

Biopiles enzymatiques H₂/O₂

Nanostructuration de l'interface électrochimique pour l'immobilisation des enzymes redox

Anne de Poulpiquet

Résumé

Dans un contexte d'utilisation du dihydrogène H₂ comme vecteur d'énergie, le début du XXI^e siècle a vu l'émergence du concept de « biopile enzymatique H₂/O₂ », où des enzymes remplacent le platine, le catalyseur plus conventionnel des piles à combustible à membrane échangeuse de protons. Dans le travail présenté ici, l'hydrogénase hyperthermophile extraite du microorganisme *Aquifex aeolicus*, qui a la propriété exceptionnelle de résister aux gaz CO et O₂, a été utilisée comme catalyseur anodique pour l'oxydation de H₂, tandis que la bilirubine oxydase thermostable de la bactérie *Bacillus pumilus* sert de catalyseur cathodique pour la réduction de O₂. La nanostructuration de l'électrode avec différents nanomatériaux carbonés a été mise en œuvre, d'une part pour améliorer le transfert électronique entre l'enzyme et l'électrode, d'autre part pour permettre de multiplier la densité de molécules de catalyseur sur une surface géométrique donnée. Ces travaux ont conduit au développement d'une biopile fonctionnant entre 30 et 80 °C et délivrant une densité de puissance maximale de 1,6 mW cm⁻² à 60 °C, ce qui représente une étape importante dans les progrès des biopiles H₂/O₂.

Mots-clés

Enzymes, hydrogène, biopile à combustible, électrochimie, nanomatériaux.

Abstract

Enzymatic H₂/O₂ biofuel cell: nanostructuration of the electrochemical interface for the immobilization of the redox enzymes

The concept of "enzymatic H₂/O₂ biofuel cell", where enzymes replace platinum as catalysts, has recently emerged in the context of conversion of hydrogen H₂ energy in devices like proton exchange membrane fuel cells (PEMFC). In the work described here, the hyperthermophilic, remarkably O₂ and CO-tolerant hydrogenase from *Aquifex aeolicus* has been used as the anodic catalyst for H₂ oxidation, while the thermostable bilirubin oxidase from *Bacillus pumilus* has been used as the cathodic catalyst for O₂ reduction. Various carbon nanomaterials have been used for the nanostructuration of the electrode interface, first to improve the electrical contact between enzyme and electrode, then also to increase the enzyme load on a given geometrical surface. This has led to the development of a biofuel cell working over a wide range of temperatures (between 30 and 80 °C) and delivering a maximal power density of 1.6 mW cm⁻² at 60 °C. This is a significant step toward the improvement of H₂/O₂ biofuel cells.

Keywords

Enzymes, hydrogen, biofuel cell, electrochemistry, nanomaterials.

Dans une perspective de développement d'énergies alternatives, le dihydrogène H₂ est un vecteur énergétique riche de multiples atouts : son abondance potentielle grâce à l'abondance atomique de l'élément H, son caractère non polluant car sa combustion ne produit que de l'eau..., mais surtout son pouvoir énergétique exceptionnel – sa combustion libère 120 MJ kg⁻¹ contre 45 MJ kg⁻¹ pour l'essence – qui le désigne comme carburant privilégié pour les piles à combustible (PAC).

Une PAC utilisant H₂ comme carburant et O₂ comme comburant est décrite dès 1843 par Sir W. Groove. Mais à l'époque déjà, la concurrence est rude : le premier puits de pétrole est creusé en 1859 en Pennsylvanie, et en 1897, R. Diesel invente le moteur à combustion interne, si bien que la PAC est oubliée... jusqu'en 1953, lorsque F.T. Bacon réalise le premier prototype de puissance notable.

Depuis, différents types de PAC (alcalines, à acide phosphorique, à oxyde solide...) ont été développés. En particulier, le domaine des transports utilise la PAC à membrane échangeuse de protons, qui fonctionne à des températures

modérées (60-120 °C) et délivre des puissances de l'ordre de 10-100 MW. Ce dispositif couple l'oxydation de H₂ à l'anode à la réduction de O₂ à la cathode. Les électrons circulent dans un circuit extérieur, générant un courant électrique, et les protons sont échangés à travers une membrane polymère de Nafion®. Les réactions aux deux électrodes nécessitent néanmoins l'emploi d'un catalyseur, généralement le platine, un métal excessivement cher dont les réserves tendent à s'épuiser. L'essor de la technologie des PAC exige donc le développement de nouveaux catalyseurs.

