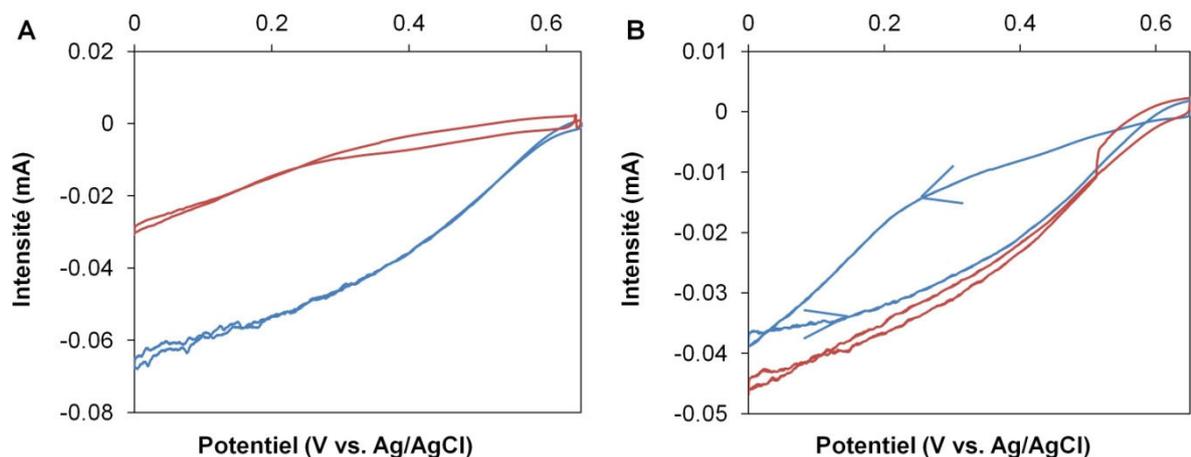


Figure 88- Influence de l'ajout (A) et de l'exclusion (B) de NaCl sur la réduction catalytique de l' O_2 par la BOD de *Myrothecium verrucaria* à pH 4. A : Premier cycle sans NaCl (bleu), second cycle en présence de 50 mM NaCl (rouge). B : Après transfert d'un électrolyte à $[\text{NaCl}]=50\text{mM}$ dans un électrolyte à $[\text{NaCl}]=0$. Premier cycle (bleu) et second cycle (rouge). Sens du balayage de potentiel indiqué par des flèches. Tampon phosphate-citrate pH 4, $T = 25^{\circ}\text{C}$, $\omega = 0$, électrolyte saturé en O_2 , O_2 en surpression, $v = 5 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

Après ajout de NaCl, le potentiel de la réduction catalytique de l'O₂ est également décalé vers un potentiel E₂ plus cathodique. En revanche, en présence de NaCl, la réduction de l'O₂ est plus faible pour 0 < E < E₂ et demeure inhibée après passage à bas potentiel (Figure 88 A). Cette inhibition est cependant réversible : après exclusion de NaCl de l'électrolyte, de la même façon que pour les BODs de *Bacillus*, la forme active est régénérée par un passage à bas potentiel (Figure 88 B). A partir du second cycle la réduction de O₂ démarre à un potentiel E₁' légèrement inférieur à E₁.

Les expériences de CV mettent donc en évidence pour les deux enzymes l'existence d'une forme « resting alternative », formée en présence de NaCl, et inactive pour la catalyse de réduction de l'O₂ à haut potentiel. On ne peut donc plus parler de « tolérance » de ces BODs au NaCl.

IV-2- Influence du pH sur l'inhibition par les chlorures à haut potentiel

IV-2-a- Activité d'oxydation de l'ABTS observée en spectroscopie UV-visible

L'influence du pH sur l'inhibition par les chlorures de l'oxydation enzymatique de l'ABTS est observée pour les BODs de *M. verrucaria* et de *B. pumilus*. La constante catalytique k_{cat} est mesurée dans les mêmes conditions en l'absence de NaCl, et après une minute d'incubation à 4°C en présence de NaCl. La figure 89 représente pour les deux BODs le pourcentage d'activité conservée. Les mesures sont effectuées aux températures usuellement reportées dans la littérature pour les tests d'activité respective des deux enzymes. On constate globalement le même comportement pour les deux BODs qui à pH acide sont inactivées pour l'oxydation de l'ABTS. Le potentiel redox de cette espèce étant de +650 mV pour tout pH, cette observation confirme l'existence, en présence de NaCl, d'une forme des BODs inactive à haut potentiel. Cette expérience montre de plus une forte influence du pH sur la proportion de cette forme, proportion d'autant plus importante que le pH est faible.

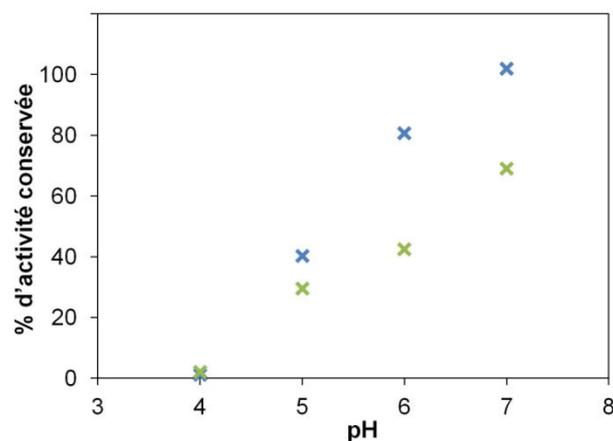


Figure 89- Pourcentage de l'activité conservée après une minute d'incubation en présence de 200 mM NaCl : BODs de *Bp* (bleu) et de *Mv* (vert). Tampons phosphate-citrate pH 4 à 7 saturés en air, T=25°C (*Mv*) ou 37°C (*Bp*)

IV-2-b- Suivi électrochimique de la réduction du dioxygène par la BOD en phase hétérogène

En voltammétrie cyclique, on constate que l'inhibition par le NaCl à haut potentiel est influencée par le pH : pour une même durée d'exposition au NaCl et une même concentration de NaCl, l'inhibition est d'autant plus forte que le pH est faible. La figure 90 montre l'effet d'une même quantité de NaCl sur la réduction électroenzymatique de l'O₂ à différents pH. Les températures sont choisies pour être cohérentes avec les températures auxquelles ont été réalisés les tests d'activité, l'effet de la température sur l'inhibition par le NaCl chez la BOD thermostable de *B. pumilus* étant décrit plus bas. Chaque cycle représenté est le premier cycle obtenu après incubation 30 minutes en présence de NaCl dans l'électrolyte. Pour séparer les effets du pH sur l'activité de la BOD et sur l'inhibition par le NaCl, les courants sont exprimés en termes de courants relatifs : l'intensité en tout point est divisée par l'intensité maximale obtenue au pH considéré.

Cette dépendance en pH peut aussi être observée en chronoampérométrie, en mesurant le courant de réduction de l'O₂ à un potentiel de 0,3 V vs. Ag/AgCl pour la BOD de *Bp* et 0,35 V vs. Ag/AgCl pour la BOD de *Mv*. Ces potentiels sont choisis pour être compris entre les potentiels E₁ et E₂ définis plus hauts quel que soit le pH. L'ajout de 20 mM NaCl au cours de la mesure provoque une diminution de l'intensité du courant. Le pH influe de deux manières différentes sur cette diminution d'intensité. Pour la *Bp* BOD, c'est majoritairement la vitesse de formation de l'état stationnaire qui dépend du pH : la vitesse à laquelle le courant atteint un plateau dépend du pH, tandis que la valeur de ce courant de plateau semble moins dépendante du pH (Figure 91 A). On peut supposer que dans l'état stationnaire, toutes les enzymes sont dans la forme « alternative resting », et que le pH influence la vitesse de formation de cette forme. Pour la *Mv* BOD, au contraire, le pH influence surtout l'intensité du courant dans l'état stationnaire : la valeur du courant de plateau est très dépendante du pH, alors que la vitesse d'inhibition semble peu varier avec le pH (Figure 91 B). On peut supposer que les proportions des deux formes dans l'état stationnaire dépendent du pH. Comme plus haut, pour séparer les effets du pH sur l'activité de la BOD et sur l'inhibition par le NaCl, les courants sont exprimés en termes de courants relatifs.

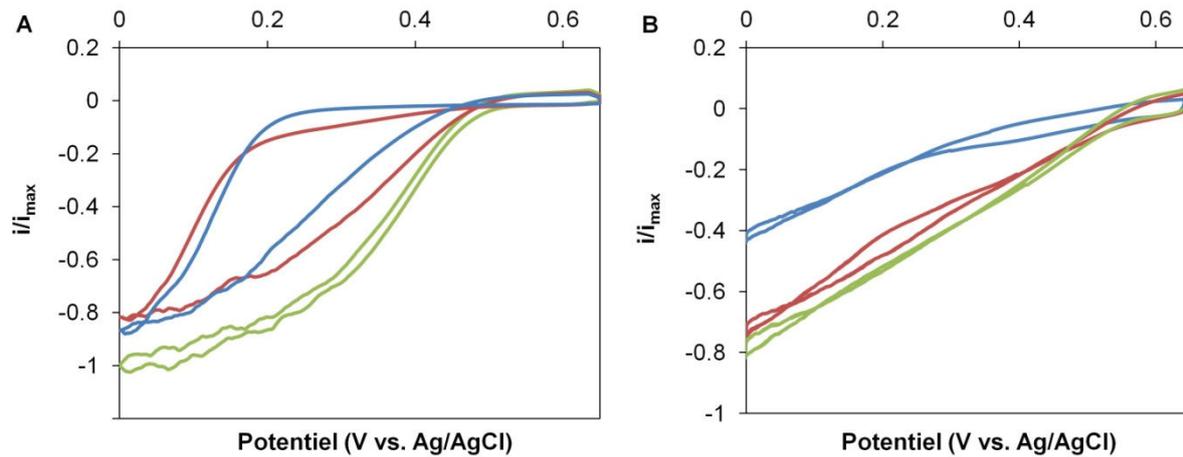


Figure 90- Inhibition de la réduction de l' O_2 par 50 mM NaCl pour la BOD de Bp (A) et la BOD de Mv (B) : pH 4 (courbes bleues), pH 5 (courbes rouges), pH 6 (courbes vertes). Pour une meilleure comparaison, les courants sont rapportés au courant maximal obtenu dans chaque cas. Tampon phosphate-citrate pH 4 à 7 ; $T=37^\circ\text{C}$ (Bp) ou 25°C (Mv) ; $\omega=0$ rpm ; bullage O_2 ; $v = 5 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

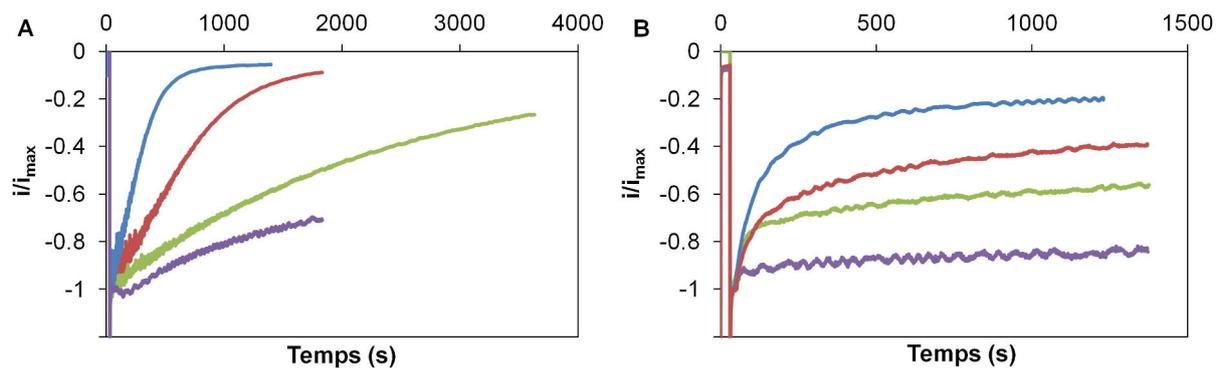


Figure 91- Inhibition de la réduction de O_2 par 20 mM NaCl mesurée par chronoampérométrie à $E=0.3\text{V}$ vs. Ag/AgCl pour la BOD de Bp (A) et $E=0.35\text{V}$ vs. Ag/AgCl pour la BOD de Mv (B) : pH 4 (courbes bleues), pH 5 (courbes rouges), pH 6 (courbes vertes) et pH 7 (courbes violettes). Pour une meilleure comparaison, les courants sont rapportés au courant maximal obtenu dans chaque cas. Tampon phosphate-citrate pH 4 à 7 ; $T=37^\circ\text{C}$ (Bp) ou 25°C (Mv) ; $\omega=0$ rpm ; bullage O_2 ; $v = 5 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

Cette observation permet pour la Mv BOD une quantification de l'effet du NaCl en fonction du pH comme le décrit la figure 92 ci-dessous.

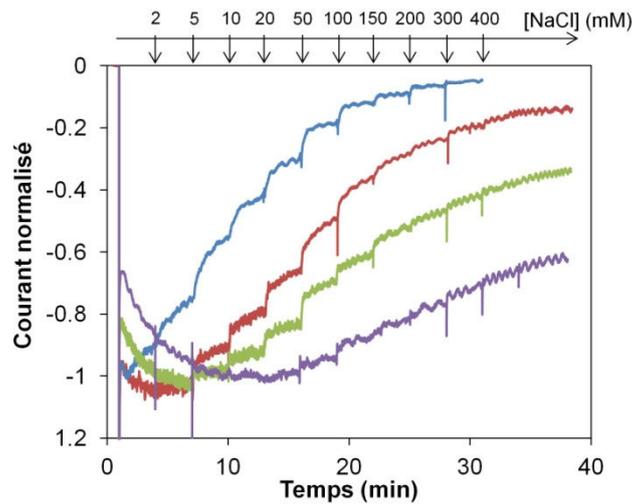


Figure 92 – Influence de l'ajout de NaCl sur le courant de réduction de l' O_2 par la Mv BOD à $E = 0,35 \text{ V}$ vs. Ag/AgCl pour différents pH. pH 4 (courbe bleue) ; pH 5 (courbe rouge) ; pH 6 (courbe verte) et pH 7 (courbe violette). Pour une meilleure comparaison, les courants sont rapportés au courant maximal obtenu dans chaque cas. Tampon phosphate-citrate pH 4 à 7 ; $T = 25^\circ\text{C}$; $\omega = 0 \text{ rpm}$; bullage O_2 .

Par ailleurs, l'expérience décrite ci-dessus est reproduite à pH fixé à 4 et à différentes températures pour la Bp BOD. Il est plus difficile de réaliser cette expérience pour la Mv BOD qui s'inactive à haute température. Le courant de réduction de l' O_2 est mesuré en chronoampérométrie au potentiel de 0,3 V vs. Ag/AgCl. L'ajout de 50 mM NaCl au cours de la mesure provoque une diminution de l'intensité du courant d'autant plus rapide que la température est élevée (Figure 93). Les courbes de voltammétrie cyclique conservent la même allure quelle que soit la température.

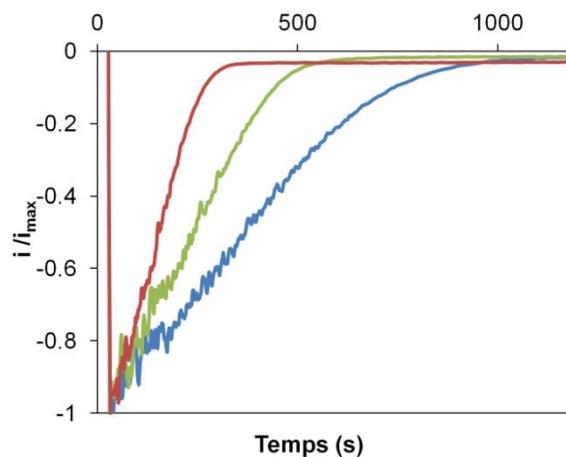


Figure 93- Inhibition de la réduction de O_2 par 50 mM NaCl pour la BOD de Bp, mesurée par chronoampérométrie à $E = 0.3 \text{ V}$ vs. Ag/AgCl : $T = 25^\circ\text{C}$ (courbe bleue), $T = 37^\circ\text{C}$ (courbe verte), et $T = 50^\circ\text{C}$ (courbe rouge). Pour une meilleure comparaison, les courants sont rapportés au courant maximal obtenu dans chaque cas. Tampon phosphate-citrate pH 4 à 7 ; $\omega = 0 \text{ rpm}$; bullage O_2 .

IV-3- Mécanisme d'inter conversion des formes « resting »

IV-3-a- Influence du potentiel sur l'activation pour la catalyse de la forme « alternative resting »

Comme décrit plus haut, la conversion de la forme « alternative resting » en forme « resting oxidised » nécessite pour les deux BODs le passage à des potentiels réducteurs. Les expériences suivantes n'ont pour le moment pu être réalisées qu'avec la *Bp* BOD.

Après ajout d'une quantité suffisante de NaCl (ici [NaCl]=200mM), les enzymes se trouvent dans la forme « alternative », comme l'indique le signal de voltammétrie cyclique décrit plus haut. L'application d'un potentiel réducteur, en chronoampérométrie, permet d'activer la forme « alternative » pour la catalyse de réduction de l'O₂ en présence de NaCl et après exclusion de celui-ci de l'électrolyte. La valeur du potentiel a un effet significatif sur la cinétique de cette activation, qui est d'autant plus rapide que le potentiel est réducteur (Figure 94 A). D'autre part, à l'application du potentiel le courant tend vers une valeur stationnaire qui est également fonction du potentiel (Figure 94 B). Le courant maximal n'est retrouvé qu'en l'absence de NaCl, comme cela avait été observé dans les expériences de voltammétrie décrites plus haut.

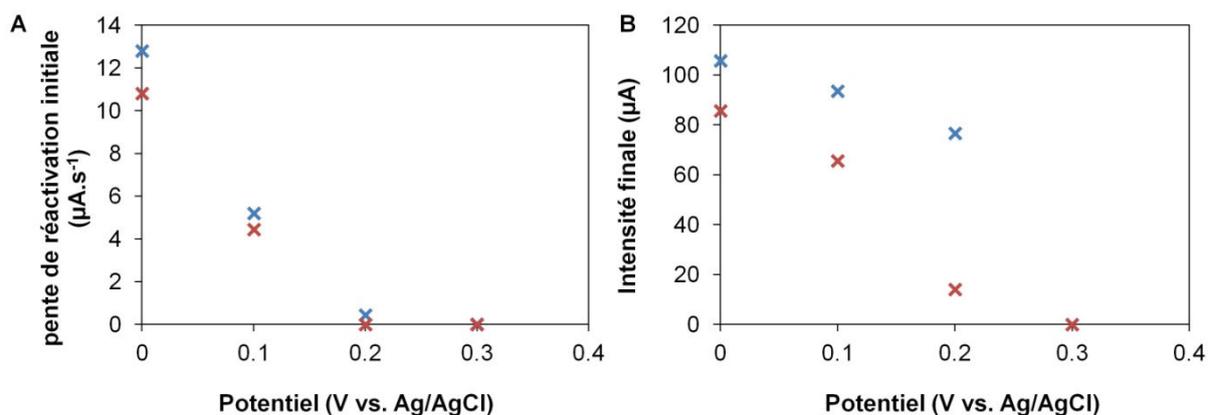


Figure 94- Effet du potentiel sur la réactivation de la BOD de *Bp* à partir de la forme « alternative resting »: cinétique de réactivation (A) et intensité du courant à l'état stationnaire (B). Valeurs en présence (croix rouges) et en absence de 200mM NaCl (croix bleues). Tampon phosphate-citrate pH 4, $\omega=0$ rpm, bullage O₂, RT

IV-3-b- Conditions oxydantes

S'il est clair qu'un potentiel réducteur est nécessaire à l'activation de l'« alternative resting form », les conditions oxydantes de sa formation restent à étudier. En particulier, on peut se demander si l'oxygène est nécessaire ou si un potentiel positif est suffisant. La nécessité de la présence du dioxygène pour la formation de l'« alternative resting form » par ajout de NaCl est donc explorée. L'azote bulle en continu dans l'électrolyte de façon à éliminer toute trace de dioxygène. Du NaCl est

ajouté de telle sorte que sa concentration finale dans l'électrolyte soit 200 mM. Après un temps suffisant pour que toute trace de dioxygène soit exclue, ce qui peut être vérifié par une mesure de voltammétrie cyclique montrant uniquement un signal non catalytique (Figure 96 A), un potentiel réducteur $E = 0V$ vs. Ag/AgCl est appliqué pendant 10 minutes de façon à ce que toutes les enzymes connectées à l'électrode soient à l'état réduit. Dans une première expérience, après cette étape, l'électrode est rincée et transférée dans un électrolyte sans NaCl. Ce premier protocole est décrit par le schéma de la figure 95 A. Une mesure de voltammétrie cyclique sous O_2 montre que les enzymes ont adopté la forme « resting oxidised » : O_2 est réduit à haut potentiel dès le premier cycle (Figure 96 B). Dans une seconde expérience, un potentiel oxydant $E = 0,6V$ vs. Ag/AgCl est appliqué après le potentiel réducteur. L'électrode est rincée et transférée dans un électrolyte sans NaCl. Ce second protocole est décrit par le schéma de la figure 95 B. Une mesure de voltammétrie cyclique sous O_2 montre que les enzymes ont adopté cette fois la forme « alternative resting » : O_2 est réduit à bas potentiel au premier cycle (Figure 96 B).

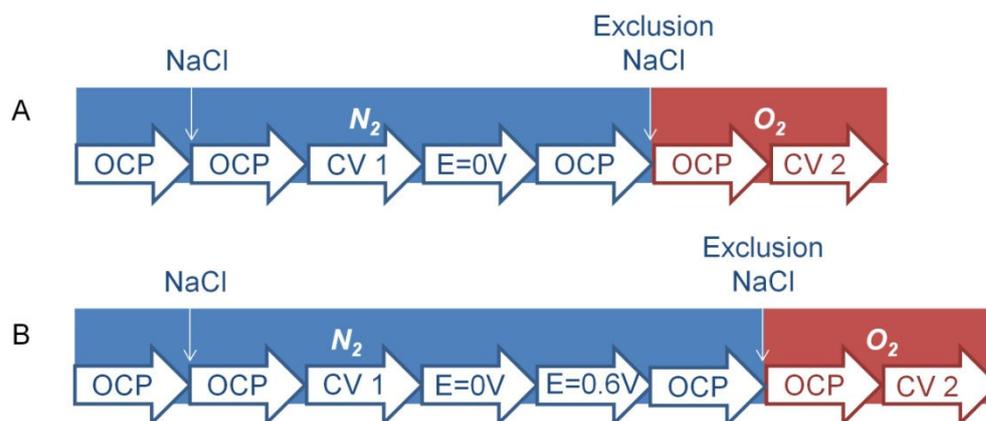


Figure 95- schéma récapitulatif des conditions de formation de la forme « resting oxidised » (A) et de la forme « alternative resting » (B)- Les CVs A et B sont données dans la figure 96 ci-dessous, les CVs du schéma A sont données dans la figure 96 A (bleu sous N_2 , rouge sous O_2). Le CV sous N_2 du schéma B est donné dans la figure 96 A (courbe bleue), et le CV sous O_2 est donné dans la figure 96 B (1^{er} cycle en bleu et 2nd cycle en rouge).

Cette expérience permet de conclure que la présence simultanée du dioxygène et du NaCl n'est pas nécessaire à la formation de la forme « alternative resting » : il faut et il suffit que le NaCl soit présent dans des conditions oxydantes, par exemple un potentiel oxydant en l'absence de l' O_2 . Lorsque l'enzyme à l'état réduit est incubée dans une solution contenant du NaCl, la réoxydation en l'absence de NaCl conduit à la forme « resting oxidised ».

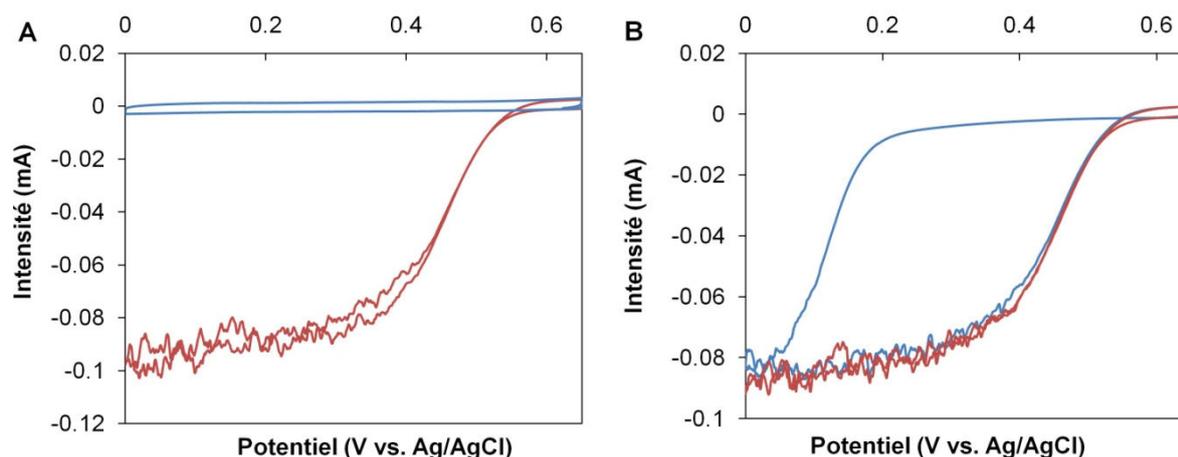


Figure 96- Voltammétrie cyclique de la BOD de *Bp* : signal non catalytique sous N_2 (A bleu), signal catalytique sous O_2 après application d'un potentiel réducteur en présence de 200mM NaCl sous N_2 (A rouge), signal catalytique sous O_2 après application d'un potentiel oxydant en présence de 200mM NaCl sous N_2 (B) premier cycle en bleu, second cycle en rouge. Tampon phosphate-citrate pH 4, RT, $\omega=0$ rpm, bullage des gaz dans l'électrolyte, $v = 5 \text{ mV.s}^{-1}$.

IV-4- Conclusion

Après avoir montré la possibilité d'obtenir un transfert d'électrons direct efficace pour la réduction de l' O_2 par la *Bp* BOD grâce à la modification de l'électrode par des CNFs, nous avons étudié les différents paramètres physicochimiques influant sur les courants de réduction de l' O_2 . Cette connexion directe de l'enzyme a ensuite donné la possibilité de mettre en évidence une influence du NaCl sur la catalyse de réduction de l' O_2 , particulièrement remarquable à pH acide.

La spectroscopie UV-visible a permis de mettre en évidence deux formes « resting » de l'enzyme, la forme « alternative resting » et la forme « resting oxidized », déjà identifiées chez les BODs de *M. oryzae* et *M. verrucaria* [81]. La forme « alternative resting » est formée par ajout de NaCl à la forme « resting oxidized ». La forme « alternative resting » correspond à une inactivation de l'enzyme pour la catalyse à haut potentiel. Dans cette forme, l'enzyme est réactivée par réduction.

L'influence des paramètres physico-chimiques pH, température et concentration de NaCl sur la formation de la forme « alternative resting » a été étudiée. Cette formation est d'autant plus rapide que le pH est faible, la température élevée, et la concentration de NaCl importante. Les expériences de CV et de CA semblent néanmoins montrer qu'on tend vers le même état stationnaire quels que soient la température, le pH et la concentration. L'état stationnaire n'est donc visiblement pas influencé par ces paramètres.

Pour comparaison, nous avons étudié la *Mv* BOD, pour laquelle la formation et l'interconversion des deux formes ont déjà été mises en évidence en spectro UV-vis et RPE [81]. Nous avons montré l'action du NaCl pour la première fois en électrochimie, et l'influence du pH a également été étudiée. Contrairement à la *Bp* BOD, les paramètres comme le pH et la concentration de NaCl semblent affecter non pas la vitesse de formation de la forme « alternative resting » mais les proportions des deux formes dans l'état stationnaire.

Malgré l'intérêt croissant pour les BODs, très peu d'études décrivent rationnellement un effet des ions chlorure sur ces enzymes. En particulier, cet effet du NaCl à pH acide n'a jamais été observé, très probablement parce que les BODs sont utilisées autour de pH 7. Les laccases, dont le potentiel est plus élevé, leur sont en effet préférées à pH acide.

L'étude que nous avons réalisée offre des pistes nouvelles de recherche sur les MCOs. La question se pose de comprendre les mécanismes moléculaires déclenchés par l'action du NaCl chez les BODs. On peut par ailleurs se demander quelle est la différence entre les mécanismes d'inhibition des laccases et des BODs par le NaCl. A ce propos, il est intéressant de noter par exemple que le NaCl ne provoque pas la conversion entre les deux formes « resting » chez la laccase de *T. versicolor* [81]. Des études de RPE seraient utiles pour étudier finement les états du cuivre et les mécanismes de conversion des formes « resting » observées en spectroscopie UV-vis et en électrochimie chez la *Bp* BOD.

On pourrait probablement également beaucoup apprendre de structures cristallographiques des deux formes des enzymes. On peut noter néanmoins que des études de cristallographie ont déjà été réalisées pour la BOD de *M. oryzae*. Seule la forme « resting alternative » a pu être cristallisée, la forme « resting oxidized » étant convertie en « alternative » dans les conditions de cristallisation. Les ions chlorures n'ont pas pu être mis en évidence à proximité du TNC, malgré leur présence dans le tampon de cristallisation.

C- La Biopile H₂-O₂

Une première biopile développée au BIP reposait sur la réduction de l'O₂ par la *Mv* BOD et l'oxydation de l'H₂ par l'*Aa* Hase 1 [87]. Les deux enzymes étaient liées covalamment sur des SW-CNTs oxydés par traitement acide. Les compartiments anodique et cathodique étaient séparés par une membrane de Nafion® et alimentés respectivement par 100% d'H₂ et 100% d'O₂. L'utilisation d'une hydrogénase hyperthermophile et d'une BOD mésophile entraînait la nécessité de thermostatier indépendamment le compartiment anodique et le compartiment cathodique. Il n'était donc pas possible d'envisager le fonctionnement de cette pile dans un endroit naturellement chaud.

Au cours des deux chapitres précédents, nous avons décrit le développement d'une cathode basée sur la *Bp* BOD, pour la réduction de l'O₂, et d'une anode basée sur l'*Aa* Hase 1, pour l'oxydation de l'H₂. Les deux enzymes sont actives sur une large gamme de température et thermostables. Par ailleurs, l'utilisation de réseaux de CNFs pour l'immobilisation des enzymes par simple adsorption a permis d'obtenir des densités de courant bien supérieures aux densités de courant obtenues avec les électrodes modifiées par des SW-CNTs (les densités de courant sont augmentées d'un ordre de grandeur). On peut donc envisager le développement d'une biopile fonctionnant à haute température, avec des performances en termes de densités de puissance accrues.

I- Dispositif expérimental

Pour étudier la biopile, on utilise le dispositif expérimental décrit sur la figure 97. Il s'agit d'une cellule en verre, composée de deux compartiments séparés par une membrane en Nafion®. Cette dernière est imperméable à l'O₂, elle permet donc de fournir 100 % d'H₂ dans le compartiment anodique et 100 % d'O₂ dans le compartiment cathodique sans former de mélange explosif. De plus, en empêchant la diffusion de l'O₂ dans le compartiment anodique, elle évite la réduction directe de l'O₂ sur l'anode et l'inhibition réversible de l'hydrogénase par l'O₂.

Des arrivées/sorties de gaz plongent dans l'électrolyte à proximité des électrodes. La régulation en température est assurée par une double enveloppe dans laquelle circule le fluide caloporteur. La présence de 2 entrées/sorties de fluide pour chaque compartiment permet de thermostatier indépendamment les compartiments anodique et cathodique. La présence de la double enveloppe et les contraintes liées au matériau utilisé ne permettent cependant pas l'optimisation des dimensions. La distance entre l'anode et la cathode est notamment élevée.

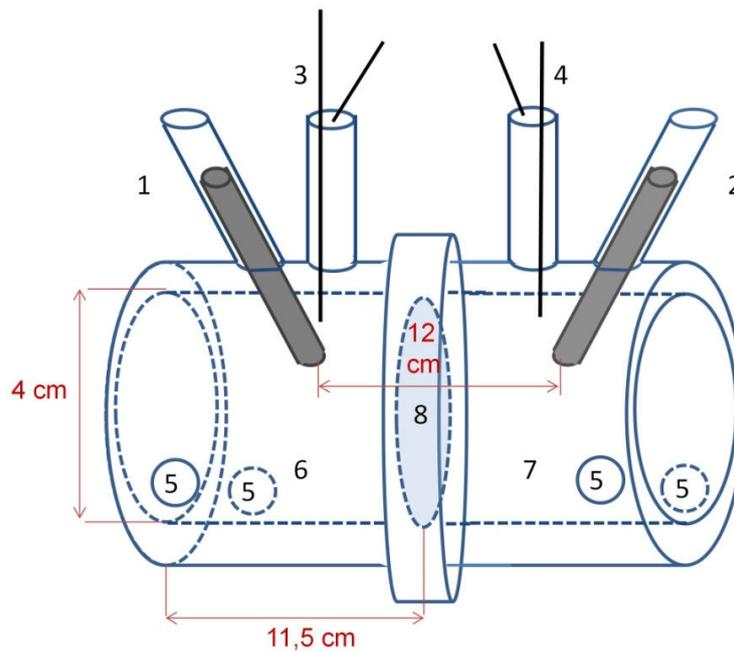


Figure 97 – Schéma du dispositif expérimental. 1 : Anode ; 2 : Cathode ; 3 : Arrivée et sortie d'H₂ ; 4 : Arrivée et sortie d'O₂ ; 5 : Arrivée et sortie du fluide caloporteur ; 6 : Compartiment anodique ; 7 : Compartiment cathodique ; 8 : Membrane de Nafion®

On vérifie tout d'abord la pertinence du système en enregistrant séparément les courbes de polarisation de la bioanode et de la biocathode. La courbe de puissance de la biopile correspondante est ensuite mesurée en imposant un balayage de potentiel entre les électrodes. Un exemple est donné dans la figure 98.

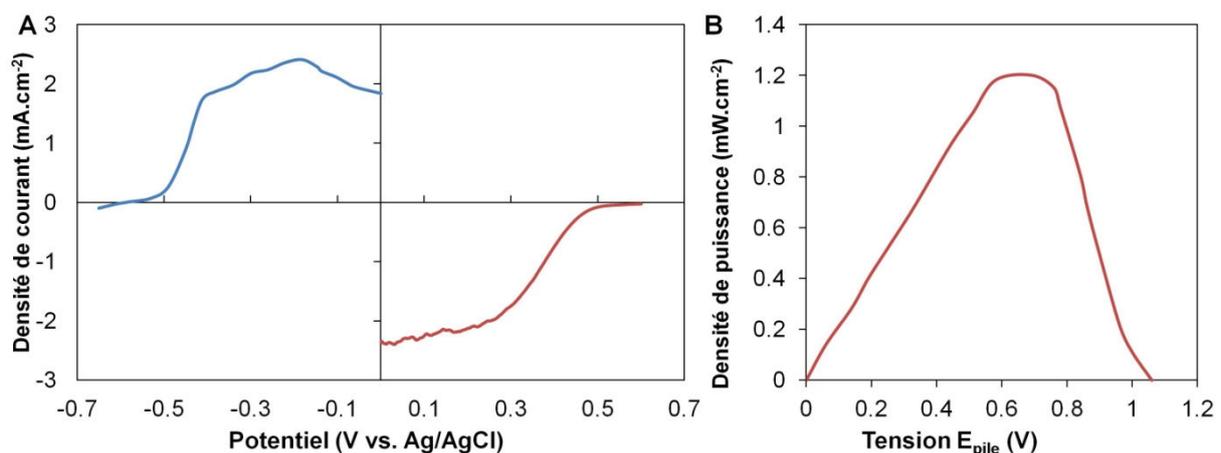


Figure 98 – A : Courbes de polarisation de la bioanode (potentiels négatifs) et de la biocathode (potentiels positifs) ; B : courbe de puissance de la biopile correspondante. $T = 50^{\circ}\text{C}$, tampon phosphate 100 mM ; pH 6 ; $v = 3\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

On peut noter que les densités de courant qui étaient obtenues pour chacune des électrodes étudiées séparément ne sont pas atteintes dans la cellule de la biopile. On peut l'expliquer par les

pertes ohmiques dues au volume important d'électrolyte ($V_{\text{total}} \approx 300 \text{ mL}$), à la membrane de Nafion qui est utilisée sans traitement, et par les résistances aux interfaces entre les différents composants du système [89]. Ces observations soulignent l'importance de l'ingénierie du système global, qu'il s'agira d'améliorer à l'avenir.

II- Nature, pH et molarité de l'électrolyte

Les deux électrodes ont été développées indépendamment. Pour obtenir la biopile H₂-O₂ la plus performante, il convient de trouver le meilleur compromis entre les paramètres optimaux d'activité électroenzymatique pour l'hydrogénase et la bilirubine oxydase.

Le pH optimal d'activité de la BOD est 4, celui de l'hydrogénase est 7. De plus, les électrolytes utilisés habituellement sont le tampon phosphate-citrate pour la BOD, et le tampon Hepes pour l'hydrogénase. La membrane de Nafion® séparant les compartiments anodique et cathodique est par définition conductrice de protons. On ne peut donc pas envisager d'utiliser des tampons de pH différents comme électrolytes à l'anode et à la cathode. En principe, cette membrane ne permet pas l'échange des autres ions. Néanmoins, pour simplifier la conception de la pile, on cherche à utiliser des tampons de même nature dans les deux compartiments. Il faut donc déterminer l'électrolyte et le pH les plus adaptés au fonctionnement en tandem des deux bioélectrodes.

Le tampon phosphate-citrate, utilisé généralement pour la *Bp* BOD, provoque des réactions parasites avec les CNFs, qui se traduisent par l'apparition d'un pic d'oxydation à $-0,2 \text{ V vs. Ag/AgCl}$ en CV. Il s'agit probablement de l'oxydation de fonctions de surface des CNFs. Ce mécanisme intervenant aux potentiels de travail de la bioanode empêche d'utiliser le tampon phosphate-citrate. Le tampon Hepes, utilisé généralement pour l'*Aa* Hase 1, ne permet pas de couvrir une large gamme de pH. Le tampon phosphate se montre convenable, c'est donc lui qui est choisi comme électrolyte.

Des concentrations élevées de sel de l'électrolyte devraient permettre de réduire les pertes ohmiques dues à la résistance de l'électrolyte. On fait donc varier dans un premier temps cette concentration entre 50 et 500 mM, et on enregistre les courbes de polarisation en pile.

Des concentrations trop faibles en sel provoquent une diminution des performances, liées à l'augmentation de la résistance de l'électrolyte (Figure 99). Néanmoins, des concentrations trop élevées sont également préjudiciables. Les sels déstabilisent probablement les interactions entre les enzymes et le matériau d'électrode, ce qui provoque une perte de l'enzyme. La molarité de l'électrolyte est donc fixée à 100 mM pour les expériences ultérieures.

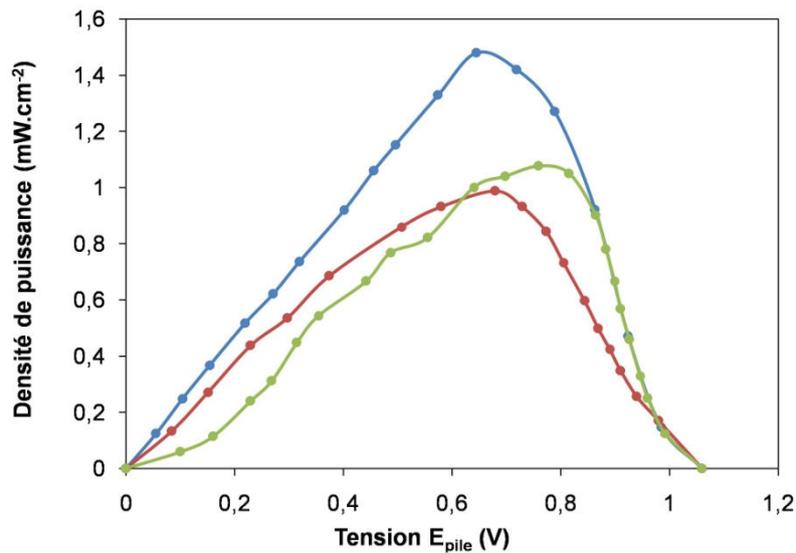


Figure 99 – Courbes de puissance montrant l'influence de la molarité du tampon sur les performances de la biopile. Tampon phosphate pH 6 à 50 mM (courbe rouge), 100 mM (courbe bleue), 200 ou 500 mM (courbe verte). $T=50^{\circ}\text{C}$, $v=3\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$

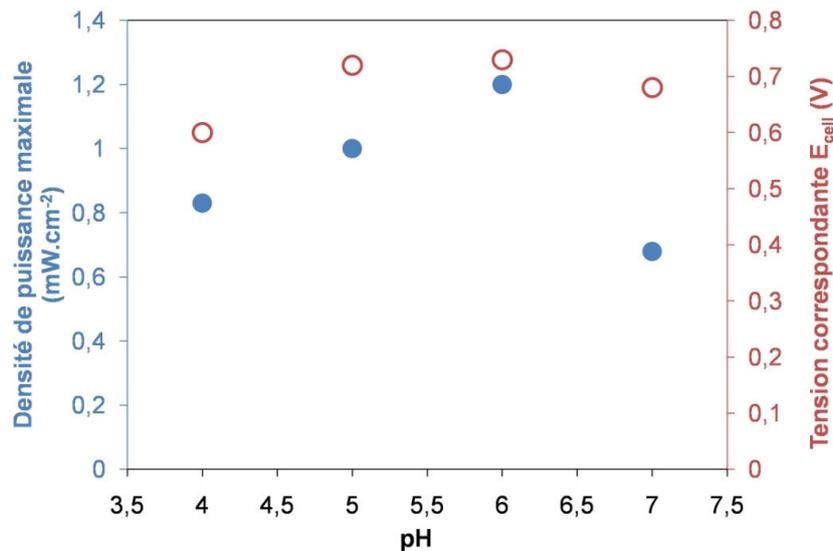


Figure 100 – Influence du pH sur les performances de la biopile H₂-O₂, exprimées en termes de densité de puissance maximale (disques bleus) et de tension de pile à la puissance maximale (cercles rouges). Les valeurs sont mesurées sur les courbes de puissance enregistrées aux différents pH. Tampon phosphate 100 mM ; pH 6 ; $T=50^{\circ}\text{C}$; $v=3\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$

La biopile opère au moins dans la gamme de pH de 4 à 7 (d'autres pH n'ont pas été testés) (Figure 100). La puissance maximale est atteinte à pH 6, qui est de façon cohérente un pH intermédiaire entre les optimaux des deux enzymes. On peut remarquer la décroissance importante de

la puissance maximale entre les pH 6 et 7. Cette décroissance traduit la baisse à ce pH de l'activité électroenzymatique de la BOD immobilisée sur les CNFs (cf. chapitre B).

III- Evolution des performances de la biopile avec la température

La température est un paramètre clef de ce système, puisqu'il met en jeu deux enzymes actives à haute température. Le dispositif se montre capable d'opérer sur un intervalle de température allant de 30 à 80°C (Figure 101). Des températures inférieures à 30°C n'ont pas été testées, car l'anode se montre limitante à basse température. Des températures supérieures à 80°C n'ont pas non plus été testées, à cause des contraintes techniques liées aux composants non enzymatiques du système. Par ailleurs, la solubilité des gaz diminue de façon importante avec l'augmentation de la température.

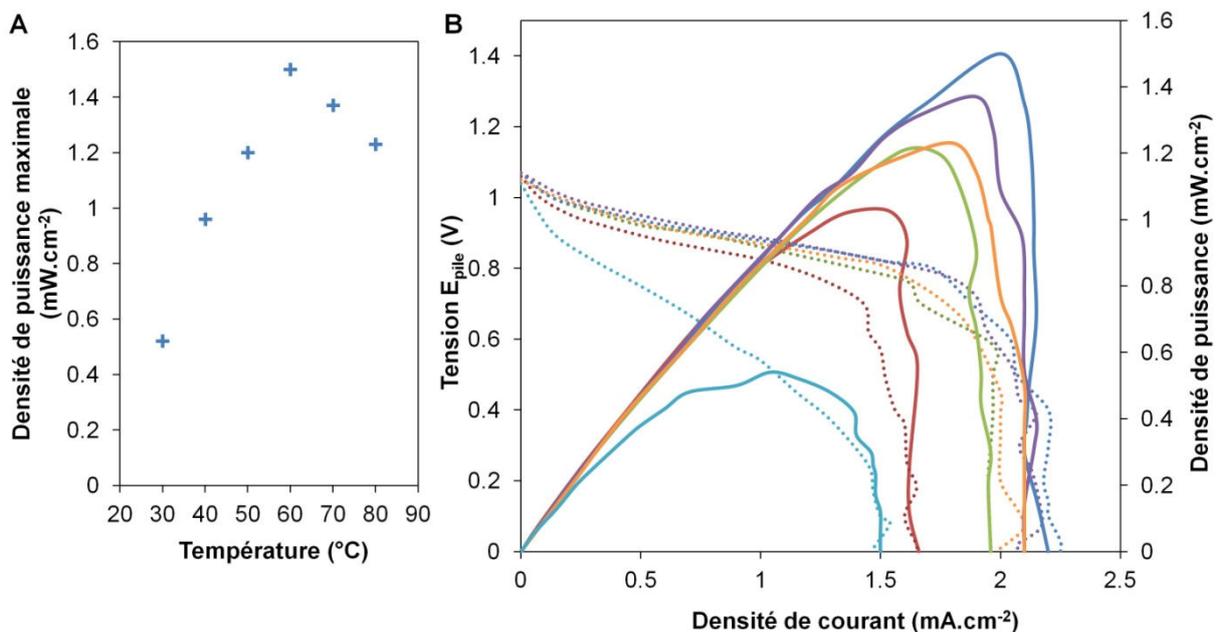


Figure 101 – Evolution des performances de la biopile avec la température. A : Puissance maximale obtenue en fonction de la température. B : Courbes de puissance (traits pleins) et courbes de polarisation (traits pointillés) montrant l'évolution des performances de la biopile avec la température. 30°C (courbes turquoise), 40°C (courbes rouges), 50°C (courbes vertes), 60°C (courbes bleues), 70°C (courbes violettes) et 80°C (courbes orange). Tampon phosphate 100 mM ; pH 6 ; $v=3\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$

Dans l'intervalle de température entre 40 et 80°C, la puissance maximale délivrée est supérieure ou égale à 1 $\text{mW}\cdot\text{cm}^{-2}$. La puissance augmente avec la température, et atteint un maximum pour une température de 60°C. Cette augmentation est en accord avec l'augmentation de l'activité des

deux enzymes en catalyse hétérogène. On peut noter que la puissance maximale est atteinte à la température optimale d'activité de la BOD sur les CNFs (chapitre B). A des températures supérieures, on observe une diminution de la puissance délivrée par le système. Ce résultat n'est pas étonnant, d'une part parce que l'efficacité biocatalytique de la cathode diminue. D'autre part, on avait également remarqué une altération de la forme du signal d'oxydation de l'H₂ par la bioanode, avec notamment une diminution de la pente (cf. chapitre A).

Notre système nous permet de varier indépendamment la température des compartiments anodique et cathodique, et de rechercher les conditions optimales de fonctionnement. Dans un premier temps, la température du compartiment cathodique est fixée à 50°C, et la température du compartiment anodique varie entre 40 et 60°C (Figure 102 A). Dans un second temps, la température du compartiment anodique est fixée à 60°C, et la température du compartiment cathodique varie entre 30 et 60°C (Figure 102 B). Dans les deux cas, l'optimum est obtenu pour une température anodique de 60°C et une température cathodique de 50°C. La densité de puissance maximale atteint alors une moyenne de $1,5 \pm 0,2 \text{ mW.cm}^{-2}$, pour un potentiel moyen de $0,67 \pm 0,04 \text{ V}$.

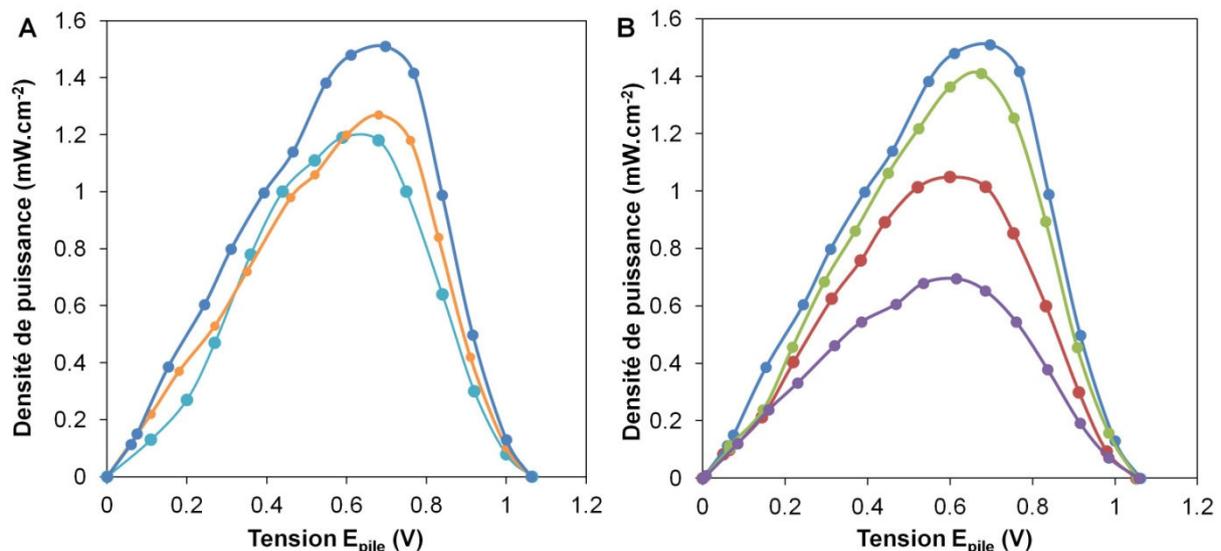


Figure 102 – Courbes de puissance obtenues en faisant varier séparément les températures des deux compartiments. A : Variation de la température du compartiment anodique, le compartiment cathodique étant maintenu à 50°C ; 40°C (courbe turquoise) ; 50°C (courbe orange) ; 60°C (courbe bleue). B : Variation de la température du compartiment cathodique, le compartiment anodique étant maintenu à 60°C ; 25°C (courbe violette) ; 40°C (courbe rouge) ; 50°C (courbe bleue) ; 60°C (courbe verte). Tampon phosphate 100 mM ; pH 6 ; $v=3 \text{ mV.s}^{-1}$.

Ce résultat paraît en contradiction avec l'optimum de température de 60°C reporté pour la BOD. Il peut s'expliquer néanmoins par la baisse de la solubilité de l'O₂ dans les solutions aqueuses

avec l'augmentation de la température (respectivement 0,17 et 0,15 Mol.L⁻¹ dans l'eau à 50 et 60°C). Etant donnés les grands volumes de solution électrolytique mis en jeu, l'agitation de la solution électrolytique grâce au flux de gaz est sans doute moins efficace, ce qui entraîne une diminution de la concentration locale en substrat.

IV- Stabilité du système

La stabilité du système sur une heure dans différentes conditions de pH et de température a été évaluée en imposant une différence de potentiel constante $E_{pile}=0,5$ V entre les électrodes pendant une heure. On constate une légère diminution de la stabilité avec l'augmentation de la température, ce qui peut correspondre à une perte plus rapide de l'activité enzymatique à haute température (Tableau 6). En ce qui concerne l'évolution de la stabilité avec le pH, on constate que le pH optimal de stabilité correspond également au pH optimal de puissance (Tableau 7).

Température (°C)	30	50	60
Pourcentage de la puissance maximale conservée (%)	93	87	85

Tableau 6 - Stabilité du système en fonction de la température. Les pourcentages sont calculés d'après les courbes de puissance, établies d'après les mesures de polarisation effectuées avant et après l'imposition de la différence de potentiel $E_{pile}=0,5$ V pendant une heure. Tampon phosphate 100 mM ; pH 6 ; $v=3mV.s^{-1}$.

pH	4	5	6	7
Pourcentage de la puissance maximale conservée (%)	42	73	87	68

Tableau 7 – Stabilité du système en fonction du pH. Les pourcentages sont calculés d'après les courbes de puissance, établies d'après les mesures de polarisation effectuées avant et après l'imposition de la différence de potentiel $E_{pile}=0,5$ V pendant une heure. Tampon phosphate 100 mM ; $T=50^{\circ}C$; $v=3mV.s^{-1}$.

Enfin, la tension $E_{pile}=0,5$ V correspondant à l'intensité maximale a été imposée aux bornes de la biopile pendant 24 h. La densité de courant montre une perte de 40 % au cours de cette opération, ce qui correspond au résultat obtenu grâce à la première biopile développée au BIP, qui délivrait 60% de la densité de courant initiale après 24 h à $E_{pile}=0,65$ V. En revanche, seulement 43 % de la puissance maximale est maintenue après cette expérience (Figure 103). On peut remarquer l'altération de la forme de la courbe de puissance après 24 h de fonctionnement. Cette forme a jusqu'ici été attribuée

uniquement à la limitation anodique [87], ce qui semble indiquer que la bioanode est moins stable que la biocathode. Cependant, les courbes de polarisation des deux bioélectrodes montrent des diminutions des densités de courants et des évolutions de la pente du signal équivalentes pour les deux électrodes. Pour comprendre ce comportement, il sera nécessaire dans l'avenir de suivre indépendamment le potentiel des deux électrodes au cours du fonctionnement de la biopile.

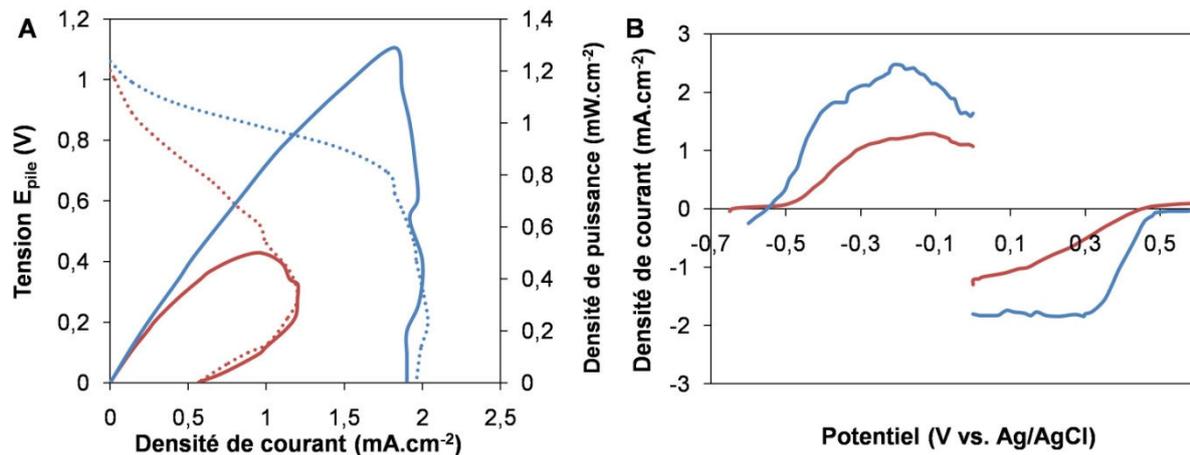


Figure 103 – Evolution des performances de la biopile après 24 h d'opération continue en CA à 0,5 V. $T_{anodique}=60\text{ }^{\circ}C$; $T_{cathodique}=50\text{ }^{\circ}C$. Performances enregistrées avant la CA (courbes bleues) et après la CA (courbes rouges). A : Courbes de puissance. B : Courbes de polarisation de l'anode (potentiels négatifs) et de la cathode (potentiels positifs).

On peut comparer le résultat obtenu au cours de ce travail à celui obtenu grâce au dispositif utilisant les électrodes de carbone mésoporeux compacté [37], qui conserve 90 % de sa puissance après 24 h à 0,98 V. Il faut noter qu'en imposant une différence de potentiel plus éloignée de l'OCV, on sollicite davantage les électrodes. Ainsi, lorsque dans ce système le potentiel d'opération est fixé à 0,55 V, le pourcentage de la puissance conservée après 24 h est abaissé à 76 %.

V- Origine biocatalytique des courants

Dans le cas où la vitesse de balayage serait trop élevée, ne permettant pas au système d'atteindre l'état stationnaire, les densités de courant mesurées dans la biopile pourraient intégrer une composante capacitive. Cette erreur de mesure conduirait à surévaluer les densités de puissance délivrées par la biopile. Pour vérifier que ce n'est pas le cas, des « blancs » sont réalisés dans les conditions où les meilleures performances ont été enregistrées, à la seule différence que les électrodes ne sont pas modifiées par les enzymes. Les puissances maximales atteintes sont alors de 9 $\mu W \cdot cm^{-2}$ à pH 6, et 20 $\mu W \cdot cm^{-2}$ à pH 5. Ce résultat prouve l'origine enzymatique des densités de puissance

enregistrées habituellement. Il montre également que la réduction directe de l'O₂ ou l'oxydation directe de l'H₂ sur les CNFs n'ont pas d'influence sur les performances enregistrées.

VI- Importance des CNFs

Quelles sont les parts respectives du matériau d'électrode (les CNFs) et de l'enzyme de la cathode (la *Bp* BOD), qui sont les deux principales nouveautés apportées à ce dispositif par rapport à la première biopile développée au BIP, dans l'amélioration des densités de puissance ? Une biopile est réalisée en immobilisant la *Mv* BOD sur les CNFs. Tous les autres paramètres sont maintenus à l'identique, à l'exception de la température qui est de 60°C dans le compartiment anodique, et de 25°C dans le compartiment cathodique. La puissance maximale délivrée atteint une moyenne de $405,5 \pm 55,5 \mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$. Ce résultat représente une multiplication par 1,5 de la puissance obtenue précédemment, lorsque les enzymes étaient liées covalamment sur les SW-CNTs-COOH. On remarque cependant que la biopile réalisée avec la *Bp* BOD, dans exactement les mêmes conditions expérimentales, conduit à une puissance maximale de $693 \mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$ (Figure 102 B, courbe violette). Ces résultats soulignent l'importance à la fois du matériau d'électrode et des enzymes mises en jeu.

VII- Conclusion

En remplaçant l'enzyme mésophile de la cathode par une enzyme thermostable, on a pu utiliser une même température dans les deux compartiments. La mise en tandem de deux enzymes anodique et cathodique thermostables a ainsi permis de développer un dispositif capable d'opérer sur une large gamme de température. Il s'agit de la première biopile enzymatique qui fonctionne à haute température. Les densités de puissances obtenues, supérieures à $1 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$, rendent envisageable l'utilisation de la biopile H₂-O₂ dans des dispositifs de faible puissance. De plus, la stabilité avec la température permettrait de s'affranchir de la thermorégulation en utilisant la biopile dans des endroits naturellement chauds.

L'utilisation des CNFs comme matériau d'électrode joue un rôle clef dans l'amélioration des performances de la biopile. Ce point souligne l'importance de développer des matériaux conducteurs compatibles avec les enzymes, qui présentent une grande capacité d'adsorption de ces dernières, et capables de former à l'électrode des réseaux de porosité adaptée à la fois à l'immobilisation fonctionnelle des enzymes et au transport de masse des substrats.

En termes de densité de puissance, ce dispositif est comparable à la biopile H₂-O₂ développée en 2013 par l'équipe du Prof. Armstrong, qui repose sur l'immobilisation de l'hydrogénase d'*E. coli* et de la BOD de *M. verrucaria* dans des électrodes de carbone mésoporeux compacté. Néanmoins, il faut noter que cette biopile présente l'avantage non négligeable de s'affranchir de la membrane de Nafion. Ce paramètre permet la réduction des coûts, la minimalisation du système et l'augmentation des densités de puissance volumique. Il signifie par ailleurs qu'une grande efficacité enzymatique est atteinte, puisque pour se maintenir dans des proportions non explosives, il faut nécessairement utiliser un mélange gazeux pauvre en l'un des deux substrats. Le choix fait d'un mélange pauvre en O₂ impose de trouver une solution pour que la cathode soit aussi efficace que l'anode, malgré l'appauvrissement en substrat. Ce défi est relevé grâce au surdimensionnement de la cathode. En revanche, l'efficacité à d'autres pH et la stabilité avec la température ne sont pas mentionnées. Les enzymes mises en jeu étant mésophiles, on peut supposer que le système n'est stable qu'à température modérée, ce qui impose de restreindre le fonctionnement aux environnements climatisés [37].

Plusieurs pistes se présentent pour l'amélioration de notre système. Puisqu'il n'est plus nécessaire de thermo-réguler indépendamment les deux compartiments, la conception du dispositif peut être simplifiée. L'optimisation doit viser notamment à minimiser les chutes ohmiques, optimiser le transport substrat, et s'affranchir de la membrane. On peut envisager l'utilisation des électrodes respirantes, non seulement pour améliorer le transport de substrat, mais également pour éviter la présence des gaz en solution et les risques de mélanges explosifs d'H₂ et d'O₂.

Bibliographie

- [1] A. Ciaccafava, P. Infossi, M. Ilbert, M. Guiral, S. Lecomte, M.T. Giudici-Orticoni, E. Lojou, Electrochemistry, AFM, and PM-IRRA Spectroscopy of Immobilized Hydrogenase: Role of a Hydrophobic Helix in Enzyme Orientation for Efficient H₂ Oxidation, *Angewandte Chemie-International Edition*, 51 (2012) 953-956.
- [2] M. Choi, K. Jo, H. Yang, Effect of Different Pretreatments on Indium-Tin Oxide Electrodes, *Bull. Korean Chem. Soc.*, 34 (2013) 421-425.
- [3] O. Rozumek, G. Elbez, STUDY OF THE WETTABILITY OF MARITIME PINE BY A UREA-FORMALDEHYDE RESIN, *Holzforschung*, 39 (1985) 239-243.
- [4] E. Lojou, X. Luo, M. Brugna, N. Candoni, S. Dementin, M.T. Giudici-Orticoni, Biocatalysts for fuel cells: efficient hydrogenase orientation for H₂ oxidation at electrodes modified with carbon nanotubes, *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 13 (2008) 1157-1167.
- [5] X.J. Luo, M. Brugna, P. Tron-Infossi, M.T. Giudici-Orticoni, E. Lojou, Immobilization of the hyperthermophilic hydrogenase from *Aquifex aeolicus* bacterium onto gold and carbon nanotube electrodes for efficient H₂ oxidation, *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 14 (2009) 1275-1288.
- [6] O. Rudiger, J.M. Abad, E.C. Hatchikian, V.M. Fernandez, A.L. De Lacey, Oriented immobilization of *Desulfovibrio gigas* hydrogenase onto carbon electrodes by covalent bonds for nonmediated oxidation of H₂, *J. Am. Chem. Soc.*, 127 (2005) 16008-16009.
- [7] Y. Higuchi, T. Yagi, N. Yasuoka, Unusual ligand structure in Ni-Fe active center and an additional Mg site in hydrogenase revealed by high resolution X-ray structure analysis, *Structure*, 5 (1997) 1671-1680.
- [8] A. Ciaccafava, P. Infossi, M.T. Giudici-Orticoni, E. Lojou, Stabilization Role of a Phenothiazine Derivative on the Electrocatalytic Oxidation of Hydrogen via *Aquifex aeolicus* Hydrogenase at Graphite Membrane Electrodes, *Langmuir*, 26 (2010) 18534-18541.
- [9] S.M. Macdonald, K. Szot, J. Niedziolka, F. Marken, M. Opallo, Introducing hydrophilic carbon nanoparticles into hydrophilic sol-gel film electrodes, *J. Solid State Electrochem.*, 12 (2008) 287-293.
- [10] K. Szot, J.D. Watkins, S.D. Bull, F. Marken, M. Opallo, Three dimensional film electrode prepared from oppositely charged carbon nanoparticles as efficient enzyme host, *Electrochem. Commun.*, 12 (2010) 737-739.
- [11] K. Szot, M. Joensson-Niedziolka, E. Rozniecka, F. Marken, M. Opallo, Direct electrochemistry of adsorbed proteins and bioelectrocatalysis at film electrode prepared from oppositely charged carbon nanoparticles, *Electrochim. Acta*, 89 (2013) 132-138.
- [12] S. Krishnan, F.A. Armstrong, Order-of-magnitude enhancement of an enzymatic hydrogen-air fuel cell based on pyrenyl carbon nanostructures, *Chemical Science*, 3 (2012) 1015-1023.
- [13] C.F. Blanford, F.A. Armstrong, The pyrolytic graphite surface as an enzyme substrate: microscopic and spectroscopic studies, *J. Solid State Electrochem.*, 10 (2006) 826-832.

- [14] S. Dong, T. Kuwana, COBALT PORPHYRIN NAFION FILM ON CARBON MICROARRAY ELECTRODE TO MONITOR OXYGEN FOR ENZYME ANALYSIS OF GLUCOSE, *Electroanalysis*, 3 (1991) 485-491.
- [15] A.A. Karyakin, E.A. Kotel'nikova, L.V. Lukachova, E.E. Karyakina, J. Wang, Optimal environment for glucose oxidase in perfluorosulfonated ionomer membranes: Improvement of first-generation biosensors, *Anal. Chem.*, 74 (2002) 1597-1603.
- [16] P. Mailley, S. Cosnier, L. Coche-Guerente, Amperometric glucose biosensors based on composite polymeric structures to prevent interferences, *Anal. Lett.*, 33 (2000) 1733-1753.
- [17] C.M. Moore, N.L. Akers, A.D. Hill, Z.C. Johnson, S.D. Minter, Improving the environment for immobilized dehydrogenase enzymes by modifying Nafion with tetraalkylammonium bromides, *Biomacromolecules*, 5 (2004) 1241-1247.
- [18] Y.A. Zhu, Z.J. Sui, T.J. Zhao, Y.C. Dai, Z.M. Cheng, W.K. Yuan, Modeling of fishbone-type carbon nanofibers: A theoretical study, *Carbon*, 43 (2005) 1694-1699.
- [19] N. Grobert, Carbon nanotubes - becoming clean, *Mater. Today*, 10 (2007) 28-35.
- [20] I. Martin-Gullon, J. Vera, J.A. Conesa, J.L. Gonzalez, C. Merino, Differences between carbon nanofibers produced using Fe and Ni catalysts in a floating catalyst reactor, *Carbon*, 44 (2006) 1572-1580.
- [21] P. Serp, M. Corrias, P. Kalck, Carbon nanotubes and nanofibers in catalysis, *Appl. Catal. A-Gen.*, 253 (2003) 337-358.
- [22] R. Vieira, B. Louis, C. Pham-Huu, Les nanofibres de carbone: un support de catalyseur polyvalent, *L'Actualité chimique*, (2009) 14-18.
- [23] D. Burton, P. Lake, A. Palmer, Properties and Applications of carbon nanofibers (CNFs) synthesized using Vapor-Grown Carbon Fiber (VGCF) Manufacturing Technology, *sigma-aldrich*.
- [24] D. Luxembourg, X. Py, A. Didion, R. Gadiou, C. Vix-Guterl, G. Flamant, Chemical activations of herringbone-type nanofibers, *Microporous Mesoporous Mat.*, 98 (2007) 123-131.
- [25] A. Periyakaruppan, P.U. Arumugam, M. Meyyappan, J.E. Koehne, Detection of ricin using a carbon nanofiber based biosensor, *Biosens. Bioelectron.*, 28 (2011) 428-433.
- [26] E. Rand, A. Periyakaruppan, Z. Tanaka, D.A. Zhang, M.P. Marsh, R.J. Andrews, K.H. Lee, B. Chen, M. Meyyappan, J.E. Koehne, A carbon nanofiber based biosensor for simultaneous detection of dopamine and serotonin in the presence of ascorbic acid, *Biosens. Bioelectron.*, 42 (2013) 434-438.
- [27] A.F. Che, V. Germain, M. Cretin, D. Cornu, C. Innocent, S. Tingry, Fabrication of free-standing electrospun carbon nanofibers as efficient electrode materials for bioelectrocatalysis, *New Journal of Chemistry*, 35 (2011) 2848-2853.
- [28] G.W. Brindley, T.D. Thompson, METHYLENE BLUE ABSORPTION BY MONTMORILLONITES - DETERMINATIONS OF SURFACE AREAS AND EXCHANGE CAPACITIES WITH DIFFERENT INITIAL CATION SATURATIONS - (CLAY-ORGANIC STUDIES 19), *Israel Journal of Chemistry*, 8 (1970) 409-&.

- [29] D. Millo, P. Hildebrandt, M.E. Pandelia, W. Lubitz, I. Zebger, SEIRA Spectroscopy of the Electrochemical Activation of an Immobilized [NiFe] Hydrogenase under Turnover and Non-Turnover Conditions, *Angewandte Chemie-International Edition*, 50 (2011) 2632-2634.
- [30] M. Vijayaraj, R. Gadiou, K. Anselme, C. Ghimbeu, C. Vix-Guterl, H. Orikasa, T. Kyotani, S. Ittisanronnachai, The Influence of Surface Chemistry and Pore Size on the Adsorption of Proteins on Nanostructured Carbon Materials, *Advanced Functional Materials*, 20 (2010) 2489-2499.
- [31] C. Leger, A.K. Jones, S.P.J. Albracht, F.A. Armstrong, Effect of a dispersion of interfacial electron transfer rates on steady state catalytic electron transport in [NiFe]-hydrogenase and other enzymes, *J. Phys. Chem. B*, 106 (2002) 13058-13063.
- [32] A.J. Bard, L.R. Faulkner, *Electrochemical methods: Fundamentals and applications*, Wiley & Sons 1980.
- [33] J. Urban, A. Zloczewska, W. Stryczniewicz, M. Jonsson-Niedziolka, Enzymatic oxygen reduction under quiescent conditions - the importance of convection, *Electrochem. Commun.*, 34 (2013) 94-97.
- [34] V. Flexer, N. Brun, O. Courjean, R. Backov, N. Mano, Porous mediator-free enzyme carbonaceous electrodes obtained through Integrative Chemistry for biofuel cells, *Energy Environ. Sci.*, 4 (2011) 2097-2106.
- [35] R.T. Bonnecaze, N. Mano, B. Nam, A. Heller, On the behavior of the porous rotating disk electrode, *Journal of the Electrochemical Society*, 154 (2007) F44-F47.
- [36] M. Guiral, P. Tron, V. Belle, C. Aubert, C. Leger, B. Guigliarelli, M.T. Giudici-Ortoni, Hyperthermostable and oxygen resistant hydrogenases from a hyperthermophilic bacterium *Aquifex aeolicus*: Physicochemical properties, *International Journal of Hydrogen Energy*, 31 (2006) 1424-1431.
- [37] L. Xu, F.A. Armstrong, Optimizing the power of enzyme-based membrane-less hydrogen fuel cells for hydrogen-rich H₂-air mixtures, *Energy Environ. Sci.*, 6 (2013) 2166-2171.
- [38] H. Wen, H.M. Bambhania, S.C. Barton, Carbon nanotube-modified biocatalytic microelectrodes with multiscale porosity, *Journal of Applied Electrochemistry*, 42 (2012) 145-151.
- [39] I. Mazurenko, M. Etienne, O. Tananaiko, V. Urbanova, V. Zaitsev, A. Walcarius, Electrophoretic deposition of macroporous carbon nanotube assemblies for electrochemical applications, *Carbon*, 53 (2013) 302-312.
- [40] L. Pieulle, X. Morelli, P. Gallice, E. Lojou, P. Barbier, M. Czjzek, P. Bianco, F. Guerlesquin, E.C. Hatchikian, The type I/type II cytochrome c(3) complex: an electron transfer link in the hydrogen-sulfate reduction pathway, *Journal of Molecular Biology*, 354 (2005) 73-90.
- [41] E. Lojou, P. Bianco, Layer-by-layer assemblies of montmorillonite and bacterial cytochromes for bioelectrocatalytic devices, *Electroanalysis*, 18 (2006) 2426-2434.
- [42] S.V. Morozov, E.E. Karyakina, N.A. Zorin, S.D. Varfolomeyev, S. Cosnier, A.A. Karyakin, Direct and electrically wired bioelectrocatalysis by hydrogenase from *Thiocapsa roseopersicina*, *Bioelectrochemistry*, 55 (2002) 169-171.

- [43] A.A. Karyakin, D.V. Vinogradova, S.V. Morozov, E.E. Karyakina, Improvement of enzyme electrocatalysis using substrate containing electroactive polymers. Towards limiting efficiencies of bioelectrocatalysis, *Electrochim. Acta*, 55 (2010) 7696-7700.
- [44] J. Baur, A. Le Goff, S. Dementin, M. Holzinger, M. Rousset, S. Cosnier, Three-dimensional carbon nanotube-polypyrrole-[NiFe] hydrogenase electrodes for the efficient electrocatalytic oxidation of H₂, *International Journal of Hydrogen Energy*, 36 (2011) 12096-12101.
- [45] N. Plumeré, O. Rüdiger, A.A. Oughli, R. Williams, J. Vivekananthan, S. Pöller, W. Schuhmann, W. Lubitz, A redox hydrogel protects hydrogenase from high-potential deactivation and oxygen damage, *Nat Chem*, advance online publication (2014).
- [46] A. Ciaccafava, L'Hydrogénase [Ni-Fe] multi-tolérante d'*Aquifex aeolicus*: de l'immobilisation fonctionnelle à la biopile H₂-O₂, Sciences de la Vie et de la Santé, Aix-Marseille Université, Marseille, 2012, pp. beaucoup de.
- [47] S.L. Yang, G. Li, R. Yang, M.M. Xia, L.B. Qu, Simultaneous voltammetric detection of dopamine and uric acid in the presence of high concentration of ascorbic acid using multi-walled carbon nanotubes with methylene blue composite film-modified electrode, *J. Solid State Electrochem.*, 15 (2011) 1909-1918.
- [48] S. Pakapongpan, R. Palangsuntikul, W. Surareungchai, Electrochemical sensors for hemoglobin and myoglobin detection based on methylene blue-multiwalled carbon nanotubes nanohybrid-modified glassy carbon electrode, *Electrochim. Acta*, 56 (2011) 6831-6836.
- [49] A.P. Brown, F.C. Anson, MOLECULAR ANCHORS FOR ATTACHMENT OF METAL-COMPLEXES TO GRAPHITE ELECTRODE SURFACES, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 83 (1977) 203-206.
- [50] A.P. Brown, C. Koval, F.C. Anson, ILLUSTRATIVE ELECTROCHEMICAL BEHAVIOR OF REACTANTS IRREVERSIBLY ADSORBED ON GRAPHITE ELECTRODE SURFACES, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 72 (1976) 379-387.
- [51] H. Jaegfeldt, T. Kuwana, G. Johansson, ELECTROCHEMICAL STABILITY OF CATECHOLS WITH A PYRENE SIDE-CHAIN STRONGLY ADSORBED ON GRAPHITE-ELECTRODES FOR CATALYTIC-OXIDATION OF DIHYDRONICOTINAMIDE ADENINE-DINUCLEOTIDE, *J. Am. Chem. Soc.*, 105 (1983) 1805-1814.
- [52] R.J. Chen, Y.G. Zhang, D.W. Wang, H.J. Dai, Noncovalent sidewall functionalization of single-walled carbon nanotubes for protein immobilization, *J. Am. Chem. Soc.*, 123 (2001) 3838-3839.
- [53] R.P. Ramasamy, H.R. Luckarift, D.M. Ivnitiski, P.B. Atanassov, G.R. Johnson, High electrocatalytic activity of tethered multicopper oxidase-carbon nanotube conjugates, *Chemical Communications*, 46 (2010) 6045-6047.
- [54] M. Delamar, R. Hitmi, J. Pinson, J.M. Saveant, COVALENT MODIFICATION OF CARBON SURFACES BY GRAFTING OF FUNCTIONALIZED ARYL RADICALS PRODUCED FROM ELECTROCHEMICAL REDUCTION OF DIAZONIUM SALTS, *J. Am. Chem. Soc.*, 114 (1992) 5883-5884.
- [55] C. Bourdillon, M. Delamar, C. Demaille, R. Hitmi, J. Moiroux, J. Pinson, IMMOBILIZATION OF GLUCOSE-OXIDASE ON A CARBON SURFACE DERIVATIZED BY ELECTROCHEMICAL REDUCTION OF DIAZONIUM SALTS, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 336 (1992) 113-123.

- [56] M. Pellissier, F. Barriere, A.J. Downard, D. Leech, Improved stability of redox enzyme layers on glassy carbon electrodes via covalent grafting, *Electrochem. Commun.*, 10 (2008) 835-838.
- [57] C. Vaz-Dominguez, S. Campuzano, O. Rudiger, M. Pita, M. Gorbacheva, S. Shleev, V.M. Fernandez, A.L. De Lacey, Laccase electrode for direct electrocatalytic reduction of O₂ to H₂O with high-operational stability and resistance to chloride inhibition, *Biosens. Bioelectron.*, 24 (2008) 531-537.
- [58] M.A. Alonso-Lomillo, O. Rudiger, A. Maroto-Valiente, M. Velez, I. Rodriguez-Ramos, F.J. Munoz, V.M. Fernandez, A.L. De Lacey, Hydrogenase-coated carbon nanotubes for efficient H₂ oxidation, *Nano Letters*, 7 (2007) 1603-1608.
- [59] C. Baffert, K. Sybirna, P. Ezanno, T. Lautier, V. Hajj, I. Meynial-Salles, P. Soucaille, H. Bottin, C. Leger, Covalent Attachment of FeFe Hydrogenases to Carbon Electrodes for Direct Electron Transfer, *Anal. Chem.*, 84 (2012) 7999-8005.
- [60] R. Polsky, J.C. Harper, S.M. Dirk, D.C. Arango, D.R. Wheeler, S.M. Brozik, Diazonium-functionalized horseradish peroxidase immobilized via addressable electrodeposition: Direct electron transfer and electrochemical detection, *Langmuir*, 23 (2007) 364-366.
- [61] F. Tasca, W. Harreither, R. Ludwig, J.J. Gooding, L. Gorton, Cellobiose Dehydrogenase Aryl Diazonium Modified Single Walled Carbon Nanotubes: Enhanced Direct Electron Transfer through a Positively Charged Surface, *Anal. Chem.*, 83 (2011) 3042-3049.
- [62] J. Lyskawa, D. Belanger, Direct modification of a gold electrode with aminophenyl groups by electrochemical reduction of in situ generated aminophenyl monodiazonium cations, *Chemistry of Materials*, 18 (2006) 4755-4763.
- [63] S. Baranton, D. Belanger, In situ generation of diazonium cations in organic electrolyte for electrochemical modification of electrode surface, *Electrochim. Acta*, 53 (2008) 6961-6967.
- [64] L. Santos, J. Ghilane, J.C. Lacroix, Formation of Mixed Organic Layers by Stepwise Electrochemical Reduction of Diazonium Compounds, *J. Am. Chem. Soc.*, 134 (2012) 5476-5479.
- [65] Y.R. Leroux, P. Hapiot, Nanostructured Monolayers on Carbon Substrates Prepared by Electrografting of Protected Aryldiazonium Salts, *Chemistry of Materials*, 25 (2013) 489-495.
- [66] J.M. Noel, B. Sjoberg, R. Marsac, D. Zigah, J.F. Bergamini, A.F. Wang, S. Rigaut, P. Hapiot, C. Lagrost, Flexible Strategy for Immobilizing Redox-Active Compounds Using in Situ Generation of Diazonium Salts. Investigations of the Blocking and Catalytic Properties of the Layers, *Langmuir*, 25 (2009) 12742-12749.
- [67] R. Reiss, J. Ihssen, L. Thony-Meyer, *Bacillus pumilus* laccase: a heat stable enzyme with a wide substrate spectrum, *Bmc Biotechnology*, 11 (2011) 11.
- [68] F. Durand, C.H. Kjaergaard, E. Suraniti, S. Gounel, R.G. Hadt, E.I. Solomon, N. Mano, Bilirubin oxidase from *Bacillus pumilus*: A promising enzyme for the elaboration of efficient cathodes in biofuel cells, *Biosens. Bioelectron.*, 35 (2012) 140-146.
- [69] E. Suraniti, S. Tsujimura, F. Durand, N. Mano, Thermophilic biocathode with bilirubin oxidase from *Bacillus pumilus*, *Electrochem. Commun.*, 26 (2013) 41-44.

- [70] E. Suraniti, M. Abintou, F. Durand, N. Mano, Heat and drying time modulate the O₂ reduction current of modified glassy carbon electrodes with bilirubin oxidases, *Bioelectrochemistry*, 88 (2012) 65-69.
- [71] G. Gupta, C. Lau, V. Rajendran, F. Colon, B. Branch, D. Ivnitski, P. Atanassov, Direct electron transfer catalyzed by bilirubin oxidase for air breathing gas-diffusion electrodes, *Electrochem. Commun.*, 13 (2011) 247-249.
- [72] S. Tsujimura, E. Suraniti, F. Durand, N. Mano, Oxygen reduction reactions of the thermostable bilirubin oxidase from *Bacillus pumilus* on mesoporous carbon-cryogel electrodes, *Electrochim. Acta*, 117 (2014) 263-267.
- [73] F. Barriere, P. Kavanagh, D. Leech, A laccase-glucose oxidase biofuel cell prototype operating in a physiological buffer, *Electrochim. Acta*, 51 (2006) 5187-5192.
- [74] L. dos Santos, V. Climent, C.F. Blanford, F.A. Armstrong, Mechanistic studies of the 'blue' Cu enzyme, bilirubin oxidase, as a highly efficient electrocatalyst for the oxygen reduction reaction, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 12 (2010) 13962-13974.
- [75] M. Ludwig, J.A. Cracknell, K.A. Vincent, F.A. Armstrong, O. Lenz, Oxygen-tolerant H₂ Oxidation by Membrane-bound NiFe Hydrogenases of *Ralstonia* Species COPING WITH LOW LEVEL H₂ IN AIR, *J. Biol. Chem.*, 284 (2009) 465-477.
- [76] C. Gutierrez-Sanchez, M. Pita, C. Vaz-Dominguez, S. Shleev, A.L. De Lacey, Gold Nanoparticles as Electronic Bridges for Laccase-Based Biocathodes, *J. Am. Chem. Soc.*, 134 (2012) 17212-17220.
- [77] A. Christenson, S. Shleev, N. Mano, A. Heller, L. Gorton, Redox potentials of the blue copper sites of bilirubin oxidases, *Biochim. Biophys. Acta-Bioenerg.*, 1757 (2006) 1634-1641.
- [78] P. Ramirez, N. Mano, R. Andreu, T. Ruzgas, A. Heller, L. Gorton, S. Shleev, Direct electron transfer from graphite and functionalized gold electrodes to T1 and T2/T3 copper centers of bilirubin oxidase, *Biochim. Biophys. Acta-Bioenerg.*, 1777 (2008) 1364-1369.
- [79] M.C. Weigel, E. Tritscher, F. Lisdat, Direct electrochemical conversion of bilirubin oxidase at carbon nanotube-modified glassy carbon electrodes, *Electrochem. Commun.*, 9 (2007) 689-693.
- [80] J.A. Cracknell, C.F. Blanford, Developing the mechanism of dioxygen reduction catalyzed by multicopper oxidases using protein film electrochemistry, *Chemical Science*, 3 (2012) 1567-1581.
- [81] C.H. Kjaergaard, F. Durand, F. Tasca, M.F. Qayyum, B. Kauffmann, S. Gounel, E. Suraniti, K.O. Hodgson, B. Hedman, N. Mano, E.I. Solomon, Spectroscopic and Crystallographic Characterization of "Alternative Resting" and "Resting Oxidized" Enzyme Forms of Bilirubin Oxidase: Implications for Activity and Electrochemical Behavior of Multicopper Oxidases, *J. Am. Chem. Soc.*, 134 (2012) 5548-5551.
- [82] H.H. Kim, Y.C. Zhang, A. Heller, Bilirubin oxidase label for an enzyme-linked affinity assay with O₂ as substrate in a neutral pH NaCl solution, *Anal. Chem.*, 76 (2004) 2411-2414.
- [83] N. Mano, H.H. Kim, Y.C. Zhang, A. Heller, An oxygen cathode operating in a physiological solution, *J. Am. Chem. Soc.*, 124 (2002) 6480-6486.

