



AVERTISSEMENT

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

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

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

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

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

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

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

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



Master 2 Biotechnologies, Microbiologie, Aliment, Nutrition, Environnement
Spécialité Microbiologie Environnementale et Sanitaire (MES)

Elaboration d'un biofilm artificiel électroactif

Rapport déposé le 13 Juin 2014

Par

PINCK Stéphane

Stage effectué du 13 janvier 2014 au 4 juillet 2014
Travaux dirigés par ETIENNE Mathieu (CR) et JORAND Frédéric (PR)

AU
LABORATOIRE DE CHIMIE PHYSIQUE ET MICROBIOLOGIE POUR
L'ENVIRONNEMENT (LCPME)
UMR 7564

405, rue de Vandoeuvre, F-54600 Villers-lès-Nancy (France)



Remerciement

Je tiens à remercier monsieur Alain WALCARIUS, directeur du LCPME pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire afin d'effectuer mon stage de master 2.

Je remercie mes encadrants, Frédéric JORAND et Mathieu ETIENNE pour leur temps, leurs explications et leurs soutiens pendant ces 6 mois de stages.

Je remercie également Laurence MATHIEU pour les manipulations de cytométrie en flux sur le site du pôle de l'eau.

Je souhaite également à remercier l'ensemble des thésards de l'équipe MIC sur Villers-lès-Nancy : Marjorie ETIQUE, Baptiste MAITTE, Paul-Philippe REMY ainsi que Florence GOSSELIN pour leurs conseils et l'aide apportés pour certaines manipulations.

Je tiens enfin à remercier l'ensemble du personnel sur le site de Villers-lès-Nancy pour leurs bonnes humeurs et pour m'avoir accueilli au sein du laboratoire.

Abréviation

AFM : microscope à force atomique

ADN : Acide désoxiribonucléique

ARN : Acide ribonucléique

Cells : Cellules

CNT : Nanotube(s) de carbone

EPS : Substances polymériques extracellulaires

GCE : Electrode de carbone vitreux

ITO : oxydes d'étain-indium

LPS : Lipopolysaccharides

MFC : Pile microbienne à combustible

MWCNT : Multi-Wall Carbon NanoTubes

PEI : polyéthylèneimine

PI : Iodure de propidium

nA : nanoampère

TSA : Trypticase soja agar

TSB : Trypticase soja bouillon

μ A : microampère

μ m : micromètre

Table des matières

I.	Biofilms et MFC	1
I.1.	Biofilms électroactifs	1
I.1.1.	Les biofilms	1
I.1.2.	L'électroactivité de la bactérie : du transfert intracellulaire entre accepteurs et donneurs internes au transfert extracellulaire entre la bactérie et des molécules externes	2
I.2.	Systèmes bioélectrochimiques	4
II.	Utilisation des nanofilaments de carbones dans un biofilm artificiel	5
II.1.	Biofilms artificiels	5
II.1.1.	Définition	5
II.1.2.	Sol-Gel	6
II.2.	Nanotubes de carbones (CNT).....	6
II.2.1.	Les CNT	6
II.2.2.	Toxicité des CNT	7
II.2.3.	Intérêt des CNT dans un biofilm électroactif artificiel	7
III.	Stratégie expérimentale	8
III.1.	Elaboration d'un biofilm artificiel électroactif par assemblage couche-par-couche	8
III.2.	Mesure de l'électroactivité du biofilm artificiel	8
IV.	Objectifs.....	9
V.	Matériels.....	10
V.1	Souches	10
V.2.	Condition de cultures	10
V.3.	Matériels électrochimiques	10
V.3.1.	Produits chimiques, solvants, additifs et médiateurs utilisés en électrochimie	10
V.3.2.	Préparation des suspensions de CNT.....	10
V.3.3.	Préparation des plaques ITO	11
V.3.4.	Préparation du sol	11
V.3.5.	Préparation des électrodes	11
VI.	Méthodes	11
VI.1.	Drop-coating	11
VI.2.	Voltampérométrie cyclique.....	11
VI.3.	Ampérométrie.....	12
VI.4.	Profilométrie	12
VI.5.	Microscopie optique	13
VI.6.	BacLight™ : analyse de la viabilité bactérienne	13

VII.	Elaboration d'un biofilm artificiel électroactif par assemblage couche-par-couche	14
VII.1.	Assemblage couche-par-couche bactérie/CNT	14
VII.1.1.	Détermination des temps d'immersions.....	14
VII.1.2.	Epaisseur du biofilm artificiel en fonction du nombre de cycles réalisés	15
VII.2.	Optimisation de l'homogénéité du biofilm artificiel	16
VII.2.1.	Les CNT : une cause importante de l'hétérogénéité de surface	16
VII.2.2.	Amélioration du procédé	16
VII.3.	Electrochimie du biofilm artificiel	18
VIII.	Cytotoxicité des CNT et limitation dans un biofilm artificiel	18
VIII.1.	Toxicité des CNT	18
VIII.1.1.	Modèle d'étude : Flocculat bactérie/CNT	19
VIII.1.2.	Electrochimie du flocculat	19
VIII.1.3.	Confirmation de l'état des bactéries par cytomarquage	20
VIII.2.	Limitation de la toxicité des CNT en présence de cytochrome c	20
VIII.2.1.	Floculation du modèle d'étude en présence de cytochrome c.....	20
VIII.2.2.	Electrochimie du flocculat	21
VIII.2.3.	Comparaison de l'état des bactéries en présence et en absence de cytochrome c dans le flocculat par cytofluorescence	22
VIII.3.	Optimisation du système	22
VIII.3.1.	Electrochimie du flocculat en présence de Sol-Gel	22
VIII.3.2.	Electrochimie du flocculat en présence de silice et cytochrome c	23
IX.	Discussion	24
IX.1.	Elaboration d'un biofilm artificiel électroactif	24
IX.1.1.	Influence du temps d'immersion sur l'épaisseur du biofilm artificiel formé	24
IX.1.2.	Relation entre l'épaisseur du biofilm et le nombre de cycle d'assemblage	24
IX.1.3.	Impact des CNT sur l'hétérogénéité de la structure	25
IX.1.4.	Absence d'électroactivité du biofilm artificiel formé.....	25
IX.2.	Autoassemblage en biofilm artificiel par floculation des souches en présence des CNT	26
IX.3.	Cytotoxicité des CNT	26
IX.3.1.	Cause de la cytotoxicité.....	26
IX.3.2.	Mécanisme d'atténuation de la cytotoxicité des CNT	27
IX.4.	Conclusion	27
X.	Perspective	28
X.I.	A court terme	28
X.I.1.	Amélioration des connaissances sur l'effet atténuateur de la cytotoxicité des CNT par le cytochrome c	28

X.I.2. Poursuite de l'étude sur l'épaisseur maximale atteignable par un biofilm artificiel formé en assemblage couche-par-couche	28
X.II. A moyen terme.....	29
X.II.1. Autoassemblage de biofilm artificiel électro actif.....	29
X.II.2. Test d'autres nanoparticules.....	29
X.III. A long terme	29
X.III.1. Adaptation du biofilm artificiel à des systèmes à visée écologique.....	29
X.III.2. Formation de biofilm artificiel cathodique.....	29

Introduction

I. Biofilms et MFC

I.1. Biofilms électroactifs

I.1.1. Les biofilms

I.1.1.a. Définition

Les bactéries sont présentes dans l'environnement sous deux formes : planctonique et sessile. Sous forme planctonique les bactéries sont isolées en suspension dans un milieu liquide. Sous forme sessile elles sont associées en structure complexe appelée biofilm. Les biofilms sont des communautés bactériennes organisées adhérant à un support et enrobées d'une matrice de substances polymériques extracellulaires (EPS). D'après la littérature, la matrice est constituée de molécules insolubles secrétées par les microorganismes (Jiao et al., 2011), de matières organiques et non organiques ainsi que de macromolécules provenant du milieu. Les supports peuvent être des métaux, des plastiques (Donlan, 2002), des instruments comme des cathéters, des tissus humains (Murga et al., 2001), des plantes, etc... Les biofilms peuvent être formés par toutes les bactéries de l'environnement (Hall-Stoodley et al., 2004). Ils peuvent aussi abriter des mycètes, des microinvertébrés et des algues (Brümmer et al., 2000).

I.1.1.b. Le phénotype biofilm

Le phénotype des bactéries du biofilm est différent de celles planctoniques avec des modifications structurales telles que la perte de flagelle (Klausen et al. 2006) et un profil d'expression génique différent (Jiao et al., 2011). Ainsi, dans les biofilms de *Pseudomonas aeruginosa*, l'expression des gènes associés aux stress nutritifs, métalliques ou encore à la dénitrification est multipliée par 10 (Folsom et al., 2010). La forme sessile est considérée comme la forme de vie bactérienne la plus commune à l'état naturel notamment dans les milieux humides ou aqueux (Hall-Stoodley et al., 2004). L'association de bactéries en biofilm est considérée comme une stratégie de survie et d'adaptation dans un milieu contraignant ou agressif, cela se transcrit par une résistance accrue des biofilms aux éléments toxiques. Booth et al. (2011) ont montré l'augmentation de la résistance aux métaux dans les biofilms de *P.fluorescens*.

I.1.1.c. Etapes de formation

La formation d'un biofilm se fait en plusieurs étapes (Figure 1).

Après contact avec le support une première étape est l'attachement réversible des bactéries. Cette fixation au support résulte de processus physiques, chimiques et biologiques (Katsikogianni and Missirlis, 2004) notamment par le rapprochement cellule/surface induit par les cils ou les flagelles de la bactérie sous forme planctonique (O'Toole et Kolter 1998) et par des interactions de type de van der Waals et électrostatiques (Gottenbos et al., 2000). La surface d'un support peut ne pas être favorable voir être défavorable à la fixation des bactéries. Un microfilm conditionnant (Donlan, 2002) peut alors

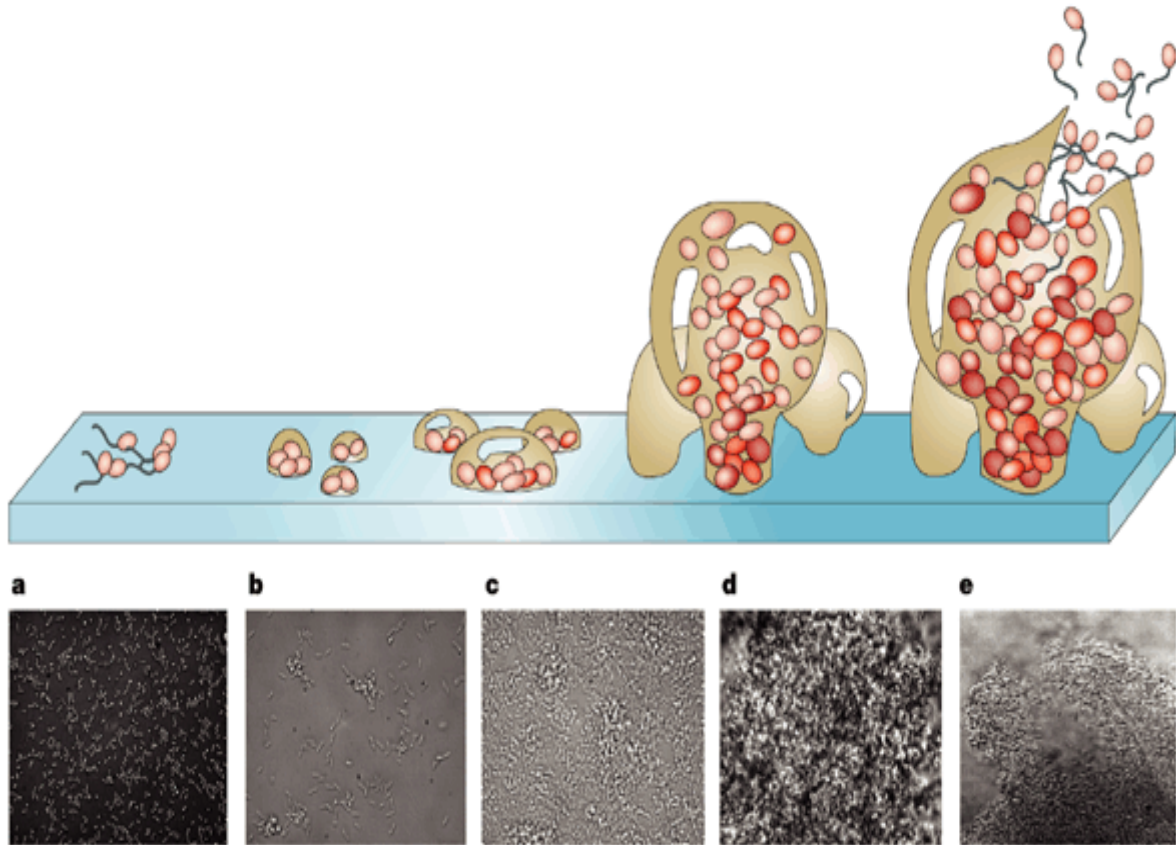


Figure 1. Etape de formation d'un biofilm. D'après Davies, 2003.

- a. Adhésion réversible de la bactérie au support*
- b. Adhésion irréversible de la bactérie au support et synthèse d'EPS*
- c. Formation de micro colonies*
- d. Maturation du biofilm en structures complexes*
- e. Erosion/ détachement du biofilm*

modifier les propriétés de la surface du matériau et créer un environnement favorable à l'adhésion des bactéries sur ce support.

Une seconde étape consiste en la sécrétion d'EPS et l'adaptation de la bactérie au support, rendant la fixation irréversible avec la surface.

La troisième étape consiste en la croissance de micro colonies. Les microcolonies sont issues de la croissance en agrégat de bactéries isolées sur le support. Chez *P.aeruginosa*, elle est favorisée par la présence de pili de type IV (O'Toole et Kolter, 1998). Au cours de l'étape de maturation du biofilm la structure spatiale du biofilm se met en place et dépend des conditions du milieu et des stress auxquels la communauté bactérienne est confrontée (Klausen et al., 2006). Le biofilm formé est hétérogène. Par microscopie confocale et laser il a été mis en évidence que les biofilms possèdent des lacunes et que leurs compositions d'un point à un autre varient (Costerton et al., 1994). La synthèse d'EPS qui commence dès l'attachement irréversible des bactéries se poursuit durant cette phase de maturation. Elle peut présenter jusqu'à 90% du volume du biofilm mature (Donlan, 2002). Les EPS sont essentielles dans le biofilm mature car ils sont impliqués dans les mécanismes de survie et de développement des bactéries. Wingender et al. (1999) citent dans ces fonctions la diffusion des nutriments dans le biofilm, la capture des nutriments et de molécules chargées négativement provenant du milieu externe et la résistance des bactéries aux stress environnementaux, aux biocides et antibiotiques. L'épaisseur maximale d'un biofilm est régulée par le détachement/érosion du biofilm (Sauer et al., 2002). Ce phénomène peut résulter de changements de conditions du milieu, de manques de nutriments ou des contraintes physiques et mécaniques imposés par le milieu.

Les biofilms sont aussi le lieu d'échange d'électrons entre les bactéries elles-mêmes et entre les bactéries et leur milieu. Ils participent à l'électroactivité des bactéries.

I.1.2. L'électroactivité de la bactérie : du transfert intracellulaire entre accepteurs et donneurs internes au transfert extracellulaire entre la bactérie et des molécules externes

L'électroactivité d'une cellule bactérienne est définie par sa capacité à échanger des électrons avec des accepteurs ou des donneurs externes en état naturel. Un biofilm électroactif désigne un biofilm capable de réaliser ces échanges. Ces transferts d'électrons sont générés par le catabolisme. Ces transferts d'électrons sont de deux types : intracellulaire et extracellulaire.

I.1.2.a. Les transferts intracellulaires d'électrons

Les transferts intracellulaire d'électrons ont lieu au cours des mécanismes du métabolisme énergétique de la bactérie et participent aux réactions d'oxydo-réduction des molécules nécessaires à son fonctionnement. Lors de la respiration aérobie, une cellule bactérienne va produire des électrons via les cytochromes présents dans son espace périplasmique. Un autre exemple des transferts intracellulaires d'électrons est la réduction intracellulaire du manganèse ou Fer notamment pour permettre le stockage du fer dans la cellule. Les électrons produits au cours de ces réactions métaboliques peuvent être ensuite

transférés à travers la membrane cytoplasmique et participer aux transferts d'électrons extracellulaires qui assurent l'électroactivité d'un biofilm.

I.1.2.b. Les transferts extracellulaires d'électrons

Ces transferts d'électrons se font en règle générale de la cellule vers un accepteur terminal extracellulaire, un exemple très étudié de ce mécanisme est la respiration extracellulaire anaérobie permettant la dégradation de matière organique en dioxyde de carbone. Cette activité métabolique peut être couplée à des activités métaboliques comme l'oxydation de chaînes courtes d'acide gras (Lovley et al., 1996) ou de polluants comme le toluène (Cervantes et al., 2001) ou le carbone tétrachlorure (Cervantes et al., 2004) en fonction du substrat « respiré ». Les électrons transférés aux accepteurs extracellulaires sont issus d'une cascade de transfert électronique à l'aide de protéines membranaires ou solubles transportant les électrons à travers la membrane interne, le périplasma puis la membrane externe. Des études ont identifié ces protéines en tant que cytochromes c, quinones et oxydases du cuivre (Myers and Myers., 1992 ; Francis et al., 2002 ; Metha et al., 2005 ; 2006) dans différentes espèces bactériennes. Dans l'exemple de la respiration de Fe(III) par *Shewanella spp* (Figure 2), un pool de quinone permet le transfert des électrons produits au niveau de la membrane interne lors des réactions de déshydrogénase vers CymA, un cytochrome c. Les électrons traversent ensuite le périplasma via d'autres cytochromes c catalysant des réactions d'oxydo-réductions comme la protéine MtrA pour ensuite être transférés aux niveaux d'OmcB et de la réductase terminale sur la membrane externe (Weber et al., 2006). Dans le milieu extracellulaire aura alors lieu la réduction de Fe(III) en Fe(II) par ces protéines de la membrane externe.

Les substrats subissant cette réaction d'oxydo-réduction via la respiration extracellulaire sont de natures diverses. Ils peuvent être insolubles ou partiellement solubles, de nature organique comme l'humus ou minérale et leur nature détermine l'approche utilisée par la bactérie pour interagir avec les protéines impliquées.

Les interactions entre le substrat et la bactérie au cours de la respiration extracellulaire sont plurielles : elle peut être directe ou indirecte (Figure 3). Une interaction directe est permise par un contact entre les protéines de la membrane externe catalysant la réduction avec le substrat (Figure 3). Ce type d'interaction est notamment observé chez *Geobacter spp*, en particulier *Geobacter sulfurreducens* (Nevin and Lovley., 2000) au cours de la respiration des minéraux (Fe(III), Mn(IV), ...) et plusieurs études ont montré que les protéines de la membrane externe impliquées sont des cytochromes c (Mehta et al., 2005). Le contact peut aussi être permis par un appendice électroactif ou conducteur (Figure 3). Ce cas de figure est noté chez *G. sulfurreducens* avec un pili de type IV chez les bactéries à distance du substrat (Reguera et al., 2005) et chez *Shewanella oneidensis* avec des pilus-like électroconducteurs dont l'activité électrique est cytochrome c dépendante (El-Naggar et al., 2010). D'après Gorby et al. (2006) de nombreux genres bactériens peuvent produire ces nanofilaments électroconducteurs en condition limitante d'accepteurs d'électrons extracellulaires.

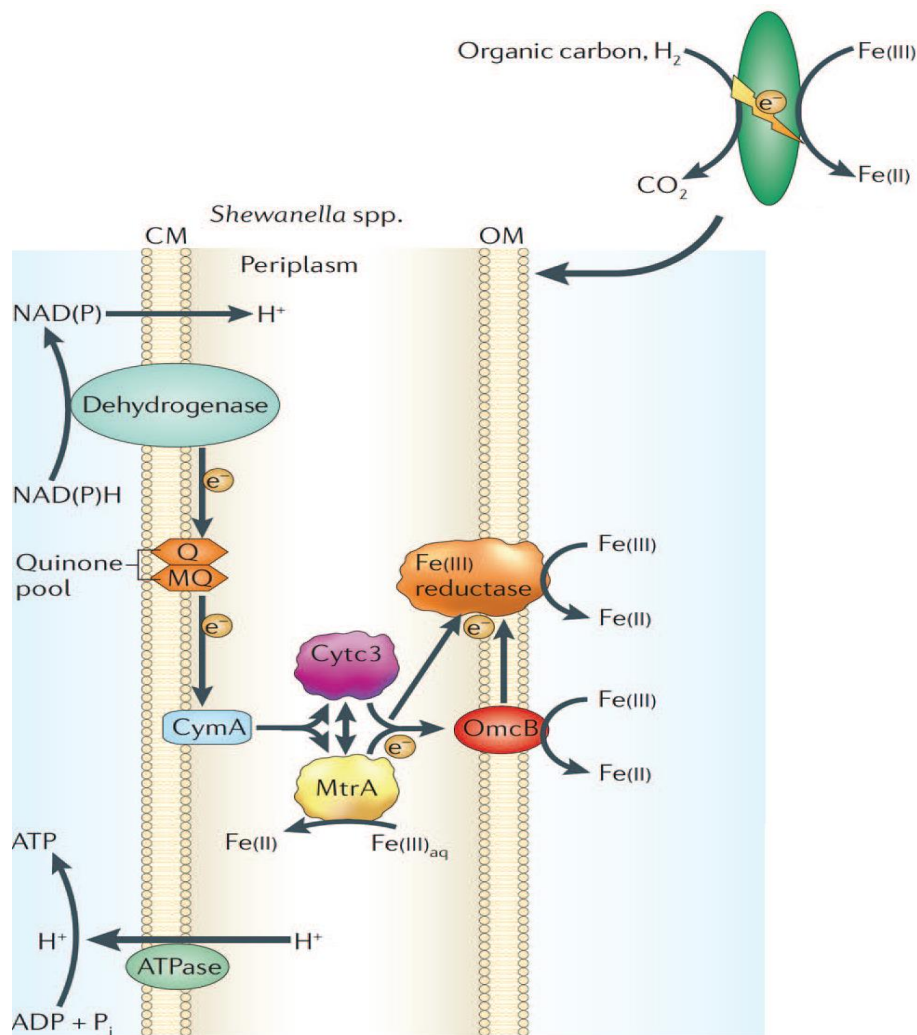


Figure 2. Respiration de Fe(III) par *Shewanella* spp. D'après Weber et al. (2006)

Représentation du mécanisme responsable des transferts d'électrons au cours de la respiration extracellulaire de Fe(III). CM : membrane cytoplasmique OM : membrane externe

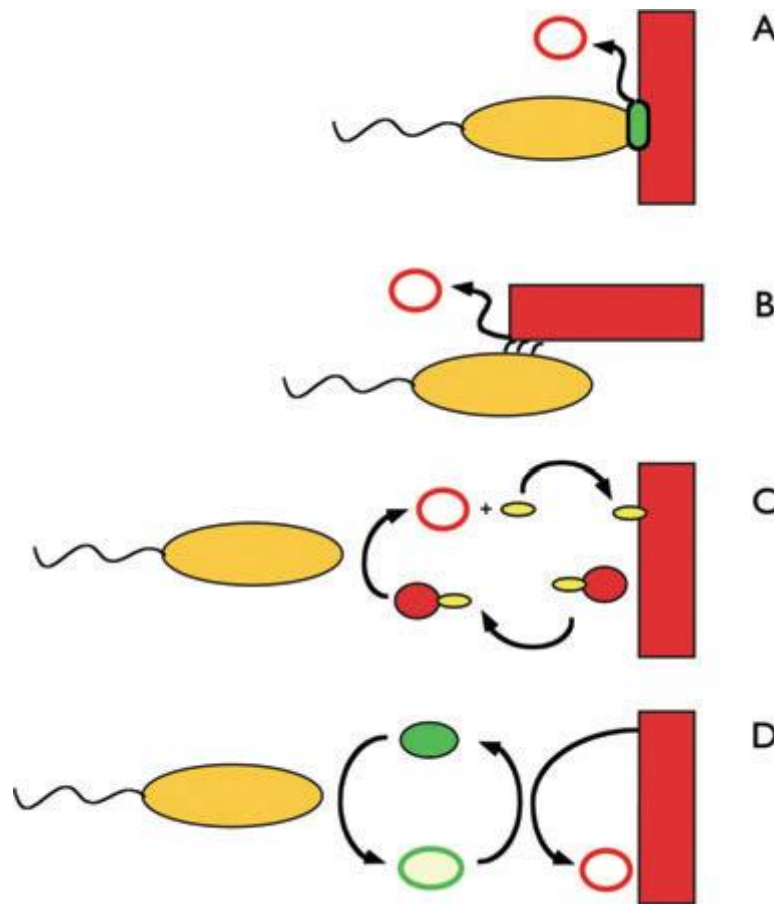


Figure 3. Les différents types d'interactions possibles entre la cellule et le support au cours des transferts extracellulaires d'électrons. D'après Gralnick et Newman (2007).

