

Bioelectrochemistry without potentiostat (or any electronics)

Mathieu Etienne

LCPME, 405 rue de Vandoeuvre, 54600 Villers-les-Nancy
mathieu.etienne@cnrs.fr

Electrochemistry is the science that studies electron transfer phenomena at interfaces and their many applications in the fields of energy, analytical chemistry, biology, etc. Bioelectrochemistry is a subdivision of electrochemical sciences that focuses more specifically on the electrochemistry of biological objects, e.g. living cells, redox enzymes, enzyme cofactors, biomolecules.

To perform electrochemistry, a potentiostat, or at least a power supply or a resistor is needed to force or measure or exploit the electron transfer reactions. This is the case for a biofuel cell that produces electrical energy collected by a low-power electronic for whatever usage. This is the case for a biosensor that usually needs to be powered to induce the bioconversion that is translated into concentration, e.g. glucose biosensor. This is the case for electrosynthesis that requires applying a potential to the electrode for conducting the biotransformation in well-controlled conditions, e.g. the cathodic NADH enzymatic cofactor regeneration that can be coupled to bioconversions catalyzed by NAD-dependent dehydrogenases. And this is the case for most tentative to use electrochemistry in denitrification with microbial electrochemical systems. When electrical energy is not the input of the bioelectrochemical system, it is the output.

In recent years, we have been interested in performing electrochemistry without potentiostat, i.e. without providing electrical energy as input for running the bioelectrochemical reaction, and without recovering the produced energy, because the potential difference between the involved redox reactions was too low to be meaningfully exploitable and also because maximizing the current density was preferable to maximizing the power density. In practice, two electrodes are simply short-circuited at the same potential, but still specialize into anode and cathode due to differences in the local environment or the nature of the electrode surface.

In this communication, after a brief overview of this concept in the literature, I would like to present three examples of bioelectrochemistry performed without potentiostat for, 1) nitrate reduction with microbial electrodes¹, 2) biohydrogen production from organic waste² and 2) NADH regeneration with H₂³. The methodology for characterizing the short-circuited system will be discussed and the main results will be highlighted.

References

- (1) Rogińska, J.; Perdicakis, M.; Midoux, C.; Bouchez, T.; Despas, C.; Liu, L.; Tian, J.-H.; Chaumont, C.; P. A. Jorand, F.; Tournebize, J.; *et al.* Electrochemical Analysis of a Microbial Electrochemical Snorkel in Laboratory and Constructed Wetlands. *Bioelectrochemistry* **2021**, *142*, 107895.
- (2) Truong, D.; Changey, F.; Rondags, E.; Framboisier, X.; Etienne, M.; Guedon, E. Evaluation of Short-Circuited Electrodes in Combination with Dark Fermentation for Promoting Biohydrogen Production Process. *Bioelectrochemistry* **2023**, *157*, 108631.
- (3) El-Housseini W.; Lopicque F.; Lojou E.; Walcarius A.; Etienne M. Highly efficient NADH Regeneration with H₂, *to be submitted*.

Carbon Monoxide Dehydrogenase sur nanotubes de carbone pour la réduction réversible du CO₂ en CO

Le Goff Alan^{(a)*}

^(a) Univ. Grenoble Alpes, CNRS, DCM UMR 5250, F-38000 Grenoble, France

[*alan.le-goff@univ-grenoble-alpes.fr](mailto:alan.le-goff@univ-grenoble-alpes.fr)

La carbon monoxide dehydrogenase (CODH) est une métalloenzyme comportant un site actif unique en biologie composé d'un centre multi-métallique NiFe₄S₄. Elle représente le biocatalyseur le plus efficace pour la réduction réversible du CO₂ en CO. Nous avons développé de nouvelles stratégies de couplage de CODH issues de différents organismes à des nanotubes de carbone.^{1,2} Elles se basent sur des méthodes de fonctionnalisation des nanotubes de carbone non covalentes via la synthèse de dérivées du pyrène, ou covalentes via l'électrogreffage de sels d'aryldiazonium. Il s'agit de favoriser et stabiliser l'immobilisation de la métalloenzyme sur la surface, à l'aide de groupements hydrophobes, hydrophiles ou chargés ou via le ciblage de tags présents à la surface de la protéine ; ainsi qu'en même temps de garantir un transfert d'électrons direct efficace entre les relais d'électrons présents au sein de la métalloenzyme et la surface des nanotubes de carbone.