- [84] N. Mano, H.H. Kim, A. Heller, On the relationship between the characteristics of bilirubin oxidases and O₂ cathodes based on their "wiring", *J. Phys. Chem. B*, 106 (2002) 8842-8848.
- [85] L. Edembe, S. Gounel, M. Cadet, F. Durand, N. Mano, A highly efficient O₂ cathode based on bilirubin oxidase from *Bacillus pumilus* operating in serum, *Electrochem. Commun.*, 23 (2012) 80-82.
- [86] J.A. Cracknell, T.P. McNamara, E.D. Lowe, C.F. Blanford, Bilirubin oxidase from *Myrothecium verrucaria*: X-ray determination of the complete crystal structure and a rational surface modification for enhanced electrocatalytic O₂ reduction, *Dalton Transactions*, 40 (2011) 6668-6675.
- [87] A. Ciaccafava, A. De Poulpiquet, V. Techer, M.T. Giudici-Orticoni, S. Tingry, C. Innocent, E. Lojou, An innovative powerful and mediatorless H₂/O₂ biofuel cell based on an outstanding bioanode, *Electrochem. Commun.*, 23 (2012) 25-28.
- [88] R.S. Jayashree, S.K. Yoon, F.R. Brushett, P.O. Lopez-Montesinos, D. Natarajan, L.J. Markoski, P.J.A. Kenis, On the performance of membraneless laminar flow-based fuel cells, *Journal of Power Sources*, 195 (2010) 3569-3578.
- [89] M.H. Osman, A.A. Shah, F.C. Walsh, Recent progress and continuing challenges in bio-fuel cells. Part I: Enzymatic cells, *Biosens. Bioelectron.*, 26 (2013) 3087-3102.

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

Dans le contexte actuel, où l'augmentation de la demande énergétique va de pair avec l'épuisement progressif des ressources en combustible fossile, le dihydrogène H_2 apparaît comme un vecteur d'énergie prometteur. Son utilisation repose essentiellement sur la conversion de l'énergie chimique de la molécule en énergie électrique, via les piles à combustible, un procédé électrochimique qui couple l'oxydation de l' H_2 à la réduction de l' O_2 . Le dispositif le plus largement répandu, la PEMFC, qui fonctionne à température modérée, a le désavantage de nécessiter l'emploi d'un catalyseur, le platine. Or ce dernier est empoisonné par de faibles concentrations d'impuretés dans le combustible. De plus, il est rare et cher, et ses ressources sont limitées. Parmi les catalyseurs susceptibles de remplacer le platine, les enzymes oxydoréductases, très actives et sélectives, constituent une alternative séduisante. Leur utilisation comme catalyseur dans une pile à combustible définit le concept de biopile enzymatique à combustible.

Au cours de ce travail de doctorat, mon objectif était de développer des bioélectrodes propres à définir une nouvelle génération de biopiles basées sur l'hydrogène et l'oxygène comme comburant et combustible. Il s'agissait de définir des couples enzymes/matériaux d'électrode permettant d'obtenir les performances optimales de la biopile, tout en progressant sur la compréhension plus fondamentale des mécanismes enzymatiques impliqués. Dans ce but, j'ai étudié l'immobilisation sur différents matériaux conducteurs de deux enzymes thermostables, spécifiques respectivement de l'oxydation de l' H_2 et de la réduction de l' O_2 , l'hydrogénase d'*Aquifex aeolicus* (*Aa* Hase 1) et la bilirubine oxydase de *Bacillus pumilus* (*Bp* BOD). L'hydrogénase d'*A. aeolicus* a de plus les avantages, contrairement à la majorité des hydrogénases, d'être active en présence de l' O_2 , du CO et de l' H_2S .

Partant du postulat qu'une connexion directe devait être privilégiée pour l'obtention de puissances élevées, j'ai travaillé dans deux directions qui à terme devraient se conjuguer pour une plus grande efficacité : l'orientation de l'enzyme, et son immobilisation sur des matériaux conducteurs présentant des surfaces développées élevées. Dans un premier temps, j'ai défini les bases moléculaires de l'immobilisation orientée de l'*Aa* Hase 1 en couplant l'électrochimie sur des électrodes d'ITO ayant subi des traitements visant à conférer différents degrés d'hydrophilicité à la surface, et la dynamique moléculaire. L'approche électrochimique a permis de montrer l'absence d'orientation préférentielle sur les surfaces hydrophiles, et l'orientation préférentielle portant le centre [FeS] distal loin des surfaces hydrophobes. La modélisation a permis d'expliquer le comportement de l'enzyme sur les surfaces chargées par la présence d'un moment dipolaire faible et fluctuant, qui induit une adaptabilité de l'*Aa* Hase 1 aux différentes surfaces chargées, et n'impose pas une orientation particulière. Ces résultats confirment les données précédentes obtenues sur les monocouches

autoassemblées de thiols (SAMs), SAMs qui auraient pu être à l'origine de biais du fait de leur structure. Mon approche valide donc le modèle proposé pour l'orientation de l'*Aa* Hase 1, dans lequel l'hélice transmembranaire hydrophobe entourée de détergent neutre constitue un environnement hydrophile qui repousse le centre [FeS] loin des surfaces hydrophobes, et ne promeut pas d'orientation particulière sur les surfaces hydrophiles.

L'*Aa* Hase 1 a ensuite été immobilisée dans des réseaux formés par différents nanomatériaux carbonés, nanoparticules (CNPs), nanotubes (CNTs) et nanofibres de carbone (CNFs). Le premier objectif était de lever la limitation liée à l'orientation de l'enzyme, qui ne permet pas d'obtenir 100% de transfert direct d'électrons (TED) sur une surface plane, en entourant l'enzyme par le matériau carboné conducteur afin d'obtenir du TED quelle que soit l'orientation adoptée par l'enzyme. Le second objectif était d'augmenter le nombre d'enzymes connectées à l'électrode, en augmentant la surface développée de cette dernière, afin d'améliorer les densités de courant délivrées à l'électrode, dans l'optique du développement d'une biopile à combustible délivrant une densité de puissance non négligeable.

Une première approche de nano-structuration de l'électrode a été constituée par la formation couche par couche de réseaux tridimensionnels conducteurs de CNPs. L'oxydation de l' H_2 par l'*Aa* Hase 1 adsorbée dans le réseau de CNPs a été observée en TED. L'adsorption a de plus permis de conserver la propriété fondamentale d'hyperthermophilie de l'*Aa* Hase 1. Une augmentation des courants de catalyse a été enregistrée. Néanmoins, ce phénomène est limité par des problèmes de stabilité mécanique des couches de CNPs pour les plus grandes épaisseurs.

L'utilisation de CNTs, réputés pour leurs excellentes propriétés électriques et leur bonne compatibilité avec les enzymes, a ensuite été explorée. La grande affinité de l'*Aa* Hase 1 pour les SW-CNTs-COOH, qui a permis de multiplier par un facteur 30 les densités de courant obtenues à l'électrode, a été démontrée. L'efficacité de différentes méthodes pour augmenter la stabilité du dispositif a été évaluée. Si l'emploi d'une membrane de Nafion® s'est révélé défavorable, la liaison covalente de l'enzyme par couplage amide s'est montrée une possibilité intéressante. Néanmoins, des limitations en termes de densité de courants et de pureté du matériau carboné ont été constatées.

Enfin, les CNFs se sont révélées un matériau d'électrode séduisant, grâce à leur excellente conductivité électrique, leur grande surface spécifique, leur réactivité favorable à l'adsorption des enzymes, et leur faculté à former des réseaux de porosité hiérarchisée. Des densités de courant supérieures à $4 \text{ mA}\cdot\text{cm}^{-2}$, encore jamais obtenues jusqu'alors, ont pu être enregistrées. En permettant d'augmenter considérablement les densités de courant catalytique, les CNFs ont aussi mis en évidence la limitation par le transport de substrat. Ce phénomène a pu être finement caractérisé. L'optimisation des densités de courant a mené au développement d'une bioanode efficace pour l'oxydation de l' H_2 .

J'ai abordé la problématique du transfert d'électrons médié (TEM) pour l'oxydation de l' H_2 par l'*Aa* Hase 1 immobilisée sur les matériaux carbonés, dans l'optique d'évaluer l'efficacité de la connexion de l'*Aa* Hase 1 dans les réseaux 3D. Ce mécanisme est en effet compliqué par la forte affinité pour les nanomatériaux carbonés des phénothiazines, médiateurs optimaux d'oxydation de l' H_2 par l'*Aa* Hase 1. J'ai pu mettre en évidence la superposition de deux phénomènes indépendants lors de l'adsorption de ces médiateurs, d'une part le redox de la phénothiazine adsorbée, d'autre part le TED par l'*Aa* Hase 1. La recherche d'autres médiateurs a conduit à considérer le benzyle viologène (BV) comme une alternative. Suite à nos premières expériences en présence de poly-phénothiazine, la question se posait également de savoir dans quelle mesure une électrode basée sur une hydrogénase fonctionnant uniquement à l'aide d'un médiateur pouvait être portée à des potentiels positifs, là où une hydrogénase connectée en direct est inactivée. Nous avons pu observer un processus de TEM avec le ferrocène méthanol de potentiel très élevé. Ce résultat est apparemment contradictoire avec une étude récente [1] qui suggère que l'inactivation de l'enzyme connectée via un médiateur dépend du potentiel du médiateur, et avec notre observation de la désactivation de l'enzyme connectée via le bleu de méthylène. Une étude cinétique fine sera nécessaire pour comprendre de quelle manière le potentiel du site actif de l'enzyme est régi lors de la catalyse impliquant une connexion médiée.

Un des points limitant le développement des biopiles est la stabilité des bioélectrodes. Des stratégies ont été explorées pour augmenter la durée de vie de la bioanode à base de nanomatériaux carbonés. Deux techniques ont été utilisées pour introduire des groupements fonctionnels, afin de permettre la liaison covalente de l'*Aa* Hase 1 à l'électrode : la liaison de molécules aromatiques par interaction π - π sur les plans de graphène, et la réduction de sels de diazoniums. La liaison de pyrène modifié a permis d'augmenter la stabilité de l'hydrogénase sur l'électrode de CNFs. Une étude préliminaire de la réduction des sels de diazonium a été réalisée sur l'électrode de PG, qui constitue un bon modèle de surface carbonée. Les fonctions introduites ont permis la stabilisation de l'enzyme, mais seule une faible proportion de TED a pu être obtenue. La mise en œuvre de cette technique reste donc à améliorer.

Une biocathode pour la réduction de l' O_2 a ensuite été développée grâce à l'immobilisation de la *Bp* BOD sur les CNFs. Cette électrode a permis la première étude de la connexion directe de cette enzyme. Les différents paramètres (concentration d'enzyme, pH, température, apport de substrat) ont tout d'abord été explorés pour l'optimisation des performances. L'électrochimie a également permis la mise en évidence de l'existence d'une forme resting alternative de la *Bp* BOD. L'influence des ions chlorures, du pH et de la température sur l'équilibre entre les deux formes resting de l'enzyme a été étudiée. La comparaison avec la *Mv* BOD a conduit à différencier les comportements des deux enzymes. Les bases moléculaires de ces différences restent néanmoins à déterminer, la résolution de la structure de la *Bp* BOD devrait être une étape importante. Il ressort néanmoins de cette étude que les biocathodes basées sur des BODs sont inefficaces pour la réduction de l' O_2 à haut potentiel à pH acide

en présence de NaCl. Cette observation s'oppose à l'opinion largement répandue dans la littérature, selon laquelle les BODs sont résistantes aux ions chlorures.

Enfin, à partir des deux bioélectrodes optimisées, j'ai réalisé une biopile capable d'opérer sur une large gamme de pH et de température. Ce dispositif constitue la première biopile H_2-O_2 capable d'opérer à des températures élevées, et délivre des densités de puissance supérieures au $mW.cm^{-2}$ pour un OCV proche de 1,1 V.

Les travaux effectués au cours de cette thèse mettent aussi en évidence les aspects à améliorer pour que le concept de biopile enzymatique soit réellement viable. Les perspectives d'étude peuvent s'articuler autour de deux axes principaux : (1) tout d'abord, lever les limitations posées par le transport de masse; (2) puis améliorer la stabilité du signal électrocatalytique.

(1) Le premier point nécessite la compréhension des mécanismes de transport dans les matériaux poreux. D'une part, le transport de l'enzyme dans le réseau 3D résulte d'une compétition entre le mécanisme d'adsorption, et les mécanismes de transport (diffusion, capillarité). Il convient donc d'adapter la taille des pores pour que cette compétition ne résulte pas en bouchage des pores. Il est également nécessaire de connaître la participation de l'enzyme au courant électrique en fonction de sa localisation dans le matériau poreux. D'après l'étude de l'immobilisation de l'*Ec Hyd 1* dans un carbone mésoporeux compacté, la répartition et l'activité de l'enzyme seraient homogènes. En effet, lorsque l'électrode est coupée en deux, l'intensité délivrée est égale à la moitié de l'intensité initiale [2]. Pour affiner cette représentation, il serait possible par exemple de cartographier la répartition des molécules d'hydrogénase qui participent à la réaction, grâce au suivi 3D de la concentration locale en protons par microscopie Raman confocale. Cette étude permettrait d'établir des modèles de répartition de l'enzyme, et d'adapter le mode d'approvisionnement en substrat.

Pour améliorer le transport du substrat vers l'enzyme enfouie dans le réseau poreux, on peut d'ores et déjà proposer l'utilisation d'électrodes à diffusion de gaz, dont les électrodes respirantes constituent un cas particulier. Les enzymes seraient alors approvisionnées non plus seulement par les faibles concentrations de gaz dissous dans l'électrolyte, mais par les gaz purs. Cette technique permettrait de plus d'éviter le mélange des gaz dans la solution électrolytique, et donc de s'affranchir de la membrane échangeuse de protons. Il en découlerait des avantages non négligeables, en termes de réduction des coûts et de simplification du système. Dans le cas de la cathode, l'augmentation de l'efficacité de la catalyse passe aussi par la recherche de nouvelles enzymes plus affines pour l' O_2 .

(2) Améliorer la stabilité du courant électro-catalytique impose de comprendre les mécanismes à l'origine de l'instabilité. Il faudrait notamment être en mesure de discriminer si les diminutions du courant électrique sont liées à l'instabilité intrinsèque de l'enzyme immobilisée, ou à l'instabilité de l'immobilisation de l'enzyme à l'électrode. Dans cet objectif, des études de microbalance à quartz

(QCM) couplées à l'électrochimie permettraient de déterminer la proportion d'enzymes immobilisées qui prennent part au courant électrique, et d'établir un lien entre la perte enregistrée dans le courant électrique et la perte de masse à l'électrode, liée au détachement de l'enzyme. Certains systèmes de QCM permettent de plus l'enregistrement de la dissipation, grâce auquel on peut établir un lien entre la perte de courant et la réorganisation du film enzymatique à l'électrode. Des études similaires ont déjà été réalisées pour la *Mv* BOD [3]. La réorganisation du film enzymatique à l'électrode peut également être étudiée grâce à la résonance des plasmons de surface (SPR). Le couplage de ces systèmes à l'électrochimie permettrait d'étudier l'influence du potentiel sur les instabilités remarquées.

Dans le cas d'une instabilité du courant liée à l'instabilité intrinsèque de l'enzyme, une solution consisterait à utiliser la bactérie entière. La première biopile H_2-O_2 avait été réalisée de cette manière, il s'agissait alors non pas d'une biopile enzymatique mais d'une biopile microbienne [4]. Ce type de système n'est néanmoins pas sans inconvénients. Tout d'abord, en raison de la complexité de son métabolisme, un microorganisme entier ne peut pas présenter la même spécificité envers un substrat qu'une enzyme isolée. Par ailleurs, la connexion électrique peut être plus difficile, voire impossible, à établir. Ensuite, le système ne serait pas exempt d'une certaine instabilité, liée cette fois à la tenue et à la durée de vie du biofilm formé par le microorganisme à la surface de l'électrode. Enfin, ce biofilm pourrait s'étendre sur d'autres composants de la biopile que l'électrode, limitant les performances du dispositif. L'ingénierie d'un tel système serait donc très différente de celle d'une biopile enzymatique, la miniaturisation serait difficilement envisageable. La stabilisation de l'enzyme elle-même peut être néanmoins être envisagée, grâce à la reconstitution à l'électrode d'un environnement proche de son environnement physiologique. Ainsi, pour l'*Aa* Hase 1, un exemple est constitué par l'étude des protéoliposomes [5]. Toujours dans le cas de l'*Aa* Hase 1, une solution consisterait à immobiliser à l'électrode le trimère entier formé par les deux sous-unités de l'hydrogénase et son partenaire physiologique, le cytochrome *b*. Une orientation physiologique serait de plus favorisée. Enfin, malgré les problèmes causés par l'utilisation de médiateurs redox, il se peut que la connexion médiée stabilise davantage l'activité enzymatique. Cette possibilité ne doit donc pas être négligée.

Dans le cas d'une instabilité liée à la liaison de l'enzyme à l'électrode, il faudrait dans un premier temps approfondir les possibilités envisagées pour greffer à la surface du nanomatériau les fonctions chimiques permettant la formation d'une liaison covalente avec l'hydrogénase. En particulier, il s'agirait de perfectionner la technique de réduction des sels de diazonium pour établir sur les CNFs une monocouche de fonctions chimiques. On pourrait alors connecter efficacement les enzymes à l'électrode et obtenir du TED. Une solution possible repose sur une stratégie de protection-déprotection qui empêchent la réduction ultérieure sur les groupes déjà attachés à la surface. Dans une étude proposée par Leroux *et al.* [6] la synthèse de sels d'aryle diazoniums protégés avec des groupes silanes de différents encombrements est suivie de leur réduction à une électrode de carbone, puis d'une

étape de déprotection. Si ces méthodes se montrent inefficaces, d'autres possibilités peuvent être explorées : la formation de matrices inorganiques par procédé sol-gel, qui protégeraient l'enzyme par encapsulation, la modification du Nafion grâce aux ions ammoniums quaternaires...

Dans le contexte de la problématique plus générale d'utilisation de l' H_2 comme vecteur énergétique, il convient néanmoins de rappeler qu'il est aujourd'hui produit à 95% par reformage d'hydrocarbures. Pour envisager de façon durable l'utilisation de l' H_2 , il faut donc également penser à développer sa production à partir de ressources renouvelables. Une approche possible est l'utilisation de bactéries productrices d' H_2 , qui conduit au concept émergent de *bio-hydrogène*. Ainsi, dans notre équipe, la formation d'un consortium bactérien artificiel constitué de deux bactéries a permis de multiplier par trois la production d' H_2 par rapport aux bactéries utilisées séparément. Ce résultat ouvre la voie à une production efficace et propre du bio-hydrogène. L'utilisation de l'hydrogénase spécifique et tolérante à la bioanode de la biopile trouverait alors tout son intérêt, puisque l' H_2 issu de ce procédé n'est pas pur. Une autre possibilité est l'utilisation de complexes biomimétiques, des molécules organométalliques de synthèse inspirées par les sites actifs des hydrogénases. La capacité de ces complexes à produire très efficacement de l' H_2 en solution aqueuse a déjà été démontrée.

Une dernière question : à quoi serviront ces biopiles H_2-O_2 ? Même si la progression des performances obtenues a été rapide, puisqu'on est passé en moins de 10 ans du μW au $mW.cm^{-2}$, il paraît aujourd'hui inenvisageable de faire rouler une voiture avec une biopile enzymatique H_2-O_2 . Ne concluons pas trop vite quant à l'inutilité de ces systèmes. Il pourra s'agir d'alimenter des dispositifs de faible puissance. On peut penser par exemple à des dispositifs statiques, tels que les capteurs environnementaux. Compte tenu de l'hyperthermophilie des enzymes, l'alimentation de capteurs fonctionnant dans des environnements chauds sera permise. A titre d'exemple, la pose de capteurs de CO dans les gaines chauffantes de bâtiments industriels ou de bureaux est aujourd'hui limitée par leur alimentation électrique. Ce dosage de gaz repose sur plusieurs centaines de capteurs par bâtiment, et donc sur plusieurs km de fils électriques. Notre biopile H_2/O_2 , à condition d'une stabilité dans le temps accrue, pourrait avantageusement servir d'alimentation électrique. Un second exemple concerne les digesteurs de boues anaérobies qui fonctionnent parfois à des températures de l'ordre de $50^\circ C$ afin d'activer les microorganismes thermophiles. Le contrôle de la température est essentiel pour maintenir l'activité microbienne. La biopile H_2/O_2 développée au cours de cette thèse pourrait permettre l'alimentation des capteurs de contrôle de température au sein de digesteurs. On peut même aller jusqu'à imaginer d'alimenter la pile en hydrogène provenant directement de la digestion anaérobie. D'autre part, l'utilisation de cartouches d'hydrogène peut permettre de penser à alimenter des dispositifs portables nécessitant de faibles puissances, de type chargeur de portable. Enfin, on peut envisager des applications jetables, pour lesquelles une grande stabilité ne serait pas nécessaire.

Bibliographie

- [1] N. Plumeré, O. Rüdiger, A.A. Oughli, R. Williams, J. Vivekananthan, S. Pöller, W. Schuhmann, W. Lubitz, A redox hydrogel protects hydrogenase from high-potential deactivation and oxygen damage, *Nat Chem*, advance online publication (2014).
- [2] L. Xu, F.A. Armstrong, Optimizing the power of enzyme-based membrane-less hydrogen fuel cells for hydrogen-rich H₂-air mixtures, *Energy Environ. Sci.*, 6 (2013) 2166-2171.
- [3] K. Singh, T. McArdle, P.R. Sullivan, C.F. Blanford, Sources of activity loss in the fuel cell enzyme bilirubin oxidase, *Energy Environ. Sci.*, 6 (2013) 2460-2464.
- [4] S. Tsujimura, M. Fujita, H. Tatsumi, K. Kano, T. Ikeda, Bioelectrocatalysis-based dihydrogen/dioxygen fuel cell operating at physiological pH, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 3 (2001) 1331-1335.
- [5] P. Infossi, E. Lojou, J.P. Chauvin, G. Herbette, M. Brugna, M.T. Giudici-Ortoni, Aquifex aeolicus membrane hydrogenase for hydrogen biooxidation: Role of lipids and physiological partners in enzyme stability and activity, *International Journal of Hydrogen Energy*, (2010) 10778-10789.
- [6] Y.R. Leroux, P. Hapiot, Nanostructured Monolayers on Carbon Substrates Prepared by Electrografting of Protected Aryldiazonium Salts, *Chemistry of Materials*, 25 (2013) 489-495.

Matériels et Méthodes

A- Enzymes

I- L'Hydrogénase 1 d'*Aquifex aeolicus*

I-1- Culture bactérienne

La souche d'*Aquifex aeolicus* a été fournie au laboratoire par le Pr. Karl O. Stetter de l'université de Regensburg. La souche est cultivée à 85°C ; sous agitation à 350 rpm ; à pH 6,8 ; sous H₂/CO₂ dans des proportions 80/20 à une pression totale de 1,35 bar. Les cultures bactériennes sont réalisées en bouteilles de 2 L contenant 400 mL d'un milieu minéral non dégazé, dans lequel est ajouté du thiosulfate (1g.L⁻¹). Le rendement est de 50 à 80 g de cellules pour 100 L de culture. En fin de phase exponentielle, les bactéries sont récoltées par centrifugation et le culot bactérien est congelé et conservé à -80°C. Ces cultures sont réalisées au centre de fermentation de l'Institut de Microbiologie de la Méditerranée (IMM, Marseille).

I-2- Biochimie

I-2-a- Purification de l'hydrogénase

L'hydrogénase est purifiée à température ambiante. Tous les tampons sont dégazés sous argon. 50 g de cellules sont re-suspendus dans un tampon Tris/HCl 50 mM de pH 7,4, contenant 4 mM EDTA, DNase I, en présence d'inhibiteurs de protéases (cocktail d'inhibiteurs de protéases Roche et 0.5 mM PMSF). Les cellules sont cassées au désintégrateur à une pression de 1,6 kbar. Les cellules non cassées sont éliminées par centrifugation à 8 000 g pendant 15 min. La fraction membranaire est séparée de la fraction soluble par ultracentrifugation à 200 000 g pendant 1 h (ultracentrifugeuse Beckman, rotor 45Ti). Le culot contenant les membranes est alors resuspendu dans le tampon A (Tris/HCl 50 mM pH 7,4, 1mM PMSF, 2% glycérol, 1 mM EDTA), et ajusté à une concentration de 10 mg protéine.mL⁻¹ après dosage protéique. La solubilisation est réalisée à 37 °C pendant 1 h sous faible agitation, avec le n-Dodecyl β-D-maltoside (DDM) à une concentration de 1,5 mg détergent par mg protéine. La suspension est alors centrifugée à 200 000 g pendant 1 h.

La purification de l'hydrogénase nécessite l'utilisation de différents types de chromatographies. Le surnageant de solubilisation est chargé sur une colonne échangeuse d'anions (DE52 cellulose, Whatman) équilibrée avec le tampon A contenant 0,05 % de DDM. Les protéines sont éluées par un gradient de force ionique NaCl 0-500 mM dont la fraction 50 mM NaCl contient l'hydrogénase. Après dialyse, cette fraction est chargée sur une colonne HTP (hydroxylapatite Bio-Rad) équilibrée avec le tampon A contenant 0,05 % de DDM. Les protéines sont éluées avec un

tampon phosphate $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ de pH 7,6 et de force ionique croissante. L'hydrogénase est retrouvée dans la fraction 400 mM. Après dialyse, cette fraction est chargée sur une colonne échangeuse d'anions de type Q Sépharose (Hi load 16/10 Pharmacia, FPLC apparatus AMERSHAM Pharmacia Biotech.). L'hydrogénase est éluée à 150 mM NaCl, lavée et concentrée par centrifugation sur « vivaspin » (cut off 100 KDa).

L'hydrogénase est alors aliquotée sous atmosphère d'argon, congelée dans l'azote liquide et stockée à -80°C . Pour 50 g de bactéries, environ 15 mg d'hydrogénase sont obtenus.

I-2-b- Dosage protéique

Les concentrations protéiques sont déterminées en utilisant la méthode de LOWRY modifiée. L'albumine de sérum bovin (BSA) est utilisée comme standard pour la courbe étalon [1].

I-2-c- Electrophorèse sur gel d'acrylamide

I-2-c-i- Condition dénaturante

L'électrophorèse en présence de détergent, le sodium dodécyle sulfate (SDS), permet de séparer les protéines préalablement dénaturées en fonction de leur masse moléculaire. Les échantillons sont traités avec du tampon de désagrégation (Tris-125 mM ; pH 6,8 ; β -mercaptoéthanol 20 mM ; SDS 4% ; glycérol 20% ; bleu de bromophénol 0,01%) selon un ratio de 1 : 1 (en volume), puis portés à ébullition pendant 5 min. Le SDS, molécule chargée négativement, va dénaturer les protéines en se fixant sur les protéines, selon un ratio d'une molécule de SDS pour 2 acides aminés. Les protéines dénaturées seront toutes chargées négativement, et migreront donc uniquement en fonction de la masse moléculaire. La migration s'effectue sur un gel de polyacrylamide (8-15%), sous un courant de 25 mA, à température ambiante et dans du tampon de migration (Tris 25mM ; pH 8,3 ; glycine 190 mM ; SDS 0,1%). Des marqueurs de poids moléculaire Fermentas sont utilisés.

I-2-c-ii- Condition native

Les conditions sont les mêmes que précédemment, mais sans détergent ni β -mercaptoéthanol. Les protéines migrent alors selon leur poids moléculaire et leur point isoélectrique, et ne sont pas dénaturées. Des tests d'activité sur gel sont alors possibles, et l'hydrogénase peut ainsi être révélée.

I-2-c-iii- Révélation des gels

Les gels sont incubés 1 h 30 dans le bleu de Coomassie (éthanol 45% ; acide acétique 9 % ; Bleu R250 0.25 %) puis décolorés dans un tampon éthanol 30 % - acide acétique 10 %.

I-2-d- Tests d'activité hydrogénase

I-2-d-i- En cuve

L'activité hydrogénase au cours de la purification est déterminée par un test de consommation d'hydrogène, en utilisant le méthyle viologène (MV) comme accepteur d'électrons, et l'hydrogène comme donneur d'électrons. La cinétique de réduction du MV, dépendante de l'oxydation de l'hydrogène, est suivie grâce à un spectrophotomètre à effet Peltier (Cary WinUV 50) à 604 nm ($\epsilon_{MV}(604nm) = 13600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Tous les tests d'activité sont effectués à 80 °C dans un tampon Hepes 50 mM équilibré à pH 7 à l'aide de NaOH, en présence d'1 mM de MV. Avant chaque expérience, le tampon dans la cuve d'activité est dégazé 10 min sous argon, 10 min sous hydrogène, puis porté 10 min à 80 °C. La réaction est initiée au temps zéro par l'injection d'une quantité appropriée d'hydrogénase pré-incubée à 80 °C dans la cuve. La constante k_{cat} (s^{-1}) est calculée d'après l'équation :

$$k_{cat} = \frac{1}{60 * \epsilon * L} \frac{C_{m,e} dA}{M_e dt}$$

Où ϵ est le coefficient d'extinction molaire de l'ABTS à une longueur d'onde donnée (pour $\lambda=420\text{nm}$, $\epsilon=36\text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), L est le chemin optique ($L=1\text{cm}$), $C_{m,e}$ est la concentration massique de l'enzyme, M_e est la masse molaire de l'enzyme ($M_e(Mv)= 60\text{kDa}$ et $M_e(Bp)=59\text{kDa}$) et $\frac{dA}{dt}$ est la pente du signal $A=f(t)$ en $\text{Abs} \cdot \text{min}^{-1}$. Les valeurs données sont les moyennes sur 4 mesures.

I-2-d-ii- Sur gel en condition native

Au cours de la purification, l'activité est révélée sur gel en utilisant l' H_2 comme donneur d'électrons et le méthylviologène (MV) comme accepteur d'électrons. Après migration, le gel est incubé dans du tampon Hepes 50 mM équilibré à pH 7,4 à l'aide de NaOH, en présence d'1 mM de MV. Le tampon est préalablement dégazé sous argon puis sous H_2 à 85°C. En présence d'hydrogénase, le MV réduit devient bleu. La réaction est révélée par ajout du 2,3,5-Triphenyltetrazolium Chloride (SIGMA) qui, réduit à son tour, forme un précipité rouge. Sur le gel, l'hydrogénase apparait sous forme de bandes de couleur rouge. Ce test n'est que qualitatif.

I-2-d-iii- Par électrochimie

L'activité hydrogénase est finalement testée en électrochimie, par simple adsorption d'hydrogénase $1\mu\text{M}$ sur une électrode de PG. Le courant direct obtenu sert de référence à l'activité spécifique de chacun des lots d'hydrogénase.

I-2-e- Spectrométrie de masse (Trappes à ions)

Les protéines provenant d'un échantillon sont préparées selon le protocole réduction/alkylation, puis sont hydrolysées par la trypsine. Les peptides obtenus sont analysés par spectrométrie de masse de type trappe à ions. Cet appareil (ESI-IT LCQ XP plus, Thermofinnigan) est couplé à une nano-chromatographie liquide qui permet la séparation des peptides avant la détermination de leur masse. L'identification des protéines est réalisée grâce à l'utilisation du logiciel TurboSEQUEST en utilisant la banque de données de NCBI limitée au génome d'*Aquifex aeolicus*.

I-2-f- Le Détergent DDM

I-2-f-i- Quantification du DDM

Le DDM présent dans les échantillons d'hydrogénase est quantifié par chromatographie en couche mince (CCM). La courbe de calibration déterminant la concentration de DDM est réalisée en utilisant des aliquots de DDM de concentration connue. Ces aliquots sont déposés sur une plaque de CCM par un applicateur d'échantillons Camag linomat IV Sample Applicator. Les échantillons d'hydrogénase sont appliqués sur la même plaque de CCM silica gel 60F₂₅₄ de Merck. Les échantillons déposés migrent dans une phase mobile chloroforme-méthanol-hydroxyde d'ammonium-eau (65 :25 :4 :1, v/v/v/v). Un mélange d'une solution de sulfate de cuivre saturée et d'acide phosphorique 85,5 % (50 :50, v/v) est vaporisé sur la plaque avant qu'elle ne soit chauffée. Les plaques sont ensuite scannées à 40 nm par densitométrie avec un densitomètre Camag TLC scanner II. L'aire des pics de détergent obtenus est analysée par régression linéaire grâce à un D-2000 Merck integrator.

I-2-f-ii- Adsorption du DDM par le traitement Bio-Beads

Les Bio-Beads (Bio-Rad) sont préparées par mouillage préalable dans de l'éthanol pendant 10 min. Elles sont ensuite lavées plusieurs fois par du tampon Hepes 50 mM pH 6,8 jusqu'à élimination de l'éthanol. Les échantillons d'hydrogénase à traiter sont mis en présence d'une petite quantité de Bio-Beads (une vingtaine de billes) et laissés à température ambiante pendant 2 heures. L'échantillon ainsi traité est récupéré à l'aide d'une pipette.

II- Les Bilirubine oxydases

II-1- Purification des enzymes

La *Bp* BOD est surexprimée dans *E. coli* et purifiée au CRPP d'après le protocole décrit dans [2]. La *Bs* BOD est fournie par l'IS2M (Marseille) et purifiée suivant la procédure décrite dans [3]. La

Mv BOD est fournie par Amano (Japon). Ces enzymes sont diluées dans du tampon phosphate pH 7,8. Le gel ci-dessous donne la pureté de chacune de ces enzymes.

Les solutions aqueuses sont préparées avec de l'eau ultra-pure (résistivité 18 M Ω). Les tampons phosphate-citrate pH 4 à 7 sont réalisés à partir de solutions de phosphate de sodium et d'acide citrique respectivement à 200 et 100 mM dans des proportions ajustées suivant les tables de pH. Les tampons phosphate à différentes molarités et différents pH sont préparés à l'aide de solutions de phosphate de sodium monobasique et dibasique dans des proportions ajustées suivant les tables de pH. De la même façon, les tampons citrate à différentes molarités et différents pH sont préparés à l'aide de solutions d'acide citrique et de citrate de sodium dans des proportions ajustées suivant les tables de pH.

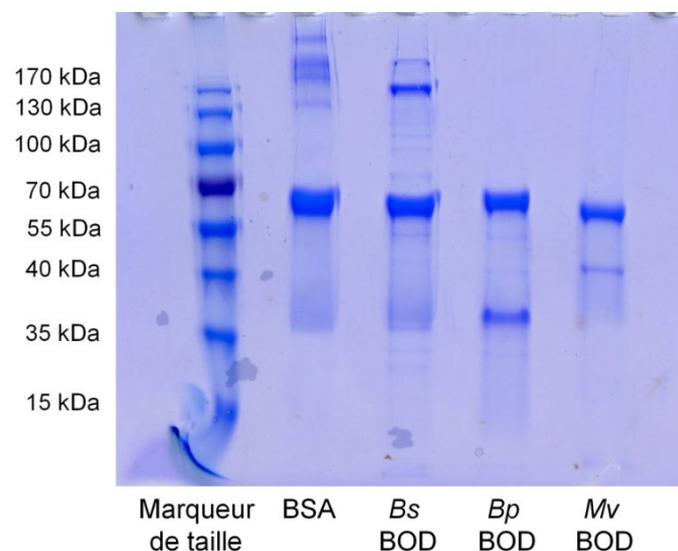


Figure 1- Gel SDS 12% donnant la pureté des enzymes *Bs* BOD, *Bp* BOD et *Mv* BOD. La piste de gauche donne l'échelle des poids moléculaires. La BSA est introduite pour contrôle.

II-2- Spectres UV-visibles

Les spectres UV-vis sont réalisés grâce à un spectrophotomètre UV Cary-Win UV. Le balayage en longueur d'onde est effectué de 800 à 200 nm à vitesse médium (600 nm.min⁻¹). La réduction de l'enzyme est effectuée grâce à un excès de dithionite de sodium. Le dithionite est enlevé par passage sur une colonne PD 10 ou par centrifugation sur vivaspin à 6000 rpm (Amicon, cut off 10 kDa). L'enzyme est réoxydée par simple exposition à l'air.

II-3- Mesure de l'activité des BODs

Les mesures d'absorbance en fonction du temps sont réalisées grâce à un spectro UV Cary-Win UV équipé d'un Peltier. La réaction est démarrée par ajout d'ABTS ($C_{ABTS,cuve}=1\text{mM}$) dans la cuve contenant l'enzyme aux concentrations $C_{BOD,cuve}=0,24\text{ mg.mL}^{-1}$ pour *Mv* et $C_{BOD,cuve}=0,1967\text{ mg.mL}^{-1}$ pour *Bp* dans le tampon au pH désiré, sans NaCl ou en présence de 200mM NaCl après une minute d'incubation à température ambiante de l'enzyme dans le tampon au pH désiré contenant du NaCl. On mesure immédiatement l'évolution de l'absorbance en fonction du temps à $\lambda=420\text{nm}$ et $T=25^{\circ}\text{C}$ (*Mv*) ou $T=37^{\circ}\text{C}$ (*Bp*). La constante k_{cat} (s^{-1}) est calculée d'après l'équation :

$$k_{cat} = \frac{1}{60 * \varepsilon * L} \frac{C_{m,e} dA}{M_e dt}$$

Où ε est le coefficient d'extinction molaire de l'ABTS à une longueur d'onde donnée (pour $\lambda=420\text{nm}$, $\varepsilon=36\text{mM}^{-1}.\text{cm}^{-1}$), L est le chemin optique ($L=1\text{cm}$), $C_{m,e}$ est la concentration massique de l'enzyme, M_e est la masse molaire de l'enzyme ($M_e(Mv)=60\text{kDa}$ et $M_e(Bp)=59\text{kDa}$) et $\frac{dA}{dt}$ est la pente du signal $A=f(t)$ en Abs.min^{-1} . Les valeurs données sont les moyennes sur 4 mesures.

B- Matériaux

I- Les nanoparticules de carbone

Les nanoparticules phénylesulfonées chargées négativement (CNPs(-)) de diamètre moyen 7,8 nm (Emperor 2000) proviennent de Cabot Corporation (Dunkinfield, UK). Les nanoparticules chargées positivement (CNPs(+)) sont obtenues à partir des CNPs(-) comme décrit dans [4].

II- Les nanotubes de carbone (CNTs)

II-1- Origine des CNTs

Les CNTs sont d'origine commerciale. Les CNTs multiparois (MW-CNTs) non fonctionnalisés proviennent de Sigma, les MW-CNTs-COOH de DropSens. Les SW-CNTs non fonctionnalisés proviennent de Sigma et les SW-CNTs-COOH sont obtenus par traitement oxydant de ces derniers.

II-2- Fonctionnalisation des SW-CNTs (SW-CNTs-COOH)

Les nanotubes de carbone simple paroi (SW-CNTs) commerciaux (Sigma) sont fonctionnalisés par traitement acide à chaud. Ce traitement génère des fonctions carboxyliques sur les parois et aux extrémités des nanotubes. 10 µg de SW-CNTs sont ajoutés à un mélange 1:3 acide sulfurique concentré/ acide nitrique concentré. Le mélange est soniqué pendant 4 heures puis dilué dans 500 mL d'eau distillée. Les SW-CNTs-COOH générés sont ensuite filtrés à l'aide d'une membrane Zitex 0,45 µm (Norton, Wayne, USA), et lavés jusqu'à obtention d'un pH neutre. Ils sont ensuite dilués dans 10 mL d'éthanol. L'éthanol est ensuite évaporé, puis les SW-CNTs-COOH sont resuspendus dans de l'eau ultra-pure. La concentration finale de la solution est mesurée par gravimétrie. Une solution de SW-CNTs-COOH de 2mg/mL environ est obtenue.

III- Les Nanofibres de carbone (CNFs) (Collaboration avec Roger Gadiou, IS2M, Mulhouse, et Renaud Denoyel, MADIREL, Marseille)

III-1- Synthèse des CNFs

Les CNFs sont synthétisées par un procédé de déposition chimique en phase vapeur conventionnel en utilisant le Ni comme catalyseur sur un support de graphite. Tout d'abord, le sel de Nickel ($\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$) est dissous dans l'éthanol, et la poudre de graphite est ajoutée à cette solution. L'éthanol est ensuite évaporé. Le mélange obtenu est réduit sous un flux d' H_2/Ar (1 :1) à 150 Torr et 600°C pendant une heure pour obtenir des nanoparticules de Ni métallique. La déposition est ensuite effectuée sous un flux de $\text{C}_2\text{H}_2/\text{H}_2$ (4 :1) à 300 Torr pendant une demi-heure.

III-2- Traitements thermiques

Les CNFs obtenues sont ensuite oxydées à 495°C pendant une demi-heure pour augmenter le volume des pores et l'aire développée. Le matériau obtenu est appelé CNFs_O2. Les CNFs_H2 sont obtenues par traitement réducteur sous H_2 à 600°C des CNFs_O2. Les CNFs_H2O2 sont obtenues par traitement oxydant avec H_2O_2 des CNFs_O2.

III-3- Caractérisation des CNFs

III-3-a- Microscopie électronique à transmission et à balayage

La microscopie électronique à transmission (MET) est effectuée avec un appareillage Philips CM200. La microscopie électronique à balayage (MEB) est effectuée avec un appareillage Philips XL30. Les images sont obtenues dans des conditions de quasi vide.

III-3-b- Diffraction aux rayons X

Un diffractomètre à rayons X (Philips Xpert 2000) avec la ligne CuK α ($\lambda=0,154056$ nm) est utilisé pour obtenir les réflexions de Bragg des CNFs et des co-dépôts.

III-3-c- Isothermes d'adsorption de l'azote

Les propriétés d'adsorption des CNFs ont été déterminées par des mesures d'isothermes d'adsorption de l'azote à 77 K sur un appareil Micromeritics ASAO 2020. L'aire surfacique des échantillons a ensuite été déterminée en appliquant la méthode de Brunauer, Emmett et Teller (BET) dans l'intervalle de pression relative 0,05-0,3. La distribution des tailles de pores a été investiguée par NL-DFT, avec l'hypothèse d'une géométrie de pore en fentes.

III-3-d- Désorption programmée en température couplée à la spectrométrie de masse (TPD-MS)

La TPD-MS permet l'analyse quantitative des groupements chimiques présents à la surface des matériaux carbonés. Les expériences sont menées dans un réacteur de silice fondue dans l'intervalle de température 327-873 K à vitesse constante de chauffe de 2 K.min⁻¹. L'analyse est réalisée dans des conditions de vide poussé (moins de 10⁻⁵ mbar). Les espèces résultant de la décomposition des groupements chimiques de surface, principalement du CO, CO₂, H₂O et H₂ sont analysées par spectrométrie de masse. Selon la température de désorption, différents groupes de surface peuvent être identifiés.

III-3-e- Isothermes d'adsorption d'eau

Les isothermes d'adsorption/désorption d'eau permettent d'évaluer le caractère hydrophile-hydrophobe des CNFs. Elles sont réalisées à 25°C en utilisant un appareil d'adsorption dynamique de vapeur à haute résolution TGA Q5000 de TA Instruments. L'appareil consiste en une microbalance twin pan sous flux de gaz. L'humidité désirée du gaz vecteur est obtenue en mélangeant les flux de gaz sec et humide dans les proportions adéquates en utilisant des contrôleurs de flux de gaz automatisés. Avant d'être exposé à la vapeur, l'échantillon est équilibré à 0% RH pendant 300 minutes à 80°C pour éliminer l'eau adsorbée résiduelle.

C- Electrochimie

I- Instrumentation

Les expériences électrochimiques sont réalisées à l'aide d'un potentiostat Bio-Logic piloté par le logiciel ECLab, ou d'un potentiostat PARSTAT 2273 de Princeton Applied Research piloté par le logiciel Power Suite. On utilise un système conventionnel à trois électrodes. L'électrode de travail est une électrode de graphite pyrolytique (PG) de Bio-Logic ou une lame d'ITO de Delta Technologies (Loveland, CO, USA), la contre électrode est une lame de platine et l'électrode de référence utilisée est une électrode Ag/AgCl (NaCl saturée), séparée de l'électrolyte grâce à une jonction maintenue à température ambiante. La température de l'électrolyte est contrôlée à l'aide d'un bain-marie équipé d'un thermostat. Avant chaque expérience, l'électrolyte est dégazé avec de l'azote, de l'hydrogène ou de l'oxygène. Les densités de courant sont calculées par rapport à la surface géométrique de l'électrode utilisée comme collecteur de courant. Les courants normalisés, utilisés pour les comparaisons, sont calculés en rapportant au courant maximal obtenu au cours de l'expérience. Sauf en cas de spécification différente, les valeurs données sont des moyennes sur au moins trois mesures

II- Conception des électrodes

II-1- Electrodes à base d'ITO

Les électrodes d'ITO sont des lames de verre traitées sur une face par dépôt d'une couche mince d'oxyde d'indium et d'étain (résistivité 8-12 $\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$). La surface de l'électrode (0,2 cm^2) est délimitée à l'aide d'un scotch isolant.

II-1-a- Traitements

Les traitements subis par les électrodes d'ITO sont le « traitement par les solvants » ou le « traitement thermique ». Le premier consiste à plonger la lame d'ITO successivement 10 min dans la potasse alcoolique (KOH 1 M), puis 10 min dans l'éthanol, puis 10 min dans l'eau ultra-pure. Le second consiste à maintenir la lame d'ITO à 500°C sous air pendant 1 h.

II-1-b- Mesure d'angle de contact

Les mesures d'angles de contact sont effectuées en utilisant un appareil de capture vidéo (Krüss G2) avec une goutte d'1 μL d'eau ultra pure. Les valeurs d'angle de contact sont déterminées en fonction du temps. Les mesures ont été pratiquées sur les deux côtés de la goutte et moyennées.

II-1-c- Adsorption de l'hydrogénase

5 μL de solution d'Aa Hase 1 à 2 μM dans du tampon Hepes pH 7,2 sont déposés sur l'électrode et séchés à 4°C.

II-1-d- ITO modifiée par des CNPs

Avant modification l'électrode est nettoyée avec de l'éthanol, puis de l'eau, puis chauffée 30 min à 500°C (four Barnstead International) pour éliminer les impuretés organiques. Les nanoparticules sont assemblées à l'électrode couche par couche. Ces électrodes sont formées de couches alternées de CNPs(+) et de CNPs(-). La lame d'ITO est plongée alternativement dans les suspensions de CNPs(+) et de CNPs(-) à 3 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ pendant une minute. Chaque étape est suivie du séchage et du rinçage à l'eau distillée pendant 2 sec pour éliminer les particules faiblement liées. 10 μL de solution d'Aa Hase 1 à 2 μM dans du tampon Hepes pH 7,2 sont déposés sur l'électrode modifiée et séchés sous un flux d'azote.

II-2- Electrodes de graphite pyrolytique (PG)

Les électrodes de PG de Bio-Logic SAS ($S = 0.07 \text{ cm}^2$) sont constituées d'une pastille de graphite de 3mm de diamètre insérée dans un cylindre de polymère PEEK résistant à la température. Sauf en cas de spécification différente, les électrodes de PG sont polies sur papier émeri P800 et P1200 (PRESI), puis rincées à l'eau distillée, soniquées, et rincées à nouveau avant dépôt de l'échantillon (nanomatériaux ou protéines).

L'électrode tournante Metrohm est munie d'un embout de graphite pyrolytique (RPG) ($S=0,035 \text{ cm}^2$) poli sur papier émeri P800 et P1200 (PRESI), puis rincé à l'eau distillée, soniqué, et rincé à nouveau avant dépôt de l'échantillon (nanomatériaux ou protéines).

II-2-a- PG nue

1 μL de solution protéique à 1 μM est déposé sur l'électrode. L'adsorption a lieu à 4°C. Une membrane de dialyse (Visking membrane MWCO 6000-8000) d'un cut-off de 6-8 kDA peut être appliquée sur l'électrode afin de confiner l'échantillon protéique. La membrane de dialyse est maintenue par un anneau en caoutchouc qui encercle l'électrode.

II-2-b- Film de DDM

2 μL d'une solution de DDM dans du chloroforme de concentration choisie sont déposés sur l'électrode. Le chloroforme est évaporé à l'air libre sous la hotte. 1 μL de solution protéique à 1 μM est ensuite déposé sur l'électrode et séché à 4°C.

II-2-c- Réduction des sels de diazonium

La réduction des sels de diazonium est réalisée sur support de PG comme substrat carboné. La synthèse est réalisée in situ à 0°C. Une solution d'acide 4-phényl butyrique à 1 mM dans H_2O + HCl 0,1 M est mise en présence d'1,5 éq. de NaNO_2 . Le mélange est laissé à 0°C pendant 10 minutes sous agitation magnétique et bullage d'azote. Puis un potentiel réducteur (-0,5 V vs. Ag/AgCl) est appliqué pendant des durées variables à l'électrode plongée dans le mélange. L'électrode est ensuite soigneusement rincée à l'eau distillée.

Pour la formation de la liaison covalente, l'électrode est incubée 1 h à température ambiante dans une solution d'EDC-NHS 40-10 mM pour activer les fonctions acide carboxylique. L'électrode est rincée, puis la liaison covalente est formée en incubant l'électrode modifiée dans une solution d'Aa Hase 1 à 5 μM à 4°C pendant 4 h. Pour les contrôles sans liaison covalente, l'étape d'incubation dans la solution d'EDC-NHS est omise.

II-2-d- Electrodes de PG modifiées par des CNTs

II-2-d-i- SW-CNT-COOH

5 μL d'une solution à 2 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de SW-CNTs-COOH sont déposés sur l'électrode puis séchés sous flux d'azote. Cette modification est répétée un nombre variable de fois. 5 μL de solution d'hydrogénase à 2 μM sont alors déposés sur l'électrode modifiée qui est séchée à 4°C.

II-2-d-ii- Couplage covalent de l'enzyme sur l'électrode modifiée par les SWCNT-COOH

L'électrode de PG modifiée par des SWCNT-COOH est trempée pendant 30 minutes dans une solution à 40 mM EDC (N-(3-Diméthylaminopropyl)-N'-éthylcarbodiimide) et 10 mM NHS (N-Hydroxysuccinimide) (Sigma). L'électrode est ensuite rincée, puis l'enzyme est déposée en surface. Typiquement- 8 μL d'hydrogénase à 5 μM sont utilisés et 5 μL de bilirubine oxydase (Amano enzyme) à 20 μM pour les essais en biopiles.

II-2-e- Electrodes de PG modifiées par des CNFs

Les CNFs sont suspendues à 4 mg.mL^{-1} dans un mélange d'eau ultrapure ($18 \text{ M}\Omega$) et de DMF dans des proportions 50-50. La suspension est homogénéisée par bain d'ultra-sons.

II-2-e-i- Hydrogénase

Sauf spécification différente, les électrodes de PG sont modifiées par trois dépôts consécutifs de $5 \mu\text{L}$ de la suspension de nanofibres suivis d'un séchage à 60°C . L'électrode ainsi modifiée est incubée pendant une heure dans $10 \mu\text{L}$ de solution d'hydrogénase à $5 \mu\text{M}$ à 4°C .

II-2-e-ii- Modification par les pyrènes pour l'hydrogénase

Les électrodes de PG sont modifiées par trois dépôts consécutifs de $5 \mu\text{L}$ de la suspension de nanofibres suivis d'un séchage à 60°C . Les nanofibres sont suspendues dans un mélange 50-50 d'eau et d'une solution de pyrène à 10 mM dans le DMF. Le film de fibres est réalisé suivant le protocole habituel mais séché à l'air libre. L'électrode modifiée est incubée une heure dans une solution d'EDC-NHS $40\text{-}10 \text{ mM}$. $5 \mu\text{L}$ de solution d'hydrogénase à $5 \mu\text{M}$ sont déposés sur la goutte de solution d'EDC-NHS restant sur l'électrode qui est séchée à 4°C . Pour les contrôles sans liaison covalente, l'étape d'incubation de l'électrode dans la solution d'EDC-NHS est omise.

II-2-e-iii- Bilirubine oxydase

Sauf spécification différente, les électrodes de PG sont modifiées par trois dépôts consécutifs de $5 \mu\text{L}$ d'une suspension de nanofibres à 4 mg.mL^{-1} dans un mélange $\text{H}_2\text{O-DMF}$ 50-50 suivis d'un séchage à 60°C . Enfin $10 \mu\text{L}$ (resp. $20 \mu\text{L}$) de la solution de *Bp* BOD ou de *Bs* BOD (resp. de *Mv* BOD) à $10 \mu\text{M}$ (resp. à $20 \mu\text{M}$) sont déposés sur l'électrode modifiée qui est conservée à 4°C pendant 15 h (resp. 2 h).

II-2-e-iv- Electrodes de la biopile

La cathode et l'anode sont modifiées respectivement grâce aux CNF_O2 et aux CNF_H2. $5 \mu\text{L}$ de la suspension de CNFs sont déposés sur une électrode de PG et séchés à 60°C , cette opération est répétée trois fois. $5 \mu\text{L}$ de la solution d'*Aa* Hase 1 à $5 \mu\text{M}$, ou $5 \mu\text{L}$ de la solution de *Bp* BOD à $10 \mu\text{M}$, ou $10 \mu\text{L}$ de la solution de *Mv* BOD à $20 \mu\text{M}$ sont alors déposés sur les CNFs. L'électrode sèche ensuite à 4°C pendant respectivement 2 h , 15 h et 1 h . Sauf en cas de spécification différente, l'enzyme à la cathode est la *Bp* BOD.

III- Conditions opératoires des expériences électrochimiques

III-1- Hydrogénase

Sauf en cas de spécification différente, l'électrolyte utilisé est du tampon Hepes 50 mM pH 7,2 à 25°C (pH 6,8 à 60°C) désiré sans sel support. Les conditions opératoires sont les suivantes : $T = 60^\circ\text{C}$, $\omega = 0\text{rpm}$. Les mesures de voltammétrie sont réalisées après équilibration pendant 30 s à $-0,65\text{ V vs. Ag/AgCl}$. Le potentiel est balayé cycliquement de $-0,65\text{ V}$ à 0 V vs. Ag/AgCl à la vitesse de balayage $5\text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$. Les mesures de chronoampérométrie sont également réalisées après équilibration pendant 30 s à $-0,65\text{ V vs. Ag/AgCl}$.

III-2- BOD

Sauf en cas de spécification différente, l'électrolyte utilisé est du tampon phosphate-citrate au pH désiré sans sel support. Les conditions opératoires sont les suivantes : $T = 50^\circ\text{C}$, $\omega = 0\text{rpm}$ et O_2 bulle dans l'électrolyte. Les mesures de voltammétrie sont réalisées après équilibration pendant 30 s à $0,65\text{ V vs. Ag/AgCl}$. Le potentiel est balayé cycliquement de $0,65\text{ V}$ à 0 V vs. Ag/AgCl à la vitesse de balayage $5\text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$. Les mesures de chronoampérométrie sont également réalisées après équilibration pendant 30 s à $0,65\text{ V vs. Ag/AgCl}$.

IV- La Biopile $\text{H}_2\text{-O}_2$

Les deux demi cellules électrochimiques double parois en verre ont été réalisées par la Verrerie Phocéenne (Marseille). Les doubles parois permettent de thermo-réguler indépendamment les deux demi-cellules. Une zone de 4 cm de large qui ne contient pas de double paroi fait la jonction entre les deux demi-cellules, qui sont séparées par une membrane de Nafion® (Nafion®117 de DuPont-USA). Cette zone tampon permet de minimiser les transferts de chaleur entre les deux compartiments. La température dans la demi-cellule a été mesurée au niveau de la bioélectrode placée à moins de 4 cm de la membrane de séparatrice. La biopile est alimentée par 100% d' H_2 pour l'anode, et 100% d' O_2 pour la cathode, les flux de gaz étant en permanence injectés directement dans l'électrolyte. Les mesures de potentiel et de courant sont effectuées à l'aide de courbes de polarisation, après stabilisation du système. La vitesse de balayage est $3\text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

D- Bioinformatique

I- Modélisation de l'hydrogénase

Le modèle de la structure de l'*Aa* Hase 1 a été construit par homologie comparative à partir de la structure de l'hydrogénase de *D. fructosovorans* (pdb ID : 1 FRF) avec le logiciel MODELLER version 9.1. La simulation a été réalisée avec GROMACS 4.5.3, et le moment dipolaire a été calculé grâce au plugin Dipole Watcher VMD. Le modèle de l'hélice a été construit par homologie à partir de la structure du cutochrome d'*E. coli* (pdb ID : 4 GD3). Les différentes conformations de l'hélice ont été générées grâce au module de sculpture de pymol.

II- Modèle de la BOD

Le modèle de structure de la *Bp* BOD est construit à partir de sa séquence protéique (saisie Pubmed AFL56752.1), par homologie avec la structure de la *Bs* BOD (pdb ID : 1 GSK chaine A), grâce au mode de modélisation automatisé de Swiss-Model (swissmodel.expasy.org). Les potentiels électrostatiques de surface sont calculés avec le logiciel PyMol, et le calcul du moment dipolaire est effectué grâce au Protein Moments Dipole Server (dipole.weizmann.ac.il).

E- Cas particuliers

I-L'Hydrogénase

I-1- Optimisation de la bioanode

La comparaison des différents protocoles est réalisée avec les CNFs_{H₂} en suspension dans un mélange H₂O-DMF 50-50 (protocole 1) ou uniquement dans l'eau (protocole 2) à une concentration de 4 mg.mL⁻¹. Les électrodes en graphite pyrolytique sont polies sur papier émeri P800 et P1200. Pour le protocole 1, elles sont modifiées par un nombre croissant de dépôts consécutifs de 5 µL de la suspension de CNFs suivis d'un séchage à 60°C. Ensuite, l'électrode est incubée dans 15 µL d'*Aa* Hase 1 à 2 µM à 4°C pendant une heure. Pour le protocole 2, l'*Aa* Hase 1 et la suspension de CNFs sont mélangées de telle sorte que la concentration finale de CNFs 2 mg.mL⁻¹, la concentration finale d'hydrogénase varie. Les électrodes sont modifiées par un ou plusieurs dépôts de 5 µL du mélange. Le séchage a lieu à 4°C.

I-2- Comparaison des types de fibres

Des suspensions des 3 types de CNFs à $4\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ dans un mélange H_2O -DMF 50-50 sont réalisées. Après polissage sur papier émeri P800 et P1200, les électrodes sont modifiées par deux dépôts consécutifs de $5\mu\text{L}$ d'une suspension de nanofibres suivis d'un séchage à 60°C . L'électrode modifiée est incubée dans $10\mu\text{L}$ de solution d'hydrogénase à $1\mu\text{M}$ pendant une heure.

II- La Bilirubine oxydase

II-1- Optimisation de la biocathode

La comparaison des différents protocoles est réalisée avec les CNFs_{H₂} en suspension dans un mélange H_2O -DMF 50-50 (protocoles 1 et 3) ou uniquement dans l'eau (protocole 2) à une concentration de $4\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Les électrodes en graphite pyrolytique sont polies sur papier émeri P800 et P1200. Pour les protocoles 1 et 3, elles sont modifiées par trois dépôts consécutifs de $5\mu\text{L}$ de la suspension de CNFs suivis d'un séchage à 60°C . Ensuite, $5\mu\text{L}$ de BOD à $3\mu\text{M}$ sont déposés sur l'électrode modifiée (protocole 1), ou cette dernière est incubée dans $15\mu\text{L}$ de BOD à $3\mu\text{M}$ (protocole 3). Pour le protocole 2, la BOD et la suspension de CNFs sont mélangées de telle sorte que la concentration finale de BOD soit $1,5\mu\text{M}$ et la concentration finale de CNFs $2\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Les électrodes sont modifiées par un ou plusieurs dépôts de $5\mu\text{L}$ du mélange. Les expériences sont reproduites deux fois, l'étape de séchage ou d'incubation de l'enzyme étant réalisée à $T=4$ et $T=25^\circ\text{C}$. Les mesures électrochimiques sont réalisées dans du tampon Hepes pH 7,2 comme électrolyte à $T=40^\circ\text{C}$.

II-2- Comparaison des types de fibres

Des suspensions des 3 types de CNFs à $4\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ dans un mélange H_2O -DMF 50-50 sont réalisées. Après polissage sur papier émeri P800 et P1200, les électrodes sont modifiées par trois dépôts consécutifs de $5\mu\text{L}$ d'une suspension de nanofibres suivis d'un séchage à 60°C . $5\mu\text{L}$ de BOD à $5\mu\text{M}$ sont déposés sur l'électrode modifiée, le séchage a lieu à 4°C pendant 2 heures.

II-3- Influence du NaCl sur les BODs

Les mesures de voltammétrie cyclique en présence de NaCl sont réalisées après un premier cycle sans NaCl suivi de l'ajout de NaCl dans l'électrolyte ($C_{\text{NaCl,électrolyte}}=200\text{mM}$, sauf spécification contraire).

La mesure de chronoampérométrie décrite en B II 2 est réalisée de la façon suivante. Un potentiel $E=0,6\text{V}$ vs. Ag/AgCl est appliqué pendant 30s, puis un saut à $E=0,3\text{V}$ (*Bp*) ou $E=0,35\text{V}$ (*Mv*)

est effectué. A $t=30s$ (*Bp*) ou $60s$ (*Mv*), le NaCl est ajouté dans l'électrolyte de telle sorte que $C_{\text{NaCl,électrolyte}}=20\text{mM}$. L'homogénéisation rapide de la concentration en NaCl est assurée grâce au bullage. La mesure est réalisée avec la même électrode pour tous les pH : après mesure à pH N, l'électrode est rincée, l'électrolyte changé, et l'enzyme réactivée par volta jusqu'à disparition de la forme « alternative resting » puis la mesure à pH N+1 est effectuée. Les valeurs données sont les moyennes sur deux mesures.

Les mesures de chronoampérométrie à différents potentiels décrites en B II 3 sont réalisées de la façon suivante. Après un premier cycle de volta, du NaCl est ajouté tel que $C_{\text{NaCl,électrolyte}}=200\text{mM}$. Un second cycle de volta est réalisé pour s'assurer de la formation de la forme alternative. Un potentiel réducteur est alors appliqué à l'électrode, tout d'abord 30 min en présence de NaCl ; puis 30 min dans un électrolyte sans NaCl après rinçage de l'électrode. Les valeurs rassemblées sont les moyennes sur trois expériences.

Bibliographie

- [1] O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall, PROTEIN MEASUREMENT WITH THE FOLIN PHENOL REAGENT, *Journal of Biological Chemistry*, 193 (1951) 265-275.
- [2] F. Durand, C.H. Kjaergaard, E. Suraniti, S. Gounel, R.G. Hadt, E.I. Solomon, N. Mano, Bilirubin oxidase from *Bacillus pumilus*: A promising enzyme for the elaboration of efficient cathodes in biofuel cells, *Biosens. Bioelectron.*, 35 (2012) 140-146.
- [3] I. Bento, L.O. Martins, G.G. Lopes, M.A. Carrondo, P.F. Lindley, Dioxygen reduction by multi-copper oxidases; a structural perspective, *Dalton Trans.*, (2005) 3507-3513.
- [4] J.D. Watkins, R. Lawrence, J.E. Taylor, S.D. Bull, G.W. Nelson, J.S. Foord, D. Wolverson, L. Rassaei, N.D.M. Evans, S.A. Gascon, F. Marken, Carbon nanoparticle surface functionalisation: converting negatively charged sulfonate to positively charged sulfonamide, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 12 (2010) 4872-4878.

Annexes

PUBLICATIONS

1. Electrochemistry communications, 23 (2012) 25-28
A. Ciaccafava, **A. de Poulpiquet**, V. Techer, M.T. Giudici-Orticoni, S. Tingry, C. Innocent, E. Lojou
An outstanding bioanode for an innovative powerful and mediatorless H₂/O₂ biofuel cell
2. Electrochimica Acta, 82 (2012) 115-125
A. Ciaccafava, **A. de Poulpiquet**, P. Infossi, S. Robert, R. Gadiou, M.T. Giudici-Orticoni, S. Lecomte, E. Lojou
A friendly detergent for H₂ oxidation by Aquifex aeolicus membrane-bound hydrogenase immobilized on graphite and SAM-modified gold electrodes
3. Electroanalysis, 25(2013) 685-695
A. de Poulpiquet, A. Ciaccafava, K. Szot, B. Pillain, P. Infossi, M. Guiral, M. Opallo, M.T. Giudici-Orticoni, E. Lojou
Exploring properties of an hyperthermophilic membrane-bound hydrogenase at carbon nanotube modified electrodes for a powerful H₂/O₂ biofuel cell
4. Electrochim. Acta, 111 (2013) 434-440
K. Szot, **A. de Poulpiquet**, A. Ciaccafava, H. Marques, M. Jonsson-Niedziolka, J. Niedziolka-Jonsson, F. Marken, E. Lojou, M. Opallo
Carbon nanoparticulate films as effective scaffolds for mediatorless bioelectrocatalytic hydrogen oxidation
5. Phys. Chem. Chem. Phys., 16 (2014) 1366-1378
A de Poulpiquet, H. Marques-Knopf, V. Wernert, R. Gadiou, M.T. Giudici-Orticoni, E. Lojou
Carbon Nanofiber Mesoporous Films: Efficient Platforms for Bio-Hydrogen Oxidation in Biofuel Cells
6. Electrochimica Acta, 126 (2014) 104-114
A. de Poulpiquet, A. Ciaccafava, E. Lojou
New trends in enzyme immobilization at nanostructured interfaces for efficient electrocatalysis in biofuel cells.
7. Anal. Bioanal. Chem., 406 (2014) 1011-1027.
M. Roger, **A. de Poulpiquet**, A. Ciaccafava, M. Ilbert, M. Guiral, M.T. Giudici-Orticoni, E. Lojou
Reconstitution of supramolecular organization involved in energy metabolisms at electrochemical interfaces for biosensing and bioenergy production.
8. Electrochem. Com., 42 (2014) 72-74
A. de Poulpiquet, A. Ciaccafava, R. Gadiou, S. Gounel, M.T. Giudici-Orticoni, N. Mano, E. Lojou
Design of a H₂/O₂ biofuel cell based on thermostable enzymes
9. PCCP, 16 (2014) 11318-11322

Francesco Oteri, Alexandre Ciaccafava, **Anne de Poulpiquet**, Elisabeth Lojou, Marc Baaden, Sophie Sacquin-Mora*

Fluctuations in the dipole moment of membrane-bound hydrogenase from Aquifex aeolicus account for its adaptability to charged electrodes

10. ChemElectroChem, (2014) sous presse
Revue invitée, VIP
A. de Poulpiquet, D. Ranava, K. Monsalve, M.T. Giudici-Ortoni, E. Lojou
Biohydrogen for a new generation of H₂/O₂ biofuel cells: a sustainable energetic perspective
11. En preparation
A. de Poulpiquet, P. Infossi, M.T. Giudici-Ortoni, R. Gadiou, N. Mano, E. Lojou
Revisiting chloride inhibition of bilirubin oxidase from Bacillus pumilus and Myrothecium verrucaria

CHAPITRE DE LIVRE

1. Recent Progress in Carbon Nanotube Research / Book 1, ISBN 980-953-307-536-0, (2012), "Carbon nanotube-enzyme biohybrids in a green hydrogen economy",
Anne de Poulpiquet, Alexandre Ciaccafava, Saïda Benomar, Marie-Thérèse Giudici-Ortoni and Elisabeth Lojou

COMMUNICATIONS ORALES

CONGRES INTERNATIONAUX

1. 8th Sino-French Workshop on « Surface Electrochemistry of Molecules of Biological Interest and Biosensor Applications », joined with the 3^{ème} Congrès du Groupe Français de Bioélectrochimie, Lacanau, 24-28 September, (2012)
A. de Poulpiquet, K. Szot, P. Infossi, MT. Giudici-Ortoni, M. Opallo, E. Lojou
Immobilization of Aquifex aeolicus hydrogenase on carbon nanotubes and nanoparticles for H₂ oxydation in biofuel cells
2. XXII International Symposium of Bioelectrochemistry and Bioenergetics, Böchum, Germany, 17th-21st March, (2013)
A. de Poulpiquet, H. Marques, R. Gadiou, MT. Giudici-Ortoni, E. Lojou
Immobilisation of Aquifex aeolicus Membrane-bound Hydrogenase on carbon nanofibers for H₂/O₂ biofuel cells

CONGRES NATIONAUX

1. 1^{ères} Journées Méditerranéennes des Jeunes Chercheurs, Montpellier, 17-18 Octobre (2013)

A. de Poulpiquet, E. Lojou
Nanofibers as efficient platforms for hydrogen oxidation

COMMUNICATIONS AFFICHEES

CONGRES INTERNATIONAUX

1. Elecnano'7, Paris, France, 19-21st May (2014)
A. de Poulpiquet, P. Infossi, M.T. Giudici-Ortoni, R. Gadiou, N. Mano, E. Lojou
Immobilisation of *Aa* membrane-bound hydrogenase on carbon nanofibers for H₂/O₂ biofuel cells.

CONGRES NATIONAUX

1. BCP8, 8^{ème} Journée Scientifique Interface Biologie-Chimie-Physique, Marseille, 5 Décembre (2011)
A. De Poulpiquet, A. Ciaccafava, P. Infossi, M.T. Giudici-Ortoni, E. Lojou
Immobilization of Aquifex aeolicus hydrogenase on carbone nanoparticles for H₂ oxidation

Carbon Nanotube-Enzyme Biohybrids in a Green Hydrogen Economy

Anne De Poulpiquet, Alexandre Ciaccafava,
Saïda Benomar, Marie-Thérèse Giudici-Orticoni and
Elisabeth Lojou

Additional information is available at the end of the chapter

<http://dx.doi.org/10.5772/51782>

1. Introduction

Alternative energy pathways to replace depleting oil reserves and to limit the effects of global warming by reducing the atmospheric emissions of carbon dioxide are nowadays required. Dihydrogen appears as an attractive candidate because it represents the highest energy output relative to the molecular weight (120 MJ kg⁻¹ against 50 MJ kg⁻¹ for natural gas), and because its combustion delivers only water and heat. Whereas the main renewable sources of energy available in nature (solar, wind, geothermal...) need to be transformed, dihydrogen is able to transport and store energy. Dihydrogen can be produced from renewable energies, indirectly from photosynthesis *via* biomass transformation, or directly by bacteria. It can be converted into electricity using fuel cell technology. From all these properties and because it does not compete with food and water resources, dihydrogen has been defined as third generation biofuel. It thus emerges as a new fully friendly environmental energy vector. The use of dihydrogen as an energy carrier is not a new idea. Let us simply remember that Jules Verne, a famous French visionary novelist, wrote early in 1874: "I believe that O₂ and H₂ will be in the future our energy and heat sources" [1]. His prediction simply relied on the discovery a few years before of the fuel cell concept by C. Schönbein, then W. Groove, who demonstrated that when stopping water electrolysis, a current flow occurred in the reverse way [2]. However in order to implement the dihydrogen economy and replace fossil fuels, there are significant technical challenges that need to be overcome in each of the following domains:

1. dihydrogen production and generation,
2. dihydrogen storage and transportation,
3. dihydrogen conversion to electrical energy.

As opposed to widespread opinions, natural dihydrogen sources exist alone on the earth's surface. Local and continuous emanations of dihydrogen can be observed in cratonic zones, ophiolitic rocks or oceanic ridges [3]. Dihydrogen is effectively produced in the upper mantle of the earth through natural oxidation of iron (II)-rich minerals, like ferromagnesians, by water of the hydrosphere. The ferrous iron is oxidized in ferric iron and water is concurrently reduced in dihydrogen, as given by following equation: $2\text{Fe}^{2+}(\text{mineral}) + 2\text{H}^+(\text{water}) \rightarrow 2\text{Fe}^{3+}(\text{mineral}) + \text{H}_2$. The same reaction can occur with other ions like Mn^{2+} . Exploitation of these sources remains however difficult so far as dihydrogen does not accumulate on the earth subsurface, especially for two reasons. First because as a powerful energy source dihydrogen is quickly consumed (biologically or abiotically), and second because as the lightest and most mobile gas it is not much retained by Earth's attraction and escapes in the atmosphere.

Combined with water and hydrocarbons dihydrogen is nevertheless the most abundant element on earth. Green means to ecologically convert H containers into dihydrogen still remain however challenging. The energetic volume density of dihydrogen is low (10.8 MJ m^{-3} against 40 MJ m^{-3} for natural gas) so that storage and transportation appear as bottlenecks for large scale development in transportation for example. Conversion of dihydrogen to electricity in fuel cells presents high electrical efficiency (more than 50% against less than 30% for gas engines), but requires the use of catalysts both for H_2 oxidation and O_2 reduction. These are mainly based on platinum catalysts, which are highly expensive, weakly available on earth, and non biodegradable. Extensive researches thus aim to decrease the amount of platinum catalysts in fuel cells. Following the discovery of carbon nanotubes (CNTs) [4, 5], their large scale availability opened a new avenue in these three domains. Due to their intrinsic properties, such as high stability, high electrical and thermal conductivities [6] and high developed surface areas, carbon nanotubes constitute attractive materials, able to enhance the credibility of an hydrogen economy.

Besides, platinum catalysts are inhibited by very low amount of CO and S (0.1% of CO is sufficient to decrease one hundred fold the catalytic activity of Pt in ten minutes!), thus requiring strong steps of H_2 purification [7]. They are not specific to either O_2 or H_2 catalysis, thus requiring the use of a membrane to separate the anodic and cathodic compartments. Nafion® perfluorinated membrane is currently the only really performing polymer [8], increasing its cost. Replacement of platinum-based catalysts is thus highly needed. In that way, a new concept appeared less than five years ago, when looking at the pathways microorganisms use for the production of ATP, their own energetic source [9, 10]. As an example, the hyperthermophilic, microaerophilic bacterium *Aquifex aeolicus*, couples H_2 oxidation to O_2 reduction *via* a membrane quinone pool (Figure 1). The redox coupling generates a proton gradient through the cell membrane for ATP synthesis. Clearly, this pathway can be considered as an "in vivo biofuel cell". The question rises if we could take benefit of bacterial energetic pathways for our own energetic needs. The idea thus emerged that microorgan-

isms or enzymes could be used instead of chemical catalysts for the development of efficient electricity producing devices. These innovative batteries called biofuel cells rely on enzymes highly specific for various fuels and oxidants [11]. A mandatory condition is that these enzymes have to be immobilized onto electrodes. One of the most common biofuel cell uses glucose oxidase and laccase, two enzymes specific for glucose oxidation and oxygen reduction, respectively. A few years ago, a new concept of biofuel cells appeared based on enzymes specific of dihydrogen oxidation. This biohydrogen economy relies on the opportunity to use low-cost materials for efficient conversion of solar energy to dihydrogen and of dihydrogen to electricity. Many microorganisms biosynthesize hydrogenase, the metalloenzyme that catalyzes the dihydrogen conversion. At least two modes of application of dihydrogen-metabolizing protein catalysts are nowadays considered within dihydrogen as a future energy carrier. Hydrogenases may be used as catalysts in dihydrogen production by coupling oxygenic photosynthesis to biological dihydrogen production [12]. Hydrogenases can also be used directly as anode catalysts in biofuel cells instead of chemical catalysts [13]. The improved knowledge of hydrogenase structure and of catalytic mechanisms allows nowadays to design the development of biofuel cells functioning as Proton Exchange Membrane (PEM) fuel cells.

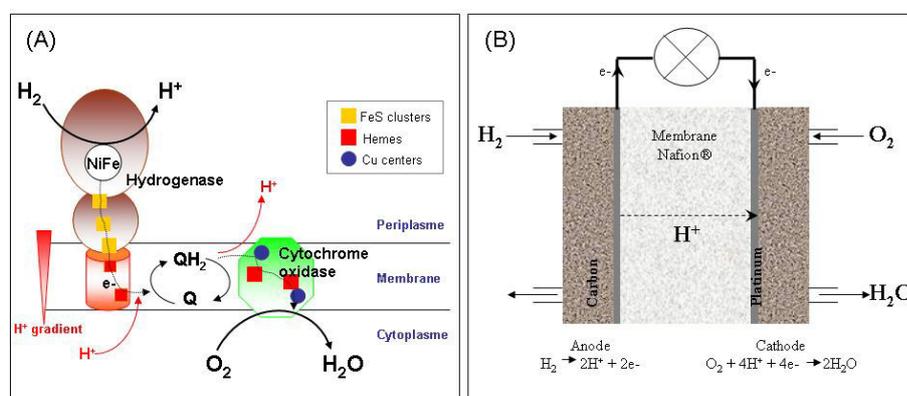


Figure 1. A) Energetic metabolism of the bacterium *Aquifex aeolicus*: H₂ oxidation in the periplasm is coupled to O₂ reduction in the cytoplasm via a membrane quinone pool to generate a trans-membrane proton gradient for ATP synthesis; (B) General view of a chemical PEM fuel cell.

For all these innovative concepts, one of the key points is the increase in power density, thus in the current density furnished by a redox couple displaying a large as possible potential difference. Apart from the improvement in enzyme stability, the increase in the current densities supposes an optimization of both the interfacial electron transfer rate and the amount of connected enzymes at the electrode. Carbon nanotubes which develop large surface areas and can be functionalized constitute an attractive platform for such enzyme immobilization. CNTs are described as graphene sheets rolled into tubes. They exist under various structural configurations (single-walled (SWCNTs), multi-walled (MWCNTs)) differing in electrical proper-

ties, thus tuning the platform properties for enzyme immobilization. The end of the tubes is capped by a fullerene-type hemisphere that yields selective functionalization of the CNTs [14].

With the objective of dihydrogen as a future green energy vector, this review focuses on the last developments in the fuel -and more especially biofuel- cell field thanks to the advantageous use of carbon nanotubes. In a first part, carbon nanotubes for H₂ storage enhancement are discussed. Then fuel cells in which carbon nanotubes help to decrease the amount of high cost noble metal catalysts are described. Green H₂ economy is then emphasized considering the key role of hydrogenase, the enzyme responsible for dihydrogen conversion. This requires the functional immobilization of the biocatalysts onto electrodes. The use of carbon nanotubes in this immobilization step is underlined, including the modes of carbon nanotube functionalization and enzyme or microbes grafting. Then the advantages of developing biofuel cells in which chemical catalysts are replaced by enzymes or microbes are described. A short review of the sugar/O₂ biofuel cells, the most widely investigated biofuel cell, is given with a particular attention on the devices based on carbon nanotube-modified bioelectrodes. The last developments based on carbon nanotube networks for hydrogenase immobilization, or mimicking synthetic complex immobilization, in view of efficient dihydrogen catalytic oxidation are finally described in order to allow the design of a future H₂/O₂ biofuel cell.

2. Carbon nanotubes: an attractive carbon material

The discovery of carbon nanotubes (CNTs) has induced breakthroughs in many scientific domains, including H₂ economy, biosensors, bioelectrochemistry... This is due to their remarkable properties, such as good electronic, mechanical and thermal properties. Their nanometric size compares with that of proteins and enzymes, offering the possibility of electrical connection. Their large developed surface area allows the development of devices in smaller volumes. SWCNTs are sp² hybridized carbon in a hexagonal honeycomb structure that is rolled into hollow tube morphology [15]. MWCNTs are multiple concentric tubes encircling each other [5]. Depending on the chirality, CNTs can be metallic or semiconducting. The distinction between metallic and semiconducting is very important for application, but the physical separation of allotropes is one of the most difficult challenges to overcome. In MWCNTs, a single metallic layer results in the entire nanotubes metallic behavior. Most often mixtures of these two forms are present in CNTs preparation. More information on the physical and electronic structures can be found in many published reviews [16]. CNTs are produced by various methods such as arc discharge, laser ablation, and chemical vapor deposition (CVD). Commercially CNTs are generally produced by CVD during the pyrolysis of hydrocarbon gases at high temperature. The control of synthesis parameters (reagent gas, T °, metal catalysts) allows for the control of CNT properties. Metal impurities may remain in the CNTs sample, thus requiring purification steps. CNTs may be treated to functionalize the surface.

3. Carbon nanotubes for safe and efficient H₂ storage

The use of H₂ in fuel cells to generate electricity has been proved early in the middle of the nineteenth century. Surprisingly this discovery by C. Schönbein in 1839 of current generation by use of H₂ and O₂ in sulphuric acid was applied by NASA only late in 1960. Despite intensive studies over the last two decades, fuel cells still suffer from high cost and low durability. The first difficulty responsible for this slow large scale development lies on dihydrogen storage and transportation, both regarded as bottlenecks considering dihydrogen specific volumic density as a gas. For convenience the gas must be intensely pressurized to several hundred atmospheres and stored in a pressure vessel. The ways to store dihydrogen with minimum hazard are under liquid state under cryogenic temperatures (at a temperature of -253 °C), or more efficiently in a solid state. Storage of dihydrogen in hydride form uses an alloy that can absorb and hold large amounts of dihydrogen by bonding with hydrogen and forming hydrides. A dihydrogen storage alloy is capable of absorbing and releasing dihydrogen without compromising its own structure, according to the reaction: $M + H_2 \leftrightarrow MH_2$, where M represents the metal and H, hydrogen. Qualities that make these alloys useful include their ability to absorb and release large amounts of dihydrogen gas many times without deteriorating, and their selectivity toward dihydrogen only. In addition, their absorption and release rates can be controlled by adjusting temperature or pressure. The dihydrogen storage alloys in common use occurs in four different forms: AB₅ (e.g., LaNi₅), AB (e.g., FeTi), A₂B (e.g., Mg₂Ni) and AB₂ (e.g., ZrV₂). Metal hydrides, such as MgH₂, Mg₂NiH₄ or LiBH₄, constitute secure reserves of dihydrogen [17-19]. Dihydrogen is released from MH₂ upon increase in temperature and/or decrease in pressure.

Material	H ₂ gas, 200 bar	H ₂ liquid, -253 C	MgH ₂	Mg ₂ NiH ₄	FeTiH ₂	LaNi ₅ H ₆
H-atom per cm ³ (x10 ²²)	0.99	4.2	6.5	5.9	6.0	5.5

Table 1. H density as a function of storage method.

Much progress has been made during the last years in that domain, including the highlight of the advantages offered by using CNTs. An efficient approach appears to be the formulation of new carbon/transition metal catalyst composites of specific composition and molecular structure, which can greatly stimulate and improve the chemical reactions involving dihydrogen relocation in alkali-metal aluminium materials. Absorption kinetics and dihydrogen storage capacity were shown to be enhanced by mixing MH₂ with SWCNTs as a result of an increase in interfacial area, decrease in MH₂ particle agglomeration and nano-platform for efficient H₂ diffusion [20, 21]. The hydriding and dehydriding kinetics of SWCNT/catalyzed sodium aluminium composite were found to be much better than those of the material ground without carbon additives. Temperature of H₂ desorption was lowered [22]. The presence of carbon creates new dihydrogen transition sites and the high dihydrogen diffusivity of the nanotubes facilitates hydrogen atom transition. Faster ther-

mal energy transfer through the nanotubes may also help reduce hydriding and dehydriding times.

