



HAL
open science

Déshydrogénases et laccases sur des surfaces redox : vers des applications en bioélectronique

Abdellaoui Sofiene

► **To cite this version:**

Abdellaoui Sofiene. Déshydrogénases et laccases sur des surfaces redox : vers des applications en bioélectronique. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université Claude Bernard - Lyon I, 2013. Français. NNT : 2013LYO10194 . tel-02614066

HAL Id: tel-02614066

<https://theses.hal.science/tel-02614066>

Submitted on 20 May 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

N° d'ordre : 1942013

Année 2013

Thèse de l'université de lyon

Délivrée par

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

ECOLE DOCTORALE INTERDISCIPLINAIRE SCIENCE SANTE

Pour l'obtention du

DIPLOME DE DOCTORAT

(arrêté du 7 août 2006)

Spécialité

BIOCHIMIE

Soutenue publiquement le 7 novembre 2013

Par Sofiene ABDELLAOUI

TITRE : Déshydrogénase et laccase sur des surfaces redox :
vers des applications en bioélectronique

Jury :

Dr. Thierry TRON	Rapporteur
Dr. Chantal GONDRAN	Rapporteur
Pr. Abdelkarim ABOUSALHAM	Examineur
Dr Bastien DOUMECHE	Encadrant
Pr Loic BLUM	Directeur de Thèse

Remerciements

Je remercie tout d'abord l'ensemble des membres du jury pour avoir accepté de juger mes travaux de thèse.

Je remercie tout particulièrement le professeur Loïc BLUM et le docteur Bastien DOUMECHE pour avoir cru en moi et sans qui cette thèse n'aurait jamais eu lieu. Je leur suis également reconnaissant pour leur temps consacré à la relecture de mon manuscrit et à leur grande rigueur scientifique.

Je ne remercierai jamais assez le docteur Bastien DOUMECHE pour son énorme travail d'encadrement ainsi que pour sa générosité en terme de transmission de savoir et de méthodologie. Merci pour ta patience et ton soutien !

Merci à toute l'équipe GEMBAS pour leur bonne humeur. Merci à Agnès DEGIULI qui a toujours été au petit soin pour que je puisse travailler dans les meilleures conditions au sein du laboratoire. Merci à Frédérique DEPIERRE qui a toujours été là pour régler avec le même sourire l'aspect administrative de ma thèse. Merci à Agnès GIRARD-EGROT pour ses précieux conseils. Merci à Christophe MARQUETTE pour son aide concernant la SPRi mais également pour les discussions scientifiques qui m'ont permis d'avancer dans mes travaux. Merci à Béatrice LECA-BOUVIER pour sa gaieté. Merci à Ophélie MANITI pour son aide concernant le PM-IRRAS. Merci à Guillaume OCTOBRE pour ses conseils en biologie moléculaire.

Je Remercie également le docteur Alexandre NOIRIEL pour sa collaboration sur la partie biologie moléculaire de la laccase CotA.

Merci à tous mes amis doctorants et stagiaires pour leurs soutiens moraux et scientifiques.

Enfin, je remercie toute ma famille et mes proches qui ont toujours crus en moi et qui mon constamment encouragés dans mes choix.

Sommaire

Abréviations	6
Introduction	8
Objectif de la Thèse	10
Synthèse bibliographique	12
I. Bioélectronique	13
I.1. Généralités	13
I.2. Historique	13
I.3. Transfert électronique.....	14
I.4. Généralité sur les oxydoréductases	15
I.5. Contraintes posées par les transferts d'électrons en bioélectronique	17
I.6. Transfert direct d'électrons (DET : <i>Direct Electron Transfer</i>)	19
I.6.1. Généralités	19
I.6.2. DET entre des métalloprotéines et des électrodes.....	20
I.6.2.1. Hémoprotéine	20
a) Hème	20
b) Cytochrome c (Cyt c)	21
c) Microperoxydase (MP)	23
d) Peroxydase	23
e) Cellobiose déshydrogénase (CDH)	24
I.6.2.2. Protéines cuivrées	25
I.6.2.2.1. Centre redox protéique cuivré	28
a) Centre cuivre de type 1 (T1).....	28
b) Centre cuivre de type 2 (T2).....	30
c) Centre cuivre de type 3 (T3).....	32
I.6.2.2.2. Oxydases multi-cuivrées (MCOs).....	34
a) Généralités sur les laccases	35
b) Potentiel redox du centre T1 chez les laccases	37
c) Deux exemples de Laccases.....	40
d) DET avec les laccases.....	42
I.7. Transfert d'électrons indirect (MET : <i>Mediated Electron Transfer</i>)	46