- A. *Contact direct entre la bactérie et l'accepteur d'électrons. Le support (e.g. : oxyde de fer) est représenté par le rectangle rouge. La bactérie par l'ovale jaune. Le support est réduit (flèche) en sa forme réduite (rond rouge) au niveau d'une protéine membranaire (ovale vert).*
- B. *Contact direct par un appendice cellulaire conducteur qui relie la bactérie au support.*
- C. *Contact indirect médié par des agents chélateurs. L'agent chélateur (petit ovale jaune) va piéger une molécule du support et l'amener à la cellule pour être réduite. Une fois réduite, l'agent chélateur n'a plus d'affinité pour le support et va libérer la molécule réduite.*
- D. *Contact indirect médié par une navette à électrons. La navette à électrons (rond vert) va catalyser la réduction du support et sera recyclée par la bactérie.*

Une interaction indirecte peut se faire via des petites molécules et protéines, soit en tant que navettes à électrons (Figure 3) ou agents chélateurs (Figure 3) qui vont médier l'interaction entre le substrat et la bactérie. Les agents chélateurs vont piéger, après reconnaissance par affinité de type ligand/récepteur, le substrat et l'emmener à la cellule pour être réduit, de façon extracellulaire (Lies et al., 2005) ou intracellulaire par des cytochromes c. Ce système est utilisé par de nombreuses bactéries comme *Geothrix fermentans* (Nevin and Lovley., 2002) *Shewanella algae* (Lovley et al., 2004). Les navettes à électrons catalysent, elles, le transfert d'électron entre la cellule et la surface des accepteurs solides et ont une grande importance au niveau des biofilms pour les cellules à distance du substrat (Nevin and Lovley., 2002b) ; Hernandez and Newman, 2001). Des études récentes montrent même que les flavines, des navettes à électrons synthétisées par *S. oneidensis*, est une voie majeure pour les transferts extracellulaires d'électrons de cette espèce (Kotolsky and Gralnick., 2012).

Au cours de ces dernières décennies, un modèle de transfert des électrons vers un support solide a été particulièrement étudié. Il s'agit du transfert des électrons vers des électrodes dans un système connu sous le nom de pile à combustible microbienne (microbial fuel cell ou MFC).

I.2. Systèmes bioélectrochimiques

La production d'électricité par les bactéries a été observée pour la première fois il y a une centaine d'année (Potter, 1911). Les biofilms électroactifs ont ensuite été mis en évidence dans des Piles à combustibles microbiennes avec une production d'électrons permise par l'oxydation de substrats par les bactéries. Shukla et al. (2004) montrent que cette production d'électrons peut aussi résulter de la fermentation du substrat par des bactéries. Cette stratégie est cependant limitée car les produits de fermentations interagissent faiblement avec les électrodes. Des études ultérieures montrent qu'il est possible de faire interagir directement le biofilm avec les électrodes : le modèle actuellement utilisé pour les MFC (Figure4). Ces études montrent que la bactérie peut considérer l'électrode comme un donneur (cathode) ou un accepteur (anode) d'électrons externes et transférer les électrons vers la cathode pour la production d'un courant (Rabaey et Verstraete, 2005).

Dans le cas d'une MFC anodique, le biofilm est en contact avec l'électrode dans le compartiment anodique et transfère des électrons à cette dernière. Les électrons passent de l'anode à la cathode par un circuit électrique externe. Au niveau de la cathode, l'électrode catalyse la réduction de l'oxygène en eau. Les deux compartiments sont séparés par une membrane semi-perméable à travers laquelle diffusent les protons nécessaires à la réaction de réduction présente dans le compartiment cathodique (Figure 4).

Des biofilms naturels capable d'interagir directement avec les électrodes sont connus à l'heure actuelle. De nombreuses études mettent en avant les biofilms dans les sédiments aquatiques (Tender et al., 2002). La famille bactérienne responsable en grande partie de cette activité électrique est *Geobacteraceae*. Des études par caractérisation de l'ARN 16 s dans ces biofilms montrent l'enrichissement de ce genre bactérien au contact des électrodes (Holmes et al., 2004). *Rhodospirillum rubrum*, *Desulfobulbus propionicus*, *Shewanella oneidensis* ou encore *Pseudomonas sp.* sont aussi

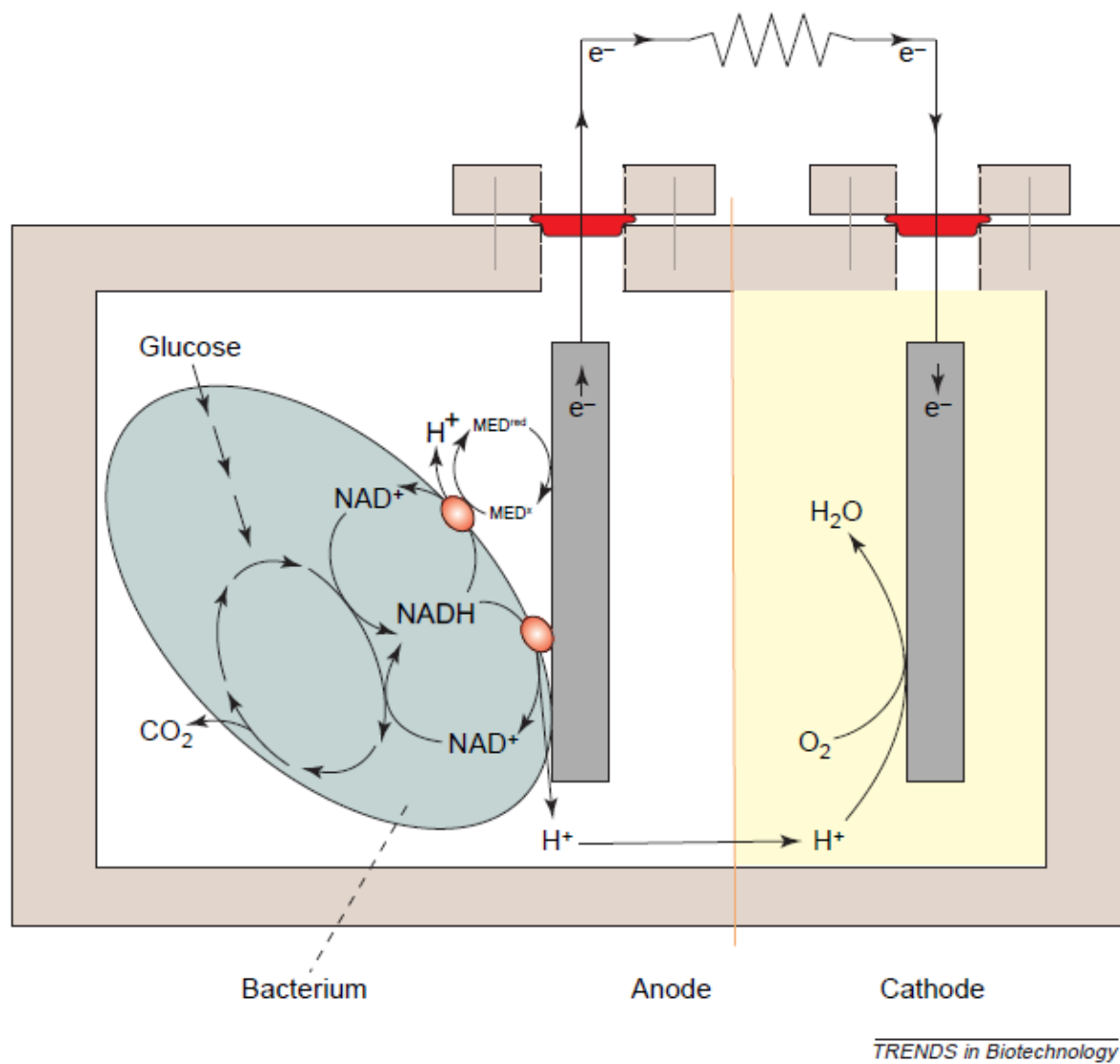


Figure 4. Schéma représentatif d'une « *microbial fuel cell* » (MFC) anodique. D'après Rabaey et Verstraete (2005)

En jaune est représentée la membrane semi-perméable séparant les deux compartiments.

décrits en tant que bactéries présentes dans les biofilms électroactifs. Capable d'oxyder les sucres, *R. ferriducens* interagit par contact direct avec l'électrode (Chaudhuri and Lovley 2003). *D. propionicus* est capable, elle, d'oxyder le soufre en sulfate pour transférer des électrons à l'anode (Holmes et al., 2004), une propriété intéressante dans des milieux riches en sulfites où la réduction abiotique des sulfites en soufres permet déjà de transférer des électrons à l'anode. *Shewanella sp.* est beaucoup étudiée du fait de la formation d'un pili conducteur en condition limitante. Ce genre est identifié en présence de cystéine dans les MFC (Logan et al., 2005) tandis que *Pseudomonas sp.* l'est en présence du glucose (Rabaey et al. 2004).

Les MFC peuvent être développés dans de nombreux domaines comme la bioremédiation ou l'analyse de polluants par biocapteurs mais aussi dans la recherche fondamentale afin de mieux cerner le phénomène de transfert extracellulaire d'électrons. L'intensité du signal électrique est proposée comme outils pour déterminer une pollution dans un milieu car le métabolisme des bactéries en présence du polluant influence la production de courant. La présence des bactéries sous forme de biofilms semblent cependant rendre cette utilisation des MFC peu convaincante (Patil et al., 2010). En bio remédiation des essais sont aussi tentés. En utilisant des électrodes en tant que donneur d'électrons on peut faire précipiter les l'uranium U^{VI} soluble en U^{IV} insoluble sur l'électrode et ainsi permettre la décontamination de sols contaminés par l'uranium (Gregory and Lovley, 2005). Les problèmes rencontrés dans ces situations résultent souvent de l'instabilité autant au niveau de la croissance et de la survie des bactéries que de la composition des biofilms naturels. Le contrôle et la stabilisation des biofilms bactériens dans les MFC permettraient de résoudre de tels écueils.

II. Utilisation des nanofilaments de carbones dans un biofilm artificiel

II.1. Biofilms artificiels

II.1.1. Définition

Une des approches à considérer pour mieux contrôler et stabiliser les biofilms bactériens pourrait être l'élaboration de biofilms artificiels. Un biofilm artificiel peut être défini comme un film bactérien mimant un biofilm où des bactéries d'une population monoclonale sont immobilisées sous forme d'un film bactérien. La croissance y est maîtrisée et la viabilité de la bactérie y est préservée également (Gach et al., 2014).

Une telle approche permet de maîtriser la croissance bactérienne dans les études de caractérisation de métabolisme ainsi que d'obtenir un matériel biologique aux capacités reproductibles et durables. Cette recherche a pour but de mieux maîtriser cette interaction bactéries-matériaux, notamment en tenant compte de la toxicité éventuelle de ces derniers et de favoriser une activité métabolique maîtrisée en optimisant notamment les transferts électroniques entre les bactéries et une électrode collectrice (Ghach et al., 2014).

II.1.2. Sol-Gel

La chimie sol-gel est basée sur la gélification progressive d'un sol, ici une suspension colloïdale en milieu aqueux. Le milieu aqueux et ce qu'il contient vont être emprisonnés dans le réseau tridimensionnel formé lors la gélification du sol. La chimie sol-gel est considérée comme une chimie douce mise en œuvre en conditions compatibles avec la manipulation de matériel biologique comme les protéines ou les cellules vivantes (Sanchez et al., 2010).

Une approche consiste à utiliser des précurseurs de silice en solution avec des protéines et/ou des bactéries. La gélification du mélange est plus ou moins rapide selon les concentrations des précurseurs et conduit à l'encapsulation du matériel biologique. Cette méthode a été utilisée par Gach et al. (2014) pour la construction d'un biofilm artificiel contenant des cytochromes C bovins et *Pseudomonas fluorescence* (Figure 5).

Une autre méthode utilisée pour générer des films sol-gel consiste en une gélification électrochimiquement assistée d'une solution de « sol ». Elle a d'abord été proposée par Sacham et al. (1999) avant d'être réalisée pour la fabrication de films sol-gel fonctionnels (Sibottier et al. 2006).

L'encapsulation des bactéries dans ce film sol-gel peut se réaliser en 2 étapes (Figure 6). La première consiste en l'immobilisation des bactéries avec du PEI (polyéthylèneimine) sur une plaque ITO (oxydes d'étain-indium) puis après ajout de la solution de « sol » une électrolyse pour le gélifier et encapsuler les bactéries dans le film sol-gel ainsi formé (Ghach et al., 2013).

L'encapsulation des bactéries permet d'augmenter leur taux de survie tout en empêchant leur croissance. Ghach et al. (2012) ont montré qu'après 1 mois dans la matrice sol-gel, plus de 50% des bactéries étaient préservées et actives. L'encapsulation de bactéries dans un film sol-gel forme un biofilm monocouche permettant la conservation des bactéries. Un « biofilm artificiel » présente donc un avantage dans les biotechnologies car elle permet une utilisation prolongée d'outils incorporant des microorganismes.

II.2. Nanotubes de carbones (CNT)

II.2.1. Les CNT

Les CNT sont des matériaux avec un potentiel d'application très élevé dans les domaines attenant à la biologie et à l'environnement du fait de leurs propriétés. Mise en œuvre pour la première fois par Iijima (1991), les CNT présentent des caractéristiques intéressantes. D'après la littérature, les CNT sont une forme de carbone apparentée aux fullerènes et sont synthétisés en mono (Iijima, 1991) ou multifeuillet. Leurs diamètres sont compris entre quelques nanomètres et plusieurs centaines de nanomètres. Ils sont conducteurs thermiques et électriques et sont très résistants et peu réactifs d'un point de vue chimique. Les propriétés de leurs surfaces peuvent aussi être modifiées chimiquement (Pandurangappa and Raghu, 2011). Ils sont classiquement utilisés dans l'industrie chimique et électronique du fait de leurs tailles, de leurs conductivités et de la capacité à les fonctionnaliser

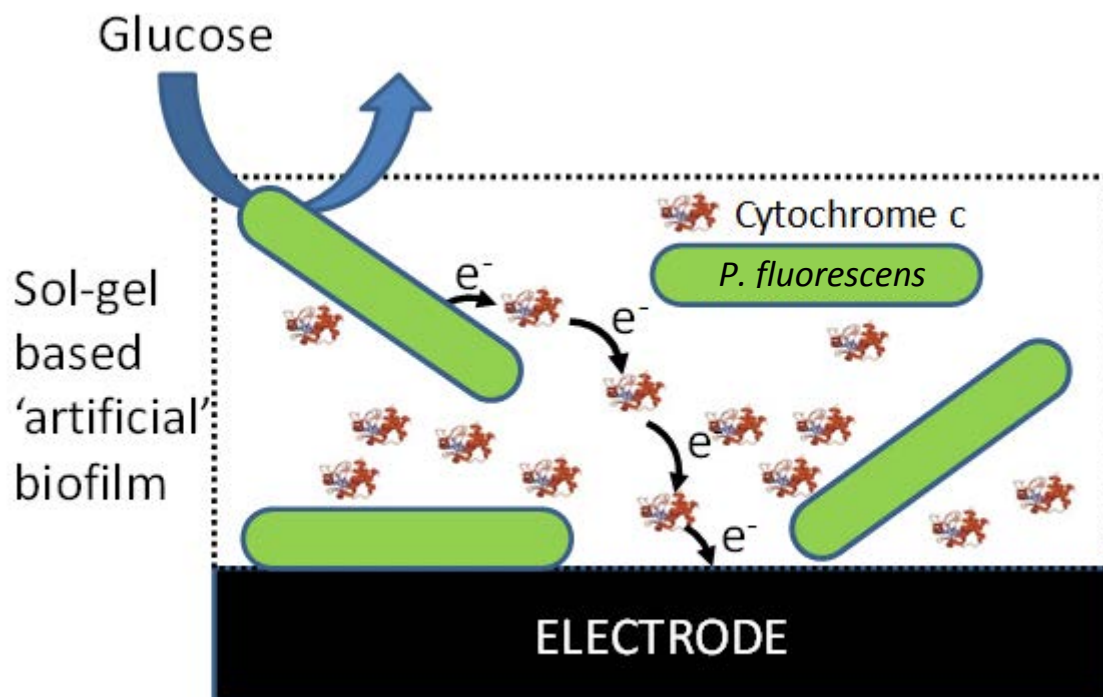


Figure 5. Représentation schématique d'un biofilm artificiel déposé sur électrode. D'après Ghach et al. (2014)

Les cytochromes C piégés avec les bactéries dans la silice permettent l'acheminement des électrons entre les bactéries éloignées et l'électrode. Les cytochromes C ont un rôle de médiateur redox dans la structure artificielle ainsi composée.

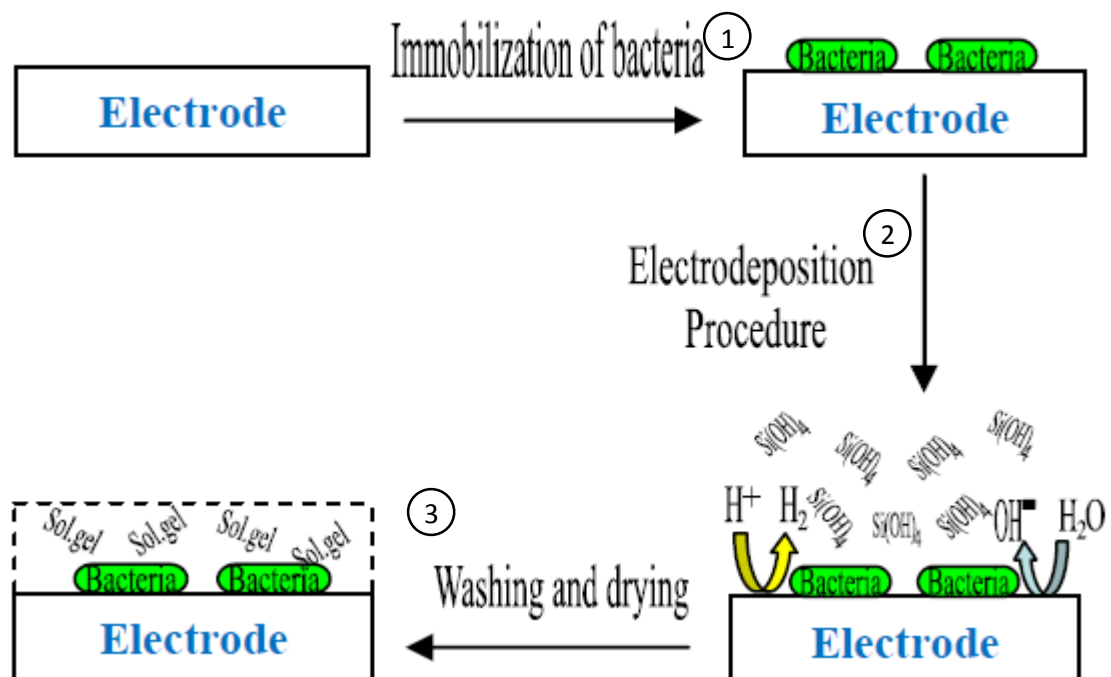


Figure 6. Schéma d'une immobilisation de bactérie dans un film de silice assistée par électrochimie (Ghach *et al.*, 2013).

Etape 1 : Immobilisation des bactéries sur l'électrode

Etape 2 : dépôt de silice assisté par électrochimie

Etape 3 : lavage et séchage

chimiquement. C'est ces caractéristiques qui permettent d'envisager leur utilisation dans les domaines attenants à la microbiologie et l'environnement. Des études ont montré qu'ils pouvaient être utilisés en tant qu'électrode modifiée dans des bio-senseurs (Timur., 2007) et les MFC (Dumitru et al., 2008 ; Sharma et al., 2008) mais aussi dans la bio remédiation (Yan et al., 2008) où ils interagissent avec les biofilms microbiens.

II.2.2. Toxicité des CNT

Plusieurs points sont cependant à prendre en compte avec les CNT. Ces composants représentent un danger environnemental (Rapport de l'ANSES, 2012). Leur toxicité pour les eucaryotes est à la fois physique de par leur taille très faible pouvant provoquer la mort de cellules par perforation et par leur génotoxicité. Des études in vivo ont montré le potentiel mutagène du produit (cassure d'ADN et formation de micronoyaux) (Ghosha et al., 2011 ; Kim et al., 2012). Les causes de la génotoxicité avancées sont notamment l'action des espèces oxygénées réactives générées par le contact des CNT avec les cellules sur l'ADN. Les CNT ont aussi un effet microbiocide important. Des études ont montré un effet biocide sur des colonies mono espèce isolées de bactéries (Kang et al., 2007; Simon-Deckers et al., 2009) et au niveau de biofilms sur des communautés bactériennes du sol (Chung et al., 2011) et de l'eau (Kang et al., 2009). Cet effet biocide est fonction du diamètre des CNT (Kang et al., 2008) est considéré comme la conséquence de 3 mécanismes : la perforation des pores membranaires par les CNT (Narayan et al., 2005), le stress oxydatif dû à la création d'espèces oxygénées entre la cellule et le CNT (Manna et al., 2005) et la toxicité des métaux (Shvedova et al., 2005). Des études plus récentes ont montré que la toxicité des métaux n'a qu'un impact mineur pour la cytotoxicité des CNT (Kang et al., 2007) et que l'effet cytotoxique est essentiellement basé sur l'interaction de la cellule avec le CNT. De plus, la capacité d'adsorption élevée des CNT fait d'eux un matériel adéquat pour immobiliser des bactéries (Upadhyayula et al., 2008 ; 2009 a et b) et renforce la capacité microbiocide des CNT. Au niveau environnemental, l'effet des nanotubes dépend essentiellement des caractéristiques du produit. Les effets nocifs de ce produit ne sont cependant démontrés qu'à concentration largement supérieure à celle présente par dissémination dans l'environnement et la nature multiple des CNT nécessitent des études complémentaires pour pouvoir clairement définir le potentiel cytotoxique de ce produit.

II.2.3. Intérêt des CNT dans un biofilm électroactif artificiel

Paradoxalement à leur effet microbiocide, des études ont montré l'utilisation des nanotubes dans la fixation des bactéries dans des biofilms. Leur utilisation est motivée par des caractéristiques intéressantes du produit, une fois l'effet cytotoxique limité. La capacité d'immobilisation des CNT est élevée pour les bactéries (Upadhyayula et al., 2008 ; 2009 a et b) et résulte de la formation de mésopores dans une solution de CNT. Elle permet de faciliter la phase précoce de formation de biofilms. Jeong et al. (2013) ont montré l'implication des CNT dans ces étapes précoces chez *S. oneidensis*. Par ailleurs des études ont montré le potentiel de ce produit au niveau des MFC, du fait de ses propriétés

conductrices. Les CNT peuvent être utilisées en tant que conducteurs et médiateur avec des bactéries électroactives ou non naturellement (Sharma et al., 2008). L'ensemble de ces critères fait des CNT un outil de choix dans la formation de biofilms artificiels électroactifs à condition de minimiser l'impact cytotoxique sur les bactéries et de pouvoir contrôler leur dissémination dans l'environnement.

III. Stratégie expérimentale

Afin d'élaborer un biofilm artificiel, une stratégie basée sur la méthode de l'assemblage couche-par-couche a été envisagée. Cette méthode est déjà utilisée en chimie des matériaux pour obtenir des structures électroactives (Zang et al., 2006). Les CNT utilisés pour former le biofilm avec les bactéries sont utilisés à des concentrations assez élevées pour théoriquement faciliter l'adsorption des CNT avec les bactéries sur le support. L'épaisseur du biofilm artificiel obtenu et son électroactivité sont ensuite mesurées. L'analyse de l'électroactivité du biofilm permet de mettre en évidence la capacité de la bactérie à transférer ses électrons avec le milieu extérieur et à fortiori son activité métabolique et sa survie dans le biofilm formé.

III.1. Elaboration d'un biofilm artificiel électroactif par assemblage couche-par-couche

L'assemblage couche-par-couche est une méthode utilisée en chimie des matériaux pour obtenir des structures électroactives. Cette méthode a déjà été utilisée, notamment avec les CNT et des particules d'or (Zang et al., 2006). Il s'agit de former une structure par empilement de couches de différents polymères/ associations de polymères deux par deux (Figure 7). La formation d'un film par une telle méthode est permise par les liaisons électrostatiques créées entre les polymères des différentes couches. Au cours de ce projet, la stratégie choisie pour élaborer un biofilm artificiel électroactif est basée sur cette méthode. Cette méthode permet de contrôler la formation et la composition du biofilm artificiel. La propriété d'immobilisation élevée des CNT pour les bactéries (Upadhyayula et al., 2008 ; 2009 a et b) permet de favoriser théoriquement l'obtention d'une structure multicouche. Les CNT ont pour rôle dans une telle structure de lier les différentes couches bactériennes entre elles et de supporter l'ensemble. Idéalement les propriétés conductrices des CNT permettraient ainsi à toutes les bactéries d'être mobilisées dans le transfert d'électrons vers un support extérieur. Il faut tout de même noter que dans notre cas les bactéries et les nanotubes de carbone présentent des charges similaires, étant négativement chargés, et que leur interaction mobilise d'autres forces que simplement les forces électrostatiques.