Ces avancées ont permis leur intégration dans des bioélectrolyseurs à diffusion de gaz et leur utilisation dans des liquides ioniques agissant comme barrière à l'oxygène.³ Enfin, leur couplage à des catalyseurs bio-inspirés de réduction des protons, de type bisdiphosphine de Ni(II), a été réalisé sur nanotubes de carbone. Ces catalyseurs hybrides sont capables de réaliser la catalyse de la Water-Gas Shift Reaction ($\text{CO} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{CO}_2 + \text{H}_2$) à des fréquences de turnover de 10 s⁻¹.

References

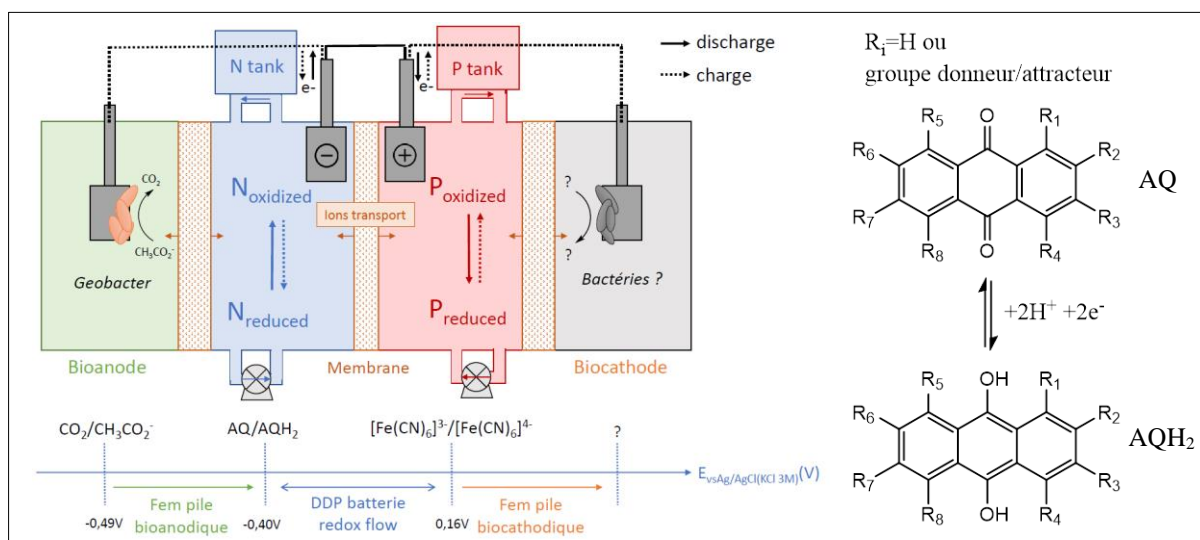
- (1) Contaldo, U.; Guigliarelli, B.; Perard, J.; Rinaldi, C.; Le Goff, A.; Cavazza, C. *ACS Catal.* **2021**, 5808–5817.
- (2) Contaldo, U.; Curtil, M.; Pérard, J.; Cavazza, C.; Le Goff, A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2022**, 61 (21), e202117212.
- (3) Allan, M. G.; Pichon, T.; McCune, J. A.; Cavazza, C.; Le Goff, A.; Kühnel, M. F. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2023**, 62 (22), e202219176.