I.7.1.	Concept et avantages	46
I.7.2.	Les médiateurs	50
I.7.3.	Médiateur du NAD(P)H.....	53
I.7.4.	Autres médiateurs	54
I.8.	Applications	54
I.8.1.	Biocapteur électrochimique	54
I.8.2.	Biopile.....	54
I.8.2.1.	Biopile microbienne.....	55
I.8.2.2.	Biopile enzymatique (EBFC : <i>Enzymatic Biofuel Cell</i>)	56
I.8.2.2.1.	Exemples de EBFCs.....	57
a)	EBFC fonctionnant avec la glucose oxydase (GOx).....	57
b)	EBFC fonctionnant avec les déshydrogénases	62
c)	EBFC fonctionnant avec d'autres types d'enzymes.....	64
I.8.2.3.	Etat actuel des biopiles et perspectives	66
II.	Ingénierie enzymatique pour la bioélectronique	68
II.1.	Problématique	68
II.2.	Solutions apportées par l'ingénierie des protéines.....	68
II.2.1.	Approche de conception rationnelle : modifications ciblées.....	69
II.2.2.	Evolution dirigée.....	71
	Matériels et méthodes	76
I.	Produits et appareillages.....	77
I.1.	Produits chimiques	77
I.2.	Enzymes.....	77
I.3.	Electrodes	77
I.4.	Sérigraphie.....	78
I.5.	Appareillages	78
I.5.1.	Electrochimie	78
I.5.2.	Spectrométrie.....	78
I.5.3.	Mesures de profilométrie.....	79
I.5.4.	Mesures par imagerie de résonance plasmonique de surface (SPRi)	79
I.6.	Biologie moléculaire	79
I.6.1.	Produits et matériel.....	79
I.6.2.	Vecteur d'expression pET-28b.....	80
II.	Méthodes	81

II.1.	Bioanode à déshydrogénase	81
II.1.1.	Préparations et modifications des électrodes.....	81
a)	Préparations des électrodes.....	81
b)	Greffages de diazoniums.....	81
c)	Electropolymérisation	83
d)	Déprotection de l'acide boronique	83
e)	Immobilisation.....	83
II.1.2.	Mesures électrochimiques	83
a)	Caractérisation par voltammétrie cyclique.....	83
b)	Mesures d'oxydation du NADH par chrono-ampérométrie.....	85
c)	Courbe de puissance	85
d)	Mesures de spectroscopie d'impédance électrochimique (SIE)	85
II.1.3.	Mesures de réflectivité par SPRi	86
II.1.4.	Mesure de fluorescence.....	87
II.1.5.	Synthèse chimique	89
II.2.	Mesure sur plaque de criblage électrochimique (PCE)	90
II.2.1.	Préparation des PCE	90
a)	Description des PCE.....	90
b)	Sérigraphie.....	90
II.2.2.	Mesures IPA.....	91
II.2.3.	Calcul du rapport signal/bruit (S/N)	91
II.2.4.	Criblage du transfert indirect d'électrons (MET).....	92
a)	Diazotation et électro-greffage des phénazine.....	92
b)	Expression d'une banque de mutants de la FDH de <i>Candida boidinii</i>	92
c)	Activités des mutants FDH en solution.....	93
d)	Mesure IPA de l'oxydation du NADH.....	93
e)	Activités des mutants FDH sur PCE.....	93
II.2.5.	Mesure du transfert direct d'électros (DET) sur PCE avec la laccase de <i>Trametes versicolor</i> (TvLac)	94
a)	Purification de la TvLac.....	94
b)	Mesure du DET avec TvLac.....	94
c)	Mesures de l'activité de la TvLac en solution.....	95
II.3.	Protocole de criblage électrochimique pour l'évolution dirigée de la laccase CotA.....	95
II.3.1.	Expression de la laccase CotA en système bactérien	95