Or la nature offre une alternative séduisante : les enzymes, catalyseurs du métabolisme, dont l'utilisation définit le concept de bio-PAC enzymatique (pour approfondir cette notion ainsi que celle de biopiles microbiennes, le lecteur pourra se référer à un récent numéro de *L'Actualité Chimique* [1]). Les enzymes notamment présentent de multiples avantages, dont la biodisponibilité, la biodégradabilité, les grandes fréquences de conversion (« turnover frequency », TOF), et la capacité à travailler comme électrocatalyseurs avec de faibles surtensions. Enfin, leur grande spécificité vis-à-vis de

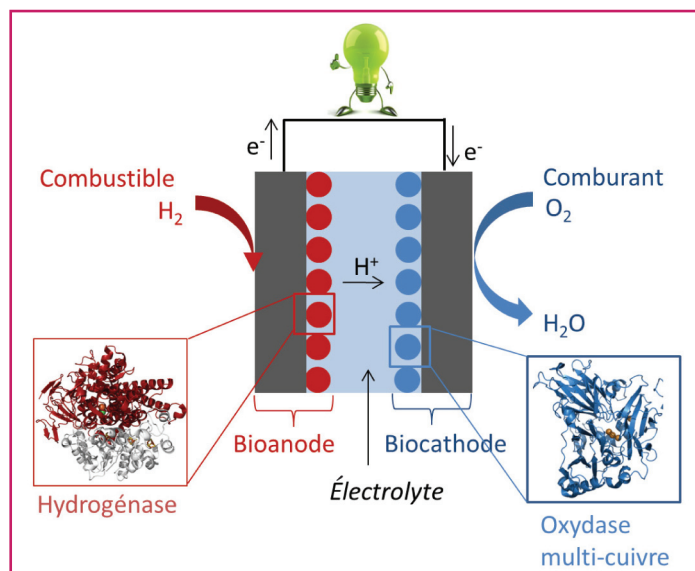


Figure 1 - Schéma de principe d'une biopile à combustible (bio-PAC) enzymatique H_2/O_2 : l'enzyme anodique est une hydrogénase et l'enzyme cathodique peut être une bilirubine oxydase ou une laccase.

leur substrat permettrait de supprimer la coûteuse membrane de Nafion®, contrairement aux PAC où elle est indispensable pour éviter les réactions croisées aux électrodes. L'existence d'enzymes spécifiques de nombreux substrats laisse par ailleurs envisager la conception de bio-PAC utilisant des carburants variés (alcools, sucres...). La plus ancienne et la plus répandue a vu le jour en 1964. Elle couple l'oxydation du glucose à l'anode par une glucose oxydase à la réduction du dioxygène à la cathode par une oxydase multi-cuivre (MCO). Dans le cas d'une bio-PAC à H_2/O_2 , la cathode est similaire, et l'oxydation de H_2 à l'anode est catalysée par une hydrogénase (figure 1).

De l'immobilisation orientée à la nanostructuration de l'interface : l'anode de la biopile

Les hydrogénases à [NiFe], dont le site actif est composé d'un atome de Ni et d'un atome de Fe, sont des catalyseurs efficaces de l'oxydation de H_2 : leurs fréquences de catalyse TOF peuvent atteindre plusieurs milliers de s^{-1} . Cependant, la grande sensibilité de la majorité d'entre elles à O_2 et CO a jusqu'à présent terriblement limité leurs applications dans des dispositifs biotechnologiques. Les solutions envisagées pour surmonter ces limitations sont d'améliorer la tolérance des hydrogénases sensibles, notamment par ingénierie génétique, ou de rechercher dans la biodiversité des hydrogénases naturellement tolérantes. Ces dernières restent rares, mais elles existent ! L'hydrogénase membranaire extraite de la bactérie hyperthermophile *Aquifex aeolicus* (*Aa Hase*), identifiée et purifiée au Laboratoire de Bioénergétique et Ingénierie des Protéines (BIP), est ainsi résistante à CO et tolérante à O_2 . En raison de son origine, elle est également hyperthermophile : elle réalise la catalyse entre 20 et 85 °C, alors que la majorité des enzymes sont dénaturées au-delà de 37 °C.