III.2. Mesure de l'électroactivité du biofilm artificiel

Afin d'obtenir une structure avec des bactéries métaboliquement actives, il est nécessaire de caractériser l'activité de ces dernières. Ces bactéries sont capables de transfert extracellulaire des électrons. Cette capacité se traduisant par la génération de courant par la structure, Il est donc possible de caractériser l'activité des bactéries via des tests électrochimiques, l'augmentation du métabolisme

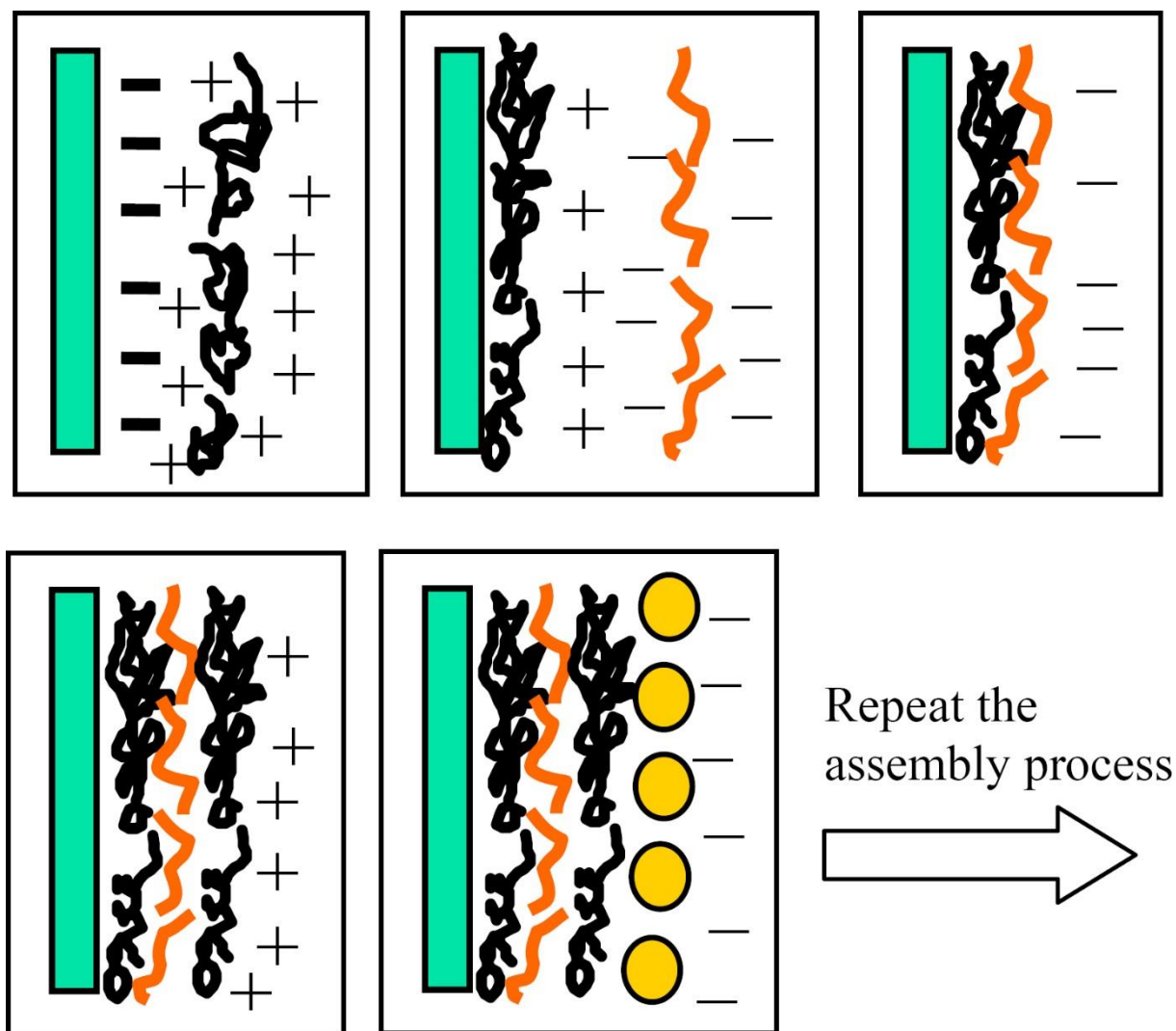


Figure 7. Assemblages couche-par-couche de polyelectrolytes/CNT et de polyelectrolytes/nanoparticules. D'après Cui and Wei (2007)

Les polyelectrolytes sont symbolisés par les traits noirs, les CNT par les traits oranges et les nanoparticules par les ronds jaunes. Ici n'est représenté qu'un seul cycle d'assemblage de la structure.

bactérien se traduisant par l'augmentation du courant généré par la structure. Ces tests électrochimiques sont de la voltampérométrie cyclique et de l'ampérométrie.

La voltampérométrie cyclique est une technique permettant d'obtenir de nombreuses indications en analyse électrochimique. Dans notre cas, elle permet de déterminer le potentiel d'oxydation des espèces redox impliquées dans les transferts électroniques entre les bactéries et l'électrode collectrice. Il est ainsi possible de déterminer le potentiel devant être appliqué dans les expériences d'ampérométrie.

L'ampérométrie permet de mesurer en fonction du temps et de la concentration en source de carbone (glucose, formiate de sodium) la réponse en courant du biofilm artificiel. C'est une mesure directe de l'activité métabolique des bactéries intégrées dans le biofilm artificiel. Ce courant augmentera avec l'ajout d'une source de carbone (glucose ou formiate) si les bactéries ont conservées une activité métabolique. L'absence de réponse en courant est alors indicative d'une absence d'activité métabolique.

IV. Objectifs

L'objectif de ce stage est de mettre au point un biofilm artificiel électroactif en utilisant des CNT.

Deux axes sont définis :

(i) Dans un premier temps est élaboré un biofilm artificiel par assemblage couche-par-couche. Une certaine homogénéité du dépôt et une épaisseur croissante avec le nombre de cycles effectués sont recherchées.

(ii) Dans un deuxième temps il s'agit de mesurer l'électroactivité d'un tel assemblage et de minimiser la cytotoxicité des CNT quand elle interfère avec la survie des bactéries dans une telle structure.

Matériels et méthodes

V. Matériels

V.1 Souches

Pseudomonas putida : La souche utilisée est fournie par le laboratoire. Elle est choisie car elle est capable de transférer les électrons au milieu extracellulaire. C'est une bactérie aérobie à la coloration Gram négative, flagellé. Sa température optimale de croissance est de 28°C.

Shewanella putrefaciens CIP 8040 : La souche utilisée est fournie par le laboratoire. Elle est choisie car elle exprime des cytochromes C sur sa membrane externe et est capable de transférer les électrons a milieux extracellulaire. C'est une bactérie anaérobie facultative à la coloration Gram négative. Sa température optimale de croissance est de 30°C

Shewanella oneidensis MR1 : La souche utilisée est fournie par le laboratoire. Elle est choisie car elle est capable de transférer les électrons au milieu extracellulaire à l'état naturel. C'est une bactérie anaérobie facultative à la coloration gram négative. Sa température optimale de croissance est de 30°C.

V.2. Condition de cultures

Les milieux utilisés sont détaillés dans le Tableau 1. Tous les milieux ont été autoclavés à 120°C durant 15 minutes.

Les souches *P. putida*, *S. putrefaciens* CIP8040 et *S. oneidensis* MR1 sont isolées dans un premier temps sur TSA. Une colonie isolée est ensuite cultivée en milieu TSB pendant 12 heures. Un volume de pré-culture équivalent à 0,1 de densité optique à 600 nm est inoculé dans du milieu TSB et incubé pendant 24 h pour *P. putida* et 48 h pour *S. putrefaciens* CIP8040 et *S. oneidensis* MR1.

La culture est centrifugée à 5000 g pendant 10 minutes à température ambiante. Le culot est lavé 2 fois dans 1mM KCl et remis en suspension dans 1 mM KCl afin d'éviter une reprise de croissance bactérienne. La suspension obtenue est utilisée directement ou conservée à 4°C pendant quelques jours.

V.3. Matériels électrochimiques

V.3.1. Produits chimiques, solvants, additifs et médiateurs utilisés en électrochimie

Les produits utilisés sont détaillés dans le Tableau 1.

Le tampon phosphate utilisé en analyse d'électrochimie est obtenue à partir de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($\geq 99,6\%$; Prolabo) et de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($\geq 99\%$; Fluka)

V.3.2. Préparation des suspensions de CNT.

10 mg de MWCNT (Multi-Wall Carbon Nanotubes) sont dispersés dans 20 mL d'eau ultra-pure par sonication pendant 30 minutes. La suspension obtenue est conservée sous agitation à température ambiante.

Milieux de culture					
Trypticase soy agar (TSA)			Trypticase soy broth (TSB)		
Casein peptone	15 g	Casein peptone	17 g		
Soya peptone	5 g	Soya peptone	3 g		
Sodium Chloride	5 g	Sodium Chloride	5 g		
Agar	15 g	Dipotassium hydrogen phosphate	2,5 g		
Deionized water	Qsp 1L				
		dextrose	2,5 g		
		Deionized water	Qsp 1L		
		pH	7,3 ± 0,2		
Produits chimiques					
Produits		Formule	Grade	Masse molaire (g.mol ⁻¹)	Fournisseurs
Sodium silicate solution		Na ₂ O SiO ₂	14% 27%	-	Aldrich
Ludox ® HS-40 colloidal (40 wt. % suspension in H ₂ O)		SiO ₂	40%	60.08	Aldrich
Glycerol		-	pure	-	Descharmes
MWCNT-COOH		-	95%-	-	Nanolab
Hydrochloric acid solution		HCl	1M	-	Riedel-de-Haen
Sodium hydroxide solution		NaOH	1M	-	Riedel-de-Haen
Nitric acid solution		HNO ₃	65%	-	Aldrich
Potassium hexacyanoferrate (III)		K ₃ [Fe(CN) ₆], ≥99%	-	329.24	Fluka
Bovine heart cytochrome C		-/ Purity 95%	-	13327	Sigma
Poly(ethyleneimine) solution (PEI)		-	50% w/v	-	Aldrich
Potassium Chloride		KCl	99%	74.55	Sigma
D-(+)-glucose anhydrous		C ₆ H ₁₂ O ₆	99%	198.17	Acros
Sodium Formiate		NaCOOH	99%	68.01	Merck

Tableau 1. Milieux de cultures et produits chimiques utilisés.

V.3.3. Préparation des plaques ITO

Les plaques ITO sont traitées au PEI afin de faciliter la fixation des bactéries sur le support au cours du premier cycle d'assemblage couche-par-couche. La plaque est dans un premier temps traitée à l'acide nitrique (65%) pendant 1 h, puis avec une solution d'hydroxyde de sodium (1 M) pendant 20 minutes et enfin avec une solution de PEI diluée à 0,2% pendant 3 heures. Entre chaque étape de traitement la plaque est rincée à l'eau ultra-pure. Les plaques ITO traitées au PEI sont ensuite conservées dans de l'eau ultra-pure jusqu'à 24 heures avant utilisation dans le procédé d'assemblage couche-par-couche.

V.3.4. Préparation du sol

Le sol pour la préparation de silice par voie sol-gel est obtenue en mélangeant une solution de silicate de sodium (0,27 M) avec du LUDOX HS-40 (40 wt %) et 5 wt % de glycerol. Le pH du mélange est ajusté à 7 avec de l'acide chlorhydrique. La solution est ensuite diluée 10 fois dans de l'eau déionisée avant utilisation.

V.3.5. Préparation des électrodes

L'électrode de carbone vitreux (GCE, 3 mm de diamètre) est utilisée en tant qu'électrode de travail au cours des analyses électrochimiques. Avant utilisation, il est nécessaire de la polir sur un tissu de polissage avec de la poudre d'alumine (Al_2O_3 , 0,05 mm, Buehler). Elle est ensuite rincée avec de l'eau pour retirer les particules d'alumine. L'électrode est ensuite séchée à température ambiante. La face Indium-Tin-Oxide des plaques ITO (ITO, Delta Technologies) peut aussi être utilisée en tant qu'électrode de travail. La contre-électrode est un fil de platine. L'électrode de référence est une électrode Ag/AgCl contenant une solution KCl 3M.

VI. Méthodes

VI.1. Drop-coating

L'encapsulation des bactéries par dépôt sur électrode est réalisée de la manière suivante : Un floculat est obtenu par mélange de 50 μl de suspension bactérienne d'une des souches suivantes (*P. putida*, *S. putrefaciens* CIP8040 et *S. oneidensis* MR1), de 50 μl d'une suspension de CNT (0,06 mg/ml dans le volume final) et d'une quantité suffisante de KCl 1mM pour un volume final de 250 μl . 50 μl de solution de sol décrit précédemment et/ou 50 μl d'une solution de cytochrome c (0,2 mM dans le volume final) peuvent être ajoutés au mélange. 5 μl du floculat est ensuite déposé sur l'électrode et séché à température ambiante pendant 20 minutes.

VI.2. Voltampérométrie cyclique

La voltampérométrie cyclique est une technique très utilisée en analyse électrochimique. Son principe est basé sur la mesure du courant à une électrode lorsque le potentiel varie linéairement en fonction du temps à une vitesse de balayage connue. Ce balayage s'effectue à partir d'une valeur initiale

jusqu'à une valeur finale, avant de procéder à un balayage retour vers la valeur initiale. Le graphe obtenu par cette analyse est appelé voltampérogramme cyclique. Cette technique permet d'appréhender dans notre travail les potentiels d'oxydation et de réduction des espèces redox impliquées dans le transfert d'électrons entre les bactéries et l'électrode de travail. Elle est réalisée à une vitesse de balayage de 50 mV/s

Elle est réalisée à l'aide d'une électrode de travail dans une solution tamponnée à pH=7, classiquement du tampon phosphate en présence d'une électrode de référence Ag/AgCl (KCl 3M) et d'une contre-électrode en platine (Figure 8). Les espèces redox impliquées sont $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$, introduit en solution, ou le cytochrome c introduit dans l'assemblage bactérien. Les mesures sont réalisées à l'aide d'un potentiostat et lues par le logiciel PStrace.

La figure obtenue présente un pic d'oxydation (courant positif) et un pic de réduction (courant négatif) (Figure 9). Cette mesure permet de définir le potentiel d'oxydation devant être utilisé pendant l'expérience d'ampérométrie, celui étant défini à 200 mV au-dessus du potentiel de pic du signal d'oxydation mesuré pour le courant maximum, sauf indication contraire.

VI.3. Ampérométrie

L'ampérométrie est une technique de mesure du courant en fonction du temps lorsqu'un potentiel est appliqué à l'électrode de travail. Elle est réalisée avec le même montage que celui décrit pour la voltampérométrie cyclique. La solution tampon est maintenue sous agitation afin de favoriser le transport du substrat qui est ajouté à différents temps dans la solution.

La Figure obtenue par cette manipulation décrit l'évolution du courant en fonction de la concentration en substrat ajouté dans le milieu (Figure 10).

VI.4. Profilométrie

La profilométrie est une technique basée sur le contact entre une pointe fine et la surface à mesurer. Un capteur permet de déterminer le positionnement 3D de la pointe avec sa position verticale Z et ses positions horizontales X et Y. Ce positionnement est basé sur la détection des forces de cisaillement entre la pointe et l'échantillon

Les échantillons de biofilm artificiel mesurés en profilométrie sont séchés à température ambiante avant utilisation. Une rayure est alors pratiquée sur le biofilm. Le profil obtenu permet, par différence entre la position verticale de la surface dégagée par la rayure (support à nu) et celle de la surface du film, d'estimer l'épaisseur du biofilm.

La Figure 11 présente un résultat de profilométrie typique. On observe la présence de deux pics autour d'une dépression. La dépression correspond à la rayure pratiquée. Les 2 pics adjacents correspondent aux dépôts de matières déplacées par la rayure.

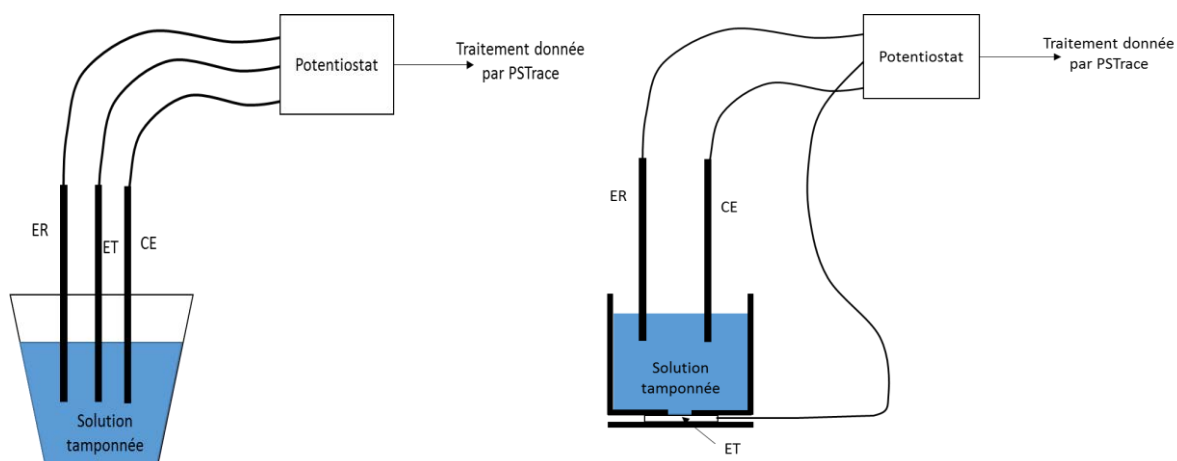


Figure 8. Schématisation du montage en électrochimie

CE : Contre-électrode

ER : Electrode de référence

ET : Electrode de travail

Les structures testées sont déposées sur l'électrode de travail et placées dans la solution tamponnée. Les sources de carbone (glucose ou formiate de sodium) sont ajoutées à intervalle régulier dans la solution au cours de l'analyse par ampérométrie.

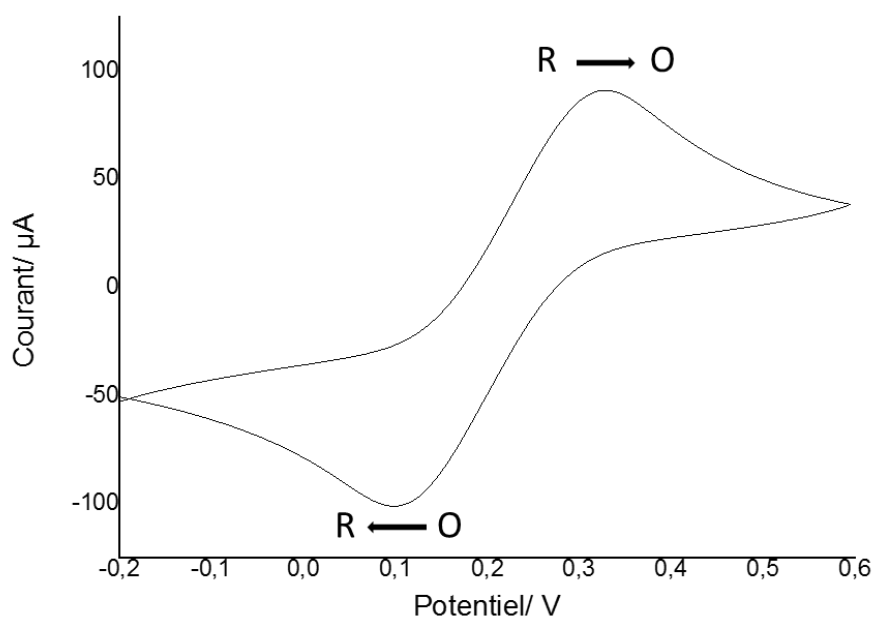


Figure 9. Voltampérogramme cyclique d'une réaction d'oxydo-réduction réversible.

Les pics d'oxydation (R (espèce réduite) est oxydé en O (espèce oxydée)) et de réduction (O est réduit en R) sont présentés sur ce voltampérogramme cyclique.

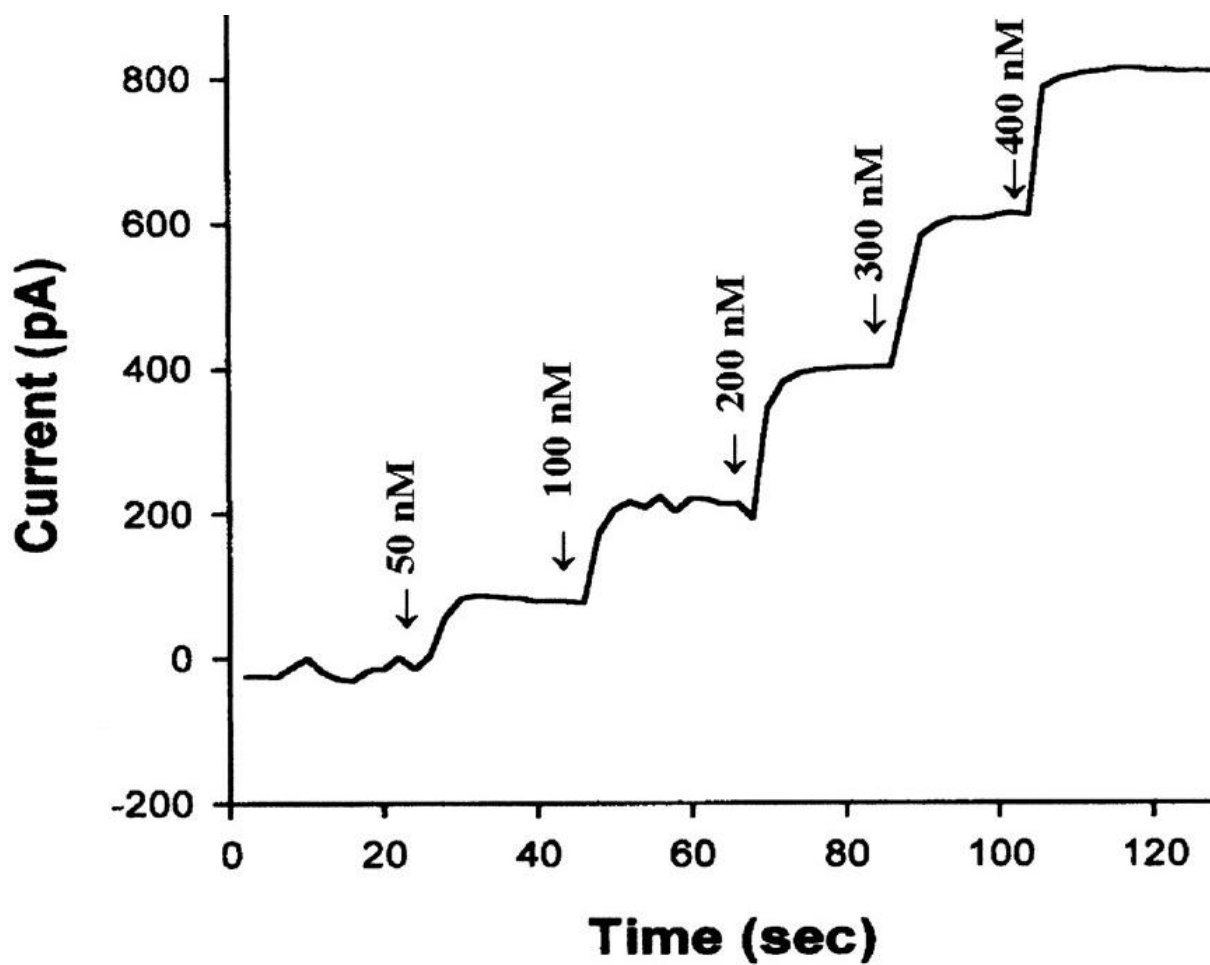


Figure 10. Réponse en courant typique mesurée en fonction du temps par ampérométrie lorsque différentes concentrations d'un substrat sont ajoutées dans la solution d'analyse.

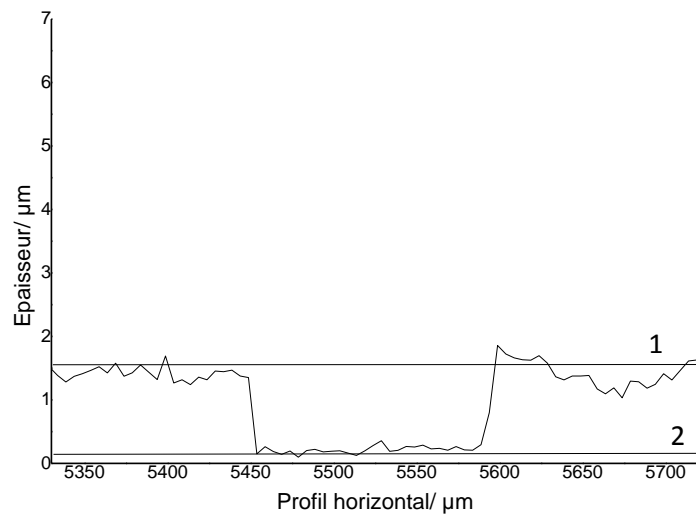


Figure 11. Profil obtenu par profilométrie d'une rayure sur un biofilm artificiel

Ce biofilm a été obtenu en utilisant 12 cycles d'assemblage couche-par-couche de bactéries et de cytochrome c. La ligne 1 matérialise la surface supérieure du biofilm et la ligne 2 sa surface inférieure en contact avec l'électrode. L'épaisseur du biofilm est estimée par la soustraction de la valeur d'épaisseur de la ligne 1 par la ligne 2.

VI.5. Microscopie optique

Les échantillons observés en microscopie optique sont séchés à température ambiante. Puis Les observations en microscopie optique sont réalisées directement sur l'échantillon par un microscope optique (Nikon) avec un grossissement X50.

VI.6. BacLight™ : analyse de la viabilité bactérienne

L'analyse de viabilité par LIVE/DEAD BacLight (Invitrogen) est une méthode de marquage utilisée pour déterminer les ratios de bactéries endommagées dans une population bactérienne. Ce système est basé sur un marquage des bactéries par deux colorants fluorescent : le SYTO 9 et l'iodure de propidium (PI). Ces deux marqueurs se fixent sur les acides nucléiques des cellules. Le SYTO 9 colore la cellule en vert et pénètre dans toutes les cellules bactériennes tandis que le PI marque la cellule en rouge et ne pénètre que les cellules avec des membranes endommagées. Les cellules colorées en rouges sont le produit de la combinaison des deux marqueurs et correspondent à des cellules endommagées tandis que les cellules colorées en vert sont uniquement marquées par le SYTO9 et sont considérées comme viables.

Les échantillons observés via cette méthode sont les floculats des bactéries avec les CNT. Avant ajout des marqueurs, les floculats sont suspendus et dilués à 10^7 cellules/ml afin de faciliter l'observation en microscopie à épifluorescence. Les échantillons sont mélangés avec le même volume de SYTO9 (1,67 μ M) et de PI (1,67 μ M) et incubés pendant 15 minutes à l'abri de la lumière. Les échantillons sont filtrés sur une rampe de filtration avec un filtre à 0,22 μ m. Le filtre est déposé sur lame et observé avec un microscope à épifluorescence (OLYMPUS BX51) en présence d'huile d'immersion à un grossissement X100.