Développement d'une bioanode couplée à un médiateur redox utilisé en batterie redox à flux

Antoine Vautier^a, James Behan^a, Jeffrey Tourneur^a, Florence Geneste^a, and Frédéric Barrière^a

^aUniv Rennes, CNRS, ISCR, UMR 6226, F-35000 Rennes, France
 antoine.vautier@univ-rennes.fr

Les piles à combustible d'origine microbienne prennent de l'ampleur dans les milieux académique et industriel tant les applications sont diverses et la matière première, d'origine organique, est abondante. Cependant, comme la technologie ne permet pas de produire des densités de puissance élevées (<5 W/m²), elle est moins développée pour la production d'électricité que pour le traitement de déchets organiques (1). Les batteries redox à flux, quant à elles, permettent de stocker l'électricité à l'aide de composés organiques solubles et délivrent ainsi des densités de puissance importantes (>1000 W/m²). L'intérêt de coupler une pile microbienne à une batterie est donc de profiter de la possibilité de stocker de l'énergie par les batteries redox à flux et de la possibilité, par exemple, d'oxyder la matière organique, sous forme de déchets ou de polluants, en dioxyde de carbone à la bioanode (2). Un procédé de dépollution peut également avoir lieu à la biocathode, comme par exemple une réaction de dénitrification (3). Il sera donc nécessaire de développer des batteries redox à flux utilisant des médiateurs redox de potentiels compatibles avec les potentiels biochimiques fixes des bactéries électroactives et conduisant à une différence de potentiel suffisamment élevée.



Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à la demi-pile constituée de la bioanode et d'un médiateur redox de type anthraquinone. Nous avons étudié la formation du biofilm en présence de ce médiateur. Celui-ci est réduit à la cathode et un biofilm bactérien mixte est formé à l'anode par la sélection de bactéries de type *Geobacter* en conditions anaérobies avec ajout d'acétate de sodium comme source d'électrons. Nous avons également cherché à optimiser la réduction de l'anthraquinone par un biofilm bactérien préformé. Enfin, différents couplages seront envisageables, avec une bioanode, une biocathode, en fonctionnement pile ou électrolyseur.

Références

- (1) Logan, B. E. et al. *Nature Reviews Microbiology* **2019**, *17*, 307-319.
- (2) Santos, M.S.S. et al. *Journal of Energy Storage* **2021**, *39*, 102610.
- (3) Philippon, T. et al. *Bioelectrochemistry* **2021**, *140*, 107819

Fixation bioélectrochimique de N₂ : biofilm cathodique fixateur de N₂ et couplage à une bioanode

Axel Rous^a, Elie Desmond-Le Quémener^b, James Behan^a, Christophe Orain^c, Frédéric Gloaguen^c, Eric Trably^b, Nicolas Bernet^b, Frédéric Barrière^a.

^a Univ Rennes, CNRS, ISCR-UMR 6226, F-35000 Rennes, France

^b LBE, Univ Montpellier, INRAE, UR0050, 102 avenue des Étangs, 11100 Narbonne, France

^c Univ Brest, CNRS, CEMCA UMR 6521, 6 avenue Le Gorgeu, F-29238 Brest, France

Email / Courriel de l'auteur présentant: axel.rous@univ-rennes.fr

L'azote est un élément essentiel du vivant et en particulier en agriculture où il est l'élément le plus apporté aux plantes par l'intermédiaire des engrais. Cependant, la production d'engrais azotés repose sur la synthèse du NH₃ par le procédé Haber-Bosch qui requiert beaucoup d'énergie et est reconnue comme responsable d'importantes émissions de gaz à effet de serre. Comme alternative au procédé Haber-Bosch, il a été suggéré d'utiliser des bactéries fixatrices de N₂ pour produire du NH₄⁺ utilisable comme engrais ou pour produire de la biomasse qui pourrait être utilisée directement comme bioengrais [1]. Pour apporter l'énergie nécessaire à la fixation de N₂ par ces bactéries, il a été proposé d'avoir recours à la bioélectrochimie. Il a ainsi été démontré qu'une cathode peut être utilisée associée à des bactéries fixatrices de N₂ pour produire de la biomasse à partir de N₂, CO₂ et d'un courant électrique faible [2].

Des travaux réalisés dans le cadre du projet ANR CATHOMIX ont permis de développer une méthode d'enrichissement permettant la formation d'une biocathode productrice de H₂ dont le biofilm réalise la fixation conjointe de N₂ et CO₂ [3]. En effet, une activité nitrogénase de 32±17 μmol C₂H₄/L/j a pu être mesurée sur des biocathodes polarisées à -0,7 V vs SHE (pH = 7) en plus d'une production d'acétate de 421,6±216,7 μmol/L/j avec N₂ comme seule source d'azote. Un modèle de fonctionnement des biofilms a été formulé à partir des hypothèses sur les communautés observées dans ces biofilms et de la littérature sur les bactéries identifiées.