Dihydrogen can be stored through physisorption on CNTs, based on Van der Waals interaction. Based on the surface area of a single graphene sheet, the maximum value for the storage of dihydrogen capacity is around 3 wt%. Dihydrogen can also be stored through chemisorption in CNTs matrix. If the π -bonding between carbon atoms were fully utilized, every carbon atom could be a site for chemisorption of one hydrogen atom. Dillon et al. first reported in 1997 dihydrogen storage in SWCNT networks [23]. Both SWCNTs and MWCNTs store dihydrogen in microscopic pores on the tubes [24, 25]. Similar to metal hydrides in their mechanism for storing and releasing dihydrogen, the carbon nanotubes hold the potential to store a significant volume of dihydrogen. The storage capacity is dependent on many parameters of the CNTs, including their structure, structure defects, pretreatment, purification, geometry (surface area, tube diameter, length), arrangement of tubes in bundles, storage pressure, temperature, ... Dihydrogen uptake varies linearly with tube diameter, because the uptake is proportional to the surface area, *i.e.* the number of carbon atoms. The adsorption sites exist inside and outside the tube, between tubes in bundles, between the shells in MWCNTs. For dihydrogen storage into the tube dihydrogen must pass through the CNT wall or the tube must be opened. Hydrogen forms stable C-H bonds on SWCNT surface at room temperature that can dissociate above 200°C. According to SWCNT diameter 100% hydrogenation can be obtained, thus more than 7 wt % dihydrogen storage capacity, which is above the target fixed by the US Department of Energy's Office of Energy Efficiency and Renewable Energy [26].

4. Carbon nanotubes for a decrease in the amount of noble metal catalysts in fuel cells

Among the different types of fuel cells, PEM fuel cell operates at low temperatures around 100°C. For small portable application requiring less than 10 kW, they are more suitable than higher powering solid oxide fuel cells (functioning at 700°C) due to the possible use of usual materials for electronic connectors (mainly based on carbon) and membrane. However the necessary use of platinum-based catalysts on electronic connectors to accelerate the rate of dihydrogen oxidation and oxygen reduction is a real brake towards the fuel cell development. Platinum is scarce enough on earth to be a limiting factor in case of large scale development of fuel cells. Consequently platinum currently accounts for 25% in the total cost of a fuel cell. Over the past five years, the price of platinum has ranged from just below \$800 to more than \$2,200 an ounce. Carbon black particles offer a high surface area support, able to decrease the amount of platinum particles. But they suffer from mass transfer limitations and strong carbon corrosion.

Among the low-cost alternatives to platinum, carbon appears to be the most promising. Due to their nano-structure and unique chemical and physical properties, CNTs have appeared

as ideal supporting materials to improve both catalytic activity and electrode stability. The enhancement of fuel cell performances by using CNT/Pt or Pt-alloy catalysts may arise from:

- i. higher dispersion of Pt nanoparticles,
- ii. increased electron transfer rates,
- iii. porous structure of CNT layers.

Various CNT-Pt composites were used to reduce the platinum amount while preserving high catalytic activity in PEM fuel cells. Platinum nanodots sputter-deposited on a CNT-grown carbon paper [27], or deposited on functionalized MWCNTs [28] exhibited great improvement in cell performance compared to platinum on carbon black. This was primarily attributed to high porosity and high surface area developed by the CNT layer. Compared to a commercial Pt/carbon black catalyst, Pt/SWCNT films cast on a rotating disk electrode was shown to exhibit a lower onset potential and a higher electron-transfer rate constant for oxygen reduction. Improved stability of the SWCNT support was also confirmed from the minimal change in the oxygen reduction current during repeated cycling over a period of 36 h [29]. Platinum particles deposited on MWCNT encapsulated in micellar surfactant were also explored as efficient catalysts for fuel cells [30, 31]. An in situ synthetic method was reported for preparing and decorating metal nanoparticles at sidewalls of sodium dodecyl sulfate micelle functionalized SWCNTs/MWCNTs. Accelerated durability evaluation was carried out by conducting 1500 potential cycles between 0.1 and 1.2 V at 80°C. These nanocomposites were demonstrated to yield a high fuel cell performance with enhanced durability. The membrane electrode assembly with Pt/MWCNTs showed superior performance stability with a power density degradation of only 30% compared to commercial Pt/C (70%) after potential cycles. Identically electrocatalytically active platinum nanoparticles on CNTs with enhanced nucleation and stability have been demonstrated through introduction of electron-conducting polyaniline (PANI) [32]. A bridge between the Pt nanoparticles and MWCNTs walls was demonstrated with the presence of platinum nitride bonding and π - π bonding. The synthesized PANI was found to wrap around the CNT as a result of π - π bonding, and highly dispersed Pt nanoparticles were loaded onto the CNT with narrowly distributed particle sizes ranging from 2.0 to 4.0 nm. The Pt-PANI/CNT catalysts were electroactive and exhibited excellent electrochemical stability, therefore constitute promising potential applications in proton exchange membrane fuel cells. Strong evidence thus emerges that CNTs/Pt composites are efficient as catalysts for fuel cells. Although platinum content has been dramatically decreased, industrials consider that further optimization is mandatory for a large scale fuel cell production. In addition Nafion® membrane between the cathodic and anodic compartment delays the large scale application of fuel cells, due to cost and problem of mass transfer. Breakthrough research towards these two bottlenecks could surely enforce a hydrogen economy.

5. Towards a green H₂ economy: carbon nanotubes for enzyme and microbe immobilization

Replacement of chemical catalysts is thus nowadays highly needed in view of the development of a green energy economy. Microorganisms contain many biocatalysts, namely enzymes, which are highly efficient and specific towards various substrate conversions. Given they are produced in large enough quantities, these enzymes could be used as catalysts in biotechnological devices. A mandatory condition to develop heterogeneous catalysis is to succeed in the functional immobilization and in the stabilization of the enzymes on solid supports. The redox active site of enzymes is indeed buried inside the protein moiety so that the enzymatic property can be maintained under environmental stresses. Specific channels are often involved to allow the substrate to reach the active site. Complex but highly organized electron transfer chains occur for energetic metabolism. Electron transfer between two physiological partners associated with transformation of the substrate involves specific recognition site. The game for a bioelectrochemist that aims to get the highest electron transfer rate for heterogeneous catalysis is to reproduce at the electrode interface the physiological electron transfer recognition process. Given the usual size of an enzyme (5–10 nm), electron transfer cannot occur *via* electron tunneling from the active site to the surface of the enzyme. In some enzymes, electron relays, one being located at the protein surface, act as a conductive line for electron shuttling. If the electrode interface is built so that it fits the surface electron relay environment, one can expect to favor a direct electrical connection of the enzyme onto the electrode. In case of direct electron transfer failure, an artificial redox mediator that acts as a fast redox system and shuttles electrons between the enzyme and the electrode can be used (Figure 2) [13, 33].

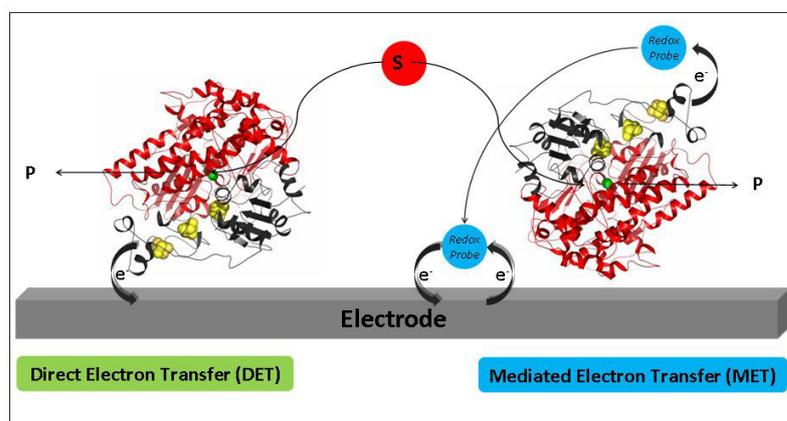
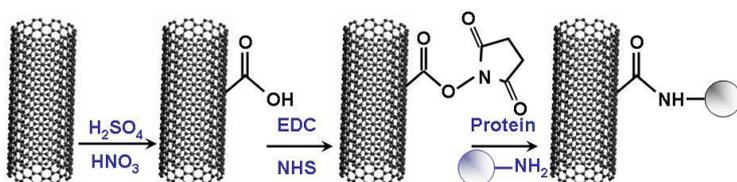


Figure 2. Interfacial electron transfer between an enzyme and an electrode can be achieved by direct (left) or mediated (right) electron transfer process.

Direct electron transfer process is preferred to mediated one, because it is not limited by the affinity between the enzyme and the redox mediator, and because it avoids the co-immobilization of enzyme and mediator. It is furthermore expected to yield the highest power density because enzymes, as biocatalysts, transform their substrate into products with very low overvoltages. However it requires the knowledge of the protein structure and the construction of a tuned electrochemical interface that fits the electron transfer site.

There are many strategies for efficient enzyme immobilization onto electrochemical interfaces, including simple physical adsorption, covalent attachment, cross-linking or entrapment in polymers. The objectives are to optimize the immobilization procedure so that the efficiency of the enzyme and its stability are preserved. Moreover, due to the size of enzymes compared to chemical catalysts, large surface area interfaces bearing many anchorage sites are required to obtain high catalytic currents.

To reach these goals, 3D structures are preferred, and CNT-based electrodes are very popular, both SWCNTs and MWCNTs. CNTs can be directly grown onto electrode surface, or adsorbed on it, or imbedded in polymer coating. In most cases, higher activity was reported for enzymes physically adsorbed onto CNTs [34]. Hydrophobic interactions between the enzyme and the CNT walls and π - π interactions between side walls of CNTs and aromatic rings of the enzyme are thought to be the driving force for direct adsorption of enzymes on CNTs [35]. Electrostatic interaction between the defect sites of CNTs and protonated amino residues of the enzyme plays also a role in the adsorption process [35]. CNTs are quite easily functionalized, allowing covalent, thus stable specific attachment of enzymes. The oxidation in strong acidic solutions at high temperature was demonstrated to remove the end caps and shorten the lengths of the CNTs. The length of the CNTs was shown to be a function of the oxidation duration [36]. Acid treatment also adds oxide groups, primarily carboxylic acids, to the tube ends and defect sites [37]. The control of reactants and/or oxidation conditions may control the locations and density of the functional groups on the CNTs, which can be used to control the location and density of the attached enzymes [37]. Covalent immobilization is induced by carbodiimide reaction between the free amine groups on the enzyme surface and carboxylic groups generated by side wall oxidation of CNTs.



Further chemical reactions can be performed at the oxide groups generated on the oxidized CNTs to functionalize with groups such as amides, thiols, etc...From an electrochemical point of view, the side walls of CNTs were suggested to behave as basal plane of pyrolytic graphite, while their open ends resemble the edge planes [38, 39]. But recent work has demonstrated that the side wall may be responsible for electrochemical activity [40]. It has been

furthermore suggested that the uncovered surface of CNTs promotes the accessibility of the substrate to the enzyme [41]. It is also interesting to note that the open spaces between CNTs are accessible to large species such as entire bacteria [42], opening the way for the development of fuel cells using whole microorganisms instead of purified enzymes. The cost and complexity of CNT manufacturing seem to be still clogging issues in that field.

Abundant literature exists on the ways CNTs are architected for efficient enzyme immobilization, including those specific for development of enzymatic fuel cells. Enzymes and proteins as various as glucose oxidase and dehydrogenase, tyrosinase, laccase and bilirubin oxidase, peroxidase, haemoglobin and myoglobin, *i.e.* flavin, copper or heme containing active sites, have been studied. Whereas direct electron transfer between protein or enzyme and an electrochemical interface has been for long time supposed to be restricted to small proteins (<15kDa) possessing active sites exposed to the surface (it is the case for many cytochromes as example [43]), the use of CNT-modified electrodes has greatly enhanced the number and kinds of enzymes able to be directly connected to an electrode. Enzymes as large as one hundred kDa, with many cofactors are now considered for direct electron transfer. Consequently, recent works during the last years focus and report on direct communication between enzymes and electrode interface through CNT network. The induced porosity of the film depends on the type of CNTs used. But generally the nanometric size of the CNTs compared to the size of enzymes favors a direct electronic connection of the enzyme whatever its orientation [44]. The physical properties of CNTs, including high electrical conductivity, explain why CNT layers can be built up on electrodes most often yielding high rate direct electron transfer for enzymatic product transformation. Many researches report on the increase in electroactive surface area by use of CNT coatings that contribute to an increase in the direct electron transfer process [45-52]. CNTs are usually deposited on electrodes as thick films. Alternatively, layer-by-layer (LBL) process induces a quite stable protein film with nice electrocatalytic properties [53-55]. LBL is based on electrostatic interaction between oppositely charged monolayers in an alternating assembling. Although CNTs greatly amplify the current response, layer-by-layer architecture suffers from weak stability of the build-up and decrease in electron transfer for the upper layers. Besides vertically aligned CNTs were suggested to act as molecular wires that ensure the electrical communication between enzyme and electrode [56-58]. The carboxylic functions induced by acidic treatment of CNTs can be used for further chemical modifications. Amine- [59-61], thionin- [62, 63], diazonium salts [64, 65], pyrene [66, 67] (Figure 3) or other π - π stacking interactions [68] were used to functionalize CNTs. These modifications were demonstrated to be efficient platforms for enzyme immobilization.

Mixing CNTs with surfactant [69-71] was claimed to assist in the dispersion of CNTs while avoiding oxidative functionalization which may disrupt their π -network. Polymer modified CNTs [72, 73] and sol-gel-CNT nanocomposite films [74] were proved to behave as friendly platforms for enzyme encapsulation.

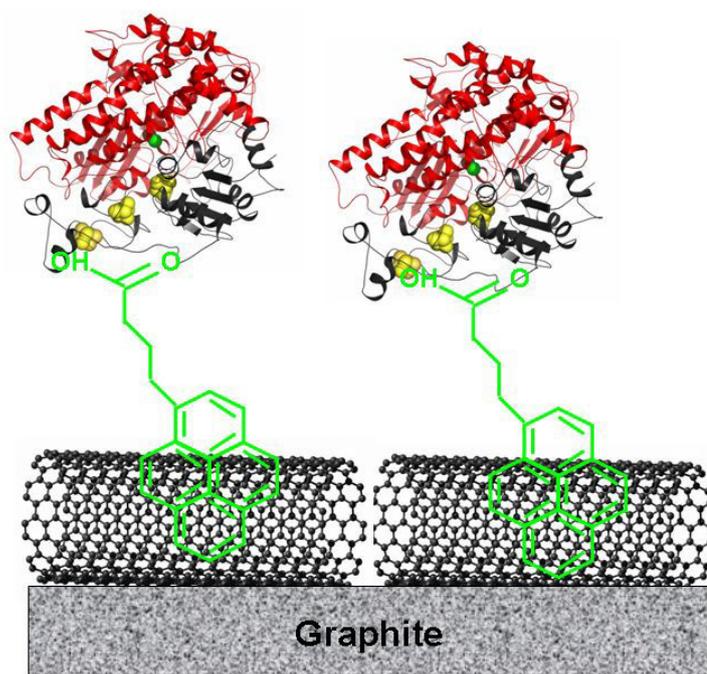


Figure 3. Schematic drawing of the build-up of enzyme on SWCNTs via π - π interactions.

Many enzymes however cannot be electrically connected to the electrode interface and require redox mediator to electrochemically follow substrate conversion. In that case, electrode kinetics is mainly dependant on mediator kinetics, so that the choice of the redox mediator mainly impedes the power density. Another issue is that the mediator can be co-immobilized with the enzyme at the electrode, while still being capable of efficient interaction with the enzyme. CNTs have also been used for building networks enabling co-immobilization of enzymes and redox mediators. In that way, one of the most popular redox entities is osmium polymer which forms hydrogels with enzymes allowing both charge transfer reaction between enzyme and mediators and diffusion of substrate and product [75]. Composite CNT/osmium films were used To immobilize bacteria [76], or enzymes [77]. By optimizing the CNT and polymer amounts, enhanced current responses were obtained linked to a promotion of the electron transfer within the composite. Various phenothiazine derivatives were also used to form nanohybrids with CNTs acting as efficient redox mediator platforms [78-80]. Phenothiazine derivatives strongly adsorb onto CNTs leading to great enhancement of redox dye loading onto the electrode, but also to improved electrochemical sensing devices. Another strategy involves the use of a redox polymer as redox mediator platform. Electropolymerization of the redox conducting polymer onto CNTs enhances the amount of redox units and the electrical conductivity of the coating [81]. An

interesting construction has also been obtained by immobilization of physiological cofactor onto CNT layers *via* π - π interactions, then immobilization of the enzyme [82]. The covalent coupling between the enzyme and its natural cofactor which was immobilized onto CNTs was proved to be efficient towards mediated substrate catalysis. This overview of multiple architectures involving enzymes and CNTs highlights the deep efforts engaged in the last years for efficient biocatalyst immobilization that open avenues towards biotechnological devices.

6. Carbon nanotubes for biological production of dihydrogen

Apart from replacement of noble metal catalysts in fuel cells, a new green technology for production of dihydrogen is required. It currently relies on steam reforming of hydrocarbons under high temperature and pressure conditions, which starts from fossil fuels, thus producing greenhouse gases. Dihydrogen production *via* water electrolysis appears as a renewable solution given that the energy input comes from a renewable source, ideally solar energy. Many bacteria gain energy by the oxidation of dihydrogen assisted by a number of complex mechanisms. Various species evolve H_2 under anaerobic conditions. This is also a human being process since bacteria in our digestive tract produce H_2 , though not detectable because immediately recycled by other bacteria. Photosynthetic organisms such as microalgae and cyanobacteria are very efficient in water splitting [83]. They possess photosensitizers for photon capture and charge separation, and enzymes for water oxidation to oxygen and water reduction to dihydrogen. This chemical activity relies on the expression of very efficient enzymes, called hydrogenases [84], which catalyze with high turn-over (one molecule of hydrogenase produces up to 9000 molecules of H_2 per second at neutral pH and 37°C) and low overvoltage the conversion of protons into dihydrogen and the oxidation of dihydrogen. The sequences of 450 hydrogenases are now available. Hydrogenases differ in size, structure, electrons donors. They also differ by their position in the cell (soluble in the periplasm, membrane-bound), and by their activity preferentially towards H_2 oxidation or protons reduction. Hydrogenase active site is composed of non noble metals such as iron and nickel, unlike platinum catalyst necessary for the chemical electrolysis of water. Three distinct classes can be split which differ from the type of metal content in the active site: [NiFe], [FeFe] and [Fe] hydrogenases. [NiFe] and [FeFe] hydrogenases possess dinuclear active centers which are connected through thiolate bridges. [NiFe] hydrogenase (Figure 4) is the most usual hydrogenase in microorganisms. It is composed of two subunits. The larger subunit harbors the [NiFe] active site. The small subunit contains FeS clusters. Electrons are transferred to the active site along these FeS clusters distant less than 10 Å that act as a conductive line. [FeFe] hydrogenases are monomeric. In addition to the active site they contain additional domains which accommodate FeS clusters.

In order to use these biocatalysts for green dihydrogen production, two main research domains are currently concerned: the understanding of the catalytic mechanisms of H_2 production, and the optimization of enzyme immobilization. Adsorption onto graphite electrodes [85, 86] was largely used to study the mechanisms by which hydrogenases produce H_2 .

Grafting of hydrogenase onto gold electrode modified by thiolated Self-Assembled-Monolayer [87] allowed efficient proton reduction into dihydrogen in aqueous buffer solutions. Hydrogenase is also considered as a promising biocatalyst for photobiological production of dihydrogen when coupled to a photocatalyst [88]. Hybrid complexes of hydrogenases with TiO₂ nanoparticles [89, 90] were studied for H₂ production. The optimized system was shown to produce H₂ at a turnover frequency of approximately 50 (mol H₂) s⁻¹ (mol total hydrogenase)⁻¹ at pH 7 and 25 °C, even under the typical solar irradiation of a northern European sky. Cd-based nanorods [91, 92] were recently studied. The CdS nanorod/hydrogenase complexes photocatalyzed reduction of protons to H₂ at a hydrogenase turnover frequency of 380-900 s⁻¹ and photon conversion efficiencies of up to 20% under illumination at 405 nm. Cd-based complexes allowed photoproduction of dihydrogen for a couple of hours, but still suffer from quick inhibition of hydrogenase.

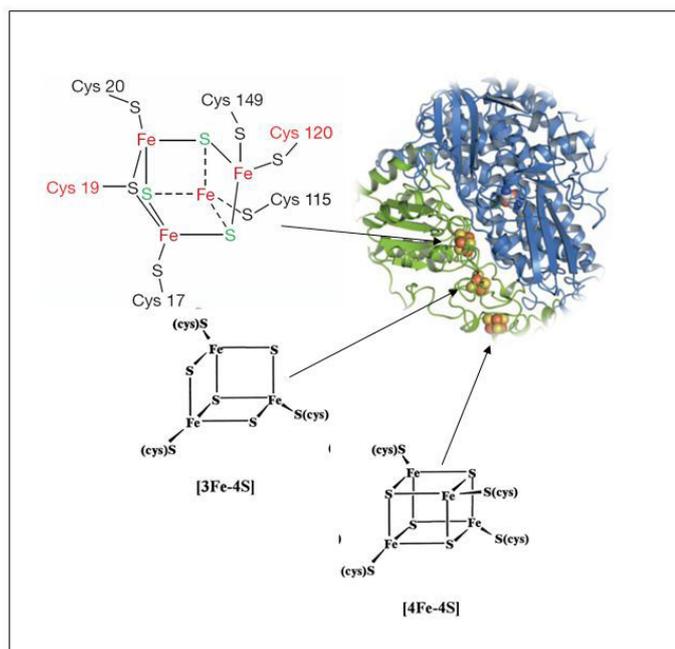


Figure 4. Structure of an oxygen-tolerant [NiFe] hydrogenase.

Although a very attractive way, little work has been done towards enhancement of green hydrogen production using CNTs. Three studies from the same group reported however catalytically active hydrogenase-SWCNT biohybrids [93, 94]. Surfactant-suspended SWCNTs were shown to spontaneously self-assemble with hydrogenase. Photoluminescence excitation and Raman spectroscopy showed that SWCNTs act as molecular wires to make electrical contact with at least one of the FeS electron relay. Hydrogenase was demon-

strated to be strongly attached to the SWCNTs and to mediate electron injection into nanotubes. The displacement of the surfactant by hydrogenase to gain access to the SWCNTs was strongly suggested by photoluminescence studies. Furthermore, Raman studies of charge transfer complexes between hydrogenase and either metallic (m) or semiconducting (s) SWCNTs revealed a difference in oxygen deactivation of hydrogenase according to the SWCNT species. m-SWCNTs most probably interact with hydrogenase to produce a more oxygen-tolerant species. The study further suggested that purified m-SWCNTs or s-SWCNTs, rather than mixed preparation, would be more suitable for hydrogenase-SWCNTs biohybrids. The formation of these catalytically active biohybrids in addition with the intrinsic properties developed by CNT networks on electrodes certainly accounts for the improved dihydrogen production observed in the following studies. Kihara *et al.* immobilized hydrogenase on a SWCNT-forest with a unique dense structure of vertically aligned millimetre-scale height SWCNTs [95]. Hydrogenase was demonstrated to spontaneously assemble between adjacent nanotubes. The maximum rate of dihydrogen production was reported to be 720 nmol/min/(mg hydrogenase) and the electron transfer efficiency was estimated to be 32%. It is two thousand fold higher than reported before using the same hydrogenase on Langmuir-Blodgett film [96]. Nevertheless, one key point in the development of biotechnological devices is the long term stability of enzymes. If these biological catalysts are very efficient *in vivo*, they often suffer from weak stability when extracted from their physiological environment. Enzyme encapsulation in silica-derived sol-gel materials has been demonstrated to stabilize many enzymes. This procedure was applied to hydrogenase [97]. The majority of hydrogenase was shown to be entrapped in the gel and protected against proteolysis. Hydrogenase/sol-gel pellets retained 60% of the specific mediated activity for H₂ production displayed by hydrogenase in solution. The gel-encapsulated enzyme retained its activity for long periods, *i.e.* 80% of the activity after four weeks at room temperature. Notably, by doping the hydrogenase-containing sol-gel materials with MWCNTs Zadvorny *et al.* demonstrated a 50% increase in dihydrogen production [98]. Furthermore stabilization of hydrogenase was proved through encapsulation process.

One alternative for green hydrogen production is to synthesize metal complexes that mimic the active site of enzymes. Huge work has been done in that field in order to obtain bioinspired models that could produce H₂ as efficiently as hydrogenase, while being much more stable [99]. The most performing complex involves mononuclear nickel diphosphine complex. This complex is inspired from the active sites of both [NiFe] and [FeFe] hydrogenases and displays remarkable catalytic proton reduction in organic solvent [100]. Le Goff *et al.* took benefit from this complex and from the results obtained by immobilization of hydrogenase on CNT networks [44]. The authors successfully immobilized the nickel complex onto carbon nanotube networks by covalent coupling [101]. Such construction was demonstrated to be very efficient for dihydrogen production in aqueous solution, evolving dihydrogen with overvoltage less than 20 mV and exceptional stability.

7. Carbon nanotubes for biofuel cells: an attractive green alternative

Beside researches towards decrease in chemical catalyst amount and discovery of less expensive catalysts (as alloys for example), a new concept emerged early in 1964 by Yahiro *et al.* [102]. A fuel cell was constructed using usual O_2 reduction at platinum modified electrode in the cell cathodic compartment, but using glucose as a fuel in the anodic compartment. The innovative idea was the use of an enzyme specific for fuel oxidation instead of platinum. For glucose oxidation, glucose oxidase was tested as the anodic catalyst. The fuel cell delivered 30 nA cm^{-2} at 330 mV ...a very low power density indeed but the proof of concept of biofuel cell was born. Generally speaking these biofuel cells function as fuel cells but used enzymes instead of noble metals as catalysts (Figure 5). They are referred as enzymatic biofuel cells. Microorganisms can also be used as catalysts, defining microbial fuel cells. Microbial biofuel cells use the metabolism of microorganisms under anaerobic conditions to oxidize fuel [103-104]. Although a promising concept, little is known yet about the mechanisms by which fuel is oxidized at the anode. The involvement of nanowires, electron transfer mediators, either membrane-bound or excreted, is supposed to be responsible for the cell current. Enzymatic biofuel cells are however more efficient because no mass transfer limitations across the cell membrane exist.

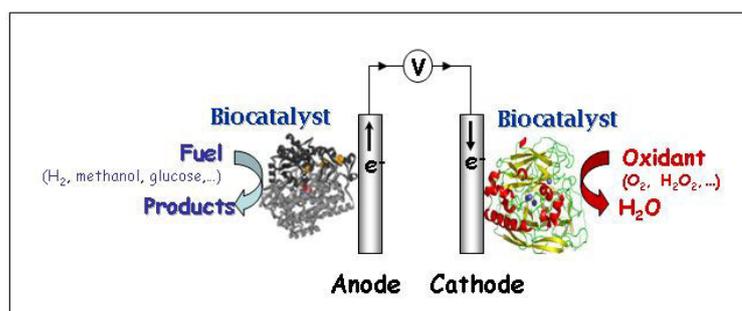


Figure 5. Schematic representation of an enzymatic biofuel cell.

The advantages of enzymatic biofuel cells over fuel cells are multiple. Biocatalysts are widespread, then *a priori* inexpensive, and biodegradable. Enzymes are highly efficient and specific to their substrates. The substrate specificity decreases reactant cross-over, and might theoretically allow to design fuel cells with no membrane between the anodic and cathodic compartments. Both costs are reduced and the design is simplified. A large variety of fuels and oxidants can be used to feed the biofuel cells, as opposed to the poor available fuels and oxidant in classical fuel cells (dihydrogen, methanol, oxygen). Indeed, many enzymes are nowadays characterized which differ by their natural abundant substrates. Dihydrogen, but also various inexpensive sugars can thus be used as efficient fuels at the anode. Furthermore, the involvement of cascades of enzymes can enhance the cell performance because of the summation of the electrons from each enzymatic reaction [105]. Finally, biofuel cells can

deliver power under soft working conditions, as enzymes usually perform their enzymatic reactions at mild pH and temperature. Nevertheless, some extremophilic enzymes operate in extreme acidic or basic pH, as well as at high temperatures (around 90°C) or high pressure, offering the possibility to develop biofuel cell devices for special applications requiring extreme working conditions [106]. The applications of biofuel cells are still in their infancy. They are mainly thought to power small portable devices. Remarkable progress has been reported for implantable biofuel cells during the last year to power drug pumps, glucose sensors, vision devices [107-109].

The most common redox couple that has been used in biofuel cells is sugar/O₂, essentially because of sugar and O₂ abundance in nature and their essential role in living metabolism. In particular, glucose is an important metabolite and a source of energy for many living organisms. In that field, CNTs have been widely used, both at the anode and cathode. Glucose/O₂ biofuel cell is thus a very pertinent investigation field to investigate the role of CNTs. A view of some typical results is presented in Table 2.

Enzymes Anode / Cathode	Mediators Anode / Cathode	Power density μW cm ⁻²	Ref
Gox / Laccase	Ferrocene / -	15	[111]
GDH / BOD	PQQ / -	23	[82]
Gox / Pt	Ferrocenecarboxaldehyde / -	51	[112]
GDH / BOD	Poly(brilliant cresyl blue) / -	54	[113]
GDH / laccase	Azine dyes / -	58	[114]
Gox / Pt	Benzoquinone / -	77	[52]
Gox / Laccase	Ferrocene / ABTS	100	[115]
Gox / BOD	Ferrocene methanol / ABTS	120	[116]
GDH / Laccase	- / -	131	[117]
CDH / Pt	Os complex / -	157	[118]
Gox / Laccase	- / -	1300	[119]

Gox: Glucose oxidase; GDH: Glucose dehydrogenase; BOD: Bilirubin oxidase; ABTS: 2, 2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) diammonium; CDH: cellobiose dehydrogenase.

Table 2. Performances of glucose/O₂ fuel cells.

Data highlight that kinetics of bioelectrochemical reactions, thus power density, largely depends on the experimental conditions, *i.e.* enzyme and mediators, T°, pH, concentration of substrate, electrolyte and type of electrode construction. Highest values are obtained with mediatorless fuel cells, reaching power densities upper than 1 mW cm⁻² which is sufficient to power small electrical devices. It appears that direct connection of copper enzymes, namely laccase or BOD, for oxygen reduction at the cathode can be quite easily obtained with the help of CNT network. Direct connection of enzymes for glucose oxidation is conversely hardly observed, even on CNT coatings. From literature examination direct connection of

Gox at electrode interfaces is still controversial. Due to the peculiar structure of Gox, a dimer with flavin adenine dinucleotide active site buried within a thick and isolated protein shell, it is understandable that electrical connection of Gox could be unexpected. A recent work concluded that CNTs were capable to electrically connect Gox, but this connection was unfruitful for glucose catalytic oxidation [110].

8. Carbon nanotubes for bioelectrooxidation of H₂: towards H₂/O₂ biofuel cells

We already described above hydrogenases, the enzymes that convert with high specificity and efficiency protons into dihydrogen. Most of these biocatalysts are also efficient in the oxidation of dihydrogen into protons. Consequently this allows to imagine biofuel cells in which the fuel would be dihydrogen, exactly as in PEM fuel cells. As hydrogenases are able to oxidize dihydrogen with very low overvoltage, the open circuit voltage for the biofuel cell using oxygen at the cathode, is expected to be not far from the thermodynamic one, *i.e.* 1.23 V. Hence, high power densities are expected, provided that a strong and efficient electrical connection between hydrogenase and electrode can be achieved. Simple adsorption of hydrogenase was performed in a first step, because it allowed a direct oxidation of dihydrogen without any redox mediators [120]. Catalytic mechanisms associated with dihydrogen oxidation at the active site were largely studied. The effect of strong hydrogenase inhibitors such as oxygen and CO were explored by this mean, leading to nice developments in engineering of more tolerant hydrogenases [121] or use of naturally resistant hydrogenases [122, 123]. However, this immobilization procedure relies on a monolayer of enzyme, which furthermore suffers from quick desorption. Otherwise, multilayer enzymatic films require a redox mediator so that even the last layer far from the electrode could be connected. Other immobilization processes are thus needed, that can favor an enhancement in both the amount of connected hydrogenases as well as their stability, while preserving their functionality.

Carbon nanotube networks constituted technological breakthroughs in that way. All the recent developments using immobilization of hydrogenases onto carbon nanotubes point out improved catalytic currents essentially related to an increase in the active area of the electrode. The respective role of metallic-SWCNTs against semiconducting one was explored for dihydrogen oxidation by immobilized hydrogenase [124]. A higher oxidation process was revealed when the nanotube mixture was enriched in metallic SWCNT. The study furthermore suggested no need of oxygenated SWCNTs for efficient anchoring of hydrogenases. The catalytic current enhancement was claimed to be due to an increase in active electrode surface area and an improved electronic coupling between hydrogenase redox active sites and the electrode surface. In most cases, however, CNTs are used as a mixture of metallic and semi-conducting tubes. Oxidation of the mixture yields the defects and functionalities described above in this review. Advantage is gained due to these chemical functions quite easily generated on the surface of the carbon nanotubes. Electrodes modified by carbon nanotubes are thus expected to offer numerous anchoring sites for stable hydrogenase immobilization. The literature provides a few examples of efficient immobili-

zation of hydrogenase on carbon nanotubes coatings bearing various functionalities. Both SWCNTs and MWCNTs are used. Notably, more and more articles are devoted nowadays to this domain in hydrogenase research. A bionanocomposite made of the hydrogenase, MWCNTs and a thiopyridine derivative was proved to form stable monolayers when transferred by Langmuir-Blodgett method on indium tin oxide electrode surfaces [125]. A greater amount of electroactive hydrogenase towards dihydrogen oxidation was demonstrated to be adsorbed on the Langmuir-Blodgett films. De Lacey and co-workers grew MWCNTs on electrode by chemical vapor deposition of acetylene [65]. A high density of vertically aligned carbon nanotubes was obtained, which were functionalized by electroreduction of a diazonium salt for covalent binding of hydrogenase. High coverage of electroactive enzyme was measured, suggesting that almost all the functionalized CNT surface was accessible to hydrogenase. Great stabilization of the catalytic current for H₂ oxidation was obtained, with no decrease in current density after one month. Another work by Heering and co-workers studied a gold electrode pre-treated by polymyxin then a multilayer of carbon nanotubes [126]. Polymyxin was shown to help in the stable attachment of hydrogenase on the gold electrode. Using adsorption of hydrogenase on a nanotube layer pretreated with polymyxin the current density for H₂ oxidation was an order of magnitude higher than at the gold electrode only modified by polymyxin. This result was supposed to originate from greater surface area even though only the top of the nanotube layer was supposed to be accessible to the enzyme. The catalytic current was stable with time, at least for two hours under continuous cycling, and several days upon storage under ambient conditions. AFM visualization of hydrogenase immobilized onto polymyxin-treated SWCNT layer on SiO₂ revealed that hydrogenase was structurally intact and preferentially adsorbed on the side-walls of the CNTs rather than on SiO₂ [126].

In our laboratory, we immobilized the [NiFe] hydrogenase from a mesophilic anaerobic bacterium (the sulfate reducing bacterium *Desulfovibrio fructosovorans* Df) by adsorption onto SWCNT films [44]. The current for direct H₂ oxidation was shown to increase with the amount of SWCNTs in the coating (Figure 6).

Because non-turnover signals were not detected for hydrogenase in these conditions, the increase in surface area was evaluated using a redox protein as a probe. It was shown that SWCNTs induced one order larger surface area. The same hydrogenase was entrapped in methylviologen functionalized polypyrrole films coated onto SWCNTs and MWCNTs [127]. Although no direct electrical hydrogenase connection was observed, an efficient dihydrogen oxidation through a mediated process occurred. It was concluded that the entrapment of hydrogenase into the redox polymer coated onto CNTs combined the electron carrier properties of redox probes, the flexibility of polypyrroles, and the high electroactive area developed by CNTs. The reason why no direct connection could be observed is however not clearly understood yet. In our group we handled immobilization of hydrogenase on a film obtained by electropolymerization of a phenothiazine dye on a SWCNT coating [81]. The phenothiazine dye was shown to be able to mediate dihydrogen oxidation but also to serve as an anchor for the enzyme when adsorbed or when electropolymerized. Higher current density than in the absence of SWCNT was observed. In addition, a wider potential window for dihydrogen oxidation was reached as well as very stable electrochemical signals with

time. We postulated that the conductive polymer which was electropolymerized onto CNTs could play a multiple role: enhancement of the electroactive surface area, enhancement of redox mediator units due to phenothiazine monomers entrapped in the polymer matrix, enhancement of hydrogenase anchorage sites. We have already mentioned in this review the advantages of a direct electron transfer over a mediated one for H₂ oxidation, including gain in over-potential values, less interferences due to enzyme specificity, absence of redox mediators that could be difficult to co-immobilize with the enzyme... Functionalized carbon nanotube films were evaluated in our group as platforms for various hydrogenases, that present a very different environment of FeS cluster electron relay. Dihydrogen oxidation was studied at gold electrodes modified with functionalized self-assembled-monolayers [128]. As expected, dihydrogen oxidation process was demonstrated to be driven by electrostatic or hydrophobic interactions according to the specific environment of the surface electron relay. Interestingly, at CNT coatings, although CNTs were negatively charged, direct electrical connection of hydrogenases that present a negatively charged patch around the FeS surface electron relay was observed [44, 123]. In other words, despite unfavourable electrostatic interactions, direct electron transfer process for dihydrogen oxidation was achieved. One important conclusion was that on such CNT films, the nanometric size of the CNTs allows a population of hydrogenases to be directly connected to a neighbouring nanotube, hence allowing direct electron transfer for H₂ oxidation, whatever the orientation of the enzyme.

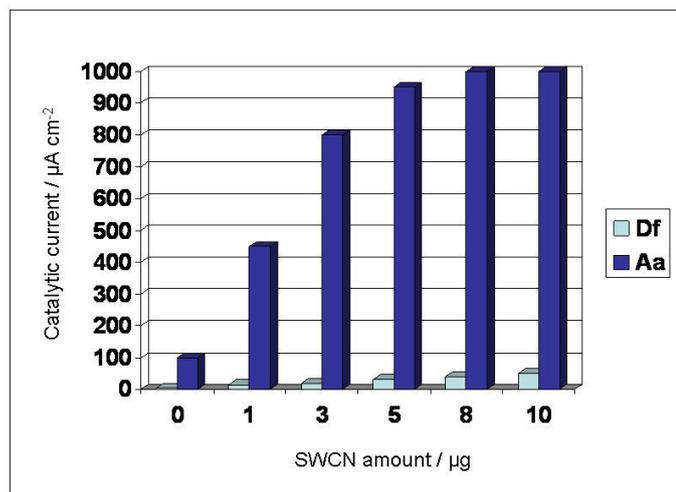


Figure 6. Comparative evolution of the catalytic current for dihydrogen oxidation with the amount of SWCNTs deposited at a graphite electrode in the case of hydrogenases from *Aquifex aeolicus* (Aa) or *Desulfovibrio fructosovorans* (Df). Catalytic currents are measured using voltammetry under H₂ at 60 and 25°C for Aa and Df respectively.

However, the extreme oxygen sensitivity of hydrogenases used in the former studies yielded an intensive research towards more resistant enzymes. During the last years, four [NiFe]

membrane-bound hydrogenases have been discovered from aerobic or extremophilic organisms [128, 129-132]. They have been demonstrated to oxidize H_2 in the presence of oxygen and CO. The crystallographic structure of three of them has been resolved, showing that an uncommon [4Fe-3S] cluster proximal to the active site prevents deleterious oxygen attack. Of course, the sensitivity to oxygen, and also to CO, of most hydrogenases known before was a strong limitation for their potential use in biotechnological devices. Therefore these resistant biocatalysts open new avenues towards a biohydrogen economy. No doubt that these researches will increase in the next future. To date, two main studies report the immobilization of resistant hydrogenase on CNT-modified electrodes. Krishnan *et al.* very recently modified MWCNTs by pyrenebutyric acid, and demonstrated it was an efficient platform for stable O_2 -resistant hydrogenase linkage [133]. In our group, original use of a hyperthermophilic O_2 - and CO-resistant hydrogenase allowed the increase in the catalytic current for direct H_2 oxidation on a large range of temperature up to $70^\circ C$. Attempts to enhance the number of electrically connected hydrogenase succeeded by use of coatings of chemically oxidized SWCNTs [123]. Values as high as 1 mA cm^{-2} were reached depending on the amount of SWCNTs used in the coating (Figure 6). For the lowest amounts of SWCNTs, the increase in the catalytic current was demonstrated to be essentially due to the increase in surface area. However the catalytic current rapidly reached a plateau, although the peak current for the redox probe still increased, suggesting rapid saturation of the surface.

9. Design of a H_2/O_2 biofuel cell based on carbon nanotubes-modified electrodes

H_2/O_2 biofuel cells did not get much attention before O_2 and CO resistant hydrogenases were proved to be efficient for H_2 oxidation when immobilized onto electrode surfaces. Even though more and more efficient hydrogenase immobilization procedures are nowadays reported, few H_2/O_2 biofuel cells are described. An early study by Armstrong's group in 2006 [134] demonstrated that simple adsorption on graphite electrode of hydrogenase at the anode and laccase (a copper protein for O_2 reduction) at the cathode, allowed a wristwatch to run for 24h. Power density of around $5 \mu W \text{ cm}^{-2}$ at 500 mV was delivered with no membrane between the two compartments providing hydrogenase was extracted from *Ralstonia metallireducens*. As this is an aerobic bacterium, the result underlined that the H_2/O_2 biofuel cell could operate only with O_2 resistant hydrogenase. In 2010, the same group improved the device by using another O_2 resistant hydrogenase from *Escherichia coli* and bilirubin oxidase (BOD), another copper protein more efficient than laccase towards oxygen reduction because being able to function at neutral pH [135]. The oxygen reductase was covalently linked to the graphite electrode which had been modified by diazonium salt reduction. The power density was enhanced compared to the former study reaching $63 \mu W \text{ cm}^{-2}$. But most of all, this work provided a nice understanding of the operating conditions of such H_2/O_2 fuel cells involving hydrogenase as anode catalyst.

Due to the understanding of how hydrogenases could be efficiently connected at CNT-coated electrodes, a huge step jumped over very recently. First, using covalent attach-

ment of both O₂ resistant hydrogenase and BOD on pyrene derivative functionalized MWCNTs, a membrane-less biofuel cell was designed fed with a non-explosive 80/20 dihydrogen/air mixture [133]. This biofuel cell displayed quite a good stability with time and a much higher power density than reported before. Indeed, an average power density of 119 μW cm⁻² was measured. Low solubility of oxygen and weak affinity of BOD for oxygen was shown to limit the cathodic current. Secondly in our group, a more performant H₂/O₂ mediatorless biofuel cell was constructed based on one step covalent attachment directly on SWCNTs of an hyperthermophilic O₂ resistant hydrogenase at the anode and BOD at the cathode [136] (Figure 7).

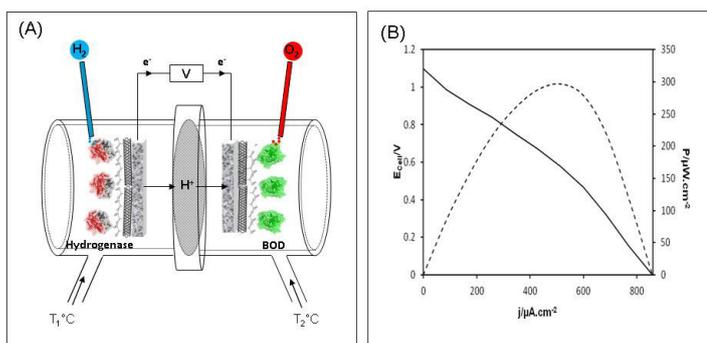


Figure 7. (A) Schematic representation of H₂/O₂ biofuel cell with O₂ resistant hydrogenase at the anode and bilirubin oxidase (BOD) at the cathode. Each half cell, separated by a Nafion® membrane, is independently thermoregulated with waterbaths. (B) Performance of the H₂/O₂ biofuel cell.

Taking advantage of temperature, the biofuel cell delivered power densities up to 300 μW cm⁻² at 0.6V with an OCV of 1.1V, which is the highest performance ever reported. Furthermore, promising stability of the biofuel cell during 24h of continuous use lets us consider this device as an alternative power supply for small portable applications. The analysis of the fuel cell parameters during polarization, allows us to define the potential window in which the fuel cell fully operates. Interestingly, in Armstrong's group [135] and in our group, different approaches on the settings of biofuel cell working conditions, led to similar observations of an unexpected increasing anodic potential. This high oxidizing potential generates an inactive state of hydrogenase active site. It is worth noticing that this hydrogenase inactivation occurred under anaerobic conditions in our group while it was under aerobic conditions in Armstrong's group. Consequently, dramatic loss in power densities was observed. By applying negative potential to the anode, and thus providing electrons to the active site, we were unable to reactivate hydrogenase. Another protocol used by Armstrong, consisted to add a second hydrogenase coated anode, unconnected to the system but present in the anodic half-cell which was consequently unaffected by the oxidizing potential but still in presence of O₂. This second anode, under H₂ oxidation was used as an electron supplier and connected to the first electrode. This procedure reactivated hydrogenase and allowed

full recovery of OCV. It is of relevant interest to overcome hydrogenase inactivation in H_2/O_2 biofuel cell.

10. Future directions

As reviewed in this chapter, many of the CNTs based technologies are promising for the development of a green hydrogen economy. Not only abiotic dihydrogen storage, but also microbial dihydrogen production and use of this green dihydrogen in biofuel cells can take advantages of the outstanding properties of CNTs. In all these applications, CNTs appear to play multiple roles including increase in surface area, increase in electron transfer rate, increase in directly connected enzymes. Possible protection against oxygen damage of enzymes has even been strongly suggested. Use of CNTs thus allows to architecture three-dimensional nanostructured interfaces which can be an alternative to strictly orientated proteins or enzymes for high direct electron transfer interfacial processes. The ease in obtaining tuned surface functionalizations is one of the very attracting points in view of the development of efficient bioelectrodes.

This is in particular the case for biofuel cells using dihydrogen as a fuel. During the last years, tremendous research on hydrogenase, the key enzyme for dihydrogen conversion, has led to the discovery, then control of some hydrogenases presenting properties that allow their use in biotechnological devices. During this year, based on these new resistant enzymes and on improved knowledge of how CNTs can enhance direct current densities, two H_2/O_2 biofuel cells have been reported. Although these biofuel cells constitute the first device using hydrogenases, they already deliver sufficient power density for small portable applications. No doubt that this research field will gain more and more interest in a next future.

However, various directions might be followed to further improve the biological system in such a way it could be commercially available. One is the enhancement of long-term stability of the device, which is obviously the critical point shared by (bio)fuel cells, yet. Search for more stable enzymes in the biodiversity or enzyme engineering has to be explored. Protection of enzymes by various encapsulation procedures could be another solution given efficient interfacial electron transfer can be reached. The use of whole microorganisms with controlled and driven metabolism, or at least immobilization of naturally encapsulated enzymes will be a next step. As an example, reconstitution of proteoliposomes with a membrane-bound hydrogenase was proved to enhance the stability of the enzyme [137]. This could be a novel route for preserving enzymes in their physiological environment, hence enhancing their stability. New enzymes, with outstanding properties (T° , pH, inhibitors, substrate affinity...) have to be discovered and studied. Notably, two very recent publications report on a new thermostable bilirubin oxidase and a tyrosinase which present outstanding resistances to serum constituents [138, 139]. These two new enzymes appear to be able to efficiently replace the currently used BOD for implantable applications of biofuel cells.

More sophisticated materials interfaces, constituted of mixtures of CNTs with other conducting materials could bring a hierarchical porosity necessary for both enzyme immobiliza-

tion and substrate diffusion. Carbon fibers, mesoporous carbon templates could be used to build very interesting new electrochemical interfaces. This diversity in potential carbon materials for efficient enzyme immobilization would be a key step to go through the difficulties linked to CNTs, *i.e.* effective cost for separation and purification as well as possible toxicity. Finally, to avoid the membrane between the cathodic and anodic compartments, and build a miniaturized biofuel cell, unusual cell designs, such as microfluidic or flow-through systems, are likely to open new avenues. All these future developments will certainly require a multidisciplinary approach, coupling electrochemists with biochemists and physicists, and coupling methods such as electrochemistry and spectrometry, electrochemistry and molecular genetics or electrochemistry and materials chemistry. This multidisciplinary willingness will help in the elucidation of the interactions between enzymes and nanostructured materials at the nanoscale and yield innovative nanobiotechnological approaches and applications.

Acknowledgements

We gratefully acknowledge the contribution of Marielle Bauzan (Fermentation Plant Unit, IMM, CNRS, Marseille, France) for growing the bacteria, Dr Marianne Guiral, Dr Marianne Ilbert and Pascale Infossi for fruitful discussions. This work was supported by research grants from CNRS, Région PACA and ANR.

Author details

Anne De Poulpiquet, Alexandre Ciaccafava, Saïda Benomar,
Marie-Thérèse Giudici-Ortoni and Elisabeth Lojou*

*Address all correspondence to: lojou@imm.cnrs.fr

Bioénergétique et Ingénierie des Protéines, CNRS - AMU - Institut de Microbiologie de la Méditerranée, France

References

- [1] Verne, J. (1874). L'île mystérieuse.
- [2] Grove, W. (1838). On a new voltaic combination. *Philosophical Magazine and Journal of Science*, 13, 430.
- [3] Charlou, J. L., Donval, J. P., Konn, C., Ondréas, H., Fouquet, Y., Jean-Baptiste, P., & Fourré, E. (2010). High production and fluxes of H₂ and CH₄ and evidence of abiotic hydrocarbon synthesis by serpentinization on ultramafic-hosted hydrothermal systems on Mid-Atlantic Ridge. Rona P., Devey C., Dymont J. Murton B. Editors., "Di-

iversity of hydrothermal systems on slow spreading ocean ridges" Edited by AGU Geophysical monograph series, 188, 265-296.

- [4] Oberlin, A., Endo, M., & Koyama, T. (1976). Filamentous growth of carbon through benzene decomposition. *Journal of Crystal Growth*, 32(3), 335-349.
- [5] Iijima, S. (1991). Helical microtubules of graphitic carbon. *Nature*, 354-56.
- [6] Saito, R., Dresselhaus, G., & Dresselhaus, M. (1998). Physical Properties of Carbon Nanotubes. *Imperial College Press, London*.
- [7] Kirk, Othmer. (1996). Encyclopedia of Chemical Technology, (4th ed.). *Wiley and Sons, New York*.
- [8] Heitner-Wirguin, C. (1996). Recent advances in perfluorinated ionomer membranes: structure, properties and applications. *Journal of Membrane Science*, 120(1), 1-33.
- [9] Cracknell, J., Vincent, K., & Armstrong, F. (2008). Enzymes as working or inspirational electrocatalysts for fuel cells and electrolysis. *Chemical Review*, 108(7), 2439-2461.
- [10] Guiral, M., Prunetti, L., Aussignargues, C., Ciaccafava, A., Infossi, P., Ilbert, M., Lojou, E., & Giudici-Orticoni, M. T. (2012). The hyperthermophilic bacterium *Aquifex aeolicus*: from respiratory pathways to extremely resistant enzymes and biotechnological applications. *Advances in Microbiological Physiology; to be edited*.
- [11] Ivanov, I., Vidakovic-Koch, T., & Sundmacher, K. (2010). Recent Advances in Enzymatic Fuel Cells. *Experiments and Modeling Energies*, 3(4), 803-846.
- [12] Tran, P., Artero, V., & Fontecave, M. (2010). Water electrolysis and photoelectrolysis on electrodes engineered using biological and bio-inspired molecular systems. *Energy & Environmental Science*, 3(6), 727-747.
- [13] Lojou, E. (2011). Hydrogenases as catalysts for fuel cells: Strategies for efficient immobilization at electrode interfaces. *Electrochimica Acta*, 56(28), 10385-10397.
- [14] Schnorr, J. M., & Swager, T. M. (2011). Emerging Applications of Carbon Nanotubes. *Chemistry of Materials*, 23(3), 646-657.
- [15] Iijima, S., & Ichihashi, T. (1993). Single-shell carbon nanotubes of 1-nm diameter. *Nature*, 363, 603-605.
- [16] Dresselhaus, M., Dresselhaus, G., & Jorio, A. (2004). Unusual properties and structure of carbon nanotubes. *Annual Review of Material Research*, 34-247.
- [17] Botzung, M., Chaudourne, S., Gillia, O., Perret, C., Latroche, M., Percheron-Guegan, A., & Marty, P. (2008). Marty Simulation and experimental validation of a hydrogen storage tank with metal hydrides. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(1), 98-104.
- [18] Vajo, J., Li, W., & Liu, P. (2010). Thermodynamic and kinetic destabilization in $\text{LiBH}_4/\text{Mg}_2\text{NiH}_4$: promise for borohydride-based hydrogen storage. *Chemical Communications*, 46(36), 6687-6689.

- [19] Li, C., Peng, P., Zhou, D., & Wan, L. (2011). Research progress in LiBH_4 for hydrogen storage: A review. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36(22), 14512-14526.
- [20] Yao, X., Wu, C., Du, A., Lu, G., Cheng, H., Smith, S., Zou, J., & He, Y. (2006). Mg-based nanocomposites with high capacity and fast kinetics for hydrogen storage. *Journal of Physical Chemistry B*, 110(24), 11697-11703.
- [21] Luo, Y., Wang, P., Ma, L. P., & Cheng, M. (2007). Enhanced hydrogen storage properties of MgH_2 co-catalyzed with NbF_5 and single-walled carbon nanotubes. *Scripta Materialia*, 56(9), 765-768.
- [22] Wu, C., Wang, P., Yao, X., Liu, C., Chen, D., Lu, G., & Cheng, H. (2006). Effect of carbon/noncarbon addition on hydrogen storage behaviour of magnesium hydride. *Journal of Alloys Compounds*, 414-259.
- [23] Dillon, A., Jones, K., Bekkedahl, T., Kiang, C., Bethune, D., & Heben, M. (1997). Storage of hydrogen in single-walled carbon nanotubes. *Nature*, 386(6623), 377-379.
- [24] Ding, F., & Yakobson, B. (2011). Challenges in hydrogen adsorptions: from physisorption to chemisorption. *Frontiers of Physics*, 6(2), 142-150.
- [25] Nikitin, A., Li, X., Zhang, Z., Ogasawara, H., Dai, H., & Nilsson, A. (2008). Hydrogen storage in carbon nanotubes through the formation of stable C-H bonds. *Nano Letters*, 8(1), 162-167.
- [26] Sahaym, U., & Norton, M. (2008). Advances in the application of nanotechnology in enabling a hydrogen economy. *Journal of Material Sciences*, 43(16), 5395-549.
- [27] Tang, Z., Poh, C., Lee, K. K., Tian, Z., Chua, D., & Lin, J. (2010). Enhanced catalytic properties from platinum nanodots covered carbon nanotubes for proton-exchange membrane fuel cells. *Journal of Power Sources*, 195(1), 155-159.
- [28] Lin, J., Kamavaram, V., & Kannan, A. (2010). Synthesis and characterization of carbon nanotubes supported platinum nanocatalyst for proton exchange membrane fuel cells. *Journal of Power Sources*, 195(2), 466-470.
- [29] Kongkanand, A., Kuwabata, S., Girishkumar, G., & Kamat, P. (2006). Single-wall carbon nanotubes supported platinum nanoparticles with improved electrocatalytic activity for oxygen reduction reaction. *Langmuir*, 22(5), 2392-2396.
- [30] Lin, J., Mason, C., Adame, A., Liu, X., Peng, X., & Kannan, A. (2010). Synthesis of Pt nanocatalyst with micelle-encapsulated multi-walled carbon nanotubes as support for proton exchange membrane fuel cells. *Electrochimica Acta*, 55(22), 6496-6500.
- [31] Lee, C., Ju, Y. C., Chou, P. T., Huang, Y. C., Kuo, L. C., & Oung, J. C. (2005). Preparation of Pt nanoparticles on carbon nanotubes and graphite nanofibers via self-regulated reduction of surfactants and their application as electrochemical catalyst. *Electrochemistry Communications*, 7(4), 453-458.
- [32] He, D., Zeng, C., Xu, C., Cheng, N., Li, H., & Mu, S. (2011). Polyaniline-Functionalized Carbon Nanotube Supported Platinum Catalysts. *Langmuir*, 27(9), 5582-5588.

- [33] Ludwig, R., Harreither, W., Tasca, F., & Gorton, L. (2011). Cellobiose Dehydrogenase: A Versatile Catalyst for Electrochemical Applications. *ChemPhysChem.*, 11(13), 2674-2697.
- [34] Cang-Rong, J., & Pastorin, G. (2009). The influence of carbon nanotubes on enzyme activity and structure: investigation of different immobilization procedures through enzyme kinetics and circular dichroism studies. *Nanotechnology*, 20(25), 255102.
- [35] Matsuura, K., Saito, T., Okasaki, T., Oshima, S., Yumura, M., & Iijima, S. (2006). Selectivity of water-soluble proteins in single-walled carbon nanotube dispersions. *Chemical Physics Letters*, 429(4-6), 497-502.
- [36] Patolsky, F., Weizmann, Y., & Willner, I. (2004). Long-range electrical contacting of redox enzymes by SWCNT connectors. *Angewandte Chemistry International Edition*, 43(16), 2113-2117.
- [37] Liu, J., Chou, A., Rahmat, W., Paddon-Row, M., & Gooding, J. (2005). Achieving direct electrical connection to glucose oxidase using aligned single walled carbon nanotube arrays. *Electroanalysis*, 17(1), 38-46.
- [38] Wang, J. (2005). Carbon-nanotube based electrochemical biosensors: A review. *Electroanalysis*, 17(1), 7-14.
- [39] Wildgoose, G., Banks, C., Leventis, H., & Compton, R. (2006). Chemically modified carbon nanotubes for use in electroanalysis. *Microchimica Acta*, 152(3-4), 187-214.
- [40] Dumitrescu, I., Unwin, P., & Macpherson, J. (2009). Electrochemistry at carbon nanotubes: perspective and issues. *Chemical Communications*, 45, 6886-4901.
- [41] Ji, P., Tan, H., Xu, X., & Feng, W. (2010). Lipase Covalently Attached to Multiwalled Carbon Nanotubes as an Efficient Catalyst in Organic Solvent. *AIChE Journal*, 56(11), 3005-3011.
- [42] Upadhyayula, V., & Gadhamshetty, V. (2010). Appreciating the role of carbon nanotube composites in preventing biofouling and promoting biofilms on material surfaces in environmental engineering: A review. *Biotechnological Advances*, 28(6), 802-816.
- [43] Lojou, E., Luciano, P., Nitsche, S., & Bianco, P. (1999). Poly(ester-sulfonic acid):modified carbon electrodes for the electrochemical study of c-type cytochromes. *Electrochimica Acta*, 44(19), 3341-3352.
- [44] Lojou, E., Luo, X., Brugna, M., Candoni, N., Dementin, S., & Giudici-Ortoni, M. T. (2008). Biocatalysts for fuel cells: efficient hydrogenase orientation for H₂ oxidation at electrodes modified with carbon nanotubes. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 13(7), 1157-1167.
- [45] Minter, S., Atanassov, P., Luckarift, H., & Johnson, G. (2012). New materials for biological fuel cells. *Material Today*, 15(4), 166-173.

- [46] Weigel, M., Tritscher, E., & Lisdat, F. (2007). Direct electrochemical conversion of bilirubin oxidase at carbon nanotube-modified glassy carbon electrodes. *Electrochemistry Communications*, 9(4), 689-693.
- [47] Pumera, M., & Smid, B. (2007). Redox protein noncovalent functionalization of double-wall carbon nanotubes: Electrochemical binder-less glucose biosensor. *Journal of Nanosciences and Nanotechnology*, 7(10), 3590-3595.
- [48] Willner, I., Yan, Y. M., Willner, B., & Tel-Vered, R. (2009). Integrated Enzyme-Based Biofuel Cells-A Review. *Fuel Cells*, 09(1), 7-24.
- [49] Ueda, A., Kato, D., Kurita, R., Kamata, T., Inokuchi, H., Umemura, S., Hirono, S., & Niwa, O. (2011). Efficient Direct Electron Transfer with Enzyme on a Nanostructured Carbon Film Fabricated with a Maskless Top-Down UV/Ozone Process. *Journal of the American Chemical Society*, 133(13), 4840-4846.
- [50] Tasca, F., Gorton, L., Harreither, W., Haltrich, D., Ludwig, R., & Nöll, G. (2008). Direct electron transfer at cellobiose dehydrogenase modified anodes for biofuel cells. *Journal of Physical Chemistry C*, 112(26), 9956-9961.
- [51] Zheng, W., Zhao, H., Zhou, H., Xu, X., Ding, M., & Zheng, Y. (2010). Electrochemistry of bilirubin oxidase at carbon nanotubes. *Journal of Solid State Electrochemistry*, 14(2), 249-254.
- [52] Zheng, W., Zhou, H., Zheng, Y., & Wang, N. (2008). A comparative study on electrochemistry of laccase at two kinds of carbon nanotubes and its application for biofuel cell. *Chemical Physics Letters*, 381-385.
- [53] Zhao, L., Liu, H., & Hu, N. (2006). Assembly of layer-by-layer films of heme proteins and single-walled carbon nanotubes: electrochemistry and electrocatalysis. *Analytical Bioanalytical Chemistry*, 384(2), 414-422.
- [54] Liu, G., & Lin, Y. (2006). Amperometric glucose biosensor based on self-assembling glucose oxidase on carbon nanotubes. *Electrochemistry Communications*, 8(2), 251-256.
- [55] Iost, R., & Crespilho, F. (2012). Layer-by-layer self-assembly and electrochemistry: Applications in biosensing and bioelectronics. *Biosensors Bioelectronics*, 31(1), 1-10.
- [56] Gooding, J., Wibowo, R., Liu, J., Yang, W., Losic, D., Orbons, S., Mearns, F., Shapter, J., & Hibbert, D. (2003). Protein electrochemistry using aligned carbon nanotube arrays. *Journal of the American Chemical Society*, 125(30), 9006-9007.
- [57] Yu, X., Chattopadhyay, D., Galeska, I., Papadimitrakopoulos, F., & Rusling, J. (2003). Peroxidase activity of enzymes bound to the ends of single-wall carbon nanotube forest electrodes. *Electrochemistry Communications*, 5(5), 408-411.
- [58] Esplandiu, M., Pacios, M., Cyganek, L., Bartroli, J., & Del Valle, M. (2009). Enhancing the electrochemical response of myoglobin with carbon nanotube electrodes. *Nanotechnology*.

- [59] Santhosh, P., Gopalan, A., & Lee, K. (2006). Gold nanoparticles dispersed polyaniline grafted multiwall carbon nanotubes as newer electrocatalysts: Preparation and performances for methanol oxidation. *Journal of Catalysis*, 238(1), 177-185.
- [60] Nazaruk, E., Karaskiewicz, M., Zelechowska, K., Biernat, J., Rogalski, J., & Bilewicz, R. (2012). Powerful connection of laccase and carbon nanotubes Material for mediator-free electron transport on the enzymatic cathode of the biobattery. *Electrochemistry Communications*, 14(1), 67-70.
- [61] Sadowska, K., Stolarczyk, K., Biernat, J., Roberts, K., Rogalski, J., & Bilewicz, R. (2010). Derivatization of single-walled carbon nanotubes with redox mediator for biocatalytic oxygen electrodes. *Bioelectrochemistry*, 80(1), 73-80.
- [62] Jeykumari, D., & Narayanan, S. (2008). Fabrication of bienzyme nanobiocomposite electrode using functionalized carbon nanotubes for biosensing applications. *Biosensors Bioelectronics*, 23(11), 1686-1693.
- [63] Wang, Z., Li, M., Su, P., Zhang, Y., Shen, Y., Han, D., Ivaska, A., & Niu, L. (2008). Direct electron transfer of horseradish peroxidase and its electrocatalysis based on carbon nanotube/thionine/gold composites. *Electrochemistry Communications*, 10(2), 306-310.
- [64] Le Floch, F., Thuair, A., Bidan, G., & Simonato, J. P. (2009). The electrochemical signature of functionalized single-walled carbon nanotubes bearing electroactive groups. *Nanotechnology*, 20(14), 45705.
- [65] Alonso-Lomillo, M., Rüdiger, O., Maroto-Valiente, A., Velez, M., Rodriguez-Ramos, L., Munoz, F., Fernandez, V., & De Lacey, A. (2007). Hydrogenase-coated carbon nanotubes for efficient H₂ oxidation. *Nano Letters*, 7(6), 1603-1608.
- [66] Jönsson-Niedziolka, M., Kaminska, A., & Opallo, M. (2010). Pyrene-functionalised single-walled carbon nanotubes for mediatorless dioxygen bioelectrocatalysis. *Electrochimica Acta*, 55(28), 8744-8750.
- [67] Karachevtsev, V., Stepanian, S., Glamazda, A., Karachevtsev, M., Eremenko, V., Lytvyn, O., & Adamowicz, L. (2011). Noncovalent Interaction of Single-Walled Carbon Nanotubes with 1-Pyrenebutanoic Acid Succinimide Ester and Glucose oxidase. *Journal of Physical Chemistry C*, 115(43), 21072-21082.
- [68] Lau, C., Adkins, E., Ramasamy, R., Lackarift, H., Johnson, G., & Atanassov, P. (2012). Design of Carbon Nanotube-Based Gas-Diffusion Cathode for O₂ Reduction by Multicopper Oxidases. *Advanced Energy Materials*, 2(1), 162-168.
- [69] Xu, H., Xiong-Y, H., Zeng-X, Q., Jia, L., Wang, Y., & Wang-F, S. (2009). Direct electrochemistry and electrocatalysis of heme proteins immobilized in single-wall carbon nanotubes-surfactant films in room temperature ionic liquids. *Electrochemistry Communications*, 11(2), 286-289.
- [70] Yan, Y., Zheng, W., Zhang, M., Wang, L., Su, L., & Mao, L. (2005). Bioelectrochemically functional nanohybrids through co-assembling of proteins and surfactants onto

carbon nanotubes: Facilitated electron transfer of assembled proteins with enhanced faradic response. *Langmuir*, 21(14), 6560-6566.

- [71] Cosnier, S., Ionescu, R., & Holzinger, M. (2008). Aqueous dispersions of SWCNTs using pyrrolic surfactants for the electro-generation of homogeneous nanotube composites. Application to the design of an amperometric biosensor. *Journal of Materials Chemistry*, 18(42), 5129-5133.
- [72] Gao, M., Dai, L., & Wallace, G. (2003). Biosensors based on aligned carbon nanotubes coated with inherently conducting polymers. *Electroanalysis*, 15(13), 1089-1094.
- [73] Tsai, C. Y., Li, C. S., & Liao, W. S. (2006). Electrodeposition of polypyrrole-multiwalled carbon nanotube-glucose oxidase nanobiocomposite film for the detection of glucose. *Biosensors Bioelectronics*, 22(4), 495-500.
- [74] Chen, H., & Dong, S. (2007). Direct electrochemistry and electrocatalysis of horseradish peroxidase immobilized in sol-gel-derived ceramic-carbon nanotube nanocomposite film. *Biosensors Bioelectronics*, 22(8), 1811-1815.
- [75] Heller, A. (2006). Electron-conducting redox hydrogels: design, characteristics and synthesis. *Current Opinion in Chemical Biology*, 10(6), 664-672.
- [76] Timur, S., Anik, U., Odaci, D., & Gorton, L. (2007). Development of a microbial biosensor based on carbon nanotube (CNT) modified electrodes. *Electrochemistry Communications*, 9(7), 1810-1815.
- [77] Song, J., Shin, H., & Kang, C. (2011). A Carbon Nanotube Layered Electrode for the Construction of the Wired Bilirubin Oxidase Oxygen Cathode. *Electroanalysis*, 23(12), 2941-2948.
- [78] Tiwari, I., & Singh, M. (2011). Preparation and characterization of methylene blue-SDS- multiwalled carbon nanotubes nanocomposite for the detection of hydrogen peroxide. *Microchimica Acta*, 174(3-4), 223-230.
- [79] Pakapongpan, S., Palangsuntikul, R., & Surareungchai, W. (2011). Electrochemical sensors for hemoglobin and myoglobin detection based on methylene blue-multiwalled carbon nanotubes nanohybrid-modified glassy carbon electrode. *Electrochimica Acta*, 56(19), 6831-6836.
- [80] Hoshino, T., Sekiguchi, S., & Muguruma, H. (2012). Amperometric biosensor based on multilayer containing carbon nanotube, plasma-polymerized film, electron transfer mediator phenothiazine, and glucose dehydrogenase. *Bioelectrochemistry*, 84-1.
- [81] Ciaccafava, A., Infossi, P., Giudici-Ortoni, M. T., & Lojou, E. (2010). Stabilization role of a phenothiazine derivative on the electrocatalytic oxidation of hydrogen via *Aquifex aeolicus* hydrogenase at graphite membrane electrodes. *Langmuir*, 26(23), 18534-18541.

- [82] Tanne, C., Göbel, G., & Lisdat, F. (2010). Development of a (PQQ)-GDH-anode based on MWCNT-modified gold and its application in a glucose/O₂-biofuel cell. *Biosensors Bioelectronics*, 26(2), 530-535.
- [83] Reisner, E. (2011). Solar Hydrogen Evolution with Hydrogenases: From Natural to Hybrid Systems European. *Journal of Inorganic Chemistry* [7], 1005-1016.
- [84] Vignais, P., & Billoud, B. (2007). Occurrence, classification, and biological function of hydrogenases: An overview. *Chemical Reviews*, 107(10), 4206-4272.
- [85] Parkin, A., Cavazza, C., Fontecilla-Camp, J., & Armstrong, F. (2006). Electrochemical investigations of the interconversions between catalytic and inhibited states of the [FeFe]-hydrogenase from *Desulfovibrio desulfuricans*. *Journal of the American Chemical Society*, 128(51), 16808-16815.
- [86] Dementin, S., Belle, V., Bertrand, P., Guigliarelli, B., Adryanczyk-Perrier, G., De Lacey, A., Fernandez, V., Rousset, M., & Léger, C. (2006). Changing the ligation of the distal [4Fe4S] cluster in NiFe hydrogenase impairs inter- and intramolecular electron transfers. *Journal of the American Chemical Society*, 128(15), 5209-5218.
- [87] Krassen, H., Stripp, S., von, Abendroth, G., Ataka, K., Happe, T., & Heberle, J. (2009). Immobilization of the [FeFe]-hydrogenase CrHydA1 on a gold electrode: Design of a catalytic surface for the production of molecular hydrogen. *Journal of Biotechnology*, 142(1), 3-9.
- [88] Zadvornyy, O., Lucon, J., Gerlach, R., Zorin, N., Douglas, T., Elgren, T., & Peters, J. (2012). Photo-induced H₂ production by [NiFe]-hydrogenase from *T. roseopersicina* covalently linked to a Ru(II) photosensitizer. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 106(1), 151-155.
- [89] Reisner, E., Powell, D., Cavazza, C., Fontecilla-Camps, J., & Armstrong, F. (2009). Visible Light-Driven H₂ Production by Hydrogenases Attached to Dye-Sensitized TiO₂ Nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.*, 131(51), 18457-18466.
- [90] Morra, S., Valetti, F., Sadeghi, S., King, P., Meyer, T., & Gilardi, G. (2011). Direct electrochemistry of an [FeFe]-hydrogenase on a TiO₂ Electrode. *Chemical Communications*, 47(38), 10566-10568.
- [91] Brown, K., Wilker, M., Boehm, M., Dukovic, G., & King, P. (2012). Characterization of Photochemical Processes for H₂ Production by CdS Nanorod-[FeFe] Hydrogenase Complexes. *Journal of the American Chemical Society*, 143(12), 5627-5636.
- [92] Brown, K., Dayal, S., Ai, X., Rumbles, G., & King, P. (2010). Controlled Assembly of Hydrogenase-CdTe Nanocrystal Hybrids for Solar Hydrogen Production. *Journal of the American Chemical Society*, 132(28), 9672-9680.
- [93] Mc Donald, T., Svedruzic, D., Kim-H, Y., Blackburn, J., Zhang, S., King, P., & Heben, M. (2007). Wiring-up hydrogenase with single-walled carbon nanotubes. *Nano Letters*, 7(11), 3528-3534.

- [94] Blackburn, J., Svedruzic, D., Mc Donald, T., Kim-H, Y., King, P., & Heben, M. (2008). Raman spectroscopy of charge transfer interaction between single wall carbon nanotubes and [FeFe] hydrogenase. *Dalton Transactions*, 5454-5461.
- [95] Kihara, T., Liu-Y, X., Nakamura, C., Park-M, K., Yasuda-W, S., Qian-J, D., Kawasaki, K., Zorin, N., Yasuda, S., Hata, K., Wakayama, T., & Miyake, J. (2001). Direct electron transfer to hydrogenase for catalytic hydrogen production using a single-walled carbon nanotubes forest. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36(13), 7523-7529.
- [96] Noda, K., Zorin, N., Nakamura, C., Miyake, M., Gogotov, I., Asada, Y., Akutsu, H., & Miyake, J. (1998). Langmuir-Blodgett film of hydrogenase for electrochemical hydrogen production. *Thin Solid Films*, 327-329, 639-642.
- [97] Elgren, T., Zadvorny, O., Brecht, E., Douglas, T., Zorin, N., Maroney, M., & Peters, J. (2005). Immobilization of active hydrogenases by encapsulation in polymeric porous gels. *Nano Letters*, 5(10), 2085-2087.
- [98] Zadvorny, O., Barrows, A., Zorin, N., Peters, J., & Elgren, T. (2010). High level oh hydrogen production activity achieved for hydrogenase encapsulated in sol-gel material doped with carbon nanotubes. *Journal of Materials Chemistry*, 20-1065.
- [99] Fontecave, M., & Artero, V. (2011). Bioinspired catalysis at the crossroads between biology and chemistry: A remarkable example of an electrocatalytic material mimicking hydrogenases. *Compte Rendu Chimie*, 14(4), 362-371.
- [100] Dubois, M., & Dubois, D. (2009). The roles of the first and second coordination spheres in the design of molecular catalysts for H₂ production and oxidation. *Chemical Society Reviews*, 38(1), 62-72.
- [101] Le Goff, A., Artero, V., Jusselme, B., Tran, P. D., Guillet, N., Metaye, R., Fihri, A., Palacin, S., & Fontecave, M. (2009). From Hydrogenases to Noble Metal-Free Catalytic Nanomaterials for H₂ Production and Uptake. *Science*, 326(5958), 1384-1387.
- [102] Yahiro, A., Lee, S., & Kimble, D. (1964). Bioelectrochemistry I. Enzyme utilizing Biofuel cell studies. *Biochimica Biophysica Acta*, 88, 375-383.
- [103] Franks, Ashley. E., & Nevin, Kelly. P. (2010). Microbial Fuel Cells. *A Current Review. Energies*, 3(5), 899-919.
- [104] Zhou, M., Chi, M., Luo, J., He, H., & Jin, T. (2011). An overview of electrode materials in microbial fuel cells. *Journal of Power Sources*, 196(10), 4427-4435.
- [105] Sokic-Lazic, D., & Minteer, S. (2008). Citric acid cycle biomimic on a carbon electrode. *Biosensors Bioelectronics*, 24(4), 939-944.
- [106] Egorova, K., & Antranikian, G. (2005). Industrial relevance of thermophilic Archaea. *Current Opinion in Microbiology*, 8(6), 649-655.
- [107] Halamkova, L., Halamek, J., Bocharova, V., Szczupak, A., Alfonta, L., & Katz, E. (2012). Implanted Biofuel Cell Operating in a Living Snail. *Journal of the American Chemical Society*, 134(11), 5040-5043.

- [108] Cinquin, P., Gondran, C., Giroud, F., Mazabrard, S., Pellissier, A., Boucher, F., Alcaraz, J. P., Gorgy, K., Lenouvel, F., Mathé, S., Porcu, P., & Cosnier, S. (2010). A Glucose BioFuel Cell Implanted in Rats. *PLoS ONE*, 5, e10476.
- [109] Falk, M., Andoralov, V., Blum, Z., Sotres, J., Suyatin, D., Ruzgas, T., Arnebrant, T., & Shleev, S. (2012). Biofuel cell as a power source for electronic contact lenses. *Biosensors Bioelectronics*, 37(1), 38-45.
- [110] Zebda, A., Gondran, C., Le Goff, A., Holzinger, M., Cinquin, P., & Cosnier, S. (2011). Mediatorless high-power glucose biofuel cells based on compressed carbon nanotube-enzyme electrodes. *Nature Com.*, 2-370.
- [111] Zhao, H., Zhou, H., Zhang, J., Zheng, W., & Zheng, Y. (2009). Carbon nanotube-hydroxyapatite nanocomposite: A novel platform for glucose/O₂ biofuel cell. *Biosensors Bioelectronics*, 25(2), 463-468.
- [112] Liu, J., Zhang, X., Pang, H., Liu, B., Zou, Q., & Chen, J. (2012). High-performance bioanode based on the composite of CNTs-immobilized mediator and silk film-immobilized glucose oxidase for glucose/O₂ biofuel cells. *Biosensors Bioelectronics*, 31(1), 170-175.
- [113] Gao, F., Yan, Y., Su, L., Wang, L., & Mao, L. (2007). An enzymatic glucose/O₂ biofuel cell: Preparation, characterization and performance in serum. *Electrochemistry Communications*, 9(5), 989-996.
- [114] Li, X., Zhou, H., Yu, P., Su, L., Ohsaka, T., & Mao, L. (2008). A miniature glucose/O₂ biofuel cell with single-walled carbon nanotubes-modified carbon fiber microelectrodes as the substrate. *Electrochemistry Communications*, 10(6), 851-854.
- [115] Nazaruk, E., Sadowska, K., Biernat, J., Rogalski, J., Ginalska, G., & Bilewicz, R. (2010). Enzymatic electrodes nanostructured with functionalized carbon nanotubes for biofuel cell applications. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 398(4), 1651-1660.
- [116] Lim, J., Malati, P., Bonet, F., & Dunn, B. (2007). Nanostructured sol-gel electrodes for biofuel cells. *Journal of the Electrochemical Society*, 154(2), A140-A145.
- [117] Karaskiewicz, M., Nazaruk, E., Zelchowska, K., Biernat, J., Rogalski, J., & Bilewicz, R. (2012). Fully enzymatic mediatorless fuel cell with efficient naphthylated carbon nanotube-laccase composite cathodes. *Electrochemistry Communications*, 20-124.
- [118] Tasca, F., Gorton, L., Harreither, W., Haltrich, D., Ludwig, R., & Nöll, G. (2008). Highly efficient and versatile anodes for biofuel cells based on cellobiose dehydrogenase from *Myriococcus thermophilum*. *Journal of Physical Chemistry C*, 112(35), 13668-13673.
- [119] Wang, Y., & Yao, Y. (2012). Direct electron transfer of glucose oxidase promoted by carbon nanotubes is without value in certain mediator-free applications. *Microchimica Acta*, 176(3-4), 271-277.

- [120] Vincent, K., Parkin, A., & Armstrong, F. (2007). Investigating and exploiting the electrocatalytic properties of hydrogenases. *Chemical Reviews*, 107(10), 4366-4413.
- [121] Liebgott, P. P., de Lacey, A., Burlat, B., Cournac, L., Richaud, P., Brugna, M., Fernandez, V., Guigliarelli, B., Rousset, M., Léger, C., & Dementin, S. (2011). Original Design of an Oxygen-Tolerant [NiFe] Hydrogenase: Major Effect of a Valine-to-Cysteine Mutation near the Active Site. *Journal of the American Chemical Society*, 133(4), 986-997.
- [122] Cracknell, J. A., Vincent, K. A., Ludwig, M., Lenz, O., Friedrich, B., & Armstrong, F. A. (2008). Enzymatic Oxidation of H₂ in Atmospheric O₂: The Electrochemistry of Energy Generation from Trace H₂ by Aerobic Microorganisms. *Journal of the American Chemical Society*, 130(2), 424-425.
- [123] Luo, X. J., Brugna, M., Infossi, P., Giudici-Orticoni, M. T., & Lojou, E. (2009). Immobilization of the hyperthermophilic hydrogenase from *Aquifex aeolicus* bacterium onto gold and carbon nanotube electrodes for efficient H₂ oxidation. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 14(8), 1275-1288.
- [124] Svedruzic, D., Blackburn, J., Tenent, R., Rocha, D. J., Vinzant, T., Heben, M., & King, P. (2011). High-performance hydrogen production and oxidation electrodes with hydrogenase supported on metallic single-wall carbon nanotubes networks. *Journal of the American Chemical Society*, 133(12), 4299-4306.
- [125] Sun, Q., Zorin, N. A., Chen, D., Chen, M., Liu, X. T., Miyake, J., & Qian, J. D. (2010). Langmuir-Blodgett films of pyridyldithio-modified multiwalled carbon nanotubes as a support to immobilize hydrogenase. *Langmuir*, 26(12), 10259-10265.
- [126] Hoeben, F. J. M., Heller, I., Albracht, S. P. J., Dekker, C., Lemay, S. G., & Heering, H. A. (2008). Polymyxin-coated Au and Carbon nanotubes electrodes for stable [NiFe]-hydrogenase film voltammetry. *Langmuir*, 24(11), 5925-5931.
- [127] Baur, J., Le Goff, A., Dementin, S., Holzinger, M., Rousset, M., & Cosnier, S. (2011). Three-dimensional carbon nanotube-polypyrrole-[NiFe] hydrogenase electrodes for the efficient electrocatalytic oxidation of H₂. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36(19), 12096-12101.
- [128] Ciaccafava, A., Infossi, P., Ilbert, M., Guiral, M., Lecomte, S., Giudici-Orticoni, M. T., & Lojou, E. (2012). Electrochemistry, AFM, and PM-IRRA Spectroscopy of Immobilized Hydrogenase: Role of a Hydrophobic Helix in Enzyme Orientation for Efficient H₂ Oxidation. *Angewandte Chemie International Edition*, 51(4), 953-956.
- [129] Volbeda, A., Amara, P., Darnault, C., Mouesca, J. M., Parkin, A., Roessler, M. M., Armstrong, F. A., & Fontecilla-Camps, J. C. (2012). X-ray crystallographic and computational studies of the O₂-tolerant [NiFe]-hydrogenase 1 from *Escherichia coli*. *Proceeding of the National Academic Sciences*, 10(14), 5305-5310.
- [130] Shomura, Y., Yoon, S. K., Nishihara, H., & Higuchi, Y. (2011). Structural basis for a [4Fe-3S] cluster in the oxygen-tolerant membrane-bound [NiFe]-hydrogenase. *Nature* NIL_143., 479(7372), 253.