Résultats

VII. Elaboration d'un biofilm artificiel électroactif par assemblage couche-par-couche

VII.1. Assemblage couche-par-couche bactérie/CNT

Afin d'élaborer un biofilm artificiel électroactif, une stratégie basée sur un protocole d'assemblage couche-par-couche est mis en œuvre. Ce protocole expérimental et ses étapes sont décrits dans la Figure 12. Il s'agit du passage dans quatre solutions d'une plaque d'ITO traitée au PEI pour améliorer la fixation des cellules. Le passage de la plaque dans ces quatre solutions permet la formation d'une structure multicouche bactéries/CNT et correspond à un cycle du protocole d'assemblage couche-par-couche. Dans un premier temps, la plaque d'ITO traitée est immergée dans une suspension bactérienne de *P. putida* à 10^{10} cell/ml pour permettre la formation d'une couche de cellules. La plaque est ensuite rincée dans une solution de KCl 1 mM dans le but d'enlever les bactéries qui ne sont pas fixées sur le support. La plaque est ensuite immergée dans une suspension de CNT à 0,5 mg/ml afin de permettre l'adhésion des CNT à la structure. Le rinçage dans la solution de KCl 1 mM permet ensuite de retirer les CNT qui ne sont pas fixées sur la structure. La plaque est ensuite à nouveau immergée dans la suspension bactérienne pour suivre un nouveau cycle. La Figure 13 présente la structure hypothétique obtenue suite à ce protocole. Il s'agit de l'empilement de couches de cellules en alternance avec des couches de CNT.

Au cours de la mise au point de ce protocole deux caractéristiques majeures sont prises en compte. D'une part, une obtention rapide d'un biofilm est recherchée. Il est donc nécessaire que les étapes d'immersion dans le protocole soient courtes tout en gardant une adhésion maximale des bactéries pour les temps choisis. D'autre part, l'épaisseur du biofilm formé doit être la plus homogène possible. Les temps d'immersions sont donc choisis afin de satisfaire à ces deux critères.

VII.1.1. Détermination des temps d'immersions

VII.1.1.a. Temps d'immersion dans la solution de CNT

L'épaisseur des structures obtenues après 6 cycles d'assemblage couche-par-couche pour un temps d'immersion arbitraire de 40 minutes dans la suspension de *P. putida* et pour des temps de 20, 10 ou 1 minute dans la suspension de CNT est mesurée par profilométrie. La Figure 14 montre les valeurs statistiques obtenues à partir de ces données. Pour un temps d'immersion dans la suspension de CNT de 20 min une épaisseur moyenne du biofilm artificiel de $0,72 \pm 0,26 \mu\text{m}$ (n=9) est obtenue, pour 10 min elle est de $0,70 \pm 0,16 \mu\text{m}$ (n=9), et de $0,75 \pm 0,13 \mu\text{m}$ (n=9) pour 1 min. Au vu de ces résultats, il apparaît que le temps d'immersion dans les CNT n'a pas eu d'impact significatif sur l'épaisseur du biofilm artificiel. Les écarts types aux moyennes tendent par contre à diminuer sensiblement avec le temps d'immersion suggérant que le temps d'immersion dans les CNT a un effet sur l'homogénéité apparente du biofilm. Au vu des critères de sélections choisies, il est plus avantageux d'utiliser un temps

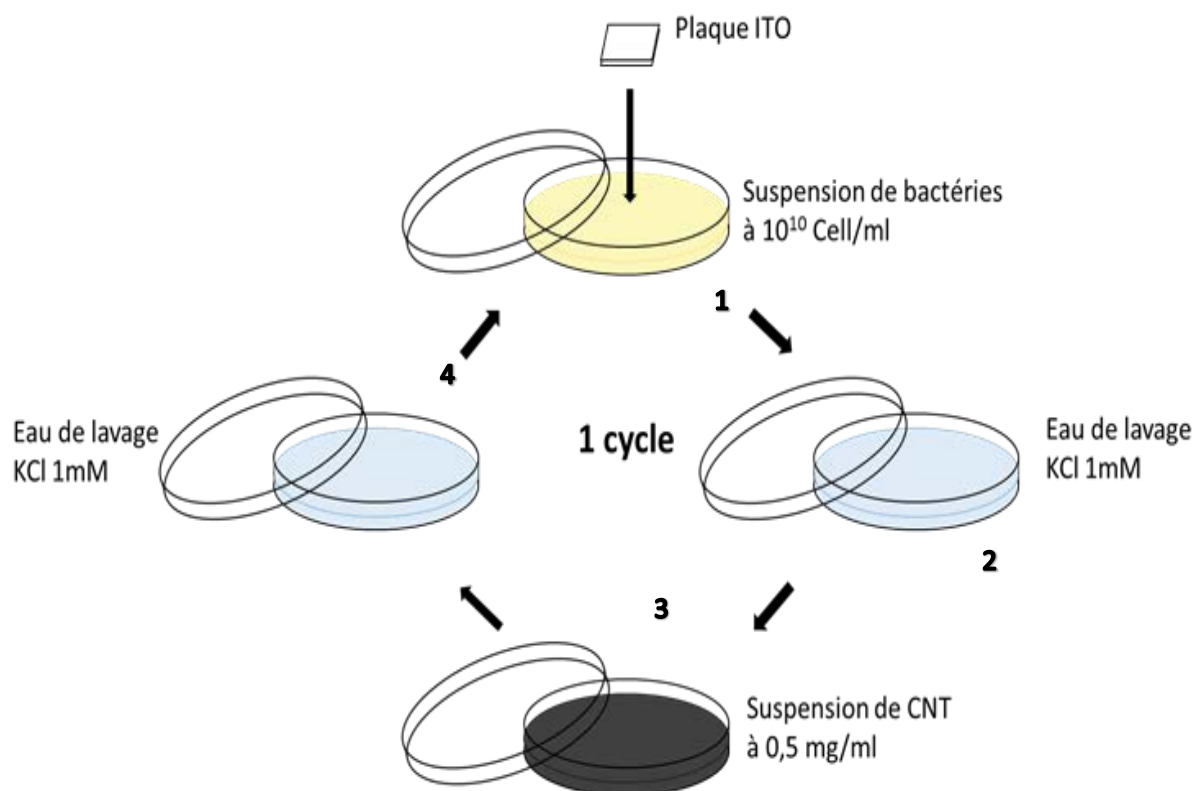


Figure 12. Représentation schématique de la stratégie amenant à l'obtention d'un biofilm artificiel sur plaque ITO par assemblage couche-par-couche.

Un seul cycle de l'assemblage couche-par-couche est ici représenté.

1 : Une plaque ITO traitée au PEI est immergée dans une suspension bactérienne à 10^{10} cellules par millilitre pendant un temps t_1 .

2 : La plaque ITO est rincée dans du KCl 1mM afin d'enlever les bactéries non fixées sur le support.

3 : La plaque est immergée dans une suspension de CNT à 0,5 mg/ml pendant un temps t_2 .

4 : La plaque est rincée dans du KCl 1mM afin d'enlever les CNT non fixées sur le support.

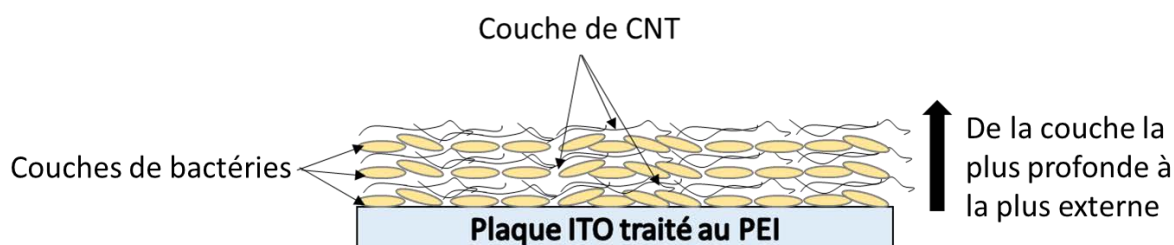


Figure 13. Représentation schématique de la structure obtenue par assemblage couche par couche.

Les couches les plus profondes correspondent aux premiers cycles. La structure en elle-même est un empilement théorique de couches de bactéries en alternance avec des couches de CNT

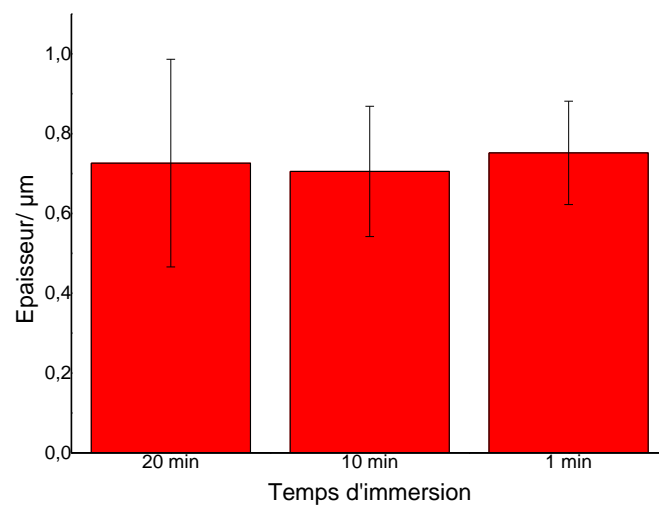


Figure 14. Epaisseurs des biofilms mesurées pour des temps d’immersions différents dans la suspension de CNT.

Les épaisseurs sont mesurées après 6 cycles d’assemblages couche-par-couche par immersion dans une suspension bactérienne contenant 10^{10} Cell/ml pendant 40 minutes et dans une suspension contenant 0,5 mg/ml de CNT pendant 20 minutes, 10 minutes ou 1 minute. $N=9$ pour chaque temps.

d'immersion dans les CNT de 1 min afin de favoriser la formation rapide d'un biofilm artificiel ayant une épaisseur homogène.

VII.1.1.b. Temps d'immersion dans la suspension bactérienne

Les épaisseurs des structures obtenues après 6 cycles d'assemblage couche-par-couche pour un temps d'immersion d'une minute dans la suspension de CNT et pour des temps d'une heure, 40 ou 20 min dans la suspension de *P. putida* sont mesurées par profilométrie. La Figure 15 montre les valeurs statistiques obtenues à partir de ces données. Pour des temps d'immersions dans la suspension bactérienne de 1 h l'épaisseur moyenne du biofilm artificiel obtenu est d'environ $0,67 \mu\text{m} \pm 0,13 \mu\text{m}$ (n=9). Pour 40 min l'épaisseur est de $0,75 \pm 0,13 \mu\text{m}$ (n=9) et pour 20 min elle est de $0,66 \pm 0,13 \mu\text{m}$ (n=9). L'épaisseur n'étant pas significativement différentes entre ces essais, ces résultats suggèrent que le temps d'immersion dans la suspension bactérienne n'impacte pas l'épaisseur et l'homogénéité du biofilm. Au vu des critères de sélections choisies, il est donc plus avantageux d'utiliser le temps d'immersion testé le plus court afin de favoriser la formation la plus rapide possible du biofilm artificiel. Il est possible que ce temps puisse encore être diminué pour augmenter la vitesse de formation du biofilm, ce qui pourra être évalué dans une étude ultérieure. Pour ce travail, le temps d'immersion dans la suspension bactérienne retenu est de 20 minutes.

VII.1.2. Epaisseur du biofilm artificiel en fonction du nombre de cycles réalisés

Le cycle d'assemblage couche-par-couche comprend une immersion dans la suspension de *P. putida* pendant 20 minutes suivi d'une immersion dans la suspension de CNT pendant une minute. La Figure 16 présente les valeurs statistiques des épaisseurs, déterminées par profilométrie, des biofilms réalisés avec différents nombres de cycles. Pour 1 cycle d'assemblage la valeur moyenne d'épaisseur obtenue est de $0,31 \pm 0,09 \mu\text{m}$ (n= 9). L'écart type à la moyenne représente un tiers de la valeur moyenne de l'épaisseur. Ces résultats suggèrent que si l'épaisseur à un cycle est de $0,31 \mu\text{m}$, elle reste très variable. Il est possible de considérer que pour 1 cycle, une couche monocellulaire est déposée sur le support. L'explication la plus plausible pour la distribution étendue des valeurs serait la présence de zone dans le biofilm où aucune cellule n'est déposée ou au contraire où la profilométrie a mesuré une couche bicellulaire. Pour 4 cycles la valeur moyenne est de $0,76 \pm 0,06 \mu\text{m}$ (n = 9). Pour 8 cycles la moyenne des valeurs est de $0,94 \pm 0,11 \mu\text{m}$ (n=9). Pour 12 cycles la valeur moyenne est de $1,13 \mu\text{m} \pm 0,08 \mu\text{m}$ (n=9). D'une manière générale, l'épaisseur du biofilm formé augmente avec le nombre de cycles réalisés. La vitesse de croissance semble cependant diminuer avec le nombre de cycles réalisés. Elle est très importante au cours des premiers cycles avec une épaisseur moyenne de biofilm plus que doublée entre 1 cycle ($0,31 \mu\text{m}$) et 4 cycles ($0,76 \mu\text{m}$). Mais elle diminue ensuite : l'épaisseur moyenne d'un biofilm n'est plus que 1,25 fois plus importante entre 8 cycles ($0,94 \mu\text{m}$) et 4 cycles ($0,76 \mu\text{m}$) et 1,2 fois plus importante entre 12 cycles ($1,13 \mu\text{m}$) et 8 cycles ($0,94 \mu\text{m}$). L'épaisseur du biofilm augmente donc avec le nombre de cycles réalisés mais semble tendre vers une épaisseur maximale.

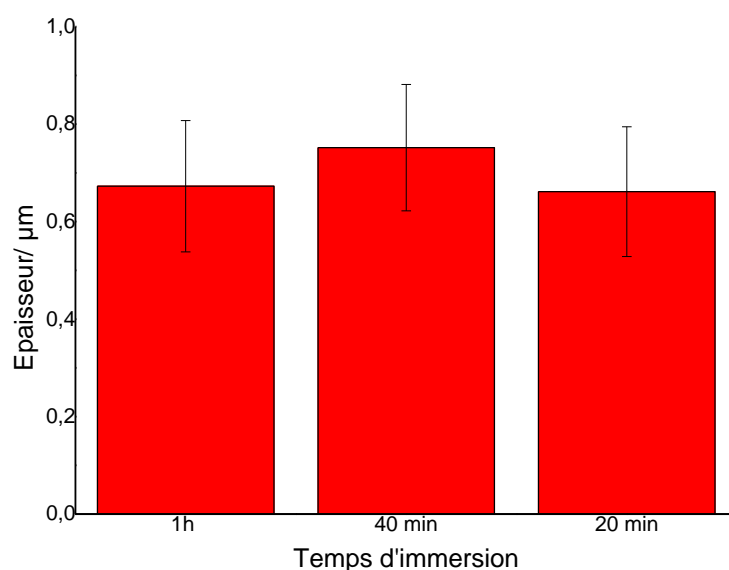


Figure 15. Epaisseurs des biofilms mesurées pour des temps d’immersions différents dans la suspension bactérienne.

Les épaisseurs sont mesurées après 6 cycles d’assemblages couche-par-couche par immersion dans une suspension contenant 0,5 mg/ml de CNT pendant 1 minute et dans une suspension bactérienne contenant 10^{10} Cell/ml pendant 1 heure, 40 minutes ou 20 minutes. N=9 pour chaque temps.

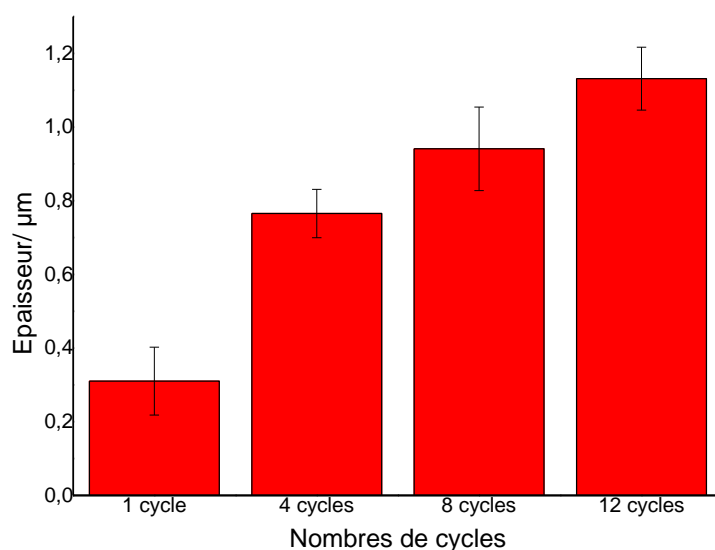


Figure 16. Epaisseur du biofilm artificiel mesuré en fonction du nombre de cycles d’assemblages couche par couche réalisés.

Les épaisseurs des biofilms sont mesurées après respectivement 1, 4, 8 et 12 cycles d’assemblages couche-par-couche. Les temps d’immersions dans la suspension bactérienne et la suspension de CNT sont respectivement de 20 min et de 1 min. N=9 pour chaque nombre de cycles.

VII.2. Optimisation de l'homogénéité du biofilm artificiel

Les biofilms artificiels formés par la méthode d'assemblage couche-par-couche sont sujets à un problème récurrent. Il s'agit de l'hétérogénéité de leurs surfaces, déjà mise en lumière par la profilométrie. La microscopie optique réalisée sur les biofilms artificiels obtenues sur les plaques d'ITO permet de mettre en évidence de façon qualitative cette donnée.

VII.2.1. Les CNT : une cause importante de l'hétérogénéité de surface

Afin de déterminer la (ou les) cause(s) de l'hétérogénéité de la surface des biofilm artificiels obtenues par la méthode d'assemblage choisie, la première piste explorée est celle des CNT. Ces derniers sont susceptibles de favoriser l'agrégation des bactéries ce qui pourrait être à l'origine d'une organisation différente des bactéries dans le biofilm et donc de l'hétérogénéité observée.

Pour mettre en évidence l'impact des CNT sur l'hétérogénéité de la surface, deux modèles de biofilms artificiels sur plaque ITO sont réalisés après 4 cycles d'assemblage couche-par-couche. Le premier modèle de biofilm artificiel est obtenu de manière habituelle avec des temps d'immersion dans la suspension de CNT d'une minute et dans la suspension de *P. putida* 20 minutes. Un deuxième modèle de biofilm artificiel est réalisé uniquement avec des couches de la bactérie *P. putida*, en supprimant les étapes 3 et 4 dans le cycle d'assemblage couche-par-couche (Figure 17). La microscopie optique sur ces deux modèles est réalisée sans marquage des bactéries. Les Figures 17.1 et 17.2 sont des photographies de microscopie optique de deux zones visuellement différentes du biofilm composé par des couches de bactéries et de CNT. La Figure 17.1 montre une surface d'apparence hétérogène avec la présence de nombreuses bactéries en forme de bâtonnets dont la densité augmente autour d'amas de particules de couleurs sombres. La Figure 17.2 montre une surface d'apparence hétérogène avec une faible densité de bactéries. Des amas bactériens sont visibles aux niveaux de particules de couleurs sombres. La Figure 17.3 est une photographie de microscopie optique d'un biofilm composé uniquement de couches bactériennes. La surface y est d'apparence plus homogène que sur les 2 photographies précédentes avec un tapis bactérien où les cellules sont difficilement différenciables. La microscopie optique permet donc de visualiser deux types de zones au niveau du premier modèle de biofilm, formé en présence de CNT : un type de zone où les bactéries n'ont pas adhéré (Figure 17.2) et son inverse, une zone où les CNT se sont fixés de manière hétérogène en amas avec une forte densité de bactéries au niveau de ces amas (Figure 17.1). La présence des CNT et leurs dépôts hétérogènes au cours de la formation du biofilm artificiel semblent donc être une cause de l'hétérogénéité de la surface des biofilms artificiels formés par la méthode d'assemblage couche-par-couche.

VII.2.2. Amélioration du procédé

Le procédé a été amélioré de deux manières afin de réduire l'hétérogénéité de la surface du biofilm formé. D'une part, l'agitation mécanique des suspensions durant l'immersion du support a permis de diminuer l'hétérogénéité de la surface du biofilm formé. D'autre part, l'utilisation de

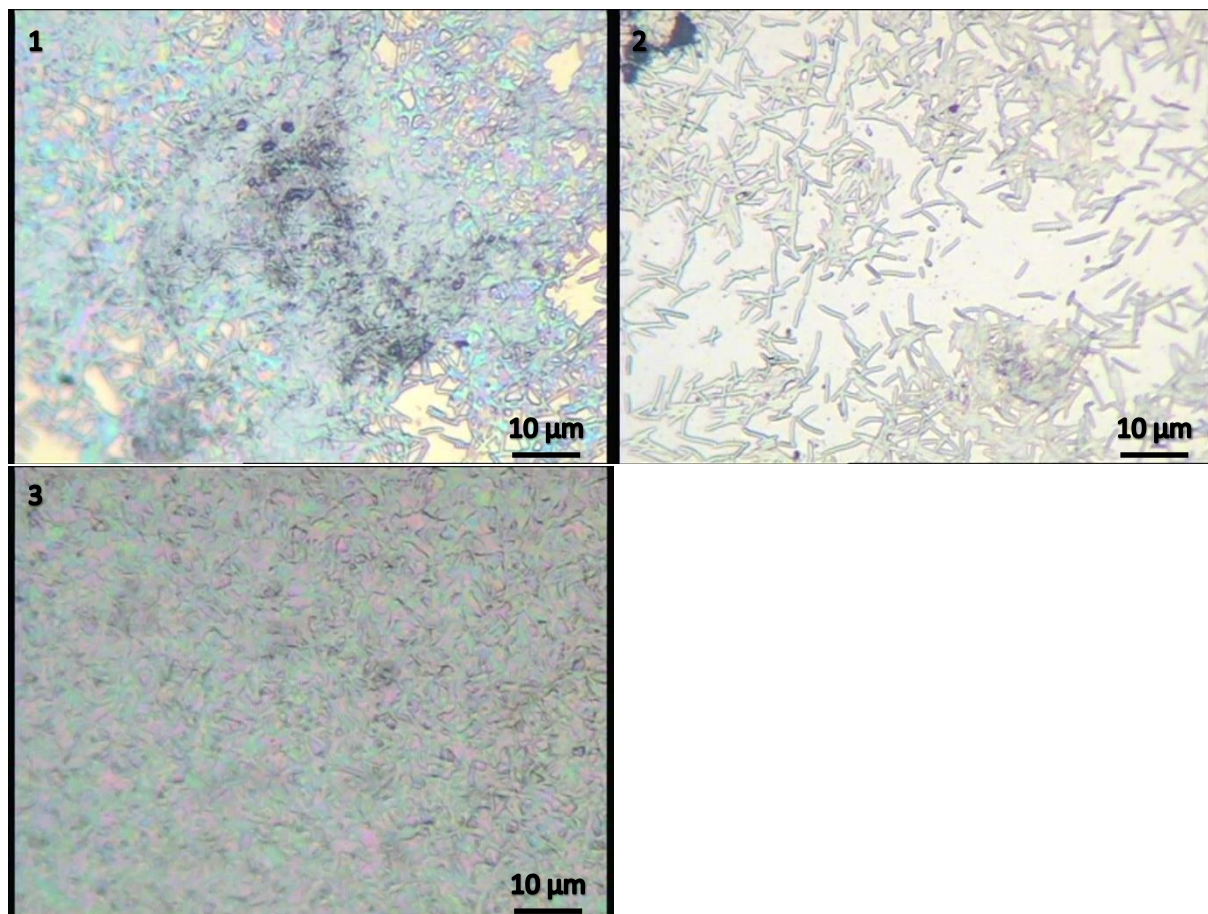


Figure 17. Photographies en microscopie optique de biofilms artificiels obtenus en utilisant 4 cycles d'assemblage couche-par-couche.

- 1 : Zone vide en bactérie d'un biofilm artificiel obtenu par assemblages de couches de CNT et de la souche utilisée (*P. putida*).
 2 : Zone dense en bactérie et en CNT d'un biofilm artificiel obtenu par assemblages de couches de CNT et de la souche utilisée (*P. putida*).
 3 : Biofilm artificiel obtenue par assemblages de couches de bactéries (*P. putida*) uniquement.

cytochrome c en complément des CNT a aussi permis de diminuer cette hétérogénéité. Le cytochrome c présente un point isoélectrique entre pH 10 et 10.5 qui lui permet d'être chargé positivement à pH 7 dans la solution d'assemblage des bactéries. Les bactéries et les CNT étant chargés négativement, le cytochrome pourrait aider à structurer le biofilm dans cette stratégie d'assemblage couche-par-couche. Cette protéine peut également servir de médiateur redox pour transférer les électrons de la membrane externe des bactéries vers les nanotubes et ou l'électrode collectrice. Ces optimisations du procédé ont été mises en évidence aux temps d'immersions de 20 minutes dans la suspension bactérienne et d'une minute dans celle de CNT.

VII.2.2.a. Par agitation mécanique

Afin de mettre en évidence l'effet sur l'assemblage du biofilm de l'agitation mécanique des différentes suspensions, des photographies en microscopie optique sont réalisées sans coloration. Les photographies présentent la surface de biofilms formés après 4 cycles d'assemblage couche-par-couche avec ou sans agitation des différentes suspensions. La photographie sur la Figure 18.1 correspond à la surface du biofilm formé en absence d'agitation mécanique tandis que celle sur la Figure 18.2 correspond à la surface du biofilm formé en présence d'agitation mécanique. Un film d'apparence hétérogène avec une forte densité bactérienne au niveau d'un amas de CNT (amas de particules sombres) est observé sur la Figure 18.1 tandis qu'un film d'apparence homogène avec une densité bactérienne élevée et uniforme ainsi que des amas de CNT plus dispersés est observé sur la Figure 18.2. L'agitation mécanique des suspensions au cours du procédé de formation du biofilm permet donc un dépôt plus uniforme et homogène des bactéries ainsi que des CNT sur le support.