a)	Amplification du gène de CotA.....	95
b)	Expression de CotA sur plaque 96 puits	96
II.3.2.	Purification de CotA.....	96
a)	Lyse cellulaire	96
b)	Purification sur micro-colonne CM-Sepharose	97
II.3.3.	PCR.....	97
a)	Matrice	97
b)	Amorces.....	98
c)	PCR de basse fidélité	98
d)	PCR de contrôle	99
e)	Digestion et ligation.....	99
II.3.4.	Criblage sur boîte de petri.....	101
II.3.5.	Criblage sur PCE.....	101
Résultats et discussion : Assemblage moléculaire pour la mise au point d'une bioanode fonctionnant avec les déshydrogénases à NAD⁺.....		102
I.	Objectif	103
II.	Couche de Bleu de toluidine (TBO) pour l'oxydation électrochimique du NADH.....	104
a)	Diazotation et électro-greffage du TBO	104
b)	Electropolymérisation du TBO.....	105
c)	Electro-oxydation du NADH	107
III.	Etude de l'immobilisation du NAD ⁺ par une molécule « linker » : les acides phénylboroniques.....	111
III.1.	Etude en solution.....	112
III.2.	Etude en surface.....	115
a)	Modification des surfaces d'or	115
b)	Caractérisation par mesure de résonance plasmonique de surface (SPR)	117
c)	Caractérisation électrochimique	119
IV.	Stratégies d'immobilisation du NAD ⁺ sur une couche de polyTBO par un acide phénylboronique.....	123
IV.1.	Co-électropolymérisation entre le TBO et le 3AB	127
IV.2.	Greffage spontané de diazonium sur la couche de poly TBO	132
IV.3.	Couplage chimique entre le TBO et un acide phénylboronique	135
V.	Conclusion	141
Résultats et discussion : Mise au point d'un système de criblage électrochimique.....		144

I.	Objectif	145
II.	Système de mesure sur plaque de criblage électrochimique (PCE).....	145
II.1.	Description du système	145
II.2.	Exemple de mesure sur PCE	147
III.	Criblage du transfert indirect d'électrons (MET).....	148
III.1.	Criblage de médiateur pour le NADH.....	149
III.2.	Mesure d'une activité déshydrogénase par MET.....	152
III.3.	Criblage par MET d'une banque de mutants FDH.....	153
IV.	Criblage de transfert direct d'électron (DET)	156
IV.1.	Mesure d'un DET sur PCE avec la laccase de <i>Trametes versicolor</i> (TvLac).....	157
a)	Préparation de l'enzyme	157
b)	Faisabilité de la mesure du DET par mesures ampérométriques pulsées par intermittence (IPA)	158
c)	Optimisation des mesures de DET.....	159
d)	Mesure de DET en présence d'inhibiteur	163
e)	Mesures de DET en présence de molécules interférentes.....	165
IV.2.	Criblage électrochimique sur PCE appliqué à l'évolution dirigée de la laccase CotA .	169
a)	Criblage d'activité laccase sur boîte de Petri	170
b)	Expression et purification de CotA	173
-	Optimisation de l'expression de la laccase CotA sur plaque 96 puits	173
-	Optimisation de la purification.....	175
c)	Mesure du transfert direct d'électrons (DET) avec CotA sur plaque de criblage électrochimique (PCE)	177
d)	Evaluation au format 96 puits/colonnes	180
e)	Mutagenèse aléatoire : création d'une banque de mutants	181
V.	Conclusion	187
V.1.	Mesure sur plaque de criblage électrochimique (PCE)	187
V.2.	Protocole de criblage électrochimique pour l'évolution dirigée de la laccase CotA...	188
	Conclusion générale et perspectives	190
	Références	196

Annexes 214

Abréviations

3AB : acide 3-aminophénylboronique

AA : azure A

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

Ag/AgCl : électrode de référence argent/chlorure d'argent

ARS : alizarine red S

BCB : Bleu de Cresyl Brillant

BOD : bilirubine oxydase

Br⁺ : 4-diazonium-bromophényl

CDH : cellobiose déshydrogénase

CFU : Unité Formant une Colonie (*Colonie Forming Units*)

COx : cytochrome c oxydase

Cyt c : cytochrome c

DET : transfert direct d'électrons (*Direct Electron Transfer*)

EBFC : biopile enzymatique (*Enzymatic BioFuel Cell*)

