

---

## GENERALITES SUR LES BIOFILMS

---

Il est aujourd'hui largement reconnu que les bactéries, dans leur milieu naturel, s'associent à des surfaces ou des interfaces, sous la forme d'agrégats multicellulaires, appelés biofilms. Les micro-organismes sessiles se trouvent alors englobés dans une matrice de polymères extracellulaires (EPS). Ces EPS, sécrétés par ces mêmes bactéries, renferment principalement des polysaccharides macromoléculaires mais aussi des protéines, des lipides et des acides nucléiques (Jouenne, 2008). Les biofilms offrent aux micro-organismes qui les composent plusieurs avantages. Principalement, ils les protègent des perturbations extérieures et leur assurent une résistance aux antimicrobiens et aux stress environnementaux. C'est cette conformation qui prodigue aux bactéries une certaine ubiquité et une prédominance dans le monde microbien (Jouenne, 2008).

Les communautés microbiennes attachées à des surfaces ont été observées bien avant d'être étudiées en détail. En 1684, Anthony Van Leeuwenhoek remarque une importante accumulation de micro-organismes sur sa propre plaque dentaire. Ce n'est qu'en 1943 que Zobell décrit, dans la première étude publiée sur les biofilms, les caractéristiques fondamentales de colonies attachées à un support (Zobell, 1943). En 1978, Costerton affirme la prédominance du mode de vie bactérien sous forme de biofilms. Plus tard il fut précisé que 99% des bactéries se développaient en biofilms sur des surfaces très variées telles que les métaux, les plastiques, les tissus humains et végétaux, les surfaces minérales telles que les pierres et le béton. Les types de biofilms sont aussi variés que les microbes qui les constituent. Par exemple, les biofilms formés sur des pierres submergées dans un drainage acide minier sont très différents de ceux qui se forment au contact de l'air à la surface des dents.

Lorsqu'elles forment des biofilms, les bactéries présentent des caractéristiques physiologiques différentes de celles présentées sous forme planctonique. Elles sont notamment capables de mettre en place un système de communication chimique, le « quorum sensing » (ou perception du quota), qui leur permet de coordonner leur comportement en fonction de leur nombre (Jouenne, 2008).

#### 1.4.2.1.1. Formation des biofilms

Au sein du biofilm naturel, chaque micro-organisme est soumis aux micro-conditions de son habitat. Les échanges entre bactéries, les migrations de populations et les facteurs externes affectent l'ordre et la structure de l'édifice. Ces derniers exercent une pression de sélection qui façonne l'architecture du biofilm et peut favoriser la formation d'une structure dense et résistante aux attaques externes.

La formation d'un biofilm microbien mature sur une surface solide implique des processus physiques, chimiques et biologiques qui se réalisent en plusieurs étapes (voir Figure I-9).

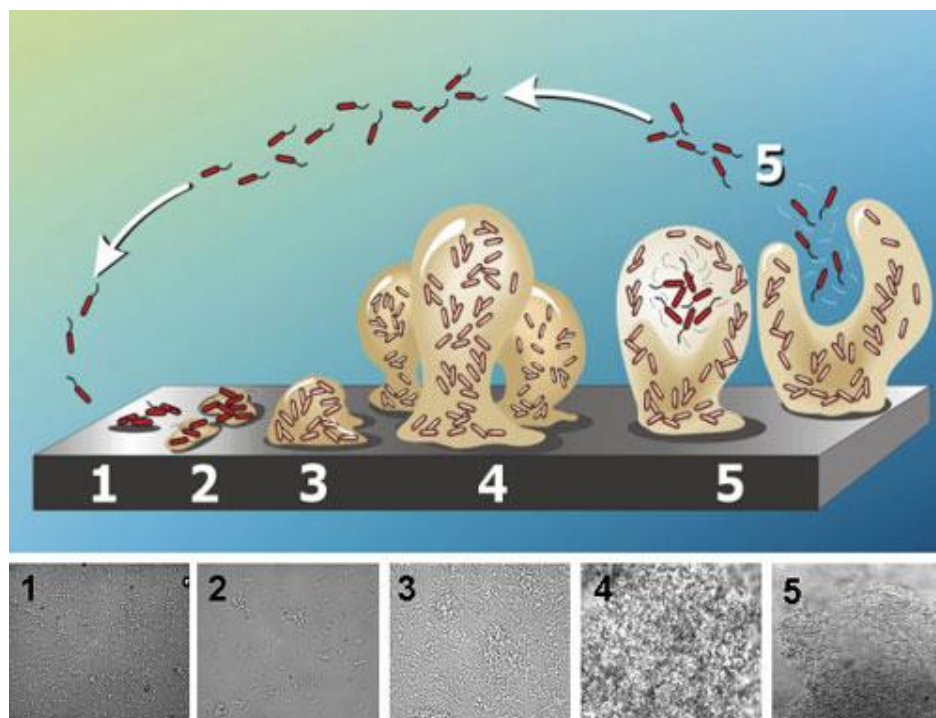


Figure I-9: Schéma des étapes successives de la formation d'un biofilm sur une surface

(d'après Stoodley et al., 2002). Le développement du biofilm se fait en 5 étapes : (1) : Attachement initial des cellules sur la surface, (2) : Adhésion irréversible et production d'EPS, (3) : Formation des micro-colonies, (4) :

*Maturation du biofilm et mise en place de la structure tridimensionnelle du biofilm, (5) : Détachement du biofilm. Les images sur la partie inférieure de la figure présentent des vues au microscope de ces 5 étapes sur un biofilm de Pseudomonas aeruginosa sur une surface en verre.*

#### *I.4.2.1.1.1 Attachement réversible des bactéries*

La formation du biofilm commence par l'adhésion sur la surface de bactéries pionnières disséminées dans le milieu liquide. Dans le milieu naturel, ces micro-organismes proviennent le plus souvent de l'érosion ou de la dissémination de biofilms voisins. L'approche des bactéries vers la surface dépend des propriétés d'écoulement du fluide, des propriétés physico-chimiques de surface (Katsikogianni and Missirlis, 2004), ainsi que de déplacement des bactéries, grâce à différents appendices bactériens tels que les flagelles et cils (O'Toole and Kolter, 1998; Gavin et al., 2003). Ces premières bactéries attachées adhèrent à la surface grâce à une force d'adhésion faible et réversible qui met en jeu des liaisons de Van Der Waals et des forces électrostatiques. A ce stade, les bactéries peuvent se détacher de la surface et revenir à l'état planctonique.

#### *I.4.2.1.1.2 Adhésion irréversible et production d'EPS*

Si ces bactéries restent sur la surface, elles peuvent s'ancrer de manière plus permanente grâce, d'une part, à l'établissement de liaisons hydrophobes entre la bactérie et la surface, et d'autre part, à la sécrétion d'exopolymères. L'adhésion devient alors irréversible.

#### *I.4.2.1.1.3 Formation des micro-colonies*

La multiplication des bactéries irréversiblement adhérees en surface conduit à la formation de colonies qui recouvrent toute ou une partie de la surface du matériau. Certaines espèces, qui ne sont pas capables d'adhérer à la surface, peuvent également s'ancrer dans la matrice ou sur des bactéries déjà attachées.