VII.2.2.b. Par utilisation de cytochrome c au lieu des CNT

L'utilisation de cytochrome c est une autre manière de diminuer l'hétérogénéité de la surface du biofilm formé notamment pour un nombre élevé de cycles. Un biofilm est formé en remplaçant la suspension de CNT par une solution de cytochrome c à 20 μ M dans les étapes de formation du biofilm par la méthode d'assemblage couche-par-couche avec un temps d'immersion de 10 minutes. Les biofilms formés dans les deux situations ont été photographiés en microscopie optique sans coloration. Ces photographies représentent la surface du biofilm formé après 12 cycles d'assemblages couche-par-couche. La Figure 19.1 montre la surface du biofilm formé avec les CNT. Les taches noires sont sans doute des impuretés carbonées présentes dans la suspension de CNT. La Figure 19.2 montre l'aspect du biofilm formé avec les cytochromes c, il a une apparence plus homogène. Le remplacement des CNT par de cytochrome c permet ainsi d'obtenir une surface d'apparence plus homogène. L'utilisation de cytochrome est donc une voie possible pour optimiser la fabrication d'un biofilm homogène en utilisant un assemblage couche-par-couche. Cet aspect n'a pas été considéré systématiquement dans le stage et il devra être pris en compte à l'avenir. Pour l'instant, dans la suite de ce travail nous nous sommes

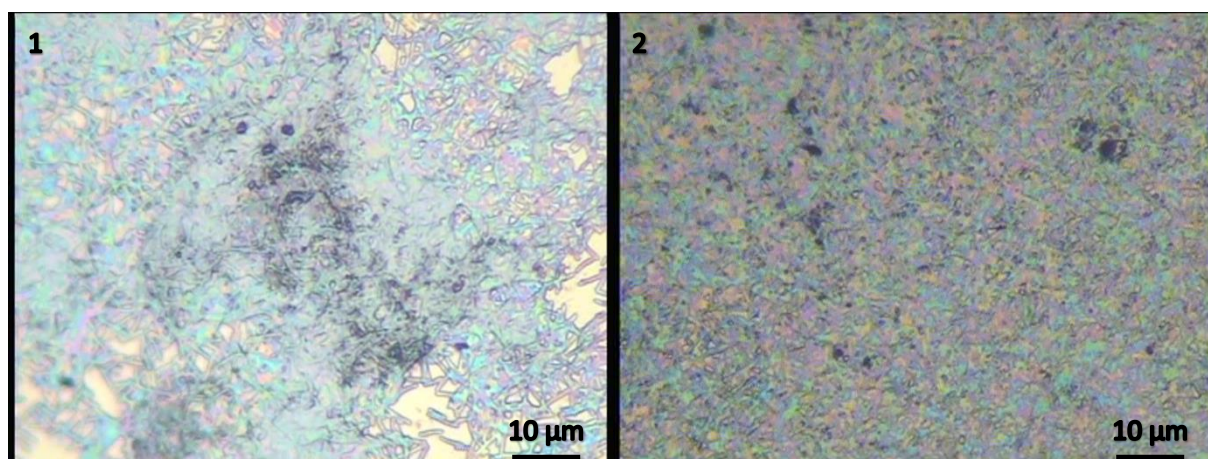


Figure 18. Photographies en microscopie optique de biofilms artificiels obtenus en utilisant 4 cycles d'assemblage couche-par-couche.

*1 : Zone dense en bactérie et en CNT d'un biofilm artificiel obtenu par assemblages de couches de CNT et de la souche *P. putida* utilisée sans agitation durant la réalisation du biofilm.*

*2 : Biofilm artificiel obtenu par assemblages de couches de CNT et de la souche *P. putida* utilisée avec agitation durant la réalisation du biofilm.*

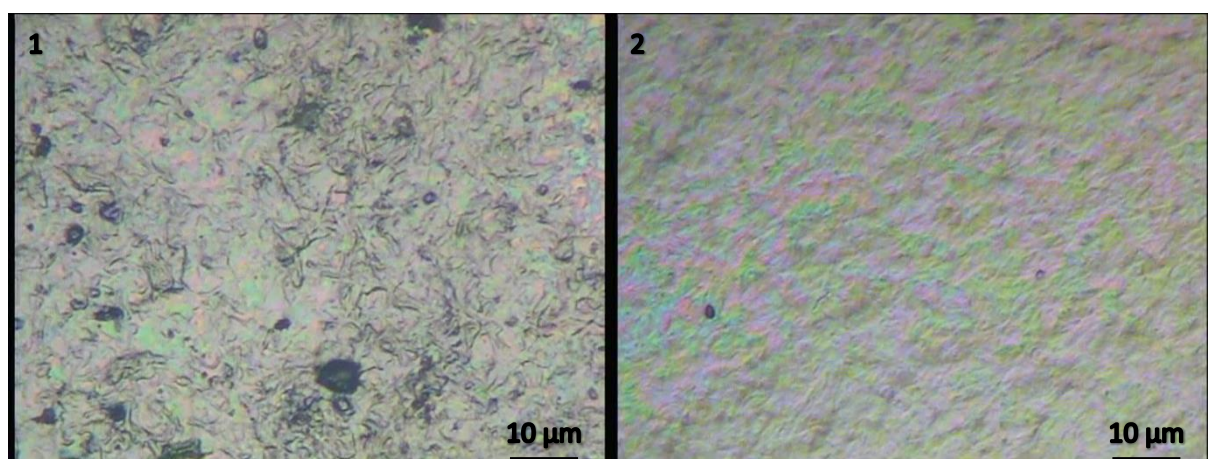


Figure 19. Photographies en microscopie optique de biofilms artificiels obtenus en utilisant 12 cycles d'assemblage couche-par-couche.

*1 : Biofilm artificiel obtenu par assemblage de couches de CNT et de la souche *P. putida* utilisée avec agitation durant la réalisation du biofilm.*

*2 : Biofilm artificiel obtenue par assemblages de couches de cytochrome *c* et de la souche *P. putida* utilisée avec agitation durant la réalisation du biofilm.*

intéressés à l'influence des nanotubes de carbone sur l'activité métabolique des biofilms artificiels obtenus.

VII.3. Electrochimie du biofilm artificiel

L'activité métabolique est ici mesurée en électrochimie à l'aide du médiateur $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ dans l'heure suivant l'obtention du biofilm après 4 cycles d'assemblages couche-par-couche. Ce dernier permet éventuellement d'amplifier la réponse électrochimique du biofilm en allant chercher des électrons de bactéries isolées pour l'électrode collectrice. Une telle expérience permet de confirmer si la bactérie est active métaboliquement dans le cas où cette dernière n'est plus capable de transfert extracellulaire d'électrons en allant chercher les électrons dans l'espace périplasmique. La Figure 20.a présente la réponse en voltampérométrie cyclique du biofilm avec le médiateur en solution. En absence de glucose dans la solution d'analyse, un pic d'oxydation ayant un maximum de courant à 0,34 V est observé. Ce pic n'est pas ici directement témoin de l'activité oxydative des bactéries. Ce médiateur redox est capable sous sa forme oxydée de collecter les électrons transférés par la bactérie et de les transférer ensuite à l'électrode. C'est un médiateur redox. En principe l'activité redox devrait avoir une influence sur ce signal voltampérométrique. Cependant, pour tester l'activité métabolique de la bactérie il est alors préférable d'appliquer un potentiel suffisamment oxydant, supérieur au potentiel de pic mesuré précédemment de façon à collecter efficacement les électrons transmis. La mesure en ampérométrie est ici réalisée à 0,54 V. En ampérométrie une légère augmentation du courant de 560 nA à 600 nA est visible entre 250 et 300 secondes, puis le courant diminue pour se stabiliser vers 500 nA (Figure 20.b). Une variation de 40 nA est donc visible. Cependant cette augmentation du courant ne semble pas concorder avec les ajouts de 0,5 mM de glucose dans la solution et reste vraiment trop faible pour être le témoin d'une activité métabolique. L'utilisation du médiateur révèle donc l'absence d'activité métabolique clairement mesurable en électrochimie. Cette absence d'activité métabolique mesurable peut être due soit au non viabilité des cellules dans le biofilm artificiel formé, soit à une concentration en cellule dans le biofilm trop faible pour produire un signal visible en électrochimie. Nous nous sommes alors intéressés dans la suite du travail à évaluer la cytotoxicité des CNT dans ce biofilm artificiel. Une stratégie pour contrer cette toxicité sera présentée.

VIII. Cytotoxicité des CNT et limitation dans un biofilm artificiel

VIII.1. Toxicité des CNT

Une stratégie est élaborée pour déterminer si la cytotoxicité des CNT sur les cellules bactériennes est à l'origine de l'absence d'activité métabolique dans le biofilm artificiel élaboré. La stratégie employée doit permettre de s'assurer que l'absence de réponse en électrochimie n'est pas due à une trop faible concentration cellulaire dans le biofilm ni à un stress résultant de la méthode de formation du biofilm artificiel.

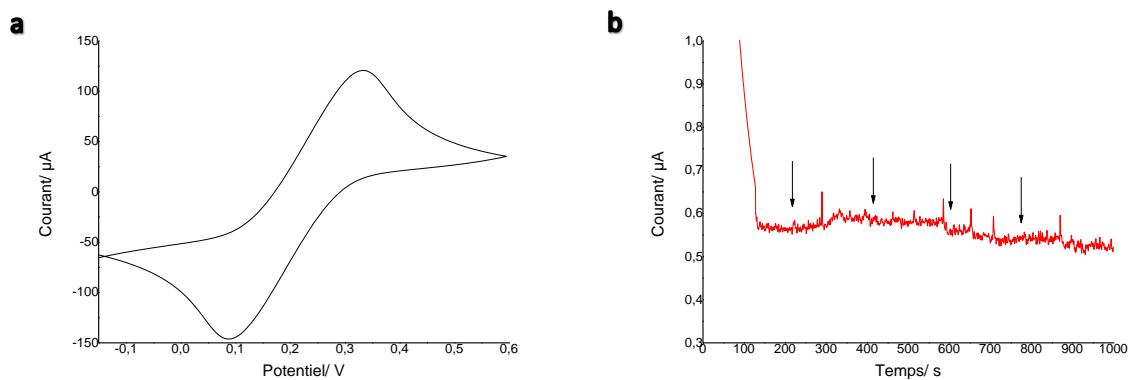


Figure 20. Electrochimie de biofilms artificiels obtenus en utilisant 4 cycles d'assemblage couche-par-couches de CNT et de la souche de *P. putida*.

Réponse en voltampérométrie cyclique (a) lue à 50 mV/s et en ampérométrie à un potentiel appliqué à l'électrode de 0,54 V (b), en présence du médiateur $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ à 5 mM en solution de phosphate tamponné pH 7. Chaque flèche correspond à l'ajout de 0,5 mM de glucose.

VIII.1.1. Modèle d'étude : Flocculat bactérie/CNT

La suite du projet est basée sur un modèle d'étude plus simple à réaliser que l'assemblage couche-par-couche pour évaluer cette toxicité. Il s'agit de l'obtention d'un biofilm artificiel par la floculation des souches bactériennes en présence de CNT, un mécanisme qui pourrait s'apparenter à de l'autoassemblage. Cette floculation est contrôlée par l'interaction intime des nanoparticules avec les surfaces bactériennes, les mécanismes mis en jeu sont alors similaires à ceux mis en œuvre lors de l'assemblage couche-par-couche. Les concentrations initiales dans la suspension homogénéisée mise à floculer sont à 10^9 cell/ml et 0,1 mg/ml de CNT. Après 2 heures d'attente, le flocculat est testé en électrochimie. Ce modèle d'étude a l'avantage d'assurer le contact étroit entre les bactéries et les CNT en évitant un stress induit par des étapes intermédiaires et des changements de milieux tout en assurant une concentration en cellule assez élevée théoriquement pour observer une réponse en électrochimie.

La floculation est réalisée avec différentes souches bactériennes en présence de CNT. Les vitesses de floculations avec les CNT diffèrent en fonction de la souche. La Figure 21 décrit le procédé de floculation selon la souche bactérienne. Ce sont des photos des suspensions bactériennes en présence des CNT au temps initial et après 15 et 30 minutes, et 1 et 2 heures. Les souches bactériennes utilisées pour réaliser la floculation sont *P. putida*, *S. putrefaciens* CIP8040, *S. oneidensis* MR1 : soit la souche utilisée pour la formation du biofilm artificiel par assemblage couche-par-couche et deux autres souches connues pour leur capacité élevée de transferts extracellulaires d'électrons. D'une manière générale, les échantillons commencent à floculer à 30 minutes (Figure 21.3) avec l'apparition de zones de densité et de couleur légèrement différentes. La floculation n'est vraiment significative macroscopiquement qu'à partir d'1 heure et deux phases sont alors distinguables au niveau des échantillons (Figure 21.4). La phase sombre correspond à l'agrégation des bactéries avec les CNT et la phase claire aux bactéries et aux CNT en suspension n'ayant pas floculé. Après deux heures, les CNT et les bactéries ont complètement floculés pour les souches CIP8040 et MR1 (Figure 21.5) et partiellement floculé pour *P. putida*. CIP8040 semble par ailleurs floculer plus rapidement que MR1 car deux phases sont déjà observables à 30 minutes pour cette souche (Figure 21.3).

VIII.1.2. Electrochimie du flocculat

Le flocculat composé de la souche bactérienne avec les CNT est ensuite utilisé pour des analyses électrochimiques afin de mettre en évidence la « vitalité électrochimique » des cellules dans le système. La réalisation de l'échantillon est décrite dans la Figure 22. Après 2 heures de contact entre la souche bactérienne et les CNT, 5 μ l du flocculat sont déposés sur l'électrode pour être analysés en électrochimie.

Comme précédemment, les mesures en électrochimie sont réalisées en présence du médiateur $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ afin de mettre en évidence une activité métabolique des bactéries. Les Figures 23.1.a, 23.2.a et 23.3.a présentent la réponse en voltampérométrie cyclique des flocculats avec les différentes souches bactériennes : *P. putida* (1), CIP8040 (2) et MR1 (3). Pour *P. putida* un pic d'oxydation est visible à 0,45 V (Figure 23.1.a), il est visible à 0,5 V pour CIP8040 (Figure 23.2.a) et 0,47 V pour MR1 (Figure

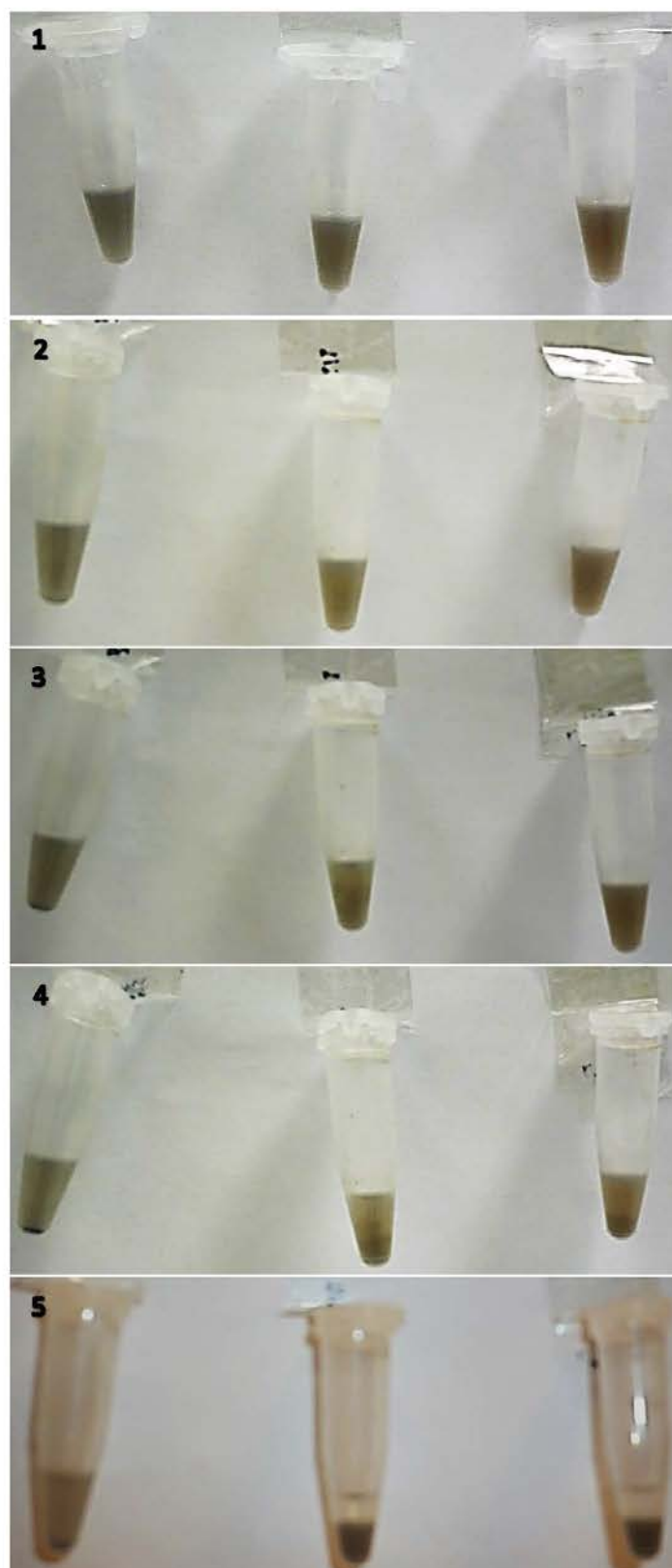


Figure 21. Flocculation des différentes souches bactériennes avec des CNTs.

Photographies de suspensions des différentes souches bactériennes, respectivement de gauche à droite *P. putida*, *S. putrefaciens* CIP8040 et *S. oneidensis* MRI en présence de CNT (0,1 mg/mL) à différents temps. 1 : t0. 2 : 15 minutes. 3 : 30 minutes. 4 : 1 heure. 5 : 2 heures.

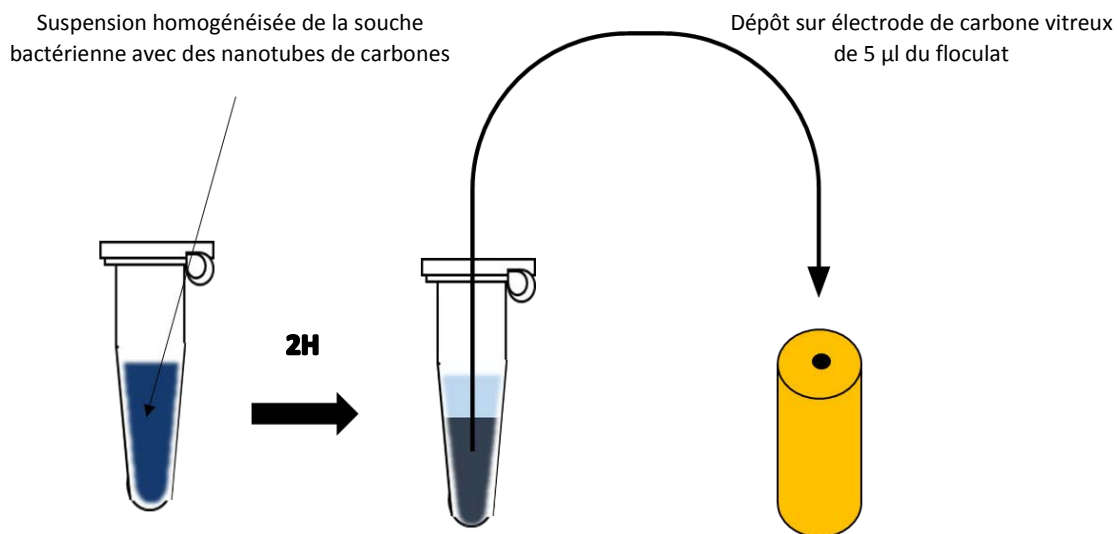


Figure 22. Représentation schématique de la stratégie amenant à l'obtention des floculats des souches bactériennes en présence de CNT testés en électrochimie.

Les suspensions bactériennes sont homogénéisées avec des CNT à t0. 2h plus tard 5 µl du floculat est déposé sur l'électrode de carbone vitreux puis séché à température ambiante pour les analyses électrochimiques.

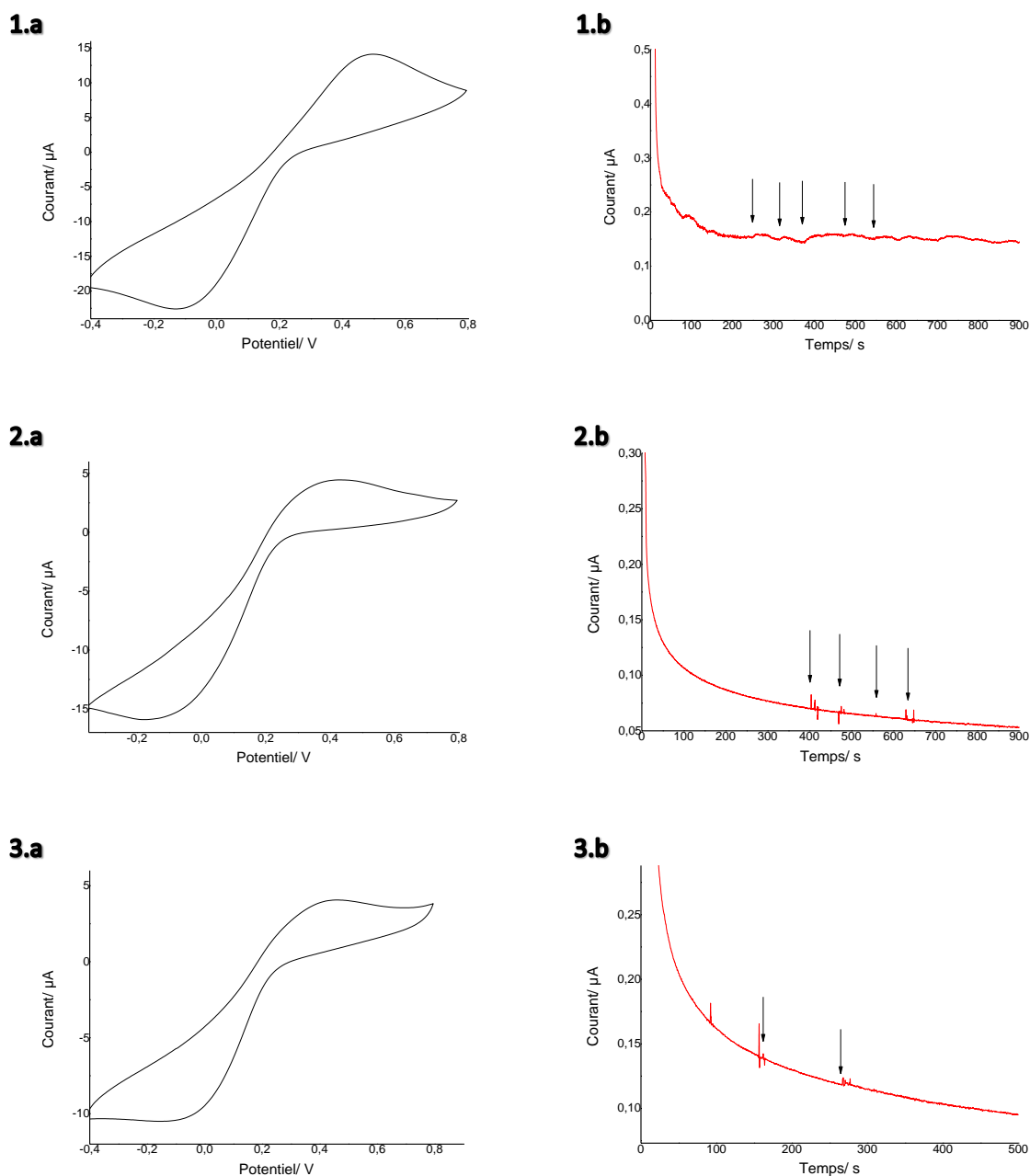


Figure 23. Electrochimie des floculats bactériens obtenus en présence de CNT.

Le médiateur $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ est présent à 5 mM en solution tamponnée phosphate à pH 7.

1 : Réponse en voltampérométrie cyclique (1.a) lue à 50 mV/set en ampérométrie à un potentiel appliqué à l'électrode de 0,65 V (1.b) du floculat de la souche de *P. putida*. Chaque flèche correspond à l'ajout de 0,5 mM de glucose.

2 : Réponse en voltampérométrie cyclique (2.a) lue à 50 mV/set en ampérométrie à un potentiel appliqué à l'électrode de 0,70 V (2.b) du floculat de la souche CIP8040. Chaque flèche correspond à l'ajout de 1 mM de formiate.

3 : Réponse en voltampérométrie cyclique (3.a) lue à 50 mV/set en ampérométrie à un potentiel appliqué à l'électrode de 0,67 V (3.b) du floculat de la souche MRI. Chaque flèche correspond à l'ajout de 1 mM de formiate.

23.3.a). Ces petites différences peuvent s'expliquer par des différences dans la densité des bactéries à la surface des électrodes, ainsi qu'à la présence d'exo-polymères comme des exo-polysaccharides. Cette différence n'est pas indicative d'une différence d'activité métabolique. Le potentiel de l'électrode de travail est imposé à 200 mV au-dessus de ce potentiel de pic pour l'expérience d'ampérométrie. Il est en conséquence à 0,65 V pour *P. putida*, 0,7 V pour CIP8040 et 0,67 V pour MR1. Les Figures 23.1.b, 23.2.b et 23.3.b présentent elles les réponses en ampérométrie des floculats. Dans les 3 cas la réponse reste la même. Le courant décroît puis se stabilise à une valeur donnée. L'ajout d'une source de carbone à des temps donnés, 1 mM de formiate pour CIP8040 et MR1 et 0,5 mM de glucose pour *P. putida* ne provoque aucune augmentation du courant mesuré à l'électrode de travail. Ainsi, aucune des souches bactériennes testées n'a d'activité métabolique. Les CNT ont très vraisemblablement un effet létal sur les bactéries dans nos conditions de travail après 2 heures de contact.