ECV : Electrode de Carbone Vitreux

EDTA : acide éthylène diamine tétraacétique

ESI⁺ : ionisation par électronébuliseur (*ElectroSpray Ionisation*)

FAD : Flavine Adénine Dinucléotide

FDH : formiate déshydrogénase

FTIR : spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (*Fourier Transformed InfraRed*)

GalOD : galactose oxydase

GDH : glucose déshydrogénase

GOx : glucose oxydase

Hc : hémocyanine

HRP : peroxydase du raifort (*HorseRadish Peroxidase*)

IPA : ampérométrie pulsée par intermittence (*Intermittent Pulse Amperometry*)

IPTG : Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside

ITO : oxyde d'indium-étain (*Indium Tin Oxide*)

LB : *Lysogeny broth* ou milieu Luria-Bertani

LMCT : *ligand-to-metal charge-transfer*
MCO : oxydase multicuivrée (*Multi Copper Oxidase*)
MCS : site multiple de clonage (*Multi Clonage Site*)
MET : Transfert indirect d'électrons (*Mediated Electron transfer*)
MFC : biopile microbienne (*Microbial Fuel Cell*)
MP : microperoxydase
NAD⁺ : Nicotinamide adénine dinucléotide oxydée
NADH : Nicotinamide adénine dinucléotide réduit
NaIO₄ : périodate de sodium
NBT : nitrobleu de tétrazolium (*NitroBlue Tetrazolium*)
NHE : électrode normale à hydrogène (*Normal Hydrogen Electrode*)
Pb : Paire de Base
PCB : plaque de circuit imprimé (*Printed Circuit Board*)
PCE : Plaque de Criblage Electrochimique
PCR : réaction en chaîne par polymérase (*Polymerase Chain Reaction*)
PE : 4-aminophénylboronate de pinacol
PE⁺ : 4-diazonium-phénylboronate de pinacol
[PE⁺][BF₄⁻] : sel de 4-diazonium-phénylboronate de pinacol tétrafluoroborate
PES : Phenazine EthoSulphate
PQQ : PyrroloQuinoline Quinone
RN : Rouge Neutre
Rpm : Tour par minute (*revolution per minute*)
S/N : rapport signal-sur-bruit
SAM : monocouches auto-assemblées (*Self Assembled Monolayer*)
SIE : Spectroscopie d'Impédance Electrochimique
SPRi : Imagerie de résonance plasmonique de surface (*Surface Plasmon Resonance imaging*)
TBO : bleu de toluidine (*Toluidine Blue O*)
TBO⁺ : bleu de toluidine diazoté
Th : Thionine
TvLac : laccase de *Trametes versicolor*
Tyase : Tyrosinase
U : activité enzymatique (μmol de substrats transformés en 1 minute)
UV : UltraViolet
λ : longueur d'onde

Introduction

Dans les systèmes biologiques, les réactions de transfert d'électrons (réactions d'oxydoréduction) sont au cœur des processus énergétiques. Les chaînes de transporteurs d'électrons en particulier, dont la plus connue est la chaîne respiratoire impliquée dans le couplage chimio-osmotique de Mitchell, peuvent être vues comme des circuits électriques fournissant le travail nécessaire à la production d'énergie, en permettant entre autres, l'oxydation totale de substrats organiques. Très simplement, ces réactions de transfert sont basées sur deux demi-réactions d'oxydoréduction catalysées par des systèmes enzymatiques qui peuvent être vues comme l'anode et la cathode d'une pile.

Si la compréhension de ces processus *in vivo* est connue maintenant depuis plusieurs décennies, l'utilisation directe du travail produit pour des applications en bioélectronique reste problématique. Il est cependant possible de mimer ces systèmes biochimiques sous forme de systèmes hybrides bio-inspirés nécessitant la mise en place d'assemblages biomoléculaires pour favoriser le transfert électronique entre le centre actif d'une enzyme (i.e. de son cofacteur) et une surface (i.e. une électrode). Dans la plupart des cas il est nécessaire d'y introduire des médiateurs d'oxydoréduction ou plus récemment, des nanoparticules métalliques (Gorton et al. 2002; Yan et al. 2009). Cependant, la compréhension des réactions de transferts électroniques entre les différents partenaires de ces assemblages (substrat, enzyme, médiateur, surface) est nécessaire pour le développement de systèmes bioélectroniques tels que des biocapteurs ou des biopiles.