#### *I.4.2.1.1.4 Maturation du biofilm et mise en place d'une structure tridimensionnelle*

Une croissance exponentielle des bactéries conduit à un épaissement du biofilm jusqu'à la formation d'une structure tridimensionnelle hétérogène (Costerton et al., 1999;

Stoodley et al., 2002). Les canaux qui se forment au sein de cette structure permettent la circulation des nutriments, de l'oxygène et le transport de produits issus du métabolisme des micro-organismes qui composent le biofilm (Stoodley *et al.*, 2002). Lorsque le biofilm est mature, son épaisseur se stabilise et les phénomènes d'arrachement du biofilm viennent compenser sa croissance.

#### I.4.2.1.1.5 *Détachement du biofilm*

Le détachement du biofilm est une étape essentielle du cycle de vie du biofilm. Il permet d'assurer son renouvellement cellulaire. Sa dispersion permet de plus aux microorganismes du biofilm de coloniser d'autres surfaces.

#### I.4.2.1.2. Biofilms négatifs

Depuis plusieurs années, les biofilms présentent un intérêt majeur dans la communauté scientifique. En effet, la prédominance de la forme attachée des micro-organismes dans le milieu naturel, industriel et médical est largement reconnue.

D'un point de vue médical, le développement des vaccins et des antibiotiques a permis de protéger et de guérir les sociétés humaines des graves épidémies pouvant être causées par des pathogènes planctoniques. Cependant, la majeure partie des infections bactériennes chez l'homme met en jeu des biofilms. Ces biofilms peuvent attaquer des surfaces corporelles (dents, yeux, poumons, oreilles, tractus uro-génital) ou peuvent se localiser au niveau de cathéters ou d'implants types prothèses lors d'opération chirurgicales (Costerton et al., 1999). Ces derniers types d'infections sont connus sous le nom d'infections nosocomiales.

Dans l'industrie alimentaire, la biodétérioration des matériaux et la contamination des produits alimentaires causées par le biofouling et la biocorrosion engendrent des surcoûts importants et surtout des problèmes industriels et sanitaires. Dans le secteur agroalimentaire, la mise en place d'un biofilm peut permettre aux bactéries de devenir plus résistantes aux agents extérieurs bactéricides et, par conséquent, de provoquer des contaminations dues à des bactéries pathogènes telles que *Listeria* et *Salmonella* (Maukonen *et al.*, 2003).

Dans d'autres secteurs industriels, les biofilms posent des problèmes sanitaires et fonctionnels importants. Le développement de biofilms dans des canalisations sur de longues périodes engendre un encrassement des surfaces notamment de canalisations d'eau potable, de transport de pétrole ou de gaz et de circuits de refroidissement mais aussi des surfaces de coques de bateau (Flemming, 2002).

#### I.4.2.1.3. Biofilms positifs

Malgré les effets néfastes des biofilms, comme précédemment décrits dans les milieux hospitalier et industriel, leur action peut être bénéfique à l'homme.

En effet, dans les systèmes d'épuration des eaux usées, les biofilms ont été utilisés historiquement avec succès. Notamment dans les systèmes de filtres à sable et à support fixe en général, les bactéries en surface du biofilm dégradent la matière organique des eaux usées avec des performances très supérieures aux procédés à cultures planctoniques, les procédés en biofilm permettant de conserver les microorganismes actifs et d'augmenter ainsi leur concentration (Jouenne, 2008).

Les biofilms peuvent également être utilisés de façon ciblée dans des sols contaminés par des composés toxiques (hydrocarbures, solvants chlorés ...). La population endogène qui constitue le biofilm s'adapte alors au milieu pour consommer ces contaminants comme substrat. Cette capacité d'adaptation et/ou de sélection des micro-organismes vis à vis de polluants organiques pour les transformer en sous-produits inoffensifs est appelée bioremédiation (Jouenne, 2008).

Les biofilms sont également utilisés dans l'industrie agroalimentaire, notamment pour la confection du vinaigre ou de fromages à pâte molle et à croûte lavée de type Reblochon, Munster ... Dans le cas des fromages, les biofilms participent à l'élaboration de la texture et de l'arôme du fromage, mais aussi à sa bioprotection face aux agents pathogènes comme *Listeria monocytogenes* non seulement par un phénomène de compétition pour le substrat mais par la production de molécules inhibitrices, comme suggéré par Mariani *et al.* (2011).

Dans le secteur minier, la biolixiviation est un procédé de plus en plus étendu qui permet d'augmenter les rendements d'extraction des métaux. En effet, la lixiviation permet de récupérer des métaux de forme solide sous leur forme liquide afin de les extraire plus

facilement. Cela permet d'augmenter les rendements d'extraction des métaux contenus dans les déchets miniers et également de rendre extractibles les métaux de ressources minérales. Pour cela, le solide est incorporé à une préparation liquide qui facilite son extraction. Dans le cas de la biolixiviation, c'est une solution bactérienne qui est utilisée où les bactéries puisent leur source d'énergie dans l'oxydation d'éléments chimiques minéraux (Asghari *et al.*, 2013).

Depuis les années 2000, la découverte de microorganismes capables de transférer directement des électrons à une anode au sein d'une pile à combustible microbienne a déclenché un regain d'intérêt pour cette technologie. D'abord utilisés pour produire de l'électricité, ces biofilms sont désormais impliqués dans la production de biocarburants et de molécules d'intérêt (Arends and Verstraete, 2012) (Figure I-10).