VIII.1.3. Confirmation de l'état des bactéries par cytomarquage

Afin de confirmer la létalité des CNT sur les bactéries, les floculats des différentes souches bactériennes sont observés en microscopie sous épifluorescence. Après avoir remis en suspension les floculats, les cellules ont été marquées au SYTO9 et au PI puis filtrées sur membranes (pores de 0,22 μm) avant d'être observées en microscopie (Figures 24.1 à 24.6). Dans chacun des cas, la totalité ou la presque totalité (Figure 24.1) des cellules sont colorées en rouge. Cette configuration est répétée sur l'ensemble des lames.

La coloration en rouge des cellules est due à une présence plus élevée de PI dans la cellule que de SYTO9, tandis que la coloration en vert des cellules est due à l'absence ou à la très faible présence de PI par rapport à celle du SYTO9. Le PI entre dans la cellule uniquement si sa membrane est endommagée, contrairement au SYTO9 qui pénètre la cellule quel que soit son état. Un marquage rouge des bactéries est donc témoin de cellules en mauvais état et perméabilisées tandis qu'un marquage vert des cellules est témoin de cellules présentant une membrane intègre. Si on considère que les bactéries marquées en rouge sont mortes ou du moins ont une membrane cytoplasmique endommagée, alors l'effet cytotoxique des CNT est confirmé.

VIII.2. Limitation de la toxicité des CNT en présence de cytochrome c

VIII.2.1. Flocculation du modèle d'étude en présence de cytochrome c

Le modèle précédent, c'est-à-dire 0,1 mg/ml de CNT et 10^9 cell/ml des différentes souches bactériennes, est testé en présence de 0,2 mM cytochrome c (Figure 26). La flocculation de ce modèle diffère légèrement de précédemment. Elle est plus rapide avec des phases différentes observables dès 30 minutes pour les souches CIP8040 et MR1 (Figure 25.3) au lieu d'une heure avec le modèle précédent (Figure 21.3). La flocculation complète de *P. putida* n'est visible qu'au bout de 2 heures (Figure 25.5 à gauche), mais elle semble plus importante que dans le modèle précédent où le volume du floculat est plus faible (Figure 21.5 à gauche). La flocculation en présence de cytochrome c est donc plus rapide pour

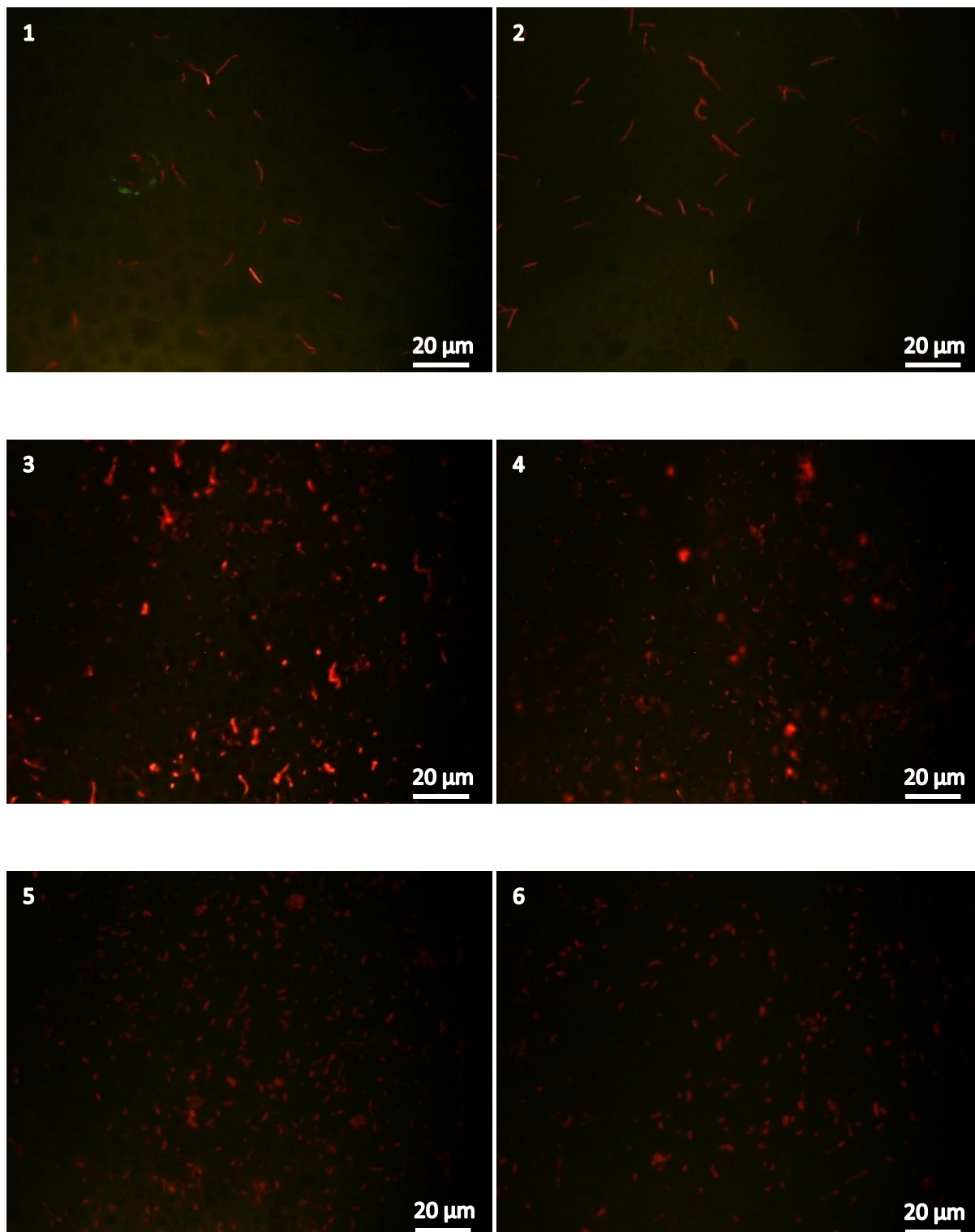


Figure 24. Photographies en microscopie à épifluorescence des floculats des différentes souches bactériennes en présence de CNT.

*Avant observation par microscopie à épifluorescence les floculats sont remis en suspension, dilués pour une meilleure observation, marqués en PI et SYTO9 puis filtrés. 1 et 2 : *P. putida*. 3 et 4 : CIP 8040. 5 et 6 : MRI. Le SYTO9 marque les cellules en vert, le PI marque les cellules en rouge. Le SYTO9 est capable de pénétrer dans toutes les cellules alors que le PI n'est capable de pénétrer que dans les cellules présentant une membrane endommagée*

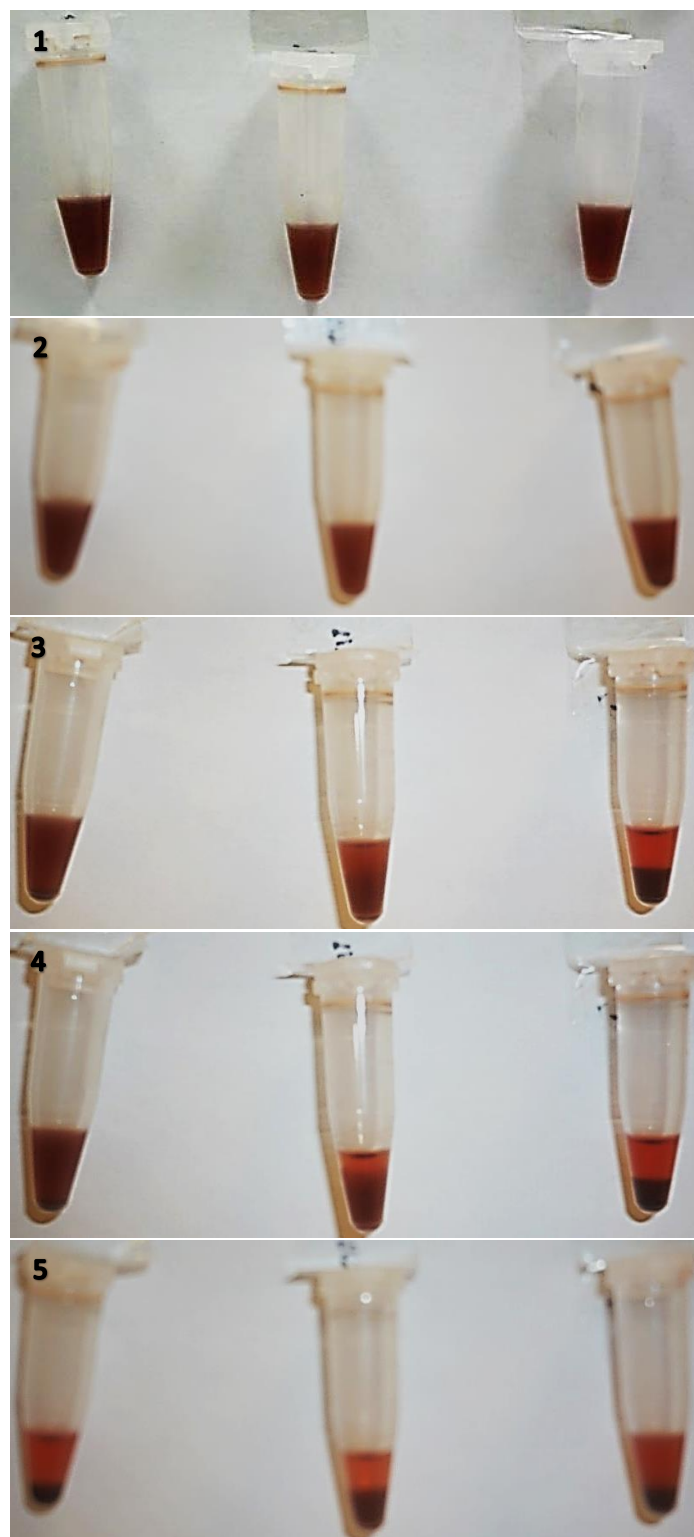


Figure 25. Flocculation des différentes souches bactériennes avec des CNT en présence de cytochrome c.

Photographies de suspensions des différentes souches bactériennes, respectivement de gauche à droite P. putida, S. putrefaciens CIP8040 et S. oneidensis MR1 en présence de CNT (0,1 mg/mL) et de cytochrome c (0,2 mM) à différents temps. 1 : t0. 2 : 15 minutes. 3 : 30 minutes. 4 : 1 heure. 5 : 2 heures.

les couches MR1 et CIP8040 et plus importante pour la souche de *P. putida*. Par ailleurs, en présence de cytochrome c, la souche MR1 semble flocculer plus rapidement que la souche CIP8040. Deux phases sont distinctes à 30 minutes pour MR1, tandis qu'elles sont encore floues pour CIP8040 (Figure 25.3 au milieu CIP 8040 et à droite MR1).

VIII.2.2. Electrochimie du floculat

Le floculat des souches bactériennes en présence des CNT et de cytochrome c est ensuite utilisé pour des analyses électrochimiques afin de mettre en évidence la vitalité des cellules dans ce système. La réalisation de l'échantillon est décrite dans la Figure 26. Cinq microlitres du floculat, après 2 heures de contact entre la souche bactérienne, les CNT et les cytochromes c, sont déposés sur l'électrode pour être analysés en électrochimie.

Les mesures en électrochimies sont réalisées en présence de 5 mM de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$. Les Figures 27.1.a, 27.2.a et 27.3.a présentent les voltampérogrammes cycliques des floculats avec les différentes souches bactériennes : *P. putida* (1), CIP8040 (2) et MR1 (3). Pour *P. putida* un pic d'oxydation est visible à 0,44 V (Figure 27.1.a), il est visible à 0,26 V pour CIP8040 (Figure 27.2.a) et 0,37 V pour MR1 (Figure 27.3.a). Le potentiel de l'électrode de travail en ampérométrie est ainsi ajusté à 0,64 V pour *P. putida*, 0,46 V pour CIP8040 et 0,57 V pour MR1. Les Figures 27.1.b, 27.2.b et 27.3.b présentent les réponses en ampérométrie des floculats. Une réponse à l'ajout de la source de carbone est observée dans les 3 cas. Sur la Figure 27.1.b une augmentation du courant de 170 nA à 450 nA est observée lors de l'ajout de glucose à 420 secondes. La valeur de courant atteinte semble être maximale. Les ajouts successifs de 0,5 mM à 480, 540, 600 et 680 secondes permettent ensuite de maintenir cette valeur plafond. La valeur du courant diminue ensuite ce qui suggère que le système n'est pas parfaitement stable. Sur les Figures 27.2.b et 27.3.b des réponses similaires sont visibles mais elles sont plus faibles. L'augmentation du courant n'est que de 60 nA avec CIP8040 à l'ajout de formiate à 130 secondes et de 200 nA avec MR1 à l'ajout de 1mM de formiate à 300 secondes. Ces différences observées dans les intensités en courant pourraient être dues à des densités variables de bactéries immobilisées sur les électrodes. Il est toutefois difficile d'estimer cette densité par notre approche. L'ajout de la source de carbone a donc permis la génération d'un courant plus important au niveau de l'électrode de travail, cette augmentation du courant est témoin de l'activité métabolique des bactéries. Les souches testées sont donc capables d'activité métabolique quand elles flocculent en présence de CNT et de cytochrome c alors qu'elles n'en sont pas capables en présence uniquement de CNT sans cytochromes c. Les cytochromes c auraient donc un effet potentiel d'atténuation de la cytotoxicité des CNT sur les souches testées.

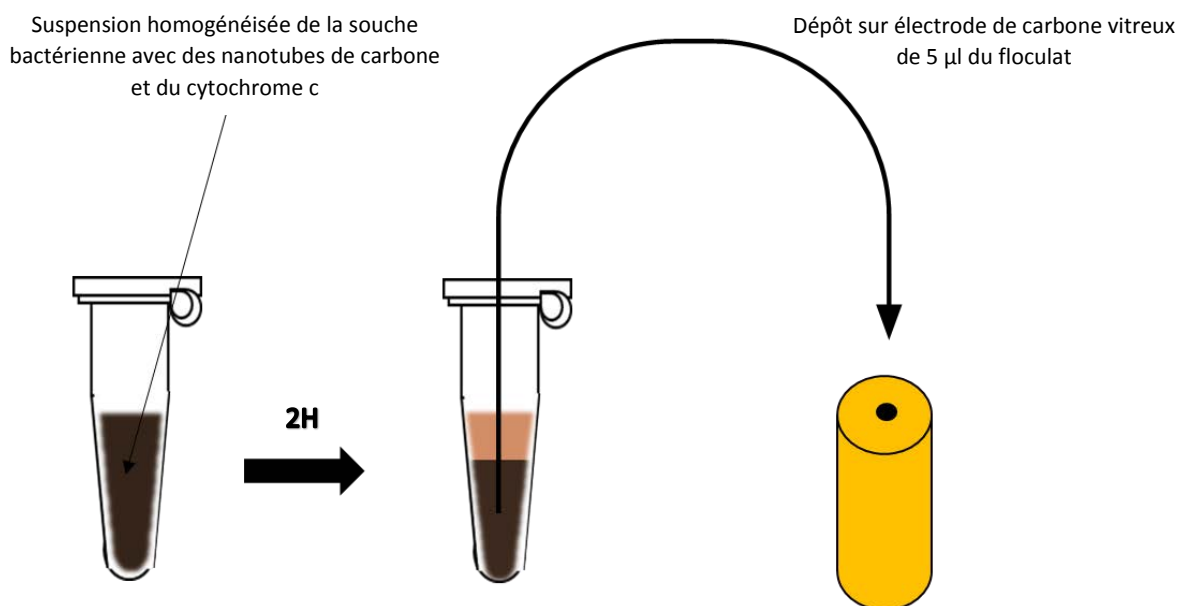


Figure 26. Représentation schématique de la stratégie amenant à l'obtention des floculats des souches bactériennes en présence de CNT et de cytochrome c testés en électrochimie.

Les suspensions bactériennes sont homogénéisées avec des CNT et le cytochrome c à t0. Après 2h, 5 µl du floculat sont déposés sur l'électrode puis séché à température ambiante pour les analyses électrochimiques.

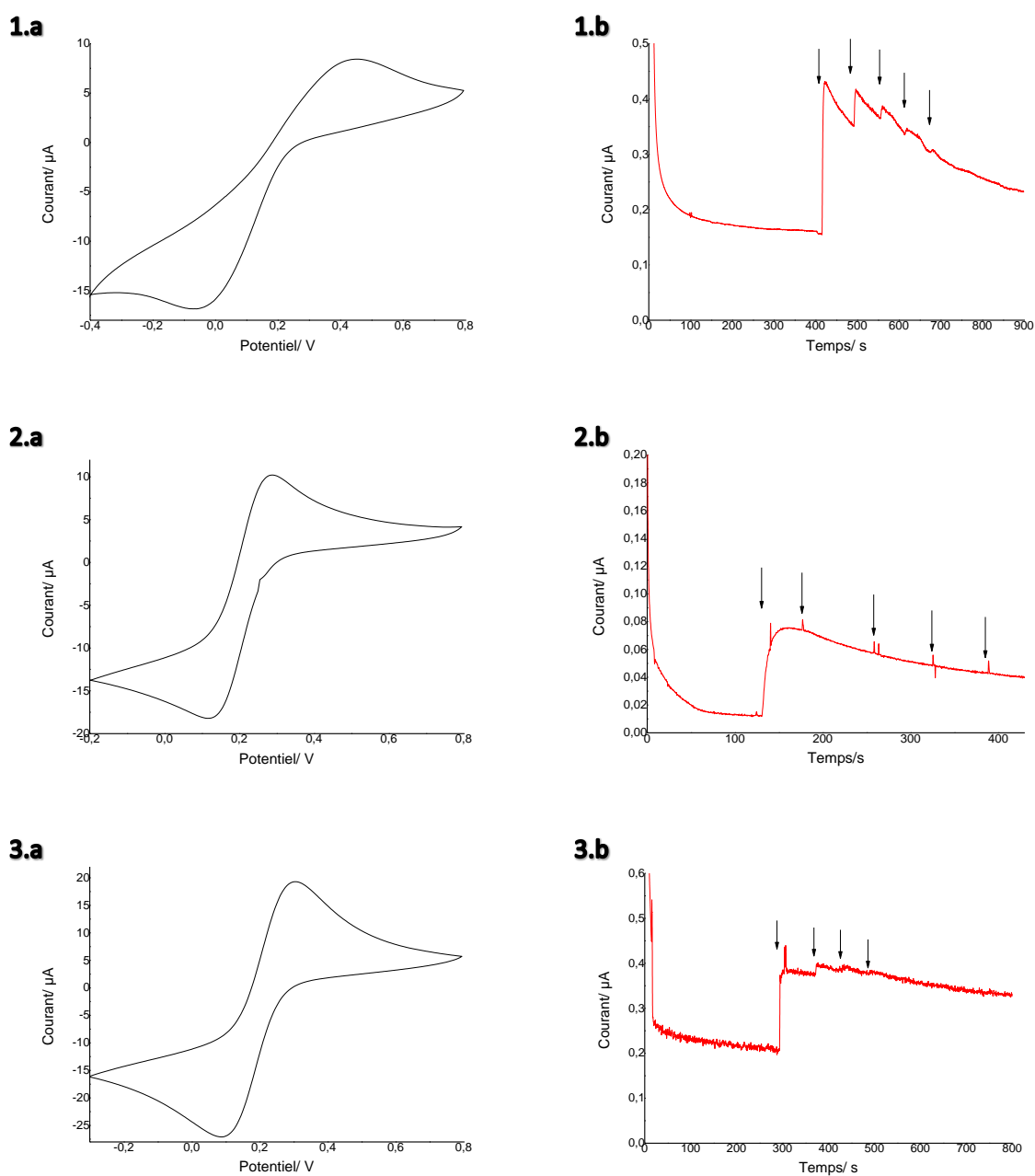


Figure 27. Electrochimie des floculats obtenues avec les différentes souches bactériennes en présence de CNT et de cytochrome c.

Le médiateur $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ est présent à 5 mM en solution tamponnée phosphate à pH 7.

*1 : Réponse en voltampérométrie cyclique (a) lue à 50 mV/s et en ampérométrie à un potentiel appliqué à l'électrode de 0,64 V (b) du floculat de la souche de *P. putida*. Chaque flèche correspond à l'ajout de 0,5 mM de glucose.*

2 : Réponse en voltampérométrie cyclique (a) lue à 50 mV/s et en ampérométrie à un potentiel appliqué à l'électrode de 0,46 V (b) du floculat de la souche CIP8040. Chaque flèche correspond à l'ajout de 1 mM de formiate.

3 : Réponse en voltampérométrie cyclique (a) lue à 50 mV/s et en ampérométrie à un potentiel appliqué à l'électrode de 0,57 V (b) du floculat de la souche MRI. Chaque flèche correspond à l'ajout de 1 mM de formiate.

VIII.2.3. Comparaison de l'état des bactéries en présence et en absence de cytochrome c dans le floculat par cytofluorescence

Afin de confirmer la survie des bactéries en présence de CNT lorsque le cytochrome c est ajouté, les floculats des différentes souches bactériennes sont observés en microscopie optique. Après avoir remis en suspension les floculats, les cellules ont été marquées au SYTO9 et au PI puis filtrées sur membranes (pores de 0,22 μm) avant d'être observées (Figures 28.1 à 28.6). Dans chacun des cas est observée une proportion équivalente de bactéries marquées en rouge ou marquées en vert. Cette configuration est répétée sur l'ensemble des lames observées. La coloration en rouge des cellules est due à une présence plus élevée de PI dans la cellule que de SYTO9 tandis que la coloration en vert est due à l'absence ou à la très faible présence de PI par rapport à celle du SYTO9. En présence de cytochrome c avec les CNT, une population bactérienne intègre apparente est observée tandis qu'en présence uniquement des CNT, la population apparente est majoritairement « morte » (Figure 24). Ces données qualitatives confirment donc l'effet atténuateur du cytochrome c sur la toxicité des CNT sur les 3 souches testées.

Afin de confirmer ces observations qualitatives par des données quantitatives, des mesures de cytométrie en flux ont été réalisées sur les échantillons des floculats de bactéries avec les CNT en présence et absence de cytochrome c. Malheureusement, les résultats obtenus n'ont pas permis de conclure et donc de confirmer (ou infirmer) ceux obtenus en microscopie optique sous épifluorescence. La fluorescence du PI est en effet trop faible. Elle est confondue en grande partie avec l'auto-fluorescence des CNT en présence de PI, (Figure 29) par la délimitation en rouge. Il est donc impossible de déterminer le nombre de cellules colorées en rouge et *a fortiori* le pourcentage de bactéries considérées comme vivantes par rapport à celles mortes en fonction de la présence ou l'absence de cytochrome c.

VIII.3. Optimisation du système

VIII.3.1. Electrochimie du floculat en présence de Sol-Gel

La floculation de la souche MR1 (10^9 cell/ml) avec les CNT (0,1 mg/ml) a finalement été testée en présence de silice obtenue par voie sol-gel. Le floculat testé en électrochimie est obtenu de la même façon que décrit précédemment, après 2 heures de floculation. Les mesures sont réalisées en présence du médiateur $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ afin de mettre en évidence une activité métabolique des bactéries. La Figure 30.a présente le voltampérogramme cyclique du floculat en présence de CNT et de silice pour la souche MR1. Un pic d'oxydation est visible à 0,31 V (Figure 30.a). Le potentiel de l'électrode de travail en ampérométrie est réglé en conséquence à 0,51 V. La Figure 30.b présente la réponse en ampérométrie du floculat testé. Une augmentation de 50 nA est observée lors de l'ajout de la source de carbone (formiate de sodium à 1 mM) à 100 secondes avec un passage de 100 nA à 150 nA. Le courant diminue ensuite régulièrement malgré l'ajout de la source de carbone de façon régulière dans le milieu d'analyse.

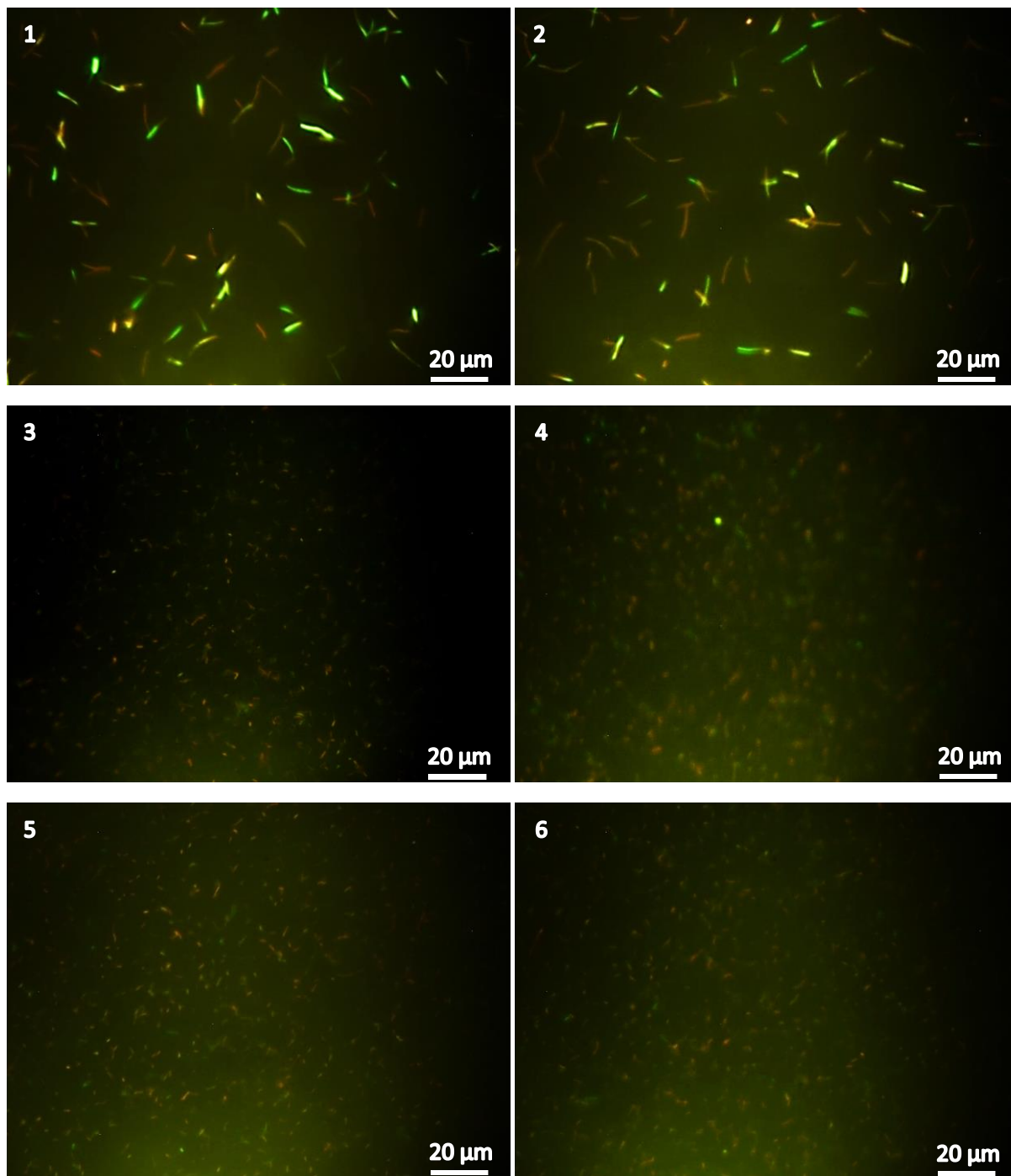


Figure 28. Photographies en microscopie à épifluorescence des floculats des différentes souches bactériennes en présence de CNT et de cytochrome c.