Dans les systèmes existant, les réactions à l'anode sont principalement catalysées par des déshydrogénases (enzymes à NAD^+ ou à FAD) et les réactions à la cathode par des oxydases (utilisant l'oxygène moléculaire ou le peroxyde d'hydrogène).

Objectif de la Thèse

L'objectif de mes travaux de thèse a été d'une part, d'élaborer une stratégie aisée et reproductible d'assemblage pour la mise au point d'une bioanode à déshydrogénase à NAD^+ fonctionnant avec un MET. Cette bioanode devra être capable de fonctionner avec un panel de déshydrogénases permettant l'oxydation totale de substrats tels que le méthanol. Ce système doit être développé sur des supports peu onéreux que sont les électrodes de carbone à partir d'un assemblage moléculaire entre du NAD^+ et le bleu de toluidine (TBO), un médiateur redox. Dans ce cadre, j'ai abordé de nouvelles stratégies ayant pour but d'immobiliser le cofacteur nicotinique avec le TBO par l'intermédiaire d'un acide phénylboronique.

D'autre part, j'ai eu pour projet de produire par une approche d'évolution dirigée de nouvelles laccases avec des activités bio-électrochimique accrues, ceci dans le but de développer une biocathode opérant avec un DET. Cependant, il a été nécessaire au préalable de développer une méthode de criblage électrochimique. Ainsi, la deuxième partie de mes travaux de thèse a été consacrée à l'étude d'un système électrochimique adapté pour le criblage des transferts directs (DET) et indirects (MET) d'électrons entre une enzyme et une électrode de carbone. Après avoir validé et appliqué ce système pour le criblage d'un MET et d'un DET, il a été utilisé pour la mise au point et l'optimisation d'un protocole de criblage dédié à l'évolution dirigée d'une laccase.

Ces approches d'assemblages biomoléculaires et d'évolution permettront d'obtenir des anodes et cathodes fonctionnelles qui seront idéalement assemblées dans un prototype de biopile

Synthèse bibliographique

I. Bioélectronique

I.1. Généralités

La bioélectronique est une discipline située à l'interface de la biochimie, de la chimie et de la physique. C'est l'étude de réactions électrochimiques entre un système biologique et un support conducteur ou semi-conducteur (électrode). L'association d'une électrode et d'une biomolécule peut être définie sous le terme de « bio- électrode ».

Dans le cadre de ma thèse, je me focaliserai sur les réactions entre une enzyme d'oxydoréduction (oxydoréductase) et une électrode où des transferts d'électrons permettront de transformer de l'énergie d'origine chimique en énergie électrique. Ces transferts sont générés à partir de réactions séquentielles d'oxydoréduction de natures différentes. Ces transferts d'électrons sont produits par l'association de réactions enzymatiques, chimiques et électrochimiques. Cette association peut être désignée sous le terme de réaction bio-électrochimique ou activité bio-électrochimique.

Les études portant sur des réactions bio-électrochimiques ont permis de développer des dispositifs bioélectroniques améliorant la qualité de vie. L'exemple le plus marquant est celui des biocapteurs électrochimiques appliqués à l'analyse et au diagnostic médical tel que la détermination de la glycémie (biocapteur à glucose) ou la mesure d'activités enzymatiques (biocapteur enzymatique) (Wang 2001). Par ailleurs, des applications dans le domaine des énergies renouvelables ont pu voir le jour avec les travaux portant sur le développement de biopiles (Bullen et al. 2006)

I.2. Historique

Le lien entre la biologie et l'électricité fut décrit pour la première fois il y a 200 ans par Luigi Galvani, physicien et médecin italien. En 1781, à partir d'une expérience accidentelle, il observa qu'en contact avec un objet métallique, les muscles d'une cuisse de grenouille étaient capables de se contracter. A partir de ces observations, il émit l'hypothèse que le vivant pouvait produire de l'énergie électrique et nomma ce phénomène « l'énergie animale » (Fig. 1). Ses travaux ont permis de révolutionner la compréhension de la physiologie du système nerveux. Cette théorie fut cependant controversée par Alessandro Volta, physicien italien du 18ème siècle. Sur la base de ce désaccord, ce dernier développa en 1800 la première pile électrique.