- [131] Pandelia, M., Fourmond, V., Tron, P., Lojou, E., Bertrand, P., Léger, C., Giudici-Orticoni, M. T., & Lubitz, W. (2010). Membrane-Bound Hydrogenase I from the Hyperthermophilic Bacterium *Aquifex aeolicus*: Enzyme Activation, Redox Intermediates and Oxygen Tolerance. *Journal of the American Chemical Society*, 132(20), 6991-7004.
- [132] Fritsch, J., Scheerer, P., Frielingsdorf, S., Kroschinsky, S., Friedrich, B., Lenz, O., & Spahn, C. M. T. (2011). The crystal structure of an oxygen-tolerant hydrogenase uncovers a novel iron-sulphur centre. *Nature* NIL_134., 479(7372), 249.
- [133] Krishnan, S., & Armstrong, F. A. (2012). Order-of-magnitude enhancement of an enzymatic hydrogen-air fuel cell based on pyrenyl carbon nanostructures. *Chemical Science*, 3(4), 1015-1023.
- [134] Vincent, K., Cracknell, J., Clark, J., Ludwig, M., Lenz, O., Friedrich, B., & Armstrong, F. (2006). Electricity from low-level H₂ in still air- an ultimate test for an oxygen tolerant hydrogenase. *Chemistry Communications*, 5033-5035.
- [135] Wait, A., Parkin, A., Morley, G., dos, Santos, L., & Armstrong, F. (2010). Characteristics of enzyme-based hydrogen fuel cells using an oxygen-tolerant hydrogenase as the anodic catalyst. *Journal of Physical Chemistry C*, 114(27), 12003-12009.
- [136] Ciaccafava, A., de Poulpique, A., Techer, V., Giudici-Orticoni, M. T., Tingry, S., Innocent, C., & Lojou, E. (2012). An innovative powerful and mediatorless H₂/O₂ biofuel cell based on an outstanding bioanode. *Electrochemistry Communications*, 23, 25-28.
- [137] Infossi, P., Lojou, E., Chauvin, J. P., Herbette, G., Brugna, M., & Giudici-Orticoni, M. T. (2010). *Aquifex aeolicus* membrane hydrogenase for hydrogen biooxidation: role of lipids and physiological partners in enzyme stability and activity. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35(19), 10778-10789.
- [138] Reuillard, B., Le Goff, A., Agnès, A., Zebda, A., Holzinger, M., & Cosnier, S. (2012). Direct electron transfer between tyrosinase and multi-walled carbon nanotubes for bioelectrocatalytic oxygen reduction. *Electrochemistry Communications*, 20, 19-22.
- [139] Durand, F., Kjaergaard, C., Suraniti, E., Gounel, S., Hadt, R., & Solomon, E. (2012). Mano N Bilirubin oxidase from *Bacillus pumilus*: A promising enzyme for the elaboration of efficient cathodes in biofuel cells. *Biosensors Bioelectronics*, 35(1), 140-146.

Exploring Properties of a Hyperthermophilic Membrane-Bound Hydrogenase at Carbon Nanotube Modified Electrodes for a Powerful H₂/O₂ Biofuel Cell

Anne De Poulpiquet,^a Alexandre Ciaccafava,^a Katarzyna Szot,^b Baptiste Pillain,^a Pascale Infossi,^a Marianne Guiral,^a Marcin Opallo,^b Marie-Thérèse Giudici-Ortoni,^a Elisabeth Lojou*^a

^a Unité de Bioénergétique et Ingénierie des Protéines, UMR7281-FR3479, CNRS, AMU, Marseille, France
tel: +33 491164524, fax: +33 491164097

^b Institute of Physical Chemistry, Polish Academy of Sciences, ul. Kasprzaka 44/52, 01-224 Warszawa, Poland
*e-mail: lojou@imm.cnrs.fr

Received: July 27, 2012

Accepted: November 6, 2012

Published online: January 15, 2013

Abstract

Hydrogenases are the key enzymes for hydrogen metabolism in many microorganisms. Due to the high efficiency and specificity they developed for H₂ oxidation, they have been recently used as biocatalysts for an efficient H₂/O₂ biofuel cell. In this work we explore new properties of an O₂⁻, CO- and T⁺-resistant hydrogenase. Enzyme immobilization on carbon nanotube modified electrodes is studied and optimized for long-term stabilization of the direct hydrogen catalytic oxidation process. The role of co-immobilized redox mediator is finally discussed in view of H₂/O₂ fuel cell performance enhancement.

Keywords: Hydrogenase, Carbon nanotube, Biofuel cell, Immobilization, Electrochemistry

DOI: 10.1002/elan.201200405

Supporting Information for this article is available on the WWW under <http://dx.doi.org/10.1002/elan.201200405>.

1 Introduction

Microorganisms couple enzymatic reactions via a membrane quinone pool with generation of a proton gradient for the synthesis of ATP, their energy source [1,2]. This energetic pathway can be considered as an “in vivo fuel cell”, and led to the concept of biofuel cells as a new valuable source for our energy needs. Biofuel cells function like chemical low temperature fuel cells (proton exchange membrane (PEM) fuel cell), coupling the oxidation of a fuel at the anode with the reduction of an oxidant at the cathode, but using enzymes instead of expensive and scarce platinum catalysts [3]. There are numerous advantages of enzymatic biofuel cells. Biocatalysts are widespread and biodegradable. They exhibit high efficiency and specificity for their substrates that might allow designing fuel cells without separator. A large variety of fuels and oxidants can be used as many enzymes which differ by their natural abundant substrates are nowadays characterized. Finally, biofuel cells can deliver power under mild working conditions typical for enzymes, namely at mild pH and temperatures. However, some extremophilic enzymes operate at extreme acidic or basic pH, as well as at high temperatures (up to 90 °C) or high pressures, offering the possibility of developing biofuel

cell devices for special applications requiring extreme working conditions [4].

So far sugar/O₂ is the most common fuel/oxidant couple to power biofuel cells, essentially because of its abundance in nature and essential role in living metabolism [5–7]. Glucose oxidase and copper proteins, such as laccase and bilirubin oxidase (BOD), were largely studied as biocatalysts for glucose oxidation and O₂ reduction, respectively. All over the last ten years, thanks to great research in engineering of enzymes, electrochemical interfaces and cell design, power densities as high as 1 mW cm⁻² were recently reached [8–10]. The step for biofuel cell credibility was jumped and some emerging applications are nowadays reported [11–13].

A few years ago, a new type of biofuel cells, based on an enzyme specific for dihydrogen oxidation, the hydrogenase, was developed [14]. This H₂/O₂ biofuel cell is directly inspired from PEM fuel cell, and is expected to yield the highest massic energy output. Various types of hydrogenases are available, differing by the metal content of their active site, their activity towards H₂ uptake or evolution, and their localization in bacterial cells. All [NiFe] hydrogenases from the group 1 [15] share a similar structure, composed of two subunits with a molecular weight around 100 kDa. The large subunit harbors the active [NiFe] centre where dihydrogen is cleaved. In the

small subunit three FeS clusters drive the electrons from the active site to the surface of the enzyme, where the redox partners (including the electrode) bind for accepting electrons [16]. It was reported that [NiFe] hydrogenases can be as efficient as platinum catalysts when immobilized on an electrode [17–19]. Unfortunately, the extreme oxygen sensitivity of most hydrogenases slowed down their potential use as biocatalysts in biofuel cells [17]. However, in very recent years, in addition to fundamental studies that aim at improving and overcoming O₂ sensitivity of classical hydrogenases [20], four [NiFe] membrane-bound hydrogenases have been characterized from aerobic or extremophilic organisms [21–24]. They have been demonstrated to oxidize H₂ in the presence of oxygen and CO. This tolerance may be related to an uncommon geometry of the FeS cluster proximal to the active site. Given an efficient immobilization of these hydrogenases on electrodes, these new biocatalysts appear as attractive candidates for fuel oxidation in a powerful H₂/O₂ biofuel cell.

Recently, we reported on the electrochemistry of one of these O₂- and CO resistant hydrogenases. It is a membrane-bound [NiFe] hydrogenase purified from *Aquifex aeolicus* (*Aa*), a hydrogen-oxidizing, microaerophilic bacterium growing at 85 °C [16,25]. This hydrogenase from *Aa* (MbH1) is involved in a complex with a diheme cytochrome *b* anchored in the membrane, coupling H₂ oxidation to O₂ reduction. Efficient MbH1 immobilization for direct H₂ oxidation was achieved by different strategies like (i) adsorption on pyrolytic graphite electrode (PG) [26], in buffer electrolytes and room temperature ionic liquids [27], (ii) adsorption on self-assembled-monolayer (SAM) modified gold electrode [28], or (iii) connection to a redox polymer film [29]. As MbH1 is membrane-bound, encapsulation in liposomes was shown to enhance the enzyme stability at the electrode [30]. A complete understanding of the role of the detergent in the immobilization process was also undertaken [31], which clearly put forwards that detergent stabilizes the enzyme and has less affinity for the electrode than the enzyme. It was proved to allow high direct electron transfer process for H₂ oxidation on charged or hydrophilic surfaces, even at concentrations above the micellar concentration.

However, H₂/O₂ biofuel cells domain is still in its infancy. Only two of these biofuel cells have been fully described so far [32,33]. Their performances rely on the modification of electrodes by carbon nanotube (CNT) networks. Both the interfacial electron transfer rate, and the amount of enzymes directly connected to the electrode are supposed to be increased due to high conductivities, large surface areas and tuned functionalization of carbon nanotubes. This was first underlined in our group for *D. fructosovorans* hydrogenase, then MbH1 [26,34], and successfully applied to *E. coli* hydrogenase. Using covalent attachment of both O₂ resistant *E. coli* hydrogenase and BOD on pyrene derivative functionalized multiwalled carbon nanotubes, a membrane-less biofuel cell was designed, that was fed with a nonexplosive 80/20 di-

hydrogen/air mixture [32]. This biofuel cell displayed quite good stability with time and an average power density of 119 μWcm⁻². Based on MbH1 at the anode and BOD at the cathode, we built a 300 μWcm⁻² H₂/O₂ mediator biofuel cell. It was architected with one step covalent attachment on a single-walled carbon nanotube (SWCNT) coating of MbH1 at the anode and BOD at the cathode [33].

In view of improvement of the H₂/O₂ biofuel cell based on MbH1 at the anode, enhancement of both long term stability and current density is needed. Therefore, we study in this work various procedures for architecturing the CNT coating and for stabilizing MbH1 at the CNT layer. Although many studies have been done about the catalytic mechanisms for H₂ oxidation by hydrogenase [17], physicochemical data on MbH1 electrochemistry are still lacking. The influence of physicochemical parameters, such as pH and ionic strength, on the direct H₂ oxidation by MbH1 immobilized on CNT networks is thus reported in this work. It was previously demonstrated that the H₂/O₂ biofuel cell performance was limited by hydrogenase inhibition at high potentials [33]. The addition of an appropriate redox mediator that could compensate for this limitation is finally discussed in the present work.

2 Experimental

2.1 Reagents

All used reagents were analytical grade and the solutions were prepared using Milli-Q water. 4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid (HEPES) was used for MbH1 dilution and as the supporting electrolyte at pH 6.8 and 50 mM concentration. For pH studies, both electrochemistry and spectrophotometric assays were realized in Britton–Robinson buffer, adjusted at the desired pH using NaOH. *N*-(3-Dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC), *N*-hydroxysuccinimide (NHS), *n*-dodecyl β-D-maltoside (DDM) were purchased at Sigma. Nafion 5% alcoholic solution from Sigma was diluted in water for coatings. Procedure for preparing gels of Nafion and tetrabutylammonium bromide salts was realized as described in [35]. SWCNTs and carboxylic functionalized MWCNTs were purchased at Sigma. Multiwalled carbon nanotubes with 0.5% NH₂ functions (MWCNT-NH₂) were purchased at DropSens and used with no purification.

2.2 Purification of MbH1

MbH1 was purified as described by Luo et al. [26]. Excess of DDM detergent used for the solubilization of MbH1 from the bacterial cell membrane extracts is removed using concentrator Vivaspin (cut off 100 K, 2500 xg) and Bio-beads SM2 (Bio-rad) for 2 h at 4 °C. Final DDM concentration was determined as described in [31] to ensure correct micellar concentration before

enzyme dilution. MbH1 activity assays were performed at 80 °C by the hydrogen consumption assay using methylviologen as the electron acceptor and hydrogen as the electron donor [26]. The hydrogen-dependant reduction rate of methyl viologen was followed spectrophotometrically at 604 nm using a Cary winUV50 with Peltier accessory for temperature control. MbH1 activity was also revealed using blue native gels with H₂ as electron donor and methyl viologen as electron acceptor at 80 °C. Reduction of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride by reduced methyl viologen produces on gels the pink colour which is characteristic of hydrogenase activity [24].

2.3 Electrochemistry Experiments

Cyclic voltammetry (CV) was done using a PARSTAT 2273 potentiostat from Princeton Applied Research (PAR). A conventional three-electrode system was used with a Ag/AgCl/NaCl (sat.) reference electrode, and a platinum wire as auxiliary electrode. All potentials were quoted against the Ag/AgCl reference. Prior to each experiment, the solutions were deoxygenated by bubbling with high-purity nitrogen or hydrogen. The temperature of the electrochemical cell was regulated using a water bath. The reference electrode was separated from the warmed electrolyte using a side junction maintained at room temperature. The direct catalytic current for H₂ oxidation was measured at the potential where the current leveled off. Current densities are referred to the electrode geometric area. For comparative data, normalized currents are preferred and referred to the maximum current obtained. The addition of CV signals was realized by addition of the current value at each potential value after subtraction of the capacitive current.

2.4 Design of the Working Electrode

The graphite working electrode was constructed from 3 mm rods of pyrolytic graphite (PG) inserted in Peek polymer casings from Bio-Logic SAS. The PG electrode was carefully polished on wet fine emery papers (PRESI, P800 then P1200). After polishing, the PG electrode was washed thoroughly with water, then ethanol, followed by sonication and rinsed again with water. The membrane electrode technology was used for some electrochemical measurements. Briefly, an aliquot of 5 µL of the buffer containing or not the enzyme was deposited on the electrode. The electrode was then gently pressed against a square piece of dialysis membrane (Visking membrane – MWCO 6000–8000). A rubber ring was fitted around the electrode body so that the volume between the membrane and the electrode surface corresponded to a uniform thin layer of less than 50 µm [36–38].

SWCNT were functionalized with carboxylic groups (SWCNT-COOH) as described by Lojou et al. [34] and diluted in Milli-Q water. They were dispersed in ultrasonic bath before coating. SWCNT-COOH solution was dropped on the PG electrode under N₂ atmosphere until

complete drying. For carbodiimide coupling between the carbon nanotube and MbH1, the SWCNT-COOH modified PG electrode was dipped in a 40 mM/10 mM EDC/NHS solution, for half an hour. Then, 5 µL of 2 µM MbH1 were deposited on the surface and left to dry for covalent attachment under N₂ stream on the bench. The optimization of EDC/NHS covalent coupling was realized after incubation of 10 µg MbH1 in a solution of EDC/NHS at different concentrations in 50 mM Hepes buffer pH 6.8 for one hour. Enzymes were then denatured by a combination of reducing agent (2-β-mercaptoethanol) and heating procedure. Samples were finally separated on a classical denaturing 8–16% Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE).

3 Results and Discussion

3.1 Carbon Nanotube Coatings for an Enhanced H₂ Oxidation Process by Immobilized MbH1

We earlier demonstrated that the orientation of immobilized MbH1 cannot be controlled simply by electrostatic interaction because of the absence of a high dipole moment and a charged patch surrounding the distal FeS cluster situated at the surface of the enzyme [28]. In addition, we have shown that a hydrophilic domain near the distal FeS cluster is formed by the trans-membrane helix surrounded by neutral detergent. As a consequence, a distribution of orientations always exists for the hydrogenase immobilized at charged electrochemical interfaces. We thus observed that direct but also mediated H₂ oxidation proceeded at SAM modified gold electrodes presenting either positive or negative end-functions [28]. Figure 1 shows comparative CV curves for H₂ oxidation by MbH1 immobilized on a SWCNT-COOH or a MWCNT-NH₂ coating, at 60 °C under H₂. For comparison, H₂ oxidation curve by MbH1 on a bare PG is overlaid.

In agreement with our findings on SAM modified gold electrodes [28], efficient direct oxidation of H₂ is recorded with MbH1 immobilized either on SWCNT-COOH or MWCNT-NH₂ films. Deposition of modified CNTs on PG is clearly advantageous: it results in more than 15 fold enhancement of catalytic current. The change of the electrode material from PG to the SWCNT-COOH film does not affect the shape of the catalytic curve. H₂ oxidation proceeds at an overpotential of less than 150 mV and levels off at potentials higher than –200 mV. This reversible inhibition may be due to the formation of an inactive state of MbH1, most probably with a hydroxide bridging Fe and Ni at the active site. Using MWCNT-NH₂ as a CNT platform, a higher MbH1 concentration is needed to observe a direct H₂ oxidation current. We already noticed this feature by modifying the electrode with non-purified MWCNT-COOH. In that case, only concentrations of MbH1 higher than 20 µM yielded detectable direct catalytic current. Furthermore the shape of the voltammogram obtained for MWCNT-NH₂ electrode is quite unusual and needs further investigation.

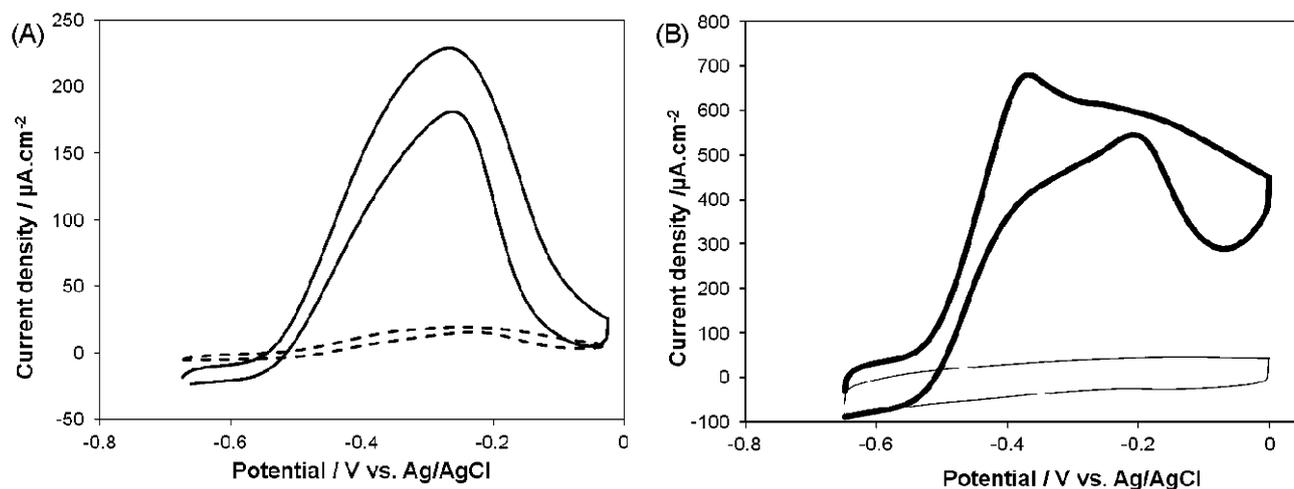


Fig. 1. Comparative cyclic voltammograms for (A) 2 μM MbH1 adsorbed on bare (dashed line) and SWCNT-COOH modified (black line) PG electrodes, and (B) 2 μM (fine line) and 20 μM (bold line) MbH1 adsorbed on MWCNT-NH₂ modified PG electrodes. 5 μg SWCNT-COOH and MWCNT-NH₂ in one layer were used for modification. Scan rate: 5 mV s^{-1} , 60°, 50 mM Hepes, pH 6.8 under H₂.

In order to optimize the carbon nanotube coating for direct H₂ oxidation, the amount of SWCNT-COOH deposited on the PG electrode was varied. For that purpose, a suspension of increasing CNT concentration was deposited on the electrode in one, two, three or four layers. Each layer corresponded to 5 μL of the CNT solution. After drying, 5 μL of 2 μM MbH1 were deposited on the coating. In Table 1 are gathered the values for the film capacitance obtained from the measure of the current at -0.65 V where no faradic current occurred.

Capacitance values increase with increasing amount of CNTs. Amounts as high as 0.9 mg cm^{-2} of CNTs can be deposited on the PG surface. However, the organization of the film may be different according to the procedure used, as capacitance values do not follow a linear increase with CNT amounts. As an example, the deposit of 20 μg of CNTs in one layer or 2 \times 10 μg in two successive layers, or 4 \times 5 μg in 4 successive layers yields capacitances of 3.62, 2.76 and 1.46 mF, respectively. Electrode modifications by LBL thus induce 3D organization of the CNT films, which may be driven by the CNT concentration in suspension, the homogeneity of the suspension and the amount of layers on the electrode. The evolution of the catalytic current for H₂ oxidation according to the

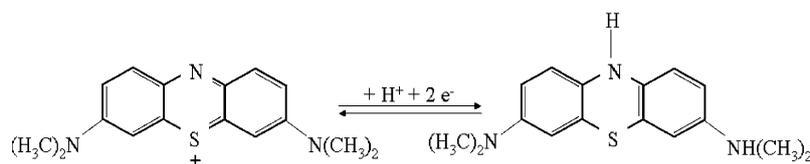
amount of CNTs which has been deposited is also reported in Table 1. Catalytic currents for direct H₂ oxidation increase with increasing amount of CNTs but quickly level off. The saturation of the anchoring sites on the carbon nanotubes and the mass transfer limitation through the coating are most probably responsible for that phenomenon. Otherwise, the different organization depicted by the capacitance values according to the deposit procedure has little effect on the catalytic current. These data suggest that MbH1 is mainly in interaction with the outer layers of CNTs, with few opportunities to occupy the film volume. Combining the values of film capacitance and catalytic current, an optimized deposit was chosen for the following experiments: two layers of 10 μg of SWCNT-COOH.

3.2 Stability of the Carbon Nanotube Coating

The stability of the SWCNT coating was evaluated by following the evolution of the redox signal of a redox probe in time. Methylene blue (MB) was chosen because it acts as an efficient redox mediator for MbH1 [28] and it adsorbs on carbon-based materials including CNTs. As expected, the electrochemical signal for MB is characterized

Table 1. Capacitance and catalytic current for H₂ oxidation by MbH1 adsorbed on SWCNT-COOH films coated on a PG electrode. One layer corresponds to a volume of 5 μL of CNT suspension.

Number of layers	SW CNTs-COOH concentration					
	4 mg mL^{-1}		2 mg mL^{-1}		1 mg mL^{-1}	
	Capacity (mF)	i (μA)	Capacity (mF)	i (μA)	Capacity (mF)	i (μA)
1	3.62	26	1.56	28.9	0.74	17.2
2	4.76	38.5	2.76	36.6	1.16	29.4
3	5.86	38.9	2.92	35.5	1	30
4			4.2	33.2	1.46	34.9



Scheme 1.

at the bare PG electrode by a single reversible redox wave at -240 mV at pH 6.8, according to the redox reaction 1 (Scheme 1).

A steady state is obtained from the first voltammetric cycle. The variation of the peak current with scan rate after electrode transfer in pure buffer demonstrates adsorption of MB on the PG surface. At a CNT-modified electrode, the redox wave is slightly moved cathodic. Consecutive CV curves demonstrating MB adsorption progress on the SWCNT-COOH coating were then recorded. Both capacitance of the film and anodic current for MB before and after electrode transfer in pure buffer are reported in Table 2.

After consecutive cycles in MB solution the peak currents reach maximal values 20 times larger. This suggests progressive adsorption of MB on the surface and within the pores of the CNT film. The maximal value of the current is also 20 fold higher than at the bare PG electrode because of the increase in surface area. Some drop in current is recorded after transfer because of some leakage of MB molecules that were not strongly adsorbed in the SWCNT film. However the remaining signal is linear with the scan rate denoting an adsorption-limited process. It is very stable in time, with no decrease of the current or the capacitance over 15 cycles (i.e. 30 min) whatever the pH. The mean redox potential of MB follows a 25 mV/U pH dependence, which only slightly differs from what is expected at a bare electrode. The redox reaction becomes less reversible at nonneutral pH, ΔE_p reaching for example 160 mV at pH 5. Only a slight variation of current and capacitance in time can be measured after electrode transfer in the presence of 200 mM NaCl in solution. The adsorption of CNTs on the PG electrode is most probably stabilized by π - π interactions.

3.3 Stability of the Biohybrid Electrode

In our previous work using MbH1 for direct H_2 oxidation at SWCNT modified electrodes, although high current densities were reached with large MbH1 concentration (40 μ M), we noted a very quick decrease of the catalytic current [26]. Up to 70% of the catalytic current was lost after one hour at 60°C . Thus a mandatory condition before use of MbH1 for H_2 oxidation in biofuel cells is the long term stabilization of the catalytic current. With this objective in mind we have explored in this work three different procedures of immobilization of MbH1 on an electrode.

In Figure 2A the time dependences of direct catalytic currents for H_2 oxidation obtained on electrode modified by the different procedures are compared. In a first procedure, the membrane electrode was used.

In the absence of dialysis membrane, a continuous decrease of the current is observed, being only 62% of the initial current after 20 min of continuous cycling between -0.65 and 0 V. In the presence of the dialysis membrane, H_2 oxidation with MbH1 adsorbed on SWCNT-COOH films appears to be stable, at least for 20 min of continuous cycling. This result slightly differs from that we obtained before at the membrane PG electrode in the absence of CNTs [29]. The decrease in current we recorded even at the membrane PG electrode led us to make the assumption that other processes than leakage, including reorientation and inactivation of MbH1 at the electrochemical interface might be involved. The advantage of using a CNT coating on the PG electrode is the large mesoporous developed surface area which is induced with many anchorage sites (Figure 3). This platform favors direct enzyme connection, thus enabling a stabilization of the direct catalytic current.

Although allowing stabilization of the electrochemical signal recorded at CNT-modified electrode, the mem-

Table 2. Capacitance and anodic current evolution in time for MB at different pH and in the absence and presence of NaCl.

	MB adsorption				Transfer			
	1st cycle		Last cycle		1st cycle		Last cycle	
	I (μ A)	Capacitance (mF)						
no NaCl, pH 6.8	2	2.5	48 ± 2.7	2.5 ± 0.1	40.5 ± 2.7	2.2 ± 0.1	40.5 ± 3.1	2.2 ± 0.1
[NaCl]200 mM, pH 6.8	0.4 ± 0.1	1.7 ± 1.1	24 ± 0.4	1.8 ± 0.6	16.4 ± 1.2	1.7 ± 0.2	15.6 ± 1.1	1.8 ± 0.2
no NaCl, pH 5	2.4 ± 0.5	1.9 ± 0.1	33.5 ± 0.1	1.9 ± 0.2	32.2 ± 4.8	1.6 ± 0.2	32.2 ± 6	1.6 ± 0.3
no NaCl, pH 9	1.4	2.5 ± 0	39.2 ± 5.9	2.5 ± 0.1	35.4 ± 1.9	2.3 ± 0.2	35.4 ± 1.9	2.3 ± 0.2

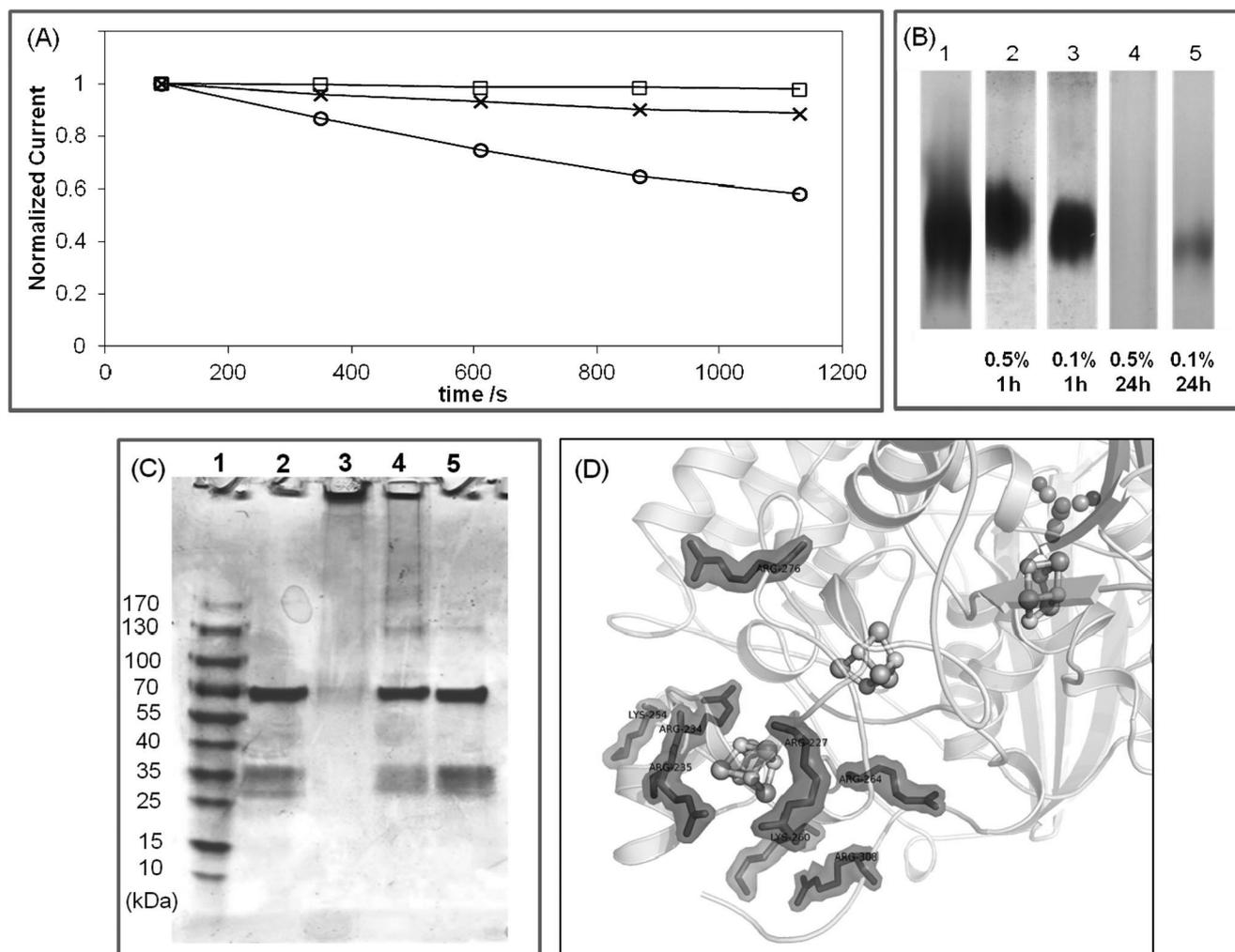


Fig. 2. Comparison between immobilization procedures of MbH1 on SWCNT-COOH modified PG electrodes. (A) Evolution with time of the catalytic currents for H_2 oxidation by $2 \mu M$ MbH1 immobilized (\circ) by simple adsorption, (\square) in the membrane configuration, (\times) via EDC/NHS coupling. (B) Native blue gels showing the effect of Nafion on $2 \mu M$ MbH1 activity: from left to right: 1) MbH1 after 24 h at $4^\circ C$, 2) MbH1 after 1h incubation in Nafion 0.5%, 3) MbH1 after 1h incubation in Nafion 0.1%, 4) MbH1 after 24h incubation in Nafion 0.5%, 5) MbH1 after 24 h incubation in Nafion 0.1%. (C) EDC/NHS covalent coupling: SDS gels stained with Coomassie Blue from left to right: 1) Molecular weight markers, 2) MbH1, 3) MbH1 with 400/100 mM EDC/NHS, 4) MbH1 with 40/10 mM EDC/NHS, 5) MbH1 with 4/1 mM EDC/NHS. (D) Arginine (in red) and Lysine (in blue) residues present in a sphere of 12 \AA radius centered on the FeS distal cluster of MbH1. MbH1 modelization is based on *R. eutropha* membrane-bound hydrogenase as a template (PDB ID: 3RGW [24]).

brane configuration is not convenient for future bioelectrochemical devices such as biofuel cells. Search for membrane replacement led us to explore the possibility of using polymers such as perfluorinated Nafion or Eastman AQ [39,40]. These polymer matrices behave as cation exchangers, and have been used earlier in our laboratory to entrap proteins such as cytochromes [40]. Recently, Reuillard et al. protected a tyrosinase based bioelectrode from leakage using a film of 0.5% Nafion [41]. Morra et al. covered an electrode modified by [FeFe] hydrogenase from *Clostridium acetobutylicum* with a layer of Nafion neutralized by tetraethylammonium bromide [42]. This layer was supposed to decrease enzyme leakage and protect the hydrogenase from O_2 inactivation. When compared to unprotected electrode, a decrease of the current

was observed due to mass transport limitations, concomitantly with a less pronounced current decay.

In this work, the PG electrode was modified by a SWCNT-COOH layer, then MbH1 was added. After drying, a layer of Nafion diluted to 0.05, 0.1 or 0.5% was dropped on the enzyme layer. The films obtained from the most diluted Nafion solutions did not help in stabilizing the electrocatalytic current. For 0.5% Nafion concentrations no catalytic current was observed. Otherwise, when either the Nafion layer was formed before MbH1 adsorption or when a mixture of Nafion and MbH1 was deposited at the CNT modified PG electrode, again no catalytic current could be observed. Oxygen reduction at $-0.4 V$ was only slightly diminished in the presence of 0.5% Nafion, showing that gas diffusion through the

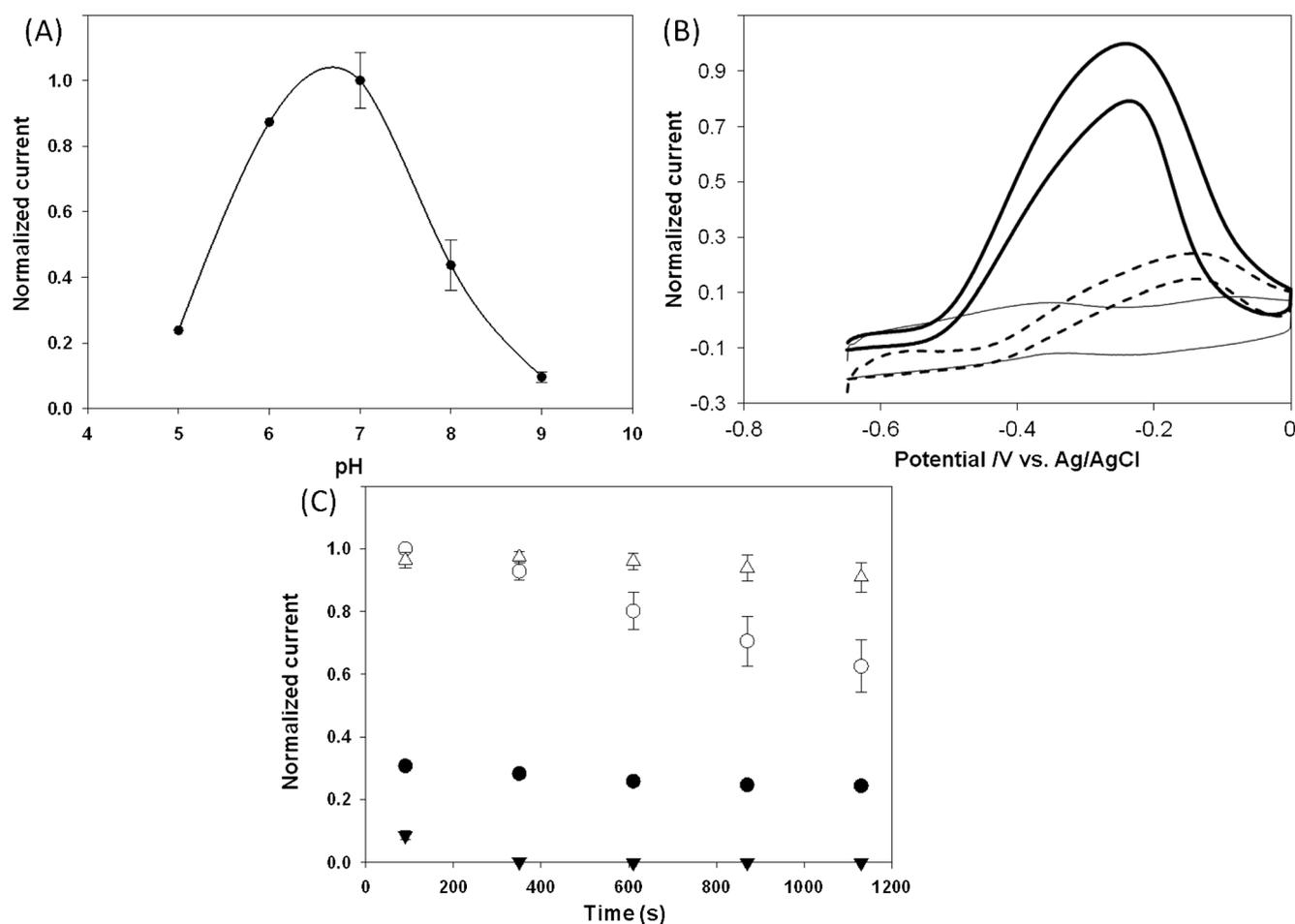


Fig. 3. Evolution with pH of H_2 oxidation by MbH1 adsorbed on SWCNT-COOH modified PG electrode; (A) direct catalytic current evolution with pH; (B) CV curves for pH 5 (dashed line), pH 7.5 (bold line) and pH 9 (fine line); (C) evolution with time of the catalytic current for H_2 oxidation by MbH1 simply adsorbed at pH 5 (\diamond), pH 9 (\circ), pH 7.5 (\times) or covalently coupled at pH 7.5 (\oplus). Britton–Robinson Buffer, 60°C , 5 mVs^{-1} .

polymer film is not responsible for the vanishing of the catalytic current. The effect of both Nafion concentration (0.5 and 0.1%) and incubation time with MbH1 (1 and 24 h) was evaluated using blue native gels (Figure 2B). In the time scale of the electrochemistry experiment, Nafion has no strong effect on MbH1 activity, even when incubation is realized using 0.5% Nafion. However, upon longer incubation times, gels clearly show that no activity can be detected in the presence of 0.5% Nafion, while MbH1 alone is still active. This activity is retained, although far less pronounced, using 0.1% Nafion. Electrical insulation of MbH1 due to wrapping by the charged polymer can explain the absence of electrocatalytic signal at electrodes covered by 0.5% Nafion films. A preliminary experiment performed by incubating 0.5% Nafion polymer with tetrabutylammonium bromide salts tends to confirm this hypothesis. It was previously reported that such polymer exhibited larger pore size [35]. In this work, the salt addition allowed to recover H_2 catalytic oxidation, although the current was still lower than in the absence of Nafion. Interestingly, a stabilization of the catalytic current was observed (Supporting Information S1).

The third procedure for MbH1 immobilization is based on enzyme cross-linking. This procedure is commonly used in the case of stabilization of bioelectrodes. As examples nitrite, L-arginine or glucose biosensors were constructed based on cross-linking by means of glutaraldehyde of nitrite reductase, arginase and urease, and cellobiose dehydrogenase, respectively [43–45]. Cross-linking by glutaraldehyde was supposed to suppress leakage of the enzymes. Here, electrochemically active MbH1 adsorbed on a PG electrode was exposed for a few minutes to glutaraldehyde vapor. After soaking in HEPES buffer, the bioelectrode exhibited smaller activity towards H_2 oxidation, however (Supporting Information S2). This result can be understood taking into account that glutaraldehyde is known to accentuate protein aggregation [46].

Carbodiimide coupling was thus used for covalent coupling between the carboxylic-functionalized SWCNT-COOH and lysine and arginine residues on the surface of MbH1. Various procedures exist to perform this coupling in the literature, including different EDC/NHS concentrations and incubation durations. In a very recent report, Krishnan et al. observed an enhanced and stabilized

signal for H₂ oxidation by covalent coupling of *E. coli* hydrogenase on pyrene-functionalized multiwalled carbon nanotubes [32]. The authors used unusually high concentration of EDC/NHS to realize the coupling. Although the need for such a high concentration can be linked in this case to the Tris Buffer, i.e. an amine-based buffer, the determination of the optimal EDC/NHS concentration that allows the coupling while avoiding aggregation is necessary. We used denaturing SDS gels for that purpose (Figure 2C). The large and the small sub-units of MbH1 expected at 72 and 34 kDa are present on the gels when MbH1 is incubated with EDC/NHS of 4/1 and 40/10 mM. Based on blue native gels, these EDC/NHS concentrations were shown to allow similar hydrogenase activity as with no coupling agent. Conversely, no enzyme is revealed using 400/100 mM EDC/NHS, suggesting inactive aggregation of the enzyme due to an excessive amount of coupling agent (Figure 2C, line 3).

After covalent coupling of MbH1 using the optimized 40/10 mM EDC/NHS concentration, direct catalytic current for H₂ oxidation was observed. This was expected since among more than seventy lysine and arginine residues exposed to solvent, seven are present in the vicinity of the distal FeS cluster within a distance compatible with direct electron transfer (Figure 2D). Moreover, the stability of the catalytic current was significantly increased as compared to adsorbed MbH1 (Figure 2A). Whereas the catalytic current was 60% of the initial value after 20 min with MbH1 adsorbed on CNT modified electrode, 90% of the initial current remained, using covalent coupling with 40/10 mM EDC/NHS.

3.4 pH Effect on Direct H₂ Oxidation by MbH1

In view of the development of a membraneless H₂/O₂ biofuel cell, knowledge of pH influence that is relevant for the efficiency of the bioelectrodes is required. Among the enzymes mostly used for oxygen reduction, laccase is known to be the most efficient at pH 5, whereas BOD is still very active at pH 7 [47]. On the other hand, there are large discrepancies in the optimum pH for H₂ oxidation by [NiFe] hydrogenases. Typically, the optimal pH for H₂ oxidation was determined using spectrophotometric assays via various electron acceptors. Using methyl viologen, optimal pH for the O₂-sensitive hydrogenases from *D. fructosovorans* and *Thiocapsa roseopersicina* were estimated at 8.5 and 9.5, respectively [48,49]. However, direct electrochemistry on O₂-sensitive [NiFe] hydrogenases, like *D. fructosovorans* [50] and *Allochromatium vinosum* [51] revealed a H₂ oxidation process independent on pH. This difference was interpreted in terms of the oxidation of the enzyme by soluble dyes limiting the rate of turnover in spectrophotometric assays. As a further illustration, optimum pH for H₂ oxidation by the hydrogenase from *H. marinus* was found to be 9.4 and 7.5 using methyl viologen and benzyl viologen, respectively [52,53]. Only in the case of the O₂-tolerant hydrogenase from *R. eutropha* [54], both spectrometric

assays using methylene blue and direct electrochemistry agreed. A pH-dependent H₂ oxidation process was observed, with an optimum at pH 5.5.

The pH-dependence of H₂ direct oxidation is confirmed in this work using MbH1 immobilized on CNT-modified PG electrodes. Figure 3 displays the evolution of the direct catalytic process for H₂ oxidation by MbH1 simply adsorbed on SWCNT-COOH in the pH range 5–9 (Figure 3). A belt-shaped evolution of the catalytic current is obtained with an optimum pH around 7.5. Concomitantly, mid-potential values of the CV signal shift towards more negative potentials in line with the evolution of the thermodynamic potential of H₂/H⁺ couple. The same pH dependence for direct H₂ oxidation was recorded in the absence of CNT coating, demonstrating that this behavior is an intrinsic property of MbH1. Strong effect of pH on the evolution of catalytic activity in time is also observed (Figure 3C). The direct catalytic signal for H₂ oxidation is quite stable at pH 5, because in these conditions electrostatic interactions between carboxylated carbon interface and MbH1 (pI=6.9) are favored. The stability of the catalytic signal decreases with increasing pH, however, which might be due either to release of the enzyme because of weaker electrostatic interactions, or to progressive deactivation of the enzyme. At pH 9, only a very weak activity can be detected upon simple adsorption of MbH1 (Figure 3C). No enhanced activity is observed at the membrane electrode, or after MbH1 covalent coupling. Transfer of MbH1 modified electrode from pH 9 back to pH 7.5 did not restore the activity towards H₂ oxidation. Intriguingly, spectrophotometric assays in Britton-Robinson buffer at pH 9 allowed an activity close to that measured at pH 5. Basic pH is thus supposed to irreversibly inactivate MbH1 when it is immobilized on CNT layers. For pH close to the pI of MbH1, covalent coupling of the enzyme to the CNT coating helps in stabilizing the signal. Thus the decrease of the stability at neutral pH is not linked to deactivation of the enzyme but to electrostatic interactions that drive the immobilization process on CNT films. For future H₂/O₂ biofuel cells, the optimum pH activity for MbH1 induces the choice of an oxidase showing efficient activity for O₂ reduction around pH 7.5.

3.5 Can a Redox Mediator Help in Overcoming MbH1 Inhibition at High Potentials?

We already reported in this work on the reversible inhibition of MbH1 at potentials higher than -200 mV. This feature is common to all [NiFe] hydrogenases, and is attributed to the formation of an inactive state of the active site, most probably with a hydroxide bridging Ni and Fe. Previous studies using MbH1 immobilized on SAM modified gold electrodes [28], had shown that the addition in solution of MB allowed to mediate the oxidation of H₂ at the potential of MB (-240 mV). This process occurs via MbH1 not directly connected to the electrode, thus not inhibited by anaerobic oxidation. MB thus appears to en-

hance the potential window at which H_2 can be catalytically oxidized. We also demonstrated that electropolymerization of a similar dye, toluidine blue O (TBO), at a PG electrode, allowed a mixed direct and mediated H_2 oxidation process with immobilized MbH1, provided that the membrane configuration was applied [29]. It was noticed that only the TBO monomer-like units retained in the polymer played an efficient mediator role.

In this work, the possibility of mediated H_2 oxidation by MbH1 immobilized on CNT modified PG electrode in the presence of MB has been studied. The experiment was performed using covalently bound MbH1 on SWCNT-COOH-modified PG electrode, in order to avoid kinetic complication due to leakage of the enzyme. In Figure 4 are gathered the CV curves for H_2 oxidation with no MB, after addition of MB in solution and after transfer to a MB-free buffer solution of a bioelectrode in which MB has accumulated.

When MB was added to the electrolyte solution, not only the process at the potential for direct H_2 oxidation, but also a mediated redox process occurred. This latter increased with consecutive cycling (Figure 4A). After transfer in MB-free buffer solution, the whole process strongly decreased. MB was still adsorbed as revealed by the CV signal under N_2 where no catalysis is expected to occur (Figure 4B). The 3D-matrice cannot be fully saturated with MbH1. As denoted above, the evolution of the catalytic current with the amount of CNTs clearly showed that only the upper CNT layers were saturated with the enzyme. Thus, a part of the electroactive surface remains available for the adsorption of smaller molecules. This is especially the case for MB that has a high affinity for graphite-like surfaces. Then, we demonstrate in this work that the quite unusual shape of the CV curve in the potential range for direct electron transfer (blue line in Figure 4B) is due to the superimposition of two phenomena

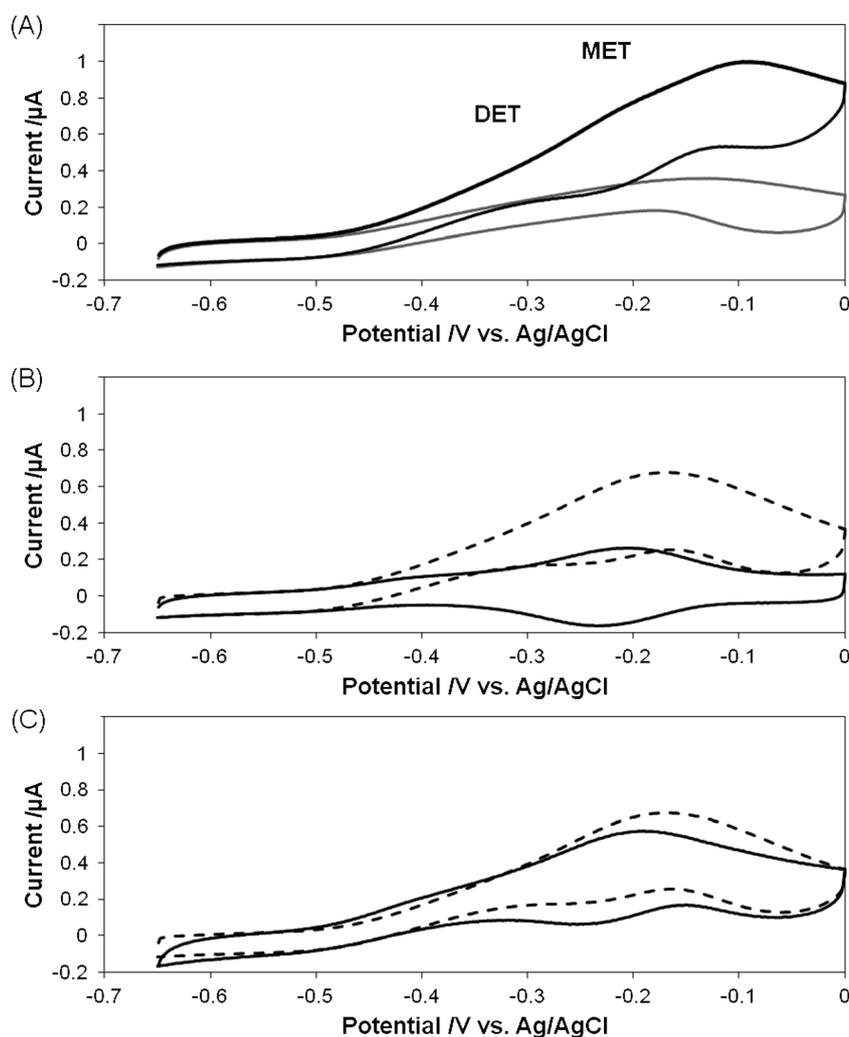


Fig. 4. CV curves showing the effect of redox mediator addition on the catalytic H_2 oxidation by MbH1 at the SWCNT-COOH modified PG electrode. (A) Electron transfer processes before addition of MB (grey line) and after accumulation in the presence of $10 \mu\text{M}$ MB in solution (black line). (B) Electron transfer processes after bioelectrode transfer in buffer under H_2 (dashed line) and N_2 (black line). (C) Addition (dashed line) of CV signals of adsorbed MB alone (black line in (B)) and MbH1 alone (grey line in (A)). 50 mM Hepes buffer, $\text{pH } 6.8$, 60° , 5 mV s^{-1} .

that do not interfere with one another: redox signal of adsorbed MB at the CNT interface, and catalytic H₂ oxidation by MbH1. The independence of the two electron transfer processes is attested by Figure 4C. Clearly, the simple mathematical addition of the CV signal for MbH1 alone (grey curve in Figure 4A) and adsorbed MB alone (red curve in Figure 4B) is very similar to the CV signal obtained under H₂ with both adsorbed MbH1 and MB (blue curve in Figure 4B). The evolution of the CV signals obtained with covalently coupled MbH1 at CNT-modified electrode thus suggests that only diffusing MB (i.e. nonadsorbed) can allow mediated electron transfer to occur. The advantage of adsorbed MB would be to act as an electrical wire in case of uncoupled MbH1 for an enhanced direct H₂ oxidation (as already observed with TBO [29]).

4 Conclusions

We have explored the immobilization of the membrane-bound [NiFe] hydrogenase MbH1 from the hyperthermophilic bacterium *Aquifex aeolicus* on pyrolytic graphite electrodes modified by SWCNT coatings. We have demonstrated that the CNT films are mechanically stable, most probably thanks to π - π interactions with the PG electrode. Three different procedures for MbH1 stable immobilization have been studied: the membrane electrode configuration, Nafion coverage and covalent coupling. Coupling by mean of EDC/NHS appears to be the most efficient procedure for future use of the biohybrid electrode as an anode in H₂/O₂ biofuel cell. An optimum pH around 7.5 has been determined for H₂ direct oxidation by MbH1, which determines the most suitable enzyme for the biocathode. Finally, the possibility to take profit of the co-immobilization of a redox mediator has been evaluated. Dye adsorption has been demonstrated to limit the mediated process. In order to ensure mediated connection of MbH1 at potentials where the direct electrical connection yields enzyme inhibition, matrices enabling diffusing mediators are under investigation.

Acknowledgements

The authors thank Dr M. Ilbert (BIP, Marseilles, France) for fruitful discussions, E. Civel for experimental support, M. Bauzan (Fermentation Plant Unit IMM, Marseilles, France) for growing the bacteria, Région Provence-Alpes-Côte d'Azur, CNRS and ANR Bioénergie N° ANR-2010-BIOE-003-01 for financial support. This project was also partially supported by the European Union within European Regional Development Fund, through grant Innovative Economy (POIG.01.01.02-00-008/08).

References

- [1] J. Cracknell, K. Vincent, F. A. Armstrong, *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 2439.
- [2] M. Guiral, L. Prunetti, C. Aussignargues, A. Ciaccafava, P. Infossi, M. Ilbert, E. Lojou, M. T. Giudici-Orticoni, *Adv. Microbiol. Physiol.* **2012**, *61*, 125.
- [3] I. Ivanov, T. Vidakovic-Koch, K. Sundmacher, *Energies* **2010**, *3*, 803.
- [4] K. Egorova, G. Antranikian, *Cur. Opin. Microbiol.* **2005**, *8*, 649.
- [5] F. Durand, C. Kjaergaard, E. Suraniti, S. Gounel, R. Hadt, E. Solomon, N. Mano, *Biosens. Bioelectron.* **2012**, *35*, 140.
- [6] J. Liu, X. Zhang, H. Pang, B. Liu, Q. Zou, J. Chen, *Biosens. Bioelectron.* **2012**, *31*, 170.
- [7] M. Karaskiewicz, E. Nazaruk, K. Zelechowska, J. Biernat, J. Rogalski, R. Bilewicz, *Electrochem. Commun.* **2012**, *20*, 124.
- [8] A. Zebda, C. Gondran, A. Le Goff, M. Holzinger, P. Cinquin, S. Cosnier, *Nature Commun.* **2011**, *2*, 370.
- [9] V. Flexer, N. Brun, O. Courjean, R. Backov, N. Mano, *Energ. Environ. Sci.* **2011**, *4*, 2097.
- [10] T. Miyake, S. Yoshino, T. Yamada, K. Hata, M. Nishizawa, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 5129.
- [11] L. Halamkova, J. Halamek, V. Bocharova, A. Szczupak, L. Alfonta, E. Katz, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 5040.
- [12] M. Falk, V. Andoralov, Z. Blum, J. Sotres, D. Suyatin, T. Ruzgas, T. Arnebrant, S. Shlevy, *Biosens. Bioelectron.* **2012**, *37*, 38.
- [13] P. Cinquin, C. Gondran, F. Giroud, S. Mazabrard, A. Pellissier, F. Boucher, J. P. Alcaraz, K. Gorgy, F. Lenouvel, S. Mathé, P. Porcu, S. Cosnier, *PLoS ONE* **2010**, *5* e10476.
- [14] K. Vincent, J. Cracknell, J. Clark, M. Ludwig, O. Lenz, B. Friedrich, F. A. Armstrong, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *48*, 5033.
- [15] P. Vignais, B. Billoud, *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 4206.
- [16] E. Lojou, *Electrochim. Acta* **2011**, *56*, 10385.
- [17] J. Cracknell, K. Vincent, F. A. Armstrong, *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 2439.
- [18] A. A. Karyakin, S. V. Morozov, O. G. Voronin, N. A. Zorin, E. E. Karyakina, V. N. Fateyev, S. Cosnier, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 7244.
- [19] T. W. Woolerton, K. A. Vincent, *Electrochim. Acta* **2009**, *54*, 5011.
- [20] P. P. Liebgott, A. de Lacey, B. Burlat, L. Cournac, P. Richard, M. Brugna, V. Fernandez, B. Guigliarelli, M. Rousset, C. Le'ger, S. Dementin, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 986.
- [21] A. Volbeda, P. Amara, C. Darnault, J. M. Mouesca, A. Parkin, M. M. Roessler, F. A. Armstrong, J. C. Fontecilla-Camps, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2012**, *10*, 5305.
- [22] Y. Shomura, K. S. Yoon, H. Nishihara, Y. Higuchi, *Nature* **2011**, *479*, 253-NIL 143.
- [23] M. Pandelia, V. Fourmond, P. Tron, E. Lojou, P. Bertrand, C. Léger, M. T. Giudici-Orticoni, W. Lubitz, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 6991.
- [24] J. Fritsch, P. Scheerer, S. Frielingsdorf, S. Kroschinsky, B. Friedrich, O. Lenz, C. Spahn, *Nature* **2011**, *479*, 249-NIL 134.
- [25] M. Brugna-Guiral, P. Tron, W. Nitschke, K.-O. Stetter, B. Burlat, B. Guigliarelli, M. Bruschi, M. T. Giudici-Orticoni, *Extremophiles* **2003**, *7*, 145.
- [26] XJ. Luo, M. Brugna, P. Infossi, M. T. Giudici-Orticoni, E. Lojou, *J. Biol. Inorg. Chem.* **2009**, *14*, 1275.
- [27] A. Ciaccafava, M. Alberola, S. Hameury, P. Infossi, M. T. Giudici-Orticoni, E. Lojou, *Electrochim. Acta* **2011**, *56*, 3359.

- [28] A. Ciaccavafa, P. Infossi, M. Ilbert, M. Guiral, S. Lecomte, M. T. Giudici-Orticoni, E. Lojou, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 953.
- [29] A. Ciaccavafa, P. Infossi, M. T. Giudici-Orticoni, E. Lojou, *Langmuir* **2010**, *26*, 18534.
- [30] P. Infossi, E. Lojou, J. P. Chauvin, G. Herbette, M. Brugna, M. T. Giudici-Orticoni, *Int. J. Hyd. Energ.* **2010**, *35*, 10778.
- [31] A. Ciaccavafa, A. De Poulpiquet, P. Infossi, S. Robert, R. Gadiou, M. T. Giudici-Orticoni, S. Lecomte, E. Lojou, *Electrochim. Acta* **2012**, *82*, 115.
- [32] S. Krishnan, F. A. Armstrong, *Chem. Sci.* **2012**, *3*, 1015.
- [33] A. Ciaccavafa, A. de Poulpiquet, V. Techer, M. T. Giudici-Orticoni, S. Tingry, C. Innocent, E. Lojou, *Electrochem. Commun.* **2012**, *23*, 25.
- [34] E. Lojou, X. Luo, M. Brugna, N. Candoni, S. Dementin, M. T. Giudici-Orticoni, *J. Biol. Inorg. Chem.* **2008**, *13*, 1157.
- [35] C. M. Moore, N. L. Akers, A. D. Hill, Z. C. Johnson, S. D. Minter, *Biomacromolecules* **2004**, *5*, 1241.
- [36] M. Correia dos Santos, P. Paes de Sousa, M. Simoes Goncalves, L. Krippahl, J. Moura, E. Lojou, P. Bianco, *J. Electroanal. Chem.* **2003**, *541*, 153.
- [37] E. Lojou, P. Bianco, *J. Electroanal. Chem.* **2000**, 485, 71.
- [38] E. Lojou, P. Bianco, *Electroanalysis* **2004**, *16*, 1113.
- [39] E. Lojou, P. Luciano, S. Nitsche, P. Bianco, *Electrochim. Acta* **1999**, *44*, 3341.
- [40] E. Lojou, P. Bianco, *J. Electroanal. Chem.* **2003**, 557, 37.
- [41] B. Reuillard, A. Le Goff, C. Agnès, A. Zebda, M. Holzinger, S. Cosnier, *Electrochem. Commun.* **2012**, *20*, 19.
- [42] S. Morra, F. Valetti, S. J. Sadeghi, P. W. King, T. Meyer, G. Gilardi, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 10566.
- [43] H. Chen, C. Mousty, S. Cosnier, C. Silveira, J. J. Moura, M. G. Almeida, *Electrochem. Commun.* **2007**, *9*, 2240.
- [44] M. Zafar, G. Safina, R. Ludwig, L. Gorton, *Anal. Biochem.* **2012**, *425*, 36.
- [45] O. Saiapina, S. Dzyadevych, N. Jaffrezic-Renault, P. Soldatkin, *Talanta* **2012**, *92*, 58.
- [46] G. Karthikeyan, G. Lakshmikanth, W. Wagle, G. Krishnamoorthy, B. J. Rao, *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **1999**, *1*, 149.
- [47] K. Otsuka, T. Sugihara, Y. Tsujino, T. Osakai, E. Tamiya, *Anal. Biochem.* **2007**, *370*, 98.
- [48] S. Dementin, B. Burlat, A. De Lacey, A. Pardo, G. Adryanczyk-Perrier, B. Guigliarelli, V. Fernandez, M. Rousset, *J. Biol. Chem.* **2004**, *11*, 10508.
- [49] N. Zorin, B. Dimon, J. Gagnon, J. Gaillard, P. Carrier, P. Vignais, *Eur. J. Biochem.* **1996**, *241*, 675.
- [50] C. Léger, S. Dementin, P. Bertrand, M. Rousset, B. Guigliarelli, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 5209.
- [51] C. Léger, A. Jones, W. Roseboom, S. Albracht, F. Armstrong, *Biochemistry* **2002**, *41*, 15736.
- [52] H. Nishihara, Y. Miyashita, K. Aoyama, T. Kodama, Y. Igarashi, Y. Takamura, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1997**, *232*, 766.
- [53] K-S. Yoon, K. Fukuda, K. Fujisawa, H. Nishihara, *Int. J. Hyd. Energ.* **2011**, *36*, 7081.
- [54] M. Ludwig, J. Cracknell, K. Vincent, F. Armstrong, O. Lenz, *J. Bioanal. Chem.* **2009**, *284*, 465.

Carbon nanofiber mesoporous films: efficient platforms for bio-hydrogen oxidation in biofuel cells†

Cite this: *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2014, 16, 1366

Anne de Poulpiquet,^a Helena Marques-Knopf,^b Véronique Wernert,^c Marie Thérèse Giudici-Ortoni,^a Roger Gadiou^b and Elisabeth Lojou‡*^a

The discovery of oxygen and carbon monoxide tolerant [NiFe] hydrogenases was the first necessary step toward the definition of a novel generation of hydrogen fed biofuel cells. The next important milestone is now to identify and overcome bottlenecks limiting the current densities, hence the power densities. In the present work we report for the first time a comprehensive study of herringbone carbon nanofiber mesoporous films as platforms for enhanced biooxidation of hydrogen. The 3D network allows mediatorless hydrogen oxidation by the membrane-bound hydrogenase from the hyperthermophilic bacterium *Aquifex aeolicus*. We investigate the key physico-chemical parameters that enhance the catalytic efficiency, including surface chemistry and hierarchical porosity of the biohybrid film. We also emphasize that the catalytic current is limited by mass transport inside the mesoporous carbon nanofiber film. Provided hydrogen is supplied inside the carbon film, the combination of the hierarchical porosity of the carbon nanofiber film with the hydrophobicity of the treated carbon material results in very high efficiency of the bioelectrode. By optimization of the whole procedure, current densities as high as 4.5 mA cm⁻² are reached with a turnover frequency of 48 s⁻¹. This current density is almost 100 times higher than when hydrogenase is simply adsorbed at a bare graphite electrode, and more than 5 times higher than the average of the previous reported current densities at carbon nanotube modified electrodes, suggesting that carbon nanofibers can be efficiently used in future sustainable H₂/O₂ biofuel cells.

Received 4th November 2013,
Accepted 11th November 2013

DOI: 10.1039/c3cp54631d

www.rsc.org/pccp

Introduction

Since the proof of concept reported by Yahiro *et al.* in 1964,¹ enzymes have been envisioned as potential biocatalysts in biofuel cells able to power low-power devices in replacement of platinum. Enzymes responsible for glucose oxidation and oxygen reduction into water, respectively, flavin adenine dinucleotide containing glucose oxidase and multi-copper laccase or bilirubine oxidase, are among the most popular, thus defining glucose/O₂ biofuel cells.^{2,3}

Great improvement has been reported during the last few years so that these biofuel cells have been implanted in various living hosts.⁴⁻⁶ Three major key issues have been addressed that could account for these improvements: (i) knowledge and taking into full consideration of the crystal structure of the enzymes and of the catalytic pathways to determine the best way for enzyme immobilization on an electrode for a direct and efficient interfacial electron transfer, (ii) covalent attachment of the enzyme on the electrode for stability enhancement, and (iii) use of 3D-architectures, for an enhancement of the amount of electrically connected enzymes, hence an increase in the catalytic currents. This last point has stimulated numerous works during the last few years in the field of enzymatic and microbial biofuel cells.⁷⁻⁹

Enzymatic biofuel cells based on hydrogen as a fuel and functioning in the same way as low temperature proton exchange membrane fuel cells are far less developed, although these systems would give the highest theoretical energy output (140 MJ kg⁻¹ for hydrogen against 20 kJ kg⁻¹ for sugars). This is essentially because of the difficulty to handle the hydrogenases (Hases), the enzymes which are responsible for hydrogen conversion in many microorganisms. The most studied class of Hases is the one in which hydrogen is converted into protons at an active site composed

^a Unité de Bioénergétique et Ingénierie des Protéines, Institut de Microbiologie de la Méditerranée – CNRS UMR 7281 – Aix Marseille Université, 31 chemin Joseph Aiguier, 13402 Marseille, France. E-mail: lojou@imm.cnrs.fr

^b Institut de Sciences de Matériaux de Mulhouse – CNRS UMR 7361, 15 rue Jean Starcky, BP 2488, 68057 Mulhouse, France

^c Laboratoire des Matériaux Divisés, Interfaces, Réactivité et Electrochimie – CNRS UMR 7246 – Aix Marseille Université, Centre St Jérôme, 13397 Marseille, France

† Electronic supplementary information (ESI) available: Control experiments for H₂ oxidation by MbH1 adsorbed in the CNF films, control experiments for kinetics and stability of adsorption of MbH1 on CNF films, impedance spectra of CNF films, comparison between experiments at the RPG electrode and with H₂ bubbling in the electrolyte, the optimized CV profile of H₂ biooxidation. See DOI: 10.1039/c3cp54631d

‡ BIP-CNRS, 31 chemin Joseph Aiguier, 13009 Marseille, France.

of nickel and iron atoms.¹⁰ These enzymes are strongly inhibited by oxygen, and the mechanism by which oxygen reaches the active site and inhibits H₂ oxidation is now well characterized, although some debates still exist on the state of the active site under strong oxidative potentials.¹¹ For two years, however, at least four membrane-bound Hases have been identified that are able to oxidize H₂ with high turnover in the presence of oxygen.^{12,13} Two Hases belonging to this class have been particularly studied with the purpose of biofuel cell development, namely from *Escherichia coli* and *Aquifex aeolicus* (Aa), respectively, mesophilic and hyperthermophilic bacteria.^{14–16} The presence of an unusual iron–sulfur cluster close to the active site that provides the electrons necessary for O₂ reduction into water (it is a [4Fe–3S] cluster coordinated by six cysteine residues and not a [4Fe–4S] cluster as in O₂-sensitive Hases) is supposed to be responsible for this tolerance. These so-called tolerant Hases are furthermore insensitive to CO, a strong inhibitor of both platinum catalysts and classical [NiFe] Hases. Use of hydrogen produced from biomass can thus be envisioned as a fuel for a future sustainable H₂/O₂ biofuel cell.

Based on these Hases and a bilirubin oxidase as oxygen reducing enzyme, two H₂/O₂ biofuel cells have been designed last year. The first one in F. Armstrong's group uses the mesophilic Hase from *E. coli*.¹⁷ A membrane-less biofuel cell fed with a non-explosive H₂-air mixture was first demonstrated to be able to generate a power density of around 100 $\mu\text{W cm}^{-2}$. In our group a biofuel cell using the hyperthermophilic Hase from Aa (MbH1) generated a power density of 300 $\mu\text{W cm}^{-2}$ and was demonstrated to be able to function in a large range of temperature.¹⁸ The latter biofuel cell may thus operate in extreme environments. Although different bioelectrode architectures were built, these two biofuel cells used covalent attachment of the enzymes on carbon nanotube based electrodes. Otherwise, carbon nanotube networks were demonstrated in some other studies to be efficient wires for electrical connection of various Hases.^{19,20} In the case of MbH1 immobilization, it was shown that the enzyme was not able to occupy the whole surface developed by the carbon material.²¹ Very recently, F. Armstrong and co-workers proposed a new architecture based on entrapment of mesophilic enzymes in compacted carbon powder.²² The current density of the anode was greatly improved thanks to the surface area developed by the commercially available carbon material, reaching 4.6 mA cm^{-2} . However, turnover frequencies were much below the expected turnover of Hase, suggesting that only a fraction of enzyme operated in the carbon film. Some porous materials have been also recently described for other enzymes than Hase,²³ for example dehydrogenase,^{24–26} laccase,^{27,28} bilirubin oxidase.²⁹ In each case, mediatorless catalysis was obtained with enhanced current densities and stabilities. Moreover, the attractiveness of porous materials is outlined, among which mesoporous and hierarchical systems are expected to enhance enzyme uptake and protection while minimizing limitation in substrate flow. This last issue has rarely been addressed, however. Despite much effort in developing new suitable materials, it appears that the whole catalytic process always remains limited by mass transport.^{17,27,29} A deep characterization of both the electrode materials and

the interaction between these materials and the enzyme is thus needed before any improvement in the knowledge and in the overcoming of the limitations of biofuel cells.

Among the new carbonaceous materials, carbon nanofibers (CNFs) are some of the most promising precursors for the production of high performance sorbents. Compared to carbon nanotubes which are made of rolled graphene sheets that enable the adsorption only at the open ends or at defects, nanofibers exhibit a nanostructure based on graphene layer stacking. These CNFs thus present lots of reactive edge sites, a characteristic which is favorable for activation and adsorption phenomena.³⁰ CNFs are mainly synthesized through the catalytic chemical vapor deposition method and the floating catalyst method. In herringbone-type nanofibers, the graphene layers are stacked obliquely with respect to the fiber axis.³¹ This leads to materials with high surface areas and hierarchical pore volumes while keeping a carbon structure which is graphitic. The excellent mechanical, electronic and magnetic properties of CNFs that result from their special structural characteristics have stimulated extensive research. CNFs have several technological applications, such as enhancing the efficiency of field emission, serving as functional fillers for various types of composite materials, absorbent materials, catalyst supports, and gas storage materials.^{32,33} Moreover, the surface chemistry of the carbon materials can be controlled by selective chemical and thermal treatments.³¹

In the present work we report a comprehensive study of hydrogen oxidation by MbH1 immobilized on these peculiar novel CNF films. The 3D network they form allows us to design a biohybrid electrode exhibiting high catalytic efficiency. A deep physical characterization of the nanofibers coupled to the study of their electrochemical behaviour in the presence of redox probes allows us to obtain a full knowledge of the biocomposite electrode. A hierarchical porosity is highlighted, showing nanopores on the fibers as well as micropores between the fibers suitable for substrate diffusion and enzyme incorporation. When deposited as a film on electrodes, these CNFs develop active areas which can be more than 1500 times larger than the bare electrode. Cyclic voltammetry, chronoamperometry and impedance spectroscopy are used to study the kinetics and isotherms of incorporation of MbH1 as a function of the amount of CNFs. Thanks to analysis of the H₂ oxidation process under quiescent conditions, or at a rotating electrode, or with hydrogen bubbling into the electrolyte, it is clearly demonstrated that the catalytic current is limited by mass transport inside the CNF film. Provided hydrogen is supplied inside the mesoporous carbon film, the combination of the mesoporosity of the CNF film with the hydrophobicity of the treated carbon material results in stability and very high efficiency of the bioelectrode. By optimization of the procedure for film formation, and of the amount of CNFs that composes the film, by taking into account the adsorption isotherms of MbH1, and by optimizing H₂ flow rate, current densities as high as 4.5 mA cm^{-2} are reached for enzymatic H₂ oxidation. This is around 100 times higher than when MbH1 is simply adsorbed at the PG electrode, and more than 5 times higher than the previous reported current densities at carbon nanotube modified electrodes.

Experimental section

Chemicals

All solutions were prepared with distilled, deionized water. 4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid (HEPES) was used for hydrogenase dilution and as the supporting electrolyte at pH 6.8 and 50 mM concentration. *n*-Dodecyl α -D-maltoside (DDM) and methylene blue (MB) were purchased from Sigma-Aldrich and diluted in water. All other chemicals were used without further purification.

Protein purification and activity on gels

Isolation and purification of MbH1 were carried out as previously described by Luo *et al.*²¹ Excess of DDM detergent used for the solubilization of MbH1 from the bacterial cell membrane extracts was removed during the washing procedure through Amicon PM 100. Final DDM concentration was determined as described in ref. 34 to ensure correct micellar concentration before enzyme dilution. MbH1 activity using blue native gels was revealed with H₂ as an electron donor and methyl viologen as an electron acceptor at 80 °C. Reduction of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride by reduced methyl viologen produced the pink colour of gels, characteristic of hydrogenase activity.³⁵

Electrochemical measurements

Cyclic voltammetry (CV), chronoamperometry (CA) and impedance spectroscopy were done directly on the bench using a PARSTAT 2273 potentiostat from Princeton Applied Research (PAR). A conventional three-electrode system was used with a Ag/AgCl/NaCl (sat.) reference electrode and a platinum wire as an auxiliary electrode. Temperature of the electrochemical cell was regulated using a water bath. The reference electrode was separated from the warmed electrolyte using a side junction maintained at room temperature. All potentials are quoted against the Ag/AgCl reference and current densities are reported to the projected area of the electrodes. Catalytic currents extracted from CV experiments are reported at a potential of -0.3 V vs. Ag/AgCl and after subtraction of the respective capacitive current. Each measurement is the average of at least three replicates. For easier comparison, normalized currents are referred to the maximal current obtained. Impedance spectra were recorded in the presence of 200 mM K₃Fe(CN)₆ at the half wave potential of the redox couple ($+0.2$ V) over a frequency range from 60 kHz to 0.1 Hz. The spectra were fit according to a Randles equivalent circuit. CV and CA experiments were performed either under H₂ atm., with H₂ flow maintained over the electrolyte, or with H₂ directly bubbling inside the electrolyte. In the latter case, the H₂ flow at a rate of $1\text{ cm}^3\text{ s}^{-1}$ (unless specified) was positioned at 10 mm from the working electrode.

CNF films were built on a working electrode made either by a stationary pyrolytic graphite electrode (PG, area 7 mm^2), or an indium tin oxide electrode (ITO, area 7 mm^2), or a rotating pyrolytic graphite electrode (RPG, area 3.5 mm^2). The PG and RPG electrodes were abraded with fine sandpapers P800 then P1200 from PRESI, then sonicated for a few minutes in ethanol to remove free graphite particles, and finally washed with ethanol then water. ITO polished float glasses from Delta Technologies

(Loveland, CO, USA) were used with no treatment. The electroactive area of ITO electrodes was defined by masking off 7 mm^2 with scotch tape. The surface developed by the CNF layer was calculated from the double layer capacitance taking a typical value of $25\text{ }\mu\text{F cm}^{-2}$ for the carbon material in aqueous electrolytes.³⁶

Preparation and characterization of carbon nanofibers

The CNFs were prepared by a conventional chemical vapor deposition (CVD) process using a Ni catalyst on a graphite support. Firstly, Ni(NO₃)₂ salt was dissolved in ethanol and the graphite powder was added to the solution. Ethanol was then evaporated from the suspension. The obtained mixture was first reduced under H₂/Ar (1:1) flow at 150 Torr and at 600 °C for 1 h to obtain Ni nanoparticles. Then, the deposition was done for 0.5 h under C₂H₂/H₂ (4:1) flow at 300 Torr. These pristine CNFs were then oxidized at 495 °C for 30 min in order to increase their pore volume and surface area (sample CNF_O2). A second material was obtained by performing a reduction under hydrogen at 600 °C. Previous studies have shown that these experimental conditions allow us to eliminate an important fraction of the surface chemistry without modifying the surface textural properties (sample CNF_H2).³⁷ An X-ray diffractometer (Philips Xpert 2000) with the CuK α line ($\lambda = 0.154056\text{ nm}$) was used to obtain the Bragg reflections from the CNFs and the co-deposits. The adsorptive properties of the samples were determined by measurements of nitrogen isotherms at 77 K on a Micromeritics ASAP 2020. The surface area of the samples was then determined by applying the Brunauer–Emmett–Teller (BET) method in the relative pressure range of 0.05–0.3. The pore size distribution was investigated by NL-DFT with the assumption of slit pore geometry.

The surface chemistry of the CNFs was investigated by Temperature Programmed Desorption with Mass Spectrometry Analysis (TPD-MS). TPD-MS experiments were done in a fused-silica reactor in the temperature range 327–873 K at a heating rate of 2 K min^{-1} . The analysis was done under high vacuum conditions (below 10^{-5} mbar), and the gas phase was analysed quantitatively using the mass spectrometer.

The hydrophilic/hydrophobic character of the CNF was evaluated from water adsorption–desorption isotherms at 25 °C determined using a high resolution dynamic vapor sorption apparatus TGA Q5000 from TA Instrument. The apparatus consists of a twin pan microbalance under gas flow. The desired humidity of carrier gas is achieved by mixing dry and humid gas flow in the correct proportions using automated mass flow controllers. Prior to being exposed to any vapor, the sample is equilibrated at 0% RH for 300 min at 80 °C to eliminate residual adsorbed water.

The surface morphology of the CNFs was observed by scanning electron microscopy (SEM, Philips, XL30) and by transmission electron microscopy (TEM, Philips CM200).

Adsorption of MbH1 on carbon nanofibers

In order to evaluate the adsorption capacity of CNFs towards the hydrogenase, MbH1 at an initial concentration of 4 mg mL^{-1} was used. The adsorption experiment was performed by immersing 3 mg of CNFs in 100 μL of protein solution inside an incubator

at controlled temperature (23 °C) for 4 h. A kinetic study done for adsorption times of up to 48 h had shown that 4 h was enough to reach the equilibrium. The solid samples were then removed from the protein solution. The analysis method uses the Bradford (Coomassie plus) Protein Assay Kit. The absorbance was measured at 595 nm using a Cary Win UV spectrometer. A calibration curve was realized with MbH1 at known concentrations. The difference between the initial and the equilibrium amount of protein gives the total amount of proteins adsorbed on CNFs.

Preparation of the MbH1–CNF bioelectrode

The CNFs were suspended in a mixture of water and dimethylformamide (DMF) at a concentration of 4 mg mL⁻¹. A ratio of 50% water to 50% DMF was determined to be the best compromise to ensure a homogeneous suspension of CNFs and a homogeneous covering of the electrode. CNFs in DMF were sonicated for 15 minutes, water was added and this suspension was sonicated anew for 15 minutes. Two different procedures were used for Hase immobilization in CNF films. In procedure (a), a PG electrode modified by CNF layers was incubated at 4 °C for various durations in MbH1 solutions. Each CNF layer was made with the same amount of CNFs and corresponded to a density of 285 μg cm⁻² when reported to the electrode geometric area. Layer-by-layer formation of CNF films was proved to be more stable than deposition of the same amount of carbon material in one deposit. The biohybrid electrodes were washed in water before use in electrochemical experiments. In procedure (b), an *ex situ* mixture of CNFs (without DMF) and MbH1 was deposited until completely dried under N₂ flux at room temperature on the PG electrode. The mixture was realized so that the CNF quantities and MbH1 concentrations were the same as in procedure (a).

Results and discussion

CNF characterization

The final carbon material is composed of 79 wt% of CNFs, 4 wt% of Ni catalyst and 17 wt% of graphite. TEM images show typical herringbone morphology of the CNFs (Fig. 1). The CNFs exhibit a rather regular diameter in the range of 100 to 200 nm. Under the experimental conditions chosen for the synthesis, the structure of the CNFs is composed of a stacking of sp² carbon layers. The carbon layers have a conical shape. From XRD measurements, the distance between the carbon layers was calculated to be 3.5 Å, very close to the value expected for graphite structures (3.35 Å). Thanks to the stacking of carbon layers in this configuration, the CNFs can exhibit a considerable conductivity. Moreover, the surface of these materials is mainly composed of carbon atoms on edges of graphene layers which have a significant reactivity. Herringbone CNFs can therefore develop attractive interactions with molecules or biomolecules.

Full physico-chemical characterization of the carbon materials is needed for further understanding and overcoming of the limitations in stability and efficiency of the immobilized enzyme. Porosity and surface chemistry of the CNFs appear to be two

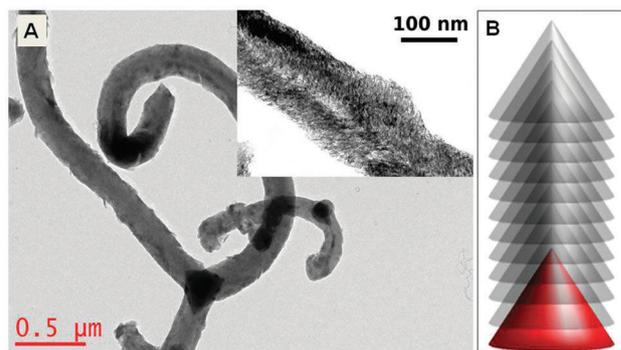


Fig. 1 (A) TEM photography of the CNF_O2 sample showing the Ni catalyst particle, here as a tricorne, and the three fibers growing from this cone. The inset image with enhanced contrast and magnification shows the CNF carbon layers in herringbone configuration, as schematized in (B).

main issues that need to be investigated. It is expected that hierarchical porosity induced by the 3D carbon material can improve the enzyme loading and substrate diffusion. Microporosity may improve gas transport inside the carbon film, while mesoporosity appears to be suitable for enzyme entrapment. Otherwise, it was previously demonstrated that MbH1 can be efficiently immobilized at flat hydrophilic interfaces.³⁸ However both DET and mediated (MET) electron transfer processes occurred for H₂ oxidation because of non-specific orientation of MbH1 at the electrochemical interface. Due to the membrane position of this enzyme and the presence of the *trans*-membrane helix surrounded by neutral detergent, hydrophobic interaction was proposed to drive the immobilization. Hence, hydrogen oxidation proceeded only through the MET process on hydrophobic self-assembled-monolayers (SAM) on gold electrodes.³⁸ The mediated process was however demonstrated to be very stable with time. 3D-architectures such as carbon nanoparticles, carbon nanotubes or carbon nanofibers are expected to overcome the orientation limitation by offering alternative pathways for electron transfer. The direct electron transfer (DET) process is supposed to be maximized because electrons are delivered from the active site to a physiological electronic relay at the surface of the enzyme which will be in electrical contact with the electrochemical interface independently of the enzyme orientation. Combining these two properties, hydrophobic 3D architectures may induce efficient and stable direct H₂ oxidation by immobilized MbH1.