*Avant observation par microscopie à épifluorescence les floculats sont remis en suspension, dilués pour une meilleure observation, marqués en PI et SYTO9 puis filtrés. 1 et 2 : *P. putida*. 3 et 4 : CIP 8040. 5 et 6 : MRI. Le SYTO9 marque les cellules en vert, le PI marque les cellules en rouge. Le SYTO9 est capable de pénétrer dans toutes les cellules alors que le PI n'est capable de pénétrer que dans les cellules présentant une membrane endommagée.*

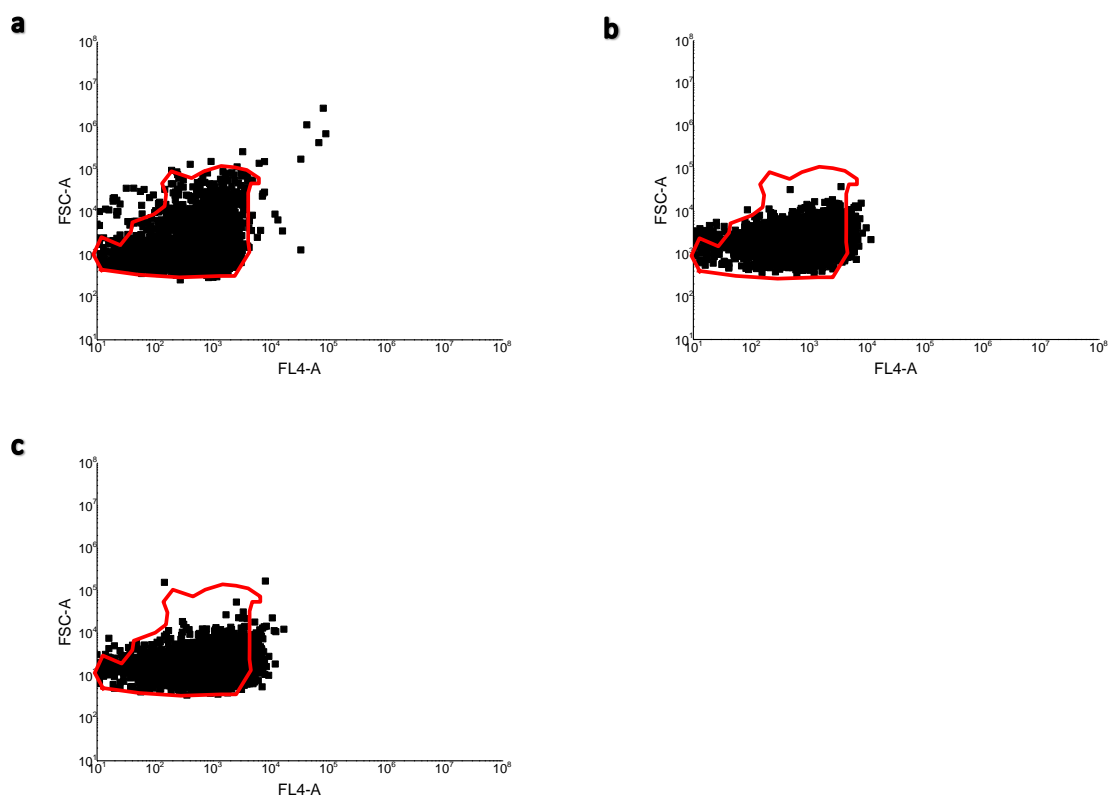


Figure 29. Cytométrie en flux des floculats obtenu avec la souche MR1 et les CNT en présence de cytochrome c.

Observation de la fluorescence par rapport à la taille des particules par cytométrie en flux. La fluorescence est observée en FL4-A capable de détecter la fluorescence du PI. La zone délimitée en rouge est l'auto fluorescence générée par les CNT. Les échantillons sont remis en suspension avant utilisation.

A : Cytométrie en flux réalisée sur une suspension de CNT : Une zone est délimitée en rouge à partir de l'auto fluorescence générée par les CNT

B : Cytométrie en flux réalisée sur les floculats, remis en suspension, de MR1 en présence de CNT

C : Cytométrie en flux réalisé sur les floculats, remis en suspension, de MR1 en présence de CNT et de cytochrome c

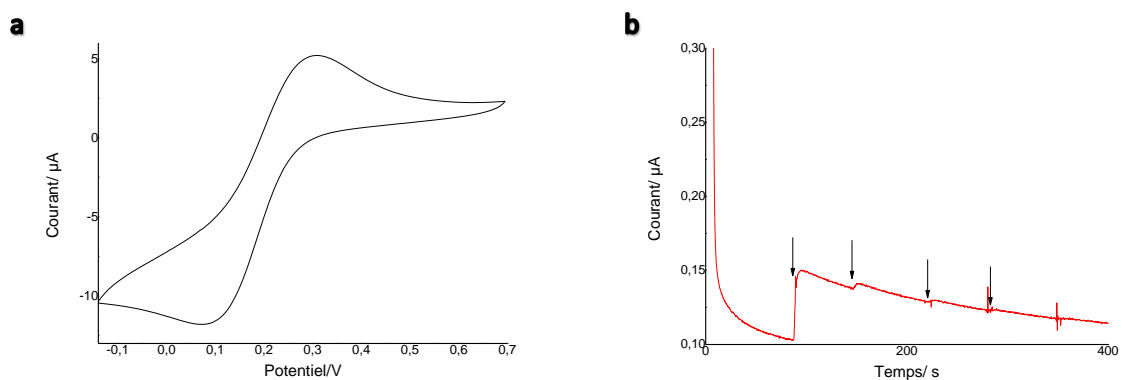


Figure 30. Electrochimie du floculat obtenu avec la souche MR1 en présence de CNT et de silice.

Le médiateur $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ est présent à 5 mM en solution tamponnée phosphate à pH 7. Réponse en voltampérométrie cyclique (a) lue à 50 mV/s et en ampérométrie à un potentiel appliqué à l'électrode de 0,51 V (b) du floculat de la souche MR1. Chaque flèche correspond à l'ajout de 1 mM de formiate.

L'activité de ce système n'est donc pas stable et n'est que peu élevée. Il est cependant possible de considérer que la silice possède elle aussi un effet atténuateur sur la cytotoxicité des CNT sur MR1 car sa présence avec les CNT permet de maintenir une réponse en ampérométrie.

VIII.3.2. Electrochimie du floculat en présence de silice et cytochrome c

Cette même floculation (souche MR, CNT et silice) a enfin été testée en présence de 0.2 mM de cytochrome c. Le floculat testé en électrochimie est obtenu de la même façon que décrit précédemment. Les mesures sont réalisées cette fois-ci en absence du médiateur $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ afin de mettre en évidence la capacité du biofilm à transférer par lui-même les électrons au milieu extracellulaire, en utilisant le transfert direct des bactéries vers les nanotubes de carbone, ou le transfert par le cytochrome c jouant ainsi un double rôle, de médiateur redox et de protection contre la cytotoxicité. La Figure 31.a présente le voltampérogramme cyclique sur les cellules du floculat en présence de CNT, de cytochrome c et de silice pour la souche MR1. Un pic d'oxydation est visible à 0,1 V et une augmentation de la génération de courant est visible à 0,26 V (Figure 31.a). Le potentiel de l'électrode de travail en ampérométrie est ici réglé à 0,26 V pour maximiser la production de courant dans ces conditions tout en évitant que la réponse en ampérométrie soit partiellement due à l'activité oxydative d'autres éléments que les cellules bactériennes. La Figure 31.b présente la réponse en ampérométrie du floculat testé. Une augmentation très importante est observée lors de l'ajout de la source de carbone (formiate à 1 mM) à 270 secondes avec un passage de 150 nA à plus de 1,1 μA . Un second ajout de 1mM de formiate à 340 secondes permet d'atteindre un courant plafond à 1,2 μA . Les ajouts successifs de 1 mM de formiate permettent ensuite de stabiliser la production de courant au niveau de l'électrode vers 1 μA . Dans le cas présent, on observe une augmentation du courant de 1 μA et cela en l'absence du médiateur soluble $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$. Cette augmentation de courant est très largement supérieure à celle observée aux mêmes concentrations de CNT, de bactéries et de cytochrome c en absence de sol-gel sur la Figure 27.3.b (200 nA). De même, elle est supérieure à celle observée aux mêmes concentrations sans les cytochromes c mais en présence de silice et du médiateur en solution sur la Figure 30.b (50 nA). Ces résultats suggèrent qu'en présence de cytochrome c, des CNT et de silice l'activité de transfert extracellulaire des électrons par la souche MR1 est relativement importante. Il est ainsi possible d'optimiser le transfert extracellulaire d'électrons du système, c'est-à-dire la génération de courant par ce dernier, en utilisant de manière conjointe les CNT, les cytochromes c et la silice. Les effets atténuateurs de la silice et de cytochrome c sur la cytotoxicité des CNT vis-à-vis des cellules semblent donc être cumulables.

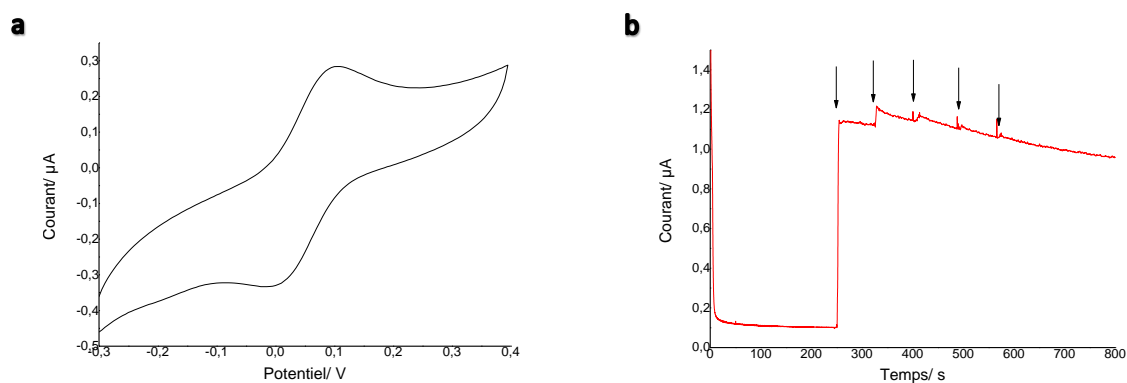


Figure 31. Electrochimie du floculat obtenu avec la souche MR1 en présence de CNT, de cytochrome c et de silice.

Le médiateur $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ n'est pas présent en solution tamponnée phosphate à pH 7. Réponse en voltampérométrie cyclique (a) lue à 50 mV/set en ampérométrie à un potentiel appliqué à l'électrode de 0,26 V (b) du floculat de la souche MR1. Chaque flèche correspond à l'ajout de 1 mM de formiate.

Discussion

IX. Discussion

IX.1. Elaboration d'un biofilm artificiel électroactif

IX.1.1. Influence du temps d'immersion sur l'épaisseur du biofilm artificiel formé

Une partie du travail de ce projet a porté sur la mise au point du protocole permettant l'élaboration d'un biofilm électroactif artificiel. Il est intéressant de noter que les temps d'immersions dans les différentes suspensions n'ont que peu d'impacts sur l'épaisseur du biofilm formé. En effet pour un biofilm formé en 6 h d'immersion dans la suspension bactérienne (6 cycles d'assemblage couche-par-couche à 1h dans la suspension bactérienne) et en 2h d'immersion dans la suspension bactérienne (6 cycles d'assemblage couche-par-couche à 20 min dans la suspension bactérienne) l'épaisseur moyenne du biofilm formé reste la même. Au contraire un biofilm naturel a une épaisseur qui est proportionnelle à son temps de formation. Cette différence peut s'expliquer par les étapes de rinçages au cours du protocole. Elles vont permettre de décrocher les cellules qui ne sont pas fixées. Durant le premier cycle, l'utilisation de plaque ITO traitée au PEI permet d'obtenir en un temps court une couche monocellulaire fixée sur le support. La fixation des bactéries sur cette plaque est très forte due à la propriété de fixation bactérienne du PEI (Dague, 2006). Le rinçage permet donc d'enlever les bactéries non fixées par interaction électrostatique car leur fixation est moins forte. L'avantage qu'apporterait donc un temps d'immersion plus long dans la suspension bactérienne est limité. Au cours des cycles suivants, il était espéré que les CNT puissent assurer la fixation rapide des bactéries. Ces derniers ont en effet une propriété de sorption très importante pour les bactéries. De manière similaire, les bactéries n'étant pas liées aux CNT sont plus facilement retirées du film lors du rinçage.

IX.1.2. Relation entre l'épaisseur du biofilm et le nombre de cycle d'assemblage

Le biofilm artificiel formé par la méthode d'assemblage couche-par-couche a une épaisseur relative au nombre de cycles d'assemblage réalisés. Les mesures obtenues permettent de mettre en évidence que l'augmentation de l'épaisseur est proportionnelle au nombre de cycles. Cependant un cycle n'est pas suffisant pour obtenir une couche monocellulaire. En effet la taille de cette dernière est estimée à 0,3 μm , épaisseur correspondant au diamètre de *P. putida* et à 4 cycles, l'épaisseur observée n'est que de 0,7 μm et à 12 cycles elle dépasse à peine 1,1 μm . Une hypothèse avancée pour expliquer cette observation est que le dépôt d'une couche bactérienne lors d'un cycle est partiel et laisse des lacunes dans le film formé. Les cycles suivants comblent ces lacunes. Ce phénomène s'observe aussi dans la formation des biofilms naturels (Donlan, 2002).

Par ailleurs, l'augmentation de l'épaisseur du biofilm formé par la méthode d'assemblage couche-par-couche tend à décroître avec le temps. Cette tendance pourrait s'expliquer par la différence entre la balance des forces de fixation et des forces de cisaillement lors du rinçage selon la localisation des cellules. Cette balance est défavorable aux bactéries éloignées du support dans le biofilm, elles seront donc enlevées plus facilement lors du rinçage que celles adhérant directement au support.

L'augmentation du nombre de lacunes au cours de la formation du biofilm peut apporter une autre explication. La fixation des cellules serait favorisée au niveau des lacunes au cours des cycles suivants. Le biofilm s'homogénéiserait au niveau de sa surface au détriment de l'augmentation de son épaisseur maximale.

IX.1.3. Impact des CNT sur l'hétérogénéité de la structure

Les CNT sont un facteur d'hétérogénéité important pour la structure formée, ce qui va à l'encontre de la propriété recherchée initialement. Cet impact peut s'expliquer par les propriétés inhérentes aux CNT. D'une part, leur dispersion dans la suspension n'est pas homogène. Les CNT sont des particules très hydrophobes, leurs fonctionnalisations avec des fonctions $-\text{COOH}$ diminuent ce caractère et facilitent leur dispersion dans l'eau, mais ils restent toujours des particules hydrophobes qui ont tendance à s'agréger entre elles. Un tel modèle de dispersion dans la suspension utilisée pour les cycles d'assemblage couche-par-couche a un impact sur la formation du biofilm artificiel. Les CNT ne se déposeront pas de façon homogène sur l'ensemble de la structure. D'autre part, les CNT ont une capacité de sorption très importante pour les bactéries (Upadhyayula et al., 2008 ; Upadhyayula et al., 2009a et 2009b). Cette capacité alliée à leurs répartitions hétérogènes favorise une fixation hétérogène des bactéries au cours des cycles suivants. Chaque cycle augmente ainsi l'hétérogénéité du biofilm.

Agiter la suspension de CNT permet de diminuer en partie l'hétérogénéité du biofilm. Le dépôt des CNT est en effet plus homogène dans ces conditions. L'effet hétérogène lié à la capacité d'agrégation des CNT est donc moindre dans ce cas. Cependant, l'effet hétérogène reste important pour un grand nombre de cycles réalisés même avec un dépôt homogène des CNT.

Par ailleurs, l'intérêt du cytochrome c pour favoriser une croissance homogène de l'assemblage bactérien a été testé. L'effet favorable du cytochrome c est probablement lié à l'interaction électrostatique entre les bactéries, globalement chargées négativement et cette protéine chargée positivement (point isoélectrique autour de 10) dans nos conditions expérimentales.

IX.1.4. Absence d'électroactivité du biofilm artificiel formé

Finalement le biofilm artificiel obtenu avec les CNT n'est pas électroactif. Aucune activité n'est observée en électrochimie en absence ainsi qu'en présence d'un médiateur redox en solution. Ce médiateur permet de mesurer l'activité métabolique des bactéries présentes car il peut aller collecter les électrons jusque dans le périplasme de la cellule. Si la bactérie est métaboliquement active, un signal serait donc visible. Les résultats obtenus ne montrent aucun signal lié à l'addition de glucose dans la solution. Il y a deux possibilités : soit la concentration en bactérie métaboliquement active est trop faible dans la structure et la réponse n'est pas mesurable, soit les bactéries sont mortes. La mort des cellules dans le biofilm artificiel peut résulter de plusieurs situations. Le stress engendré par les étapes de formation du biofilm artificiel peut en être la cause. Les bactéries ont changé de milieux plusieurs fois et le dépôt peut subir un stress hydrique lors du séchage. L'autre cause peut venir directement des CNT.

Ces derniers sont connus pour leur effet cytotoxique sur les cellules procaryotes (Narayan et al., 2005; Kang et al., 2007; Simon-Deckers et al., 2009). L'expérience de floculation des suspensions bactériennes en présence de CNT a permis d'aborder plus directement cette question de la cytotoxicité, l'interaction entre les bactéries et les nanotubes étant, *a priori*, similaire à celle présente dans l'assemblage couche-par-couche.

IX.2. Autoassemblage en biofilm artificiel par floculation des souches en présence des CNT

La floculation des bactéries avec les CNT en présence ou non de cytochrome c est différente selon la souche considérée. De manière générale *P. putida* flocule plus lentement que les deux souches de *Shewanella* (*S. putrefaciens* CIP80.40 et *S. oneidensis* MR1). Ce résultat est en accord avec les travaux de Korenevsky & Beveridge (2007) et Furukawa & Dale (2013) montrant que les propriétés de surface de *Shewanella* favorisent la floculation des bactéries.

Plusieurs résultats ont alors retenus notre attention. D'une part, la floculation est différente entre CIP8040 et MR1 en absence ou en présence de cytochrome c. Dans le premier cas, CIP8040 flocule plus vite que MR1 alors que dans le second cas c'est l'inverse. Des études ont montré qu'il existe des différences entre ces deux souches. MR1 doit ses capacités de floculation plus au lipopolysaccharides (LPS) présents sur sa membrane externe qu'aux EPS alors que la flocualtion de CIP8040 résulte plus des EPS que des LPS. La différence de composition au niveau de la membrane externe explique sans doute la différence de floculation des deux souches avec les CNT. L'augmentation de la floculation de MR1 en présence de cytochrome c par rapport à CIP 80.40 est sans doute due à la présence de ce même type de protéine en abondance sur sa membrane externe. D'autre part, en présence de cytochrome c en plus des CNT, la floculation de *P. putida* est beaucoup plus importante. *P. putida* en présence des CNT a une organisation différente selon l'ajout de CNT ou non. Enfin, les souches floculent plus rapidement en présence de cytochrome c. Cette observation peut s'expliquer par la charge positive des cytochromes c (point isoélectrique ≈ 10) en condition expérimentale alors que les CNT et les bactéries sont chargées négativement. Des liaisons électrostatiques se formeront alors entre les CNT et les cytochromes c et entre les cytochromes c et les bactéries, accélérant le processus de floculation.

La floculation des bactéries, leur organisation dans le floculat et son importance sont donc variables selon les composants présents dans le milieu. Il est possible de parler ici d'autoassemblage en biofilm artificiel car la structure obtenue est une structure multicouche désordonnée avec une organisation dépendante des particules présentes avec les bactéries.

IX.3. Cytotoxicité des CNT

IX.3.1. Cause de la cytotoxicité

L'effet cytotoxique des CNT sur les souches testées est mis en évidence à travers cette étude. La cause de la cytotoxicité semble être essentiellement due à l'interaction directe entre les CNT et les

cellules (Narayan et al., 2005) notamment par la perforation de la cellule par les CNT. La technique de marquage *bacLight*TM permet de mettre évidence cette action de perforation car les cellules en présence des CNT ont presque toutes leurs membranes perméables. Cet état de la membrane est attendu au vu de l'action des CNT. L'absence de réponse mesurable en électrochimie des bactéries dans ces conditions confirme par ailleurs que les cellules perméabilisées ne sont sans doute pas actives, signalant l'absence probable de métabolisme dans la cellule.

IX.3.2. Mécanisme d'atténuation de la cytotoxicité des CNT

En présence de cytochrome c en plus des CNT, une activité métabolique est observable via l'électrochimie tandis que le *bac light* révèle que la moitié des cellules ont une membrane intacte (colorées uniquement au SYTO 9). La présence de cytochrome c semble donc atténuer significativement la toxicité due à l'effet de perforation de la cellule par les CNT. Une hypothèse sur le modèle d'atténuation de l'effet cytotoxique des CNT par le cytochrome c est le rôle d'interface qu'il semble jouer entre la bactérie et le CNT, éventuellement en tapissant la surface des nanotubes (Figure 32). Cette hypothèse va dans le sens des résultats obtenus. En tapissant les CNT, la protéine empêcherait les CNT d'exercer une interaction directe avec les cellules et de les perforer.

En présence de silice, obtenue par voie sol-gel, en plus des CNT, une activité métabolique est aussi observée. Le test *bacLight*TM n'ayant pas été réalisé sur ces échantillons, on ne peut que supposer que comme le cytochrome c, la silice permet de séparer physiquement les CNT des cellules et donc de limiter l'effet cytotoxique induit par l'interaction directe des CNT avec les cellules.

Lors de l'utilisation de la silice conjuguée avec le cytochrome c en présence de CNT, l'activité obtenue est beaucoup plus importante. Deux cas de figures sont imaginables. Dans le premier, les propriétés d'atténuation de l'effet cytotoxique des CNT se cumulent. Dans le deuxième cas, les propriétés d'atténuations de l'effet cytotoxique des CNT ne se cumulent pas. Le cytochrome c est alors capable de servir de navette (ou médiateur redox) pour les électrons et permettent donc d'augmenter la réponse du biofilm artificiel formé, la silice permettant de stabiliser le cytochrome c dans la structure et éventuellement de maintenir la viabilité des bactéries comme déjà décrit dans la littérature (Ghach, 2013).

Si l'hypothèse d'une interaction favorable entre les nanotubes de carbone et le cytochrome était confirmée, elle permettrait d'envisager l'autoassemblage d'une façon optimale des bactéries et des nanotubes de carbone, le cytochrome ayant une position parfaite pour transférer de façon optimale les électrons de la bactérie aux nanotubes et ensuite à l'électrode collectrice. Si les courants obtenus en utilisant uniquement le cytochrome c comme médiateur redox ne constituent pas une preuve de ce mécanisme il supporte bien cette hypothèse qu'il convient d'explorer plus en détail.