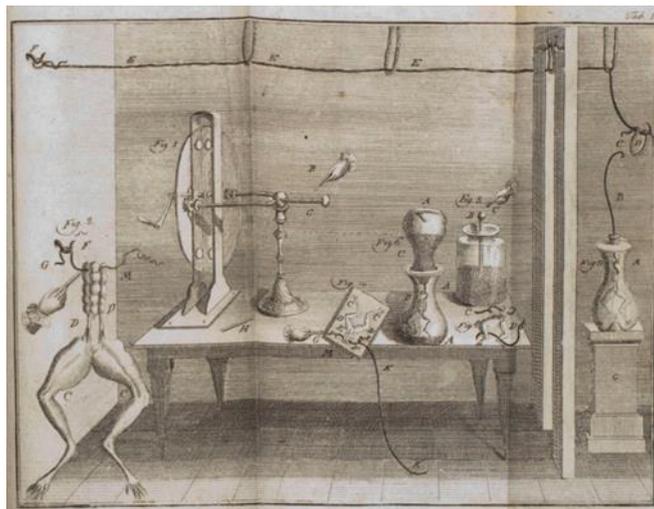


Fig. 1 : Gravure ancienne représentant une des expériences pratiquées par Galvani sur des grenouilles. (www.wikipedia.org/wiki/Luigi_Galvani).

En 1910, la théorie de L. Galvani sur « l'énergie animale » réémergea avec les travaux de Michael Cresse Potter, un botaniste anglais qui observa que des réactions d'oxydoréduction catalysées par des micro-organismes tels que *Escherichia coli* ou *Saccharomyces* pouvaient produire de l'énergie électrique. Ces travaux furent oubliés jusqu'à ce que Barnet Cohen développe en 1931 une biopile microbienne générant une tension de plus de 35 Volt. Par la suite, entre les années 1950 et 1960, des projets spatiaux américains menèrent au développement de biopiles microbiennes. Puis, dans les années 60, les premiers travaux concernant les biopiles fonctionnant avec des enzymes purifiées, ont vu le jour (Bullen et al. 2006). Ces travaux ont aussi conduit au développement des premiers biocapteurs ampérométriques.

I.3. Transfert électronique

En bioélectronique, le transfert d'électrons sur une bio-électrode impliquant une oxydoréductase, peut être réalisé selon deux modalités (Fig. 2) : le transfert direct d'électrons (**DET** : Direct Electron Transfer) entre le centre redox de l'enzyme et une électrode ; et le transfert indirect (**MET** : Mediated Electron Transfer), nécessitant un médiateur redox fonctionnant comme une navette électronique entre une enzyme et une électrode.

Une bio-électrode peut être définie sous le terme de **bioanode** ou de **biocathode** selon le sens du transfert d'électrons (Fig. 2). Dans le cas d'une bioanode, le cheminement des électrons est vectorisé de l'enzyme vers l'électrode et inversement pour une biocathode.