Malgré tous les avantages des enzymes, leur utilisation comme électrocatalyseurs demeure un défi. En effet, les difficultés proviennent de leur taille importante, les hydrogénases pesant par exemple environ 100 kDa, mais surtout de l'anisotropie de leurs propriétés électroniques. Les hydrogénases à [NiFe] sont ainsi constituées de deux sous-unités : le site actif où a lieu la rupture hétérolytique de H_2 est enfoui dans la plus grande, et la plus petite contient trois relais électroniques FeS pour conduire les électrons du site actif à la surface de la protéine, où ils sont cédés au partenaire physiologique et donc, dans notre cas, à l'électrode. Il faut aussi prendre en compte pour l'*Aa Hase* une hélice transmembranaire qui, *in vivo*, permet l'ancrage de l'enzyme à la membrane périplasmique (figure 2). Lorsque l'enzyme est

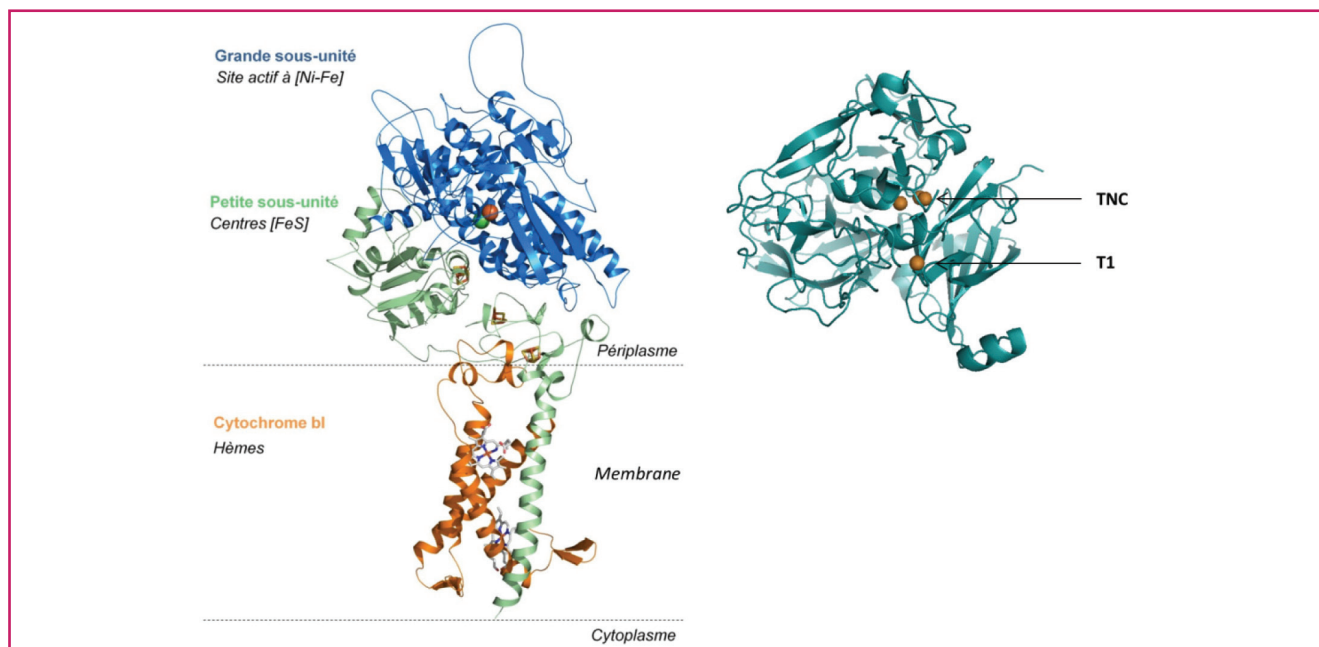


Figure 2 - **Modèle des enzymes de la biopile thermostable.** Hydrogénase d'*Aquifex aeolicus*, *Aa Hase* (à gauche) : la grande sous-unité est représentée en bleu et la petite, qui comporte l'hélice transmembranaire, en vert. Le cytochrome b1, partenaire physiologique de l'*Aa Hase*, est représenté en orange. Les centres [FeS] sont représentés par des bâtonnets jaunes (soufre) et marron (fer), le site actif [NiFe] par des sphères verte (nickel) et marron (fer), et les hèmes (sites redox du cytochrome b1) par des bâtonnets blancs (atomes de carbone), bleus (atomes d'azote), rouges (atomes d'oxygène) et marrons (atomes de fer). Bilirubine oxydase de *Bacillus pumilus*, *Bp BOD* (à droite) : le site actif est composé de quatre atomes de cuivre répartis en deux sites, un site trinocléaire (TNC) où a lieu la réduction du dioxygène, et un site mononucléaire (T1) où a lieu l'oxydation de la bilirubine (*in vivo*) et où est réalisé le contact avec l'électrode.