After the oxidation step, the BET surface area of the CNF_O2 material is 131 m² g⁻¹. The main physico-chemical characteristics of the CNF_O2 are gathered in Fig. 2. Information on the micro- and mesoporosity of the carbon material can be obtained from the nitrogen adsorption isotherms (Fig. 2A). The step at very low pressure shows that there is a small microporous volume (pores below 2 nm); but the adsorption mainly takes place for relative pressures above 0.5 which correspond to mesopores with a size in the range 2–25 nm. From DFT analysis, we were able to compute the cumulative pore size distribution. The volume of micropores is $V_{\text{micro}} = 0.03 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ and the volume of mesopores $V_{\text{meso}} = 0.27 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$. This last kind of pores is mainly due to the

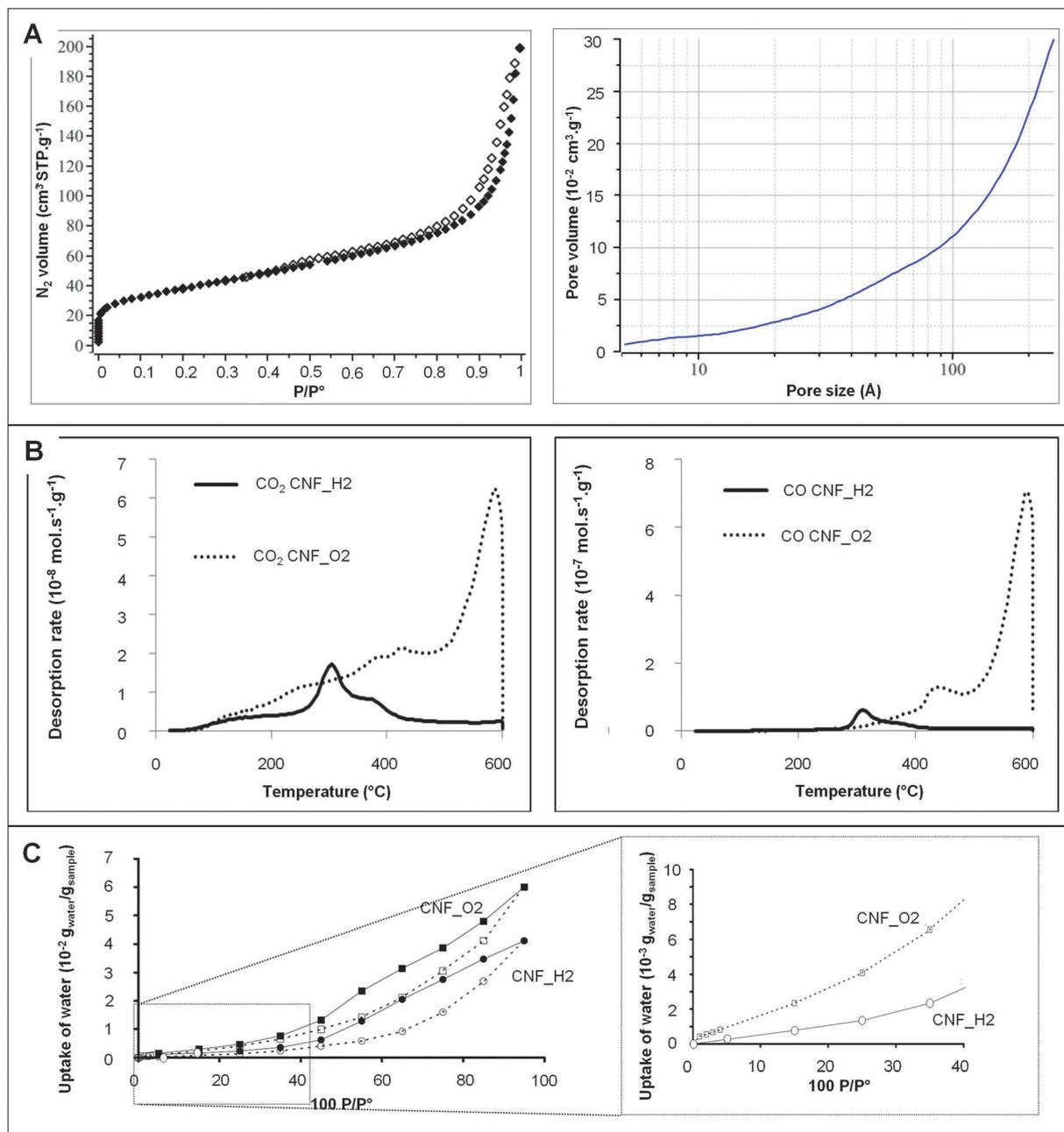


Fig. 2 Characterization of the CNFs. (A) Textural properties of CNFs, left: nitrogen adsorption isotherm at 77 K of sample CNF_O2, right: cumulative pore size distribution obtained by DFT; (B) TPD-MS analysis of treated CNF_O2 and CNF_H2 nanofibers, left CO₂ desorption, right: CO desorption; (C) adsorption-desorption isotherms of water onto CNFs.

void between the fibers in the carbon powder and can be suitable for Hase adsorption, whose size is around 5 nm.

Since it results from an oxidation step, CNF_O2 is expected to exhibit a significant number of oxygenated functional groups on its surface. CNF_O2 was thus submitted to a surface treatment by hydrogen in order to obtain a hydrophobic surface, yielding CNF_H2. From their nitrogen adsorption isotherms, it was shown that the textural properties of CNF_O2 and CNF_H2 are the same. The TPD-MS analysis of the two carbon materials is presented in Fig. 2B. Very different desorption profiles are observed.

The desorption profiles of CNF_O2 are typical of oxidized carbons.³⁹ As expected for a carbon oxidized at 495 °C, the CO₂ desorption at low temperature is very low, showing that nearly no carboxyl groups are present on the surface. The simultaneous desorption of CO and CO₂ above 500 °C is related to the presence of anhydrides and lactones.³⁹ In contrast to CNF_O2, the desorption profiles of CNF_H2 exhibit very low amounts of surface groups: the total amount of oxygen on CNF_H2 is 50 μmol g⁻¹ compared to 385 μmol g⁻¹ for CNF_O2. From this analysis, the surface of CNF_H2 is likely to be more hydrophobic than the one of CNF_O2.

Although the dry material does not exhibit carboxyl surface groups, oxygenated surface groups like anhydrides should undergo reactions with water. Therefore, it is expected that in solution the surface of CNF_O2 will be more acidic and will be negatively charged in a liquid at neutral pH, while the CNF_H2 surface should be neutral or positive under the same conditions.⁴⁰

The adsorption–desorption isotherms of water onto the two different CNFs are reported in Fig. 2C. In the whole range of relative humidity, the CNF_O2 adsorbs much more water than the CNF_H2 which is a clear indication of the more hydrophobic character of CNF_H2 fibers, as expected.⁴¹ The hysteresis loops indicate the presence of pore filling. The corresponding volume is much smaller than the total pore volume ($0.3 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$). In the case of water on carbons, hysteresis in this relative pressure range may correspond to micropore and very small mesopore filling.⁴² All the pores are then not filled in the analysed pressure range.

Morphological and electrochemical characterization of CNF films on the electrode

Fig. 3A shows a typical SEM micrograph of a CNF film formed on a PG electrode. Well-formed CNFs cover the entire surface of the PG electrode. The arrangement of the CNFs with significantly no bundling as classically observed when using carbon nanotubes in the absence of a surfactant allows us to define an inter-fiber

porosity in agreement with the preceding findings, which should be sufficient for MbH1 penetration (the enzyme is 6 nm in its longest dimension). Impedance spectroscopy and cyclic voltammetry were used for the determination of the surface area developed by the CNFs on the electrode surface. The double layer capacitance was deduced as a function of CNF amount either from the charge transfer loop obtained by impedance spectroscopy or from CV experiments in the absence of any faradaic current (Fig. 3B). It is shown that the capacitance linearly increases with the amount of deposited CNFs. This allows an estimation of the developed surface on electrodes as a function of the CNF deposit. Taking into account the value of $25 \mu\text{F cm}^{-2}$ for the carbon material, experimental results demonstrate that the surface developed by the CNFs on the electrode is very close to the BET surface. CNFs thus allow an increase in the active areas compared to the bare electrode up to 1500 times higher.

Methylene blue (MB) was used as a redox probe to seek stability of the CNF film on the electrode. By dipping the bare or the CNF-modified PG electrode in $10 \mu\text{M}$ MB solutions, fast adsorption of the redox probe occurred due to π – π interactions.⁴³ Stability of the redox process for MB adsorbed on CNFs was followed during consecutive cycles. Notably the peak current and the capacitive current after 10 cycles at 5 mV s^{-1} were 90% and 98% of the initial currents, respectively. Besides, CV for ferricyanide oxidoreduction was performed at a RPG electrode with bare RPG and RPG modified by CNF films. The Levich current increased linearly with the square root of the rotation rate up to 3000 rpm for CNF density of up to $1140 \mu\text{g cm}^{-2}$. These experimental results are consistent with a high stability of the CNF layer physisorbed on the PG electrode, probably because of favourable π – π and hydrophobic interactions.

Optimization of the CNF film for MbH1 incorporation and enzymatic H₂ oxidation

A typical CV curve for H₂ oxidation at 60°C under quiescent conditions with MbH1 immobilized according to procedure (a) (see experimental section) on a CNF film is given in Fig. 4 (plain line). The CV curve for H₂ oxidation in the absence of a CNF layer is superimposed for comparison (Fig. 4, dashed line). H₂ oxidation profiles in the absence of MbH1 with a CNF layer is also given in Fig. SI1 (ESI[†]), which assesses that CNFs alone are not able to catalyze H₂ oxidation and proves that MbH1 is required to oxidize H₂. This catalytic process occurs at a low overpotential with no redox mediator. The peculiar shape of the CV curve recorded at the CNF-modified PG electrode will be discussed in the following, but it can be observed that a plateau shape is first described, then the current decreases at the highest potentials, *i.e.* above -100 mV , most probably in relation with the formation of an inactive state of the enzyme.¹⁴ This state, named Ni-B, is formed either under anaerobic conditions at potentials higher than -300 mV , or under aerobic conditions. A hydroxo ligand has been shown to bridge the nickel and iron atoms.⁴⁴ This process is reversible, however, and by switching the direction of potential sweep, the active center is reactivated, so that the H₂ oxidation process can occur upon reverse scan.

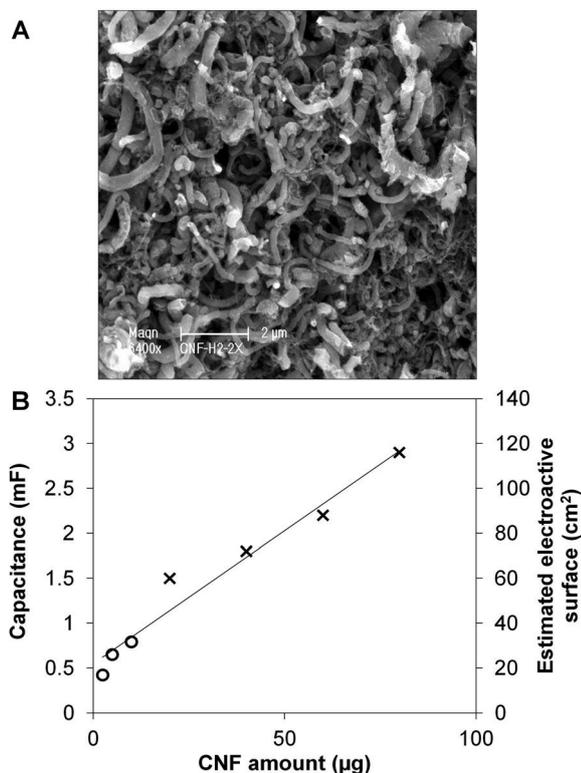


Fig. 3 (A) SEM micrograph of a CNF film formed on a PG electrode and composed of two successive layers of $285 \mu\text{g cm}^{-2}$ of CNF_H2; (B) evolution as a function of the CNF amount of the capacitance calculated from impedance spectroscopy (O) or CV (x). The electroactive surface developed by the CNFs is deduced from the capacitance values by taking a value of $25 \mu\text{F cm}^{-2}$ for the carbon material.³⁶

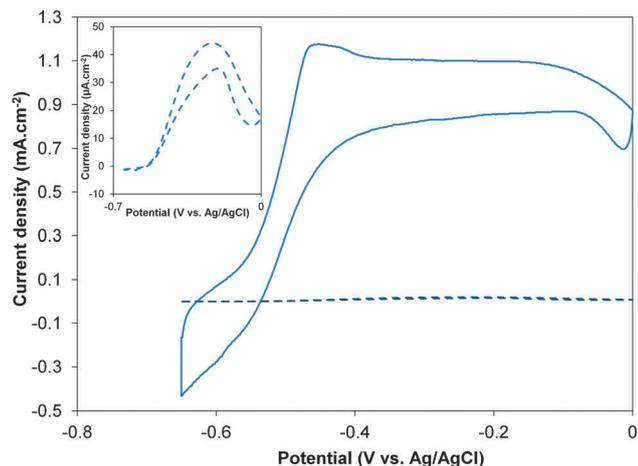


Fig. 4 CV curves for H_2 oxidation by $2 \mu\text{M}$ MbH1 adsorbed for 30 min on a $855 \mu\text{g cm}^{-2}$ CNF_H2-modified PG electrode in 50 mM HEPES buffer, pH 6.8 at 60°C under H_2 atm in quiescent conditions. Scan rate was 5 mV s^{-1} . The dashed blue line and the inset correspond to the CV recorded for $2 \mu\text{M}$ MbH1 adsorbed for 30 min at the bare PG electrode.

Compared to H_2 oxidation by MbH1 immobilized according to the same procedure but on a bare PG electrode, the current density is at least 20 times higher at the CNF modified PG electrode, reaching values higher than 1 mA cm^{-2} . Notably, this current density is also around twice the typical current values previously recorded at carboxylic functionalized carbon nanotube layers.⁴³

To state how hydrophobicity controls MbH1 entrapment in the mesoporous CNF film, H_2 oxidation was compared with the enzyme adsorbed either on CNF_O2 or on CNF_H2 films. CV shape for H_2 oxidation was similar on both materials. However, the stability of the catalytic signal increased by using the CNF_H2 instead of CNF_O2. Only 15% of the initial oxidative signal remained after 10 consecutive cycles at 5 mV s^{-1} in the potential window of -650 mV to 0 mV on CNF_O2 film, against 50% on CNF_H2 films. This progressive decrease in CV intensity has been proposed to be due to a combination of enzyme leaching/reorientation from the electrode, but also from an incomplete reactivation of the enzyme after inhibition at 0 V . Stability of the enzymatic oxidation of H_2 was thus further controlled using CA at a CNF_H2-modified PG electrode at a potential of -300 mV . A deviation of only 6% for two hours is recorded. CV and CA experiments thus suggest that the hydrophobic environment taking place with CNF_H2 is favourable for MbH1 stable immobilisation. H_2 oxidation by MbH1 adsorbed on hydrophobic SAM layers on gold electrodes already underlined a highly stable catalytic signal.³⁸ This was not unexpected when considering the membrane anchoring of this protein. However on flat SAM hydrophobic surfaces only a MET process was observed, driven by the detergent-surrounded *trans*-membrane helix. It is confirmed in this work that the 3D-structure of the CNF_H2 layer allows us to overcome the enzyme orientation limitation and leads to an efficient and stable mediatorless H_2 oxidation by immobilized MbH1. The occurrence of a direct electron transfer may be related to the good correlation between the mesopore sizes and the protein diameter (see Fig. 2A).

As for the stability, it can be related to previous protein adsorption studies which demonstrate that the percentage of proteins in strong interaction with the carbon surface is more than twice higher at CNFs than at other carbon materials such as template carbon films.⁴⁵ This shows that the great reactivity of the CNF surface allows a strong interaction of the protein with the carbon surface.

The two different procedures for MbH1 immobilization exposed in the experimental section were then compared in terms of stability of the bioelectrode and efficiency for H_2 oxidation. Using procedure (a), adsorption kinetics and isotherms of MbH1 were followed by recording the catalytic currents for H_2 oxidation using CV. The CV catalytic current at a potential of -0.3 V was taken as a characteristic parameter. This potential corresponds to the middle of the plateau in the CV current response. The catalytic current levelled off after only a few minutes of incubation of the CNF_H2-modified PG electrode in MbH1 solution, suggesting fast adsorption of the enzyme. The catalytic signal stability was however increased for longer incubation time of up to 60 min which may be related to a multi-step organization of the enzymes in the CNF layer (Fig. S12, ESI[†]).⁴⁶ The adsorption isotherms of MbH1 as a function of the amount of CNF_H2 deposited on the PG electrode were constructed based on the recorded catalytic currents. Results are given in Fig. 5A. The first observation is that the maximum of the catalytic current is obtained for MbH1 concentration between 1 and $2 \mu\text{M}$. Moreover current densities for H_2 oxidation increase with increasing amounts of CNF_H2. This can be reasonably linked to an increasing amount of MbH1 able to be anchored in the CNF layers as the surface develops. However, the current density tends to level off for the highest CNF amounts.

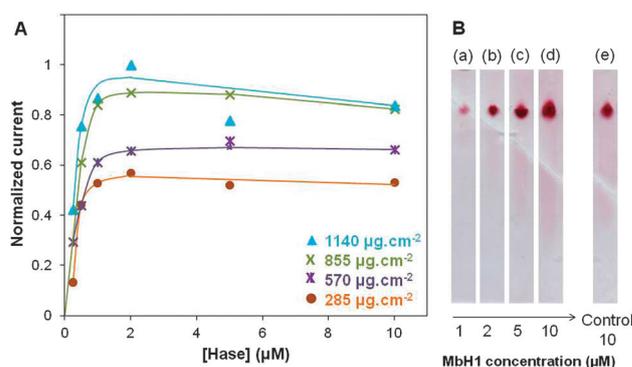


Fig. 5 Evolution of the catalytic current with MbH1 concentration for increasing amounts of CNF_H2; (A) evolution with MbH1 concentration of the CV catalytic current measured under quiescent conditions under H_2 atm. for increasing amounts of CNFs deposited as successive layers on a PG electrode; MbH1 is adsorbed on the pre-formed CNF layer for 30 min; (B) hydrogenase activity revealed on native blue gels with H_2 as an electron donor and methyl viologen as an electron acceptor at 80°C ; reduction of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride by reduced methyl viologen produced the pink colour of gels, characteristic of hydrogenase activity; bands (a) to (d) correspond to the hydrogenase activity remaining after incubation of the CNF-modified PG electrode in MbH1 solutions of increasing concentrations; band (e) is the control hydrogenase activity for MbH1 concentration of $10 \mu\text{M}$.

To ensure that this could be due to saturation of the CNF film by the enzyme, MbH1 solutions in which the CNF-modified electrode was incubated were deposited on native blue gels. Then the activity for H₂ oxidation was revealed on the gel. The results are gathered in Fig. 5B, where the red bands correspond to active hydrogenase. It is clear that the initial 1 μM solution which served for electrode incubation still contains MbH1. Even if it is impossible from this gel activity to quantify the remaining enzyme with accuracy, these experimental results demonstrate that the limiting current we observed in Fig. 5A is not linked to enzyme availability. Multiple hypothesis can be put forward to explain the catalytic limitation: (i) the reactive sites of the CNFs are saturated with MbH1 so that an insufficient amount of CNFs is available for more MbH1 anchoring, (ii) the upper layers of MbH1 block the access of further MbH1 molecules inside the CNF layer, (iii) other processes such as mass transport inside the CNF layer are limiting.

In order to confirm or infirm the first hypothesis, adsorption of MbH1 was quantified by the determination of the remaining enzyme in solution after adsorption in CNF_H2 powder. Around 43 mg per g of CNF_H2 was found to be adsorbed in the CNF material. This demonstrates that MbH1 must have been fully adsorbed in our range of CNF amount. Assumption (i) is thus ruled out. Besides, adsorption measurements underlined that 4 h were necessary for complete enzyme saturation. This contrasts with the fast saturation we faced according to electrochemistry measurements, and suggests again that the current we recorded was limited by other processes such as mass transport inside the CNF film. The two remaining hypotheses will be further discussed in the following paragraph.

The porosity between the fibers is close to the CNF diameters, *i.e.* in the range 100–200 nm. This value is significantly larger than the protein size. Previous studies on nanostructured carbon films have nevertheless shown that under such conditions pore plugging may occur and lead to mass transfer limitations.⁴⁵ Procedure (b), which consists of mixing enzyme and CNFs before deposition on the electrode, was therefore handled in order to validate assumption (ii) by overcoming MbH1 diffusion inside the mesoporous CNF film. Furthermore, an enhancement of the stability of the catalytic signal was expected, because MbH1 could be protected from leaching by deep entrapment in the CNF_H2 thickness. Both the concentration of MbH1 and the amount of CNF_H2 were varied in the mixture before deposit on the PG electrode.

H₂ oxidation proceeded efficiently through MbH1 embedded in the carbon material, but with lower current densities however than in procedure (a) (the maximum current density was only 505 μA cm⁻² against 1.1 mA cm⁻² in procedure (a)). The catalytic efficiency was also strongly dependent on the ratio of MbH1 to CNF_H2 amount. The lowest the ratio of MbH1/CNF_H2 amount, the highest the catalytic current. A weak mechanical stability of the MbH1–CNF_H2 biohybrid was also observed with MbH1 concentrations higher than 2 μM. Progressive desorption of MbH1 might be one explanation of this evolution. Other hypothesis cannot be ruled out: MbH1 molecules located in deep zones of the CNF film could be electrochemically not

addressable because of substrate transport limitation, or deep zones of the CNF film could be free of enzymes because of MbH1 diffusion limitation inside the CNF film, or zones in the film could be electrically insulated from the electrode. To address these issues, impedance spectroscopy was used to determine the evolution of the kinetic parameters in the mixture MbH1–CNF_H2. Using the same amount of CNFs, the charge transfer resistance (R_{ct}) of the loop obtained in the Nyquist plane increased from 1.2 kΩ for the CNF layer alone to 14 kΩ for MbH1 directly adsorbed on the CNF layer (procedure a), up to 40 kΩ in the case of the mixing of MbH1 CNFs (procedure b) (Fig. S13, ESI[†]). This increase in R_{ct} suggests that a great fraction of MbH1 molecules acts as an electrical insulator between CNFs. This electrical insulation is deleterious to an efficient electron transfer for H₂ oxidation. Because interactions between the fibers decrease, this can also explain the decreasing mechanical stability of the biohybrids.

Search for the limitation process

Enzymatic oxidation of H₂ by MbH1 adsorbed in CNF_H2 according to procedure (a) was further examined using CV in order to address the limitation in catalytic current issue. Fig. 6 compares CV behavior for MbH1 under H₂ at 60 °C at a bare RPG electrode and at a RPG electrode modified by 855 μg cm⁻² of CNF_H2. CV curves are reported after current normalization for an easier comparison. A striking observation is that the shape of the H₂ oxidation CV signal is greatly influenced by the electrode modification. With MbH1 simply adsorbed on the RPG electrode (Fig. 6A) when the potential is raised from –650 mV, H₂ oxidation starts around –520 mV. At 0 rpm the current density first increases with increasing potential, then reaches a maximum at around –300 mV and immediately decreases because of the formation of the reversibly inactivated Ni-B state of the [NiFe] active center. Fig. 6B shows the result of the experiment performed under exactly the same conditions, except that the hydrogenase is adsorbed on a RPG electrode modified with CNF_H2. At 0 rpm, the oxidation starts at the same potential, but the increase in normalized current with potential describes a slope which is far more important (10 V⁻¹ against 4 V⁻¹). This increase is observed only over a limited range of potential, which does not lead to a peak shape as observed before but to a plateau, with a constant current density over around 300 mV.

Three different hypotheses could be proposed to account for this change in the signal shape. First, the electrode modification with CNFs could increase the electrical conductivity of the interface in such a way that the catalysis becomes the rate-limiting step of the experiment at a lower potential than usual. Second, this plateau shape could be the boundary case of the distribution of orientation theory. According to the latter, at a planar electrode the hydrogenase molecules would be adsorbed in every possible orientation in the absence of specific interaction. Then the distance between the distal [4Fe4S] cluster, the last surface electronic relay on the protein, and the electrode surface could take any value below the tunneling distance. This would result in a continuous distribution of apparent catalytic

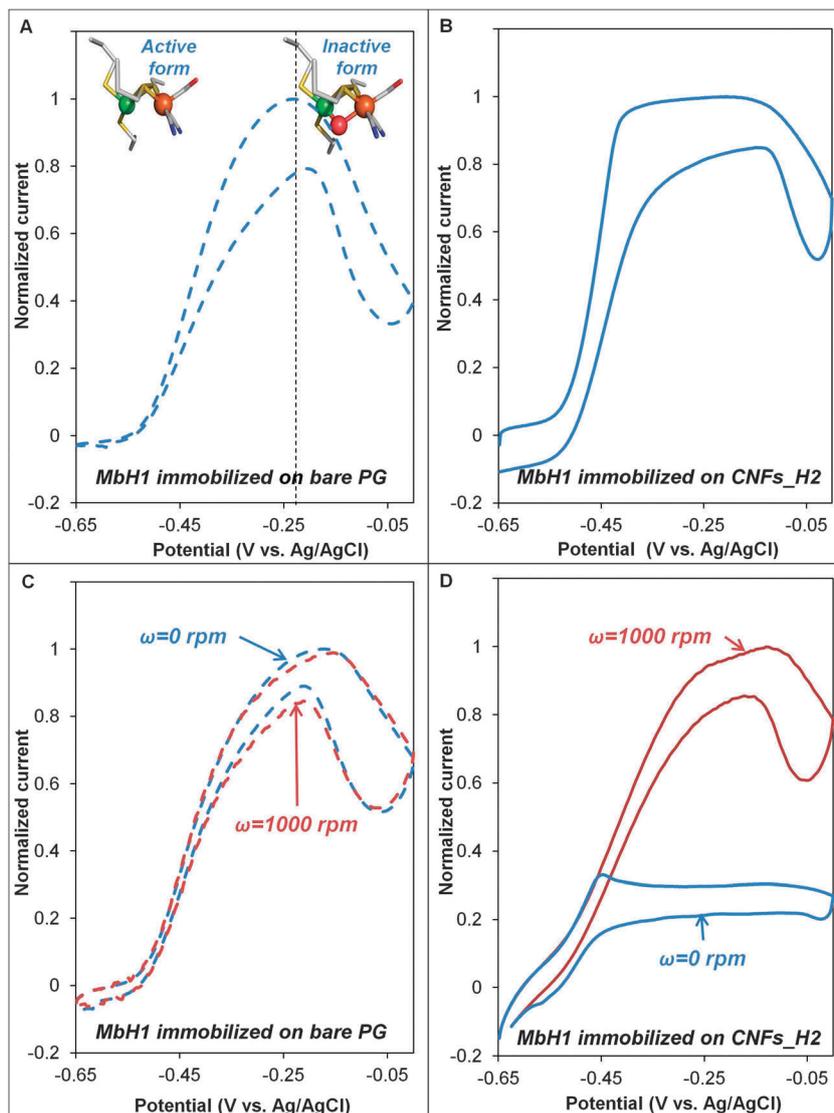


Fig. 6 CV curves for H_2 oxidation by $2 \mu\text{M}$ MbH1 adsorbed for 30 min on a bare RPG electrode (A and C) or on a $855 \mu\text{g cm}^{-2}$ CNF_H2-modified RPG electrode (B and D) in 50 mM HEPES buffer, pH 6.8 at 60°C under H_2 atm at 0 rpm (blue fine lines) and 1000 rpm (red thick lines). In (A) the Ni-Fe active site states are depicted. In (C) and (D) the blue and red CV curves are two consecutive cycles. Scan rate was 5 mV s^{-1} .

rate constants, leading to the slope usually observed in a cyclic voltammetry experiment.⁴⁷ The situation is different when using a CNF-modified PG electrode. In this case the hydrogenase molecules are closely surrounded by nanomaterials. Thus in all configurations the distal FeS cluster would be at the minimal distance from the nanostructured interface so that only one apparent catalytic constant rate takes place. The usual slope would not be observed anymore but would be replaced by a plateau. The unmodified polished PG electrode presents also pores of micrometer size.^{34,48} However this pore size is far less adapted to connectivity of enzyme, compared to the mesopores of the CNF network. And last, the plateau shape could be the result of limitation by mass transport of the substrate. In this case the maximum current density would be determined by the rate at which the enzymes are supplied with hydrogen. It has to be reminded that the electrolyte solution is saturated with

hydrogen before the experiments are carried out. During the experiments described above the hydrogen is maintained at overpressure above the electrolyte so that it can only travel through diffusion.

To get rid of this latter limitation, experiments were performed at 1000 rpm at a RPG electrode while maintaining the hydrogen in overpressure, so that hydrogen can also travel in the electrolyte and through the CNF film by forced convection. Fig. 6 shows the difference between two consecutive scans of a voltammetry experiment under H_2 overpressure, when the hydrogenase is adsorbed either on a bare RPG electrode (Fig. 6C) or on a RPG electrode modified with CNF_H2 (Fig. 6D). On the first cycle (blue line) performed at the RPG electrode under quiescent conditions and already discussed just above is superimposed a second consecutive cycle (red line) performed at the RPG electrode under rotating conditions. The small difference in current

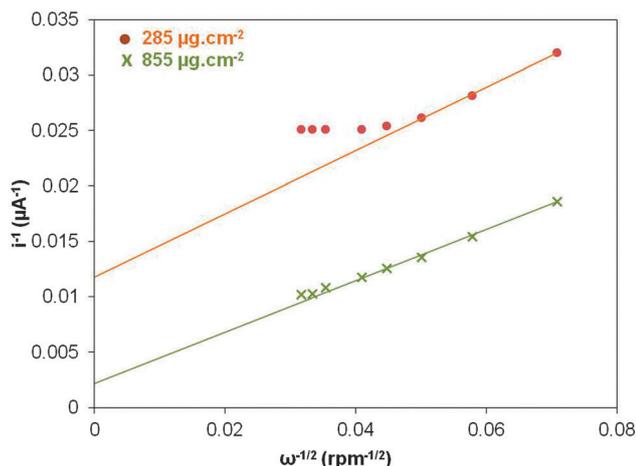


Fig. 7 Typical Koutecky–Levich plots derived from CV curves for H_2 oxidation by $2 \mu\text{M}$ MbH1 adsorbed for 30 min on two deposits of CNF_H2 on the RPG electrode in 50 mM HEPES buffer, pH 6.8 at 60°C under H_2 atm. Scan rate was 5 mV s^{-1} .

between the two consecutive scans in Fig. 6C is the typical decrease previously discussed between two consecutive scans no matter what the conditions of hydrogen supply are. This is due to some change in MbH1 film, a combination of enzyme leaching, deactivation and reorientation.^{49,50} On the other hand, the difference between the two scans in Fig. 6D is only the result of change in hydrogen supply conditions. An increase in the current density for H_2 oxidation and a far less marked plateau-shape is observed. This clearly indicates that the plateau observed at the stationary electrode was due to limitation by mass transport of the substrate. This phenomenon was studied as a function of the CNF amount deposited at the electrode to evaluate the mass transport limitation inside the CNF_H2 film.

Two CNF deposits were studied at the RPG electrode. The respective Koutecky–Levich plots for 285 and $855 \mu\text{g cm}^{-2}$ CNF_H2 are reported in Fig. 7. For the thickest CNF film, a linear relationship is observed for hydrogen oxidation between the inverse of the limited catalytic current and the inverse of the square root of the rotation rate with no kinetic limitation up to 1000 rpm. The experimental current limit predicted by the Levich region reaches in this case a value of 6.5 mA cm^{-2} . For the low CNF amount, the currents are kinetically controlled for rotation rates higher than 400 rpm and the current limit is now 1.2 mA cm^{-2} . This behavior is consistent with Flexer's and Bonnacaze's observations.^{29,51} The increase of the current with the rotation rate on a porous electrode was demonstrated to rely on the variation of the flow rate of substrates throughout the porous thickness, the perfusion of reactants, and the ratio of reaction time to resident time of substrates in the porous media. Our results demonstrate that the catalytic current increase with the rotation rate is due to more H_2 diffusing inside the CNF film, and thus to more hydrogenase molecules participating in the whole oxidative process. They also demonstrate that the porosity is still not fully optimized as the amount of CNFs increases.

Mass transport limitation was further confirmed with hydrogen bubbling directly in the electrolyte. This hydrogen supply procedure would be preferred to experiments at the RPG electrode for more realistic configuration for future biofuel cell application. Conditions where H_2 is only in overpressure above or bubbling into the electrolyte will be named H_2 OFF and H_2 ON, respectively. Exactly the same evolution of the CV cycles as described in Fig. 6 with the RPG electrode is obtained (Fig. SI4, ESI†). Adsorption isotherms and kinetics were reexamined under conditions of H_2 ON and compared to the data obtained under conditions of H_2 OFF (Fig. SI5, ESI†). In contrast with the profiles obtained under H_2 OFF conditions, the catalytic currents were at least three times higher for $2 \mu\text{M}$ MbH1 which was the saturation concentration observed under conditions of H_2 OFF. Furthermore, the catalytic currents increased continuously with increasing MbH1 concentrations, although not linearly above $2 \mu\text{M}$ MbH1. Adsorption kinetics also revealed that longer durations were needed to reach saturation. These experimental results under H_2 ON conditions highlight again the mass transport limitation at the CNF modified PG electrode.

A first reason why this mass transport limitation is not observed with a bare PG electrode is that the number of connected enzymes is far smaller, and consequently the hydrogen diffusion in the electrolyte is fast enough to ensure a sufficient substrate supply at the electrode. To get deeper into details CA experiments were performed at a potential of $-0.3 \text{ V vs. Ag/AgCl}$, which matches approximately the middle of the current plateau (Fig. 8). Fig. 8A shows the evolution of current density over time while the hydrogen is switched every minute whether off (H_2 OFF, blue arrows) or on (H_2 ON, red arrow). The current response to this regular switching is significant and immediate. Thereafter, a parameter defined as $\Delta i = (i_{\text{H}_2\text{ON}}) - (i_{\text{H}_2\text{OFF}})$ as represented in Fig. 8A is measured. As can be seen in Fig. 8B, Δi increases with increasing amounts of CNFs showing that the bigger the developed surface area of the electrode, or more accurately the bigger the CNF network, the bigger the amount of hydrogenase molecules that cannot efficiently oxidize hydrogen when the latter is provided only through diffusion. Interestingly also, the maximal current density of the signal increases with increasing amounts of CNFs attesting that the number of enzyme molecules adsorbed is directly related to the developed surface area of the electrode (Fig. 8C). The increase of i_{max} with the estimated surface area of the electrode is faster under H_2 ON than under H_2 OFF conditions. This demonstrates that providing hydrogen flux inside the CNF film enables the amount of electrically connected hydrogenase to increase with the increase in the CNF network. From Fig. 8C it is also noticeable that the current density does not increase linearly with the CNF amount for the thinnest films whatever H_2 OFF or H_2 ON. This can be explained by the need for a sufficient amount of 3D-network to overcome the enzyme orientation limitation for direct electrical connection, and reinforces the idea that porous structures are needed in view of the enhancement of catalytic current densities. We finally varied the flow rate of hydrogen under H_2 ON conditions in order to search for the optimum current density. In Table 1 are given the current densities measured by

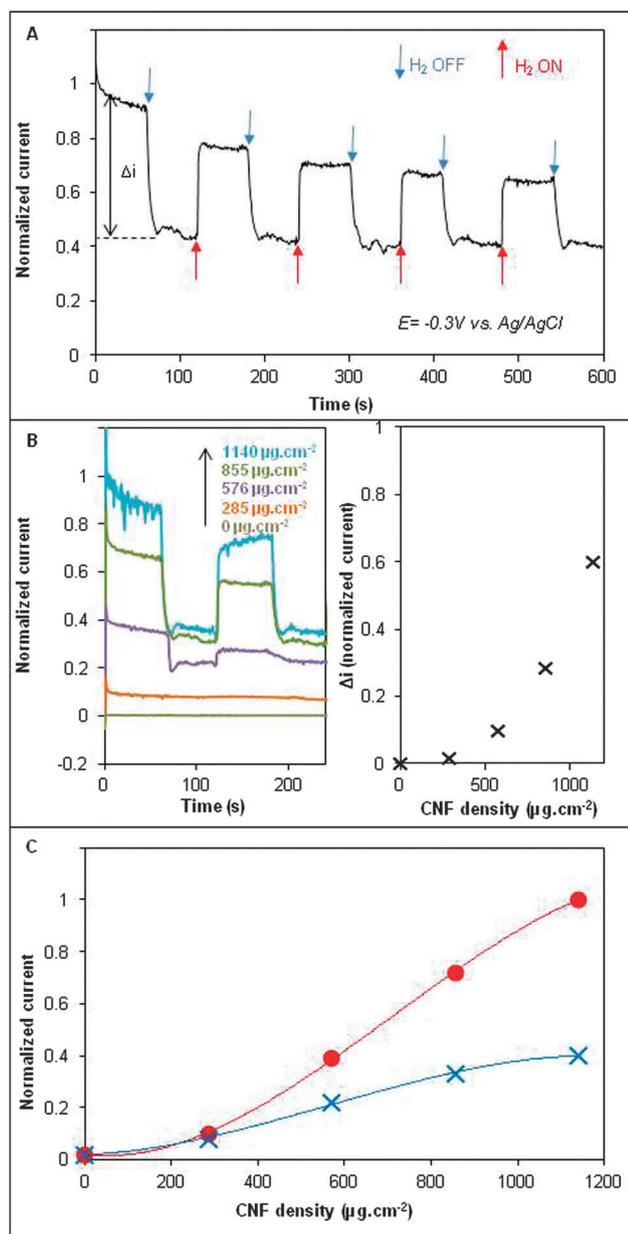


Fig. 8 Evolution of the current density for H_2 oxidation at -0.3 V vs. Ag/AgCl by $2 \mu\text{M}$ MbH1 adsorbed for 30 min on CNF_H2 on the PG electrode in 50 mM HEPES buffer, pH 6.8 at 60°C under H_2 according to hydrogen supply. (A) Typical CA curve showing the response in current to a regular switch of H_2 in overpressure above the electrolyte (H_2 OFF, blue arrow) to H_2 bubbling in the electrolyte (H_2 ON, red arrow). The parameter Δi is the difference between the maximum current density recorded under H_2 ON conditions and the maximum current density recorded under H_2 OFF conditions. (B) Evolution of the CA experiment as in (A) as a function of increasing amount of CNF_H2. (C) Evolution of the maximum current density measured at 50 s as a function of CNF_H2 under H_2 OFF conditions (\times , blue line) or H_2 ON conditions (\bullet , red line).

CV experiments for two different CNF amounts as a function of H_2 flow rate. It is observed that the current density increases with the H_2 flow rate up to a boundary value which depends on the CNF deposit. In the best configuration, current densities as high as 4.5 mA cm^{-2} are reached (Fig. SI6, ESI†).

Table 1 Evolution of the current density for H_2 oxidation by MbH1 immobilized on the CNF_H2-modified PG electrode as a function of H_2 flow rate. 50 mM HEPES buffer, pH 6.8 at 60°C under H_2 atm. Scan rate was 5 mV s^{-1}

H_2 flow rate ($\text{cm}^3 \text{ s}^{-1}$)	j (mA cm^{-2})	
	CNFs $855 \mu\text{g cm}^{-2}$	CNFs $1140 \mu\text{g cm}^{-2}$
0	0.6	0.6
0.35	1.0	1.3
1.05	1.5	2.0
1.6	1.8	2.7
2.4	2.0	3.7
3.5	2.3	4.2
5.2	2.7	4.5

Conclusion and perspectives

The results presented in this work underline how herringbone carbon nanofiber films developing high porous surface area are suitable for MbH1 adsorption. Micro and mesopores in the mesoporous film allow not only an efficient immobilization of MbH1 but permit to overcome the catalytic limitation induced by enzyme orientation. Moreover, our work analyzes for the first time mass transport limitation inside the mesoporous film.

The deep physico-chemical characterization of these peculiar mesoporous carbon nanofibers enables the development of a suitable platform for efficient H_2 oxidation by immobilized O_2 -tolerant MbH1. The electrochemical characterization of the CNF film leads to the determination of a developed surface area which is 1500 times larger than the area of the bare electrode. The mesoporosity of the carbon material allows efficient entrapment of MbH1. With classical Bradford protein assay the total amount of MbH1 able to incorporate the carbon material was measured as 43 mg per g of CNF. The chemical treatment of CNFs induces a hydrophobic surface which is suitable for immobilization of MbH1 in an efficient way for a mediatorless catalytic process. This result is in contrast with previous measurements at gold electrodes functionalized with hydrophobic monolayers. Use of CNF material thus reinforces the idea that 3D-structures are able to overcome the orientation limitation induced by adsorption of enzymes such as hydrogenases on flat electrodes. Moreover, we demonstrate in this work that progressive adsorption of MbH1 in the CNFs by incubation is preferable to mixing of the enzyme with the carbon material, because of electrical isolation of the carbon material by MbH1 in the latter case.

By increasing the amount of carbon nanofibers deposited on the bare electrode, current densities above 1 mA cm^{-2} are reached under quiescent conditions. This current density is largely enhanced compared to flat carbon electrodes (at least 20 times higher) and about twice the typical current density observed using functionalized carbon nanotubes. But the increase in the amount of CNFs in the film also highlights that mass transport inside the mesoporous carbon material limits the whole catalytic process. This transport limitation is the key for future development of enzymatic electrodes, but is still rarely discussed in related publications. In the present work, we have analyzed mass transport as a function of the CNF

amount, thus the thickness and tortuosity of the film, either at a rotating electrode or under H₂ bubbling, which is more realistic for future biofuel cell applications. We have demonstrated that when hydrogen supply is sufficient inside the mesoporous film current density as large as 4.5 mA cm⁻² can be reached. This is almost 100 times higher than when MbH1 is simply adsorbed at the PG electrode, and more than 5 times higher than the average of the previously reported current densities at carbon nanotube modified electrodes.

The CNF films used in this work develop a surface area 1500 times higher than the flat graphite electrode, thus the geometric area. Moreover we have estimated using MB as a redox probe that less than 10% of this surface is available for molecule adsorption. Using compacted carbon powder, Armstrong *et al.* estimated a surface accessibility 10⁵ times higher than the geometric area.²² Because the same range of limiting current densities is reached in the latter work compared to our current work, this suggests that a high fraction of the carbon material could not be available for Hase adsorption in compacted carbon powder films. Taking into account the amount of MbH1 adsorbed in the carbon nanofiber mesoporous film (34 pmol from the Bradford assay), a turnover frequency for H₂ oxidation of 48 s⁻¹ is calculated. The turnover frequency for Hases adsorbed at flat electrodes stays a remaining issue because actual surface coverage is still unknown. It was however expected to be at least higher than 100 s⁻¹.²² Our value is thus still below the expected turnover, although it is a decade higher than the previously reported value obtained in compacted carbon powder.²² Our analysis for H₂ transport as a function of the CNF film underlines that a current limit of more than 6 mA cm⁻² could be reached. A great further enhancement of the current density is however expected by appropriate design of the bioelectrode and by modeling the substrate diffusion inside the porous film. For H₂/O₂ biofuel cell development, not only the cell design but also the use of hydrogen directly produced from biomass will allow a further leap in this new generation of sustainable biofuel cells.

Abbreviations

Aa	<i>Aquifex aeolicus</i>
BET	Brunauer–Emmett–Teller
BSA	Bovine serum albumin
CA	Chronoamperometry
CNF	Carbon nanofiber
CV	Cyclic voltammetry
CVD	Chemical vapor deposition (CVD)
Cytc	Horse heart cytochrome <i>c</i>
DDM	<i>n</i> -Dodecyl α -D-maltoside
DET	Direct electron transfer
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamide
Gox	Glucose oxidase
Hase	Hydrogenase
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid

ITO	Indium tin oxide
MB	Methylene blue
MbH1	Aa Membrane-bound hydrogenase
MET	Mediated electron transfer
PG	Pyrolytic graphite
R_{ct}	Charge transfer resistance
RPG	Rotating pyrolytic graphite
SAM	Self-assembled-monolayer
SEM	Scanning electron microscopy
TEM	Transmission electron microscopy
TPD-MS	Temperature programmed desorption with mass spectrometry analysis.

Acknowledgements

Pascale Infossi is particularly thanked for her help in the protein purification. Joseph Dentzer is acknowledged for his technical support in the CNF characterization, and Alexandre Ciaccafava and Renaud Denoyel for helpful discussions. The authors thank Région Provence-Alpes-Côte d'Azur, CNRS, and ANR Bioénergie No. ANR-2010-BIOE-003-01 for financial support.

References

- 1 A. Yahiro, S. Lee and D. Kimble, *Biochim. Biophys. Acta*, 1964, **88**, 375–383.
- 2 L. Lapinsonniere, M. Picot and F. Barriere, *ChemSusChem*, 2012, **5**, 995–1005.
- 3 D. Leech, P. Kavanagh and W. Schuhmann, *Electrochim. Acta*, 2012, **84**, 223–234.
- 4 A. Zebda, S. Cosnier, J. Alcaraz, M. Holzinger, A. Le Goff, C. Gondran, F. Boucher, F. Giroud, K. Gorgy, H. Lamraoui and P. Cinquin, *Sci. Rep.*, 2013, **3**, 1516.
- 5 M. Rasmussen, R. Ritzmann, I. Lee, A. Pollack and D. Scherson, *J. Am. Chem. Soc.*, 2012, **134**, 1458–1460.
- 6 L. Halamkova, J. Halamek, V. Bocharova, A. Szczupak, L. Alfonta and E. Katz, *J. Am. Chem. Soc.*, 2012, **134**, 5040–5043.
- 7 X. Y. Yang, G. Tian, N. Jiang and B. L. Su, *Energy Environ. Sci.*, 2012, **5**, 5540–5563.
- 8 X. Xie, L. B. Hu, M. Pasta, G. F. Wells, D. S. Kong, C. S. Criddle and Y. Cui, *Nano Lett.*, 2011, **11**, 291–296.
- 9 Y. C. Yong, X. C. Dong, M. B. Chan-Park, H. Song and P. Chen, *ACS Nano*, 2012, **6**, 2394–2400.
- 10 K. Vincent, A. Parkin and F. Armstrong, *Chem. Rev.*, 2007, **107**, 4366–4413.
- 11 A. Abou Hamdan, B. Burlat, O. Gutierrez-Sanz, P. P. Liebgott, C. Baffert, A. de Lacey, M. Rousset, B. Guigliarelli, C. Leger and S. Dementin, *Nat. Chem. Biol.*, 2013, **9**, 15.
- 12 J. Fritsch, O. Lenz and B. Friedrich, *Nat. Rev. Microbiol.*, 2013, **11**, 106–114.
- 13 R. Evans, A. Parkin, M. Roessler, B. Murphy, H. Adamson, M. Lukey, F. Sargent, A. Volbeda, J. Fontecilla-Camp and F. Armstrong, *J. Am. Chem. Soc.*, 2013, **135**, 2694–2707.

- 14 M. Pandelia, V. Fourmond, P. Tron-Infossi, E. Lojou, P. Bertrand, C. Leger, M. T. Giudici-Orticoni and W. Lubitz, *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, **132**, 6991–7004.
- 15 E. Lojou, *Electrochim. Acta*, 2011, **56**, 10385–10397.
- 16 A. Volbeda, P. Amara, C. Darnault, J. Mouesca, A. Parkin, M. Roessler, F. Armstrong and J. Fontecilla-Camps, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2012, **109**, 5305–5310.
- 17 S. Krishnan and F. Armstrong, *Chem. Sci.*, 2012, **3**, 1015–1023.
- 18 A. Ciaccafava, A. de Poulpique, V. Techer, M. T. Giudici-Orticoni, S. Tingry, C. Innocent and E. Lojou, *Electrochem. Commun.*, 2012, **23**, 25–28.
- 19 M. Alonso-Lomillo, O. Rüdiger, A. Maroto-Valiente, M. Velez, I. Rodriguez-Ramos, F. Munoz, V. Fernandez and A. De Lacey, *Nano Lett.*, 2007, **7**, 1603–1608.
- 20 D. Svedruzic, J. Blackburn, R. Tenent, J. D. Rocha, T. Vinzant, M. Heben and P. King, *J. Am. Chem. Soc.*, 2011, **133**, 4299–4306.
- 21 X. J. Luo, M. Brugna, P. Infossi, M. T. Giudici-Orticoni and E. Lojou, *JBIC, J. Biol. Inorg. Chem.*, 2009, **14**, 1275–1288.
- 22 L. Xu and F. Armstrong, *Energy Environ. Sci.*, 2013, **6**, 2166–2171.
- 23 S. Minter, P. Atanassov, H. R. Luckarift and G. R. Johnson, *Mater. Today*, 2012, **15**, 166–173.
- 24 D. Fried, K. Tropp and M. Fröba, *ChemCatChem*, 2013, **5**, 931–938.
- 25 Y. Hamano, S. Tsujimura, O. Shirai and K. Kano, *Bioelectrochemistry*, 2012, **88**, 114–117.
- 26 T. Miyake, S. Yoshino, T. Yamada, K. Hata and M. Nishizawa, *J. Am. Chem. Soc.*, 2011, **133**, 5129–5134.
- 27 M. Sosna, L. Stoica, E. Wright, J. Kilburn, W. Schuhmann and P. Bartlett, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2012, **14**, 11882–11885.
- 28 S. Rubenwolf, S. Sané, L. Hussein, J. Kestel, F. von Stetten, G. Urban, M. Krueger, R. Zengerle and S. Kerzenmacher, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2012, **96**, 841–849.
- 29 V. Flexer, N. Brun, O. Courjean, R. Backov and N. Mano, *Energy Environ. Sci.*, 2011, **4**, 2097–2106.
- 30 Y. Zhu, Z. Sui, T. Zhao, Y. Dai, Z. Cheng and W. Yuan, *Carbon*, 2005, **43**, 1694–1699.
- 31 D. Luxembourg, X. Py, A. Didion, R. Gadiou, C. Vix-Guterl and G. Flamant, *Microporous Mesoporous Mater.*, 2007, **98**, 123–131.
- 32 Y. Y. Li, S. D. Bae and A. Sakoda, *Carbon*, 2001, **39**, 91–100.
- 33 P. Serp, M. Corrias and P. Kalck, *Appl. Catal., A*, 2003, **253**, 337–358.
- 34 A. Ciaccafava, A. de Poulpique, P. Infossi, S. Robert, R. Gadiou, M. T. Giudici-Orticoni, S. Lecomte and E. Lojou, *Electrochim. Acta*, 2012, **82**, 115–125.
- 35 L. T. Serebryakova, M. E. Sheremet'eva and P. Lindblad, *Microbiology*, 1999, **68**, 249–253.
- 36 Y. J. Kim, B. J. Lee, H. Suezaki, T. Chino, Y. Abe, T. Yanagiura, K. Park and M. Endo, *Carbon*, 2006, **44**, 1592–1595.
- 37 C. M. Ghimbeu, R. Gadiou, J. Dentzer, D. Schwartz and C. Vix-Guterl, *Langmuir*, 2010, **26**, 18824–18833.
- 38 A. Ciaccafava, P. Infossi, M. Ilbert, M. Guiral, S. Lecomte, M. T. Giudici-Orticoni and E. Lojou, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2012, **51**, 953–956.
- 39 P. Brender, R. Gadiou, J. C. Rietsch, P. Fioux, J. Dentzer, A. Ponche and C. Vix-Guterl, *Anal. Chem.*, 2012, **84**, 2147–2153.
- 40 L. R. Radovic, C. Moreno-Castilla and J. Rivera-Utrilla, Carbon materials as adsorbents in aqueous solutions, in *Chemistry and Physics of Carbon*, ed. L. R. Radovic, Marcel Dekker, 2000, vol. 27, pp. 227–405.
- 41 J. Iapichella, J. M. Meneses, I. Beurroies, R. Denoyel, Z. Bayram-Hahn, K. Unger and A. Galarneau, *Microporous Mesoporous Mater.*, 2007, **102**, 111–121.
- 42 T. Kimura, H. Kanoh, T. Kanda, T. Ohkubo, Y. Hattori, Y. Higaonna, R. Denoyel and K. Kaneko, *J. Phys. Chem. B*, 2004, **108**, 14043–14048.
- 43 A. de Poulpique, A. Ciaccafava, K. Szot, B. Pillain, P. Infossi, M. Guiral, M. Opallo, M. T. Giudici-Orticoni and E. Lojou, *Electroanalysis*, 2013, **25**, 685–695.
- 44 M. van Gastel, S. Matthias, M. Brecht, O. Schroeder, F. Lenzian, R. Bittl, H. Ogata, Y. Higuchi and W. Lubitz, *JBIC, J. Biol. Inorg. Chem.*, 2006, **11**, 41–51.
- 45 M. Vijayaraj, R. Gadiou, K. Anselme, C. Ghimbeu, C. Vix-Guterl, H. Orikasa, T. Kyotani and S. Ittisanronnachai, *Adv. Funct. Mater.*, 2010, **20**, 2489–2499.
- 46 M. Rabe, D. Verdes and S. Seeger, *Adv. Colloid Interface Sci.*, 2011, **162**, 87–106.
- 47 C. Léger, A. Jones, S. Albracht and F. Armstrong, *J. Phys. Chem. B*, 2002, **106**, 13058–13063.
- 48 C. Blanford and F. Armstrong, *J. Solid State Electrochem.*, 2006, **10**, 826–832.
- 49 A. Ciaccafava, P. Infossi, M. T. Giudici-Orticoni and E. Lojou, *Langmuir*, 2010, **26**, 18534–18541.
- 50 D. Millo, M. Pandelia, T. Utesch, N. Wisitruangsakul, M. Mroginski, W. Lubitz, P. Hildebrandt and I. Zebger, *J. Phys. Chem. B*, 2009, **113**, 15344–15351.
- 51 R. Bonnecaze, N. Mano, B. Nam and A. Heller, *J. Electrochem. Soc.*, 2007, **154**, F44–F47.



New trends in enzyme immobilization at nanostructured interfaces for efficient electrocatalysis in biofuel cells



A. de Poulpiquet¹, A. Ciaccafava¹, E. Lojou^{*,1}

Unité de Bioénergétique et Ingénierie des Protéines, Institut de Microbiologie de la Méditerranée, Centre National de la Recherche Scientifique–Aix Marseille Université, 31 Chemin Joseph Aiguier, 13402 Marseille Cedex 20, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 24 May 2013

Received in revised form 15 July 2013

Accepted 16 July 2013

Available online 31 July 2013

Keywords:

Biofuel cell

Electrode modification

Nanostructuration

Electrochemistry

Enzyme

ABSTRACT

Biofuel cells, and among them enzymatic biofuel cells, are expected to take part in a sustainable economy in a next future. The development of such biodevices requires significant improvements in terms of efficiency of enzyme immobilization at the electrodes, so as to enable direct electron transfer, and to increase and stabilize the current densities. Many works during the last years aimed at reaching higher current densities, thus power densities, while increasing the long term stability of the enzymatic bioelectrodes. Search for new enzymes, wild type or mutants, new entrapment procedures, but also new electrode architectures, have been targeted. This review focuses on the materials developed and involved during the last few years to meet these demands *via* nanostructuration of electrode interfaces. Discussion is essentially focused on cases where direct electron transfer between enzymes and electrochemical interfaces are involved. After having introduced the main reasons for the need of nanostructuration, the materials and methods that are newly developed are described. The consequences on improved performances for enzymatic bioelectrodes are discussed, and finally major challenges for future research are addressed.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

In the current energetic context in which the depletion of usual fossil fuel resources is expectable, fuel cells have attracted great interest because they allow the use of renewable and inexpensive fuels with high energy density and safety. However, the need for noble metals such as platinum to catalyze the reactions that convert chemical energy into electricity is a limiting factor, as these metals are expensive, scarcely available and exhaustible. In the last century, technologies have emerged in which they are replaced by whole microorganisms or parts of these latter, leading to microbial, mitochondrial or enzymatic biofuel cells (BFCs). Some recent

reviews by Walsh et al., Schuhmann et al., Minteer et al. and Cosnier et al. are particularly relevant in that latter domain [1–4].

In enzymatic BFCs (EBFCs), at least the catalyst at the anode is a redox enzyme. This kind of BFCs was first introduced in 1964 by Yahiro et al. [5] and although this field has undergone many developments since then, especially in the last decade, there is still scope for improvement. Enzymes are expected to be better candidates as biocatalysts than microbes, not only because of their excellent intrinsic properties such as specificity toward substrate, high catalytic activity with low overvoltage for substrate conversion, mild operating conditions like ambient T° and near-neutral pH, but also due to their low cost, renewability and biodegradability. All substances likely to be utilized by living microorganisms, like sugars, amines, alcohols, organic acids, hydrogen or large-molecular weight biomasses can be used as fuels, providing the specific enzyme for their transformation is identified and purified.

In the last three years, many different EBFCs relying on enzymatic reactions at both electrodes have been published, a high number that underlines the fast and continuous progresses made in this field. The most used enzymes in these very recent EBFCs are glucose oxidase (GOx) [6–15] which oxidizes glucose into gluconolactone at the anode, and laccase (Lac) [6,9,11,15–18] or bilirubin oxidase (BOD) [13,19,20], both multi-copper oxidases that perform the efficient reduction of oxygen into water at the cathode. Some various studies report also the use of hydrogenase (Hase) [21–24], alcohol dehydrogenase [25–27], cellobiose

Abbreviations: Au-NP, gold nanoparticle; AFM, atomic force microscopy; BFC, biofuel cell; BOD, bilirubin oxidase; CDH, cellobiose dehydrogenase; CNT, carbon nanotube; DET, direct electron transfer; EBFC, enzymatic biofuel cell; FAD, flavin adenine dinucleotide; FDH, fructose dehydrogenase; GC, glassy carbon; GDH, glucose dehydrogenase; GOx, glucose oxidase; Hase, hydrogenase; HOPG, highly-oriented pyrolytic graphite; ITO, indium tin oxide; Lac, laccase; MET, mediated electron transfer; MW-CNT, multi-wall carbon nanotube; PG, pyrolytic graphite; SAM, self-assembled monolayer; SEM, scanning electron microscope; SPR, surface Plasmon resonance; SW-CNT, single-wall carbon nanotube.

* Corresponding author. Tel.: +33 491164524;

fax: +33 491164097/+33 491164578.

E-mail addresses: lojou@imm.cnrs.fr, elisabeth.lojou@wanadoo.fr (E. Lojou).

¹ ISE members.

Table 1

Some usual current densities reached at a planar electrode. Only currents due to DET are taken into consideration. ω is the rotation rate of the electrode.

Enzyme	Micro organism	Electrode material	Current density ($\mu\text{A cm}^{-2}$)	Reference
BOD	<i>Trachyderma tsunodae</i>	Glassy carbon (GC)	≈ 4 ($\omega = 0$)	[20]
CDH	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Polycrystalline gold	≈ 0.5 ($\omega = 0$)	[69]
FDH	<i>Gluconobacter</i> sp.	GC	≈ 100 ($\omega = 0$)	[71]
Hase	<i>Aquifex aeolicus</i>	Pyrolytic graphite (PG)	20 ($\omega = 0$)	[72]
Hase	<i>Desulfovibrio gigas</i>	PG	125 ($\omega \rightarrow \infty$)	[73]
Lac	<i>Trametes</i> sp.	Highly Oriented PG (HOPG)	168 ($\omega = 0$)	[70]

dehydrogenase (CDH) [14,28], fructose dehydrogenase (FDH) [16,19,29,30], glucose dehydrogenase (GDH) [14,28,31–40], lactate dehydrogenase [41], malate dehydrogenase [27], urease [42] or trehalase [43,44], as catalysts respectively oxidizing dihydrogen, alcohols, cellobiose, fructose, glucose, lactate, malate, urea or trehalose at the anode, and polyphenol oxidase [45,46] or tyrosinase [10] reducing oxygen at the cathode. Other enzymes like pyruvate dehydrogenase at the anode [47] or peroxidases at the cathode had also been used formerly [48].

Some of the EBFCs mentioned above have been designed to work in physiological conditions [46,49–51] or in different physiological fluids such as human serum [52], plasma [14,53], human lacrimal liquid [28] or hemolymph [54], which is a challenge because of the low availability and slow diffusion of substrates as well as the presence of many possibly interfering compounds. They have sometimes even been successfully implanted in a lobster [55], in a rat [45,56], in insects [43,44,57], in a snail [54], in clams [58], thus demonstrating the possibility to extract energy directly from various living organisms, or from fruits [59]. For the sake of affordability, some others have been conceived to harvest substrates from commercially available beverages [25,38,39]. The use of cheap electrode materials like paper [39] has also been envisioned in the purpose of developing low-price disposable devices. More extreme environments like high temperatures [22,37] have been foreseen as well.

Power densities ranging from few tens of $\mu\text{W cm}^{-2}$ to almost 2 mW cm^{-2} [16,25] and open circuit voltages as high as 1.1 V for a single cell [21,23] have been reported. Stability has been successfully evaluated on various scales: 24 h [16,21,50], one week [21,60,61], or even one month [51]. Miniaturization efforts have been done in a few cases [30,38,39,54,59,62] leading to systems as small as $5 \times 5 \times 1.1\text{ mm}^3$ [30]. The ability to power tiny gadgets such as light emitting diodes [30,56,59,63], a watch [55], a digital thermometer [56], a small electrical motor [58] or pacemakers [55,64] has already been demonstrated for a couple of systems. An interesting study performed by Miyake et al. [30] is worth emphasizing, as it depicts the stacking of three similar mini fructose- O_2 cells in a single device, thus multiplying the low voltage of a single cell without altering the performances, and while remaining at the millimeter scale (OCV 2.09 V, P_{max} 2.55 mW cm^{-2} at 1.21 V, $5 \times 5 \times 3.3\text{ mm}^3$). These last developments open the route for effective use of EBFCs in low-power devices and in small portable applications. EBFCs might also be considered as suitable electrical power sources for implantable autonomous electronic devices, like drug-delivery or health-monitoring systems.

Despite these attracting properties and potential applications, the expansion of EBFCs still faces some limitations. Power densities remain in most cases quite low, and not sufficient to power the targeted applications. More critically, the long term stability of the devices is still a challenge. Except in rare exceptions where the enzymes remain in solution [42], this requires highly efficient and stable enzyme immobilization at electrodes. In many cases, electrode modifications with conductive nano- or micro-materials, leading to electrode nano- or micro-structuration, have proved to be valuable tools for enhancing the performances of enzyme bioelectrodes. The formation of enzyme-nanoparticle hybrids for

electrochemistry has been envisioned since the end of the 1990s, and less recent results have already been reviewed in interesting papers by Willner et al. [65] or Xiao et al. [66]. This article covers the major contributions in the field over the last years. It does not focus on developed EBFCs but on enzyme electrodes that could be used in EBFCs. Since the topic could be rather extensive, only cases where DET was achieved are considered, essentially over the last five years. The main reasons for such modifications are first introduced, the materials and methods used are then described, and the performances obtained are finally discussed.

2. What is the purpose of electrode modifications by nano- or micro-materials?

2.1. Increase in current densities

One of the most cited motives for nano- or microstructuration of electrodes is to increase the current density and thus the delivered power density of the EBFC. At a planar electrode the current density is indeed limited by the intrinsic properties of the enzyme, according to the following equation:

$$J_{\text{max}} = k_{\text{cat}} \times n \times F \times \Gamma$$

where J_{max} is the maximal current density, n the number of electrons exchanged during the enzymatic reaction, k_{cat} the catalytic turnover of the enzyme, F the Faraday constant and Γ the coverage of enzyme. Let us consider the simplest case of a spheric enzyme with a molecular weight around 200 kDa that corresponds to a radius of 5 nm [67], a reasonable value of $k_{\text{cat}} = 1000\text{ s}^{-1}$ and $n = 2$. A simple calculation gives a maximal current density $J_{\text{max}} \approx 1.2\text{ mA cm}^{-2}$. With a voltage $V = 1.23\text{ V}$, which is the theoretical highest voltage reachable in aqueous electrolytes, this gives a maximal power density $P_{\text{max}} \approx 1.5\text{ mW cm}^{-2}$, which is a quite limited value.

Moreover, it has to be taken into consideration that this equation describes the optimal case where both following conditions are fulfilled: (1) The electroactive surface area matches the geometric surface of the electrode and this electroactive surface area is totally covered by the enzyme; (2) the enzyme is oriented at the electrode in an optimal way so as to give 100% DET. It is therefore really unlikely that this optimal case might be observed. Besides, techniques that allow to assess correct orientations of electroactive enzyme are missing, which precludes the accurate knowledge of k_{cat} . As an example, only one article reports the quantification of Hases at self-assembled monolayers (SAMs) on gold thanks to electrochemistry coupled to scanning electron microscopy (SEM) [68]. Current densities reached at a planar electrode thus vary according to the kind of enzyme studied but are most often situated between $0.5\text{ }\mu\text{A cm}^{-2}$ [69] and $168\text{ }\mu\text{A cm}^{-2}$ [70] as described in Table 1.

Nano- or micro-structuration of the electrode would allow to increase the developed surface area of the electrode without modifying its geometric dimensions, whether by developing a volumic network where larger amounts of enzymes can be entrapped or by creating pores enabling the adsorption of more enzymes.

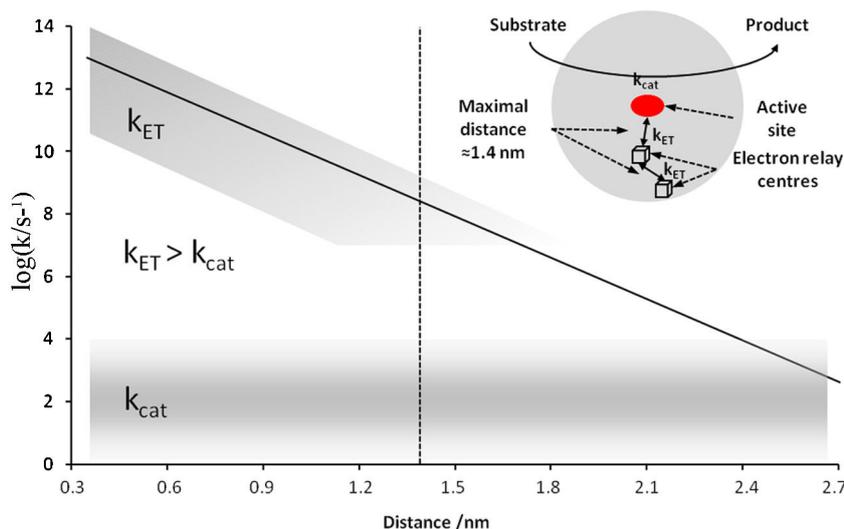


Fig. 1. Distribution of electronic transfer rate for oxidoreductases of known structure as a function of the distance between redox centers (Adapted from [74]).

2.2. Direct electron transfer (DET) achievement and improvement of electron transfer efficiency

Another limitation that has to be overcome in numerous cases is the difficulty to get DET with various enzymes. DET is obtained only when the distance between the active site and an electron relay in the enzyme and the surface of the electrode is inferior to the tunneling distance (≈ 1.5 nm) [74], enabling an electronic contact between the enzyme and the electrode (Fig. 1).

This is not always possible with a planar electrode, whether because the active site is too deeply buried in the protein, as has been reported many times for the glucose oxidase [75,76] which can be surrounded by a glycosylation shell [77,78], or because it is difficult to get a proper orientation of the enzyme at the electrode surface [79]. These unfavorable cases require the use of redox-active species that act as mediators to achieve the electrical connection between enzyme and electrode (Fig. 2). Using redox mediators can help in increasing the current densities and the kinetics of electron transfer. A successful approach has been the development by Heller's group of osmium or ruthenium redox-active centers tethered to a polymer backbone, which allows both the stable immobilization and the efficient wiring of enzymes at the electrode [80,81]. However it has also some disadvantages: Not only do these substances increase the complexity and the cost of the system, but they are also often polluting and even sometimes hazardous. Some of them are not stable in time, limiting the performances and lifetime of their applications [82–84]. In a BFC they would also make necessary the use of a separation membrane between the anodic and the cathodic compartments so to avoid crossover reactions, and to limit the down-scaling of the device. Resorting to them would also increase the overpotentials at the electrodes and thus decrease the voltage of the BFC. From a more fundamental point of view, using redox mediators does not allow to study the catalytic mechanisms of enzymes immobilized at electrodes.

Nanostructuring of the electrode surface can help in overcoming this limitation in two different ways. On one hand, because of their nanometric dimensions close to those of enzymes or even smaller, nanomaterials are supposed to go close enough to the buried active sites or electron relays inside the protein to electronically wire the enzyme at the electrode and allow the electron transfer that cannot be achieved by direct tunneling effect [86,87]. On the other hand, the formation of a volumic network where the enzyme is entrapped allows to get rid of the problems caused by

difficult or non specific orientation of the enzyme at the interface. As one can easily imagine, in such an environment the number of orientations where each point of the enzyme surface is close enough to the electroactive surface to allow DET is multiplied [54,85,88,89].

Actually even if DET is obtained, a problem that can limit the performances of a bioelectrode is the electronic efficiency between enzyme and electrode. Gorton et al. demonstrated that nanostructuring of the interface is one way to improve electron transfer efficiency by reducing the distance, or get less random orientations of the enzyme at the electrode, thus increasing the electron transfer rates [90]. Moreover the addition of extremely conducting materials at the electrode surface can be performed to improve electronic conductivity of the interface between catalyst and electrode [91–93].

2.3. Enhancement of the stability and immobilization of the biocatalyst

Lastly, in many cases the immobilization of an enzyme at a planar electrode is a tiny task because of the lack of reactive sites or reactive functions that provide a favorable environment to the protein. Interactions between the enzyme and the interface are then not sufficient to ensure a long-lasting linking of the biocatalyst at the electrode. Therefore, the modification of the electrode surface by nanomaterials has been undertaken in the purpose of providing anchoring sites, *i.e.* reactive sites for efficient and steady entrapment of the enzymes. The goal has also been to define a confined environment that stabilizes the structure of the protein [20,89]. This has a double advantage in terms of current stabilization as it possibly eliminates or at least reduces two major causes of current decrease over time, that are the leakage and/or rearrangement of enzyme molecules from the electrode interface, and the denaturation of enzyme that leads to loss of catalytic activity.

3. What kind of materials can be used?

Important properties of materials for general use in bioelectrochemistry and especially for efficiently meeting the demands mentioned above are a high surface to volume ratio or a high porosity, a high electrical conductivity and the presence of reactive sites to allow the efficient entrapment of proteins.

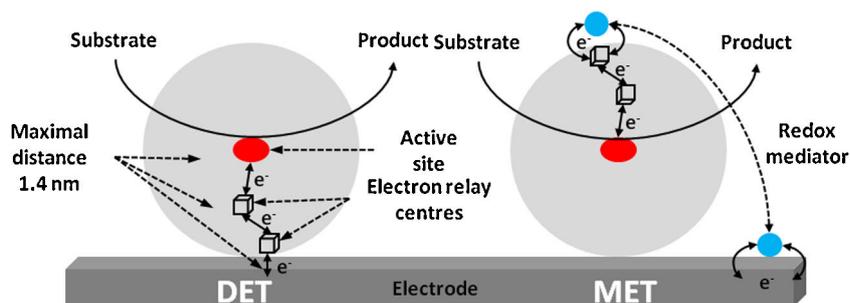


Fig. 2. Schematic representation of (left) direct electron transfer (DET) and (right) mediated electron transfer (MET) (Adapted from [85]).

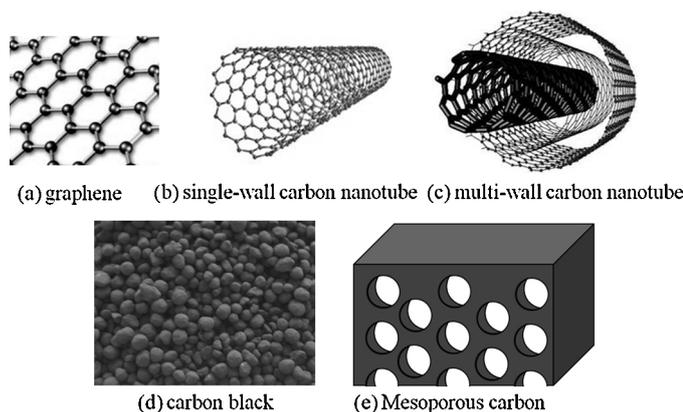


Fig. 3. Views of carbon based nanomaterials.

3.1. Carbon materials

Carbon-based materials are the most widely used due to invaluable properties of carbon such as easy tailoring possibilities, low prices compared to most other raw materials and good biocompatibility. Numerous different kinds of nanostructured carbons are reported, as described on Fig. 3. Among the most cited are single-wall [16,19,22,60,61,72,90,91,94–96] and multi-wall carbon nanotubes [23,29,30,39,51,54,73,92,97,98] (respectively SW-CNTs and MW-CNTs), carbon black [19,29,70,71], carbon nanoparticles [98–100], hollow carbon spheres [41], graphene [18,77,86], mesoporous carbon foams [20,76,89,101,102]. Not only a kind of particles is used, but hybrids made of particles of different sizes, shapes and physical properties can be engineered [86,103]. Most characteristics of carbon-based materials are determined by their architecture and synthesis conditions.

CNTs have diameters in the range of 0.4 to more than 3 nm for SW-CNTs, 1.4 to more than 100 nm for MW-CNTs [104], and lengths varying from few nanometers to 100 μm . They show high chemical and electrochemical stabilities, that is chemical inertness and large potential window. Depending on their chirality, *i.e.* the orientation in which the graphene sheet is rolled around its axis, SW-CNTs can be metallic or semi conductive. The importance of metallic behavior for an efficient electronic coupling with enzymes has been reported [91]. However SW-CNTs are mostly used in combinations of metallic and semi conductive in random ratios, because of the difficulty to properly separate the two kinds of CNTs [105]. On the other hand MW-CNTs are considered to be all metallic. However, the differences in the behaviors of SW- and MW-CNTs for bioelectrode modification are still little understood so far [106]. In ideal CNTs, only the open ends should be reactive enough to allow the entrapment of proteins. Actually this is also enabled by structural defects in the walls of CNTs [73]. These latter can also undergo a chemical treatment, mostly acidic [22,30,72,92,97], but also with ionic

liquids [39], that creates defects or modifies their surface chemistry. Many anchoring sites for enzyme immobilization are thus created, which however alters the conductivity of the CNTs [107].

Carbon black is made of spherical particles whose sizes vary between 10 and 500 nm, which confer them a very high electroactive surface area up to $1400 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ [19]. They also display a high sorption capacity which allows a simple adsorption of enzymes, and they are highly conductive.

Graphene is the attractive material of nowadays research, as revealed by the increasing amount of publications using this type of material for enzymatic purpose. Graphene are two-dimensional fragments made of carbon atoms closely packed in a honeycomb lattice with very high electrical conductivity due to a closed π -electron system and impressive mechanical and chemical stability [77]. They can also be functionalized through chemical treatment.

The main advantage of mesoporous carbon structures is their high and well-ordered porosity together with adjustable pore size, enabling narrow-pore size distribution or multiscale porosity to be achieved. This allows adapting the pore size to the purpose (enzyme diffusion, substrate and product diffusion, enzyme entrapment, etc.), as well as to the enzyme and substrate sizes [89]. A high specific surface area up to $2000 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ and a high total pore volume also result from this high porosity. They are however generally less conductive than other carbon based materials.

3.2. Metallic and oxide-based electrodes

Even though they are less widespread, some other materials have been used to ensure an efficient nanostructuring of electrode interfaces. Examples worth mentioning are gold nanoparticles (AuNPs) [14,28,69,100,108,109], nano-, meso- or macroporous gold electrodes [110,111], mesoporous silica matrices [75,112] or mesoporous metal oxides (SnO_2 , TiO_2 , indium tin oxide (ITO)) [113].

Although far more expensive and less biocompatible than carbon materials, AuNPs display interesting characteristics. Not only do they have a high electronic conductivity and great specific surface area due to their small diameter varying from 3.5 nm [108] to approximately 20 nm [14,28,69], but they also allow to adjust surface properties such as electrical charge or hydrophilicity through modification with SAMs of thiols bearing the desired end functions.

Like mesoporous carbons, mesoporous silica matrices have a high porosity together with adjustable pore size leading to a high specific surface area. They are however less electrically conductive than carbon-based materials. Their conductivity can be improved through carbon coating [114].

ITO is a conductive oxide, mostly deposited onto glass, which bears the numerous advantages of transparency, high electrical conductivity, homogeneous porosity, and adjustable shape and thickness. It is highly hydrophobic but can also undergo thermal or chemical treatments to adjust its hydrophilicity [115]. The

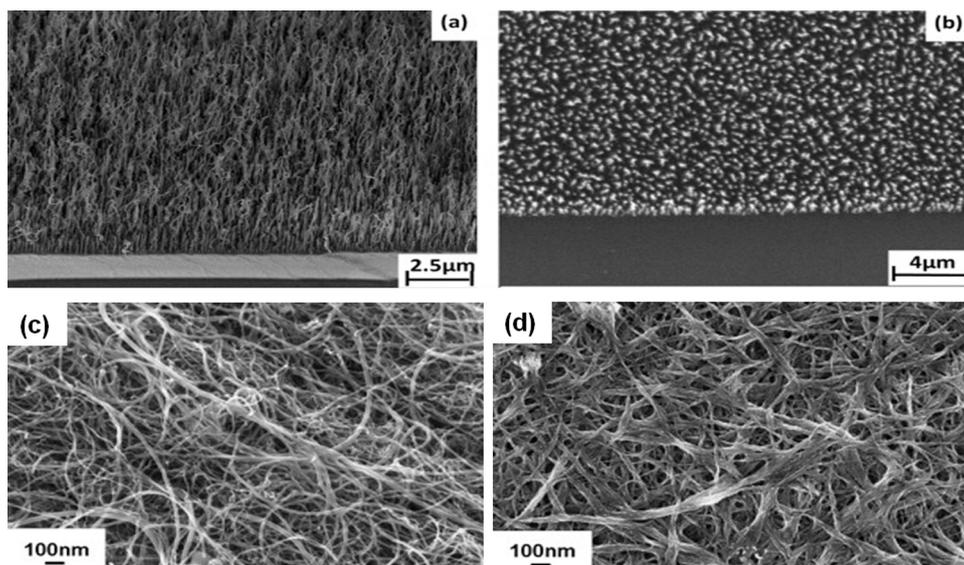


Fig. 4. SEM images of (a) side view and (b) top view of vertically aligned CNT forest at low magnification (Reproduced from permission [118]) SEM micrographs of a random deposit of (c) MWCNTs and (d) SWCNTs (Reproduced from permission [119]).

synthesis method can allow a nanosized columnar structure to be formed [113].

4. How are the electrodes designed?

4.1. Formation of the structured interface

The properties of the structured electrode interface not only depend on the intrinsic properties of materials used, but are also greatly influenced by the method adopted to shape or to modify the electrode surface.

Electrodes can be made with materials that are *per se* highly ordered. This is especially the case of mesoporous carbon, gold or ITO electrodes whose pore sizes are tuned as desired during the synthesis. The nanostructuring of these materials relies on the use of highly ordered templates during the synthesis step. A multiscale porosity can be engineered so as to ensure a good diffusion of enzyme and substrate in the larger pores, and an optimum adsorption of the enzyme in the smaller pores. This has been realized for example in Mano's group by using monolithic silica foams as hard-templates [20].

When nanoparticles are used to structure the interface on the other hand, the deposition method of the particles at the surface of the planar electrode greatly affects the order of the interface. Some techniques lead to an ordered structure. SW- and MW-CNTs can be for example grown by chemical vapor deposition (CVD) on the electrode surface and constitute then a highly ordered CNTs forest [73], as illustrated on Fig. 4(a) and (b). This CNTs forest can also be obtained when CNTs are grown on a non-adhesive substrate so that they can be removed from it without losing their ordered structure [87]. Ordered structures can be obtained also through the Langmuir–Blodgett (LB) method [92], or through the layer by layer (LBL) self-assembly technique [99,100,116] which consists in sequentially dipping an electrode in a suspension of nanoparticles. Covalent linking of Au-NPs at a graphite electrode *via* grafting of diazonium salts to form a homogeneous monolayer of particles has also been performed [93].

In most cases however nanoparticles are deposited in a more arbitrary way and self arrange at the interface to form a random structure (Fig. 4(c) and (d)). In these cases the nanoparticles are dispersed in a liquid phase, and then sonicated to form a

homogeneous colloidal suspension from which a little volume is deposited at the electrode surface [14,22,28,72,90,96]. Different substances may also be employed to get a more homogeneous suspension, and then a more homogeneous deposition. The formation of composites using surfactants [30,91], organic polymers [70,71], suitably biocompatible biopolymers like chitosan [19,117] or cellulose as binders, lipids [97] and even DNA [60,61] to ensure a better CNTs dispersion and a better affinity with the enzyme has been reported. Using this random method, multiscale porosities can also be obtained through mixes of particles of different shapes and sizes [86].

4.2. Enzyme immobilization

Most classical methods for enzyme immobilization at the electrode have been tested. The various techniques are based on different kinds of interactions between enzyme and electrode. The simplest and mildest is adsorption (physisorption), where only weak interactions like hydrophobic–hydrophobic, electrostatic, or Van der Waals interactions between the enzyme and the nanostructured electrode are involved, and which can be realized on unmodified nanomaterials [14,28,87,91]. However, some studies have evidenced the bad influence of direct adsorption on the activity of enzymes [15,94], or the difficult binding of enzymes on bare unmodified gold or carbon surfaces [69]. Therefore other methods have been developed, like adsorption on nanocomposites described above [19,60,61,70,71,97] or immobilization after modification of the materials to provide a more favorable environment for enzyme and avoid leaching. These modifications can be performed thanks to non-covalent interactions like π -stacking of pyrene molecules bearing chemical functions on graphene-like carbon materials [23,94,117] (Fig. 5(a)), or *via* chemical treatments with thiols to constitute SAMs (Fig. 5(b)), acidic treatment to form oxidative or carboxylic groups [30,86,96] (Fig. 5(c)), reduction of diazonium salts (Fig. 5(d)) [90], or other chemical reactions [92,117]. In all these cases the enzyme adsorption can be realized whether by incubation of the nanoparticles in the enzyme solution before they are deposited at the electrode [15,96], or by incubation of the modified electrode in the enzyme solution [19,28,70,91], or by deposition of a droplet of the enzyme solution on top of the modified electrode [22,72,90,96,117].

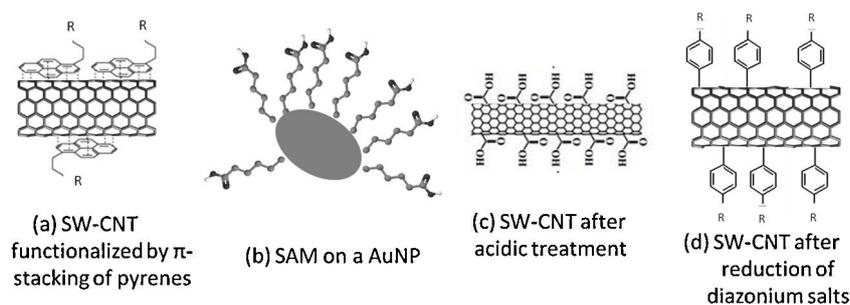


Fig. 5. Schematic modifications of the nanoparticles.

Table 2

Reported increases in current densities thanks to various nanoparticles (ω is the rotation rate).

Enzyme	Nanostructure	Current density (mA cm^{-2})	Ratio $I_{\text{nanostructure}}/I_{\text{bare}}$	Reference
BOD	Mesoporous carbon	2.1 ($\omega = 1000$ rpm)	500	[20]
	SW-CNT	0.9	300	[22]
CDH	SW-CNT	0.5	[90]	[90]
		($\omega = 0$)		
[Fe–Fe] Hase (H_2 production)	Metallic SW-CNT	≈ 12	200	[91]
[Ni–Fe] Hase (H_2 oxidation)	SW-CNT	1 ($\omega = 0$)	10	[96]
	SW-CNT	0.6 ($\omega = 0$)	30	[22]
	MW-CNT	4.1 ($\omega \rightarrow \infty$)	32.8	[73]
FDH	KB	10	100	[71]
		($\omega = 0$)		
CDH	Au-NPs	0.015	30	[69]
		($\omega = 0$)		

Covalent binding of the enzyme has also been performed. This requires the functionalization of nanomaterials to create chemical groups at their surface enabling cross linking. The same methods as described above have been used, like π -bonding of pyrenes [23,54], acidic treatment [22,72], incubation in solutions of thiols to create SAMs [14,28,69], reduction of diazonium salts [93], formation of aminophenyl groups [117]. All these methods were followed by a covalent-linking step mostly using a cross linker to promote a binding between the reactive groups at the enzyme and at the modified electrode surfaces.

To ensure a tight confinement of the enzyme at the electrode, polymers like Nafion® [18,75], Eastman AQ™ [120] or cellulose [51] can be used to form membranes at the biomodified electrodes. However, Nafion® and Eastman AQ™ are charged polymers, so they may not be suitable for all enzymes depending on the surface charge of these latter. Other techniques like encapsulation in inorganic matrices like silica sol-gel or entrapment in polymeric matrices obtained by electropolymerization remain more challenging for the establishment of DET, but have proved to be possible when conductive nanoparticles are entrapped with the enzyme in the organic matrix [98].

It can be noted that for the same electrode modification the enzyme immobilization may be different depending on the enzyme. As an example, two EBFCs have been realized with the same nanostructuration *via* AuNPs of the anode and cathode interfaces but *via* simple adsorption of BOD at the cathode and SAMs formation followed by covalent linking of FDH or CDH at the anode [14,28]. Very recently, Janus Au-mesoporous silica NPs were modified with streptavidin on the gold side and HRP on the silica face. This modification served as an anchor on a biotin-modified gold electrode while preserving H_2O_2 catalytic reduction by HRP [121].