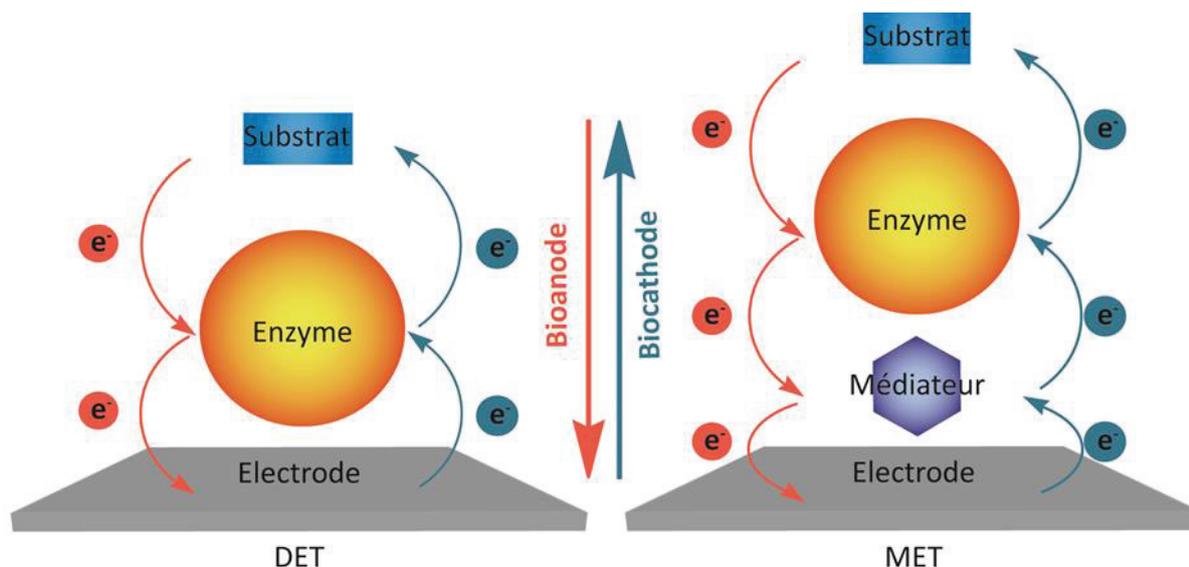


Fig. 2 : Schéma des transferts d'électrons directs (DET) ou indirects (MET) entre une enzyme et une électrode. Les flèches rouges et bleues indiquent respectivement le sens du transfert d'électrons dans le cas d'une bioanode et d'une biocathode.

I.4. Généralité sur les oxydoréductases

Les oxydoréductases sont des enzymes qui catalysent le transfert d'électrons d'un substrat appelé réducteur ou donneur d'électron (A), à un autre substrat appelé oxydant ou accepteur d'électrons (B). L'équation 1 illustre cette réaction



Ces enzymes, classées EC1 (*Enzyme Commission*), sont associées à des cofacteurs pouvant jouer à la fois le rôle de donneur et d'accepteur d'électrons. Parmi ces cofacteurs, on retrouvera des ions métalliques souvent sous forme complexée tels que le Fe^{2+} , le Cu^{2+} , le Mg^{2+} , le Mn^{2+} , mais aussi des molécules organiques telles que le FAD (Flavine adénine dinucléotide) et le NAD (nicotinamide adénine dinucléotide). Lorsque ces cofacteurs sont fortement liés à l'enzyme (par des liaisons covalentes par exemple), ils sont appelés groupements prosthétiques et co-substrat dans le cas contraires (cofacteur faiblement lié ou soluble).

Le NAD composé du couple redox $NAD^+/NADH$ est un co-substrat soluble présent dans toutes nos cellules à des concentrations millimolaires. Sa structure comprend deux nucléotides liés par une liaison anhydride d'acide entre deux phosphates: le 5'AMP (5'Adénosine MonoPhosphate), et le NMN (Nicotinamide MonoNucléotide) (Fig. 3). L'ensemble de cette structure représente une masse de 664 Da. Ce cofacteur est associé à de

nombreuses déshydrogénases avec lesquelles il est apte à donner et à accepter deux électrons et un proton. La synthèse du coenzyme NAD peut être réalisée à partir de la vitamine B3 (ou PP) ou à partir de tryptophane.