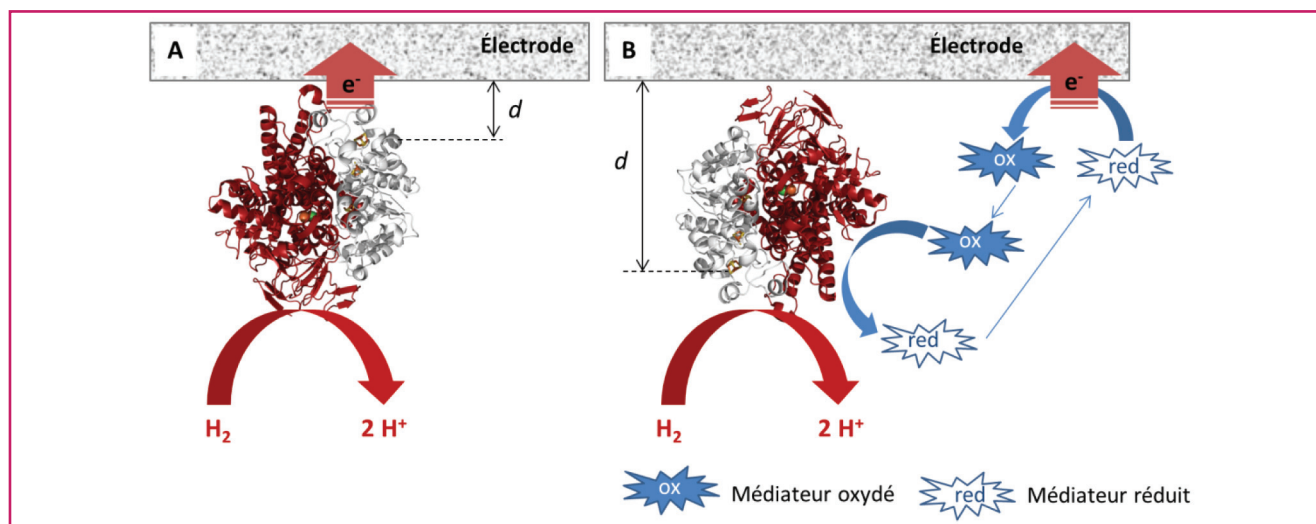


Figure 3 - Mécanismes d'échange d'électrons entre l'enzyme et l'électrode : A) transfert électronique direct (TED) et B) transfert électronique médié (TEM). Dans l'exemple, l'enzyme est une hydrogénase, qui réalise l'oxydation du dihydrogène, et le médiateur peut être le bleu de méthylène.

immobilisée à l'électrode, le transfert électronique entre les deux protagonistes peut se faire selon deux mécanismes : l'un est appelé direct (TED), puisque les électrons sont cédés directement par effet tunnel entre l'enzyme et l'électrode, et l'autre est appelé médié (TEM), puisque la connexion se fait *via* une molécule redox, le médiateur, qui joue le rôle de navette électronique entre l'enzyme et l'électrode (figure 3). Le transfert TED est préféré dans notre étude pour sa simplicité et pour éviter la diminution de tension de pile due à l'introduction du médiateur. Néanmoins, ce mécanisme TED ne peut avoir lieu que si le centre électronique le plus proche de la surface de l'enzyme est également suffisamment proche de la surface de l'électrode.

Pour forcer l'enzyme à s'orienter correctement, on peut chercher à reproduire à l'électrode les affinités existant *in vivo* entre l'enzyme et son partenaire. L'hydrophobicité de la surface étant particulièrement importante pour une enzyme membranaire, une première étape a consisté à travailler avec des électrodes d'oxyde d'indium dopé à l'étain (ITO) ayant subi différents traitements visant à leur conférer différents degrés d'hydrophobicité. Les résultats obtenus ont confirmé une étude antérieure, dans laquelle l'enzyme était immobilisée sur une électrode modifiée avec des monocouches auto-assemblées de thiols (SAM) [2], cette approche étant connue pour permettre l'obtention d'une surface organisée et la maîtrise de la chimie de surface grâce au choix de la fonction terminale appropriée. Une orientation préférentielle de l'Aa Hase défavorable au TED a été constatée sur les surfaces hydrophobes, et l'absence d'orientation préférentielle sur les surfaces hydrophiles. Le modèle proposé pour expliquer le premier cas considère que l'hélice transmembranaire hydrophobe est entourée du détergent utilisé lors de la purification de l'enzyme, ce qui crée une zone hydrophile à proximité du centre FeS de surface, repoussant ce dernier loin des surfaces hydrophobes. Pour expliquer le second cas, une modélisation par dynamique moléculaire a été réalisée à l'Institut de Biologie Physico-Chimique. Le calcul de l'évolution du potentiel électrostatique de l'enzyme au cours de « longues » simulations ($\approx 2 \mu\text{s}$) montre que l'intensité de son moment dipolaire est quasi constante mais relativement faible (≈ 200 Debyes), tandis que sa direction fluctue considérablement. Ceci permet à l'enzyme d'adopter une grande multiplicité d'orientations sur les surfaces hydrophiles [3].