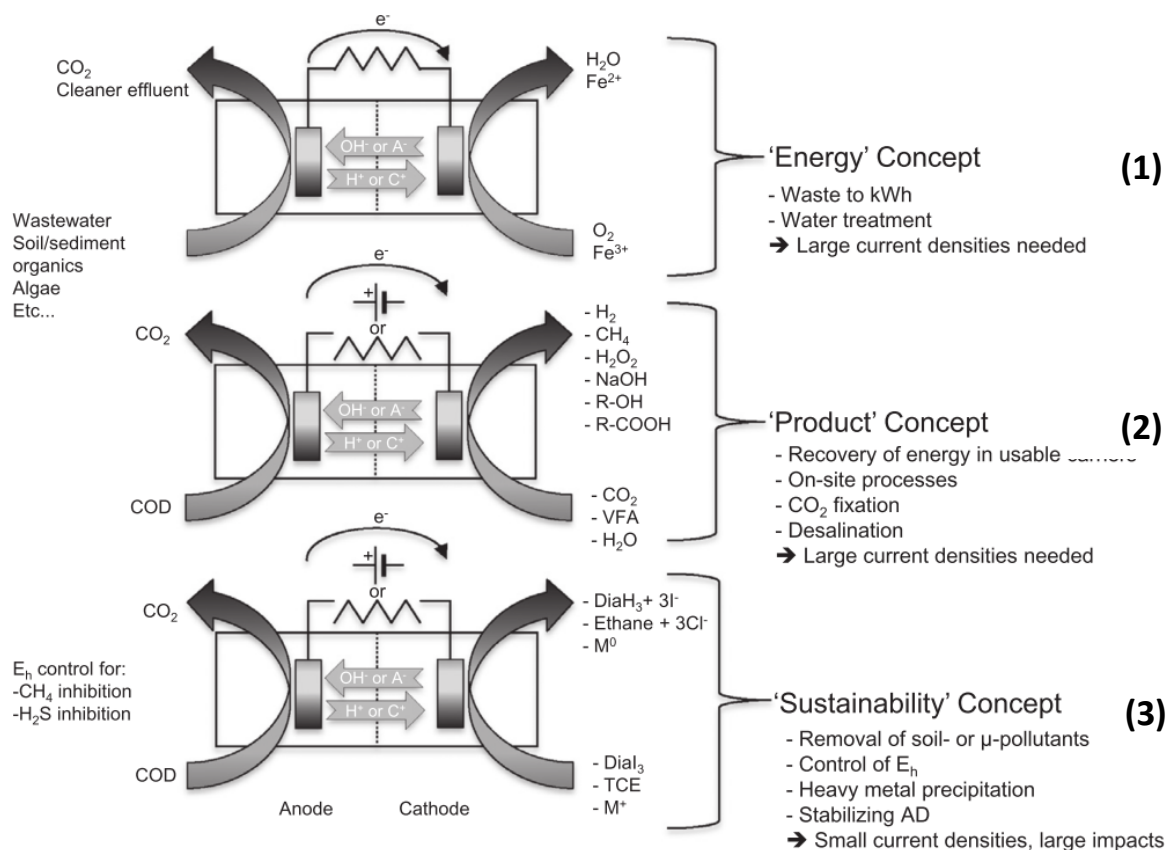


Figure I-10 : Trois concepts d'utilisation de biofilms électroactifs en système bioélectrochimique (BES)

pour (1) la production d'énergie électrique, (2) la production de molécules d'intérêt et de vecteur énergétique, (3) le traitement de pollutions (Arends and Verstraete (2012))

#### **I.4.2.2. BIOFILMS ELECTROACTIFS**

---

##### **I.4.2.2.1. Historique**

Même si la transformation de la matière organique en électricité a toujours présenté un intérêt majeur pour les scientifiques, ce n'est qu'aujourd'hui que des applications pour de petits appareils et sur des installations pilotes de plusieurs kilowatts sont envisagées. C'est Luigi Galvani, en 1790, qui le premier, a constaté que les pattes d'une grenouille se contractaient alors qu'un bref courant les traversait. Le terme de « bioélectricité » est alors apparu. En 1910, Michael Cresse Potter, professeur de botanique à l'université de Durham en Grande Bretagne, découvre que des microorganismes ont la capacité de générer du courant. En 1931, Cohen reprend l'idée de Potter et obtient en connectant en série des biopiles à combustible des tensions générées allant jusqu'à 35V (Cohen, 1931). C'est dans les années 60 que la NASA manifeste un intérêt pour la conversion des déchets organiques en électricité pour ses vols spatiaux. Cependant, face au succès grandissant d'autres techniques alternatives telles que le photovoltaïque pour les applications dans l'espace, le développement des piles à combustible microbiennes a été délaissé par la NASA. Ce n'est que plus tard, pendant la crise du pétrole des années 70 et 80 que l'intérêt pour les piles à combustible microbiennes s'est ravivé. Bennetto *et al.* (1981) ont apporté une contribution remarquable à l'amélioration des piles à combustible microbiennes en montrant l'intérêt de l'ajout de médiateurs (tel que la flavine, la thionine, la résorufine, le méthyl viologène, les acides humiques, le rouge neutre) pour le transfert des électrons au système par les microorganismes. Toutefois, le courant et donc les puissances générés par les piles à combustible microbiennes (PACMs) restaient insuffisants et le coût des médiateurs trop conséquent pour un développement commercial à grande échelle.

Ce n'est que récemment qu'un réel intérêt est né pour les piles à combustible microbiennes et les systèmes bioélectrochimiques en général avec la découverte d'un transfert direct d'électrons d'une bactérie électroactive à l'électrode (Bond and Lovley, 2003; Chaudhuri and Lovley, 2003). Grâce à ce mode de transfert, les systèmes bioélectrochimiques moins coûteux, moins polluants et plus durables pouvaient désormais être développés. Le transfert direct, sans ajout de médiateurs, a également permis d'améliorer la conversion de matière organique en électrons (rendement faradique). La

densité de courant, c'est-à-dire le courant transféré à l'électrode par unité de surface de l'électrode, sert à évaluer l'électroactivité du biofilm. Les densités de courant générées par les biofilms au début de l'étude du transfert direct étaient de l'ordre de l'Ampère par mètre carré au début des années 2000. Puis elles ont connu une croissance exponentielle dans les années suivantes pour atteindre un maximum de 30.8 A/m<sup>2</sup> en 2011 (He et al., 2011) (Figure I-11) et jusqu'à 390 A/m<sup>2</sup> en 2012 (Chen et al., 2012) en utilisant une structure d'électrode bien particulière en couches superposées et ondulées.

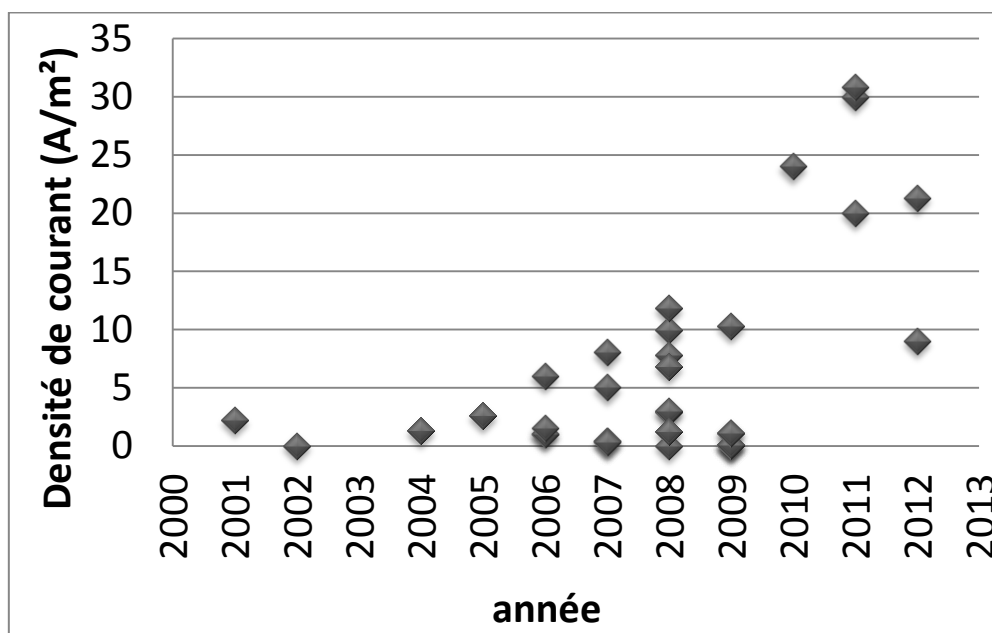


Figure I-11 : Croissance exponentielle des densités de courant produites par des biofilms anodiques dans la littérature depuis 2000.