Au cours de ces enrichissements, l'oxydation de l'eau a été utilisée à l'anode. Pour améliorer ce procédé de fixation bioélectrochimique de N₂, nous proposons de coupler ces biofilms cathodiques à des anodes microbiennes avec, par exemple, *Geobacter sulfurreducens* comme catalyseur de l'oxydation de l'acétate. Côté cathode, nous proposons d'utiliser des électrodes de graphite recouvert de catalyseurs moléculaires à base de cobalt ou de rhodium pour permettre une meilleure production de H₂ pour sa valorisation directe par un biofilm fixateur de N₂. L'utilisation de bioanodes et de cathodes modifiées doivent permettre de réduire la différence de potentiel du système pour permettre une production de NH₄⁺ ou de biomasse à partir de gaz et avec un apport en énergie électrique réduit.

Remerciements : Ces travaux de recherche ont été soutenus par le projet CATHOMIX financé par l'Agence Nationale de la Recherche (n° ANR-19-CE43-0013)

References

- [1] MacFarlane, D. R.; Cherpanov, P. V.; Choi, J.; Suryanto, B. H. R.; Hodgetts, R. Y.; Bakker, J. M.; Ferrero Vallana, F. M.; Simonov, A. N. *Joule* **2020**, vol. 4, n° 6, p. 1186- 1205.
- [2] Rago, L.; Zecchin, S.; Villa, F.; Goglio, A.; Corsini, A.; Cavalca, L.; Schievano, A. *Bioelectrochemistry* **2019**, vol. 125, p. 105- 115.
- [3] Rous, A.; Santa-Catalina, G.; Desmond-Le Quémener, E.; Trably, E.; Bernet, N. *Peer Community J.* **2024**, vol. 4, article e12.

Investigation of Quinone Reduction by Microalgae using Fluorescence. How “Lake” and “Puddle” Mechanisms may play into Quinone Analysis?

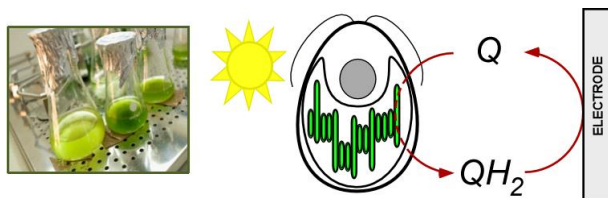
Frédéric Lemaître,^a Léna Beauzamy,^{a,b} Guillaume Longatte,^{a,c} and Manon Guille-Collignon^a

^a PASTEUR UMR8640, Département de Chimie, ENS, 24 rue Lhomond, Paris, France

^b Laboratory of Membrane and Molecular Physiology UMR7141, IBPC, 13 rue Pierre et Marie Curie, Paris, France

^c UMR5255, ISM, Université de Bordeaux, 16 Avenue Pey Berland, Pessac, France
frederic.lemaitre@sorbonne-universite.fr

The production of bioelectricity from natural photosynthesis is an emerging field. In this context, various strategies are being implemented to take advantage of this type of "photon-electron" converter.(1) More specifically, one approach is to focus on the photosynthetic organisms (microalgae or cyanobacteria). The idea is to make a redox mediator, such as a quinone, react with the reduced photosynthetic chain (PC) under illumination. The quinone (Q) is then reduced to hydroquinone (QH₂), which is then released to be oxidised at the surface of a collecting electrode, thereby restoring the quinone form. The principle has been successfully tested on the microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* using 2,6-dichlorobenzoquinone (2,6-DCBQ) and carbon or ITO-Au electrodes to produce photocurrents.(2,3,4) However, there is still the question of identifying the best quinone.



In this context, fluorescence is an ideal technique for analyzing the interactions between algae and quinones, and particularly for assessing the ability of a given quinone to extract photosynthetic electrons.(5) However, two mechanisms account for light capture by the photosynthetic chain (lake vs puddle) and are related to the dependence or non-dependence of the active centres. As a result, the way in which the key parameters characterizing the quinone effects are calculated and their values may be impacted.