Another strategy for efficient coupling of enzyme on electrochemical interfaces relies on protein engineering. This method is

still in its infancy because it requires strong interaction between biochemists and physicochemists. Some innovative works have nevertheless been published recently in that domain. As an example, simple genetic modification of GOx to display a free thiol group near its active site allowed an efficient electrical connection with Au-NPs [122]. A SP1 protein was otherwise engineered to present 12 surrounding GOx monomers, then further modified with a cysteine amino-acid (Fig. 6). Au-NPs grafted on a gold electrode were finally inserted to the inner pore of the mutant GOx-Cyst-SP1 [123]. This hybrid architecture was followed by SPR and electrochemistry. An interesting strategy has also been published that concerns the electropolymerization of chains grafted onto the enzyme molecules, as successfully demonstrated by Yehezkeli et al. who immobilized a GDH on AuNPs [108].

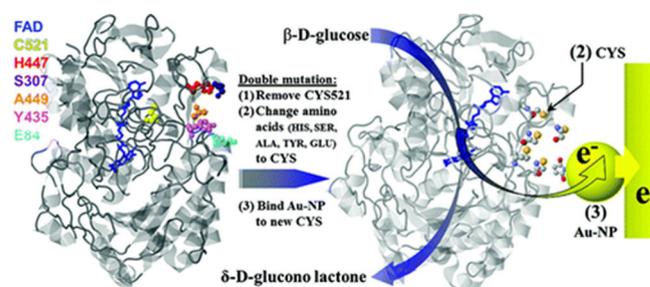


Fig. 6. (left) Ribbon diagram of a GOx monomer with the FAD molecule shown in blue. The amino acid residues targeted for mutagenesis are highlighted as space-filling models (right) Schematic drawing of the covalent-binding chemistry of cysteine to a maleimide-modified AuNP enabling DET. (Reproduced with permission from graphical abstract [122]). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

5. How much are the performances enhanced?

5.1. Increase in the current densities

Most reports show that current densities have indeed increased through nano- or micro-structuring of the electrode. A few of them are described in Table 2, although it may be difficult to compare the data as various definitions of the surface (geometric surface, developed surface, etc.) are used to calculate the current densities. This enhancement could be partly related to an increase of the enzyme activity in the electrode nanostructured environment [61,75].

But the current density enhancement is essentially due to an increase in enzyme load per projected 2D geometric area of the electrode. Nanostructuring of the electrode allows increasing the current densities by enlarging the electroactive surface area of the electrode, and thus should enable the number of connected enzymes to step up in proportion. The electroactive surface area of the electrode before and after the modifications leading to nanostructuring has been evaluated in most cases by measuring the capacitive current using cyclic voltammetry, or the double layer capacitance using electrochemical impedance spectroscopy. Interestingly it can be noted that the current density rise is often far below the surface rise. For example Miyake et al. have reported a double layer capacitance increase of about 100 times with MW-CNTs whereas the catalytic current was only about 10 times higher [30]. In some other cases, when electrodes were coated with SW-CNTs, the developed surface increased proportionally to SW-CNTs quantities whereas a fast level-off of the catalytic current densities was observed [72,96]. Besides, simple calculations demonstrate that only a small part of the electroactive surface area is needed to enhance the current densities as it is recorded [91].

Two hypotheses might account for this phenomenon. First, the enzymes might not be able to access the whole developed surface, because of the lack of suitable porosity. Therefore the number of immobilized enzymes does not increase proportionately to the surface and neither does the current density. A second explanation could be that the number of immobilized enzymes indeed increases proportionately to the surface, but that not all these enzymes take part in the electrical current, either because they are not efficiently wired to directly transfer electrons to the electrochemical interface, or because they are denatured by immobilization [89], or else because they are too deeply buried in the three-dimensional network and not reachable for the substrate. Actually very few studies [91] went deeper into details about this, so that it still has to be taken into account as a challenge to overcome.

In a few works the amount of immobilized enzyme molecules has been calculated by integration of the peaks of the non catalytic signal. Wang et al. reported that the immobilization of GOx onto mesoporous silica led to enzyme amounts corresponding to three times a saturated monolayer, *i.e.* $5.23 \times 10^{-12} \text{ mol cm}^{-2}$ [75]. FeS clusters of Hase-MW-CNTs hybrid films built by LB method were identified using electrochemistry, which showed that the addition of MW-CNTs allowed immobilizing three times more enzyme, *i.e.* $4.23 \times 10^{-11} \text{ mol cm}^{-2}$ [92]. Other titrations were also performed. For example the Lowry method indicated that the modification of an electrode with DNA-SW-CNTs led to a fourth time increase in enzyme amount [61]. AFM microscopy also allowed counting up the enzyme molecules in the case of a Ni-Fe-Hase adsorbed on a MW-CNTs forest, showing that there was at least an enzyme molecule every 20 nm [73]. In some other cases the estimated number of enzymes shows that the space occupied by enzymes remains far below the developed surface area. Mano et al. also calculated that only about 20% of a dense monolayer of BOD was adsorbed in the mesoporous electrode [20].

The number of enzymes actually immobilized at the electrode has been determined *via* activity essays, and has been further

compared to the number of enzymes that take part in the direct electrical current. This gives an estimation of how the nanostructuring of the electrode really allows an efficient electronic coupling between the enzyme and the electrode. For example DNA-wrapped CNTs allowed immobilizing four times more enzymes while only a threefold increase in current was recorded. This shows that not all the immobilized enzymes take part in the current [60,61]. Likewise, the count of enzymes by AFM just mentioned above related to electrochemistry showed that the catalytic current was multiplied by 8 while the number of immobilized enzymes was multiplied by 33 compared to a bare PG surface [73].

We can conclude that both factors suggested above are responsible for the difference recorded between the current density increase and the corresponding surface enlargement: the whole developed area is not fully saturated by enzymes, and not all the immobilized enzymes take part in the electrical current.

5.2. Direct electron transfer (DET)

DET has indeed been achieved thanks to adapted dimensions of the nanoparticles [77], or to enzyme operating in a tight three-dimensional conductive network [19,20,54,87,102], as described in Section 2.1.

The case of GOx is particularly worth mentioning. Numerous studies report that direct electronic connection of GOx at the electrode has been fulfilled through the use of nanoparticles. It is clear that these nanomaterials have allowed the functional immobilization of the enzyme at the electrode because both non-catalytic and catalytic currents at the potential of the FAD active center have been recorded [75–77,86]. In the case described in Section 4.2 the recorded direct oxidation of glucose went together with a notable decrease in K_m value, but also a decrease in the apparent catalytic activity. These variations in the catalytic parameters suppose structural changes on the enzyme that are so far unknown [122]. It is however sometimes less evident as the non catalytic signal corresponding to the reversible redox process of FAD does not turn to a catalytic wave in the presence of substrate unless a redox mediator is added [18,123,124]. The occurrence of a redox non-catalytic signal is thus rather attributed to denaturing of the enzyme that releases the FAD [90].

Another way to promote the direct electronic coupling between enzyme and electrode has been to stimulate a favorable orientation of the enzyme at the surface through interactions that cannot be that easily realized at a planar electrode, whether through electrostatic [77,90], hydrophobic [92] or covalent interactions [22,72,73]. In the cases described in Section 4.2 where the enzyme is covalently linked at the interface, it must be underlined that the enzyme orientations are determined by the positions of amino acids that can chemically react with the interface to form the covalent bond. The presence of the desired reactive groups close to an electron relay centre at the protein surface enables a favorable positioning where the distance between the electrode and the electron relay is minimized [22,72]. Besides, as shown by a study performed by Gutierrez-Sanchez et al. [117] the nature of the covalent link (amide bond, imino bond. . .) can lead to a more or less favorable orientation depending on the amino acids it involves. A specific attention has to be paid to it, also because some positions of the enzyme could lead the nanoparticles to partially hinder the substrate accessibility to the active site thus causing decrease in activity [89,125].

5.3. Stability of the modified electrodes

The stability of the enzymatic electrodes has been shown to be improved through nanostructuring in several cases. It must be underlined that the stability of nanostructured bioelectrodes is quite difficult to estimate, as the lack of stability of the recorded

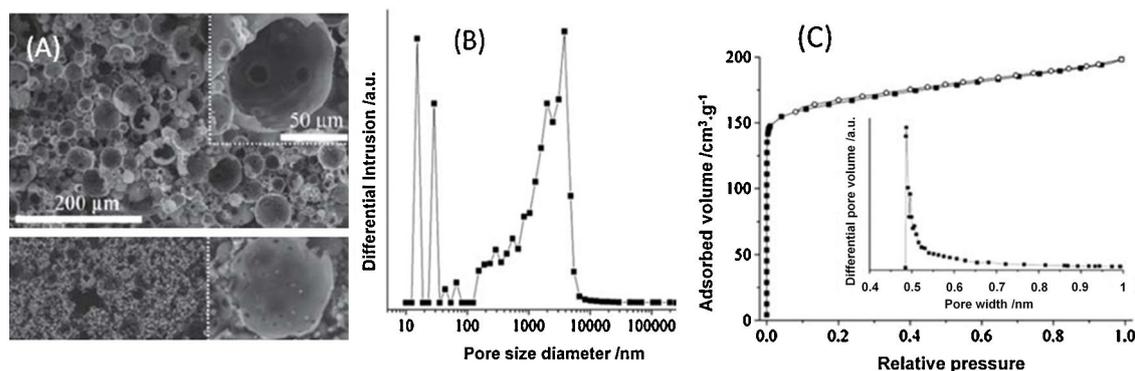


Fig. 7. Hierarchical pore distribution in carbon materials made from silica template. (a) SEM micrographs of silica template and resulting carbon material, (b) macroscopic pore size distribution, (c) micropore size distribution. (Adapted with permission from [20]).

signals can involve several factors (denaturing of the enzyme, leaching of the enzyme from the electrode, instability of the electrode coating...) whose respective contribution is actually unknown. The increased stability can be due to reduced enzyme leaching from the electrode, especially when nanomodification has allowed a covalent binding so that the enzyme is strongly linked at the electrode [72,73]. When working without a cross-linker, the better stability can also be related to the tight confinement of the enzyme at the electrode [51], or to defects that optimize the bioelectrocatalytic enzyme entrapment leading to the same stability than in solution [20]. It can be also related to a more favorable environment due to improved electrostatic interactions [90] or other phenomena not clearly explained yet, as is the case of DNA–CNTs [61]. The linking of enzyme can also lead to an improved resistance toward inhibitors [51] or toward proteases present in serum like trypsin [61], probably due to protection of the active site in a nanostructured environment.

5.4. Enzyme and substrate diffusion

The conclusions that were drawn in Section 5.1 lead to considering another interesting point, which is the control of mass transport inside the structured conductive 3D-network which forms the electrode. The structure must enable the diffusion of enzyme molecules when enzyme immobilization is performed after formation of the network. It must also enable the transport of the substrate and the product to and from the enzyme, whether they are gas or dissolved substances.

As the amount of enzymes immobilized at the electrode is increased, mass transport within the 3D electrode can become rate-limiting in case of extremely active enzymes. This phenomenon is currently described and studied *via* the Levich or Koutecky–Levich equations [20,126], or other models developed to better take into account the porosity of the electrode [127]. Mano et al. [20] and Bartlett et al. [126] recently reported how mass transport controlled oxygen reduction with respectively BOD and Lac immobilized in 3D carbon networks. In these cases current densities can be increased by rotating the electrode [20,126] or stirring the electrolyte solution [102]. However using these energy consuming methods is not conceivable in the EBFC context, so that more viable strategies have to be found.

It has been demonstrated that pores contribute to increase the efficiency of the modified electrodes as they enable radial diffusion. But performances are influenced by the pores dimensions. Especially the catalytic current has been demonstrated to depend on the pore size [102]. The difficulty that arises then is to adapt the pore sizes. When pores are much larger than the enzyme, leaching and low stabilization can occur, whereas too small pores prevent

from efficient enzyme diffusion [102], lead to pore blocking and deactivation of the enzyme [128]. An emerging concept, proposed for example by Manos group [20], suggests the formation of a hierarchical porosity (Fig. 7). Different pore sizes are obtained through integrative chemistry, so as to be adapted at the same time to enzyme diffusion as well as confinement, and to substrate diffusion. A multiscale porosity has also been realized by mixing materials of different sizes. For example a hierarchically structured carbon material has been obtained by growing CNTs on previously synthesized carbon microfibers [117], which provided a high developed surface area for enzyme immobilization and allowed efficient diffusion of the substrate toward the biocatalyst. Another interesting study reports the simultaneous use of SW–CNTs whose dimensions are $\varnothing = 1.1$ nm and $L = 0.5$ – 100 μm , and of spherical carbon black particles with a mean particle size of 40–50 nm and internal porosity [19]. This results in a highly conductive composite where the carbon black ensures a large electroactive surface area and CNTs act as electrical wires between the spherical particles. This structure also presents a favorable porosity that allows the enzyme that diffuses in the matrix to be efficiently immobilized in the nanopores of the carbon black particles.

Another possibility is put forward by an interesting study by Miyake et al. where a method to take advantage of the largest part of the developed surface area of SW–CNTs is proposed. They demonstrate that a CNTs forest dynamically arranges around enzyme molecules in solution due to liquid-induced shrinkage [16]. Besides, as already described in Section 4.2, other studies have also reported the enzyme adsorption at the nanoparticles before formation of a 3D-network at the electrode [15,96], which allows to get rid of enzyme diffusion and might at the same time avoid enzyme leaching.

6. Conclusions

In an effort to overcome the bottlenecks in EBFCs development, research has been undertaken in the last years to immobilize enzymes in the most appropriate conductive matrices at the electrode so as to improve electron transfer efficiency, get direct electron transfer, and improve stability and sometimes even activity of enzymes at the electrode. Numerous nanostructured materials, especially carbon-based ones, have been used. Different preparation methods have been reported, leading to various shapes and structures of the nano-biomodified electrode. Although all these results are really promising, some technological challenges still have to be overcome. A key point is the quantification of enzymes actually linked and electroactive at the electrode to allow the determination of true characteristics of the immobilized enzyme: Michaelis constant K_m , catalytic turnover k_{cat} ... Another

challenge is the modelization of the porous materials, so as to engineer the optimal diffusion of enzyme, substrate and product as well as to provide stabilizing environment for the enzyme immobilization.

Acknowledgments

The authors thank MT Giudici-Orticoni for helpful discussion, Région Provence-Alpes-Côte d'Azur, CNRS and ANR Bioénergie No. ANR-2010-BIOE-003-01 for financial support.

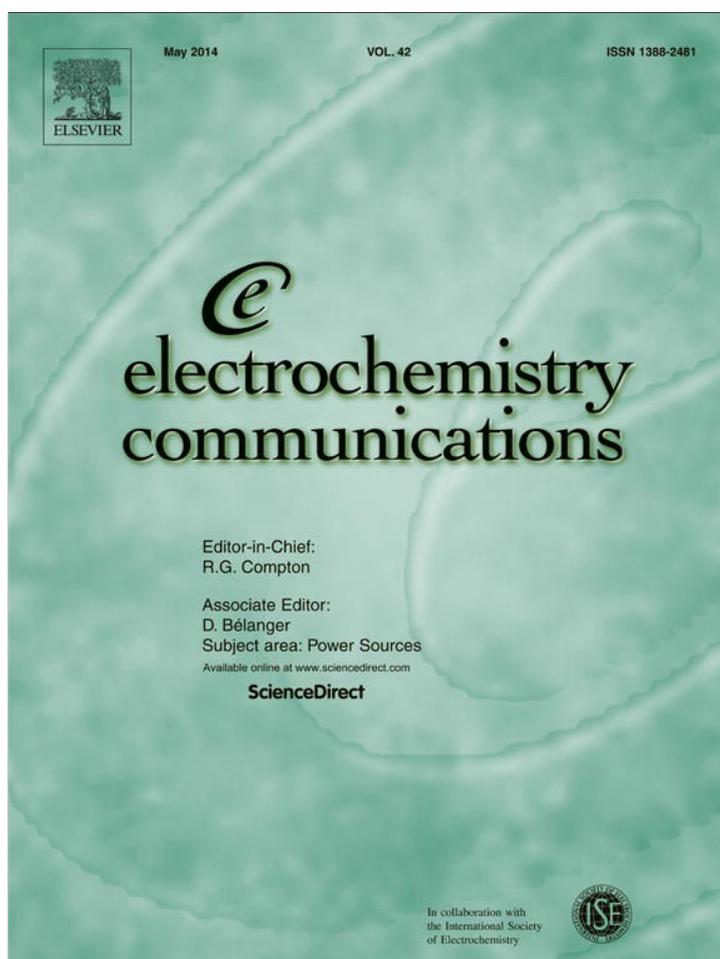
References

- M.H. Osman, A.A. Shah, F.C. Walsh, Recent progress and continuing challenges in bio-fuel cells. Part I: Enzymatic cells, *Biosensors & Bioelectronics* 26 (2011) 3087–3102.
- D. Leech, P. Kavanagh, W. Schuhmann, Enzymatic fuel cells: recent progress, *Electrochimica Acta* 84 (2012) 223–234.
- S.D. Minteer, P. Atanassov, H.R. Luckarift, G.R. Johnson, New materials for biological fuel cells, *Materials Today* 15 (2012) 166–173.
- M. Holzinger, A. Le Goff, S. Cosnier, Carbon nanotube/enzyme biofuel cells, *Electrochimica Acta* 82 (2012) 179–190.
- A.T. Yahiro, S.M. Lee, D.O. Kimble, *Bioelectrochemistry*. I. Enzyme utilizing biofuel cell studies, *Biochimica Et Biophysica Acta* 88 (1964) 375–380.
- N. Asrul, R. Othman, M.Z.A. Yahya, H.M. Salleh, F. Yusof, A.A. Ahmad, Freely-Suspended, Single chamber glucose oxidase-laccase enzymatic fuel cell, in: N. Ren, L.K. Che, B. Jin, R. Dong, H. Su (Eds.), *Renewable and Sustainable Energy II*, 512–515, Trans Tech Publications Ltd, Stafa-Zurich, 2012, pp. 1499–1502 (Pts 1–4).
- T. Beneyton, I.P.M. Wijaya, C. Ben Salem, A.D. Griffiths, V. Taly, Membraneless glucose/O₂ microfluidic biofuel cells using covalently bound enzymes, *Chemical Communications* 49 (2013) 1094–1096.
- Y. Li, S.M. Chen, R. Sarawathi, Membraneless enzymatic biofuel cells based on multi-walled carbon nanotubes, *International Journal of Electrochemical Science* 6 (2011) 3776–3788.
- M.T. Meredith, D.Y. Kao, D. Hickey, D.W. Schmidtke, D.T. Glatzhofer, High current density ferrocene-modified linear poly(ethylenimine) bioanodes and their use in biofuel cells, *Journal of the Electrochemical Society* 158 (2011) B166–B174.
- K. Min, J.H. Ryu, Y.J. Yoo, Mediator-free glucose/O₂ biofuel cell based on a 3-dimensional glucose oxidase/SWNT/polypyrrole composite electrode, *Biotechnology and Bioengineering* 15 (2010) 371–375.
- M. Minson, M.T. Meredith, A. Shrier, F. Giroud, D. Hickey, D.T. Glatzhofer, S.D. Minteer, High performance glucose/O₂ biofuel cell: effect of utilizing purified laccase with anthracene-modified multi-walled carbon nanotubes, *Journal of the Electrochemical Society* 159 (2012) G166–G170.
- P.C. Nien, J.Y. Wang, P.Y. Chen, L.C. Chen, K.C. Ho, Encapsulating benzoquinone and glucose oxidase with a PEDOT film: application to oxygen-independent glucose sensors and glucose/O₂ biofuel cells, *Bioresource Technology* 101 (2010) 5480–5486.
- J. Shim, G.Y. Kim, S.H. Moon, Covalent co-immobilization of glucose oxidase and ferrocenedicarboxylic acid for an enzymatic biofuel cell, *Journal of Electroanalytical Chemistry* 653 (2011) 14–20.
- X.J. Wang, M. Falk, R. Ortiz, H. Matsumura, J. Bobacka, R. Ludwig, M. Bergelin, L. Gorton, S. Shleev, Mediatorless sugar/oxygen enzymatic fuel cells based on gold nanoparticle-modified electrodes, *Biosensors & Bioelectronics* 31 (2012) 219–225.
- W. Wei, P.P. Li, Y. Li, X.D. Cao, S.Q. Liu, Nitrogen-doped carbon nanotubes enhanced laccase enzymatic reactivity towards oxygen reduction and its application in biofuel cell, *Electrochemistry Communications* 22 (2012) 181–184.
- T. Miyake, S. Yoshino, T. Yamada, K. Hata, M. Nishizawa, Self-regulating enzyme-nanotube ensemble films and their application as flexible electrodes for biofuel cells, *Journal of the American Chemical Society* 133 (2011) 5129–5134.
- A. Zebda, S. Tingry, C. Innocent, S. Cosnier, C. Forano, C. Mousty, Hybrid layered double hydroxides-polypyrrole composites for construction of glucose/O₂ biofuel cell, *Electrochimica Acta* 56 (2011) 10378–10384.
- W. Zheng, H.Y. Zhao, J.X. Zhang, H.M. Zhou, X.X. Xu, Y.F. Zheng, Y.B. Wang, Y. Cheng, B.Z. Jang, A glucose/O₂ biofuel cell base on nanographene platelet-modified electrodes, *Electrochemistry Communications* 12 (2010) 869–871.
- J. Filip, J. Sefcovicova, P. Gemeiner, J. Tkac, Electrochemistry of bilirubin oxidase and its use in preparation of a low cost enzymatic biofuel cell based on a renewable composite binder chitosan, *Electrochimica Acta* 87 (2013) 366–374.
- V. Flexer, N. Brun, O. Courjean, R. Backov, N. Mano, Porous mediator-free enzyme carbonaceous electrodes obtained through integrative chemistry for biofuel cells, *Energy & Environmental Science* 4 (2011) 2097–2106.
- L. Xu, F.A. Armstrong, Optimizing the power of enzyme-based membrane-less hydrogen fuel cells for hydrogen-rich H₂-air mixtures, *Energy & Environmental Science* 6 (2013) 2166–2171.
- A. Ciaccafava, A. De Poulpique, V. Techer, M.T. Giudici-Orticoni, S. Tingry, C. Innocent, E. Lojou, An innovative powerful and mediatorless H₂/O₂ biofuel cell based on an outstanding bioanode, *Electrochemistry Communications* 23 (2012) 25–28.
- S. Krishnan, F.A. Armstrong, Order-of-magnitude enhancement of an enzymatic hydrogen-air fuel cell based on pyrenyl carbon nanostructures, *Chemical Science* 3 (2012) 1015–1023.
- A.F. Wait, A. Parkin, G.M. Morley, L. dos Santos, F.A. Armstrong, Characteristics of enzyme-based hydrogen fuel cells using an oxygen-tolerant hydrogenase as the anodic catalyst, *Journal of Physical Chemistry C* 114 (2010) 12003–12009.
- L. Deng, L. Shang, D. Wen, J.F. Zhai, S.J. Dong, A membraneless biofuel cell powered by ethanol and alcoholic beverage, *Biosensors & Bioelectronics* 26 (2010) 70–73.
- M. Masuda, Y. Motoyama, K. Murata, N. Nakamura, H. Ohno, Preparation of an electrode modified with an electropolymerized film as a mediator of NADH oxidation and its application in an ethanol/O₂ biofuel cell, *Electroanalysis* 23 (2011) 2297–2301.
- R.A. Rincon, C. Lau, H.R. Luckarift, K.E. Garcia, E. Adkins, G.R. Johnson, P. Atanassov, Enzymatic fuel cells: integrating flow-through anode and air-breathing cathode into a membrane-less biofuel cell design, *Biosensors & Bioelectronics* 27 (2011) 132–136.
- M. Falk, V. Andoralov, Z. Blum, J. Sotres, D.B. Suyatin, T. Ruzgas, T. Arnebrant, S. Shleev, Biofuel cell as a power source for electronic contact lenses, *Biosensors & Bioelectronics* 37 (2012) 38–45.
- K. Haneda, S. Yoshino, T. Ofuji, T. Miyake, M. Nishizawa, Sheet-shaped biofuel cell constructed from enzyme-modified nanoengineered carbon fabric, *Electrochimica Acta* 82 (2012) 175–178.
- T. Miyake, K. Haneda, S. Yoshino, M. Nishizawa, Flexible, layered biofuel cells, *Biosensors & Bioelectronics* 40 (2013) 45–49.
- H.J. Cheng, Q. Qian, X. Wang, P. Yu, L.Q. Mao, Electricity generation from carboxymethyl cellulose biomass: a new application of enzymatic biofuel cells, *Electrochimica Acta* 82 (2012) 203–207.
- P. Jenkins, S. Tuurala, A. Vaari, M. Valkiainen, M. Smolander, D. Leech, A comparison of glucose oxidase and aldose dehydrogenase as mediated anodes in printed glucose/oxygen enzymatic fuel cells using ABTS/laccase cathodes, *Bioelectrochemistry* 87 (2012) 172–177.
- P. Jenkins, S. Tuurala, A. Vaari, M. Valkiainen, M. Smolander, D. Leech, A mediated glucose/oxygen enzymatic fuel cell based on printed carbon inks containing aldose dehydrogenase and laccase as anode and cathode, *Enzyme and Microbial Technology* 50 (2012) 181–187.
- M. Karaskiewicz, E. Nazaruk, K. Zelechowska, J.F. Biernat, J. Rogalski, R. Bilewicz, Fully enzymatic mediatorless fuel cell with efficient naphthylated carbon nanotube-laccase composite cathodes, *Electrochemistry Communications* 20 (2012) 124–127.
- F.S. Saleh, L.Q. Mao, T. Ohsaka, Development of a dehydrogenase-based glucose anode using a molecular assembly composed of Nile blue and functionalized SWCNTs and its applications to a glucose sensor and glucose/O₂ biofuel cell, *Sensors and Actuators B-Chemical* 152 (2011) 130–135.
- C. Tanne, G. Gobel, F. Lisdat, Development of a (PQQ)-GDH-anode based on MWCNT-modified gold and its application in a glucose/O₂-biofuel cell, *Biosensors & Bioelectronics* 26 (2010) 530–535.
- X.Y. Wang, D. Li, T. Watanabe, Y. Shigemori, T. Mikawa, T. Okajima, L.Q. Mao, T. Ohsaka, A glucose/O₂ biofuel cell using recombinant thermophilic enzymes, *International Journal of Electrochemical Science* 7 (2012) 1071–1078.
- D. Wen, X.L. Xu, S.J. Dong, A single-walled carbon nanohorn-based miniature glucose/air biofuel cell for harvesting energy from soft drinks, *Energy & Environmental Science* 4 (2011) 1358–1363.
- L.L. Zhang, M. Zhou, D. Wen, L. Bai, B.H. Lou, S.J. Dong, Small-size biofuel cell on paper, *Biosensors & Bioelectronics* 35 (2012) 155–159.
- Z.G. Zhu, Y.R. Wang, S.D. Minteer, Y.H.P. Zhang, Maltodextrin-powered enzymatic fuel cell through a non-natural enzymatic pathway, *Journal of Power Sources* 196 (2011) 7505–7509.
- F. Gao, X.Y. Guo, J. Yin, D. Zhao, M.G. Li, L. Wang, Electrocatalytic activity of carbon spheres towards NADH oxidation at low overpotential and its applications in biosensors and biofuel cells, *Rsc Advances* 1 (2011) 1301–1309.
- F. Giroud, C. Gondran, K. Gorgy, A. Pellissier, F. Lenouvel, P. Cinquin, S. Cosnier, A quinuhydrone biofuel cell based on an enzyme-induced pH gradient, *Journal of Power Sources* 196 (2011) 1329–1332.
- M. Rasmussen, R.E. Ritzmann, I. Lee, A.J. Pollack, D. Scherson, An implantable biofuel cell for a live insect, *Journal of the American Chemical Society* 134 (2012) 1458–1460.
- K. Shoji, Y. Akiyama, M. Suzuki, T. Hoshino, N. Nakamura, H. Ohno, K. Morishima, Insect biofuel cells using trehalose included in insect hemolymph leading to an insect-mountable biofuel cell, *Biomedical Microdevices* 14 (2012) 1063–1068.
- P. Cinquin, C. Gondran, F. Giroud, S. Mazabard, A. Pellissier, F. Boucher, J.P. Alcaraz, K. Gorgy, F. Lenouvel, S. Mathe, P. Porcu, S. Cosnier, A glucose biofuel cell implanted in rats, *Plos One* 5 (2010).
- F. Giroud, C. Gondran, K. Gorgy, V. Vivier, S. Cosnier, An enzymatic biofuel cell based on electrically wired polyphenol oxidase and glucose oxidase operating under physiological conditions, *Electrochimica Acta* 85 (2012) 278–282.
- D. Sokic-Lazic, S.D. Minteer, Pyruvate/air enzymatic biofuel cell capable of complete oxidation, *Electrochemical Solid State Letters* 12 (2009) F26–F28.
- A. Pizzariello, M. Stred'ansky, S. Miertus, A glucose/hydrogen peroxide biofuel cell that uses oxidase and peroxidase as catalysts by composite bulk-modified

- bioelectrodes based on a solid binding matrix, *Bioelectrochemistry* 56 (2002) 99–105.
- [49] J. Kim, K.H. Yoo, Glucose oxidase nanotube-based enzymatic biofuel cells with improved laccase biocathodes, *Physical Chemistry Chemical Physics* 15 (2013) 3510–3517.
- [50] S. Rengaraj, P. Kavanagh, D. Leech, A comparison of redox polymer and enzyme co-immobilization on carbon electrodes to provide membrane-less glucose/O₂ enzymatic fuel cells with improved power output and stability, *Biosensors & Bioelectronics* 30 (2011) 294–299.
- [51] A. Zebda, C. Gondran, A. Le Goff, M. Holzinger, P. Cinquin, S. Cosnier, Mediatorless high-power glucose biofuel cells based on compressed carbon nanotube-enzyme electrodes, *Nature Communications* 2 (2011).
- [52] M. Ammam, J. Franssaer, Glucose/O₂ biofuel cell based on enzymes, redox mediators, and Multiple-walled carbon nanotubes deposited by AC-electrophoresis then stabilized by electropolymerized polypyrrole, *Biotechnology and Bioengineering* (2012) 1601–1609.
- [53] D.J. Dai, D.S. Chan, H.S. Wu, Modified carbon nanoball on electrode surface using plasma in enzyme-based biofuel cells, in: D. Zeng (Ed.), 2011 Second International Conference on Advances in Energy Engineering, vol. 14, 2012, pp. 1804–1810.
- [54] L. Halamkova, J. Halamek, V. Bocharova, A. Szczupak, L. Alfonta, E. Katz, Implanted biofuel cell operating in a living snail, *Journal of the American Chemical Society* 134 (2012) 5040–5043.
- [55] K. MacVittie, J. Halamek, L. Halamkova, M. Southcott, W.D. Jemison, R. Lobel, E. Katz, From “cyborg” lobsters to a pacemaker powered by implantable biofuel cells, *Energy & Environmental Science* 6 (2013) 81–86.
- [56] A. Zebda, S. Cosnier, J.P. Alcaraz, M. Holzinger, A. Le Goff, C. Gondran, F. Boucher, F. Giroud, K. Gorgy, H. Lamraoui, P. Cinquin, Single glucose biofuel cells implanted in rats power electronic devices, *Scientific Reports* 3 (2013).
- [57] K. Shoji, Y. Akiyama, M. Suzuki, T. Hoshino, N. Nakamura, H. Ohno, K. Morishima, IEEE, Insect-mountable biofuel cell with self-circulation system, in: 2012 IEEE 25th International Conference on Micro Electro Mechanical Systems, 2012.
- [58] A. Szczupak, J. Halamek, L. Halamkova, V. Bocharova, L. Alfonta, E. Katz, Living battery – biofuel cells operating in vivo in clams, *Energy & Environmental Science* 5 (2012) 8891–8895.
- [59] T. Miyake, K. Haneda, N. Nagai, Y. Yatagawa, H. Onami, S. Yoshino, T. Abe, M. Nishizawa, Enzymatic biofuel cells designed for direct power generation from biofluids in living organisms, *Energy & Environmental Science* 4 (2011) 5008–5012.
- [60] J.Y. Lee, H.Y. Shin, S.W. Kang, C. Park, S.W. Kim, Improvement of electrical properties via glucose oxidase-immobilization by actively turning over glucose for an enzyme-based biofuel cell modified with DNA-wrapped single walled nanotubes, *Biosensors & Bioelectronics* 26 (2011) 2685–2688.
- [61] J.Y. Lee, H.Y. Shin, S.W. Kang, C. Park, S.W. Kim, Application of an enzyme-based biofuel cell containing a bioelectrode modified with deoxyribonucleic acid-wrapped single-walled carbon nanotubes to serum, *Enzyme and Microbial Technology* 48 (2011) 80–84.
- [62] C.F. Pan, Y. Fang, H. Wu, M. Ahmad, Z.X. Luo, Q.A. Li, J.B. Xie, X.X. Yan, L.H. Wu, Z.L. Wang, J. Zhu, Generating electricity from biofluid with a nanowire-based biofuel cell for self-powered nanodevices, *Advanced Materials* 22 (2010) 5388–5390.
- [63] B. Reuillard, A. Le Goff, C. Agnes, M. Holzinger, A. Zebda, C. Gondran, K. Elouarzaki, S. Cosnier, High power enzymatic biofuel cell based on naphthoquinone-mediated oxidation of glucose by glucose oxidase in a carbon nanotube 3D matrix, *Physical Chemistry Chemical Physics* 15 (2013) 4892–4896.
- [64] M. Southcott, K. MacVittie, J. Halamek, L. Halamkova, W.D. Jemison, R. Lobel, E. Katz, A pacemaker powered by an implantable biofuel cell operating under conditions mimicking the human blood circulatory system – battery not included, *Physical Chemistry Chemical Physics* 15 (2013) 6278–6283.
- [65] I. Willner, B. Basnar, B. Willner, Nanoparticle-enzyme hybrid systems for nanobiotechnology, *FEBS Journal* 274 (2007) 302–309.
- [66] Y.H. Xiao, C.M. Li, Nanocomposites: from fabrications to electrochemical bioapplications, *Electroanalysis* 20 (2008) 648–662.
- [67] H.P. Erickson, Size and shape of protein molecules at the nanometer level determined by sedimentation, gel filtration, and electron microscopy, *Biological Procedures Online* 11 (2009) 32–51.
- [68] C. Madden, M.D. Vaughn, I. Diez-Perez, K.A. Brown, P.W. King, D. Gust, A.L. Moore, T.A. Moore, Catalytic turnover of [FeFe]-hydrogenase based on single-molecule imaging, *Journal of the American Chemical Society* 134 (2012) 1577–1582.
- [69] H. Matsumura, R. Ortiz, R. Ludwig, K. Igarashi, M. Samejima, L. Gorton, Direct electrochemistry of *Phanerochaete chrysosporium* cellobiose dehydrogenase covalently attached onto gold nanoparticle modified solid gold electrodes, *Langmuir* 28 (2012) 10925–10933.
- [70] Y. Kamitaka, S. Tsujimura, N. Setoyama, T. Kajino, K. Kano, Fructose/dioxygen biofuel cell based on direct electron transfer-type bioelectrocatalysis, *Physical Chemistry Chemical Physics* 9 (2007) 1793–1801.
- [71] Y. Kamitaka, S. Tsujimura, K. Kano, High current density bioelectrolysis of D-fructose at fructose dehydrogenase-adsorbed and Ketjen black-modified electrodes without a mediator, *Chemistry Letters* 36 (2007) 218–219.
- [72] A. De Poulpique, A. Ciaccavava, K. Szot, B. Pillain, P. Infossi, M. Guiral, M. Opallo, M.T. Giudici-Orticoni, E. Lojou, Exploring properties of a hyperthermophilic membrane-bound hydrogenase at carbon nanotube modified electrodes for a powerful H₂/O₂ biofuel cell, *Electroanalysis* 25 (2013) 685–695.
- [73] M.A. Alonso-Lomillo, O. Rudiger, A. Maroto-Valiente, M. Velez, I. Rodriguez-Ramos, F.J. Munoz, V.M. Fernandez, A.L. De Lacey, Hydrogenase-coated carbon nanotubes for efficient H₂ oxidation, *Nano Letters* 7 (2007) 1603–1608.
- [74] C.C. Page, C.C. Moser, X.X. Chen, P.L. Dutton, Natural engineering principles of electron tunneling in biological oxidation-reduction, *Nature* 402 (1999) 47–52.
- [75] K.Q. Wang, H. Yang, L. Zhu, J.H. Liao, T.H. Lu, W. Xing, S.Y. Xing, Q. Lv, Direct electrochemistry and electrocatalysis of glucose oxidase immobilized on glassy carbon electrode modified by Nafion and ordered mesoporous silica-SBA-15, *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* 58 (2009) 194–198.
- [76] K.Q. Wang, H. Yang, L. Zhu, Z.S. Ma, S.Y. Xing, Q. Lv, J.H. Liao, C.P. Liu, W. Xing, Direct electron transfer and electrocatalysis of glucose oxidase immobilized on glassy carbon electrode modified with Nafion and mesoporous carbon FDU-15, *Electrochimica Acta* 54 (2009) 4626–4630.
- [77] B. Liang, L. Fang, G. Yang, Y.C. Hu, X.S. Guo, X.S. Ye, Direct electron transfer glucose biosensor based on glucose oxidase self-assembled on electrochemically reduced carboxyl graphene, *Biosensors & Bioelectronics* 43 (2013) 131–136.
- [78] O. Courjean, F. Gao, N. Mano, Deglycosylation of glucose oxidase for direct and efficient glucose electrooxidation on a glassy carbon electrode, *Angewandte Chemie-International Edition* 48 (2009) 5897–5899.
- [79] A. Ciaccavava, P. Infossi, M. Ilbert, M. Guiral, S. Lecomte, M.T. Giudici-Orticoni, E. Lojou, Electrochemistry, AFM, and PM-IRRA spectroscopy of immobilized hydrogenase: role of a hydrophobic helix in enzyme orientation for efficient H₂ oxidation, *Angewandte Chemie-International Edition* 51 (2012) 953–956.
- [80] N. Mano, V. Soukharev, A. Heller, A laccase-wiring redox hydrogel for efficient catalysis of O₂ electroreduction, *Journal of Physical Chemistry B* 110 (2006) 11180–11187.
- [81] F. Mao, N. Mano, A. Heller, Long tethers binding redox centers to polymer backbones enhance electron transport in enzyme “wiring” hydrogels, *Journal of the American Chemical Society* 125 (2003) 4951–4957.
- [82] P.N. Bartlett, V.Q. Bradford, R.G. Whitaker, Enzyme electrode studies of glucose oxidase modified with a redox mediator, *Talanta* 38 (1991) 57–63.
- [83] D. Dicu, L. Muresan, I.C. Popescu, C. Cristea, I.A. Silberg, P. Brouant, Modified electrodes with new phenothiazine derivatives for electrocatalytic oxidation of NADH, *Electrochimica Acta* 45 (2000) 3951–3957.
- [84] E. Madej, P. Wardman, Pulse radiolysis and cyclic voltammetry studies of redox properties of phenothiazine radicals, *Radiation Physics and Chemistry* 75 (2006) 990–1000.
- [85] E. Lojou, Hydrogenases as catalysts for fuel cells: strategies for efficient immobilization at electrode interfaces, *Electrochimica Acta* 56 (2011) 10385–10397.
- [86] J.L. Chen, X.L. Zheng, F.J. Miao, J.N. Zhang, X.Q. Cui, W.T. Zheng, Engineering graphene/carbon nanotube hybrid for direct electron transfer of glucose oxidase and glucose biosensor, *Journal of Applied Electrochemistry* 42 (2012) 875–881.
- [87] T. Kihara, X.Y. Liu, C. Nakamura, K.M. Park, S.W. Han, D.J. Qian, K. Kawasaki, N.A. Zorin, S. Yasuda, K. Hata, T. Wakayama, J. Miyake, Direct electron transfer to hydrogenase for catalytic hydrogen production using a single-walled carbon nanotube forest, *International Journal of Hydrogen Energy* 36 (2011) 7523–7529.
- [88] E. Lojou, X. Luo, M. Brugna, N. Candoni, S. Dementin, M.T. Giudici-Orticoni, Biocatalysts for fuel cells: efficient hydrogenase orientation for H₂ oxidation at electrodes modified with carbon nanotubes, *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 13 (2008) 1157–1167.
- [89] V. Flexer, F. Durand, S. Tsujimura, N. Mano, Efficient direct electron transfer of PQQ-glucose dehydrogenase on carbon cryogel electrodes at neutral pH, *Analytical Chemistry* 83 (2011) 5721–5727.
- [90] F. Tasca, W. Harreither, R. Ludwig, J.J. Gooding, L. Gorton, Cellobiose dehydrogenase aryl diazonium modified single walled carbon nanotubes: enhanced direct electron transfer through a positively charged surface, *Analytical Chemistry* 83 (2011) 3042–3049.
- [91] D. Svedruzic, J.L. Blackburn, R.C. Tenent, J.D.R. Rocha, T.B. Vinzant, M.J. Heben, P.W. King, High-performance hydrogen production and oxidation electrodes with hydrogenase supported on metallic single-wall carbon nanotube networks, *Journal of the American Chemical Society* 133 (2011) 4299–4306.
- [92] Q. Sun, N.A. Zorin, D. Chen, M. Chen, T.X. Liu, J. Miyake, D.J. Qian, Langmuir-blodgett films of pyridyldithio-modified multiwalled carbon nanotubes as a support to immobilize hydrogenase, *Langmuir* 26 (2010) 10259–10265.
- [93] C. Gutierrez-Sanchez, M. Pita, C. Vaz-Dominguez, S. Shleev, A.L. De Lacey, Gold nanoparticles as electronic bridges for laccase-based biocathodes, *Journal of the American Chemical Society* 134 (2012) 17212–17220.
- [94] V.A. Karachevtsev, S.G. Stepanian, A.Y. Glamazda, M.V. Karachevtsev, V.V. Eremino, O.S. Lytvyn, L. Adamowicz, Noncovalent interaction of single-walled carbon nanotubes with 1-pyrenebutanoic acid succinimide ester and glucose oxidase, *Journal of Physical Chemistry C* 115 (2011) 21072–21082.
- [95] S. Zanarini, M. Vinante, L. Pasquardini, A. Sanginario, M. Giorcelli, S. Bianco, C. Gerbaldi, J.R. Nair, L. Lunelli, L. Vanzetti, F. Paolucci, M. Marcaccio, L. Prodi, A. Tagliavento, C. Pedersoli, D. Demarchi, P. Civera, Facile functionalization by π -stacking of macroscopic substrates made of vertically aligned carbon nanotubes: tracing reactive groups by electrochemiluminescence, *Electrochimica Acta* 56 (2011) 9269–9276.
- [96] X.J. Luo, M. Brugna, P. Tron-Infossi, M.T. Giudici-Orticoni, E. Lojou, Immobilization of the hyperthermophilic hydrogenase from *Aquifex aeolicus* bacterium

- onto gold and carbon nanotube electrodes for efficient H₂ oxidation, *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 14 (2009) 1275–1288.
- [97] Y.M. Yan, L. Su, L.Q. Mao, Multi-walled carbon nanotube-based glucose/O₂ biofuel cell with glucose oxidase and laccase as biocatalysts, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* 7 (2007) 1625–1630.
- [98] K. Szot, W. Nogala, J. Niedziolka-Jonsson, M. Jonsson-Niedziolka, F. Marken, J. Rogalski, C.N. Kirchner, G. Wittstock, M. Opallo, Hydrophilic carbon nanoparticle-laccase thin film electrode for mediatorless dioxygen reduction SECM activity mapping and application in zinc-dioxygen battery, *Electrochimica Acta* 54 (2009) 4620–4625.
- [99] K. Szot, J.D. Watkins, S.D. Bull, F. Marken, M. Opallo, Three dimensional film electrode prepared from oppositely charged carbon nanoparticles as efficient enzyme host, *Electrochemistry Communications* 12 (2010) 737–739.
- [100] A. Lesniewski, M. Paszewski, M. Opallo, Gold-carbon three dimensional film electrode prepared from oppositely charged conductive nanoparticles by layer-by-layer approach, *Electrochemistry Communications* 12 (2010) 435–437.
- [101] C.X. Guo, F.P. Hu, X.W. Lou, C.M. Li, High-performance biofuel cell made with hydrophilic ordered mesoporous carbon as electrode material, *Journal of Power Sources* 195 (2010) 4090–4097.
- [102] Y. Hamano, S. Tsujimura, O. Shirai, K. Kano, Micro-cubic monolithic carbon cryogel electrode for direct electron transfer reaction of fructose dehydrogenase, *Bioelectrochemistry* 88 (2012) 114–117.
- [103] F. Gao, L. Viry, M. Maugey, P. Poulin, N. Mano, Engineering hybrid nanotube wires for high-power biofuel cells, *Nature Communications* 1 (2010).
- [104] R.H. Baughman, A.A. Zakhidov, W.A. de Heer, Carbon nanotubes - the route toward applications, *Science* 297 (2002) 787–792.
- [105] N. Grobert, Carbon nanotubes - becoming clean, *Materials Today* 10 (2007) 28–35.
- [106] S. Sajjadi, H. Ghourchian, P. Rahimi, Different behaviors of single and multi wall carbon nanotubes for studying electrochemistry and electrocatalysis of choline oxidase, *Electrochimica Acta* 56 (2011) 9542–9548.
- [107] K. Kamaras, M.E. Itkis, H. Hu, B. Zhao, R.C. Haddon, Covalent bond formation to a carbon nanotube metal, *Science* 301 (2003), 1501–1501.
- [108] O. Yehezkeli, R. Tel-Vered, S. Reichlin, I. Willner, Nano-engineered flavin-dependent glucose dehydrogenase/gold nanoparticle-modified electrodes for glucose sensing and biofuel cell applications, *ACS Nano* 5 (2011) 2385–2391.
- [109] Y.B. Saint Come, H. Lalo, Z.J. Wang, G.W. Kohring, R. Hempelmann, M. Etienne, A. Walcarius, A. Kuhn, Interest of the Sol-Gel approach for multiscale tailoring of porous bioelectrode surfaces, *Electroanalysis* 25 (2013) 621–629.
- [110] S. Boland, D. Leech, A glucose/oxygen enzymatic fuel cell based on redox polymer and enzyme immobilisation at highly-ordered macroporous gold electrodes, *Analyst* 137 (2012) 113–117.
- [111] U. Salaj-Kosla, S. Poller, W. Schuhmann, S. Shleev, E. Magner, Direct electron transfer of *Trametes hirsuta* laccase adsorbed at unmodified nanoporous gold electrodes, *Bioelectrochemistry* 91 (2013) 15–20.
- [112] D.I. Fried, F.J. Brieler, M. Froba, Designing inorganic porous materials for enzyme adsorption and applications in biocatalysis, *Chemcatchem* 5 (2013) 862–884.
- [113] C. Renault, C.P. Andrieux, R.T. Tucker, M.J. Brett, V. Balland, B. Limoges, Unraveling the mechanism of catalytic reduction of O₂ by microperoxidase-11 adsorbed within a transparent 3D-Nanoporous ITO Film, *Journal of the American Chemical Society* 134 (2012) 6834–6845.
- [114] H. Nishihara, Y. Fukuraa, K. Inde, K. Tsuji, M. Takeuchi, T. Kyotani, Carbon-coated mesoporous silica with hydrophobicity and electrical conductivity, *Carbon* 46 (2008) 48–53.
- [115] M. Choi, K. Jo, H. Yang, Effect of different pretreatments on indium-tin oxide electrodes, *Bulletin of the Korean Chemical Society* 34 (2013) 421–425.
- [116] A. Celebanska, A. Lesniewski, M. Paszewski, M. Jonsson-Niedziolka, J. Niedziolka-Jonsson, M. Opallo, Gold three dimensional film electrode prepared from oppositely charged nanoparticles, *Electrochemistry Communications* 13 (2011) 1170–1173.
- [117] C. Gutierrez-Sanchez, W.Z. Jia, Y. Beyl, M. Pita, W. Schuhmann, A.L. De Lacey, L. Stoica, Enhanced direct electron transfer between laccase and hierarchical carbon microfibers/carbon nanotubes composite electrodes. Comparison of three enzyme immobilization methods, *Electrochimica Acta* 82 (2012) 218–223.
- [118] Z.G. Zhu, L. Garcia-Gancedo, C. Chen, X.R. Zhu, H.Q. Xie, A.J. Flewitt, W.I. Milne, Enzyme-free glucose biosensor based on low density CNT forest grown directly on a Si/SiO₂ substrate, *Sensors and Actuators B-Chemical* 178 (2013) 586–592.
- [119] J. Baur, A. Le Goff, S. Dementin, M. Holzinger, M. Rousset, S. Cosnier, Three-dimensional carbon nanotube-polyppyrrrole-[NiFe] hydrogenase electrodes for the efficient electrocatalytic oxidation of H₂, *International Journal of Hydrogen Energy* 36 (2011) 12096–12101.
- [120] T. Lojou, P. Bianco, Buildup of polyelectrolyte-protein multilayer assemblies on gold electrodes. Role of the hydrophobic effect, *Langmuir* 20 (2004) 748–755.
- [121] A. Sanchez, P. Diez, P. Martinez-Ruiz, R. Villalonga, J.M. Pingarron, Janus Aummesoporous silica nanoparticles as electrochemical biorecognition-signaling system, *Electrochemistry Communications* 30 (2013) 51–54.
- [122] J.T. Holland, C. Lau, S. Brozik, P. Atanassov, S. Banta, Engineering of glucose oxidase for direct electron transfer via site-specific gold nanoparticle conjugation, *Journal of the American Chemical Society* 133 (2011) 19262–19265.
- [123] M. Frascioni, A. Heyman, I. Medalsy, D. Porath, F. Mazzei, O. Shoseyoy, Wiring of redox enzymes on three dimensional self-assembled molecular scaffold, *Langmuir* 27 (2011) 12606–12613.
- [124] C.P. You, X. Xu, B.Z. Tian, J.L. Kong, D.Y. Zhao, B.H. Liu, Electrochemistry and biosensing of glucose oxidase based on mesoporous carbons with different spatially ordered dimensions, *Talanta* 78 (2009) 705–710.
- [125] A. Ciaccafava, M. Alberola, S. Hameury, P. Infossi, M.T. Giudici-Ortoni, E. Lojou, Hydrogen bioelectrooxidation in ionic liquids: from cytochrome c₃ redox behavior to hydrogenase activity, *Electrochimica Acta* 56 (2011) 3359–3368.
- [126] M. Sosna, L. Stoica, E. Wright, J.D. Kilburn, W. Schuhmann, P.N. Bartlett, Mass transport controlled oxygen reduction at anthraquinone modified 3D-CNT electrodes with immobilized *Trametes hirsuta* laccase, *Physical Chemistry Chemical Physics* 14 (2012) 11882–11885.
- [127] R.T. Bonnecaze, N. Mano, B. Nam, A. Heller, On the behavior of the porous rotating disk electrode, *Journal of the Electrochemical Society* 154 (2007) F44–F47.
- [128] C.H. Lee, T.S. Lin, C.Y. Mou, Mesoporous materials for encapsulating enzymes, *Nano Today* 4 (2009) 165–179.

Provided for non-commercial research and education use.
Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/authorsrights>



Contents lists available at ScienceDirect

Electrochemistry Communications

journal homepage: www.elsevier.com/locate/elecom

Short communication

Design of a H₂/O₂ biofuel cell based on thermostable enzymesA. de Poulpiquet^a, A. Ciaccafava^a, R. Gadiou^b, S. Gounel^c, M.T. Giudici-Ortoni^a, N. Mano^c, E. Lojou^{a,*}^a Bioénergétique et Ingénierie des Protéines, UMR 7281, CNRS-AMU, 31 Chemin Aiguier, 13009 Marseille, France^b Institut de Sciences des Matériaux de Mulhouse, UMR 7361, CNRS, 15 rue Starcky, 68057 Mulhouse, France^c Centre de Recherche Paul Pascal, UPR 8641, CNRS, Bordeaux University, 33600 Pessac, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 30 January 2014

Received in revised form 17 February 2014

Accepted 18 February 2014

Available online 26 February 2014

Keywords:

Enzymatic H₂/O₂ biofuel cell

Hydrogenase

Bilirubin oxidase

Thermostable enzymes

Direct electron transfer

Carbon nanofiber

ABSTRACT

A new generation of mediatorless H₂/O₂ biofuel cells was designed based on a hyperthermophilic O₂-tolerant hydrogenase and a thermostable bilirubin oxidase both immobilized on carbon nanofibers. A power density up to 1.5 ± 0.2 mW · cm⁻² at 60 °C was reached. This first demonstration of a H₂/O₂ biofuel cell able to deliver electricity over a wide range of temperatures, from 30 °C up to 80 °C, and over a large pH window, allows considering this device as an alternative power supply for small portable applications in various environments, including extreme ones.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

H₂ is an alternative to fossil fuels and is the subject of intensive research in the field of fuel cells. Its production from biomass is an increasing and promising domain which may improve its sustainability [1,2]. Its use has also been envisioned for the elaboration of H₂/O₂ enzymatic biofuel cells (BFCs) which may power small *ex-vivo* electronic devices in a sustainable manner.

Hydrogenase (Hase) is the key enzyme for hydrogen oxidation in many microorganisms. Many fundamental researches on mechanistic aspects of hydrogen oxidation by Hase have been done for more than 20 years [3–5]. However, H₂/O₂ BFCs are only emerging, essentially because of the high sensitivity to O₂ of many Hases. This limitation was recently overcome by the identification of O₂-tolerant Hases [6–10]. Armstrong's group established the proof of concept of H₂/O₂ BFCs using a mesophilic O₂-tolerant Hase and multicopper enzymes (laccase or bilirubin oxidase (BOD)) to reduce oxygen [11–13]. The mW · cm⁻² power density landmark was reached last year for H₂/O₂ BFC by entrapping the enzymes in compacted carbon powder electrodes [14]. Therefore, H₂/O₂ BFC equaled the highest performances of the commonly developed glucose/O₂ BFCs [15–17]. This BFC operated in mild conditions, *i.e.* at pH 6 and room temperature. We also proved

two years ago that power densities up to 300 μW · cm⁻² could be reached with another O₂- and CO-tolerant Hase purified from the hyperthermophilic bacterium *Aquifex aeolicus* (MbH1) and a commercially available BOD, both covalently bound on carboxyl functionalized carbon nanotubes [18]. Due to the ability of MbH1 to oxidize H₂ at high temperatures [7], we envisioned the development of a H₂/O₂ biofuel cell delivering electricity in unconventional environments, such as hot ones. However the performances of the H₂/O₂ BFC were limited at temperatures higher than 40 °C by the strong decrease in enzymatic activity of the biocathode, linked to the BOD denaturation.

In the present work we use a thermostable BOD from *Bacillus pumilus* (*Bp* BOD) [19,20] for the direct reduction of oxygen at the biocathode in tandem with the hyperthermophilic MbH1 at the anode. This is the first attempt to address the problem of operating BFCs even at temperatures above those tolerated by enzymes from conventional microorganisms.

2. Experimental

2.1. Chemicals and materials

B. pumilus BOD (*Bp* BOD) was produced and purified according to Durand and co-workers [19] and MbH1 was purified as described in Luo et al. [7]. BOD from *Myrothecium verrucaria* (*Mv* BOD) was a gift from Amano Enzyme Inc. (Nagoya, Japan). Hydrophobic and hydrophilic carbon nanofibers (CNF) were synthesized and functionalized as reported in de Poulpiquet et al. [21].

* Corresponding author. Tel.: +33 491164524; fax: +33 491164097.
E-mail address: lojou@imm.cnrs.fr (E. Lojou).

2.2. Bioinformatics

Swissmodel automated mode was used to construct the homology model of *Bp* BOD. The *Bp* BOD protein sequence (Pubmed entry AFL56752.1) was used as a query and the crystallographic structure of *Bacillus subtilis* (1GSK chain: A) was used as a template.

2.3. Instrumentation and measurement procedures

Electrochemical experiments were performed using a potentiostat from Bio-Logic. The Ag/AgCl (NaCl sat.) reference electrode was separated from the electrolyte using a side junction maintained at room temperature. A pyrolytic graphite (PG) electrode from Bio-Logic was the working electrode. All current densities are calculated using the projected area of the PG electrode ($A = 0.07 \text{ cm}^2$). Current densities were measured at -0.25 V or $+0.3 \text{ V}$ for MbH1 and BOD, respectively. The electrodes were placed at 6 cm (this distance was not optimized but imposed by the geometry of the cell) from the Nafion® membrane (Nafion® 117 from DUPONT-USA) separating the compartments. The biofuel cell performances were examined under 100% H_2 and 100% O_2 for anode and cathode respectively. Gas bubbling was maintained into the electrolyte solution to limit substrate depletion. The cell current and voltage were measured by polarization curves, after stabilization of the system. Scan rate was $3 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$.

2.4. Electrode preparation

MbH1 and BOD were immobilized respectively on hydrophobic and hydrophilic fishbone carbon nanofibers (CNF) [21]. In-depth characterization of the biohybrid electrode led to the following optimized procedure. CNFs were diluted in a mix of Milli-Q water and N-N-dimethylformamide and sonicated before use. $5 \mu\text{L}$ of the 4 mg/mL CNF suspension was deposited on the PG electrode and left to dry at 60°C . This operation was repeated 3 times. Then $5 \mu\text{L}$ of $5 \mu\text{M}$ MbH1, or $5 \mu\text{L}$ of $10 \mu\text{M}$ *Bp* BOD, or $10 \mu\text{L}$ of $20 \mu\text{M}$ *Mv* BOD were deposited and left to dry at 4°C for 2 h, 15 h and 1 h, respectively.

3. Results and discussion

3.1. Direct electron transfer for H_2 oxidation and O_2 reduction is allowed by the CNF network on a large range of temperature (30 to 70°C)

Direct H_2 oxidation by MbH1 at a CNF-bioelectrode has been recently detailed at 60°C [21]. Thanks to a hierarchical porosity and a large number of anchoring sites available for MbH1, hydrophobic fishbone nanofibers allowed stable and high current densities for H_2 oxidation [21,22]. The evolution of the catalytic current as a function of temperature is reported in Fig. 1A. Current densities increase with temperatures reaching values around $4 \text{ mA} \cdot \text{cm}^{-2}$ at 70°C . It must be noted also that H_2 oxidation is still quite efficient for lower temperatures (j_{max} at 30°C is about 45% of j_{max} at 70°C).

Although O_2 reduction by *Bp* BOD in redox osmium hydrogels has been reported [20,23], direct electron transfer (DET) has never been investigated. Actually, bacterial *Bp* BOD shares less than 33% sequence homology with the fungal BOD usually studied by electrochemistry such as *Mv* BOD [19]. A consistent structural model of *Bp* BOD has been constructed by homology modeling based on the crystallographic structure of CotA from *B. subtilis* which displays 67% sequence identity (Fig. 1B). The *Bp* BOD exhibits a strong dipole moment of 2073 Debye pointing toward a positive patch at the surface of the protein opposite to the T1 copper center (for a review on multicopper oxidases see [24]). Besides, hydrophobic amino acids form only isolated entities at the surface. Consequently, hydrophilic CNFs were chosen and simple adsorption of the enzyme led to efficient DET for O_2 reduction with an onset potential of $+0.56 \text{ V}$ vs Ag/AgCl at pH 4 (Fig. 1A). Hydrophobic CNFs could also be used but led to a less important and stable O_2 reduction.

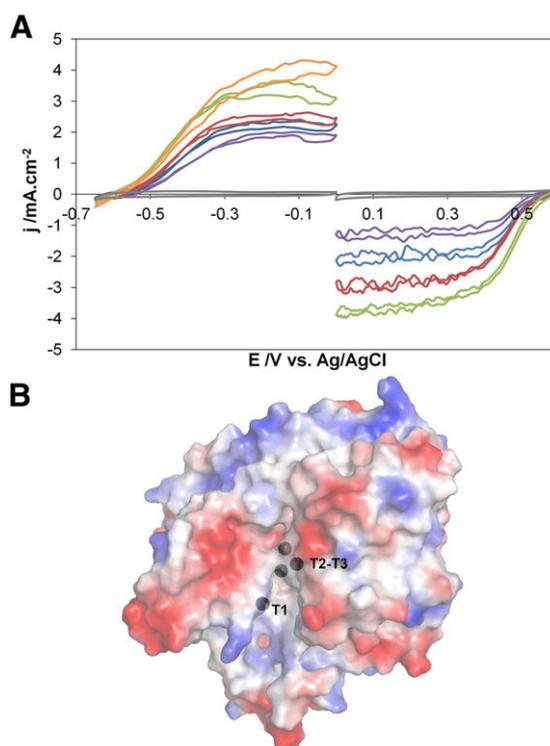


Fig. 1. Direct H_2 oxidation and O_2 reduction at CNF-modified bioelectrodes. (A) Temperature dependence of the voltammetric signals (0 rpm , $5 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$) for the bioanode in 50 mM Hepes buffer pH 7 and for the biocathode in 100 mM phosphate– 200 mM citrate buffer pH 4 (H_2 and O_2 flow rates were $3 \text{ cm}^3 \cdot \text{s}^{-1}$): 30°C (violet), 40°C (blue), 50°C (red), 60°C (green), 70°C (orange). CV at 60°C for CNF electrodes with no enzyme is superimposed in gray. (B) Model structure of *Bp* BOD based on *B. subtilis* CotA crystallographic structure (pdb ID: 1GSK). The hydrophobic amino acids are colored white, the positive and negative ones are in blue and red, respectively. Copper atoms appear as black spheres.

The biocathode proved to be efficient over a wide range of pH and temperature. The enzyme was electroactive at acidic and neutral pH, with an optimum at pH 4 (data not shown), which is close to the optimum activity reported for oxidation of the natural substrate bilirubin [19]. As similar observations were reported for *Bp* BOD wired in osmium polymer [20], this suggests that direct electrical connection of the enzyme does not alter its enzymatic properties. The current densities for direct enzymatic O_2 reduction increase with increasing temperatures up to 60°C , depicting a two-fold increase between 30°C and 60°C (Fig. 1A). A decrease in the maximum current density was recorded at higher temperatures than 60°C . Based on spectrophotometric assays, Mano's group reported a four-time higher activity at 60°C than at 30°C with an optimum temperature of 75°C [20]. A three-time enhancement of the catalytic current was also previously recorded for O_2 reduction with *Bp* BOD wired in osmium polymer when temperature was increased from 37°C up to 70°C [20]. The differences between homogeneous and heterogeneous experiments might be explained by the increasing difficulty to overcome the mass transport limitation through the redox polymer or the CNF network because O_2 solubility in water decreases with increasing temperature, and/or by the orientation of the enzyme on the electrode surface. A change in the CV profiles at the highest temperatures was sometimes noticed, which is also observed for H_2 oxidation (Fig. 1A). This behavior might be related to a distribution of electron transfer rates inside the CNF film because of a distribution of enzyme orientation [25]. The intensity for direct O_2 reduction by *Bp* BOD immobilized onto CNFs is 90%, 70% and 50% of the initial current after 30 min of continuous cycling at 50°C , 60°C and 70°C , respectively. Again these results are close to those reported before for homogeneous catalysis at 80°C [19] and when the BOD was

wired in Os polymer at 70 °C [20]. A different result is obtained when immobilizing *Mv* BOD at the CNF-modified electrode: 100% loss of current for O₂ reduction at 50 °C in 30 min is observed.

3.2. Performances of the biofuel cell

Individual experiments were performed either with Hepes at the anode or citrate–phosphate at the cathode. In the BFC configuration, phosphate buffer was determined to be the best compromise.

The thermostability of both cathodic and anodic enzymes permits to apply a unique temperature in the two BFC compartments allowing overcoming the previous limitation reported using MbH1 and *Mv* BOD [18]. At 50 °C, the optimal power density $1.2 \pm 0.2 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$ was reached at pH 6 with a cell voltage of 0.75 V. In the 4 to 7 pH range, the BFC power densities were comprised between 0.6 ± 0.07 and $1.2 \pm 0.2 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$ for cell voltages varying from 0.6 to 0.75 V (Fig. 2A). In contrast a maximal power density of $10 \mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$ was reached for electrodes modified with CNFs in the absence of enzymes. 40% of the initial power density is retained after 24 h of continuous operation at $E_{\text{cell}} = 0.5 \text{ V}$. During this period (24 h), the anodic and cathodic currents have decreased by the same ratio (inset in Fig. 2A). The loss of power density is most probably a combination of enzyme leaching and denaturation.

As seen in Fig. 2B, the H₂/O₂ BFC delivers high power densities over a broad range of temperature comprised between 30 and 80 °C. At 30 °C, a power density of $650 \mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$ was reached while it was $1.5 \pm 0.2 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$ at 60 °C. These results contrast with the previous

BFC performances using *Mv* BOD where the power density strongly decreased upon increasing the temperature above 40 °C in the cathodic compartment [18]. The power density of this new BFC is 5 times higher than our previous BFC [18]. Measurements with CNF-modified electrodes were realized with *Mv* BOD instead of *Bp* BOD while maintaining the anode and cathode compartments respectively at 60 and 25 °C as previously published [18]. A maximal power density of $495 \mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$ was obtained, *i.e.* a 1.5-fold increase which shows the importance of optimizing the electrode material, but which essentially underlines the key role of the thermostability of *Bp* BOD.

4. Conclusion

We demonstrate in this work that associating together two thermostable enzymes allows the development of a H₂/O₂ BFC that can deliver high power densities over a wide range of temperatures. A power density of $1.5 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$ with a fill factor of 0.63 is reached which constitutes one of the highest power density ever obtained for BFCs. This new generation of H₂/O₂ BFCs whose functioning is not limited by temperature can reasonably be considered as an alternative energy for future applications in environments in which enzymes from conventional microorganisms are denaturated. Preliminary studies on the stability of this BFC reveal that only 40% of the power density remains after 24 h of operating. In the next step of this research, long-term stability as well as the scale-up of the bioelectrodes need to be envisioned for future applications. To this end, enzyme engineering and material design are underway.

Acknowledgments

The authors thank P. Infossi, Drs M. Guiral, M. Ilbert (BIP, Marseille, France) for the fruitful discussions, and Région Provence-Alpes-Côte d'Azur, Région Aquitaine and ANR for the financial support.

References

- [1] A.J. McCormick, P. Bombelli, D.J. Lea-Smith, R.W. Bradley, A.M. Scott, A.C. Fisher, A.G. Smith, C.J. Howe, *Energy Environ. Sci.* 6 (2013) 2682–2690.
- [2] E.S. Heidrich, J. Dolfing, K. Scott, S.R. Edwards, C. Jones, T.P. Curtis, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97 (2013) 6979–6989.
- [3] H.S. Shafaat, O. Rudiger, H. Ogata, W. Lubitz, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* 1827 (2013) 986–1002.
- [4] E. Lojou, *Electrochim. Acta* 56 (2011) 10385–10397.
- [5] P.W. King, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* 1827 (2013) 949–957.
- [6] A. Ciaccavava, C. Hamon, P. Infossi, V. Marchi, M.T. Giudici-Orticoni, E. Lojou, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 15 (2013) 16463–16467.
- [7] X.J. Luo, M. Brugna, P. Tron-Infossi, M.T. Giudici-Orticoni, E. Lojou, *J. Biol. Inorg. Chem.* 14 (2009) 1275–1288.
- [8] Y. Shomura, K.S. Yoon, H. Nishihara, Y. Higuchi, *Nature* 479 (2011) 253–U143.
- [9] J. Fritsch, P. Scheerer, S. Frielingsdorf, S. Kroschinsky, B. Friedrich, O. Lenz, C.M.T. Spahn, *Nature* 479 (2011) 249–U134.
- [10] A. Volbeda, P. Amara, C. Darnault, J.M. Mousca, A. Parkin, M.M. Roessler, F.A. Armstrong, J.C. Fontecilla-Camps, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109 (2012) 5305–5310.
- [11] K.A. Vincent, J.A. Cracknell, J.R. Clark, M. Ludwig, O. Lenz, B. Friedrich, F.A. Armstrong, *Chem. Commun.* (2006) 5033–5035.
- [12] A.F. Wait, A. Parkin, G.M. Morley, L. dos Santos, F.A. Armstrong, *J. Phys. Chem. C* 114 (2010) 12003–12009.
- [13] S. Krishnan, F.A. Armstrong, *Chem. Sci.* 3 (2012) 1015–1023.
- [14] L. Xu, F.A. Armstrong, *Energy Environ. Sci.* 6 (2013) 2166–2171.
- [15] D. Leech, P. Kavanagh, W. Schuhmann, *Electrochim. Acta* 84 (2012) 223–234.
- [16] M. Holzinger, A. Le Goff, S. Cosnier, *Electrochim. Acta* 82 (2012) 179–190.
- [17] A.L.G. Serge Cosnier, Michael Holzinger, *Electrochem. Commun.* 38 (2014) 19–23.
- [18] A. Ciaccavava, A. De Poulpiquet, V. Techer, M.T. Giudici-Orticoni, S. Tingry, C. Innocent, E. Lojou, *Electrochem. Commun.* 23 (2012) 25–28.
- [19] F. Durand, C.H. Kjaergaard, E. Suraniti, S. Gounel, R.G. Hadt, E.I. Solomon, N. Mano, *Biosens. Bioelectron.* 35 (2012) 140–146.
- [20] E. Suraniti, S. Tsujimura, F. Durand, N. Mano, *Electrochem. Commun.* 26 (2013) 41–44.
- [21] A. de Poulpiquet, H. Marques-Knopf, V. Wernert, M.T. Giudici-Orticoni, R. Gadiou, E. Lojou, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 16 (2014) 1366–1378.
- [22] A. Ciaccavava, P. Infossi, M. Ilbert, M. Guiral, S. Lecomte, M.T. Giudici-Orticoni, E. Lojou, *Angew. Chem. Int. Ed.* 51 (2012) 953–956.
- [23] L. Edembe, S. Gounel, M. Cadet, F. Durand, N. Mano, *Electrochem. Commun.* 23 (2012) 80–82.
- [24] E.I. Solomon, A.J. Augustine, J. Yoon, *Dalton Trans.* (2008) 3921–3932.
- [25] K.A. Vincent, A. Parkin, F.A. Armstrong, *Chem. Rev.* 107 (2007) 4366–4413.

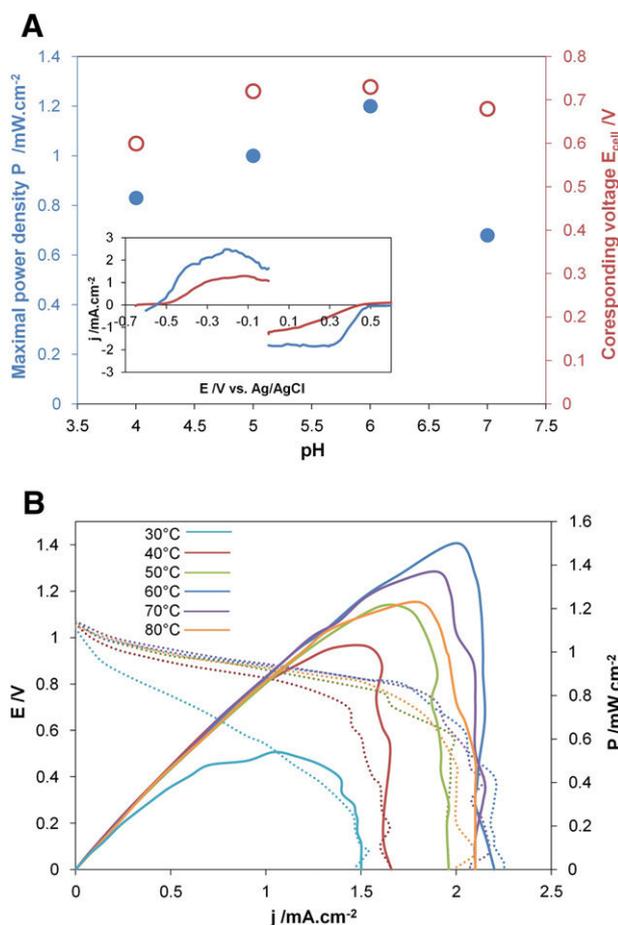
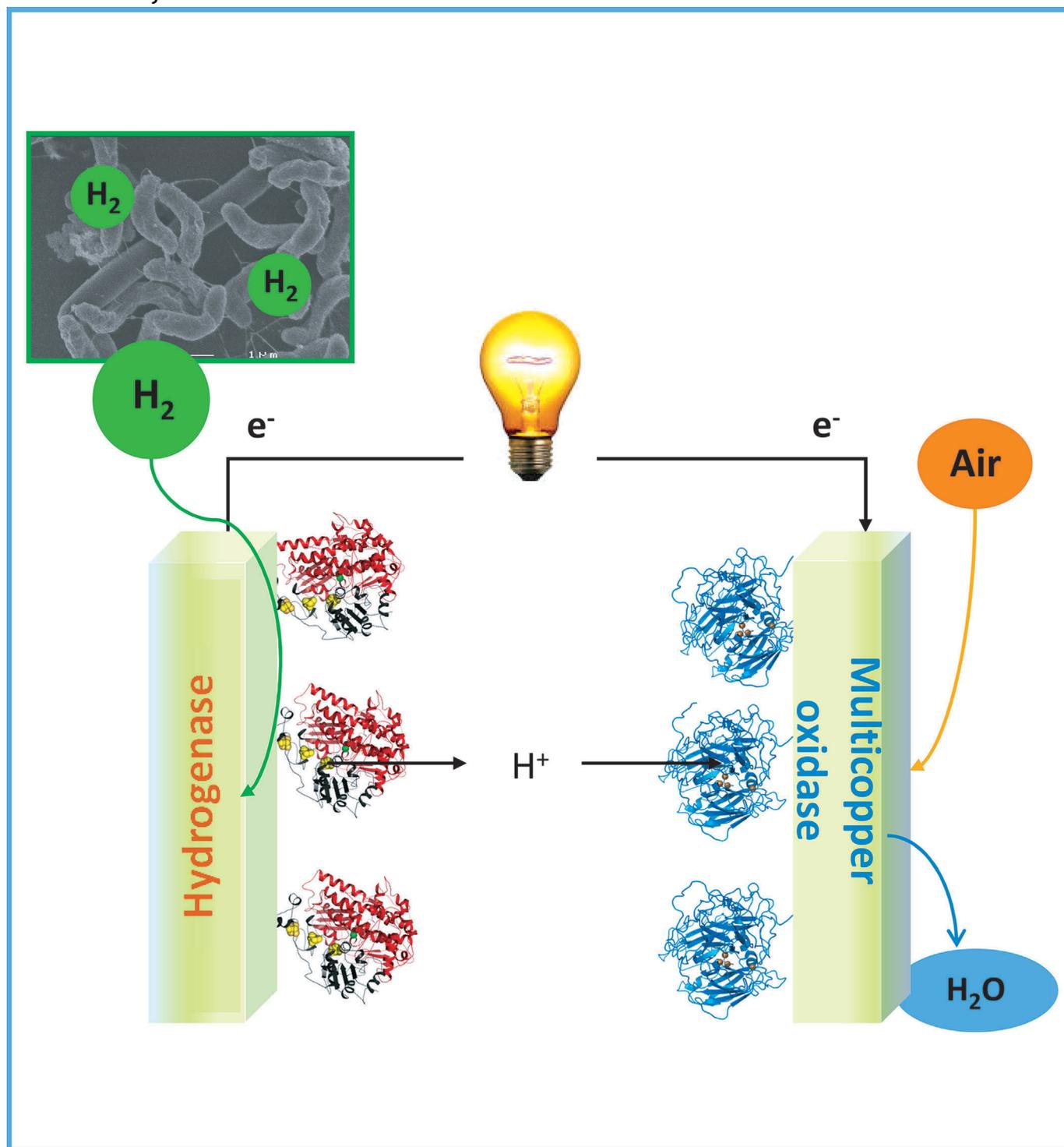


Fig. 2. High temperature H₂/O₂ BFC performances in 100 mM phosphate buffer. (A) Influence of pH at 50 °C, inset: performances of the biofuel cell before (blue) and after (red) 24 h of continuous operation at $E_{\text{cell}} = 0.5 \text{ V}$ and pH 6; (B) temperature dependence at pH 6.

DOI: 10.1002/celec.201402249

Special
Issue

Biohydrogen for a New Generation of H₂/O₂ Biofuel Cells: A Sustainable Energy Perspective

Anne de Poulpiquet, David Ranava, Karen Monsalve, Marie-Thérèse Giudici-Ortoni, and Elisabeth Lojou*^[a]

Among sustainable alternatives to fossil fuel, proton exchange membrane fuel cells are promising devices that deliver electricity from hydrogen and oxygen, producing only water. The transformation of the fuel and oxidant however relies on rare-metal catalysts. H₂/O₂ enzymatic biofuel cells thus emerge as sustainable biotechnological devices in which chemical catalysts are replaced by hydrogenases at the anode and multicopper oxidases at the cathode. This review discusses the recent breakthroughs and the limitations in all the components of H₂/O₂ biofuel cells: 1) Catalytic mechanisms involved in multicop-

per oxidases and hydrogenases, in addition to the new potential of enzymes from the biodiversity pool, which exhibit outstanding properties. 2) The molecular basis for oriented enzyme immobilization on the electrochemical interfaces as a prerequisite for a fast direct electron-transfer rate. 3) The requirement for 3D networks to enhance current densities. 4) The production of H₂ from biomass. 5) The history of H₂/O₂ biofuel cells and recent devices, which also highlights the remaining issues that will allow the use of such devices in low-power applications.

1. Introduction

Our world is currently facing a demographic, energy, and climatic crisis. The world population will keep growing until 2050, reaching nine billion inhabitants. In addition to the emergence of new developed countries, one direct consequence is the increase in energy demand, even if restrictive policies to limit the temperature increase due to greenhouse gas emission are settled and applied. To respond to this increasing demand, the energy sources are still predicted to come essentially from fossil sources. However, these are already responsible to a great extent for greenhouse gas emissions and global temperature increase, and reserves are expected to be depleted in the latter half of the century. Sustainable alternatives are imperative to improve this dark future, and this will require that we are able to propose, then to develop and use a variety of economically viable energy sources.

Among the alternative energies available, hydrogen appears to be an attractive candidate because it represents the highest energy output relative to the molecular weight (120 MJ kg⁻¹ against 50 MJ kg⁻¹ for natural gas), and because its combustion delivers only water and heat. Combined within water and hydrocarbons, H₂ is the most abundant element on earth. Its production and storage does not compete with food and water resources and it can be used as a method with which to transport and store energy, therefore hydrogen emerges as a fully friendly environmental energy carrier that can be classed as a third-generation biofuel. However a H₂ economy requires technological challenges not only to address the issue of storage and transportation, but also to produce and convert hydrogen in a sustainable manner. Promising ways exist, including production from renewable energies, from biological conversion of light energy by photosynthetic microorganisms, and from dark fermentation.^[1,2] Furthermore, conversion of the chemical energy into electricity by using fuel cell technology is a very efficient approach (more than 50% compared with less

than 30% for gas engines).^[3] In particular, low-temperature proton exchange membrane fuel cells (PEMFCs) operating between 60–80 °C, may be suitable for a wide range of applications from transportation to small stationary or portable devices. Although these fuel cells present advantageous characteristics, in terms of both power generation and sustainability, they are not yet widespread. This is mainly due to the cost of the proton conductive membrane required to separate the anodic and cathodic compartments, and the cost of the catalysts, which are necessary to accelerate both hydrogen oxidation and oxygen reduction. Catalysts in PEMFC are mainly based on Pt-group metals loaded onto a carbon support,^[4] which allow fast kinetics and negligible overpotential even at high current densities. These metals are, however, very expensive (average price is 40 €/g against 2 €/g for Ru for example [from <http://www.platinum.matthey.com/prices/price-charts/>]), are available in low amounts on earth (37 ppb in the Earth's crust), and are nonbiodegradable. Extensive research has aimed at decreasing the Pt content (for a review see^[5]), such as: 1) nanostructuring of the catalysts,^[6,7] 2) use of alloys or heterostructures,^[8–9] 3) nanostructuring and treatment of the carbon support,^[10–13] 4) use of noncarbon matrixes such as conducting polymers,^[14] and 5) use of semiconductive transition-metals.^[15] Furthermore, platinum catalysts are readily poisoned by very low levels of CO and S (0.1% of CO is sufficient to decrease one hundred fold the catalytic activity of Pt in ten minutes), thus requiring extensive H₂ purification.^[16] Lastly, the metal catalysts are not specific to either O₂ or H₂, thus requiring the obligatory use of a costly separating membrane.

The development of alternatives to platinum catalysts is surely one of the challenges that will need to be met to implement PMEFC. Recent publications report on the use of non-noble-metals for H₂ oxidation.^[5,17] Mo and W carbides, metal sulfides, Pd-Ni alloys, and especially Ir-V alloys have been shown to present promising high activity and good stability. For oxygen reduction catalysis, Fe- and Co-porphyrin-based macrocycles, Fe and Mn carbides, nitrides and oxides, and Ru-based chalcogenides have been investigated the most; however, none of them compete with the exceptional performance of Pt, especially for use in low-temperature fuel cells. Furthermore, although many studies have been conducted to design low cost alternatives to the standard membrane Nafion, which is a perfluorosulfonic acid polymer, this component imposes a severe limitation on fuel cell expansion.^[18]

[a] A. de Poulpiquet, D. Ranava, K. Monsalve, Dr. M.-T. Giudici-Ortoni, Dr. E. Lojou
Bioénergétique et Ingénierie des Protéines, UMR 7281
CNRS-Aix Marseille University
31 chemin Joseph Aiguier, 13009 Marseille (France)
E-mail: lojou@imm.cnrs.fr

 An invited contribution to a Special Issue on Biofuel Cells

A few years ago, a new concept of H_2/O_2 fuel cells appeared that was based on biocatalysts for fuel and oxidant transformation. This new concept was inspired by the pathways used by microorganisms for the production of ATP, which is their own energy source. As a relevant example, the hyperthermophilic, microaerophilic bacterium *Aquifex aeolicus* (*Aa*) couples H_2 oxidation to O_2 reduction through a membrane quinone pool (Figure 1A). The redox coupling involves an electron-transfer chain composed of specific redox enzymes and generates a proton gradient through the cell membrane for ATP synthesis. Clearly, this pathway can be considered as an “in vivo” fuel cell. It means that, providing the identification and production of the specific enzymes involved in this physiological coupling of H_2 oxidation and O_2 reduction can be achieved, an enzymatic biofuel cell (EBFC) can be envisioned that would operate exactly as PEMFC. Such a system would have the advantages of biocatalysts over chemical catalysts, including bioavailability, biodegradability, and specificity towards their substrate, and would mean that the need for a membrane separator could be avoided (Figure 1B).

In this review, we will discuss the developments and progress that have been reported in the last five years in the design of H_2/O_2 EBFCs as emerging devices. The objective is to gather in one report all the information that is needed to envision how such EBFC performance could be enhanced. We will first focus on the identification and limitations of enzymes that are available in the biodiversity pool that have properties suitable for their use as biocatalysts in EBFCs. In the second part, we will address the issue of the electrical connection of enzymes for O_2 reduction and H_2 oxidation, which is a prerequisite for turning enzymatic activity into electricity. Additionally, 3D networks that are required to enhance the number of enzymes participating to the catalytic current will be discussed. To be recognized as a green process, H_2/O_2 EBFCs must also be fed by a sustainable hydrogen source. Recent research on the production of biohydrogen will therefore also be discussed. A summary of the performance of the few, but increasing number of H_2/O_2 EBFCs will be presented, and the main limitations will be highlighted and discussed. Finally, an outlook on emerging research directions focused on the fundamental

Anne de Poulpiquet is a graduate of the Centrale Lyon Graduate School (Dipl. Ing.). Since 2011, she has been studying for her doctorate under the guidance of Dr. Elisabeth Lojou. Her research interests focus on the immobilization of redox enzymes at carbon mesoporous interfaces. She designed the first biofuel cell that can operate at a wide range of temperatures.