#### 1.4.2.2.2. Des bactéries qui génèrent de l'électricité

Initialement, les espèces vivantes anaérobies ont évolué en développant diverses méthodes pour réduire des composés supportant leur métabolisme sans utiliser l'oxygène comme accepteur d'électrons. La compréhension des interactions microbe-électrode peut être éclairée par la capacité des microorganismes à évoluer en développant cette propriété de réduction. Les bactéries présentes dans les biofilms électroactifs présentent une faculté à transférer leurs électrons à un accepteur externe insoluble autre que leur accepteur d'électron dans leur environnement naturel. Ces bactéries sont appelées « bactéries électroactives » ou « exoelectrogènes » en anglais : « exo » pour le caractère extracellulaire du transfert et « electrogènes » pour la capacité des bactéries à transférer leur électron à un



composé chimique ou un matériau qui n'est pas l'accepteur d'électron naturel. Les bactéries électroactives se distinguent des bactéries anaérobies en général par leur capacité à transférer directement leurs électrons en dehors de la cellule, permettant leur emploi dans les systèmes bioélectrochimiques.

L'analyse des communautés des piles à combustible microbiennes montre qu'il existe une grande diversité d'espèces, comprenant des organismes à Gram positifs comme à Gram négatifs (Rabaey & Rozendal 2010). Les micro-organismes électroactifs isolés à partir de cultures mixtes dans des PACMs appartiennent à divers groupes microbiens tels que dans quatre des cinq groupes de protéobactéries ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ) (Chaudhuri and Lovley, 2003; Holmes, Bond, O'Neil, et al., 2004; Zuo et al., 2008), au sein des firmicutes (Park et al., 2001), acidobactéries (Bond et al., 2002) et actinobactéries (Bond and Lovley, 2005)(Freguia et al., 2009). De nombreuses recherches se sont en particulier intéressées à deux genres de bactéries: *Shewanella* et *Geobacter*.

Les espèces du genre *Shewanella* sont des bactéries à Gram négatif, anaérobies facultatives, que l'on retrouve largement dans les milieux aquatiques et les sédiments. Les espèces de *Shewanella* sont capables d'oxyder une large gamme de sources de carbone telles que le lactate et le glucose (Fredrickson et al., 2008).

*Shewanella* est l'espèce électroactive qui, à ce jour, présente la plus grande diversité en terme de stratégies de respiration sur électrode par transfert direct via des cytochromes-c de la membrane externe ou via des pili-conducteur, mais aussi par transfert indirect via des médiateurs endogènes qu'elle sécrète (tel que la flavine). Ne formant pas de biofilms épais et produisant des densités de courant plus faibles que les autres modèles de bactéries électroactives, *Shewanella* est un modèle pour l'étude des mécanismes de transfert d'électrons. Les faibles densité de courant obtenues avec cette espèce en comparaison aux autres espèces étudiées rendent peu probable une application industrielle avec *Shewanella* (Lovley, 2011).

Les espèces du genre *Geobacter* sont des bactéries à Gram négatif, anaérobies strictes, que l'on retrouve également dans les milieux aquatiques et les sédiments. *Geobacter* peut non seulement utiliser l'acétate, mais aussi l'hydrogène, le lactate et le formate comme sources d'électrons pour la production de courant. Les espèces du genre *Geobacter* ou proches apparentés sont généralement retrouvées dans les biofilms électroactifs de

systèmes bioélectrochimiques. Contrairement à *Shewanella*, *Geobacter* n'utilise qu'un mode de transfert d'électrons vers l'électrode : le transfert direct via des cytochromes de type c ou des pili conducteurs.

L'étude des communautés microbiennes de biofilms électroactifs rapporte cependant une grande diversité d'espèces dans la littérature. De plus, l'explication des mécanismes de transfert extracellulaires d'électrons est en recherche naissante.

#### 1.4.2.2.3. Biofilms électroactifs en cultures mixtes

L'analyse microbiologique des biofilms électroactifs en cultures mixtes rapporte qu'il existe une grande variété de micro-organismes jouant un rôle dans le transfert d'électrons à l'anode (Tableau I-2). Les  $\delta$ -protéobactéries prédominent dans les biofilms électroactifs obtenus à partir de sédiments, et on retrouve plus généralement les  $\alpha$ - $\beta$ - $\gamma$ - et  $\delta$ -protéobactéries dans les biofilms électroactifs, toutes technologies confondues (Logan and Regan, 2006). A titre d'exemple, dans la première pile à combustible microbienne inoculée à partir de ce type de sédiments en laboratoire, Bond *et al.* (2002) ont obtenu  $71,3 \pm 9,6\%$  de  $\delta$ -protéobactéries dont 70% d'une même séquence (ARN 16S) de la famille des *Geobacteraceae*. Le micro-organisme le plus proche phylogénétiquement de cette séquence s'est révélé être *Desulfuromonas acetoxidans*. Il n'y a donc pas un unique micro-organisme émergeant dans l'ensemble des biofilms anodiques étudiés, bien qu'il soit possible d'y retrouver des espèces majoritaires (Harnisch *et al.*, 2011). Ceci peut être dû, d'une part au fait que de nombreuses bactéries présentent des propriétés électroactives, et d'autre part au large champ de conditions expérimentales, d'architectures de systèmes, de type de donneurs et accepteurs d'électrons utilisés. D'autre part, une partie de la communauté microbienne peut présenter un métabolisme alternatif et concurrent comme la digestion anaérobie, qui utilise un accepteur d'électron autre que l'anode. Néanmoins, il est reconnu que les bactéries électroactives anodiques sont majoritairement des bactéries ferri-réductrices, comme les espèces des genres *Shewanella* et *Geobacter* (Logan and Regan, 2006).

Ensuite, deux microorganismes psychrotolérants ont été isolés sur une anode microbienne inoculée avec des sédiments marins et alimentée avec de l'acétate par Holmes, *et al.* (2004). Ces bactéries de la famille des *Geobacteraceae* peuvent se multiplier entre 4 et

30°C avec un optimum de température à 22°C. Elles ont été dénommées *Geopsychrobacter electrodiphilus* A1 et *Geopsychrobacter electrodiphilus* A2 (Holmes et al., 2004).

Par ailleurs, dans les biofilms issus sédiments riches en sulfures ( $S^{2-}$ ), les micro-organismes de la famille *Desulfobulbaceae* prédominent (Holmes et al., 2004). Les sulfures présents dans le milieu peuvent alors s'oxyder de manière abiotique à la surface de l'électrode en soufre élémentaire  $S^0$ . Des études sur *Desulfobulbus propionicus* en culture pure ont montré que ces bactéries oxydent le soufre élémentaire  $S^0$  en sulfate en utilisant l'anode comme accepteur d'électron (voir Figure I-12) (Holmes, et al. 2004; Lovley, 2006a).