This presentation will describe the two mechanisms involved and how to select the relevant parameter for which a quinone can be assessed independently of the light capture mechanism.(6)

References

- (1) Grattieri, M.; Beaver, K.; Gaffney, E. M. et al. *Chem. Commun.* **2020**, 56, 8553.
- (2) Longatte, G.; Rappaport, F.; Wollman, F.-A. et al. *Electrochim. Acta* **2017**, 236, 337.
- (3) Sayegh, A.; Longatte, G.; Buriez, O. et al. *Electrochim. Acta* **2019**, 304, 465.
- (4) Beauzamy, L.; Delacotte, J.; Bailleul, B. et al. *Anal. Chem.* **2020**, 92, 7532.
- (5) Longatte, G.; Fu, H.-Y.; Buriez, O. et al. *Biophys. Chem.* **2015**, 205, 1.
- (6) Beauzamy, L.; Longatte, G.; Guille-Collignon, M.; Lemaître, F. *Bioelectrochemistry* **2023**, 152, 108454. BioLena2023

Site-Specific Anchorage of a Multicopper Oxidase CueO for Electrocatalysis

Vita Saska, Umberto Contaldo, Anne de Poulpiquet, Elisabeth Lojou, Ievgen Mazurenko

Aix-Marseille Université, CNRS, BIP, Bioénergétique et Ingénierie des Protéines UMR 7281
31 chemin Joseph Aiguier 13402 Marseille Cedex 20, France

vsaska@imm.cnrs.fr

Decades of biosensors and biofuel cell development have demonstrated the viability of redox enzymes as a green alternative to inorganic catalysts. Nevertheless, the enhancing of enzyme electrocatalytic activity is still on the cutting edge of interest of many researchers. Due to the large size of biomolecules and distribution of enzyme orientations on the electrode surface in case of physical adsorption, the electron transfer rate can be decreased leading to low efficiency of catalysis. Thus, the site-specific anchorage of biomolecules to the electrode surface might become a promising solution of the problem.

The site-specific anchorage requires the availability of a biorthogonal reactive group in only one specific place of enzyme, which poses a challenge, as within 20 amino acids most groups are unreactive and are replicated multiple times on the enzyme's surface. Therefore, cysteine chemistry is popular for biomolecules binding thanks to low natural abundance and reactivity, which provides selectivity of anchorage. Natural amino acid can be easily introduced before protein expression through site-directed mutagenesis. However, the benefits of cysteine chemistry reactions for redox proteins binding to electrodes are still under discussion.¹⁻³

The group of multicopper oxidases combines a large number of enzymes, including copper efflux oxidase from *Thermus thermophilus* (*Tt* CueO), which is our target enzyme for electrode attachment. With four copper sites in the active center, it is capable of reducing oxygen to water, oxidizing phenolic compounds and Cu⁺ ions, thereby determining its proposed physiological role in copper homeostasis. The distinctive feature of *Tt* CueO is the presence of a flexible methionine-rich (Met-rich) domain, which shields the first electron acceptor, T1 Cu-site, and can be the decisive factor of enzyme activity.⁴ From this perspective, controlling the orientation of the enzyme on the electrode surface can facilitate the study of dynamics and conformational changes of this domain with various external actors.

Thus, our first aim is to assess the efficiency of cysteine chemistry for site-specific anchorage of *Tt* CueO on the electrode surface. For this purpose, several mutations in the wild type enzyme were performed by substituting chosen amino acids with cysteine in positions close to, far from the active center and in the Met-rich domain. The enzymatic activity of *Tt* CueO mutants was first quantified in solution and then tested for site-specific anchorage to electrodes. Various strategies of binding through thiol-ene and maleimide reactions, as well as approaches for preventing non-specific interaction between the enzyme and the electrode, have been applied and will be the main subject of our discussion.