Afin d'obtenir une anode efficace pour l'oxydation électro-enzymatique de H_2 pour la biopile, une stratégie différente a donc été adoptée : la nanostructuration de l'électrode [4]. Cette technique doit permettre non seulement d'augmenter le nombre d'enzymes connectées sur une surface géométrique donnée, en augmentant la surface développée, mais aussi d'assurer une meilleure connexion du catalyseur grâce au choix d'une porosité adaptée. En entourant l'enzyme par un matériau conducteur, on doit en effet augmenter la probabilité d'obtenir un transfert électronique efficace. Le matériau choisi doit bien entendu être biocompatible, conducteur et de grand rapport surface/volume : tout ceci fait des nanomatériaux carbonés des candidats privilégiés. Différents nanomatériaux ont été successivement employés au cours de cette thèse : les nanoparticules [5], les nanotubes [6] et les nanofibres de carbone [7].

En particulier, les nanofibres de carbone en chevrons (CNF), un matériau novateur, ont donné accès à des performances intéressantes [7]. Synthétisées à l'Institut des Sciences des Matériaux de Mulhouse par déposition chimique en phase vapeur d'acétylène sur un support de graphite avec le nickel comme catalyseur, elles sont constituées de cônes de graphène empilés les uns sur les autres (figure 4). Cette structure graphitique particulière leur confère de nombreuses arêtes réactives, une grande surface développée et une excellente conductivité électrique. Afin de rationaliser les interactions entre l'enzyme et le matériau, leurs propriétés physico-chimiques ont tout d'abord été caractérisées. Les isothermes d'adsorption de l'azote révèlent un faible volume de micropores ($\phi < 2 \text{ nm}$), mais un volume important de mésopores ($2 \text{ nm} < \phi < 50 \text{ nm}$). La porosité est donc adaptée à l'immobilisation de l'enzyme, dont la dimension caractéristique est d'environ 10 nm . Par ailleurs, l'analyse de la surface des nanofibres CNF par désorption programmée en température, couplée à la spectrométrie de masse, montre une faible densité de fonctions de surface : c'est donc essentiellement la texture du matériau qui va gouverner ses interactions avec l'enzyme.

Un film de nanofibres CNF a alors été formé sur une électrode de graphite, et l'étude par microscopie à balayage de la structure 3D ainsi construite a montré la formation de pores de $100\text{-}200 \text{ nm}$ favorables à la circulation de l'enzyme dans le réseau (figure 4). Après adsorption de l'enzyme sur les CNF,