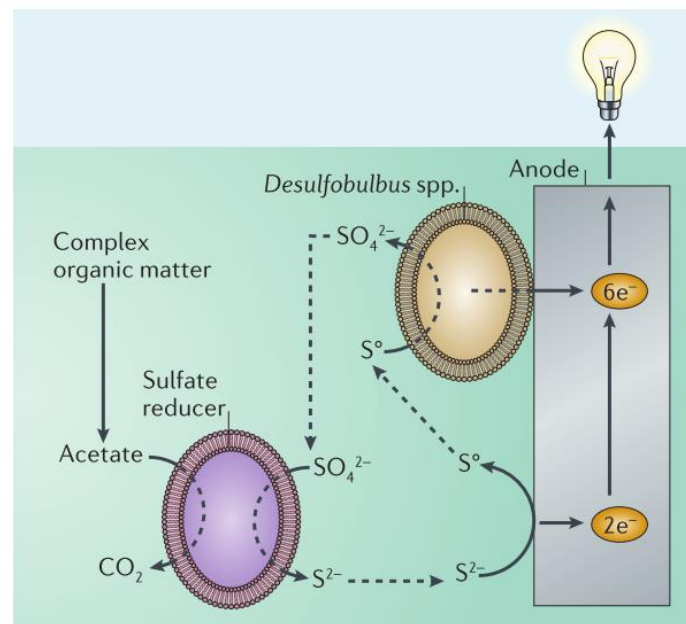


Figure I-12: Mécanisme le plus probable selon lequel les sulfures réagissent avec l'électrode pour former le soufre élémentaire  $S_0$  et les micro-organismes oxydent le  $S_0$  en sulfate en utilisant l'électrode comme accepteur d'électron. (Lovley, 2006b)

De manière générale, l'analyse des gènes de l'ARNr16S des communautés microbiennes qui colonisent la surface des anodes révèle un enrichissement sur l'anode de micro-organismes appartenant à la famille des *Geobacteraceae* (Tableau I-2). Plus particulièrement, ces bactéries prédominent dans les biofilms anodiques obtenus à partir de sédiment marins ou d'eau douce (Holmes et al., 2004). Les *Geobacteraceae* constituent plus de la moitié de la population totale du biofilm électroactif alors qu'elles représentent moins de 5 % des micro-organismes de la communauté de l'inoculum. Dans cette famille des *Geobacteraceae*, le genre *Desulfuromonas*, adapté à des salinité marines, prédomine dans

les environnements marins alors que le genre *Geobacter* domine dans les biofilms de sédiments d'eau douce (Lovley, 2006b).

#### I.4.2.2.4. Biofilms électroactifs en cultures pures

Les bactéries électroactives sont rarement étudiées à partir d'isolats issus de biofilms électroactifs mais plus souvent à partir de l'espèce issue de collection qui leur est génétiquement la plus proche. En culture pure, les micro-organismes peuvent être étudiés en réacteur (MFC ou MEC) mais plus souvent par chronoampérométrie avec une anode à potentiel imposé pour travailler en conditions contrôlées. Les bactéries étudiées en culture pure sont ainsi inoculées dans ces réacteurs dans un milieu ne contenant pas d'accepteur final d'électrons dissous afin de favoriser leur attachement sur l'électrode. De plus, l'acétate est très fréquemment utilisé comme substrat en culture pure (Tableau I-3).

Les performances obtenues en cultures pures sont, de manière générale, moins bonnes que celles obtenues en cultures mixtes. Ceci suggère que l'efficacité du biofilm électroactif n'est pas seulement due à la capacité des bactéries électroactives à transférer des électrons à l'électrode, mais aussi aux interactions inter-espèces existantes au sein du biofilm. Notamment, il peut exister des interactions syntrophiques où certaines bactéries peuvent produire des molécules qui constituent des transporteurs d'électrons pour assurer chez les bactéries électroactives un transfert d'électrons indirect (Kiely, Regan, et al., 2011).

Tableau I-2 : Synthèse bibliographique des études en cultures mixtes de biofilms électroactifs.

Espèce(s) majoritaire(s)	Référence	type de système	Substrat	Densité de courant (A/m <sup>2</sup> )	pH	T(°C)
<i>Geobacter sulfurreducens</i>	(Jung and Regan, 2007)	MFC	acétate	0,349	7	30
<i>Geobacter sulfurreducens</i>	(Jung and Regan, 2007)	MFC	lactate	0,364	7	30
<i>Geobacter sulfurreducens</i>	(Jung and Regan, 2007)	MFC	glucose	0,292	7	30
<i>Geobacter sulfurreducens, Thauera aromatica</i>	(Chae et al., 2009)	MFC	acétate	0,025	7	28
<i>Pelobacter propionicus</i>	(Kiely et al., 2011)	MFC	acétate			
<i>Geobacter sulfurreducens</i>	(Chae et al., 2008)	MEC	acétate	2,91	7	26-28°C
<i>Geobacter sulfurreducens, Pelobacter propionicus</i>	(Kiely et al., 2011)	MEC	acétate			
<i>Geobacter sulfurreducens, Pelobacter propionicus</i>	(Kiely et al., 2011)	MFC	Ethanol			
<i>Azoarcus sp., Desulfuromonas sp.</i>	(Kim et al., 2007)	MFC	Ethanol			
<i>Pelobacter propionicus, Desulfuromonas sp.</i>	(Kiely et al., 2011)	MFC	Lactate			
<i>Bacillus sp.</i>	(Chae et al., 2009)	MFC	Propionate	0,024	7	28
<i>Dechloromonas sp., Geobacter sp.</i>	(Chae et al., 2009)	MFC	Butyrate	0,023	7	28
<i>Paracoccus sp., Geobacter sp.</i>	(Kiely et al., 2011)	MFC	Formate			
<i>Geobacter sp.</i>	(Ha et al., 2008)	MFC	Formate			
<i>Geobacter sulfurreducens, Pelobacter propionicus</i>	(Kiely et al., 2011)	MFC	Succinate			
<i>Geobacter sulfurreducens</i>	(Chae et al., 2009)	MFC	Glucose	0,039	7	28
<i>Clostridium sp.</i>	(Ishii et al., 2008)	MFC	Cellulose			
<i>Geoalkalibacter sp.</i>	(Miceli et al., 2012)	demi cellule	acétate	8,92		
<i>Geoalkalibacter sp.</i>	(Miceli et al., 2012)	demi cellule	acétate	4,23		

Espèce(s) majoritaire(s)	Référence	type de système	Substrat	Densité de courant (A/m <sup>2</sup> )	pH	T(°C)
<i>Geobacter sulfurreducens</i>	(Milliken and May, 2007)	demi cellule		8		
<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	(Xing et al., 2008)	demi cellule		9,9		
<i>Acidiphilium</i> sp.	(Malki et al., 2006)	demi cellule		3		
<i>Escherichia coli</i>	(Zhang et al., 2006)	demi cellule		1		
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	(Zhang et al., 2008)	MEC		1,2		
<i>Clostridium butyricum</i>	(Park et al., 2001)	MFC	amidon	2,2	7	37
<i>Desulfuromonas acetoxidans</i>	(Bond et al., 2002)	MFC	-	0,005	-	-
-	(Min and Logan, 2004)	sédiments				
-	(Liu et al., 2005)	MFC		1,3		
-	(Liu et al., 2005)	MFC	acétate	2,6	7	20
-	(Aelterman et al., 2006)	MFC	effluents de pommes de terre	6	7	22
-	(Zuo et al., 2006)	MFC	hydrolysats de canne de maïs	1,5	7	-
-	(Catal et al., 2008)	MFC	acide gluconique	11,8	-	30
-	(Catal et al., 2008)	MFC	xylose	7,8	-	30
-	(Catal et al., 2008)	MFC	glucose	6,8	-	30
<i>Geobacter sulfurreducens</i>	(Torres et al., 2009)	MEC	acétate	10,3	7,5	31
-	(Zhao et al., 2010)	MFC	lactate	24	6,8	30
-	(Chen et al., 2011)	MFC	acétate	30	6,8	35
-	(Chen et al., 2011)	MFC	acétate	20	6,8	25
-	(He et al., 2011)	MFC	acétate	30,8	7	35

Tableau I-3 : Synthèse bibliographique des études en culture pure de bactéries identifiées dans des biofilms électroactifs.