References

- (1) Zhang L, Vilà N, Klein T, et al. *ACS Appl Mater Interfaces* **2016**, 8(27),17591-17598.
- (2) Meneghello M, Al-Lolage FA, Ma S, Ludwig R, Bartlett PN. *ChemElectroChem*. **2019**, 6(3), 700—713.
- (3) Al-Lolage FA, Bartlett PN, Gounel S, Staigre P, Mano N. *ACS Catal*. **2019**, 9(3), 2068-2078.
- (4) Hitaishi VP, Clément R, Quattrocchi L, et al. *J Am Chem Soc*. **2020**, 142(3), 1394-1405.

Using Scanning Electrochemical Microscopy (SECM) as the Sensor for Living Cells: Applications and Numerical Simulations

Dao Trinh^a, Nikita Thomas^b, Dhésmon Lima^b, Shubhneet Thind^b, Evan Booy^c, Sean McKenna^c, Sabine Kuss^b

^a *Laboratoire des Sciences de l'Ingénieur pour l'Environnement (LaSIE) UMR CNRS 7356, Université de La Rochelle, La Rochelle, France*

^b *Laboratory for Bioanalytics and Electrochemical Sensing, Department of Chemistry, University of Manitoba, Winnipeg, Manitoba, Canada*

^c *Department of Chemistry, University of Manitoba, Winnipeg, Manitoba, Canada*
Email: quang-dao.trinh@univ-lr.fr

Scanning electrochemical microscopy (SECM) is increasingly being used to monitor electrochemical processes at the interface of living cells and electrodes. This allows for the detection and quantification of biomarkers, furthering the understanding of various diseases. To date, successfully decoupling signals related to topography and reactivity remains a challenge. Moreover, such delicate samples require careful adjustment of experimental parameters, such as scan velocity (1,2).

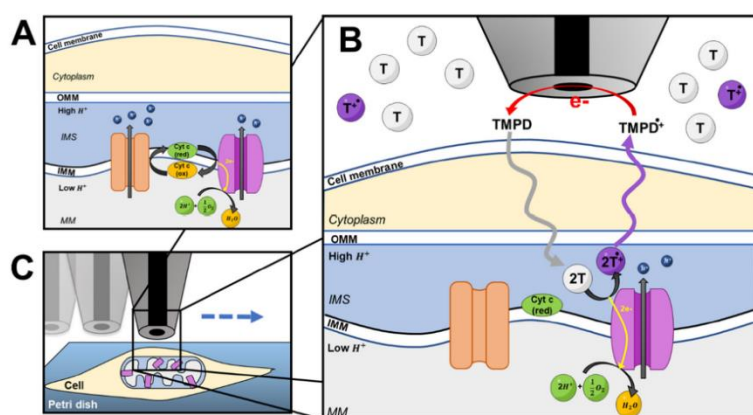


Figure 1 Schematic representation of cellular and electrochemical reactions (5)

The present study proposes a method to extract a substrate's kinetic rate through numerical modeling and experimental high-speed constant-height SECM imaging (3). This is particularly useful for determining substrates with unknown surface reaction kinetics and large topographical features. We also demonstrate that temperature control (4) is crucial during SECM imaging of living cells to obtain reliable

data. Two-dimensional line scans were conducted while scanning single Adenocarcinoma Cervical cancer (HeLa) cells.

Numerical modeling was carried out to evaluate the effect of temperature on the electrochemical current response of living cells, in order to compare the apparent heterogeneous rate constant (k_0) representing cellular reaction kinetics (5).

References

- (1) S Kuss, **D Trinh**, J Mauzeroll, *Analytical chemistry* 87 (2015), 8102-8106
- (2) S Kuss, **D Trinh**, L Danis, J Mauzeroll, *Analytical chemistry* 87 (2015), 8096-8101
- (3) N Thomas, V Singh, N Ahmed, **D Trinh**, S Kuss, *Biosensors and Bioelectronics* 217 (2022), 114658
- (4) N Thomas, D Lima, **D Trinh**, S Kuss, *Analytical Chemistry* 95 (2023), 17962-17967
- (5) S Thind, D Lima, E Booy, **D Trinh**, SA McKenna, S Kuss, *Proceedings of the National Academy of Sciences PNAS* 121 (2024), e2310288120