IX.4. Conclusion

L'élaboration d'un biofilm artificiel par la méthode d'assemblage couche-par-couche s'est avérée techniquement réalisable avec une possibilité d'obtenir un film de plus en plus épais en fonction

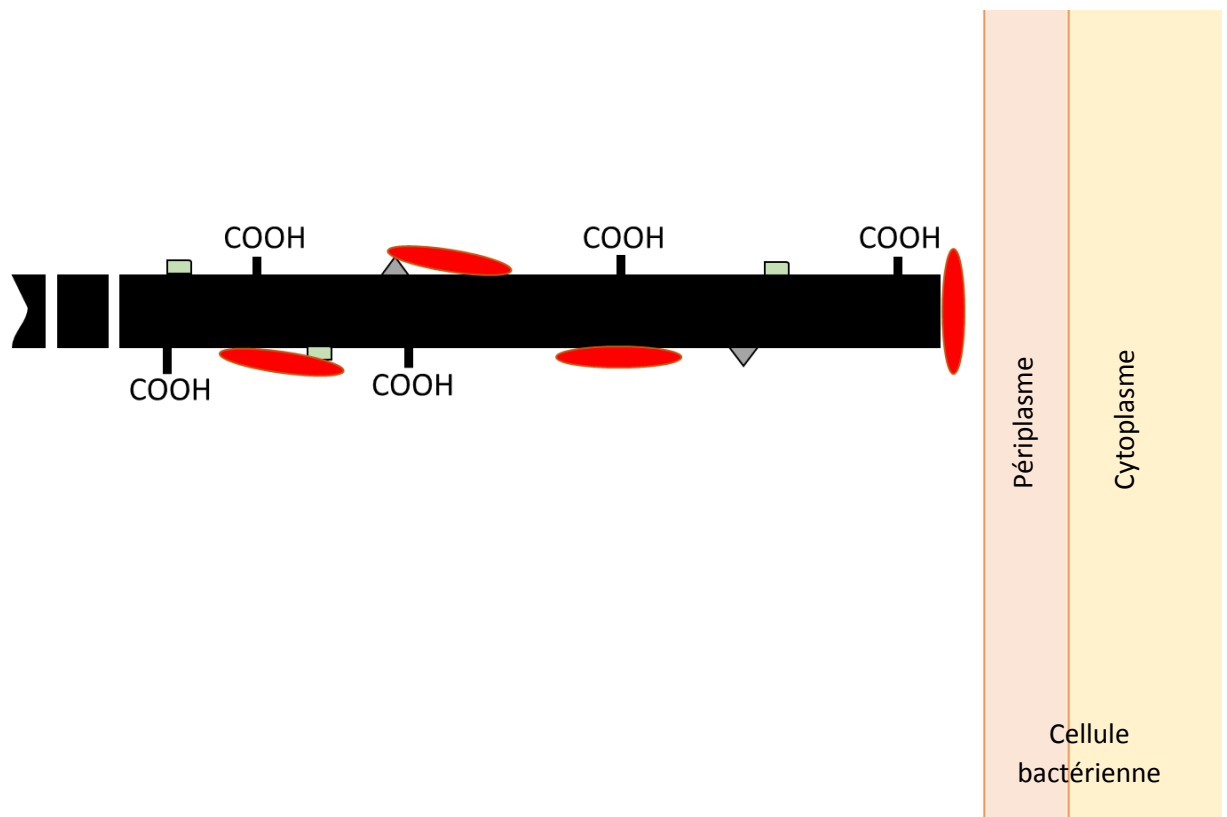


Figure 32. Représentation schématique du mécanisme hypothétique d'atténuation de l'effet cytotoxique des CNT sur les bactéries par le cytochrome c.

Les ovales rouges représentent les cytochromes c, les rectangles verts et triangle gris représentent des impuretés sur le CNT. Le CNT est modélisé en un rectangle noir et les fonctionnalisations au COOH sont représentées. La cellule est représentée en orange et rose au niveau de son péridasme et cytoplasme.

du nombre de cycles réalisés. Afin d'améliorer l'homogénéité du biofilm, le procédé peut être optimisé par agitation ou encore en introduisant des couches de cytochrome c pour favoriser l'interaction entre les différents éléments du biofilm artificiel, bactéries et nanotubes de carbone.

L'absence d'électroactivité du biofilm artificiel réalisé s'est avérée problématique mais a permis de mettre en évidence la cytotoxicité des CNT dans la structure. La cytotoxicité des CNT a ensuite été confirmée puis empêchée à l'aide de cytochrome c mais aussi par l'apport de silice, par voie sol-gel, dans le biofilm. L'hypothèse envisagée quant à l'action d'atténuation du cytochrome c sur la cytotoxicité des CNT est que ces derniers serviraient d'interface entre la cellule et le CNT en empêchant une interaction physique directe. Leur position en ferait un médiateur parfaitement situé pour transférer efficacement les électrons donnés par la bactérie vers les nanotubes de carbone et vers l'électrode collectrice.

X. Perspective

X.I. A court terme

X.I.1. Amélioration des connaissances sur l'effet atténuateur de la cytotoxicité des CNT par le cytochrome c

La vitalité des souches testées n'a été vérifiée que par électrochimie et par le test *bacLight*TM permettant seulement de mesurer une activité métabolique quand elle est mesurable et de déterminer si les membranes des cellules sont perméabilisées ou non. La cytométrie en flux n'ayant pas permis d'obtenir de données quantitatives concluantes, il est nécessaire de procéder à un test de vitalité robuste des cellules pour assoir les résultats de survie cellulaire présentés dans ce rapport.

Par ailleurs, l'effet protecteur (!) du cytochrome c sur les CNT n'est observé qu'après 2 h de contacts entre les bactéries et les CNT. Il est intéressant de tester cet effet sur un temps de contact plus important : par exemple après 24 h ou 48 h de contact et jusqu'à 1 semaine dans la suspension. Une méthode pour observer cette effet serait de réaliser un marquage d'échantillons conservés à -20 °C après un tel temps d'incubation.

Améliorer les connaissances sur le mécanisme d'atténuation de la cytotoxicité des CNT par le cytochrome c permettrait d'obtenir des biofilms artificiels avec des bactéries ayant une viabilité optimale.

X.I.2. Poursuite de l'étude sur l'épaisseur maximale atteignable par un biofilm artificiel formé en assemblage couche-par-couche

L'intérêt de la formation d'un biofilm artificiel par la méthode d'assemblage couche-par-couche est la possibilité théorique de pouvoir augmenter *ad infinite* l'épaisseur du biofilm en fonction du nombre de cycles réalisés. Il serait donc intéressant de pouvoir placer la limite d'épaisseur atteignable

via cette méthode si elle existe. Cette limite d'épaisseur permettrait ensuite de déterminer si cette stratégie est intéressante ou non à long terme.

X.II. A moyen terme

X.II.1. Autoassemblage de biofilm artificiel électro actif

Un point intéressant révélé dans cette étude est l'autoassemblage des bactéries avec les nanotubes de carbone en présence de cytochrome c. L'étude de la configuration par AFM d'une telle structure pourrait permettre d'apprendre comment la bactérie s'organise en fonction du type de nanoparticules.

X.II.2. Test d'autres nanoparticules

L'étude est réalisée ici avec des CNT. Il existe pléthore d'autre nanoparticules et polymères utilisables pour la formation de biofilm artificiel. Il serait particulièrement intéressant d'étudier ce mécanisme d'autoassemblage avec par exemple des nanoparticules ou du graphène. Et évaluer cette possibilité de limiter la cytotoxicité des nanomatériaux semble être une voie d'investigation riche de développement pour favoriser l'émergence de nouveaux dispositifs impliquant des bactéries viables.

X.III. A long terme

X.III.1. Adaptation du biofilm artificiel à des systèmes à visée écologique

Les biofilms artificiels électroactifs formés vont pouvoir être adaptés dans un système à visée écologique. Il pourra s'agir d'un système à visée de dépollution par le choix d'une souche bactérienne particulière ou encore de biosenseurs permettant de mettre en évidence la présence d'un polluant dans des eaux de consommation.

X.III.2. Formation de biofilm artificiel cathodique

Aujourd'hui le développement de biofilm anodique ne pose pas beaucoup de difficultés, mais il existe beaucoup moins d'information sur la croissance de biofilms cathodiques, les souches identifiées étant peu nombreuses et ne se prêtant pas facilement à la croissance de biofilms. La stratégie proposée ici de biofilm artificiel permettrait par un contrôle fin de l'interaction entre les bactéries et les nanomatériaux de développer des biofilms électroactifs stables et effectifs pour l'électrocatalyse, touchant notamment à des questions comme la réduction du CO₂.

Bibliographie

Bibliographie

- Booth, S. C., Workentine, M. L., Wen, J., Shaykhutdinov, R., Vogel, H. J., Ceri, H., Weljie, A. M. (2011)** Differences in metabolism between the biofilm and planktonic response to metal stress. *J. Proteome Res.*, 10(7), 3190–9.
- Brümmer, I. H. M., & Fehr, W. (2000)** Biofilm community structure in polluted rivers : abundance of dominant phylogenetic groups over a complete annual cycle. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66(7), 3078.
- Cervantes, F.J., Dijksma, W., Duong-Dac, T., Ivanova, A., Lettinga, G., Field, J.A. (2001)** Anaerobic mineralization of toluene by enriched sediments with quinones and humus as terminal electron acceptors. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67, 4471-4478
- Cervantes, F.J., Vu-Thi-Thu, L., Lettinga, G., Field, J.A. (2004)** Quinone-respiration improves dechlorination of carbon tetrachloride by anaerobic sludge. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 64, 702-711
- Chaudhuri, S. K., & Lovley, D. R. (2003)** Electricity generation by direct oxidation of glucose in mediatorless microbial fuel cells. *Nat. Biotechnol.*, 21, 1229-1232.
- Chung, H., Son, Y., Yoon, T. K., Kim, S., Kim, W. (2011)** The effect of multi-walled carbon nanotubes on soil microbial activity. *Ecotoxicol. and environ. safety*, 74(4), 569–75.
- Costerton, J. W., Lewandowski, Z., Debeer, D., Caldwell, D., Korber, D. (1994)** Biofilms, the Customized Microniche. *J. Bacteriol.*, 176(8), 2137–2142.
- Cui, T. and Xue, W. (2007)** Assembling three-dimensional carbon nanotube-based cantilever arrays. *October 2007, SPIE Newsroom*
- Karreman, R.J., Dague, E., Gaboriaud, F., Quilès, F., Duval, J.F.L., Lindsey, G.G., (2007)** The stress response protein Hsp12p increases the flexibility of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Biochim. et Biophysica. Acta.*, 1774, 131–137
- Donlan, R. M. (2002)** Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging infectious diseases*, 8(9), 881–90.
- Dumitru, A., Morozan, A., Ghiurea, M., Scott, K. Vulpe, S. (2008)** Biofilm growth from wastewater on MWNTs and carbon aerogels. *Phys. Stat. Sol.*, 205, 6, 1484–7.
- El-Naggar, Y.M., Wanger, G., Leung, K.M., Yuzvinsky, T.D., Southam, G., Yang, J., Lau, W.M., Nealson, K.H., Gorby, Y.A. (2010)** Electrical transport along bacterial nanowires from *Shewanella oneidensis* MR-1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 107, 18127-18131
- Folsom, J. P., Richards, L., Pitts, B., Roe, F., Ehrlich, G. D., Parker, A., Stewart, P. S. (2010)** Physiology of *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms as revealed by transcriptome analysis. *BMC microbiol.*, 10(1), 294.

- Francis, C.A., Casciotti, K.L., Tebo, B.M. (2002)** Localization of Mn (II)-oxydizing activity and the putative multicopper oxidase, Mnx_oG, to the exosporium of the marine *Bacillus* sp strain SG-1. *Arch. Microbiol.*, 178, 450-456
- Furukawa, Y. & Dale, J.R. (2013)** The surface properties of *Shewanella putrefaciens* 200 and *S. oneidensis* MR-1: the effect of pH and terminal electron acceptors. *Geochemical Transactions*, 14:3
- Ghash, W., Etienne, M., Billard, P., Jorand, F. & Walcarius, A. (2013)** Electrochemically assisted bacteria encapsulation in thin hybrid sol-gel films. *J. Mater. Chem. B*, 1, 1052-1059
- Ghach, W., Etienne, M., Urbanova, V., Jorand, F. & Walcarius, A. (2014)** Sol-gel based ‘artificial’ biofilm from *Pseudomonas fluorescens* using bovine heart cytochrome c as electron mediator. *Electrochem. Com.*, 38, 71-74
- Ghosh, M., Chakraborty, A., Bandyopadhyay, M., Mukherjee, A. (2011).** Multi-walled carbon nanotubes (MWCNT): Induction of DNA damage in plant and mammalian cells. *J. Hazardous Mat.*, 197, 327– 336.
- Gottenbos, B., van der Mei, H. C., & Busscher, H. J. (2000)** Initial adhesion and surface growth of *Staphylococcus epidermidis* and *Pseudomonas aeruginosa* on biomedical polymers. *J. biomed. mat. Res.*, 50(2), 208–14.
- Gorby, Y.A., Yanina, S., McLean, J.S., Rosso, K.M., Moyles, D., Dohnalkova, A. (2006)** Electrically conductive bacterial nanowires produced by *Shewanella oneidensis* strain MR-1 and other microorganisms. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103, 11358-11363
- Gralnick, A.J., & Newman, D.K. (2007)** Extracellular respiration. *Molecular Microbiol.*, 65, 1-11
- Gregory, K.B & Lovley, D.R. (2004)** Remediation and recovery of uranium from contaminated subsurface environments with electrodes. *Environ. Sci. Technol.*, 39, 8943-8947
- Haddock, B. a, & Jones, C. W. (1977)** Bacterial respiration. *Bacteriological rev.*, 41(1), 47–99.
- Hall-Stoodley, L., Costerton, J. W., Stoodley, P. (2004)** Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature Rev Microbiol.*, 2(2), 95–108.
- Hernandez, M.E., & Newman, D.K. (2001)** Extracellular electron transfer. *Cell Mol Life Sci*, 58, 1562-1571
- Holmes, D. E., Bond, D. R. Lovley., D.R. (2004)** Electron transfer by *Desulfobulbus propionicus* to Fe(III) and graphite electrodes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70, 1234-1237.
- Iijima, S. (1991)** Helical microtubules of graphitic carbon. *Nature*, 354, 56–8
- Jeong, H. E., Kim, I., Karam, P., Choi, H.-J., & Yang, P. (2013)** Bacterial recognition of silicon nanowire arrays. *Nano letters*, 13(6), 2864–9
- Jiao, Y., D’haeseleer, P., Dill, B. D., Shah, M., Verberkmoes, N. C., Hettich, R. L., Thelen, M. P. (2011)** Identification of biofilm matrix-associated proteins from an acid mine drainage microbial community. *Appl. Environ. Microbiol.*, 77(15), 5230–7.

- Kang, S., Pinault, M., Pfefferle, L. D., Elimelech, M. (2007)** Single-walled carbon nanotubes exhibit strong antimicrobial activity. *Langmuir*, 23(17), 8670–3.
- Kang, S., Herzberg, M., Rodrigues, D. F., Elimelech, M. (2008)** Antibacterial effects of carbon nanotubes: size does matter! *Langmuir*, 24(13), 6409–13
- Kang S, Mauter SM, Elimelech M. (2009)** Microbial cytotoxicity of carbon based nanomaterials: implications for river water and wastewater effluent. *Environ Sci Technol.*, 43(7), 2648–53
- Katsikogianni, M., & Missirlis, Y. F. (2004)** Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials and of techniques used in estimating bacteria-material interactions. *European cells & mat.*, 8, 37–57.
- Kim, J.S., Sung, J.H., Song, K.S., Lee, J.H., Kim, S.M., Lee, G.H., Ahn, K.H., Lee, J.S., Shin, J.H., Park, J.D., Yu, I.J. (2012)** Persistent DNA Damage Measured by Comet Assay of Sprague Dawley Rat Lung Cells after Five Days of Inhalation Exposure and 1 Month Post-Exposure to Dispersed Multi-Wall Carbon Nanotubes (MWCNTs) Generated by New MWCNT Aerosol Generation System. *Toxicological Sciences* 128(2), 439–448.
- Klausen, M., Gjermansen, M., Kreft, J.-U., Tolker-Nielsen, T. (2006)** Dynamics of development and dispersal in sessile microbial communities: examples from *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida* model biofilms. *FEMS Microbiol. Let.*, 261(1), 1–11.
- Korenevsky, A. and Terry J. Beveridge, T.J. (2007)** The surface physicochemistry and adhesiveness of *Shewanella* are affected by their surface polysaccharides. *Microbiology*, 153, 1872–1883.
- Kotloski, N.J., & Gralnick, A.J. (2012)** Flavin electron shuttles dominate extracellular electron transfer by *Shewanella oneidensis*. *MBio*, 2013 Jan 15,4(1)
- Lies, D.P., Hernandez, M.E., Kappler, A., Mielke, R.E., Gralnick, J.A., Newman, D.K. (2005)** *Shewanella oneidensis* MR-1 uses overlapping pathways for iron reduction at a distance and by direct contact under conditions relevant for biofilms. *Appl Environ Microbiol*, 71, 4414–4426
- Logan, B.E., Murano, C., Scott, K., Gray, N.D., Head, I.M. (2005)** Electricity generation from cysteine in a microbial fuel cell. *Water Res.*, 39, 942–952.
- Lovley, D.R., Woodward, J.C., & Chapelle, F.H. (1996)** Rapid anaerobic benzene oxidation with a variety of chelated Fe (III) forms. *Appl Environ Microbiol*, 62, 288–291
- Lovley, D.R., Holmes, D.E., Nevin, K.P. (2004)** Dissimilatory Fe (III) and Mn(IV) reduction. *Adv Microb Physiol*, 49, 219–286
- Manna, S. K., Sarkar, S., Barr, J., Wise, K., Barrera, E. V., Jejelowo, O., Rice-Ficht, A. C., Ramesh, G. T. (2005)** *Nano Lett.*, 5, 1676–1684.
- Metha, T., Coppi, M.V., Childers, S.E., & Lovley, D.R. (2005)** Outer membrane C-type cytochromes required for Fe (II) and Mn (IV) oxide reduction in *Geobacter sulfurreducens*. *Appl Environ Microbiol*, 71, 8634–8641

- Metha, T., Childers, S.E., Glaven, R., Lovley, D.R., Mester, T. (2006)** A putative multicopper protein secreted by an atypical type II secretion system involved in the reduction of insoluble electron acceptors in *Geobacter sulfurreducens*. *Microbiol.*, 152, 2257-2264
- Murga, R., Miller, J. M., & Donlan, R. M. (2001)** Biofilm formation by Gram-negative bacteria on central venous catheter connectors : effect of conditioning films in a laboratory model. *J. Clin. Microbiol.*, 39(6), 2294.
- Myers, C.R., & Myers, J.M. (1992)** Localization of cytochromes to the outer-membrane of anaerobically grown *Shewanella putrefaciens* MR-1. *J Bacteriol*, 174, 3429-3438
- Narayan, R. J.; Berry, C. J. Brigmon, R. L. (2005)** *Mater. Sci. Eng., B*, 123,123-129.
- Nevin, K.P., & Lovley, D.R. (2000)** Lack of production electron shuttling compounds or solubilization of Fe (III) during reduction of insoluble Fe (III) oxide by *Geobacter metallireducens*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, 2248-2251
- Nevin, K.P., & Lovley, D.R. (2002)** Mechanisms for accessing insoluble Fe(III) oxide during dissimilatory Fe(III) reduction by *Geothrix fermentans*. *Appl Environ Microbiol*, 168, 2294-2299
- Nevin, K.P., & Lovley, D.R. (2002) (b)** Mechanisms for Fe (III) oxide reduction in sedimentary environments. *J. Geomicrobiol.*, 19, 141-159
- O'Toole, G. a, & Kolter, R. (1998)** Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Molecular microbiol.*, 30(2), 295–304.
- Pandurangappa, M., & Raghu, G. K. (2011)** Chemically modified carbon nanotubes : derivatization and their applications. *Carbon Nanotubes Applications on Electron Devices*, 499-526
- Patil, S., Harnisch, P., Schröder, U. (2010)** Toxicity response of electroactive microbial biofilms – A decisive feature for potential biosensor and power source applications. *ChemPhysChem* 11, 2834-2837
- Potter, M. C. (1911)** Electrical effects accompanying the decomposition of organic compounds. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Containing Papers of a Biological Character*. 84(571), 260–276.
- Rabaey, K., Boon, N., Siciliano, S.D., Verhaege, M., Verstraete, W. (2004)** Biofuel cells select for microbial consortia that self-mediate electron transfer. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70, 5373-5382.
- Rabaey, K., & Verstraete, W. (2005)** Microbial fuel cells: novel biotechnology for energy generation. *Trends in biotechnol.*, 23(6), 291–8.
- Rapport de l'ANSES (2012)** Toxicité et écotoxicité des nanotubes de carbone. *Note d'actualité -Etat de l'art 2011-2012*
- Reguera, G., McCarthy, K.D., Mehta, T., Nicoll, J.S., Tuominen, M.T., Lovley, D.R. (2005)** Extracellular electron transfer via microbial nanowires. *Nat.*, 435, 1098-1011
- Sanchez, C., Rozes, L., Ribot, F., Laberty-Robert, C., Grosso, D., Sassoie, C., Boissiere, C., Nicole, L. (2010)** “Chimie douce”: A land of opportunities for the designed construction of functional inorganic and hybrid organic-inorganic nanomaterials. *C. R. Chimie*, 13, 3–39

- Sauer, K., Camper, A.K., Eherlich, G.D., Costerton, J.W., Davies, D.G. (2002)** *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *J. Bacteriol.*, 184, 1140-1154
- Shacham, R., Avnir, D. Mandler, D. (1999)** Electrodeposition of methylated sol-gel films on conducting surfaces. *Adv. Mater.*, 11, 1544 - 1564
- Sharma, T., Mohanareddy, A., Chandra, T., Ramaprabhu, S. (2008)** Development of carbon nanotubes and nanofluids based microbial fuel cell. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(22), 6749–6754
- Shukla, A.K., Suresh, P., Berchmans, S., Rajendran, A. (2004)** Biological fuel cells and their applications. *Curr. Science*, 87, 455-468.
- Shvedova, A. A., Kisin, E. R., Mercer, R., Murray, A. R., Johnson, V.J., Potapovich, A. I. et al., (2005)** Unusual inflammatory and fibrogenic pulmonary response to single-walled carbon nanotubes in mice. *Am. J. Physiol.*, 289, 698-708.
- Sibottier, E., Sayen, S., Gaboriaud, F. Walcarius, A. (2006)** Factors affecting the preparation and properties of electrodeposited silica thin films functionalized with amine or thiol groups. *Langmuir*, 22, 8366-8373
- Simon-Deckers, A., Loo, S., Mayne-L’Hermite, M., Herlin-Boime, N., Menguy, N., Reynaud, C., Gouget, B., Carriere, M. (2009)** Size-, composition- and shape- dependent toxicological impact of metal oxide nanoparticles and carbon nanotubes toward bacteria. *Environ. Sci. Technol.*, 43, 8423–8429.
- Tender, L.M., Reimers, C.E., Stecher, H.A., Holmes, D.E., Bond, D.R., Lowy, D.A. (2002)** Harnessing microbi- ally generated power on the seafloor. *Nat. Biotechnol.*, 20, 821–825.
- Timur, S., Anik, U., Odaci, D., & Gorton, L. (2007)** Development of a microbial biosensor based on carbon nanotube (CNT) modified electrodes. *Electrochem. Com.*, 9(7), 1810–1815
- Upadhyayula, V.K.K, Deng, S., Mitchell, M.C., Smith, G.B., Nair, V.S., Ghoshroy, S. (2008)** Adsorption kinetics of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* on single walled carbon nanotube aggregates. *Water Sci Technol.*, 58(1), 179–84.
- Upadhyayula, V.K.K., Deng, S., Mitchell, M.C., Smith, G.B. (2009)a** Application of carbon nanotube technology for removal of contaminants in drinking water: a review. *Sci Total Environ*, 408, 1-13.
- Upadhyayula, V.K.K., Deng, S., Smith, G.B., Mitchell, M.C. (2009)b** Adsorption of *Bacillus subtilis* on single walled carbon nanotube aggregates, activated carbon and nanoceram™. *Water Res*, 43, 148–56.
- Weber, K.A., Achenbach, L.A. Coates, J.D. (2006)** Microorganisms pumping iron: anaerobic microbial iron oxidation and reduction. *Nat Rev Microbiol*, 4, 752-764
- Yan, X.M., Shi, B.Y., Lu, J.J., Feng, C.H., Wang, D.S., Tang, H.X. (2008)** Adsorption and desorption of atrazine on carbon nanotubes. *J. Colloid. Interface. Sci.*, 321, 30–8.

Zhang, M., Su, L., Mao, L. (2006) Surfactant functionalization of carbon nanotubes (CNTs) for layer-by-layer assembling of CNT multi-layer films and fabrication of gold nanoparticle/CNT nanohybrid. *Carbon*, 2, 276–283

Résumé

Un biofilm artificiel électroactif est défini comme une structure mimant un biofilm naturel où une population bactérienne monoclonale immobilisée sous forme de film est capable de transfert extracellulaire d'électrons avec le milieu extérieur. La croissance et la viabilité des bactéries composant ces films doivent être maîtrisées. Dans le but de produire de façon contrôlée un biofilm artificiel électroactif nous avons évalué l'intérêt d'un assemblage couche-par-couche de nanotubes de carbone (CNT) et de bactéries (*Pseudomonas Putida*). Les CNT utilisés sont des nanoparticules conductrices pouvant aider à transférer les électrons entre les bactéries et un collecteur final (ici une électrode de graphite). Le biofilm formé n'a cependant montré aucune activité électrochimique du fait de la cytotoxicité de ces nanotubes. La mise en place d'une stratégie originale nous a permis néanmoins de réduire significativement cette toxicité et d'améliorer l'activité électrochimique. Associées au cytochrome c, les cellules du biofilm présentent une plus faible sensibilité aux CNT. Enfin, cette toxicité a été également réduite en enrobant les cellules d'un gel de silice. Finalement l'assemblage bactérie-cytochrome c–CNT-silice s'est montré efficace et a permis de donner une activité électrochimique significative du biofilm artificiel.

Abstract

Electro active artificial biofilm is a structure mimicking natural biofilm with monoclonal bacterial population immobilized in film which is able to transfer electron to external environment. Bacterium's growth and reliability could be controlled in those films. We have evaluated the interest of layer-by-layer's assembly with bacterium (*Pseudomonas Putida*) and carbon nanotubes (CNT) to get such electroactive artificial biofilm. CNT are conductive nanoparticles which could improve electron transfer between biofilm and final electron acceptor. Primary experiments have shown no electroactivity with the primary assembly. Experience of flocculation confirmed that cytotoxicity of CNT was detrimental to the metabolic activity of bacteria. Adapted strategy allow us to strongly minimize this toxicity using cytochrome c or silica in the deposition protocol. Final assembly involving bacteria, cytochrome c, CNT and silica show significant electroactivity.

Mots-clefs : biofilm artificiel, électroactivité, nanotubes de carbones, assemblage couche-par-couche, cytotoxicité, cytochrome c, gel de silice.