David Ranava is a graduate of the University of Marseille. Since 2013, he has been studying for his doctorate in the Laboratory of Bioenergetics and Protein Engineering with Marie-Thérèse Giudici-Orticoni. His study interests include bacterial interactions and hydrogen production in synthetic consortium by using different approaches such as microbiology, microscopy, metabolic quantification and electrochemistry.



Karen Monsalve obtained her BSc from the University of Los Andes and her MSc from Centrale Paris Graduate School. She is now working towards her doctorate under the supervision of Dr Elisabeth Lojou. Her studies are focused on immobilization and specific orientation of redox enzymes to optimize the electron-transfer rate with a view towards the development of biofuel cell devices.



Marie-Thérèse Giudici-Orticoni is a senior researcher at the French Research National Center. She obtained a Ph.D in Enzymology at the University of Aix-Marseille in 1991. She is currently the Director of the Laboratory of Bioenergetics and Protein Engineering, the Deputy Director of the Microbiology Mediterranean Institute, and coordinator of the Biomass/Biohydrogen partnership platform from CNRS/Aix Marseille University. She is involved in scientific programs mainly related to metabolic studies of consortia involved in biohydrogen production, biochemical studies on the organization of extremophile bacterium metabolic chains, and in the identification and characterization of new multiresistant redox enzymes.



Elisabeth Lojou obtained her PhD at the University of Paris XII and then carried out postdoctoral research on Li/liquid cathode batteries in collaboration with the SAFT company. In 1995, she moved to her current position as senior researcher at the French Research National Center, in the Bioenergetic and Protein Engineering Laboratory, Marseille. Here, she develops fundamental and applied research at the biology/chemistry interface. Her particular interest is in the functionalization of electrodes for studying long-range electron transfers involving redox proteins and enzymes, including those identified in extremophiles. More recently, her interests have been in the development of H_2/O_2 biofuel cells.



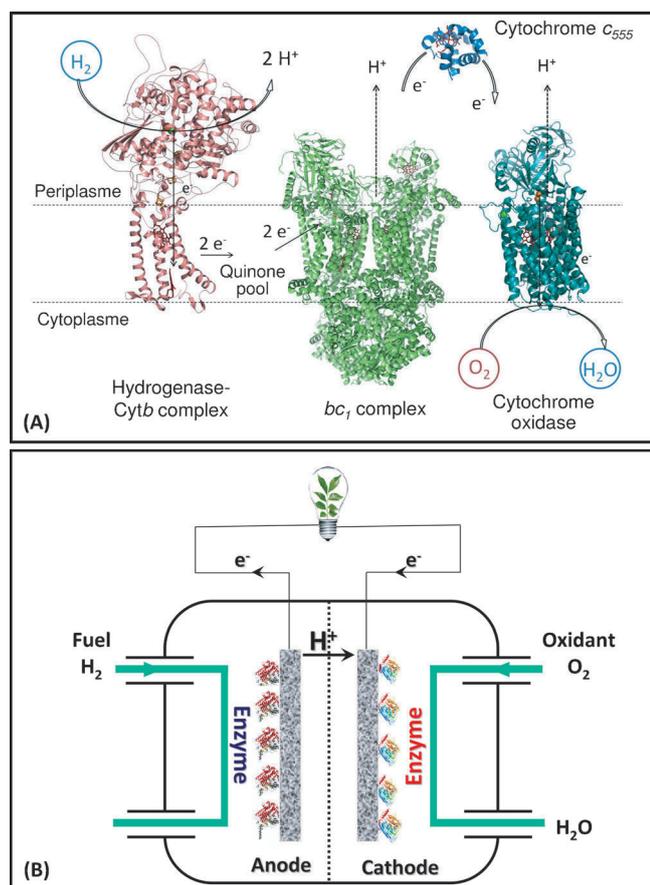


Figure 1. The concept of biofuel cells. A) Hydrogen metabolism involved in the hyperthermophilic bacterium *Aa*. B) Schematic representation of a H₂/O₂ biofuel cell.

issue of enzyme connection into the 3D-matrices, and on the ongoing search of the biodiversity pool for enzymes exhibiting new properties will be presented.

2. Enzymes to Replace Pt

Microorganisms have addressed the issue of hydrogen oxidation and oxygen reduction through the maturation of specific enzymes. Generally, the active site of the enzyme where the catalytic reaction takes place is constituted by non-noble metals such as Fe, Ni, Cu, or Mo. Based on these enzymes, chemists have designed bioinspired or even biomimetic synthetic compounds. Some of them are promising for H₂ oxidation, among which the Ni bisdiphosphane complex displays a notable activity in organic solvents.^[19,20] An analogue to Dubois' complexes was even grafted on carbon nanotube (CNT) networks and shown to be efficient for H₂ oxidation in aqueous acidic solution, displaying good stability and no CO poisoning.^[21,22] More recently, a very elegant and promising combination of a protein scaffold and active site synthetic analogue demonstrated the possibility of artificial maturation of hydrogenases (Hases), opening a new avenue toward synthetic biological hydrogen catalysts.^[23,24]

Enzymes themselves are able to display much higher catalytic rates under mild conditions and they can be envisioned as being very efficient biocatalysts in PMEFC. The most common EBFC developed so far was based on glucose oxidation by a flavin-containing enzyme, glucose oxidase, and oxygen reduction by multicopper-containing enzymes (MCOs), laccase (LAC) or bilirubin oxidase (BOD).^[25,26] Because they can operate under mild conditions of temperature and pH using physiological fluids, the target was in vivo applications. Increasing numbers of examples of the applicability of such devices implanted in animals have been reported in recent years, and a recent review of the latest developments in that domain has been published.^[27] However, considering the advantage of hydrogen over glucose in terms of energy density, H₂/O₂ EBFC may provide higher performances and could be used in a broader range of applications than in vivo implantation. The development of such new devices will benefit from the knowledge of oxidases already used for O₂ reduction in glucose/O₂ EBFCs, and from the recently improved understanding of the biochemistry and catalytic mechanisms of Hases, which are the key enzymes for H₂ oxidation.^[28]

2.1. Enzymes for O₂ Reduction

To date, the most widely used enzymes for oxygen reduction in EBFCs are MCOs.^[29] LAC and BOD belong to this class. They undergo four-electron reduction of O₂ to H₂O to oxidize a variety of organic substrates such as phenolic compounds and bilirubin, a bile pigment.^[30,31] This reduction requires four copper sites, which differ by their ligand coordination and geometry: one T1 Cu, and a trinuclear cluster composed of one T2 Cu center coupled to a binuclear T3 Cu center (Figure 2A).

The enzymatic mechanism of both homogeneous and heterogeneous catalysis was investigated long ago.^[30,32–35] Physiologically, electrons are received from the substrate to the T1 Cu and transfer through a histidine-cysteine bridge to the trinuclear cluster 12–14 Å away, where O₂ reduction takes place (Figure 2B). Some intermediates in the catalytic mechanism, in particular in the presence of inhibitors or under conditions of low or high potentials, are still under consideration.^[36–39] The commonly accepted mechanism is depicted in Figure 2C, in which two consecutive electronic transfers are involved from O₂ binding at the reduced trinuclear cluster, passing through a peroxy intermediate, then the native intermediate.

Direct electrochemistry of some MCOs has been reported at various electrochemical interfaces.^[40,41] A rotating ring-disk electrode served to demonstrate the four-electron reduction of O₂ to H₂O by BOD immobilized at an electrode.^[30] An evolution of the heterogeneous catalytic signal with various parameters such as time, temperature, and pH similar to homogeneous catalysis was observed.^[42–43] Noncatalytic voltametric signatures of MCOs in the absence of O₂ were difficult to assign, especially on gold electrodes, because of some discrepancy between the cyclic voltammetry (CV) potentials and the potential at which O₂ reduction occurred.^[44–47] A mutant of *Myrothecium verrucaria* (*Mv*) BOD, displaying a lower Cu T1 redox potential, was however shown to catalyze O₂ reduction at a lower poten-

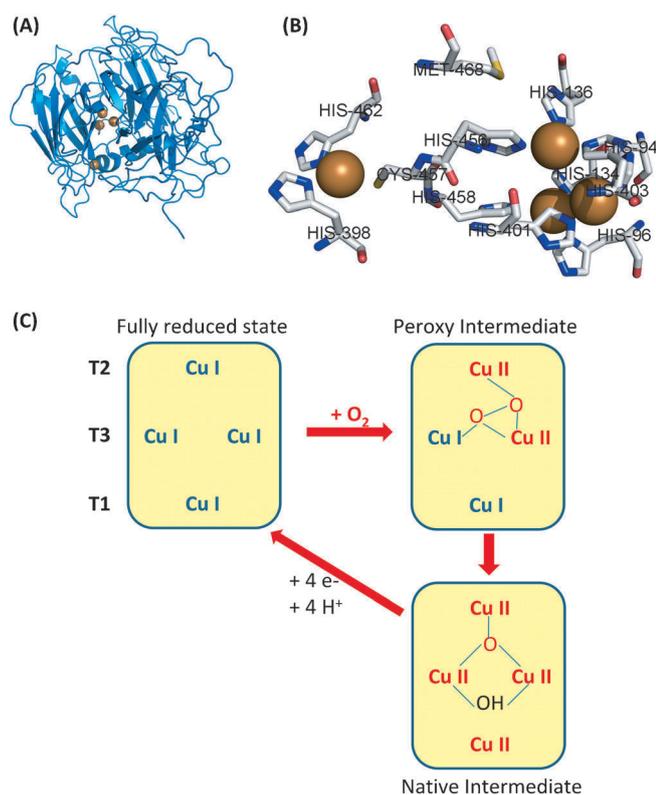


Figure 2. Structures of oxygen-reducing enzymes and electron-transfer pathways. A) BOD from *Mv* in which the copper centers are depicted as brown spheres (pdb ID 3ABG). B) Copper center geometry. C) Simplified electron-transfer pathway for O_2 reduction adapted from Ref. [32].

tial than the wild type.^[48] This suggests that the electrode can be recognized as the primary electron donor to the MCOs, and can provide direct access to the potential values for the T1 Cu centers (Table 1).^[41,47,49–53] The Cu^{II}/Cu^I transition of the T1 center for plant and fungal LACs are determined to be between +0.22 and +0.58 V vs. Ag/AgCl.^[45] According to this potential, LACs are classified in low, middle, or high redox poten-

tial enzymes, the latter being the most interesting for applications in EBFCs. In BOD, values between +0.4 and +0.5 V vs. Ag/AgCl are reported, thus they are somehow lower than observed in high potential LACs.^[54–57] The variation in the potential values depends on the Cu coordination, nature of the ligands, geometry of the T1 Cu center, and the electrostatic and solvent effects. Potential values for T2 and T3 centers are more difficult to evaluate because of the many intermediates with different geometries and oxidation states that are generated in the course of O_2 reduction.^[47,52,58–60] Some works however reported multiple noncatalytic redox waves for MCOs in the range +0.2 to +0.4 V vs. Ag/AgCl, most probably because of a different enzyme orientation depending on the electrode material.^[47,61–62] At least one of these processes might be attributed to a trinuclear cluster intermediate.^[41,47,63–64] An uphill intramolecular electron transfer was thus proposed, which was confirmed both by electrochemistry and quantum and molecular mechanical calculations.^[60] This process is, however, still a matter of debate because the catalytic cycle involves highly oxidative species.^[34,51,57]

LACs are characterized by an acidic isoelectric point and an optimal activity under acidic pH.^[56] A LAC was, however, recently shown to have an optimum activity at neutral pH.^[57] LACs are most often inhibited by halides, hydroxides, and urate ions. Noncompetitive (with F^-) or competitive (with I^- and Cl^-) inhibition processes were proposed. This suggests that halides bind to the TNC center, with the biggest ions having restricted access to the trinuclear cluster.^[65–67] An accurate mechanism and the precise binding site are, however, still being established, especially as a function of pH.^[38,39] Furthermore, BODs are quite stable at neutral pH.^[68,69] They have been identified in various fungi and bacteria, and can exhibit chloride, urate, dithiothreitol (DTT) and ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) tolerance. Some of them also present thermostable properties.^[38,70–74] The reasons for this thermostability, although not well understood because of the absence of crystallographic structures, may originate from a more compact structure of the protein.^[75]

Table 1. Comparison of some O_2 reducing enzymes.						
	Source	Type	Resistance	T1 redox potential [V] ^[a]	T2/T3 redox potential [V] ^[a]	K_m [μM]/ k_{cat} [s^{-1}]
<i>Myrothecium verrucaria</i> (<i>Mv</i>)	Fungus	BOD		0.28 (pH 5.3) ^{[b][49]} 0.48 (pH 7) ^{[c][47,50]} 0.55 (pH 5.8) ^{[c][41]} 0.404 (pH 7) ^{[c][51]}	0.25 ^{[b][52]} 0.19 ^{[c][60]}	250/115 ^[317]
<i>Trachyderma tsunodae</i> (<i>Tt</i>)	Fungus	BOD		0.45 (pH 7) ^{[b][52]} 0.48 (pH 7) ^{[c][47]}	0.11 ^{[b][52]} 0.18 ^{[c][47]}	n.d. ^[d]
<i>Bacillus pumilus</i> (<i>Bp</i>) ^[71]	Bacterium	BOD	temp., urate, Cl^-			32/391
<i>Bacillus halodurans</i> ^[53]	Bacterium	BOD		0.115 ^[c]		n.d.
<i>Magnaporthe oryzae</i> ^[72]	Fungus	BOD	urea			429/664
<i>Bacillus subtilis</i> ^[318–319]	Bacterium	BOD	temp.			124/322
<i>Rhus vernicifera</i> ^[56]	Plant	LAC		0.22 ^[b]		103/560 ^[320]
<i>Trametes hirsute</i> (<i>Th</i>) ^[56]	Fungus	LAC		0.57 ^[b]		220/210
<i>Sreptomycetes coelicolor</i> (<i>Sc</i>) ^[57]	Bacterium	LAC		0.47 (pH 5.5) ^[c]		3600/5.8 ^[321]
<i>E. coli</i> ^[329]	Bacterium	<i>CcO aa3</i>				0.2/n.d.
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> ^[330]	Bacterium	<i>CcO cbb3</i>				0.007/n.d.

[a] versus Ag/AgCl. [b] Redox titration. [c] Electrochemistry. Kinetic constants K_m and k_{cat} were calculated with ABTS and catechol as substrates for BODs and LACs respectively. [d] n.d. = not determined.

2.2. Enzymes for H₂ Oxidation

Many microorganisms biosynthesize Hase, which is the metalloenzyme that catalyzes hydrogen uptake and evolution, for their energy demand, in various biotopes, either aerobic or anaerobic, and even under extreme conditions such as hot environments. These microorganisms range from the bacteria and archae domain to the lower eukaryotes.^[76] Despite their abundance, Hases have been studied in only a limited number of groups over the world essentially because of the difficulty involved in their purification and handling. Nevertheless, because Hases can be involved in attractive fields of work such as water splitting and biogas or electricity production, the interest in their biochemical and catalytic properties has grown considerably during the last five years. As an illustration, Hases have been the subject of five recent reviews, one of them covering most of the issues that are currently investigated.^[20,28,76–78] In the present review we will focus especially on Hases that are able to oxidize H₂ in the presence of O₂, which are enzymes that are fundamentally more suitable for EBFC development.

Hases are classified according to the metal content of the active site at which the heterolytic splitting of H₂ takes place. Among them the [FeFe]-Hases are more specifically involved in H₂ production, whereas [NiFe]-Hases are more efficient in H₂ oxidation; thus the latter will be more suitable for use in EBFCs. [NiFe]-Hases also differ in their localization in the cell: they are found in the periplasm, in the cytoplasm, and bound to the cell membrane (Figure 3A). Accordingly, the *in vivo* partner differs: it is a cytochrome c₃ in periplasmic [NiFe]-Hases or a diheme membrane cytochrome *b* in membrane-bound Hases. Since the first structure of a [NiFe]-Hase from a sulfate-reducing bacterium in 1995 was resolved,^[79] much progress has been realized in the understanding of Hases, including their maturation process, the mechanism of catalytic reactions, the molecular basis of their inhibition, and, more recently, the control of their immobilization on an electrode interface while preserving their catalytic activity.

All the [NiFe]-Hases share a common structure, which is composed of two subunits arranged in a globular shape that are a few nanometers in size. The [NiFe] active site is buried in the large subunit. The Fe atom is ligated by one CO and two CN⁻ (Figure 3B).^[80] Three FeS clusters within less than 13 Å constitute a conductive line in the small subunit. Hydrogen reaches the active site through well-defined hydrophobic channels,^[81–82] whereas avenues for proton evacuation are not yet so clearly identified (Figure 3C).

The existence of a FeS electronic relay at the surface of the protein (the distal FeS) accounts for the fact that Hases were some of the earliest enzymes addressed by direct electrochemistry on graphite electrodes.^[83,84] Whereas in the late 80s, electrochemistry provided essential kinetic data for Hases and their physiological partners,^[85–88] Yoropolov's group, followed by Hagen's then Armstrong's groups demonstrated that Hases could yield a direct current for H₂ oxidation or proton reduction when adsorbed at graphite electrodes.^[83,84,88,89] The influences of parameters such as pH, temperature, gas composi-

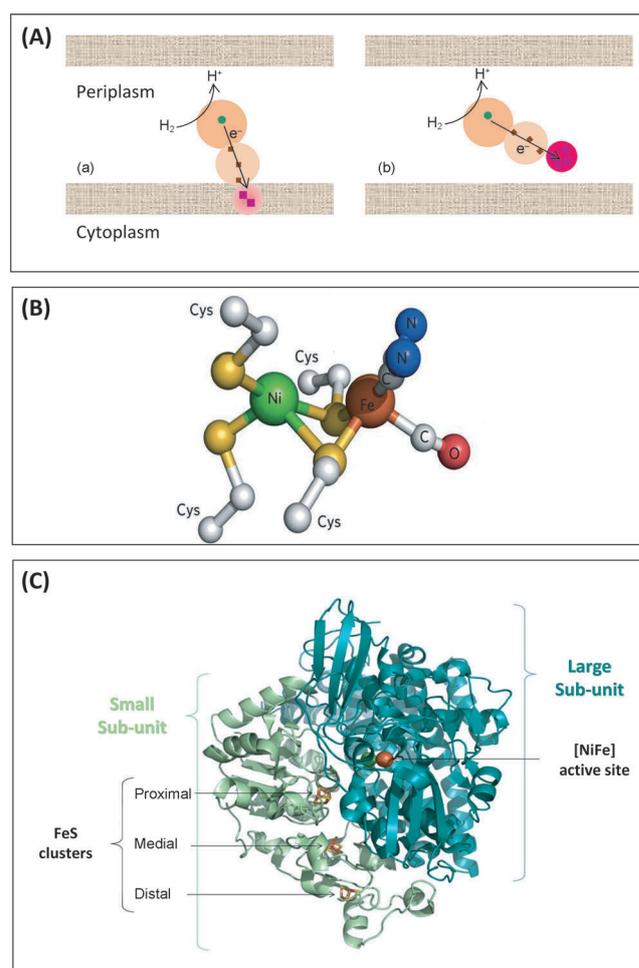


Figure 3. Structural properties of [NiFe]-Hase. A) Cellular location and *in vivo* partners of a) membrane-bound and b) periplasmic Hases; electrons are conducted from the Hase toward a membrane cytochrome *b* or a periplasmic cytochrome c₃ in (a) and (b), respectively. B) [NiFe] active site. C) Structure of the periplasmic O₂-sensitive [NiFe]-Hase from *Df* showing the [NiFe] active site and the three FeS clusters (pdb ID 1FRF).

tion, and graphite polishing procedure were evaluated,^[89–91] before fundamental research was undertaken to understanding of the catalytic properties of this exciting enzyme. Essential kinetic data were then available to support the spectroscopic data. A typical voltammogram for H₂ oxidation by *Aa* membrane-bound Hase (MbH) directly adsorbed on a pyrolytic graphite (PG) electrode is given in Figure 4. With no requirement for a redox mediator, a well-defined wave develops that is linked to the catalytic activity of some enzyme molecules in direct connection with the porous structure of the polished graphite. Noncatalytic waves have been reported only in one publication^[84] and was attributed to FeS redox potentials. However, because these redox transitions are most often not detectable, it is assumed that less than 2 pmol cm⁻² of enzyme is electroactive on the unmodified graphite surface.^[90] It is consequently impossible to access the exact turnover of the enzyme by using electrochemistry, but it should be in the range from 100 to 10,000 s⁻¹.^[92]

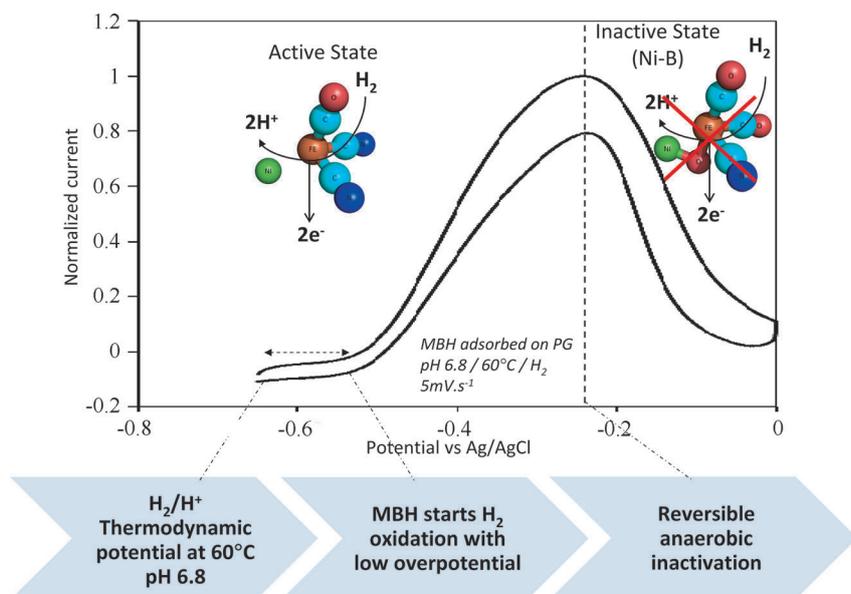


Figure 4. Typical voltametric signal of enzymatic H_2 oxidation by [NiFe]-Hase adsorbed on a graphite electrode. In the experiment *Aa* MbH was used for H_2 oxidation at 60°C , $\text{pH } 6.8$, 5 mV s^{-1} .

When O_2 is added to the electrolyte at a potential at which it cannot undergo direct reduction, the CV current for H_2 oxidation by classical Hases immediately falls to zero. The catalytic current is not recovered until potentials less than -200 mV vs. Ag/AgCl are reached.^[90,93] Even though inhibition by O_2 is thus reversible with [NiFe]-Hases, this inhibition has long been the main bottleneck of their use in biotechnological devices.^[90] O_2 sensitivity requires enzyme purification steps and electrochemical experiments to be handled in an anaerobic chamber, and it was inconceivable to use them in EBFC with O_2 as the oxidant. Further search of the biodiversity pool allowed Hases to be recognized that were able to convert H_2 in the presence of O_2 .^[94] These Hases are present in aerobic and microaerobic bacteria, in Aquificales^[95–98] and Knallgas,^[99] the bacteria which obtain energy for growth from an electron transfer from hydrogen to oxygen. During the last ten years, several O_2 -tolerant Hases have been purified and characterized especially by spectroscopy (electron paramagnetic resonance, electron nuclear double resonance, Mössbauer, FTIR), electrochemistry essentially at graphite electrodes, and more recently by molecular dynamics.^[100] This includes the membrane-bound Hases from *Ralstonia eutropha* (*Re* MbH),^[76] from *Aa*,^[95,101] from *Hydrogenovibrio marinus*^[102] and from the bacteria *Escherichia coli* (*E. coli*)^[103] and *Salmonella*.^[104] The O_2 tolerance means that the enzyme can retain at least 40% of its activity at ambient levels of O_2 (200 mbar). An activity is detectable even at 3% H_2 in air, a condition encountered in membraneless H_2/O_2 EBFCs.^[105]

All the O_2 -tolerant Hases share the same phenotypes in addition to O_2 tolerance: electron transfer from the [NiFe] active site to a membrane-bound diheme cytochrome *b* through a conductive line of three FeS clusters (electrons are then transferred via a quinone pool to a *bc* cytochrome then to a cytochrome oxidase)^[96] (Figure 5A), CO -insensitivity (in contrast to O_2 -sensitive Hases), and higher redox potentials

of the FeS clusters than the clusters in O_2 -sensitive Hases (Table 2).^[77,78,106–112] In addition, because it is purified from a hyperthermophilic bacterium, *Aa* MbH is able to oxidize H_2 over a temperature range from 25 to 85°C .^[106] The O_2 -tolerant Hases are also much worse H_2 producers than O_2 -sensitive Hases.^[106,113] This is accompanied by an overpotential requirement for H_2 oxidation.^[90,114] Studies focused on understanding this catalytic bias both in O_2 -sensitive and O_2 -tolerant Hases have been undertaken.^[115] However, *E. coli* MbH became an efficient H_2 producer at pH values below 4.^[116] This result was suggested to be controlled by the entry point of electrons, namely the distal FeS cluster. The irreversibility of H_2 oxidation reaction by O_2 -tolerant Hases appears as an addition-

of the FeS clusters than the clusters in O_2 -sensitive Hases (Table 2).^[77,78,106–112]

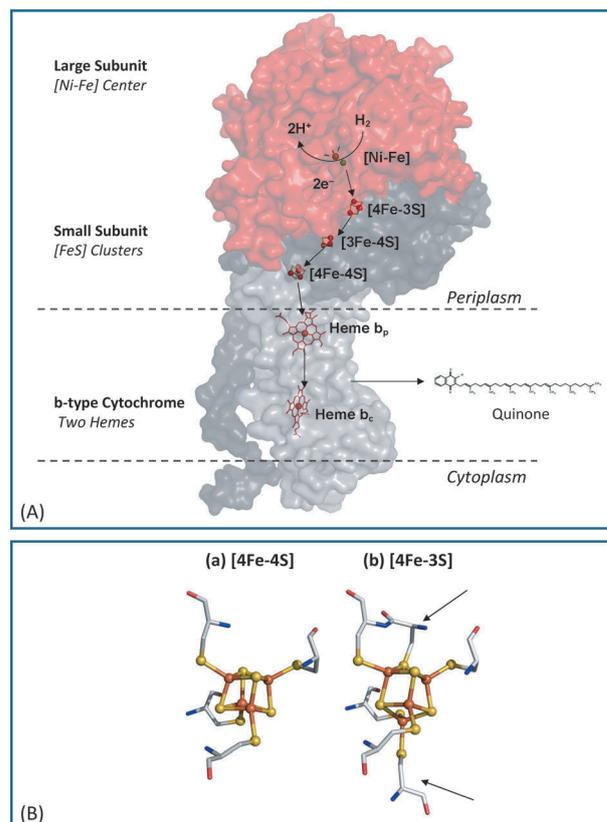


Figure 5. A) Structure of *Aa* MbH showing the active site, the FeS clusters, the trans-membrane helix and the membrane partner cytochrome *b*. B) Comparative structure of the proximal FeS clusters a) in O_2 -sensitive Hases, and b) in O_2 -tolerant Hases (the arrows indicate the two additional cysteines).

Table 2. Redox potentials (mV vs. Ag/AgCl) of [NiFe] transitions and FeS clusters in O₂-tolerant^[77,107–110] and O₂-sensitive Hases.^[78,111,112]

	NiFe states	Proximal FeS	Medial FeS	Distal FeS
O ₂ -sensitive Hases	Fe ^{II} (OH)Ni ^{III} (Ni-B)/Fe ^{II} (OH ⁻)Ni ^{II}	[4Fe-4S] ^{2+/1+}	[3Fe-4S] ^{1+/0}	[4Fe-4S] ^{2+/1+}
	-360	ca. -550	-145 (<i>Df</i>)	-550
	Fe ^{II} Ni ^{II} /Fe ^{II} (H ⁻)Ni ^{III}		-280 (<i>Dg</i>)	
	-580			
	Fe ^{II} (H ⁻)Ni ^{III} /Fe ^{II} (H ⁻)Ni ^{II}			
	-650			
O ₂ -tolerant Hases	Fe ^{II} (OH)Ni ^{III} (Ni-B)/Fe ^{II} Ni ^{II}	[4Fe-3S] ^{4+/3+}	[4Fe-4S] ^{1+/0}	[4Fe-4S] ^{2+/1+}
	-315	-120 (<i>Aa MbH</i>); -270 (<i>Re MbH</i>)	-140 (<i>Aa MbH</i>)	-290 (<i>Aa MbH</i>)
	Fe ^{II} Ni ^{II} /Fe ^{II} (H ⁻)Ni ^{III}	[4Fe-3S] ^{5+/4+}	-185 (<i>Re MbH</i>)	-390 (<i>Re MbH</i>)
	-505	+ 10 (<i>Aa MbH</i>); -50 (<i>Re MbH</i>)	-20 (<i>E. coli Hyd1</i>)	
	Fe ^{II} (H ⁻)Ni ^{III} /Fe ^{II} (H ⁻)Ni ^{II}			
	-510			

al advantage for future work in biotechnological devices such as EBFCs.

The molecular basis for inhibitor tolerance has been the subject of intensive research during the last years. Based on spectroscopic studies, it has been known for some time that Hases entered different inactive states after O₂ attack, namely Ni-B and Ni-A, which differ by their rate of reactivation.^[90] Spectroscopic and electrochemical studies of O₂-tolerant Hases revealed that only the Ni-B state was formed,^[114] in which the redox state is Ni^{III}Fe^{II}, with a hydroxo ligand bridging the two metal atoms.^[117] The formation of Ni-B is responsible for the decrease in the CV current as the potential reaches approximately -250 mV vs. Ag/AgCl (Figure 4). This process is, however, reversible as shown by the increase in current in the reverse scan. E_{switch} , the pH-dependent potential at the maximum of the di/dE slope, was defined as a thermodynamic parameter characteristic of the enzyme.^[90] E_{switch} is around 200 mV higher for the O₂-tolerant Hases than for the O₂-sensitive Hases.^[106] This shows that Ni-B reactivates faster in O₂-tolerant than in O₂-sensitive Hases.^[118,119] Thanks to the resolution of the crystallographic structures of three O₂-tolerant Hases,^[120–122] and to genetic engineering both on O₂-tolerant and O₂-sensitive Hases, a general scheme is nowadays proposed that may account for O₂ tolerance.

The size of the channels for gas access to the active site was widely targeted by genetic engineering. This was based on the observation that two highly conserved residues (valine 74 and leucine 122) at the end of the channel in O₂-sensitive Hases are replaced by more bulky residues (isoleucine and phenylalanine) in regulatory Hases that control Hase gene expression and are resistant to O₂.^[123] Depending on the mutation, mutants of valine 74 were shown to either decrease the rate of O₂ diffusion to the active site,^[124,125] or even to tend to acquire the phenotypes of O₂-sensitive Hases, most probably because of faster electron-transfer rate between the active site and the closest FeS cluster (proximal cluster).^[126,127] Reduction of the channel size is however not sufficient to provide O₂ tolerance. Flexibility and physico-chemistry of the channel chain are also proposed to play a part in global protection.^[128]

The most significant feature in O₂-tolerant Hases relies on the unusual proximal FeS cluster (Figure 5B). It is coordinated by six cysteines instead of four in the O₂-sensitive Hases, yield-

ing a flexible configuration and allowing a supplemental redox state (Table 2).^[120–122,129] This configuration provides an electron-rich environment, which is required for O₂ detoxification. Mutants of MbH in which the two supplemental cysteines were exchanged became O₂ sensitive, although they retained some catalytic activity.^[28,130] These mutants also retain the CO insensitivity. Furthermore, evolutionary studies showed that microorganisms present before the development of the O₂ environment also have the six-cysteine motif,^[131] suggesting that factors other than the unusual proximal cluster might be responsible for O₂ tolerance.

The first and second coordination spheres of the active site are similar in O₂-tolerant and O₂-sensitive Hases.^[76] A difference in the binding force of the hydride to the catalytic intermediate (Ni-C) has, however, been measured that can account for the bias towards H₂ oxidation.^[132] Hase supercomplexes might also provide alternative electron-transfer processes between catalytically active and inactivated enzymes following oxidative damage.^[133] It appears finally that a change of some key residues in the vicinity of the active site may dramatically affect the O₂ tolerance or sensitivity. As an example, a single mutation of valine 74 in histidine allows the activity of an O₂-sensitive Hase to compare with that of MbH.^[127] In contrast, recent results on the O₂-tolerant Hase from *Salmonella enterica* highlights the role of a glutamic residue in close proximity to a histidine residue, the mutation of which induce O₂ sensitivity and decrease the overpotential for H₂ oxidation; that is, some phenotypes characteristic of O₂-sensitive Hases.^[134] This histidine residue, which is conserved in the majority of O₂-sensitive and O₂-tolerant Hases, has also been demonstrated to play a key role in O₂ tolerance in *Re MbH*.^[135]

This is definitely not the end of the story. Nevertheless, based on current knowledge (note that very recent results suggest that O₂ could directly bind the proximal cluster),^[135] thanks to the unusual FeS proximal cluster, it is proposed that when O₂ reaches the active site, it is immediately reduced by four electrons, producing H₂O and only the fast reactivating Ni-B state (Figure 6). Accordingly, hydrophilic cavities have been identified in the crystal structures of MbH that could serve as a water evacuation route from the active site.^[120–121] Hases would thus present supermachinery that can either drive the electrons from the active site to the *cyt b* during H₂

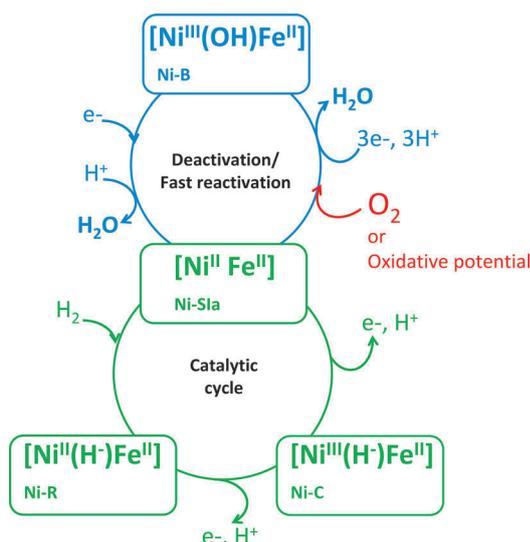


Figure 6. Proposed catalytic cycle for O_2 -tolerant [NiFe] MbH; adapted from Ref. [77].

oxidation or reverse the electron flow as a rescue mechanism to prevent damage by reactive oxygen species.

Can O_2 -tolerant Hases be considered as oxidases? Recently, Armstrong's group answered this question by measuring water, hydrogen peroxide, and superoxide production when *E. coli* MbH was incubated in H_2/O_2 mixtures.^[136] Using mass spectroscopy and oxygen isotopes, the formation of H_2O from O_2 was demonstrated, allowing O_2 -tolerant Hases to be classified as four-electron oxidases. The rate of O_2 reduction is, however, very low (0.28 s^{-1}), and the physiological role would only be as a rescue mechanism.

CO insensitivity of O_2 -tolerant Hases has been less well addressed than O_2 sensitivity. Based on electrochemistry and spectroscopic studies, CO is supposed to reach the active site because its diffusion rate decreased when the size of the gas channel in O_2 -sensitive Hases decreased (when CO is competitive to H_2).^[125,137] Lubitz et al. especially studied CO binding within *Aa* MbH.^[138] The authors showed that CO binds only on the Ni-SIa state (see Figure 6) and that the binding is weak, in contrast to binding of CO in O_2 -sensitive Hase.

3. Electrical Connection

3.1. Orientation Issue: Generalities

Respiratory pathways of microorganisms involve specific interactions between proteins and between proteins and lipids. Soluble or membrane electron carriers transfer electrons from one membrane complex to another by sophisticated but specific interactions. In an accepted scheme, electrostatic interactions serve in the pre-orientation of both partners, then hydrophobic interactions drive an orientational rearrangement allowing electron transfer.^[139] These processes engage highly structured transient or stable complexes.^[97] Dynamic supercomplexes composed of several functional units are even identified that increase the stability of each component and the yield

and kinetic efficiency of catalytic reactions.^[140] The knowledge of both the structural organization in a metabolic chain and of the ways biology controls the efficiency of electron transfers over long distances through proteins is mandatory to explain the global working of the energy chain. On the other hand, electrochemists can take benefit of such structural features to reconstitute at an electrochemical interface part of the electron-transfer chain, so as to optimize the electron-transfer rate. Elegant examples of such a strategy have recently been reported. Part of the respiratory chain of *Shewanella oneidensis* was reconstituted at a membrane-like electrode, enabling a regulation mechanism involving a change in the catalytic bias to be demonstrated.^[141] The electrostatic orientation of photosystem II on a self-assembled-monolayer (SAM) modified indium tin oxide electrode was successfully used to enhance visible-light-driven water oxidation.^[142] *Aa* MbH was reconstituted with cytochrome *b* in proteoliposomes.^[143] The efficient orientation of the enzyme was assessed by microscopy and electrochemistry. The trimeric complex of *Re* [NiFe]-Hase (composed of the two subunits of MbH and the cytochrome *b*) was also immobilized on gold-modified electrodes.^[144] In this case, although the physiological electron pathway was preserved, the major electron transfer by-passed cytochrome *b* most probably because of the detergent surrounding the membrane cytochrome. This will be discussed further below. Finally, elegant work from Jeuken et al. recently demonstrated the immobilization of the same trimeric complex at gold electrodes modified with tethered bilayer lipid membrane.^[145] Not only was a fast reactivation of the enzyme at high potentials after aerobic stress obtained, but also no anaerobic inactivation at high redox potential occurred. These properties may be linked to the oligomeric state of MbH in the lipid membrane. Most of the electrochemical studies concern unique protein orientation however. In the 1980s, bioelectrochemistry proved to be a powerful tool with which to link electronic transfer data to the structure and function of low-weight redox proteins.^[146-150] Huge redox enzymes incorporate redox cofactors during maturation, where conversion of the substrates takes place. Efficient intramolecular electron transfer is ensured by electron relays over distances of less than 14 \AA , allowing electron tunneling from the active site to the surface of the protein.^[151] Electrons are finally transferred to the physiological partner in the energy chain through a transient complex, which is formed by specific electrostatic and/or hydrophobic interactions.^[152-153] This complex insures that distances between the two partners are optimized for a fast electron-transfer rate. Such short distances are also required for direct interfacial electron transfer (DET) (Figure 7). As MCOs and Hases have a diameter of 5 nm or more, their simple adsorption on an electrochemical interface yields a distribution of distances between the electrode and the electronic relay, hence a distribution of the interfacial electron-transfer rates.^[154,155] The mandatory condition to mimic high rate physiological electron-transfer processes is to succeed in imposing a specific orientation of the protein on the electrode that is as similar as possible to that of the physiological orientation. Only 5% of known proteins have been directly addressed by electrochemistry, however.^[156]

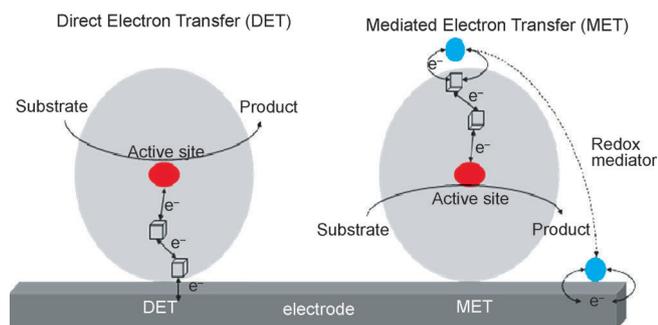


Figure 7. Distance between the electron relay on the protein surface and the electrochemical interface controls the electrochemical process either directly (left) or mediated by a redox mediator (right).

Crystallographic data provide the key parameters that help guide modifications of the electrochemical interface, allowing close approach of the surface electron relay and free access of the channels for the diffusion of substrates.^[157] In MCOs, the T1 Cu center situated 7–8 Å from the surface of the enzyme is targeted for fast interfacial electron-transfer rate.^[64] In LACs the charge of the pocket near T1 Cu center in which the substrate binds depends on the origin of the enzyme,^[158–159] but the binding pocket is essentially hydrophobic.^[160] In contrast to LACs, the binding pocket in BODs is mainly hydrophilic.^[42, 161] Fast DET between Hases and an electrode will only be achieved if the distal FeS cluster is at a tunneling distance from the electrode. In periplasmic O₂-sensitive [NiFe]-Hases, an anionic patch of amino acid residues, mainly glutamate residues, surrounds the FeS distal cluster.^[88, 162] A high dipole moment points towards this cluster.^[163] This polarity allows a physiological electrostatic recognition with the positive tetrahemic cytochrome c₃. In contrast, O₂-tolerant MBHs do not display such a charged patch in the close vicinity of the distal FeS cluster because they are anchored in the cell membrane. The dipole moment is lower than the dipole moment of periplasmic O₂-sensitive Hases.^[163] It was demonstrated that the hydrophobic trans-membrane helix, which serves as an anchor into the cell membrane, and the detergent required for enzyme solubilization play key roles.^[143, 164] Apart from a specific orientation for high electron-transfer rate, the channel for substrate diffusion must not be hindered upon immobilization of the enzyme on the electrode.^[165] This aspect has not been investigated so far for Hases or MCOs. Furthermore, the reconstitution of a physiological chain at an electrochemical interface can be complicated by the competition between favorable orientation of one partner at the interface and favorable orientation for the other partner recognition.^[166] A successful approach may rely on sufficient mobility of the proteins on the interfaces.

3.2. Tools to Study Orientation

DET can be measured by using a classical voltammetry method whereby a catalytic wave will develop at the potential for the enzyme active site. In case the electronic relay on the enzyme surface is positioned too far from the electrode interface, cata-

lytic activity can be measured through a small redox molecule, behaving as a fast and reversible redox system and playing the role of a shuttle between the enzyme and the electrode. This process, named mediated electron transfer (MET) will occur at the potential for the redox mediator (Figure 7). By a suitable choice of redox mediators, it becomes possible to follow by voltammetry the distribution of orientation of the enzyme at the electrode interface.

This is illustrated well by recent studies on the immobilization of *Aa MbH* followed by electrochemistry coupled to AFM, polarization modulated infrared reflection absorption spectroscopy (PMIRRAS) and molecular dynamic simulations (Figure 8). When *Aa MbH* is immobilized at either a polished graphite electrode^[164] or at hydrophilic SAMs on gold electrodes,^[167] a well-defined wave characteristic of enzymatic H₂ oxidation develops. Due to the membrane position of this Hase and the absence of net charge around the distal FeS cluster, a DET process is obtained irrespective of the charge of the electrode (Figure 8A). When a redox mediator is added to the solution (here methylene blue, MB, is chosen because of its more positive redox potential than the enzyme), a new oxidation process appears at the potential for the redox mediator (MET process). This means that two populations of *Aa MbH* coexist at the electrochemical interface: the first with the distal FeS cluster at a tunneling distance from the interface, and a second oriented with the distal FeS cluster far from the interface.^[167] Molecular dynamics simulations have recently confirmed that the large variation of the dipole moment accounts for the distribution of *Aa MbH* on charged interfaces (Figure 8B).^[163] By contrast, when *Aa MbH* is coupled to a hydrophobic SAM, a MET process is favored (Figure 8A). AFM observations highlight a monolayer of enzyme on SAM. PMIRRAS was carried out with *Aa MbH* immobilized either on hydrophobic or hydrophilic SAM surfaces. The ratio of the two amide bands was demonstrated to depend on the hydrophobicity of the surface (Figure 8C). This ratio is linked to the orientation of the protein considered as a main helix vector. It was thus concluded that the different processes for H₂ oxidation, either DET or MET, obtained by using electrochemistry was due to a different orientation of *Aa MbH* depending on the hydrophobicity of the interface. This was rationalized by taking into account the hydrophobic trans-membrane helix, which is surrounded by neutral detergent, and which defines a highly hydrophilic domain, less than 15 Å from the distal FeS cluster. Hydrophobic interfaces thus greatly favor an orientation of the enzyme with the FeS distal cluster far from the electrochemical interface, disfavoring a DET process for H₂ oxidation; whereas on hydrophilic interfaces a distribution of orientation, and thus mixed DET and MET processes, are always obtained (Figure 8D). It is, however, worthy to recall that DET should be preferred to MET in most cases for several reasons: gain in overpotential values, less interference due to enzyme specificity, and difficulty to co-immobilize the redox mediators with the enzyme.

The example of *Aa MbH* illustrates well how the use of combined methods is helpful to study protein immobilization. Other methods are reported such as surface enhanced infrared absorption (SEIRA),^[119, 168] coupled or not to electrochemistry, in

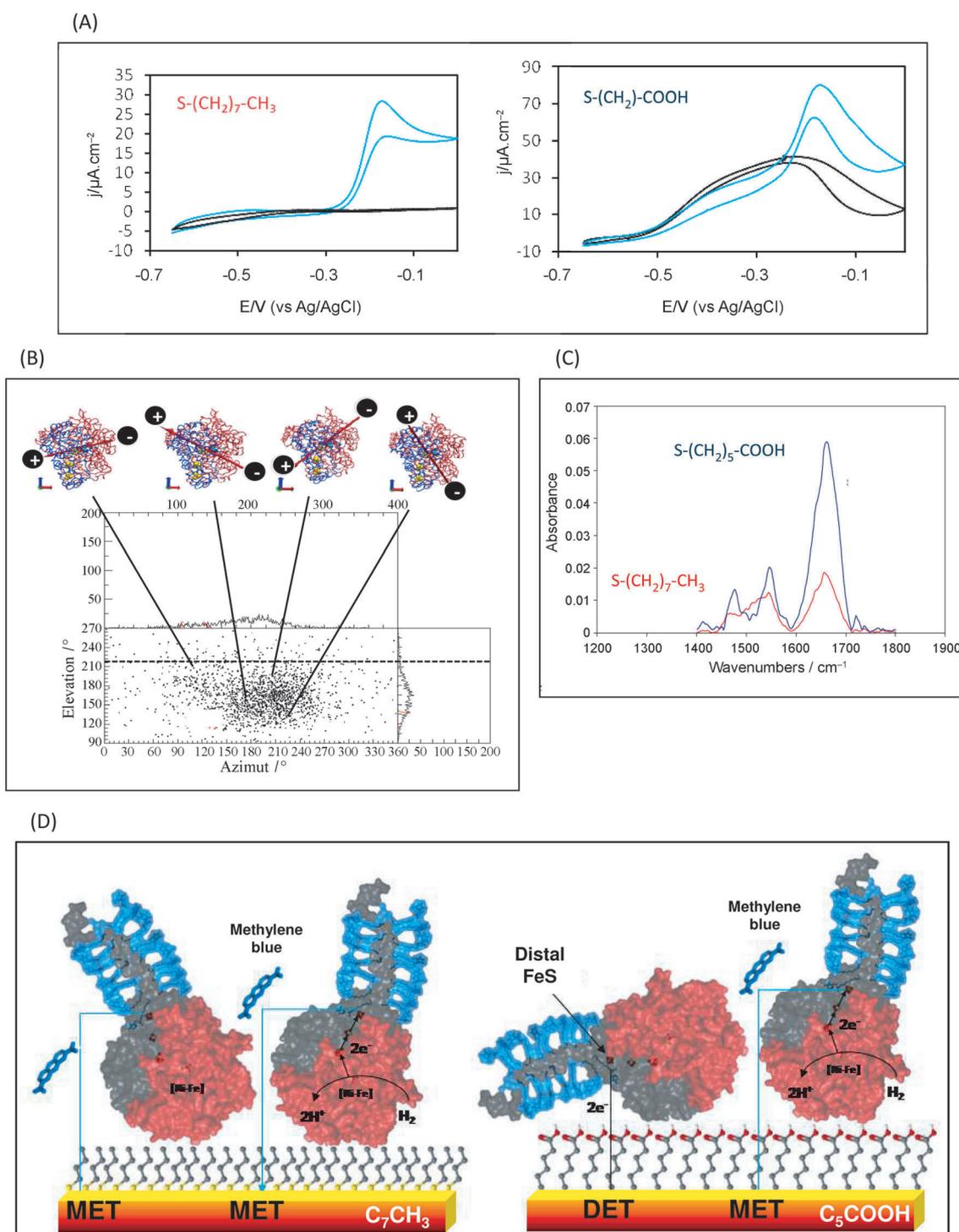


Figure 8. How to study enzyme immobilization at an electrode interface: the case of Aa MbH at SAM electrodes. A) Voltammetry signals for H_2 oxidation by Aa MbH immobilized at hydrophobic (left) or hydrophilic (right) SAM electrodes before (black curves) and after (blue curves) MB addition (H_2 atm, 60°C , pH 6.8, 5 mV s^{-1}), adapted from Ref. [167]. B) Molecular dynamic simulations of the variation of the dipole moment of Aa MbH (adapted from Ref. [163]). C) PMIRRAS spectra in the amide frequency range for Aa MbH immobilized on hydrophilic or hydrophobic SAM surfaces (adapted from Ref. [167]). D) Model of Aa MbH immobilization according to the hydrophobicity of the interface.

situ scanning tunneling microscopy,^[158] and quartz crystal microbalance (QCM) with dissipation (QCM-D).^[37,141,169] All these methods help in the understanding of the behavior of the enzyme upon immobilization and to address key issues such

as enzyme release, enzyme denaturation, enzyme reorientation, structural rearrangement under electric field, and substrate access, with ultimate progress toward single-molecule science.

3.3. Examples of Successful Orientation of MCOs and Hases

To achieve enzyme orientation on solid and conductive supports, hence favoring DET processes, two main ways have been reported recently: 1) genetic engineering on the protein to provide suitable residues,^[170] and 2) modification of the electrode to fit some residues located near the surface electronic relay.

Histidine-tagged LAC was immobilized on nitrilotriacetic (NTA) modified gold^[171] or carbon^[172] electrodes. In the first study, with a short thiol-NTA linker, no DET process could be obtained. MET analysis revealed, however, that immobilized LAC was as active as in homogeneous solution. Similarly no DET process was detected in the latter study, because the His-tag was introduced opposite to the T1 Cu center. Nevertheless, because diazonium salt reduction was the first step for NTA attachment, it can be supposed that even with a His-tag introduced in the vicinity of the T1 Cu, the long distance would preclude DET. A recent study reports the comparison of two LAC mutants bearing His-tags that place the enzyme with the T2/T3 Cu facing the electrode or the T1 Cu and the T2/T3 Cu being at the same distance to the electrode.^[173] H₂O₂ production served as a probe with which to demonstrate the correct orientations of the two mutants (it was previously suggested that orientation with the T2/T3 Cu facing the electrode favored H₂O₂ production).^[45,46] Although mutant construction and immobilization is ingenious, the electrocatalytic mechanism would require further analysis to confirm the control of the orientation. Apart from these studies, most of the works on LAC, BOD, and Hase orientation involve electrode modification to fit the enzyme surface electron relay.

3.3.1. Multicopper Oxidases (MCOs)

Orientation of MCOs through the T1 copper site is crucial to enhance the electron-transfer rate and favor the four-electron reduction of O₂ to water. Carboxylate groups on the surface of the graphite were shown to favor an orientation of BOD allowing fast electron transfer.^[34,174] In contrast, the presence of hydrophobic functions decreased the electron-transfer rate. An efficient modification involved reproducing the lock-and-key process between BOD and its substrate, bilirubin, at the electrode.^[161,175] The same idea led to the design of substrate analogues for *Mv* BOD immobilization in CNT network.^[176] From the DET/MET ratio, it was evaluated that 90% of BOD was oriented with the T1 facing the electrode. However, in that case, the 3D-network composed of CNTs most probably favored a direct electrical connection. The direct connection of BODs to gold-based electrodes is still a matter of debate (note that the same issue concerns LACs^[45–46]). In 2008, it was proposed that bare polycrystalline gold electrodes led to some enzyme denaturation and/or favored orientation of *Trachyderma tsunoda* (*Tt*) BOD through the T2/T3 Cu.^[47] A clearer situation was obtained upon immobilization of *Mv* BOD on gold single-crystal electrodes.^[158,177] CV coupled to QCM and AFM experiments at various SAMs confirmed that hydrophilic interfaces, and especially negative interfaces, were more favorable for T1 inter-

action and electrocatalysis of O₂ reduction. A different orientation on bare gold vs. SAM-modified gold was suggested.

Concerning LACs, a rational strategy of electrode modification with anthracene was carried out to fit the hydrophobic pocket around the T1 Cu.^[178–182] Following the same idea, graphite electrodes, either bare or modified by CNTs, were modified with aryl diazonium salts,^[66] pyrene derivatives,^[57,183–185] or benzoic acid derivatives.^[186] Accurate observations revealed a decrease in the hysteresis of the onset of O₂ reduction^[57] related to the enzyme orientation of *Sreptomyces coelicolor* (*Sc*) LAC, which helps in the efficient bioelectrocatalysis in neutral media and in the presence of chloride. It is worth noting that this LAC is structurally different to the others, being organized as a trimer.^[187] SAM-functionalized gold electrodes and gold nanoparticles (NPs) with anthracene-thiol derivatives,^[188] or phenyl groups ending either with amino or carboxyl functions were also evaluated as platforms for efficient orientation of *Trametes versicolor* (*Tv*), *Tt* and *Trametes hirsute* (*Th*) LACs.^[189–191] PMIRRAS, QCM, and electrochemistry were coupled and allowed a specific orientation linked to a different activity of the enzyme depending on the functionality borne by the SAM to be demonstrated.^[189] The authors also demonstrated a clear correlation between the orientation of LAC with a β -sheet tilted with respect to the electrode surface and the electrocatalytic activity.^[192] This orientation also corresponds to the T1 being close to the electrode. ATR-SEIRAS and in situ STM were performed with *Th* LAC immobilized on gold modified by diazotization.^[168] The importance of the microenvironment of the T1 was evidenced by analysis of both the amide signatures and the electrocatalytic activity. Electrochemistry and QCM-D allowed the maximum catalytic current for O₂ reduction at single Au NPs to be calculated.^[169]

Attempts to construct direct and efficient connections of MCOs at electrodes allow new knowledge to be gained on the long-term behavior of immobilized enzymes. Singh et al. investigated the activity loss of *Mv* BOD on QCM-D polished gold resonator modified by a SAM.^[37] It was demonstrated that the covalent attachment of the enzyme did not stabilize the catalytic activity, but decreased the efficiency of the electron-transfer rate. It was also underlined that activity loss did not correlate with enzyme leaching, but with some structural rearrangements. STM performed in situ at SAM electrodes modified with *Coprinus cinereus* LAC also revealed that the decrease in catalytic current with time was not due to protein loss but to reorientation and/or denaturation of the enzyme.^[158] Very interestingly, a potential induced structural change of LAC was observed only under conditions of turn-over, which can be linked to the intermediate states in the catalytic cycle.

3.3.2. Hydrogenases

Although catalytic mechanisms involving Hase have been studied in depth, much less work has been reported on their immobilization on electrochemical interfaces. In contrast to membrane-bound O₂-tolerant Hases, O₂-sensitive [NiFe]-Hases are quite easily oriented at an electrochemical interface because of

the presence of the acidic patch around the distal FeS cluster and the presence of a unique large dipole moment pointing toward this FeS cluster.^[88,162–163,193,194] Actually, it was demonstrated long ago that the modification of the graphite electrode by positively charged polymer (poly-L-lysine or polymyxin) helps to obtain a high and stable electrocatalytic signal.^[195–197] In this way, the interface electrostatically mimics the positively charged physiologic partner; that is, the polyheme cytochrome c_3 . More recently, SAM gold electrodes were used to better understand the interaction between various O_2 -sensitive [NiFe]-Hases and the electrochemical interfaces. It was demonstrated that H_2 oxidation switches from a direct to a mediated process according to the charge of the SAM.^[162,193,194,198] Intriguingly, even with a monolayer of properly oriented Hase, no noncatalytic signals could be observed, precluding a calculation of catalytic turnover (only in the case of a [FeFe]-Hase did the coupling between electrochemistry on SAM electrodes and electrochemical scanning tunneling microscopy allow a turnover frequency of $21,000\text{ s}^{-1}$ for hydrogen production to be calculated).^[199] No explanation can as yet be given for such a result. It can be, however, be hypothesized that many molecules on the surface are not electrochemically active. Thanks to a direct connection, the coupling of SEIRA with CV brought complementary data concerning the integrity of Hase upon immobilization. It was demonstrated that the active site of the periplasmic *Desulfovrio vulgaris Miyazaki F* [NiFe]-Hase was structurally intact and functional on the positively charged electrode.^[200] The CV inactivation/reactivation processes were unquestionably assigned to the Ni-SI/Ni-B transition.^[201] It was also demonstrated that the decrease of the catalytic current with time was not due to protein release, as largely assumed,^[90] but to a slow degradation of the O_2 -sensitive enzyme on the electrode because of traces of oxygen.^[119] The recent combination of SEIRA and electrochemistry with molecular dynamics opens new avenues for the rational design of biocompatible interfaces that preserve Hase integrity and functionality.^[163,202] A strong interaction between the orientation of the enzyme and the level of ionization of the SAM gold electrode was found, which influences the enzyme reorientation and conformation.

Apart from the study we described above related to *Aa MbH* orientation, only a few works have attempted to control the immobilization of O_2 -tolerant MbHs. In this case, the difficulty arises from the detergent that is always present in the protein solution and on patches of the protein surface. It is really challenging to control the amount of detergent attached to the protein, whereas it is easily understandable that it can strongly influence the enzyme orientation. Furthermore, the hydrophobic transmembrane helix, which also serves as an anchor of the protein in the cell membrane, is present on the purified Hase. Its removal may result in a destabilization of the enzyme. Considering that the transmembrane helix is situated less than 15 \AA from the distal FeS cluster, it can modulate the enzyme orientation, depending on the position it adopts after protein solubilization. This helix was recently modeled by molecular dynamics simulation.^[163] It was shown that it did not change the overall dipole moment direction of *Aa MbH*, pre-

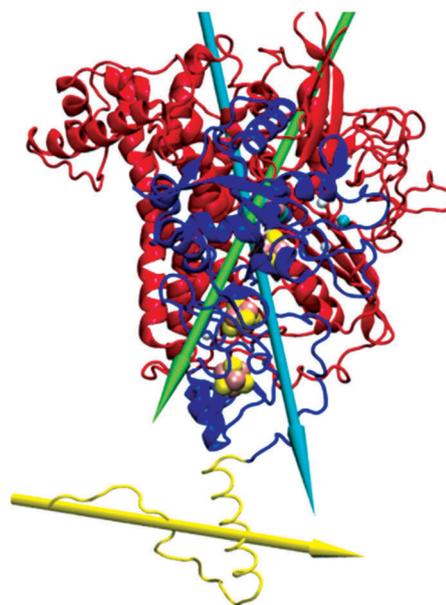


Figure 9. The hydrophobic trans-membrane helix of O_2 -tolerant *Aa MbH* is situated close to the distal FeS cluster, but does not preclude interaction between the FeS distal cluster and the electrode (adapted from Ref. [163]).

venting steric hindrance between the distal FeS cluster and the electrochemical interface (Figure 9). De Lacey et al. proposed the controlled immobilization of a membrane-bound [NiFeSe]-Hase based on a phospholipid bilayer arranged either on top of the electrode or on top of Hase disposed on a SAM gold electrode.^[203] The latter configuration was shown to help in a stable DET process for H_2 oxidation thanks to the insertion of the enzyme lipid tail in the lipid bilayer, which orients the enzyme with the distal FeS facing the electrode. The same configuration was further studied by coupling SEIRA and electrochemistry. It was shown that a different orientation of the enzyme was adopted when the phospholipidic bilayer was under or above the enzyme layer.^[204] No redox mediators were added in solution, however, which could have confirmed a perfectly oriented Hase layer.

4. Efficient Bioelectrode Nanostructuration

4.1. Why Search for Nanostructuration?

It is clear from the information summarized in this Review that controlling the orientation of enzymes on electrodes will help to enhance the interfacial electron-transfer rate. However, some crucial data are still lacking concerning the amount of electroactive enzyme and regarding the evolution of the enzyme layer with time and/or under electric field.^[205] In view of the development of EBFCs, the current densities will be limited by the turn-over of the enzymes arranged in a monolayer. It is difficult to access the upper limit of the current density because the turnover of the enzyme in the immobilized state is still unknown. Given a monolayer of *Aa MbH* and a reasonable turnover frequency of $1,000\text{ s}^{-1}$, a current density of

1.2 mAcm⁻² would be reached. However, even with a ten-fold higher turnover, it thus appears necessary to enhance the amount of electrically connected enzymes to reach power densities suitable for applications. One way is to develop 3D nanostructured networks that are able to increase the surface area of the electrode while maintaining the geometric dimensions. In addition to increasing the number of anchoring sites for high enzyme loading, strict orientation of the enzyme would no longer be a prerequisite because the 3D material would act as a connecting network. A direct demonstration is given by H₂ oxidation by Hases on emery polished graphite electrode, which favors DET simply because of the porous structure generated by the polishing procedure despite unfavorable electrostatic interactions.^[90,164] The nanometer size of the materials, which compares with the enzyme size, may help in the connection of the electronic relay and/or the active site of the enzymes.^[206,207] Enhancement of the stability may also be a direct consequence of enzyme entrapment in a friendly and confined environment. Finally, conductivity of the electrochemical interface can be increased by the nanomaterial. We published this year a review summarizing the results realized in this domain until 2012.^[208] Here, we will thus report only the main recent ideas that have guided the efficient immobilization of MCOs and Hases in 3D networks. Again, we will restrict the discussion to materials that are able to induce DET for enzymatic reactions.

4.2. Which Nanomaterials?

Generally speaking, materials that are suitable for efficient enzyme loading must present a high porosity or a high surface/volume ratio, and a high electric conductivity. They must also present many surface reactive sites, or must be able to undergo chemical treatment to generate anchoring sites (Figure 10).

4.2.1. Redox Polymers

Redox polymers are not widely used for direct connection of MCOs and Hases. Electropolymerized poly(aniline)/poly(vinyl-sulfonate) films were used for LAC immobilization.^[172] It was shown that the DET current for O₂ reduction increased with the thickness of the conductive film, suggesting a distribution of the enzyme in the volume. The evaluation of MET process indicated a distribution of orientation inside the polymer.

4.2.2. Metal NPs

Metal NPs, mainly Au NPs or Ag NPs, were successfully applied for BOD and LAC deposition. Much work has been done in the last years to unravel the mechanism of enzyme immobilization on NPs. The size of the NPs can be tuned during the synthesis, being in the range of a few nanometers to hundreds of nanometers.^[209,210] Contrary to many former studies, a recent work has shown, however, that the efficiency of the catalytic reduction of O₂ by BOD does not depend on the diameter of the NPs,^[211] highlighting that the mechanism regarding such mate-

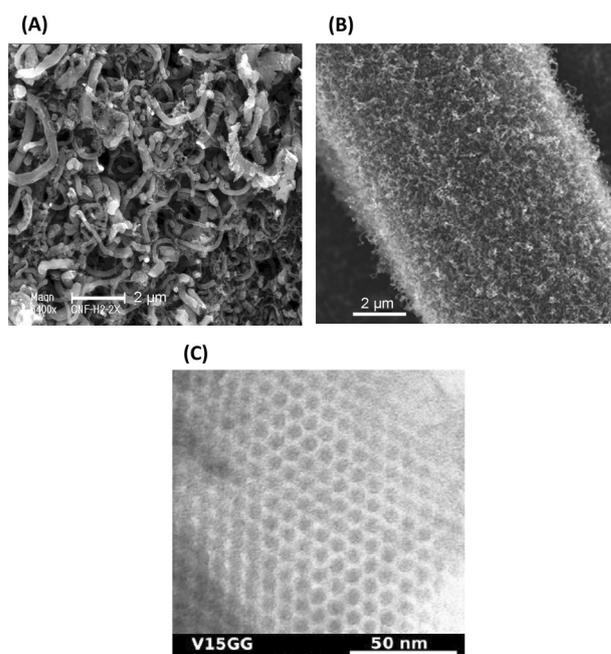


Figure 10. Nanostructuring of electrodes allows higher enzyme loading and stability, as well as higher fuel delivery. A) CNF deposit on a graphite electrode (from Ref. [237] with permission from the Royal Society of Chemistry). B) CNTs deposit on CFs (from Ref. [209] with permission from Elsevier). C) Carbon material prepared from SBA-15 silica template (from Ref. [246] with permission from Elsevier).

rials needs to be examined in depth. It is most probably strongly dependent on the method by which the NPs are deposited. Generally, the direct catalytic current is increased due to a concomitant effect of an increase in the surface area and a potential electron hopping between the NP and the electrical relay on the enzyme surface.^[210,212,213] As an example, a 30-fold increase of the surface area was shown by successive layers of Au NPs.^[174] More sophisticated architectures can be designed by covalent attachment of Au NPs on graphite, before enzyme covalent attachment. In the case of LAC,^[190] DET for O₂ reduction was observed and the heterogeneous electron-transfer rate was calculated to be higher than 400 s⁻¹. Recently, electrochemistry was coupled to QCM-D to characterize LAC immobilization on Au NPs.^[169] It was calculated that 44 LAC molecules adsorbed at a 22 nm Au NP. A turnover of 13 s⁻¹ was calculated, which is lower than the homogeneous value, suggesting modification of the enzyme upon immobilization. In contrast, Hase has never been immobilized on metal NPs. Otherwise, LAC was immobilized at nanoporous gold electrodes. DET was obtained due to LAC adsorbed at the surface of the nanopores.^[35]

4.2.3. Carbon Nanomaterials

Carbon materials and especially CNTs are interesting platforms for enzymatic O₂ reduction and H₂ oxidation.^[214-217] Different carbon allotropes can be used for their specific properties such as porosity, high surface area, high conductivity, and possibility to be functionalized, so that the interaction with enzymes can

be modulated. Carbon black materials have been successfully used for BOD immobilization.^[62,218,219] Carbon NPs were assembled by a layer-by-layer approach and used for *Aa* MbH encapsulation.^[220] Graphite particles were also decorated by *E. coli* Hase. A 30 times enhancement of the current density for H₂ oxidation was obtained while maintaining suitable conductivity and mass transport.^[221]

CNTs have unique properties of electrical conductivity and have a size that is suitable for enzyme interactions, preventing their leaching and offering multipoint linkage.^[222,223] They also develop large surface areas. Multi-walled (MWCNTs) or single-walled CNTs (SWCNTs) can be used, although they display very different properties, with the former being considered as a flat material from the enzyme point of view. They can be easily functionalized through chemical oxidation, which generates many defects on the wall surface as well as carboxylic functions. This treatment, however, decreases the conductivity of the material and can even modify the structure of the CNT.^[224] They can otherwise be functionalized by diazonium salt reduction process,^[225] or π -stacking of pyrene derivatives.^[181] Many groups have reported LAC and BOD immobilization on CNT-based electrodes.^[180,181,183,226–228] Notably, Lalaoui et al. electropolymerized pyrroles bearing a pyrene function on MWCNTs for LAC immobilization.^[229] The electrode showed a high stability, retaining 50% activity after one month. Hases from various origins were also attached to CNTs.^[194,197,198,230,231] Large increase in the catalytic current was observed, in addition to a better stability of the biocomposite, due to the covalent attachment of the enzyme on the CNT surface. Surfactants can be added to the CNT solution to achieve better dispersion, hence an increase in the available surface for enzyme loading.^[232] Attention must, however, be given to the influence of the surfactant on the electrical conductivity of the network and on the interaction between the enzyme and CNTs. The efficiency may result from a balance between the respective affinity of the enzyme or the surfactant for the surface.^[167] As an example, [FeFe]-Hase was shown to displace sodium cholate from the CNT surface.^[233]

Carbon fibers (CFs) provide a high pore volume from the inter-fiber space as well as a large developed surface on the fibers.^[234] They can be further stabilized by silica sol-gel coating.^[235] Electrospun CFs were used by Che et al. for LAC entrapment.^[236] Although some DET was observed, the direct connection of the enzyme was not optimized in the network because redox mediator addition greatly increased the current density for O₂ reduction. Carbon nanofibers (CNFs) can also be synthesized, presenting various structures. Some CNFs exhibit a nanostructure based on graphene layer stacking. They present lots of reactive edge sites, high surface area, and hierarchical pore volumes, and can be chemically functionalized. De Poulpiquet et al. used CNFs synthesized by CVD to entrap *Aa* MbH and *Mv* and *Bp* BODs.^[42,237] Very high current densities were reached in the range of a few mAcm⁻² in the absence of any covalent attachment.

Graphene is a novel 2D layered material that presents excellent electronic, mechanical, and thermal stability, as well as large specific area.^[185,238] Graphene oxide can be derived from

graphene by strong oxidation, yielding hydroxyl, carboxyl, and epoxy groups on the surface. Reduced graphene oxide resembles graphene but with an enhanced conductivity. Graphene thus appears to be a quite versatile material that may interact with enzymes through electrostatic, hydrophobic, or π - π interactions. Coupled to CNTs, graphene was used for enzymatic O₂ reduction.^[239–241] It is, however, not clear what the true role of graphene over CNTs on the electroenzymatic activity is. Deeper examination of graphene interaction with enzymes is necessary to determine its true advantages over other carbon materials for enzyme immobilization.^[242]

Research on enzyme entrapment in 3D metal NPs and carbon networks for current enhancement have consequences on more fundamental issues. Carbon NPs are promising for the understanding of both catalytic mechanisms and immobilization processes of enzymes on electrode support. QCM analysis can be performed on a carbon-modified quartz resonator, and spectroelectrochemistry can take benefit from the 3D network of Au and carbon NPs. As a recent illustration, the [NiFe] regulatory *Re* Hase was entrapped in a carbon particle film deposited on a Si attenuated total reflectance prism.^[243] The redox transitions between different states of the enzyme were determined with no need for redox mediators.

4.3. A Challenging Issue: Overcoming Mass-Transport Limitation

One very important point when building architectures for electroenzymatic reaction is to ensure suitable mass transport inside the network. A direct consequence of the increase in enzyme loading is a rapid mass transport limitation, such as fuel depletion either dissolved or in the gas phase, especially when using very efficient enzymes such as Hases. In addition, the low solubility of H₂ and O₂ in aqueous solutions, respectively 0.74 and 0.40 mM at 40 °C, might be critical, especially for MCOs that present low affinity for O₂ (K_m is more than 100 μ M for most of the MCOs (see Table 1 and Section 7.3) compared with less than 10 μ M for Hases). A rotated electrode or a stirred electrolyte can diminish the effect, but these approaches are not suitable for application in EBFCs. To solve mass transport limitation, the design of hierarchically structured materials is desired: macroscale porosity for fuel delivery, to comply with the high enzymatic efficiency, mesoscale architecture for the suitable anchorage of enzymes and for connectivity throughout the architecture, and nanoporosity to ensure a large surface area, thus high enzyme loading. Finally, enclosing of the enzymes in the pores may protect the biomolecule against aggregation. Further functionalization of the pore surface can offer specific anchorage sites for stable adsorption or covalent immobilization.

Multiscale porosity can be obtained directly through a suitable synthesis of the material (Figure 10C).^[244–246] Mano et al. designed carbonaceous foam electrodes displaying a hierarchical porosity for direct O₂ reduction by *Tt* BOD.^[247,248] The increase in mesoporosity and macroporosity allowed for high enzyme loading and less fuel delivery limitation. It was, however, demonstrated that the Levich diffusion limited current was never

reached. Hierarchical porosity can also be reached by depositing conductive NP in a porous template,^[249] or by introducing nanometer polystyrene beads inside a carbon network. Barton et al. reported an elegant work based on this idea.^[250] The macropores were found to increase by twofold the electroactive surface area, simultaneously enhancing the electroenzymatic activity. Recently, Cosnier et al. followed the same route to induce porosity in a polymer film.^[251] Many other works report the mixture of different materials to modulate the porosity for electroenzymatic reactions, increasing at the same time the conductivity of the material: Ag NP and CNTs,^[252] reticulated vitreous carbon mixed with CNTs,^[253] and CFs dipped in CNT dispersions.^[209,254,255] Catalytic currents were increased by the addition of CNTs, but, surprisingly, some discrepancy on DET or MET processes exist between the works. Fine physicochemical characterization of the network is still needed, which requires interdisciplinary collaboration between biochemists, bioelectrochemists, and material chemists to improve our understanding of the parameters that determine efficient catalysis at 3D electrodes.

5. Sustainable H₂ Production

H₂/O₂ EBFCs cannot be considered as green devices if the fuel itself is not produced in a sustainable way. Although hydrogen is regarded as a sustainable energy carrier, its production still relies on gas reforming, thus generating many greenhouse gasses.^[256] Biohydrogen, a generic name that includes all the ways of hydrogen production from biomass, may be a clean and carbon neutral alternative. Many microorganisms produce hydrogen for their own metabolism, including microalgae and bacteria. Considering that these microorganisms are present in industrial and household wastes, the production of biohydrogen enters a productive waste recycle chain. Hydrogen can be produced by biophotolysis of water, by photofermentation of organic substrates, or by dark fermentation from organic substances.^[257] Despite these multiple routes to ecologically friendly hydrogen production, biohydrogen has not yet developed into an economically viable technology. Some bottlenecks need to be overcome, which require an interdisciplinary collaboration between microbiology, physicochemistry, and engineering.

5.1. Microbial Processes for Biohydrogen Production

Production of hydrogen from photolysis and fermentation is dependent on the presence of H₂-producing enzymes, either Hase or nitrogenase, although the availability of the enzymes does not appear to be the limiting factor (Figure 11).^[258]

Photobiolysis is achieved by organisms such as microalgae and cyanobacteria. One of the well-known representatives is the green algal *Chlamydomonas reinhardtii*. This procedure is the most renewable source of H₂ because it relies on two inexhaustible resources; that is, sunlight and electrons from water,^[1] according to $2\text{H}_2\text{O} + h\nu \rightarrow 2\text{H}_2 + \text{O}_2$. The biological conversion of light energy into H₂ by photosynthetic microorganisms is potentially very efficient in terms of energy capture and

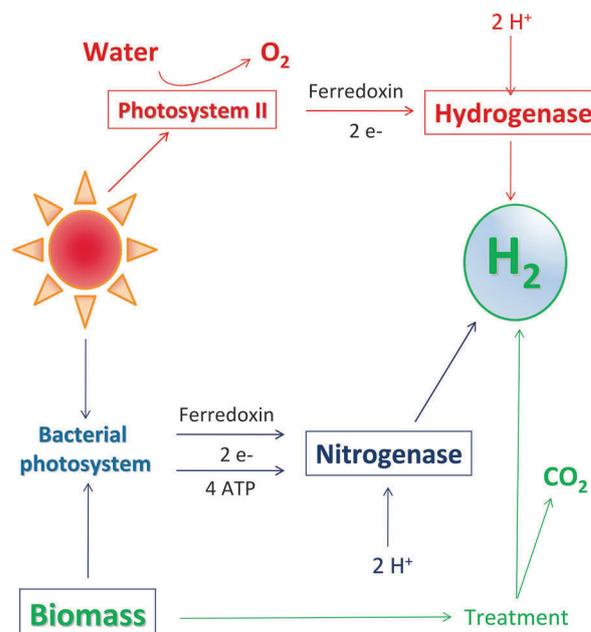


Figure 11. Different modes of bioproduction of H₂. Red arrows: photobiolysis, blue arrows: photofermentation, green arrows: dark fermentation.

CO₂ remediation: 10% of the incident light energy can theoretically be converted into H₂. Such yield represents 145 TOE (ton of oil equivalent) over a year. However, the photosynthetic production of H₂ is only a transient phenomenon under natural conditions because Hases are inhibited by O₂ produced during water photolysis.^[259,260] Some interesting research has led to a proposed H₂ photoproduction under sulfur deprivation regime.^[261] But H₂ production rates are low because very low light intensities are used to avoid O₂ inhibition. This area of research can surely benefit from the current knowledge on the molecular basis of O₂ tolerance by Hases. Otherwise, indirect photobiolysis allows this issue to be overcome because hydrogen production and photosynthesis occur at different periods or in different regions.^[262] Note that promising work has been undertaken on artificial photosynthesis. In this method, Hase is immobilized on semiconductor materials, which insure efficient charge transfer for photocatalytic production of H₂.^[263,264]

Photofermentation produces hydrogen because anaerobic organisms such as the purple bacterium *Rhodobacter capsulatus* use light and nitrogenase for organic substrate transformation.^[265] Yields are limited by inhibition of substrate conversion by intense light (Table 3).^[258]

Anaerobic digestion (or dark hydrogen fermentation) is an attractive pathway to produce H₂. The advantage is that H₂ production rate can be an order of magnitude higher than those achieved by other means. CO₂ is generated during the

Table 3. H₂ bioproduction rates in mmol H₂/L h⁻¹ according to the bioprocesses.^[257]

Biophotolysis	Photofermentation	Dark fermentation
2.5–13	12–83	10–15 10 ³

process, but because this material enters the cycle of biomass formation, the process is considered to be carbon neutral.^[266] Fermentation is realized by strict or facultative anaerobes such as *Clostridium* or *Enterobacter*. Dark fermentation processes are relatively simple to construct, their functioning does not consume much energy, and fermenting bacteria can utilize complex forms of organic substrate; that is, cellulose, food waste, and urban and industrial wastes. Two main routes are engaged, which lead to concomitant acetate or butyrate production $C_6H_{12}O_6 + 2H_2O \rightarrow 4H_2 + 2CH_3COOH + 2CO_2$; $C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2H_2 + CH_3CH_2CH_2COOH + 2CO_2$.^[2,267] The yield of H_2 is thus decreased, as a consequence of fermentation that has been optimized by evolution to produce energy and biomass but not H_2 .^[257] The most favorable route through acetate, which can produce four moles H_2 per mole glucose, is not realistic for biotechnological applications because it would require slow rates and/or low partial H_2 pressures.

5.2. Challenges Involved in Increasing Biohydrogen Production by Dark Fermentation

From the data presented in Table 3, it is clear that dark fermentation is by far the most efficient process for H_2 production. It is also the least expensive mode because industrial devices already exist to treat biomass or wastes. Therefore, this technology might be the way by which bio H_2 could be produced in the near-future.^[257] The H_2 yield must, however, be increased. The first step transforms the substrate into pyruvate, which is further transformed into H_2 by following different routes depending on the microorganism. In nature, these processes involve bacterial consortia, with each species interacting with the others. In these systems, hydrogen is an energy carrier, which allows electron transfer between the species. In a consortium, hydrogen produced by some species can be used by anaerobic autotrophs to harness energy by reducing CO_2 .^[268] The consequence is that several metabolic routes can yield production of hydrogen, while several other routes can be competitive.^[269] These latter routes involve methanogens or sulfate reducing bacteria. The complexity of the metabolisms inside a bacterial consortium requires knowledge of parameters such as pH,^[270] temperature,^[271] salt concentration,^[272] and microbe population that favor H_2 synthesis.^[273]

To enhance the yield of H_2 production, metabolic engineering has been performed with the objective of inactivating the competitive routes.^[274–276] There is most probably a great potential in bacterial engineering to control the metabolic flux in pure cultures. However, one of the ways to enhance production yield is to understand the communication mechanisms between bacteria in a consortium, by studying mixed cultures. The consequences of syntrophic associations of bacterial metabolism, although rich in information, have been so far largely unexplored. Nevertheless, in a natural environment, substrate deficiency, the presence of toxic compounds, and the spatial structure of microorganisms generate metabolic communication between bacteria that research on a single culture cannot examine. This is particularly visible in the case of biomass degradation, in which different communities live together and in-

teract.^[277–279] Recently, H_2 production by mixed cultures from complex organic sources, for example, residues from biomass treatment, has been described.^[280] Even though biohydrogen productivities and conversion yields can be interesting for industrial purposes, several scientific and technical constraints remain to be addressed. In particular, the presence of alternative metabolic ways of hydrogen consumption generally results in chronic instability of the biological processes. To increase the stability and the efficiency of dark fermentative processes, it is now necessary to acquire a better understanding of the metabolic interaction networks existing between producing and consuming microorganisms.^[281]

Microbial electrolysis is an emerging method based on electroactive microorganisms which form a biofilm on electrodes.^[282,283] Efficient members for microbial electrolysis are *Shewanella* or *Geobacter*. Microbial electrolysis allows high theoretical conversion yield of organic substrate.^[284] At the anode, organic acids such as acetate can be oxidized into CO_2 by bacteria forming an electroactive biofilm according to $CH_3COOH + 2H_2O \rightarrow 8H^+ + 2CO_2 + 8e^-$. Protons that are released are reduced at the cathode, theoretically yielding to four moles H_2 per mole acetate. One of the advantages of microbial electrolysis is the low voltage at which it operates compared with water electrolysis. Coupling fermentation to microbial electrolysis is thus a very promising process because it could yield the total conversion of sugar into hydrogen.^[285] However, high H_2 production rate and low applied voltage still requires improvement in structuration of electrodes.^[286] Efficient microbial immobilization thus meets the general issue of enzyme immobilization in 3D nanostructured networks.

6. H_2/O_2 Biofuel Cells: A Short but Attractive Story

The idea that Hases could one day replace platinum catalysts in fuel cells emerged during the 1970s, especially in Bogdanovskaya's group.^[287] This was supported ten years ago by the comparison between the catalytic efficiency of Hase against that of platinum for H_2 oxidation, which demonstrated that the enzyme, once immobilized on carbon material as an electrode, was as efficient as platinum.^[92,288] Activation was slower in the case of Hase because of a distribution of orientation on the electrode. It was also shown that Hase was a much better catalyst than Pt in subatmospheric levels of H_2 .^[289] MCOs, and BOD in particular, were shown by Mano et al. to be more efficient than Pt in physiological environments.^[290]

The first biofuel cell based on H_2 oxidation and O_2 reduction was reported late in 2001.^[291] The enzyme for O_2 reduction was a BOD from *Mv*. H_2 oxidation was not realized by enzymes themselves but by whole cells of the sulfate reducing bacterium *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough (*DvH*), which is known to contain several Hases from different classes.^[292–293] In the presence of suitable redox mediators (methyl viologen, MeV, for Hase and ABTS for BOD), the cell was demonstrated to deliver a current of 0.9 mA at 1.0 V. 30 years of mechanistic studies to understand the enzymatic reactions driven by Hase on an electrode, then the identification of O_2 -tolerant Hases,^[90]

were necessary to design the first H₂/O₂ EBFC based on enzymes both at the anode and the cathode. The device was first reported in 2002 by Tarasevich et al., and delivered a power density of more than 300 μW/cm², but no details on the source of enzymes, nor on the device were given.^[294] In 2004, a patent was deposited by Karyakin et al. dedicated to H₂/O₂ EBFCs in the presence of a Nafion membrane using Hases from different strains and LACs, both immobilized on carbon materials.^[295] However, surprisingly, it was proposed to use Hases as different as those from *Desulfovibrio* or from *Thiocapsa* with no regard for O₂ tolerance. Armstrong's group published in 2006 the performances of the first H₂/O₂ EBFC based on O₂-tolerant Hases. The combination of membrane-bound Hases from *Ralstonia* and LAC from *Tv*, led to an EBFC delivering a power density of 5 μW/cm².^[296] A wrist watch was powered by combining three cells in series.^[105] Neither enhancement of the current densities nor the stability of the device was investigated at that time, so the enzymes were simply adsorbed on a graphite electrode. Nevertheless, it was the beginning of this still short but increasingly attractive story, which is summarized in Table 4. All the biofuel cells reported after this first biodevice have been based on O₂-tolerant Hases for H₂ oxidation, either from *E. coli* or from *A. aeolicus*, and a BOD for O₂ reduction. Clearly, the CO-tolerance property that these enzymes share is another strong advantage that justifies their use in H₂/O₂ EBFCs.