Espèce	Référence	type de système	Substrat	Densité de courant (A/m <sup>2</sup> )	pH	T (°C)
<i>Geopsychrobacter electrodiphilus</i> A2	(Holmes et al., 2004a)	demi cellule	fumarate	1,21		22
<i>Geopsychrobacter electrodiphilus</i> A1	(Holmes et al., 2004a)	demi cellule	fumarate	0,089		22
<i>Geopsychrobacter electrodiphilus</i> A1	(Holmes et al., 2004a)	demi-cellule	acétate	0,037		22
<i>Clostridium beijerinckii</i>	(Niessen et al., 2004)	demi-cellule	glucose	13,00		36
<i>Clostridium butyricum</i>	(Niessen et al., 2004)	demi-cellule	amidon	13,00		36
<i>Escherichia coli</i> K12	(Schröder et al., 2003)	demi-cellule	glucose	11,20	nc	37
<i>Geobacter sulfurreducens</i> PCA	(Dumas et al., 2008a)	demi-cellule	acétate	8,40	6,8	30
<i>Geoalkalibacter ferrihydriticus</i>	(Badalamenti et al., 2013)	demi-cellule	acétate	8,30	9,3	40
<i>Geobacter sulfurreducens</i> PCA	(Dumas et al., 2008a)	demi-cellule	acétate	8,00	6,8	30
<i>Thermincola ferriacetica</i>	(Parameswaran et al., 2013)	demi-cellule		8,00		60
<i>Geopsychrobacter electrodiphilus</i> A2	(Holmes et al., 2004a)	demi-cellule	malate	6,60		
<i>Geobacter sulfurreducens</i> PCA	(Marsili et al., 2008)	demi-cellule	acétate	5,00	6,8	30
<i>Geoalkalibacter subterraneus</i> Red1	(Badalamenti et al., 2013)	demi-cellule	acétate	3,30	7	40
<i>Geoalkalibacter ferrihydriticus</i> DSM 17813	(Badalamenti et al., 2013)	demi-cellule	acétate	3,30	9.3	40
<i>Geobacter sulfurreducens</i>	(Reguera et al., 2006)	demi-cellule	acétate	1,96		
<i>Geopsychrobacter electrodiphilus</i>	(Holmes et al., 2004a)	demi-cellule	fumarate de sodium	1,21		
<i>Klebsiella pneumoniae</i> L17	(Zhang et al., 2008)	MFC	glucose	1,20	7	30
<i>Geobacter sulfurreducens</i>	(Bond and Lovley, 2003)	demi-cellule	acétate	1,14		
<i>Rhodospseudomonas palustris</i> DX-1	(Xing et al., 2008)	MFC	acétate	0,81	7	23
<i>Haloferax volcani</i> DS70	(Abrevaya et al., 2011)	MFC	glucose	0,50	7	37
<i>Enterobacter cloacae</i> ATCC 13047	(Rezaei et al., 2009)	MFC	glycérol	0,49		
<i>Desulfitobacterium hafniense</i> DCB2	(Milliken and May, 2007)	MFC	fumarate de sodium	0,46	nc	nc

Espèce	Référence	type de système	Substrat	Densité de courant (A/m <sup>2</sup> )	pH	T (°C)
<b><i>Thermincola ferriacetica</i> Z-0001</b>	(Marshall and May, 2009)	MFC	acétate	0,40	7	60
<b><i>Geobacter bremensis</i></b>	(Nercessian et al., 2012)	demi-cellule		0,30		
<b><i>Geobacter metalireducens</i></b>	(Bond et al., 2002)	demi-cellule	benzoate	0,27		
<b><i>Pseudomonas aeruginosa</i> MTCC 17702</b>	(Raghavulu et al., 2011)	MFC	milieu de culture LB	0,26	6	37
<b><i>Natrialba magadii</i> ATCC 43099</b>	(Abrevaya et al., 2011)	MFC		0,22		
<b><i>Comamonas denitrificans</i> DX-4</b>	(Xing et al., 2010)	MFC		0,20		
<b><i>Desulfuromonas acetoxidans</i></b>	(Bond et al., 2002)	demi-cellule	acétate	0,17	nc	nc
<b><i>Saccharomyces cerevisiae</i></b>	(Raghavulu et al., 2011)	MFC	glucose	0,16	6	28
<b><i>Escherichia coli</i></b>	(Raghavulu et al., 2011)	MFC	milieu de culture LB	0,15	6	37
<b><i>Escherichia coli</i> MTCC 10436</b>	(Raghavulu et al., 2011)	MFC	milieu de culture LB	0,15	7	37
<b><i>Shewanella putrefaciens</i> NCTC 10695</b>	(Carmona-Martínez et al., 2012)	demi-cellule	lactate de sodium	0,12	7	nc
<b><i>Shewanella oneidensis</i> MR1</b>	(Carmona-Martínez et al., 2011)	demi-cellule	lactate de sodium	0,08	7	nc
<b><i>Klebsiella</i> sp. ME17</b>	(Xia et al., 2010)	MFC		0,06		
<b><i>Geothrix fermentans</i> ATCC 700665</b>	(Bond and Lovley, 2005)	demi-cellule	propionate	0,05	nc	nc
<b><i>Geothrix fermentans</i></b>	(Bond and Lovley, 2005)	demi-cellule	lactate	0,04	nc	nc
<b><i>Geothrix fermentans</i></b>	(Bond and Lovley, 2005)	demi-cellule	succinate	0,02	nc	nc
<b><i>Geothrix fermentans</i></b>	(Bond and Lovley, 2005)	demi-cellule	malate	0,02	nc	nc
<b><i>Geothrix fermentans</i></b>	(Bond and Lovley, 2005)	demi-cellule	acétate	0,01	nc	nc



### **I.4.2.3. MECANISMES DE TRANSFERT D'ÉLECTRONS**

---

Les bactéries électroactives catalysent le transfert d'électrons entre le donneur d'électron et l'électrode. Dans la littérature, ces biocatalyseurs sont également appelés « anodophiles », « exoelectrogens », « electrogenic », « anode respiring bacteria » et « electrochemically active bacteria ». Il est aujourd'hui reconnu que le potentiel appliqué à l'anode n'est pas le seul paramètre qui détermine l'efficacité du transfert d'électrons. D'autres facteurs entrent en jeu dans ce processus tels que la nature du substrat ou le pH.