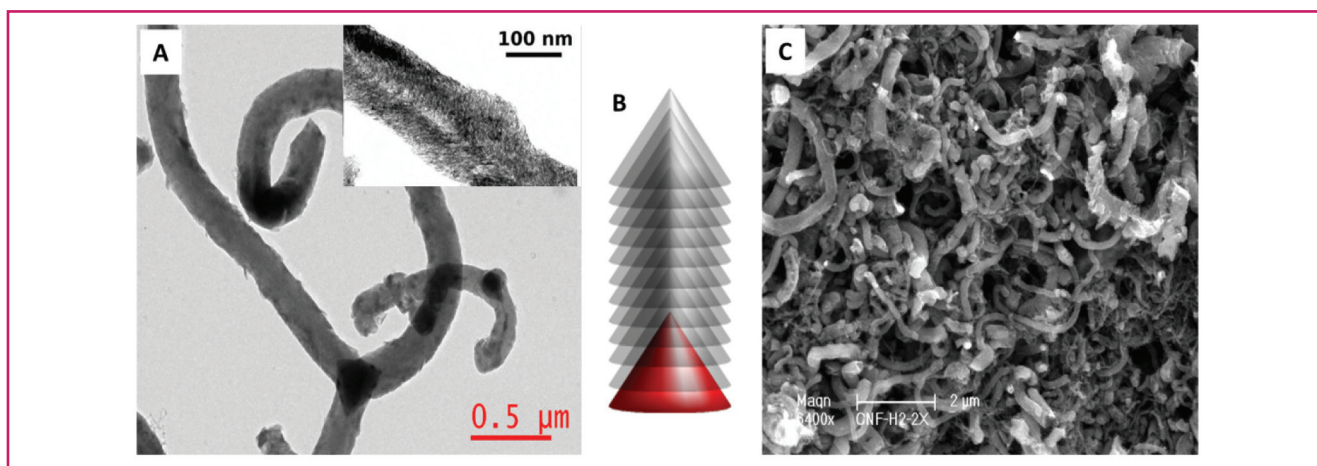


Figure 4 - Structure des nanofibres de carbone CNF (A et B) et du réseau de CNF formé à l'électrode (C). A) Observations au microscope électronique à transmission d'un échantillon de CNF montrant le catalyseur de nickel sous forme de tricône d'où partent trois fibres. L'encart montre un plus fort grossissement sur lequel on distingue la structure en chevrons schématisée en B. C) Observation au microscope électronique à balayage d'un film de CNF formé à la surface d'une électrode de graphite pyrolytique.

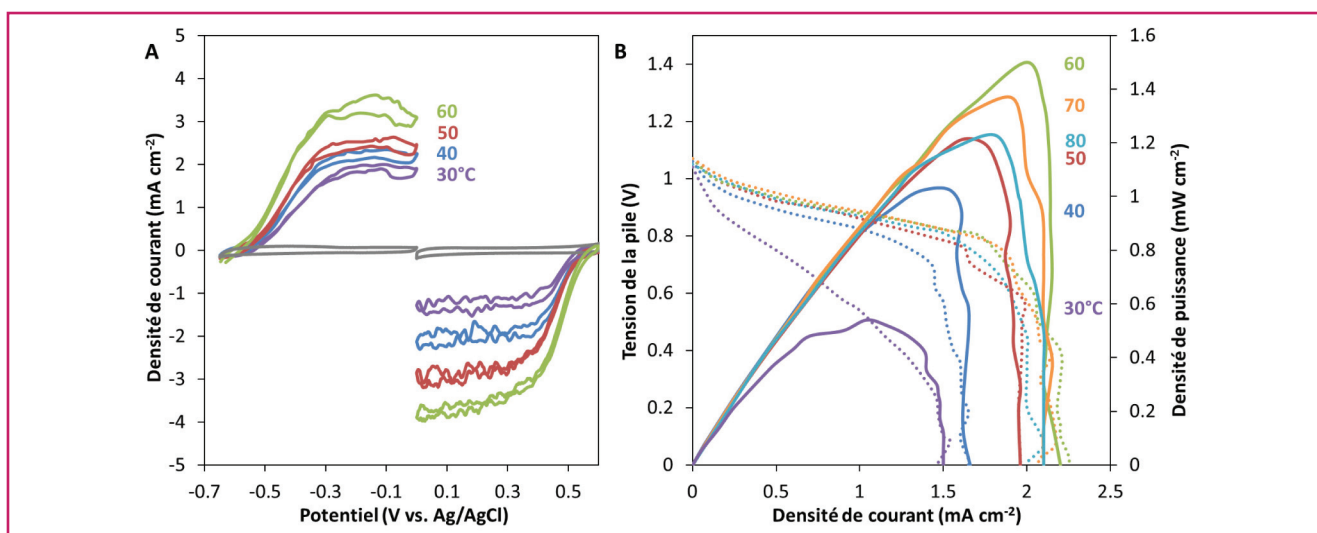


Figure 5 - Évolution des performances de la biopile avec la température. A) Voltammogrammes montrant l'évolution des performances de l'anode (à droite) et de la cathode (à gauche). B) Courbes de puissance (traits pleins) et courbes de polarisation (traits pointillés) montrant l'évolution des performances de la biopile, qui sont optimales pour la température de 60 °C. Tampon phosphate 100 mM ; pH 6 ; $v = 3 \text{ mV s}^{-1}$.

les courants d'oxydation de H_2 ont été étudiés en fonction des quantités d'enzymes et de CNF utilisés pour modifier l'électrode, montrant que cette nanostructuration permettait une multiplication importante des courants par rapport au cas où l'hydrogénase était adsorbée sur une électrode plane (figure 5). La mise en évidence et la caractérisation de la limitation du procédé par le transport de masse de H_2 vers l'enzyme a permis d'accroître encore les performances de l'électrode. Finalement, une anode a pu être obtenue, délivrant des densités de courant allant jusqu'à $4,5 \text{ mA cm}^{-2}$ – une valeur jamais atteinte pour l'oxydation électroenzymatique de H_2 par une hydrogénase tolérante à O_2 .