6.1. Increasing Performance

To enhance the power density, both the current density at each electrode and the cell voltage has to be optimized. The cell voltage is defined by the catalysts and the experimental conditions (pH, temperature, substrate concentration etc.). A typical example is the biofuel cell developed in 2002 by Tarasevich et al. in which the anodic and cathodic pH buffers were significantly different so that an OCV of 1.35 V (i.e. a higher value than the thermodynamic one) was reached.^[294] Otherwise, at a given overpotential, the current density will rely on the electron-transfer rate, hence the orientation of the enzyme at the electrode interface, and on 3D-networks to increase the enzyme loading (see Sections 3 and 4).

Based on 3D nanostructured electrodes, two H₂/O₂ biofuel cells delivering power densities of more than 100 μW/cm² were reported in 2012. In Armstrong's group, both Hase and BOD were immobilized through covalent grafting on CNT-based networks. Hase Hyd1 from *E. coli* was grafted through carbo-diimide linkage at pyrene entities functionalized by carboxylic functions.^[231] The π-π stacking interaction was used to decorate the MWCNTs by the pyrene entities. A power density of 119 ± 11 μW/cm² was reached, whereas only 12 ± 4 μW/cm² was obtained by using the same device but with the enzymes simply adsorbed on a graphite electrode. In our laboratory, a more straightforward nanostructuring of the electrodes was handled by modification of graphite electrodes by SWCNTs treated by chemical oxidation. Short SWCNTs (ca. 50 nm long) bearing

Table 4. H₂/O₂ biofuel cells: a short but emerging story.

Date	Anode catalyst	Cathode catalyst	Electrode material	Conditions	Substrate	Membrane	Power density [mW/cm ²]	OCV [V]	Stability	Ref.
2001	DvH cells (MeV)	Mv BOD (ABTS)	carbon felt	pH 7 50 mM phosphate RT	100% H ₂ , 100% O ₂	yes	0.4	1.17	2 h	[291]
2002	Hase	LAC	carbon black	pH 8 (anode) pH 4.2 (cathode)	n.d. ^[a]	yes	0.32	1.35	n.d.	[294]
2006	Rm CH34 MbH ^[a]	Tv LAC	graphite	pH 5 100 mM citrate	3% H ₂ in air	no	0.005	0.950	n.d.	[296]
2010	<i>E. coli</i> Hyd1	Mv BOD	graphite (anode) graphite with 6-amino-2-naphtoic acid (cathode)	pH 5 100 mM phosphate RT	A) 100% H ₂ , 100% O ₂ B) 96% H ₂ , 4% O ₂ C) 4% H ₂ in air	A) yes B) no C) no	A) 0.063 B) 0.013 C) 0.010	A) 0.99 B) 0.95 C) 0.93	n.d.	[303]
2012	<i>E. coli</i> Hyd1	Mv BOD	MWCNTs modified with butyric acid pyrene	pH 5 100 mM phosphate RT	H ₂ /air (80:20 mixture)	no	0.119		n.d.	[231]
2012	Aa MbH	Mv BOD	SWCNTs-COOH	pH 6.8 50 mM Hepes, 60 °C (anode), 25 °C (cathode)	100% H ₂ , 100% O ₂	yes	0.300	1.1	60% after 24 h at 0.65 V	[297]
2013	<i>E. coli</i> Hyd1	Mv BOD	mesoporous carbon	pH 6 100 mM phosphate 25 °C	78% H ₂ , 22% air	no	1.67	1.068	90% after 24 h at 0.8 V	[298]
2014	Aa MbH	Pm BOD	CNF	pH 6 100 mM phosphate 50 °C	100% H ₂ , 100% O ₂	yes	1.5	1.06	40% after 24 h at 0.5 V	[42]
2014	<i>Citrobacter sp. S-77</i>	Pt	carbon black	PEMFC MEA ^[b] 60 °C		MEA	180	0.95	nd	[300]

[a] Rm = *Ralstonia metallidurens*. [b] MEA = membrane electrode assembly.

carboxylic functions on the nanotube walls were thus obtained.^[198] Covalent grafting of both *Aa MbH* and *Mv BOD* was realized through carbodiimide coupling. DET currents for H₂ oxidation and O₂ reduction were observed, which can be rationalized because of the presence of arginine and lysine residues close to the distal FeS cluster and Cu T1 for Hase and BOD, respectively. This EBFC was proved to deliver a power density of 300 μWcm⁻²; that is, 300 times higher than the same device with enzymes simply adsorbed on the PG electrode.^[297]

In the next years, a step change in performance was achieved, with two new EBFCs delivering power densities larger than 1 mWcm⁻² at 0.65 V. This is especially due to the research on carbon materials offering hierarchical porosity suitable for substrate diffusion and high surface areas for a higher amount of anchorage sites for enzyme immobilization. Compacted mesoporous carbon served as material support for *E. coli* Hase and *Mv BOD* in Armstrong's group. The geometry of the bioelectrodes was especially studied to optimize the power densities.^[298] In our group, we combined CNFs as efficient platforms for immobilization of *Aa MbH* and a thermostable BOD recently identified in *Bacillus pumilus* (*Bp*).^[42] It must be noted that one of the best glucose/air EBFC delivers a power density of 1.45 mW/cm² at 0.3 V.^[299] The experimental results highlight that H₂/O₂ EBFCs have quickly reached performances that are comparable to those of other EBFCs that have been under development for a much longer time. Finally, very recently, Ogo's group described a H₂/O₂ fuel cell with a bioanode and a Pt-based cathode assembled according to a classical membrane electrode assembly as in PEM design; that is, with gas diffusion electrodes both at the anode and cathode.^[300] The [NiFe]-Hase from *Citrobacter* sp. S-77 was very roughly mixed with carbon black material. This configuration was expected to enhance the turnover of the enzyme compared with homogeneous conditions. An outstanding value of 893,000 s⁻¹ was calculated that has never been reported before for Hase, and which is one of the highest values ever reported for any enzyme. Comparison with platinum revealed a much higher performance of the Hase-based anode. Very surprisingly, although presenting a similar sequence to that of Hyd-2 from *E. coli*, which is classified as an O₂-sensitive Hase, [NiFe]-Hase from *Citrobacter* sp. S-77 appeared to be stable in the presence of O₂. Coupled to a platinum-based cathode, the hybrid fuel cell delivered a very high power density of 180 mWcm⁻². It must be noted however that the polarization curves were conducted with a high sweep rate of 50 mVs⁻¹. Nevertheless, this new finding may enhance the credibility of H₂/O₂ biofuel cells. Explanations must be now found to explain the incredible properties of this Hase, including its resistance to O₂, CO, and temperature.

6.2. Increasing Stability

Long-term stability is one of the most relevant issues of EBFCs. The low stability of these devices originates from the intrinsic stability of the enzymes themselves, from the stability of the enzyme/carbon host matrix biohybrid, and from the stability of the interaction between the carbon host matrix and the electron collector. The first issues can be overcome by the use of

thermostable enzymes that may present higher stability with time, or by specific protection of the enzyme against denaturation (presence of detergent or glycerol, use of amphipols as detergents^[301] etc), although this has not been extensively explored so far. Similarly, stable interaction between the electron collector and the carbon host matrix has so far rarely been considered. The simplest way would be to avoid two different substrates, for example by the use of CNTs or CNFs directly grown on an electrode or through the use of carbon felts, which do not need further support.^[194]

Efforts to enhance the stability of the bioelectrodes have mainly focused on the interaction between the carbon host matrix and the enzymes. A covalent coupling between CNTs and the enzymes allowed for recovery of approximately 40% of the power density after 24 h operation of the EBFCs.^[237,297] Entrapment of enzymes inside compacted mesoporous carbon led to stability of the bioelectrodes for operation for one week.^[298] No covalent coupling was necessary in this case. The loss in power density was demonstrated to be unrelated to enzyme release in solution, but was more likely due to enzyme deactivation with time.

6.3. Biodevice Miniaturization

A first simplification of the currently developed H₂/O₂ biofuel cells originates from the direct electrical connection of enzymes, which obviates the need for redox mediators. This would otherwise be a limitation because of the need for a host matrix that is suitable for the enzyme and the redox mediator, both often presenting opposite interaction properties. Second, the use of highly specific enzymes and of an O₂-tolerant Hase allows a biofuel cell to be envisioned with no membrane separator. A H₂/O₂ gas mixture in nonexplosive proportions must then be used (the range of explosive proportions is 4.1–78% of H₂ in air or 4.0–95.2% for H₂-O₂^[302]). Armstrong's group recently explored these conditions^[298] and demonstrated that the EBFC could operate in a gas mixture enriched in H₂ over O₂. Otherwise, to take benefit of the hyperthermophilicity of *Aa MbH*, a search for a thermostable BOD was undertaken in our laboratory. By using bacterial BOD from *Bp*, which was recently identified by Mano's group, a EBFC that was able to deliver a high power density over a large range of temperature from 30 to 80 °C was designed.^[42] This new finding allows the application of EBFCs to be extended to extreme environments in which classical enzymes or microorganisms could not survive (Figure 12).

6.4. Some Limitations, Some Issues

These preliminary H₂/O₂ biofuel cells define the limiting parameters for further improvement in device configuration and performance. Except for the last EBFC reported by Ogo et al.,^[300] the calculated turnover of the incorporated Hase in the carbon materials (ca. 50 s⁻¹) is much lower than the expected value (>1000 s⁻¹), suggesting that many enzyme molecules are not electrically connected to the carbon material, and/or some biomolecules are hindered inside the carbon film so that the sub-

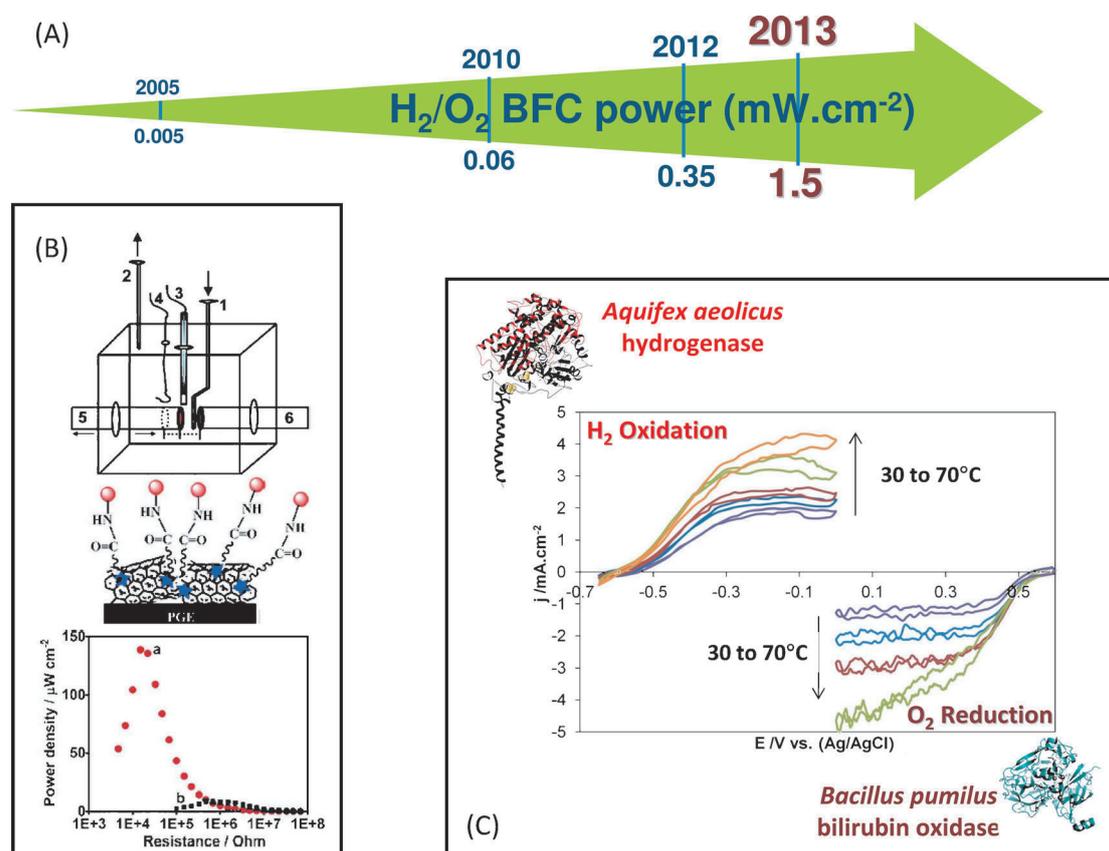


Figure 12. Increases in the performances of H₂/O₂ EBFCs A) rely both on cell design, electrode material, and thermostability of enzymes. B) Membraneless EBFC using covalent attachment of enzymes on pyrene-functionalized CNTs that allows enhancement of the power density compared with a bare graphite electrode (adapted from Ref. [237] with permission from the Royal Society of Chemistry). C) Use of thermostable enzymes on CNFs allows the development of performant EBFCs (adapted from Ref. [42]).

strate cannot reach them, and/or many molecules are denatured upon immobilization. Again, this originates from the size of the biomolecules and the anisotropy of the electron transfer. Extended work is necessary to determine the physicochemical parameters that control the efficient electrical connection of the enzymes at the surface of the electrode material, to fit the pore size to the enzyme size, and to define an environment that is not deleterious to enzymes. In this way it was demonstrated that the porosity of CNF films led to a 10 times enhancement of the turnover frequency compared with that obtained with compacted mesoporous carbon.^[42,298]

Cathode limitation induced by low O₂ concentration and low affinity of BOD to O₂ was demonstrated in membraneless EBFC.^[231] This limitation was simply encompassed by playing with the cathode geometry.^[298] However, other solutions are needed so that cathode geometry is not limited. Finally, it is worth noting that H₂/O₂ EBFC is limited by the reversible inhibition of Hase at potentials higher than -0.2 V vs. Ag/AgCl. The consequence of this process on biofuel cell performance was first examined by Armstrong et al. in a H₂/O₂ EBFC based on *E. coli* Hase.^[303] Conditions of fuel-weak (4% H₂) hydrogen/air mixture in a membraneless H₂/O₂ biofuel cell was shown to induce collapse of the power at low load due to inactivation of Hase when subjected to O₂ at high potential. Similarly, we

demonstrated by using *Aa* MbH that in the case of an anode-limited EBFC, formation of the inactive state of Hase at moderate potentials induced a large increase in anode potential to such an extent that Hase could be irreversibly damaged, despite the presence of a membrane separator that avoiding the presence of O₂ in the anodic compartment.^[297] This can be put together with the results obtained with O₂-sensitive Hase in which a high potential induces transformation of the active site in states similar to those observed in the presence of O₂.^[304] We however defined a cell voltage range in which the EBFC could operate irrespective of whether the anode or the cathode was limited. To mediate this important issue, Armstrong et al. proposed to connect a second anode containing active Hase to provide electrons to the Hase that was inactivated at high potential.^[303] Ciaccafava et al. explored another way to inject electrons in the inactivated Hase.^[305] Actually, they demonstrated a light-induced reactivation process of Hase under turnover, which was hypothesized to promote the loss of the hydroxo ligand bridging the nickel and the iron. Quantum rods were then used as platforms for *Aa* MbH immobilization.^[306] The complex was shown to retain H₂ catalytic oxidation activity, although the reactivation process under illumination was hindered by the need for a redox mediator.

7. Summary and Outlook

This review highlights the recent and exponentially increasing progress toward the development of H_2/O_2 EBFCs. Enzyme biodiversity, long-range electron transfer within enzymes and between enzymes and electrochemical interfaces, electrode nanostructuring, and fuel production are domains in which a lot of research has been conducted to develop H_2/O_2 EBFCs that deliver promising power densities. Improvements including an increase in enzyme production and power output and stabilization of the overall system are still required. The design and demonstration of these EBFCs have now to be realized. Some groups have recently reported original concepts that couple supercapacitors to EBFCs,^[307,308] or mix an enzymatic electrode with a non-rare-metal chemical complex based electrode, which expand the applications of these biodevices.^[309,310] The ideal H_2/O_2 EBFC would be fed with H_2 produced directly from biomass. Although it is known that O_2 -tolerant Hases are insensitive to CO and are more resistant to H_2S than Pt,^[90,288] the influence of biogas contaminants on H_2 oxidation and O_2 reduction needs to be further studied, particularly the effect of H_2S and CO_2 . Additionally, three main challenges, listed below, may guide future research directions.

7.1. Enzyme Quantification in 3D Networks

Progress has to be made toward achieving higher numbers of electrically connected enzymes inside 3D networks. This can be realized if the network is composed of aligned conductive nanostructures on which each enzyme molecule is oriented in an optimized position (Figure 13). One attractive study has been reported by Miyake et al. for fructose oxidation.^[311] A CNT forest was grown in the presence of an enzyme solution, and the network was shown to shrink to a near-hexagonal close-packed structure, with the intra-nanospace regulated by the size of the enzymes. For fructose oxidation, a current of up to

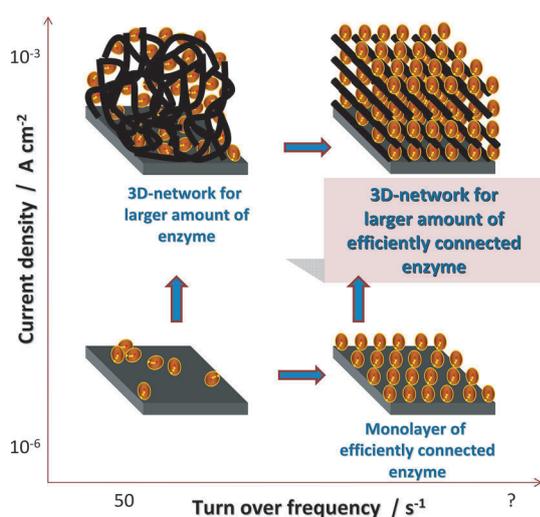


Figure 13. Schematic view of the ideal bioelectrode showing a nanostructured network in which each enzyme is electrically connected to the electrode (adapted from Ref. [312]).

16 mA cm^{-2} was reached. In a more recent report, vertically aligned CNTs with intraspaces compatible with the size of the enzymes were used.^[312] High current densities of approximately 15 mA cm^{-2} were reached, and, most importantly, the turnover rate was comparable to that of the homogeneous value, suggesting that all the encapsulated enzymes were effectively connected. Although in this particular case, a redox polymer was used for the electrical wiring of the glucose oxidase, it can be envisioned that such an ideal arrangement could guide future 3D matrix development.

7.2. Toward Enzyme Stabilization inside the Matrix

One of the main issues on which the future of H_2/O_2 EBFCs relies is the stability of the enzymes themselves, and of the biohybrids. Biochemists can provide solutions either by the discovery of new thermostable enzymes or by purification of enzyme complexes, whereas physicochemists may provide matrices that are suitable for enzyme stabilization. In this review, we have not focused on bioelectrodes constructed with redox mediators, because of the advantages of DET over MET and because H_2/O_2 EBFCs have not yet used such configuration. MET is, however, efficiently achieved through redox hydrogels for MCOs, such as osmium-based polymers, the potentials of which can be tuned to mediate the catalysis.^[69,313] In this case, electron hopping between the neighboring mediator entities allows connection between the enzymes and the electrode. Moreover, *T. roseopersicina* Hase was entrapped in sol-gel material doped with CNTs,^[314] and showed stability over weeks. Evaluation of MET will have to be carried out for H_2 oxidation in the future, because this may help improve enzyme stability. We previously reported the entrapment of *Aa MbH* in polymers based on a phenothiazine entity.^[315] DET and MET processes were demonstrated to coexist inside the polymer, yielding a high current for H_2 oxidation. Analysis of the CV signals also suggested that some protection against reactive oxygen species might originate from the redox polymer. Cosnier's group entrapped *Desulfovrio fructosovorans* (*Df*) Hase inside a viologen-polypyrrole film.^[316] A MET process for H_2 oxidation was observed, although a high potential was applied to the enzyme during the electropolymerization process. It was hypothesized that the enzymes not directly connected to the electrode were not damaged by the oxidative conditions. In a recent conference communication a bioanode based on a O_2 -sensitive Hase entrapped in a functionalized polymer was reported.^[317] The redox entities in the polymer were demonstrated to participate in the consumption of oxygen in the upper film layer, preventing the access of O_2 to deeper enzyme layers. This procedure opens a new avenue towards the use of various kinds of Hases presenting a range of enzymatic properties, including those that are O_2 sensitive.

7.3. Search for Enzymes with High O_2 Affinity

The affinity for O_2 of MCOs such as BOD or LAC is low because the in vivo function is not to reduce oxygen [K_m is in the order of hundreds of micromoles (see Table 1)]^[56,71-72,318-322]. A direct

consequence is the cathodic limitation of most fuel/O₂ EBFCs, because of low dissolved-oxygen concentrations at the cathode (O₂ solubility is ca. 0.40 mM at 40 °C).^[175,323,324] Sugar/air-breathing EBFCs were recently developed and helped to overcome this issue, because oxygen is brought as a gas and not as a dissolved species.^[218,325–327] In view of the removal of the membrane separator in H₂/O₂ EBFCs, mixtures of H₂ and O₂ must be controlled outside their explosive limits. This requires a search for enzymes that display high affinity toward their substrates. Microorganisms have been adapted to various oxygen concentrations from oxygenic to anoxic environments. In microoxic environments, they are able to survive and to grow owing to the occurrence of terminal oxidases with a range of affinities for O₂. These cytochrome c oxidases (CcOs) are integral membrane proteins (Table 1), which reduce oxygen into water while creating a proton gradient across the cellular membrane. They present high affinity for oxygen ranging from a few nanomoles to several hundred nanomoles; that is, three orders higher than the MCOs (Table 1).^[328–330] Immobilization of these enzymes on electrodes is a challenge, however, because it requires sophisticated modification of the electrode mimic of the cell membrane.^[331,332] Moreover, many of the terminal oxidases currently reported reduce oxygen at a much lower potential than MCOs.^[333] Some bacterial metabolisms in the biodiversity pool are known to involve high-potential electron-transfer chains.^[334,335] Identification of high redox potential CcOs would be an original way to address the issue of low oxygen availability in H₂/O₂ EBFCs. This research is also a good illustration of how more studies into applications will increase our knowledge of enzyme electrochemistry, and help in the understanding of fundamental issues such as enzymatic reactions in complex electron-transfer chains.

Acknowledgements

The authors thank P. Infossi, Drs. A. Ciaccafava (TU, Berlin, Germany), M. Guiral and M. Ilbert (BIP, CNRS-AMU, Marseille, France), R. Gadiou (IS2M, CNRS, Mulhouse, France), S. Sacquin-Mora and M. Baaden (IBPC, CNRS, Paris, France), N. Mano (CRPP, CNRS, Bordeaux, France), V. Marchy (ISC, CNRS, Rennes, France), C. Innocent and S. Tingry (IEM, CNRS, Montpellier, France) for fruitful discussions, M. Bauzan (IMM, Marseille, France) for growing the bacteria, Région Provence-Alpes-Côte d'Azur, Programme Interdisciplinaire Energie CNRS, and ANR for financial support.

Keywords: biomass · enzyme catalysis · electron transfer · hydrogen · sustainable chemistry

- [1] H. Sakurai, H. Masukawa, M. Kitashima, K. Inoue, *J. Photochem. Photobiol. C* **2013**, *17*, 1–25.
- [2] C.-Y. Lin, C.-H. Lay, B. Sen, C.-Y. Chu, G. Kumar, C.-C. Chen, J.-S. Chang, *Int. J. Hydrogen Energy* **2012**, *37*, 15632–15642.
- [3] U. Sahaym, G. Norton, *J. Mater. Sci.* **2008**, *43*, 5395–5429.
- [4] M. Cao, D. Wu, R. Cao, *ChemCatChem* **2014**, *6*, 26–45.
- [5] A. Brouzgou, S. Song, P. Tsiakaras, *Appl. Catal. B* **2012**, *127*, 371–388.
- [6] C. Li, T. Sato, Y. Yamauchi, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 8050–8053; *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 8208–8211.

- [7] H. Atae-Esfahani, J. Liu, M. Hu, N. Miyamoto, S. Tominaka, K. Wu, Y. Yamauchi, *Small* **2013**, *9*, 1047–1051.
- [8] Z. Jiang, Z. Wang, W. Qu, H. Rivera, D. Gu, G. Yin, *Nanoscale* **2012**, *4*, 7411–7418.
- [9] Y. Kang, X. Ye, J. Chen, Y. Cai, R. Diz, R. Adzic, E. Stach, C. Murray, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 42–45.
- [10] C. Galeano, J. Meier, V. Peinecke, H. Bongard, I. Katsounaros, A. Topalov, A. Lu, K. Mayrhofer, F. Schuth, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 20457–20465.
- [11] R. Liu, D. Wu, X. Feng, K. Mullen, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 2565–2569; *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 2619–2623.
- [12] X. Li, I. Hsing, *Electrochim. Acta* **2006**, *51*, 5250–5258.
- [13] H. Inoue, K. Hosoya, N. Kannari, J. Osaki, *J. Power Sources* **2012**, *220*, 173–179.
- [14] X. Yuan, X.L. Ding, C.Y. Wang, Z.F. Ma, *Energy Environ. Sci.* **2013**, *6*, 1105–1124.
- [15] Y. Liu, W. Mustain, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 530–533.
- [16] C. Bonnet, L. Franck-Lacaze, S. Ronasi, S. Besse, F. Lapicque, *Chem. Eng. Sci.* **2010**, *65*, 3050–3058.
- [17] A. Serov, C. Kwak, *Appl. Catal. B* **2009**, *90*, 313–320.
- [18] S. Peighambaridoust, S. Rowshanzamir, M. Amjadi, *Int. J. Hydrocarbon Eng.* **2010**, *35*, 9349–9384.
- [19] J. Yang, S. T. Chen, W. G. Dougherty, W. S. Kassel, R. M. Bullock, D. L. Dubois, S. Raugei, R. Rousseau, M. Dupuis, M. R. Dubois, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 8618–8620.
- [20] P. Chenevier, L. Mugerli, S. Darbe, L. Darchy, S. Dimanno, P.D. Tran, F. Valentino, M. Iannello, A. Volbeda, C. Cavazza, V. Artero, *C. R. Chim.* **2013**, *16*, 491–505.
- [21] A. Le Goff, V. Artero, B. Joussemme, P. D. Tran, N. Guillet, R. Metaye, A. Fihri, S. Palacin, M. Fontecave, *Science* **2009**, *326*, 1384–1387.
- [22] P. Tran, A. Le Goff, J. Heidkamp, B. Joussemme, N. Guillet, S. Palacin, H. Dau, M. Fontecave, V. Artero, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 1371–1374.
- [23] C. Berggren, A. Adamska, C. Lambertz, T. Simmons, J. Esselborn, M. Atta, J. M. Mouesca, E. Reijerse, W. Lubitz, T. Happe, V. Artero, M. Fontecave, *Nature* **2013**, *499*, 66–70.
- [24] T. Simmons, G. Berggren, M. Bacchi, M. Fontecave, V. Artero, *Coord. Chem. Rev.* **2014**, *270–271*, 127–150.
- [25] D. Leech, P. Kavanagh, W. Schuhmann, *Electrochim. Acta* **2012**, *84*, 223–234.
- [26] M. Falk, C. Villarrubia, S. Babanova, P. Atanassov, S. Shleev, *ChemPhys-Chem* **2013**, *14*, 2045–2058.
- [27] S. Cosnier, A. Le Goff, M. Holzinger, *Electrochem. Commun.* **2014**, *38*, 19–23.
- [28] H. Shafaat, O. Rüdiger, H. Ogata, W. Lubitz, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* **2013**, *1827*, 986–1002.
- [29] S. Wherland, O. Farver, I. Pecht, *J. Biol. Inorg. Chem.* **2014**, *19*, 541–554.
- [30] S. Brocato, C. Lau, P. Atanassov, *Electrochim. Acta* **2012**, *61*, 44–49.
- [31] N. Parimi, Y. Umasankar, P. Atanassov, R. Ramasamy, *ACS Catal.* **2012**, *2*, 38–44.
- [32] E. Solomon, A. Augustine, J. Yoon, *Dalton Trans.* **2008**, *2008*, 3921–3932.
- [33] Y. Ackermann, D. Guschin, K. Eckhard, S. Shleev, W. Schuhmann, *Electrochem. Commun.* **2010**, *12*, 640–643.
- [34] L. dos Santos, V. Climent, C. Blanford, F. Armstrong, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, *12*, 13962–13974.
- [35] B. Salaj-Kosla, S. Pöller, Y. Beyl, M. Scanlon, S. Belochapkin, S. Shleev, W. Schuhmann, E. Magner, *Electrochem. Commun.* **2012**, *16*, 92–95.
- [36] D. Heppner, C. Kjaergaard, E. Solomon, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 12212–12215.
- [37] K. Singh, T. McArdle, P. Sullivan, C. Blanford, *Energy Environ. Sci.* **2013**, *6*, 2460–2464.
- [38] C. Kjaergaard, F. Durand, F. Tasca, M. Qayyum, B. Kauffmann, S. Gounel, E. Suraniti, K. Hodgson, B. Hedman, N. Mano, E. Solomon, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 5548–5551.
- [39] J. Cracknell, C. Blanford, *Chem. Sci.* **2012**, *3*, 1567–1581.
- [40] D. Ivnitiski, K. Artyushkova, P. Atanassov, *Bioelectrochemistry* **2008**, *74*, 101–110.
- [41] D. Ivnitiski, C. Khripin, H. Luckarift, G. Johnson, P. Atanassov, *Electrochim. Acta* **2010**, *55*, 7385–7393.

- [42] A. de Poulpique, A. Ciaccava, R. Gadiou, S. Gounel, M. T. Giudici-Ortoni, N. Mano, E. Lojou, *Electrochem. Commun.* **2014**, *42*, 72–74.
- [43] S. Shleev, J. Tkac, A. Christenson, T. Ruzgas, A. Yaropolov, J. Whittaker, L. Gorton, *Biosens. Bioelectron.* **2005**, *20*, 2517–2554.
- [44] K. Schubert, G. Goebel, F. Lisdat, *Electrochim. Acta* **2009**, *54*, 3033–3038.
- [45] M. Pita, S. Shleev, T. Ruzgas, V. Fernandez, A. Yaropolov, L. Gorton, *Electrochem. Commun.* **2006**, *8*, 747–753.
- [46] S. Shleev, M. Pita, A. Yaropolov, T. Ruzgas, L. Gorton, *Electroanalysis* **2006**, *18*, 1901–1908.
- [47] P. Ramirez, N. Mano, R. Andreu, T. Ruzgas, A. Heller, L. Gorton, D. Shleev, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* **2008**, *1777*, 1364–1369.
- [48] Y. Kamitaka, S. Tsujimura, K. Kataoka, T. Sakurai, T. Ikeda, K. Kano, *J. Electroanal. Chem.* **2007**, *601*, 119–124.
- [49] F. Xu, W. Shin, S. Brown, J. Wahleithner, U. Sundaram, E. Solomon, *Biochim. Biophys. Acta* **1996**, *1292*, 303–311.
- [50] M. Weigel, E. Tritsger, F. Lisdat, *Electrochem. Commun.* **2007**, *9*, 689–693.
- [51] J. Filip, J. Tkac, *Bioelectrochemistry* **2014**, *96*, 14–20.
- [52] A. Christenson, S. Shleev, N. Mano, A. Heller, L. Gorton, *Biochim. Biophys. Acta* **2006**, *1757*, 1634–1641.
- [53] S. Shleev, Y. Wang, M. Gorbacheva, A. Christenson, D. Haltrich, R. Ludwig, T. Ruzgas, L. Gorton, *Electroanalysis* **2008**, *20*, 963–969.
- [54] G. Hong, D. Ivnitcki, G. Johnson, P. Atanassov, P. Patcher, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 4802–4809.
- [55] S. Tsujimura, A. Kuriyama, N. Fujieda, K. Kano, T. Ikeda, *Anal. Biochem.* **2005**, *337*, 325–331.
- [56] S. Shleev, A. Jarosz-Wilkolazka, A. Khalunina, O. Morozova, A. Yaropolov, T. Ruzgas, L. Gorton, *Bioelectrochemistry* **2005**, *67*, 115–124.
- [57] S. Lörcher, P. Lopes, A. Kartashov, E. Ferapontova, *ChemPhysChem* **2013**, *14*, 2112–2124.
- [58] E. Solomon, R. Szilagyi, S. DeBeer George, L. Basumallick, *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 419–458.
- [59] E. Solomon, D. Heppner, E. Johnston, J. Ginsbach, J. Cirera, M. Qayyum, M. Kieber-Emmons, C. Kjaergaard, R. Hadt, L. Tian, *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 3659, 3853.
- [60] S. Shleev, V. Andoralov, M. Falk, C. Reimann, T. Ruzgas, M. Srnc, U. Ryde, L. Rulisek, *Electroanalysis* **2012**, *24*, 1524–1540.
- [61] S. Shleev, T. Ruzgas, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 7270–7274; *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 7380–7384.
- [62] J. Filip, J. Sefcovicova, P. Gemeiner, J. Tkac, *Electrochim. Acta* **2013**, *87*, 366–374.
- [63] S. Shleev, A. Christenson, V. Serezhnikov, D. Burbaev, A. Yaropolov, L. Gorton, T. Ruzgas, *Biochem. J.* **2005**, *385*, 745–754.
- [64] M. Frascioni, H. Boer, A. Koivula, F. Mazzei, *Electrochim. Acta* **2010**, *56*, 817–827.
- [65] B. Salaj-Kosla, S. Pöller, W. Schuhmann, S. Shleev, E. Magner, *Bioelectrochemistry* **2013**, *91*, 15–20.
- [66] C. Vaz-Dominguez, S. Campuzano, O. Rüdiger, M. Pita, M. Gorbacheva, S. Shleev, M. Fernandez, A. De Lacey, *Biosens. Bioelectron.* **2008**, *24*, 531–537.
- [67] F. Xu, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2001**, *95*, 125–133.
- [68] N. Mano, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2012**, *96*, 301–307.
- [69] N. Mano, L. Edembe, *Biosens. Bioelectron.* **2013**, *50*, 478–485.
- [70] S. Tsujimura, E. Suraniti, F. Durand, N. Mano, *Electrochim. Acta* **2014**, *117*, 263–267.
- [71] F. Durand, C. Kjaergaard, E. Suraniti, S. Gounel, R. Hadt, E. Solomon, N. Mano, *Biosens. Bioelectron.* **2012**, *35*, 140–146.
- [72] F. Durand, S. Gounel, C. Kjaergaard, E. Solomon, N. Mano, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2012**, *96*, 1489–1498.
- [73] E. Suraniti, S. Tsujimura, F. Durand, N. Mano, *Electrochem. Commun.* **2013**, *26*, 41–44.
- [74] T. Beneyton, A. El Harrak, A. Griffith, P. Hellwig, V. Taly, *Electrochem. Commun.* **2011**, *13*, 24–27.
- [75] K. Hildén, T. Hakala, T. Lundell, *Biotechnol. Lett.* **2009**, *31*, 1117–1128.
- [76] J. Fritsch, O. Lenz, B. Friedrich, *Nat. Rev. Microbiol.* **2013**, *11*, 106–114.
- [77] W. Lubitz, H. Ogata, O. Rüdiger, E. Reijerse, *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 4081–4148.
- [78] A. Parkin, F. Sargent, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2012**, *16*, 26–34.
- [79] A. Volbeda, M. Charon, C. Piras, C. Hatchikian, M. Frey, J. Fontecilla-Camps, *Nature* **1995**, *373*, 580–587.
- [80] R. Happe, W. Roseboom, A. Pierik, S. Albracht, K. Bagley, *Nature* **1997**, *385*, 126–126.
- [81] Y. Montet, P. Amara, A. Volbeda, X. Vernède, E. Hatchikian, M. Field, M. Frey, J. Fontecilla-Camps, *Nat. Struct. Biol.* **1997**, *4*, 523–526.
- [82] P. Wang, R. Best, J. Blumberger, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 3548–3556.
- [83] A. Yaropolov, A. Karyakin, S. Varfolomeev, I. Berezin, *Bioelectrochem. Bioenerg.* **1984**, *12*, 267–277.
- [84] H. Pershad, J. Duff, H. Heering, E. Duin, S. Albracht, F. Armstrong, *Biochemistry* **1999**, *38*, 8992–8999.
- [85] P. Bianco, J. Haladjian, M. Bruschi, F. Guerlesquin, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1992**, *189*, 633–639.
- [86] E. Lojou, P. Bianco, *Electroanalysis* **2004**, *16*, 1093–1100.
- [87] L. Pieuille, X. Morelli, P. Gallice, E. Lojou, P. Barbier, M. Czjzek, P. Bianco, F. Guerlesquin, C. Hatchikian, *J. Mol. Biol.* **2005**, *354*, 73–90.
- [88] E. Lojou, *Electrochim. Acta* **2011**, *56*, 10385–10397.
- [89] J. Butt, M. Filipiak, W. Hagen, *Eur. J. Biochem.* **1997**, *245*, 116–122.
- [90] K. Vincent, A. Parkin, F. Armstrong, *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 4366–4413.
- [91] M. Guiral-Brugna, M.T. Giudici-Ortoni, M. Bruschi, P. Bianco, *J. Electroanal. Chem.* **2001**, *510*, 136–143.
- [92] A. Jones, E. Sillery, S. Albracht, F. Armstrong, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **2002**, 866–867.
- [93] C. Léger, S. Dementin, P. Bertrand, M. Rousset, B. Guigliarelli, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 12162–12172.
- [94] G. Goldet, A. Wait, J. Cracknell, K. Vincent, M. Ludwig, O. Lenz, B. Friedrich, F. Armstrong, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 11106–11113.
- [95] M. Guiral, C. Aubert, M.T. Giudici-Ortoni, *Biochem. Soc. Trans.* **2005**, *33*, 22–24.
- [96] M. Guiral, L. Prunetti, S. Lignon, R. Lebrun, D. Moinier, M. T. Giudici-Ortoni, *J. Proteome Res.* **2009**, *8*, 1717–1730.
- [97] M. Roger, A. de Poulpique, A. Ciaccava, M. Ilbert, M. Guiral, M. T. Giudici-Ortoni, E. Lojou, *Anal. Bioanal. Chem.* **2014**, *406*, 1011–1027.
- [98] M. Guiral, L. Prunetti, C. Aussignargues, A. Ciaccava, P. Infossi, M. Ilbert, E. Lojou, M. T. Giudici-Ortoni, *Adv. Bact. Resp. Phys.* **2012**, *61*, 125–194.
- [99] E. Schwartz, J. Fritsch, B. Friedrich, in *The Prokaryotes* 4th Ed. (Eds.: E. Rosenberg, E. DeLong, E. Stakebrandt, S. Lory, F. Thompson), Springer, **2013**, pp.119–199.
- [100] R. Vazquez-Duhalt, S. Aguila, A. Arrocha, M. Ayala, *ChemElectroChem* **2014**, *1*, 496–513.
- [101] R. Huber, T. Wilharm, D. Huber, A. Trincone, S. Burggraf, H. König, R. Rachel, I. Rockinger, H. Fricke, K. Stetter, *Syst. Appl. Microbiol.* **1992**, *15*, 340–351.
- [102] K. Yoon, K. Fukuda, K. Fujisawa, H. Nishihara, *Int. J. Hydrogen Energy* **2011**, *36*, 7081–7088.
- [103] M. Lukey, A. Parkin, M. Roessler, B. Murphy, J. Harmer, T. Palmer, F. Sargent, F. Armstrong, *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 3928–3938.
- [104] A. Parkin, L. Bowman, M. Roessler, R. Davies, T. Palmer, F. Armstrong, F. Sargent, *FEBS Lett.* **2012**, *586*, 536–544.
- [105] K. Vincent, J. Cracknell, J. Clark, M. Ludwig, O. Lenz, B. Friedrich, F. Armstrong, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **2006**, 5033–5035.
- [106] X. Luo, P. Tron-Infossi, M. Brugna, M.T. Giudici-Ortoni, E. Lojou, *J. Biol. Inorg. Chem.* **2009**, *14*, 1275–1288.
- [107] M. Pandelia, W. Nitschke, P. Infossi, M.T. Giudici-Ortoni, E. Bill, W. Lubitz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 6097–6102.
- [108] M. Pandelia, D. Bykov, R. Izsak, P. Infossi, M. T. Giudici-Ortoni, E. Bill, F. Neese, W. Lubitz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, 483–488.
- [109] M. Roessler, R. Evans, R. Davies, J. Harmer, F. Armstrong, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 15581–15594.
- [110] K. Knüttel, K. Schneider, A. Erkens, W. Plass, A. Muller, E. Bill, A. X. Trautwein, *Bull. Pol. Acad. Sci. Chem.* **1994**, *42*, 495–511.
- [111] M. Rousset, Y. Montet, B. Guigliarelli, N. Forget, M. Asso, P. Bertrand, J. Fontecilla-Camps, C. Hatchikian, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 11625–11630.
- [112] M. Teixeira, I. Moura, A. Xavier, J. Moura, J. Legall, D. Dervartanian, H. Peck, B. Huyn, *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 16435–16450.
- [113] M. Brugna-Guiral, P. Tron, W. Nitschke, K.O. Stetter, B. Burlat, B. Guigliarelli, M. Bruschi, M. T. Giudici-Ortoni, *Extremophiles* **2003**, *7*, 145–157.
- [114] M. Pandelia, V. Fourmond, P. Tron-Infossi, E. Lojou, P. Bertrand, C. Leger, M.T. Giudici-Ortoni, W. Lubitz, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 6991–7004.

- [115] A. Hamdam, S. Dementin, P. P. Liebgott, O. Gutierrez-Sanz, P. Richaud, A. De Lacey, M. Rousset, P. Bertrand, L. Cournac, C. Léger, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 8368–8371.
- [116] B. Murphy, F. Sargent, F. Armstrong, *Energy Environ. Sci.* **2014**, *7*, 1426–1433.
- [117] H. Ogata, S. Hirota, A. Nakahara, H. Komori, N. Shibata, T. Kato, K. Kano, Y. Higushi, *Structure* **2005**, *13*, 1635–1642.
- [118] J. Cracknell, A. Wait, O. Lenz, B. Friedrich, F. Armstrong, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 20681–20686.
- [119] D. Millo, M. Pandelia, T. Utesch, N. Wisitruangsakul, M. Mroginski, W. Lubitz, P. Hildebrandt, I. Zebger, *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 15344–15351.
- [120] J. Fritsch, P. Scheerer, S. Frielingsdorf, S. Kroschinsky, B. Friedrich, O. Lenz, C. Spahn, *Nature* **2011**, *479*, 249–U134.
- [121] Y. Shomura, K. Yoon, H. Nishihara, Y. Higuchi, *Nature* **2011**, *479*, 253–256.
- [122] A. Volbeda, P. Amara, C. Darnault, J. Mouesca, A. Parkin, M. Roessler, F. Armstrong, J. Fontecilla-Camps, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 5305–5310.
- [123] T. Buhrke, O. Lenz, N. Krauss, B. Friedrich, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 23791–23796.
- [124] S. Dementin, F. Leroux, L. Cournac, A. De Lacey, A. Volbeda, C. Leger, B. Burlat, N. Martinez, S. Champ, L. Martin, O. Sanganas, M. Haumann, V. Fernandez, B. Guigliarelli, J. Fontecilla-Camps, M. Rousset, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 10156–10164.
- [125] P. P. Liebgott, F. Leroux, B. Burlat, S. Dementin, C. Baffert, T. Lautier, V. Fourmond, P. Ceccaldi, C. Cavazza, I. Meynial-Salles, P. Soucaille, J. Fontecilla-Camps, B. Guigliarelli, P. Bertrand, M. Rousset, C. Léger, *Nat. Chem. Biol.* **2010**, *6*, 63–70.
- [126] P. P. Liebgott, A. De Lacey, B. Burlat, L. Cournac, P. Richaud, M. Brugna, V. Fernandez, B. Guigliarelli, M. Rousset, C. Léger, S. Dementin, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 986–997.
- [127] A. Hamdam, P. P. Liebgott, V. Fourmond, O. Gutierrez-Sanz, A. De Lacey, P. Infossi, M. Rousset, S. Dementin, C. Léger, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 19916–19921.
- [128] J. Topin, J. Diharce, S. Fiorucci, S. Antonczak, J. Golebiowski, *J. Phys. Chem. B* **2014**, *118*, 676–681.
- [129] J. Mouesca, J. Fontecilla-Camps, P. Amara, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 2002–2006; *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 2056–2060.
- [130] T. Goris, A. Wait, M. Saggi, J. Fritsch, N. Heidary, M. Stein, I. Zebger, F. Lendzian, F. Armstrong, B. Friedrich, O. Lenz, *Nat. Chem. Biol.* **2011**, *7*, 310–318.
- [131] M. Pandelia, W. Lubitz, W. Nitschke, *Biophys. Biochim. Acta* **2012**, *1817*, 1565–1575.
- [132] M. Pandelia, P. Infossi, M. Stein, M. T. Giudici-Ortoni, W. Lubitz, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 823–825.
- [133] S. Frielingsdorf, T. Schubert, A. Pohlmann, O. Lenz, B. Friedrich, *Biochemistry* **2011**, *50*, 10836–10843.
- [134] L. Bowman, L. Flanagan, P. Fyfe, A. Parkin, W. Unter, F. Sargent, *Biochem. J.* **2014**, *458*, 449–458.
- [135] S. Frielingsdorf, J. Fritsch, A. Schmidt, M. Hammer, J. Löwenstein, E. Siebert, V. Pelmenshikov, T. Jaenicke, J. Kalms, Y. Rippers, F. Lendzian, I. Zebger, C. Teutloff, M. Kaupp, R. Bittl, P. Hildebrandt, B. Friedrich, O. Lenz, P. Scheerer, *Nat. Chem. Biol.* **2014**, *10*, 378–U92.
- [136] P. Wulff, C. Day, F. Sargent, F. Armstrong, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, 6606–6611.
- [137] P. Wang, J. Blumberger, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 6399–6404.
- [138] M. Pandelia, P. Infossi, M. T. Giudici-Ortoni, W. Lubitz, *Biochemistry* **2010**, *49*, 8873–8881.
- [139] O. Richter, B. Ludwig, *Biophys. Acta* **2009**, *1787*, 626–634.
- [140] G. Lenaz, M. Genova, *Adv. Exp. Med. Biol.* **2012**, *748*, 107–144.
- [141] D. McMillan, S. Marritt, G. Kemp, P. Gordon-Brown, J. Butt, L. Jeuken, *Electrochim. Acta* **2013**, *110*, 79–85.
- [142] M. Kato, T. Cardona, W. Rutherford, E. Reisner, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 10610–10613.
- [143] P. Infossi, E. Lojou, J. P. Chauvin, G. Herbetette, M. Brugna, M. T. Giudici-Ortoni, *Int. J. Hydrogen Energy* **2010**, *35*, 10778–10789.
- [144] M. Sezer, S. Frielingsdorf, D. Millo, N. Heidary, T. Utesch, M. Mroginski, B. Friedrich, P. Hildebrandt, I. Zebger, I. Weidinger, *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115*, 10368–10374.
- [145] V. Radu, S. Frielingsdorf, S. Evans, O. Lenz, L. Jeuken, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 85121–8515.
- [146] J. Frew, H. Hill, *Eur. J. Biochem.* **1988**, *172*, 261–269.
- [147] F. Armstrong, H. Hill, N. Walton, *Acc. Chem. Res.* **1988**, *21*, 407–413.
- [148] E. Lojou, L. Pieulle, F. Guerlesquin, P. Bianco, *J. Electroanal. Chem.* **2002**, *523*, 150–159.
- [149] M. Correia dos Santos, P. Paes de Sousa, M. Simões Gonçalves, L. Krip-pahl, J. Moura, E. Lojou, P. Bianco, *J. Electroanal. Chem.* **2003**, *541*, 153–162.
- [150] E. Lojou, P. Bianco, *Langmuir* **2004**, *20*, 748–755.
- [151] R. Marcus, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1993**, *32*, 1111–1121; *Angew. Chem.* **1993**, *105*, 1161–1172.
- [152] C. Page, C. Moser, X. Chen, P. Dutton, *Nature* **1999**, *402*, 47–52.
- [153] L. Jeuken, *Biochim. Biophys. Acta* **2003**, *1604*, 67–76.
- [154] C. Léger, P. Bertrand, *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 2379–2438.
- [155] A. Karyakin, *Bioelectrochemistry* **2012**, *88*, 70–75.
- [156] B. Salaj-Kosla, M. Scanlon, T. Baumeister, T. Zahma, R. Ludwig, R. Conghaile, O. MacAodha, D. Leech, E. Magner, *Anal. Bioanal. Chem.* **2013**, *16*, 92–95.
- [157] A. Ciaccafava, M. Alberola, S. Hameury, P. Infossi, M. T. Giudici-Ortoni, E. Lojou, *Electrochim. Acta* **2011**, *56*, 3359–3368.
- [158] V. Climent, J. Zhang, E. Peter Friis, L. Ostergaard, J. Ulstrup, *J. Phys. Chem. C* **2012**, *116*, 1232–1243.
- [159] K. Piontek, M. Antorini, T. Choinowski, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 37663–37669.
- [160] T. Bertrand, C. Jolival, P. Briozzo, E. Caminade, N. Joly, C. Madzak, C. Mougou, *Biochemistry* **2002**, *41*, 7325–7333.
- [161] J. Cracknell, T. McNamara, E. Lowe, C. Blanford, *Dalton Trans.* **2011**, *40*, 6668–6675.
- [162] O. Rüdiger, C. Gutierrez-Sanchez, D. Olea, I. Pereira, M. Velez, V. Fernandez, A. De Lacey, *Electroanalysis* **2010**, *22*, 776–783.
- [163] F. Oteri, A. Ciaccafava, A. de Poulpique, M. Baaden, E. Lojou, S. Sacquin-Mora, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2014**, *16*, 11318–11322.
- [164] A. Ciaccafava, A. de Poulpique, P. Infossi, S. Robert, R. Gadiou, M. T. Giudici-Ortoni, S. Lecomte, E. Lojou, *Electrochim. Acta* **2012**, *82*, 115–125.
- [165] D. McMillan, S. Marritt, A. Firer-Sherwood, L. Shi, D. Richardson, S. Evans, S. Elliott, J. Butt, L. Jeuken, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 10550–10556.
- [166] E. Lojou, P. Bianco, *J. Electroanal. Chem.* **2004**, *573*, 159–167.
- [167] A. Ciaccafava, P. Infossi, M. Ilbert, M. Guiral, S. Lecomte, M. T. Giudici-Ortoni, E. Lojou, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 953–956; *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 977–980.
- [168] C. Vaz-Dominguez, M. Pita, A. De Lacey, S. Shleev, A. Cuesta, *J. Phys. Chem. C* **2012**, *116*, 16532–16540.
- [169] V. Krikstolaityte, A. Barrantes, A. Ramanavicius, T. Arnebrant, S. Shleev, T. Ruzgas, *Bioelectrochemistry* **2014**, *95*, 166.
- [170] A. Kartashov, G. Seraphini, M. Dong, S. Shipovskov, I. Gazaryan, F. Besenbacher, E. Ferapontova, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, *12*, 10098–10107.
- [171] V. Balland, C. Hureau, A. Cusano, Y. Liu, T. Tron, B. Limoges, *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 7186–7192.
- [172] M. Sosna, H. Boer, P. Bartlett, *ChemPhysChem* **2013**, *14*, 2225–2231.
- [173] Y. Li, J. Zhang, X. Huang, T. Wang, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2014**, *446*, 201–205.
- [174] M. Pita, C. Gutierrez-Sanchez, M. Toscano, S. Shleev, A. De Lacey, *Bioelectrochemistry* **2013**, *94*, 69–74.
- [175] K. So, S. Kawai, Y. Hamano, Y. Kitazumi, O. Shirai, M. Hibi, J. Ogawa, K. Kano, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2014**, *16*, 4823–4829.
- [176] R. Lopez, S. Babanova, Y. Ulyanova, S. Singhal, P. Atanassov, *ChemElectroChem* **2014**, *1*, 241–248.
- [177] M. Tominaga, M. Ohtani, I. Taniguchi, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2008**, *10*, 6928–6934.
- [178] C. Blanford, R. Heath, F. Armstrong, *Chem. Commun.* **2007**, 1710–1712.
- [179] C. Blanford, C. Foster, R. Heath, F. Armstrong, *Faraday Discuss.* **2008**, *140*, 319–335.
- [180] M. Meredith, M. Minson, D. Hickey, K. Artyushkova, D. Glatzhofer, S. Minteer, *ACS Catal.* **2011**, *1*, 1683–1690.
- [181] K. Stolarczyk, M. Sepelowska, D. Lyp, K. Zelechowska, J. Biernat, J. Rogalski, K. Farmer, K. Roberts, R. Bilewicz, *Bioelectrochemistry* **2012**, *87*, 154–163.

- [182] M. Cao, A. Fu, Z. Wang, J. Liu, N. Kong, X. Zong, H. Liu, J. Gooding, *J. Phys. Chem. C* **2014**, *118*, 2650–2659.
- [183] M. Bourourou, K. Elouarzaki, N. Lalaoui, C. Agnes, A. Le Goff, M. Holzinger, A. Maaref, S. Cosnier, *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 9371–9375.
- [184] K. Żelechowska, K. Stolarczyk, D. Łyp, J. Rogalski, K. Roberts, R. Bilewicz, J. Biernat, *Biocycber. Biomed. Eng.* **2013**, *33*, 235–245.
- [185] X. Zhou, X. Huang, L. Liu, X. Bai, H. Shi, *RSC Adv.* **2013**, *3*, 18036–18043.
- [186] J. Martinez-Ortiz, R. Flores, R. Vazquez-Duhalt, *Biosens. Bioelectron.* **2011**, *26*, 2626–2631.
- [187] T. Skálová, J. Dohnálek, I. Østergaard, R. Østeryaard, P. Kolenko, J. Dušková, A. Štěpánková, J. Hašek, *J. Mol. Biol.* **2009**, *385*, 1165–1178.
- [188] M. Thorum, C. Anderson, J. Hatch, A. Campbell, N. Marshall, S. Zimmerman, Y. Lu, A. Gewirth, *J. Phys. Chem. Lett.* **2010**, *1*, 2251–2254.
- [189] P. Olejnik, B. Palys, A. Kowalczyk, A. Nowicka, *J. Phys. Chem. C* **2012**, *116*, 25911–25918.
- [190] C. Gutiérrez-Sánchez, M. Pita, C. Vaz-Domínguez, S. Shleev, A. De Lacey, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 17212–17220.
- [191] M. Pita, C. Gutierrez-Sanchez, D. Olea, M. Velez, C. Garcia-Diego, S. Shleev, V. Fernandez, A. De Lacey, *J. Phys. Chem. C* **2011**, *115*, 13420–13428.
- [192] P. Olejnik, A. Pawlowska, B. Palys, *Electrochim. Acta* **2013**, *110*, 105–111.
- [193] O. Rüdiger, J. Abad, C. Hatchikian, V. Fernandez, A. De Lacey, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 16008–16009.
- [194] M. Alonso-Lomillo, O. Rüdiger, A. Maroto-Valiente, M. Velez, I. Rodriguez-Ramos, F. J. Munoz, V. Fernandez, A. De Lacey, *Nano Lett.* **2007**, *7*, 1603–1608.
- [195] P. Bianco, J. Haladjian, *J. Electrochem. Soc.* **1992**, *139*, 2428–2432.
- [196] F. Armstrong, S. Albracht, *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. A* **2005**, *363*, 937–954.
- [197] J. Hoeben, I. Heller, S. Albracht, C. Dekker, S. Lemay, H. Heering, *Langmuir* **2008**, *24*, 5925–5931.
- [198] E. Lojou, X. Luo, N. Candoni, M. Brugna, S. Dementin, M. T. Giudici-Orticoni, *J. Biol. Inorg. Chem.* **2008**, *13*, 1157–1167.
- [199] C. Madden, M. Vaughn, I. Diez-Perez, K. Brown, P. King, D. Gust, A. Moore, T. Moore, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 1577–1582.
- [200] N. Wisitruangsakul, P. Lenz, M. Ludwig, B. Friedrich, F. Lenzian, P. Hildebrandt, I. Zebger, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 611–613; *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 621–623.
- [201] D. Millo, P. Hildebrandt, M. Pandelia, W. Lubitz, I. Zebger, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 2632–2634; *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 2680–2683.
- [202] T. Utesch, D. Millo, A. Castro, P. Hildebrandt, I. Zebger, M. Mroginiski, *Langmuir* **2013**, *29*, 673–682.
- [203] C. Gutiérrez-Sánchez, D. Olea, M. Marques, V. Fernandez, I. Pereira, M. Vélez, A. De Lacey, *Langmuir* **2011**, *27*, 6449–6457.
- [204] O. Gutiérrez-Sanz, M. Marques, I. Pereira, A. De Lacey, W. Lubitz, O. Rüdiger, *J. Phys. Chem. Lett.* **2013**, *4*, 2794–2798.
- [205] B. Jin, G. X. Wang, D. Millo, P. Hildebrandt, X. H. Xia, *J. Phys. Chem. C* **2012**, *116*, 13038–13044.
- [206] J. Chen, X. Zheng, F. Miao, J. Zhang, X. Cui, W. Zheng, *J. Appl. Electrochem.* **2012**, *42*, 875–881.
- [207] T. Kihara, X. Liu, C. Nakamura, K. Park, S. Han, D. Qian, K. Kawasaki, N. Zorin, S. Yasuda, K. Hata, T. Wakayama, J. Miyake, *Int. J. Hydrogen Energy* **2011**, *36*, 7523–7529.
- [208] A. de Poulpique, A. Ciaccava, E. Lojou, *Electrochim. Acta* **2014**, *126*, 104–114.
- [209] C. Gutiérrez-Sánchez, W. Jia, Y. Beyl, M. Pita, W. Schuhmann, A. De Lacey, L. Stoica, *Electrochim. Acta* **2012**, *82*, 218–223.
- [210] X. Wang, M. Falk, R. Ortiz, H. Matsumura, J. Bobacka, R. Ludwig, I. Bergelin, L. Gorton, S. Shleev, *Biosens. Bioelectron.* **2012**, *31*, 219–225.
- [211] D. Pankratov, Y. Zeifman, A. Dudareva, G. Pankratova, M. Khlopova, Y. Parunova, D. Zajtsev, N. Bashirova, V. Popov, S. Shleev, *Acta Nat.* **2014**, *6*, 102–106.
- [212] K. Murata, K. Kajiya, N. Nakamura, H. Ohno, *Energy Environ. Sci.* **2009**, *2*, 1280–1285.
- [213] D. Brondani, B. de Souza, A. Neves, I. Vieira, *Biosens. Bioelectron.* **2013**, *42*, 242–247.
- [214] M. Opallo, R. Bilewicz, *Adv. Phys. Chem.* **2011**, 2011.
- [215] M. Holzinger, A. Le Goff, S. Cosnier, *Electrochim. Acta* **2012**, *82*, 179–190.
- [216] S. Minteer, P. Atanassov, H. Luckarift, G. Johnson, *Mater. Today* **2012**, *15*, 166–173.
- [217] A. de Poulpique, A. Ciaccava, S. Benomar, M. T. Giudici-Orticoni, E. Lojou in *Synthesis and applications of carbon nanotubes and their composites*, (Ed.: S. Suzuki), Intech, **2013**, pp. 433–466.
- [218] G. Gupta, C. Lau, V. Rajendran, F. Colon, B. Branch, D. Ivnitski, P. Atanassov, *Electrochem. Commun.* **2011**, *13*, 247–249.
- [219] A. Habrioux, G. Merle, K. Servat, S. Tingry, K. Kokoh, *Electrochim. Acta* **2010**, *55*, 7701–7705.
- [220] K. Szot, A. de Poulpique, A. Ciaccava, H. Marques, M. Jonsson-Niedziolka, J. Niedziolka, F. Marken, E. Lojou, M. Opallo, *Electrochim. Acta* **2013**, *111*, 434–440.
- [221] A. Healy, H. Reeve, A. Parkin, K. Vincent, *Electrochim. Acta* **2011**, *56*, 10786–10790.
- [222] S. Ha, Y. Wee, J. Kim, *Top Catal.* **2012**, *55*, 1181–1200.
- [223] W. Feng, P. Ji, *Biotechnol. Adv.* **2011**, *29*, 889–895.
- [224] K. Behler, S. Osswald, H. Ye, S. Dimovski, Y. Gogotsi, *J. Nanopart. Res.* **2006**, *8*, 615–625.
- [225] J. Pinson, F. Podvorica, *Chem. Soc. Rev.* **2005**, *34*, 429–439.
- [226] F. Giroud, S. Minteer, *Electrochem. Commun.* **2013**, *34*, 157–160.
- [227] L. Hussein, S. Rubenwolf, F. von Stetten, G. Urban, R. Zengert, M. Krueger, S. Kersenmacher, *Biosens. Bioelectron.* **2011**, *26*, 4133–4138.
- [228] A. Zebda, C. Gondran, A. Le Goff, M. Holzinger, P. Cinquin, S. Cosnier, *Nat. Commun.* **2011**, *2*, 370.
- [229] N. Lalaoui, K. Elouarzaki, A. Le Goff, M. Holzinger, S. Cosnier, *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 9281–9283.
- [230] A. De Poulpique, A. Ciaccava, K. Szot, B. Pillain, P. Infossi, M. Guiral, M. Opallo, M. T. Giudici-Orticoni, E. Lojou, *Electroanalysis* **2013**, *25*, 685–695.
- [231] S. Krishnan, F. Armsstrong, *Chem. Sci.* **2012**, *3*, 1015–1023.
- [232] T. Miyake, K. Haneda, S. Yoshino, M. Nishizawa, *Biosens. Bioelectron.* **2013**, *40*, 45–49.
- [233] T. McDonald, D. Svedruzic, Y. Kim, H. Blackburn, S. Zhang, P. King, M. Heben, *Nano Lett.* **2007**, *7*, 3528–3534.
- [234] Y. Zhu, Z. Sui, T. Zhao, Y. Dai, Z. Cheng, W. Yuan, *Carbon* **2005**, *43*, 1694–1699.
- [235] G. Strack, H. Luckarift, S. Sizemore, R. Nichols, K. Farrington, P. Wu, P. Atanassov, J. Niffinger, G. Johnsson, *Bioresour. Technol.* **2013**, *128*, 222–228.
- [236] A. Che, V. Germain, M. Cretin, D. Cornu, C. Innocent, S. Tingry, *New J. Chem.* **2011**, *35*, 2848–2853.
- [237] A. de Poulpique, H. Marques-Knopf, V. Wernert, R. Gadiou, M. T. Giudici-Orticoni, E. Lojou, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2014**, *16*, 1366–1378.
- [238] W. Zheng, H. Zhou, Y. Zheng, N. Wang, *Chem. Phys. Lett.* **2008**, *457*, 381–385.
- [239] X. Wang, J. Wang, H. Cheng, P. Yu, J. Ye, L. Mao, *Langmuir* **2011**, *27*, 11180–11186.
- [240] B. Devadas, V. Mani, S. Chen, *Int. J. Electrochem. Sci.* **2012**, *7*, 8064–8075.
- [241] K. Prasad, Y. Chen, P. Chen, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2014**, *6*, 3387–3393.
- [242] I. Pavlidis, M. Patila, U. Bornscheuer, D. Gournis, H. Stamatis, *Trends Biotechnol.* **2014**, *32*, 312–320.
- [243] A. Healy, P. Ash, O. Lenz, K. Vincent, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, *15*, 7055–7059.
- [244] D. Fried, K. Tropp, M. Fröba, *ChemCatChem* **2013**, *5*, 931–938.
- [245] J. Wang, Q. Chen, X. Liu, W. Qiao, D. Long, L. Ling, *Mater. Chem. Phys.* **2011**, *129*, 1035–1041.
- [246] R. Gadiou, A. Didion, R. Gearba, D. Ivanov, I. Czekaj, R. Kötz, C. Vix-Guterl, *J. Phys. Chem. Solids* **2008**, *69*, 1808–1814.
- [247] V. Flexer, N. Brun, O. Courjean, R. Backov, N. Mano, *Energy Environ. Sci.* **2011**, *4*, 2097–2106.
- [248] V. Flexer, N. Brun, M. Destribat, R. Backov, N. Mano, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, *15*, 6437–6445.
- [249] C. Li, Y. Tian, W. Shao, C. Yuan, K. Wang, X. Xia, *Electrochem. Commun.* **2014**, *42*, 1–5.
- [250] H. Wen, H. Bambhania, S. Barton, *J. Appl. Electrochem.* **2012**, *42*, 145–151.
- [251] A. Cernat, A. Le Goff, M. Holzinger, R. Sandulescu, S. Cosnier, *Anal. Bioanal. Chem.* **2014**, *406*, 1141–1147.
- [252] R. Rawal, C. Chawla, C. Pundir, *Anal. Biochem.* **2011**, *419*, 196–204.

- [253] R. Rincón, C. Lau, H. Luckarift, K. Garcia, E. Adkins, G. Johnson, P. Atanassov, *Biosens. Bioelectron.* **2011**, *27*, 132–136.
- [254] A. Both Engel, A. Cherifi, S. Tingry, D. Cornu, A. Peigney, C. Laurent, *Nanotechnology* **2013**, *24*, 245402.
- [255] M. Sosna, L. Stoica, E. Wright, J. Kilburn, W. Schuhmann, P. Bartlett, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2012**, *14*, 11882–11885.
- [256] H. Alves, C. Junior, R. Niklevic, E. Frigo, M. Frigo, C. Coimbra-Araujo, *Int. J. Hydrogen Energy* **2013**, *38*, 5215–5225.
- [257] P. Hallenbeck, M. Abo-Hashesh, D. Ghosh, *Bioresour. Technol.* **2012**, *110*, 1–9.
- [258] P. Hallenbeck, J. Benemann, *Int. J. Hydrogen Energy* **2002**, *27*, 1185–1193.
- [259] D. Levin, L. Pitt, M. Love, *Int. J. Hydrogen Energy* **2004**, *29*, 173–185.
- [260] K. Srirangan, M. Pyne, C. Peery Chou, *Bioresour. Technol.* **2011**, *102*, 8589–8604.
- [261] B. Tamburic, F. Zemichael, G. Maitland, K. Hellgardt, *Int. J. Hydrogen Energy* **2011**, *36*, 7872–7876.
- [262] J. Mckinlay, C. Harwood, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2010**, *21*, 244–251.
- [263] P. King, *Biochim. Biophys. Acta* **2013**, *1827*, 949–957.
- [264] M. Wilker, K. Shinopoulos, K. Brown, D. Mulder, P. King, G. Dukovic, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 4316–4324.
- [265] J. Holladay, J. Hu, D. King, Y. Wang, *Catal. Today* **2009**, *139*, 244–260.
- [266] S. Rittmann, C. Herwig, *Microb. Cell Fact.* **2012**, *11*, 115.
- [267] F. Hawkes, I. Hussy, G. Kyazze, R. Dinsdale, D. Hawkes, *Int. J. Hydrogen Energy* **2007**, *32*, 172–184.
- [268] N. Lane, W. Martin, *Cell* **2012**, *151*, 1406–1416.
- [269] X. Guo, E. Trably, E. Latrille, H. Carrere, J. P. Steyer, *Int. J. Hydrogen Energy* **2010**, *35*, 10660–10673.
- [270] M. Temudo, G. Muyzer, R. Kleerebezem, M. van Loosdrecht, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, *80*, 1121–1130.
- [271] J. Wang, W. Wan, *Int. J. Hydrogen Energy* **2009**, *34*, 799–811.
- [272] M. Quéméneur, J. Hamelin, E. Latrille, J. P. Steyer, E. Trably, S. Benomar, M. T. Giudici-Ortoni, *Int. J. Hydrogen Energy* **2011**, *36*, 3870–3879.
- [273] F. Monlau, A. Barakat, E. Trably, C. Dumas, J. P. Steyer, H. Carrere, *Crit. Rev. Env. Sci. Technol.* **2013**, *43*, 260–322.
- [274] H. Zhao, K. Ma, Y. Lu, C. Zhang, L. Wang, X. Xing, *Int. J. Hydrogen Energy* **2009**, *34*, 186–194.
- [275] S. Li, C. Lai, Y. Cai, X. Yang, S. Yang, M. Zhu, J. Wang, X. Wang, *Bioresour. Technol.* **2010**, *101*, 8718–8724.
- [276] G. Cai, B. Jin, P. Monis, C. Saint, *Biotechnol. Adv.* **2011**, *29*, 375–387.
- [277] X. Zhang, X. Ye, K. Finneran, J. Zilles, E. Morgenroth, *Biotechnol. Bioeng.* **2013**, *110*, 164–172.
- [278] C. Hung, Y. Chang, Y. Chang, *Bioresour. Technol.* **2011**, *102*, 8437–8444.
- [279] P. Saraphirom, A. Reungsang, *Int. J. Hydrogen Energy* **2011**, *36*, 8765–8773.
- [280] J. Masset, M. Calusinska, C. Hamilton, S. Hilgsmann, B. Joris, A. Willmotte, P. Thonart, *Biotechnol. Biofuels* **2012**, *5*, 35.
- [281] D. Ranava, S. Benomar, E. Trably, E. Lojou, M. T. Giudici-Ortoni, *V International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology*, Madrid, Spain, **2013**, p. 111.
- [282] J. Ditzig, H. Liu, B. Logan, *Int. J. Hydrogen Energy* **2007**, *32*, 2296–2304.
- [283] S. Chen, G. He, Q. Liu, F. Harnisch, Y. Zhou, Y. Chen, M. Hanif, S. Wang, X. Peng, H. Hou, U. Schröder, *Energy Environ. Sci.* **2012**, *5*, 9769–9772.
- [284] D. Pant, A. Singh, G. Van Bogaert, S. Irving Olsen, P. Singh Nigam, L. Diels, K. Vanbroekhoven, *RSC Adv.* **2012**, *2*, 1248–1263.
- [285] T. Tommasi, B. Ruggeri, S. Sanfilippo, *J. Cleaner Prod.* **2012**, *34*, 91–97.
- [286] A. Kundu, J. Sahu, G. Redzwan, M. Hashim, *Int. J. Hydrogen Energy* **2013**, *38*, 1745–1757.
- [287] S. Varfolomeev, A. Yaropolov, I. Berezin, M. Tarasevich, V. Bogdanovskaya, *Bioelectrochem. Bioenerg.* **1977**, *4*, 314–326.
- [288] A. Karyakin, S. Morozov, E. Karyakina, N. Zorin, V. Pereylygin, S. Cosnier, *Biochem. Soc. Trans.* **2005**, *33*, 73–75.
- [289] T. Woolerton, K. Vincent, *Electrochim. Acta* **2009**, *54*, 5011–5017.
- [290] N. Mano, J. Fernandez, Y. Kim, W. Shin, A. Bard, A. Heller, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 15290–15291.
- [291] S. Tsujimura, M. Fujita, H. Tatsumi, K. Kano, T. Ikeda, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2001**, *3*, 1331–1335.
- [292] B. Pohorelic, A. Dolla, E. Lojou, J. K. Voordouw, G. Voordouw, *J. Bacteriol.* **2002**, *184*, 679–686.
- [293] E. Lojou, M. C. Durand, A. Dolla, P. Bianco, *Electroanalysis* **2002**, *14*, 913–922.
- [294] M. Tarasevich, V. Bogdanovskaya, N. Zagudaeva, A. Kapustin, *Russian J. Electrochem.* **2002**, *38*, 335–335.
- [295] A. Karyakin, M. Karyakina, V. Morozov, M. Vagin, S. Varfolomeev, Patent WO 2004114494A2, **2004**.
- [296] K. Vincent, J. Cracknell, O. Lenz, I. Zebger, B. Friedrich, F. Armstrong, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 16951–16954.
- [297] A. Ciaccava, A. de Poulpique, V. Techer, M. T. Giudici-Ortoni, S. Tingry, C. Innocent, E. Lojou, *Electrochem. Commun.* **2012**, *23*, 25–28.
- [298] L. Xu, F. Armstrong, *Energy Environ. Sci.* **2013**, *6*, 2166–2171.
- [299] H. Sakai, T. Nakagawa, Y. Tokita, T. Hatazawa, T. Ikeda, S. Tsujimura, K. Kano, *Energy Environ. Sci.* **2009**, *2*, 133–138.
- [300] T. Matsumoto, S. Eguchi, H. Nakai, T. Hibino, K. S. Yoon, S. Ogo, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 8895–8898; *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 9041–9044.
- [301] J. L. Popot, T. Althoff, D. Bagnard, J. L. Banères, P. Bazzacco, E. Billon-Denis, L. J. Catoire, P. Champeil, D. Charvolin, M. J. Cocco, G. Crémel, T. Dahmane, L. M. De la Maza, C. Ebel, F. Gabel, F. Giusti, Y. Gohon, E. Goormaghtigh, E. Guittet, J. H. Kleinschmidt, W. Kühlbrandt, C. Le Bon, K. L. Martinez, M. Picard, B. Pucci, J. N. Sachs, C. Tribet, C. van Heijenoort, F. Wien, F. Zito, M. Zoonens, *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* **2011**, *40*, 379–408.
- [302] V. Schröder, B. Emonts, H. Janßen, H. Schulze, *Chem. Eng. Technol.* **2004**, *27*, 847–851.
- [303] A. Wait, A. Parkin, G. Morley, L. dos Santos, F. Armstrong, *J. Phys. Chem. C* **2010**, *114*, 12003–12009.
- [304] A. Hamdam, B. Burlat, O. Gutierrez-Sanz, P. P. Liebgott, C. Baffert, A. De Lacey, M. Rousset, B. Guigliarelli, C. Léger, S. Dementin, *Nat. Chem. Biol.* **2013**, *9*, 15–17.
- [305] A. Ciaccava, C. Hamon, P. Infossi, V. Marchi, M. T. Giudici-Ortoni, E. Lojou, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, *15*, 16463–16467.
- [306] C. Hamon, A. Ciaccava, P. Infossi, R. Puppo, P. Even-Hernandez, E. Lojou, V. Marchi, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 4989–4992.
- [307] C. Agnès, M. Holzinger, A. Le Goff, B. Reuillard, K. Elouarzaki, S. Tingry, S. Cosnier, *Energy Environ. Sci.* **2014**, *7*, 1884–1888.
- [308] D. Pankratov, P. Falkman, Z. Blum, S. Shleev, *Energy Environ. Sci.* **2014**, *7*, 989–993.
- [309] S. Neto, J. Forti, A. De Andrade, *Electrocatalysis* **2010**, *1*, 87–94.
- [310] L. Huang, J. Regan, X. Quan, *Bioresour. Technol.* **2011**, *102*, 316–323.
- [311] T. Miyake, S. Yoshino, T. Yamada, K. Hata, M. Nishisawa, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 5129–5134.
- [312] S. Yoshino, T. Miyake, T. Yamada, K. Hata, M. Nishisawa, *Adv. Energy Mater.* **2013**, *3*, 60–64.
- [313] X. Cadet, X. Brilland, S. Gounel, F. Louerat, N. Mano, *ChemPhysChem* **2013**, *14*, 2097–2100.
- [314] O. Zadovny, A. Barrows, N. Zorin, J. Peters, T. Elgren, *J. Mater. Chem.* **2010**, *20*, 1065–1067.
- [315] A. Ciaccava, P. Infossi, M. T. Giudici-Ortoni, E. Lojou, *Langmuir* **2010**, *26*, 18534–18541.
- [316] J. Baur, A. Le Goff, S. Dementin, M. Holzinger, M. Rousset, S. Cosnier, *Int. J. Hydrogen Energy* **2011**, *36*, 12096–12101.
- [317] O. Rüdiger, A. Alsheikh Ougli, S. Pöller, N. Plumeré, W. Schuhmann, W. Lubitz, *10th International Hydrogen Conference*, Szeged, Hungary **2013**, pp. 120.
- [318] K. Kataoka, K. Tanaka, Y. Sakai, T. Sakurai, *Protein Expression Purif.* **2005**, *41*, 77–83.
- [319] P. Durão, Z. Chen, A. Fernandes, P. Hildebrandt, D. Murgida, S. Todorovic, M. Pereira, E. Melo, L. Martins, *J. Biol. Inorg. Chem.* **2008**, *13*, 183–193.
- [320] S. Sakasegawa, H. Ishikawa, S. Imamura, H. Sakuraba, S. Goda, T. Oshima, *Appl. Environ. Microbiol.* **2006**, *72*, 972–975.
- [321] L. Petersen, H. Degn, *Biochim. Biophys. Acta* **1978**, *526*, 85–92.
- [322] M. Machczynski, E. Vijgenboom, B. Samyn, G. Canters, *Protein Sci.* **2004**, *13*, 2388–2397.
- [323] X. E. Wu, Y. Z. Guo, M. Y. Chen, X. D. Chen, *Electrochim. Acta* **2013**, *98*, 20–24.
- [324] M. H. Osman, A. A. Shah, R. G. Wills, F. C. Walsh, *Electrochim. Acta* **2013**, *112*, 386–393.
- [325] C. Santoro, S. Babanova, P. Atanassov, B. K. Li, I. Ieropoulos, P. Critiani, *J. Electrochem. Soc.* **2013**, *160*, H720–H726.
- [326] C. Lau, E. R. Adkins, R. Ramasamy, H. Luckarift, G. Johnson, P. Atanassov, *Adv. Eng. Mater.* **2012**, *2*, 162–168.

- [327] W. Gellett, J. Schumacher, M. Kesmez, D. Le, S. Minteer, *J. Electrochem. Soc.* **2010**, *157*, B557–B562.
- [328] R. Morris, T. Schmidt, *Nat. Rev. Microbiol.* **2013**, *11*, 205–212.
- [329] C. Rice, W. Hempfling, *J. Bacteriol.* **1978**, *134*, 115–124.
- [330] O. Preisig, R. Zufferey, L. ThonyMeyer, C. Appleby, H. Hennecke, *J. Bacteriol.* **1996**, *178*, 1532–1538.
- [331] T. Melin, X. Meyer, S. Lankiang, S. Choi, R. Gennis, C. Blanck, M. Schmutz, P. Hellwig, *Electrochem. Commun.* **2013**, *26*, 105–108.
- [332] C. Nowak, D. Schach, J. Gebert, M. Grosserueschkamp, R. Gennis, S. Ferguson-Miller, W. Knoll, D. Walz, R. Naumann, *J. Solid State Electrochem.* **2011**, *15*, 105–114.
- [333] A. Haas, D. Pilloud, K. Reddy, G. Babcock, C. Moser, K. Blasie, L. Dutton, *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105*, 11351–11362.
- [334] M. Roger, C. Castelle, M. Guiral, P. Infossi, E. Lojou, M. T. Giudici-Orticoni, M. Ilbert, *Biochem. Soc. Trans.* **2012**, *40*, 1324–1329.
- [335] M. Roger, F. Biaso, C. Castelle, M. Bauzan, F. Chaspoul, E. Lojou, G. Sciara, S. Caffarri, M. T. Giudici-Orticoni, M. Ilbert, *PLoS One* **2014**, *9*, e98941.

Received: July 22, 2014

Published online on ■ ■ ■, 2014

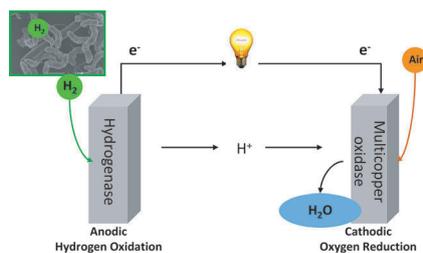
REVIEWS

A. de Poulpiquet, D. Ranava, K. Monsalve,
M.-T. Giudici-Ortoni, E. Lojou*



Biohydrogen for a New Generation of H₂/O₂ Biofuel Cells: A Sustainable Energy Perspective

Special
Issue



Enzymes deliver: H₂/O₂ biofuel cells based on hydrogenase and multicopper oxidase as biocatalysts are emergent and promising sustainable electricity delivering devices. Here, the latest developments in this important field are examined and evaluated.

Dans la nature, les réactions de réduction de l'oxygène et d'oxydation de l'hydrogène sont catalysées par des enzymes de la famille des oxydoréductases. Ces catalyseurs spécifiques, efficaces, renouvelables et biodégradables constituent une alternative séduisante au platine dans les procédés comme les piles à combustible. L'immobilisation à des interfaces nanostructurées de l'hydrogénase membranaire tolérante à l'oxygène extraite de la bactérie hyperthermophile *Aquifex aeolicus*, et de la bilirubine oxydase thermostable extraite de la bactérie *Bacillus pumilus*, a été étudiée dans cette optique.

L'électrochimie et la dynamique moléculaire ont permis d'affiner le modèle d'orientation de l'hydrogénase sur les surfaces planes. L'efficacité de l'immobilisation de l'hydrogénase sur différents nanomatériaux carbonés (nanoparticules, nanotubes et nanofibres de carbone) nanostructurant la surface de l'électrode a été évaluée. En particulier, les nanofibres de carbone en arrêtes de poisson ont permis de former une bioanode efficace pour l'oxydation de l'H₂ en l'absence de médiateurs redox. L'étude a souligné l'importance d'un transport efficace du substrat au sein du film carboné mésoporeux. Les nanofibres de carbone ont également été utilisées comme matériau d'électrode pour réaliser la première connexion directe de la bilirubine oxydase. L'existence d'une forme resting alternative de l'enzyme, influencée par les ions chlorures, le pH et la température, a été mise en évidence. Une biocathode efficace pour la réduction de l'oxygène a été développée.

Les deux électrodes thermostables ont permis le développement de la 1^{ère} biopile H₂-O₂ qui délivre des densités de puissance supérieures au mW.cm⁻² sur une large gamme de température. Ce résultat ouvre la voie à l'alimentation électrique de dispositifs de faibles puissances.

Mots clés : Hydrogénase ; Bilirubine oxydase ; Hyperthermophile ; Nanostructuration ; Nanofibres de carbone ; Forme resting alternative ; Electrochimie ; Biopile à combustible

The oxygen reduction and the hydrogen oxidation reactions are realized in nature by oxidoreductase enzymes. These highly efficient, specific, renewable and biodegradable catalysts appear as a seducing alternative to platinum in fuel cell devices. The immobilization at nanostructured interfaces of the membrane-bound oxygen-tolerant hydrogenase from the hyperthermophilic bacterium *Aquifex aeolicus*, and of the thermostable bilirubin oxidase from *Bacillus pumilus*, has been studied within this objective.

Electrochemistry and molecular dynamics have been used to validate the orientation model of the hydrogenase at planar electrodes. Hydrogenase immobilisation in 3D-networks based on various carbon materials (nanoparticles, nanotubes and nanofibers) has been especially studied. Fishbone carbon nanofibers were demonstrated to provide an efficient platform for mediatorless H₂ oxidation. Mass transport inside the carbon mesoporous film has been especially studied and demonstrated to be one of the limitations of the catalytic efficiency. Direct electrical connection of bilirubin oxidase has also been realized for the first time thanks to its immobilization on carbon nanofiber films. An alternative resting form of the enzyme, influenced by chlorides, pH and temperature, has been evidenced. An efficient biocathode for the oxygen reduction reaction has been developed.

Thanks to the two thermostable electrodes, the first H₂-O₂ bio fuel cell able to deliver power densities over 1 mW.cm⁻² over a large temperature range has been developed. This result paves the way for the electrical alimentation of low-power devices.

Key words : Hydrogenase ; Bilirubin oxidase ; Alternative resting form ; Hyperthermophile ; Nanostructuration ; Carbon nanofibers ; Electrochemistry ; Bio fuel cell