Ces organismes libèrent les électrons du substrat organique en l'oxydant en intermédiaires métaboliques puis en CO<sub>2</sub>. Les électrons libérés sont capturés par des co-enzymes tels que le nicotinamide adénine dinucléotide (NAD<sup>+</sup>), le nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADP), la flavine adénine dinucléotide (FAD) et la ferrédoxine (Fd-Fe<sup>3+</sup>), qui sont respectivement réduits en NADH, NADPH, FADH<sub>2</sub>, Fd-Fe<sup>2+</sup>. Ces électrons sont transmis de porteur en porteur jusqu'à l'accepteur final d'électrons. En l'absence d'oxygène, c'est à l'anode que les micro-organismes cèdent leurs électrons.

Comme indiqué précédemment, les bactéries électroactives transfèrent leurs électrons soit au travers d'une structure immobile (transfert direct) soit grâce à des composés mobiles (transfert indirect via des médiateurs) (Figure I-13).

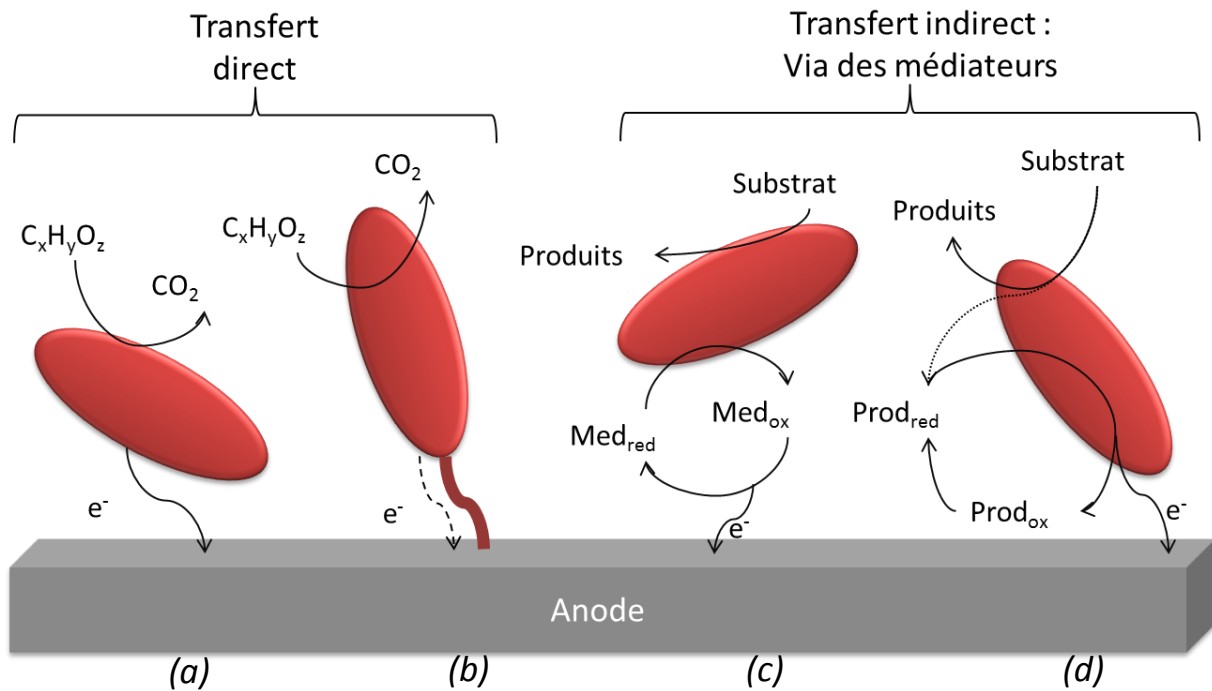


Figure I-13 : Mécanismes de transfert d'électrons aux électrodes.

(a) transfert direct par les micro-organismes en contact avec la surface de l'électrode au travers de protéines rédox, telles que les cytochromes de type c associés à la membrane externe de la cellule ou la matrice extracellulaire. (b) Transfert direct d'électrons de la cellule à l'électrode via des pili conducteurs. (c) Transfert indirect via la réduction d'oxydes solubles du milieu. Ces composés sont réduits au niveau de la membrane externe des cellules, puis ré-oxydé en surface de l'électrode à laquelle les électrons issus de l'oxydation sont transférés. (d) Cas du transfert via des médiateurs produit par la molécule. (d'après Lovley (2012))

#### 1.4.2.3.1. Transfert indirect par l'intermédiaire de médiateurs

Les médiateurs correspondent à des sortes de navettes chimiques pour les électrons entre la membrane cellulaire et l'anode. Ils peuvent s'oxyder et se réduire successivement, traverser la membrane cellulaire sous leur forme oxydée, accepter des électrons d'un ou de plusieurs porteurs à l'intérieur de la cellule, puis sortir de cette dernière sous forme réduite pour transférer des électrons à l'anode en se ré-oxydant (Shukla et al., 2004). Le potentiel de réduction du médiateur doit donc être supérieur à celui du porteur intracellulaire.

Des médiateurs artificiels peuvent être utilisés pour des micro-organismes qui sont incapables de produire eux même leur propre médiateur comme *Escherichia coli* et certaines espèces des genres *Pseudomonas*, *Proteus* ou encore *Bacillus*. Ces médiateurs peuvent être la thionine, la résorufine, le méthyl viologène, les acides humiques, le rouge neutre, le 2,6-dichlorophénol indophénol, et la 2-hydroxy-1,4-naphthoquinone (DR Lovley 2006).

Dans certain cas, les micro-organismes produisent eux-mêmes leurs propres médiateurs pour le transfert cellulaire des électrons. C'est le cas d'*Enterococcus gallinarum* et de *Pseudomonas aeruginosa* qui produisent respectivement de l'entérocyanine 012 et de la pyocyanine (Rabaey *et al.* 2004).

Cependant, le recours à la production de médiateurs associée à leur renouvellement représente un coût énergétique non négligeable pour la cellule.

#### 1.4.2.3.2. Transfert direct

Certains microorganismes doivent établir un contact direct avec les anodes pour réaliser le transfert d'électron. Pour pouvoir réaliser le transfert direct des électrons, les bactéries doivent être capables de passer d'un accepteur ou d'un donneur d'électron soluble (oxygène, fumarate ...) à un accepteur ou donneur insoluble (DR Bond *et al.* 2002). Il a été largement démontré que, pour les espèces de *Geobacter*, le transfert d'électrons aux oxydes de fer Fe(III) requiert la présence de plusieurs cytochromes-c et protéines de la membrane externe. Bond and Lovley (2003) ont rapporté des productions d'électricité par *Geobacter sulfurreducens* attachés à une électrode, avec un taux de conversion supérieurs à d'autres espèces malgré une densité de cellules plus élevée et/ou la mise en jeu de médiateurs avec ces derniers (Bond and Lovley, 2003).