Repousser les frontières des biopiles H_2/O_2 grâce à des enzymes thermostables

Une première biopile H_2/O_2 alliant l'Aa Hase à l'anode à la bilirubine oxydase (BOD) de *Myrothecium verrucaria* pour la réduction de O_2 à la cathode avait été développée au

BIP en 2012 [8]. Ce dispositif délivrait une puissance de $300 \mu\text{W cm}^{-2}$, ce qui en faisait le dispositif le plus puissant à l'époque. Néanmoins, la BOD n'étant pas stable aux températures élevées, contrairement à l'Aa Hase ; il fallait chauffer le compartiment anodique et refroidir le compartiment cathodique... Ce n'était donc pas tout à fait optimal en termes de rendements énergétiques ! Il était ainsi nécessaire de trouver également une enzyme thermostable pour la cathode. Le choix s'est porté sur la BOD de *Bacillus pumilus* (*Bp* BOD) (figure 2), identifiée et produite au Centre de Recherche Paul Pascal, qui avait déjà prouvé son efficacité pour réduire O_2 à haute température lorsqu'elle était immobilisée à l'électrode dans un hydrogel redox. Adsorbée dans un réseau de CNF, la *Bp* BOD a également démontré son efficacité et sa thermostabilité en TED (figure 5).

Les deux bioélectrodes thermostables ont alors pu être connectées en pile. La tension de circuit ouvert ($E_{\text{OCP}} = 1,06 \text{ V}$) est proche de la limite thermodynamique en milieu aqueux ($E_{\text{OCP,lim}} = 1,23 \text{ V}$), et la biopile optimale a délivré une densité de puissance de $1,6 \text{ mW cm}^{-2}$. Après un fonctionnement continu de 24 h à la tension $E_{\text{cell}} = 0,5 \text{ V}$, ce qui

représente les conditions les plus exigeantes pour le dispositif, 40 % des performances initiales étaient encore conservées. Par ailleurs, le fonctionnement de la biopile a été testé pour des températures allant de 30 à 80 °C, et les densités de puissance se sont montrées supérieures à 1 mW cm⁻² sur tout l'intervalle 40-80 °C [9] (figure 5).

Conclusion

Depuis la preuve du concept en 2005, et particulièrement ces dernières années, les bio-PAC H₂/O₂ ont connu un essor rapide auquel a participé le travail décrit ci-dessus. On peut citer différents progrès marquants, comme la multiplication des densités de puissance avec la nanostructuration des électrodes [8-10], la réalisation d'une pile sans membrane grâce à une cathode respirante [11], ou récemment l'utilisation d'une hydrogénase sensible protégée par un hydrogel redox [12]... Si les densités de puissance de ce type de dispositif ne sont pas encore comparables avec celles des piles à combustible à membrane d'échange de protons (PEFC), certaines applications sont néanmoins déjà envisageables. L'alimentation par une unique bio-PAC H₂/O₂ d'un circuit complet permettant l'envoi par radio de cinq mesures différentes toutes les 20 secondes a ainsi été démontrée dernièrement au BIP [13]. Et le champ exploratoire reste encore large pour les améliorations possibles, notamment en matière d'approvisionnement du dispositif en carburant et de stabilité des enzymes.

Références

- [1] Holade Y., Oliot M., Bergel A., Servat K., Biopiles enzymatiques et microbiennes, *L'Act. Chim.*, **2015**, 400-401, p. 81.
- [2] Ciaccafava A., Infossi P., Ilbert M., Guiral M., Lecomte S., Giudici-Ortoni M.T., Lojou E., Electrochemistry, AFM, and PM-IRRA spectroscopy of immobilized hydrogenase: role of a hydrophobic helix in enzyme orientation for efficient H₂ oxidation, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2012**, 51, p. 953.
- [3] Oteri F., Ciaccafava A., de Poulpique A., Baaden M., Lojou E., Sacquin-Mora S., The weak, fluctuating, dipole moment of membrane-bound hydrogenase from *Aquifex aeolicus* accounts for its adaptability to charged electrodes, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2014**, 16, p. 11318.
- [4] de Poulpique A., Ciaccafava A., Lojou E., New trends in enzyme immobilization at nanostructured interfaces for efficient electrocatalysis in biofuel cells, *Electrochim. Acta*, **2014**, 126, p. 104.
- [5] Szot K., de Poulpique A., Ciaccafava A., Marques H., Joensson-Niedziolka M., Niedziolka-Joensson J., Marken F., Lojou E., Opallo M., Carbon nanoparticulate films as effective scaffolds for mediatorless bioelectrocatalytic hydrogen oxidation, *Electrochim. Acta*, **2013**, 111, p. 434.
- [6] de Poulpique A., Ciaccafava A., Szot K., Pillain B., Infossi P., Guiral M., Opallo M., Giudici-Ortoni M.T., Lojou E., Exploring properties of a hydrothermophilic membrane-bound hydrogenase at carbon nanotube modified electrodes for a powerful H₂/O₂ biofuel cell, *Electroanal.*, **2013**, 25(3), p. 685.
- [7] de Poulpique A., Marques-Knopf H., Wernert V., Giudici-Ortoni M.T., Gadiou R., Lojou E., Carbon nanofiber mesoporous films: efficient platforms for bio-hydrogen oxidation in biofuel cells, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2014**, 16(4), p. 1366.
- [8] Ciaccafava A., de Poulpique A., Techer V., Giudici-Ortoni M.T., Tingry S., Innocent C., Lojou E., An innovative powerful and mediatorless H₂/O₂ biofuel cell based on an outstanding bioanode, *Electrochem. Comm.*, **2012**, 23, p. 25.
- [9] de Poulpique A., Ciaccafava A., Gadiou R., Gounel S., Giudici-Ortoni M.T., Mano N., Lojou E., Design of a H₂/O₂ biofuel cell based on thermostable enzymes, *Electrochem. Comm.*, **2014**, 42, p. 72.
- [10] Xu L., Armstrong F.A., Optimizing the power of enzyme-based membrane-less hydrogen fuel cells for hydrogen-rich H₂-air mixtures, *Energy Environ. Sci.*, **2013**, 6(7), p. 2166 ; Krishnan S., Armstrong F.A., Order-of-magnitude enhancement of an enzymatic hydrogen-air fuel cell based on pyrenyl carbon nanostructures, *Chem. Sci.*, **2012**, 3(4), p. 1015.
- [11] Lalaoui N., de Poulpique A., Haddad R., Le Goff A., Holzinger M., Gounel S., Mermoux M., Infossi P., Mano N., Lojou E., Cosnier S., A membraneless air-breathing hydrogen biofuel cell based on direct wiring of thermostable enzymes on carbon nanotube electrodes, *Chem. Comm.*, **2015**, 51(35), p. 7447.
- [12] Plumere N., Ruediger O., Oughli A.A., Williams R., Vivekananthan J., Poeller S., Schuhmann W., Lubitz W., A redox hydrogel protects hydrogenase from high-potential deactivation and oxygen damage, *Nat. Chem.*, **2014**, 6(9), p. 822.
- [13] Monsalve K., Mazurenko I., Lalaoui N., Le Goff A., Holzinger M., Infossi P., Nitsche S., Lojou J.Y., Giudici-Ortoni M. T., Cosnier S., Lojou E., A H₂/O₂ enzymatic fuel cell as a sustainable power for a wireless device, *Electrochem. Comm.*, **2015**, 60, p. 216.



Anne de Poulpique a reçu le **Prix de thèse de la division de Chimie physique de la SCF en 2015**. Elle a préparé sa thèse sous la direction d'Elisabeth Lojou, au Laboratoire de Bioénergétique et Ingénierie des Protéines, Institut de Microbiologie de la Méditerranée*.

* Laboratoire de Bioénergétique et Ingénierie des Protéines, Institut de Microbiologie de la Méditerranée, 31 Chemin Joseph Aiguier, F-13009 Marseille.
Courriel : anne.depoulpique@enscbp.fr

45
Sc
21

Culture
iencesChimie



ENS



MINISTÈRE
DE L'ÉDUCATION
NATIONALE DE
L'ENSEIGNEMENT
SUPÉRIEUR ET DE
LA RECHERCHE



Mis à disposition
**CAPES et
AGRÉGATION**
aux épreuves orales

Site de ressources en Chimie pour les enseignants

Thèmes en lien avec les
**PROGRAMMES
D'ENSEIGNEMENT**
Contenu validé par des
CHERCHEURS

Articles, Vidéos, Diaporamas
AGENDA, ACTUALITÉS
événements, conférences, parutions
scientifiques...

<http://culturesciences.chimie.ens.fr>