L'expression de ce mode de transfert d'électrons attribuerait un caractère électroactif aux organismes suivants : *Geobacter sulfurreducens* (Bond and Lovley, 2003), *Geobacter metallireducens*, *Rhodospirillum rubrum* (Chaudhuri and Lovley, 2003), *Desulfuromonas acetoxidans* (Bond *et al.*, 2002), *Desulfobulbus propionicus* (Holmes, Bond, and Lovley, 2004), *Enterococcus gallinarum* (Kim, Hyun, *et al.*, 2005), *Thermincola ferriacetica* (Parameswaran *et al.*, 2013). Cependant, le transfert direct d'électrons de la bactérie à l'électrode est controversé pour certaines bactéries où il semble que le courant obtenu soit une combinaison entre un transfert direct entre la bactérie et l'électrode et un transfert indirect via des médiateurs sécrétés par la bactérie, notamment chez *Aeromonas hydrophila* (Pham *et al.*, 2003), *Clostridium butyricum* (Park *et al.*, 2001), *Shewanella putrefaciens* (Kim, Kim, *et al.*, 1999).

Ce mode de transfert direct au travers de la membrane cytoplasmique induit un contact direct entre la cellule et l'électrode. Cela suppose que seuls les microorganismes de la

première couche du biofilm en contact avec l'électrode sont réellement électroactifs. Cependant, il a récemment été montré que le transfert direct des électrons puisse également se faire par le biais de pili (Reguera *et al.*, 2005; Lovley, 2006b). Ces derniers permettent d'assurer un contact direct sur des épaisseurs plus importantes de biofilm et d'atténuer les limites électrochimiques liées aux propriétés isolantes de la couche lipidique des membranes cellulaires (Lovley, 2006b). Il a été démontré que *Geobacter sulfurreducens* et *Shewanella oneidensis* étaient capables de réduire des oxydes de fer en utilisant des pili conducteurs connectés au cytochromes qui permettent le transfert d'électrons vers l'extérieur de la cellule bactérienne (Gorby *et al.*, 2006; Logan and Regan, 2006). Il a été démontré qu'après la formation des pili, le flux d'électrons de *Geobacter sulfurreducens* en culture pure était multiplié par 10 (Reguera *et al.*, 2005).

La possibilité du transfert inter-espèce a également été mise en évidence. Une étude en co-culture de Ishii *et al.* (2005) a notamment montré la production d'appendices épais et conducteurs semblables à des flagelles entre *Pelotomaculum thermopropionicum* et *Methanothermobacter thermautotrophicus*. L'analyse morphologique de ces filaments produits par *Pelotomaculum thermopropionicum* montre une homologie avec les pili formés par *Shewanella oneidensis* MR-1. Une observation des filaments de *Shewanella oneidensis* MR-1 au microscope à effet tunnel (Scanning Tunneling Microscopy ou STM en anglais) a permis de montrer que ces appendices sont conducteurs et peuvent être considérés comme des pili conducteurs (Gorby *et al.*, 2006) (Figure I-14).

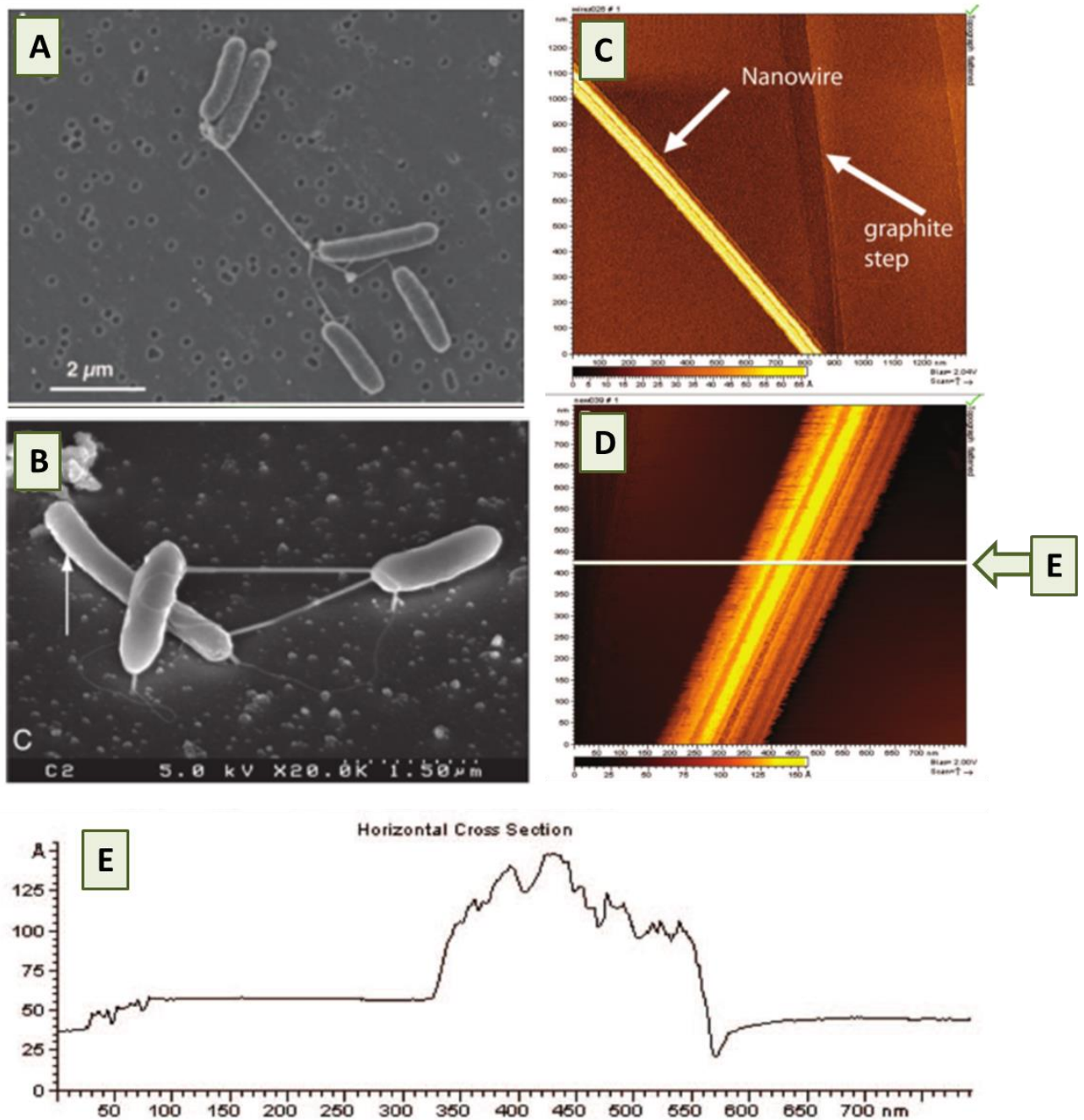


Figure I-14 : Images SEM et STM des pili conducteurs produits par des microorganismes électroactifs.

(A) Image SEM (Scanning electron microscope ou microscope à balayage électronique) de *Schewanella oneidensis* MR-1. (B) Images SEM d'une co-culture de *Pelotomaculum thermipropionicum* et *Methanothermobacter thermoautotrophicus* montrant la présence de pili conducteurs inter-espèces. (C) Images STM (scanning tunneling microscope ou microscope à effet tunnel) de pili conducteurs isolés de *Schewanella oneidensis* sur une surface de graphite. (D) Grossissement de (C). (E) Structure de la coupe du pili selon l'axe des abscisses. (d'après Gorby et al. (2006))