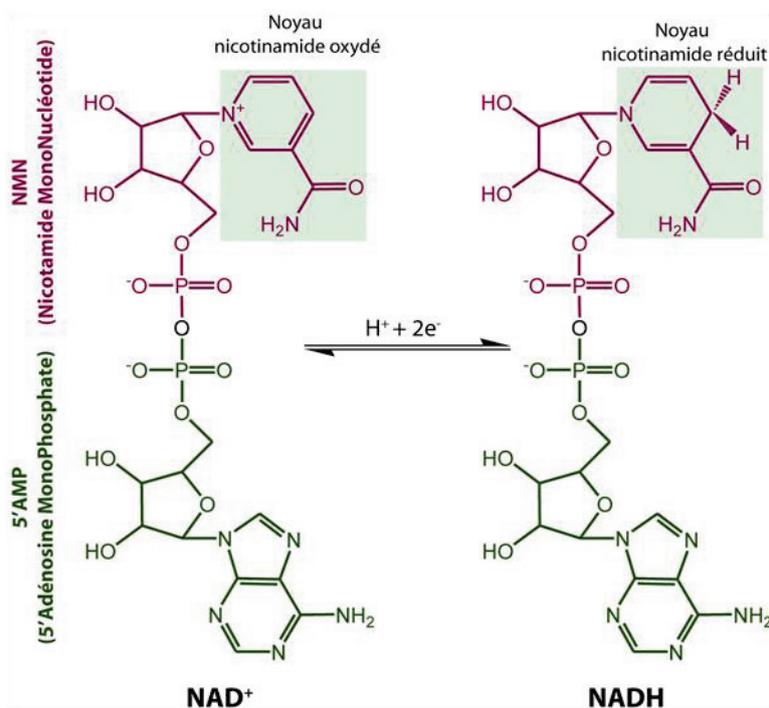


Fig. 3 : Structure du NAD^+ et du NADH

Le FAD est un cofacteur de type prosthétique retrouvé chez de nombreuses oxydases (ex : glucose oxydase, monoamine oxydase, xanthine oxydase) et déshydrogénase (ex : acyl CoA déshydrogénase, glycérol 3-phosphate déshydrogénase, cellobiose déshydrogénase) dont la masse est de 785 Da. Ce cofacteur, dont la forme oxydée est le FAD et la forme réduite le FADH_2 , permet le transfert de deux électrons et deux protons. Il est composé de deux nucléotides : le FMN (Flavine MonoNucléotide) et le 5'AMP (Fig. 4). Avec la glucose oxydase (GOx), il permet l'oxydation du β -D-glucose (D-glucopyrannose) en gluconolactone associée à la réduction du dioxygène en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (Fig. 5).

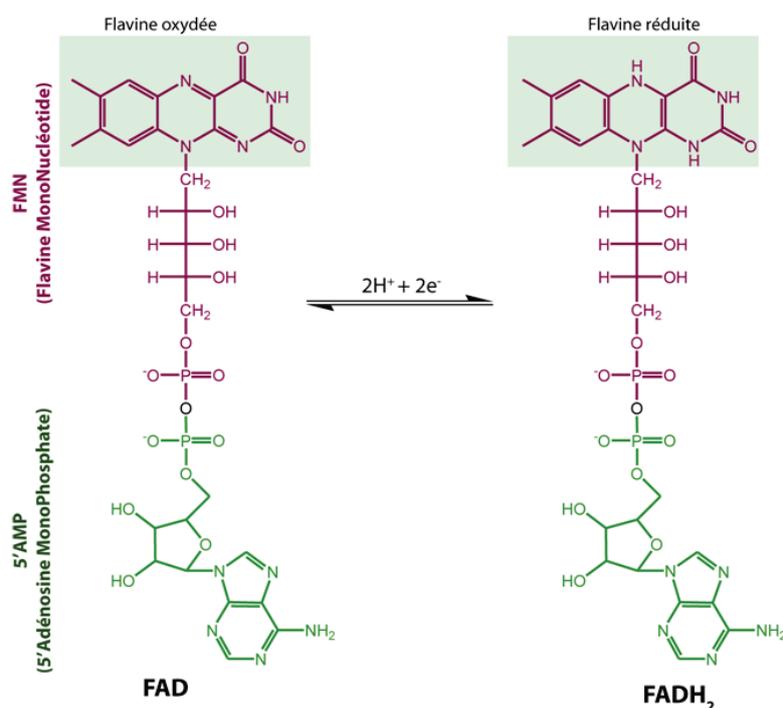


Fig. 4 : Structure du FAD et du FADH₂

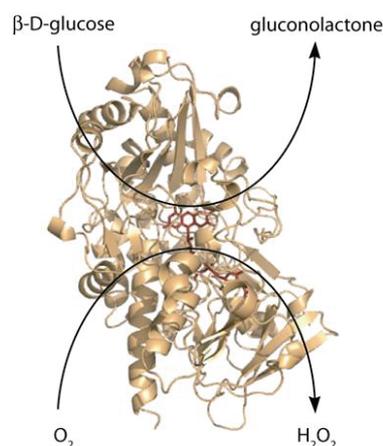


Fig. 5 : Réaction catalysée par la glucose oxydase. Structure de la GOx d'*Aspergillus niger* (FAD contenu dans la protéine est en rouge) (PDB : 1CF3).

I.5. Contraintes posées par les transferts d'électrons en bioélectronique

Afin d'étudier le transfert d'électrons entre une oxydoréductase et une électrode, il est nécessaire de tenir compte de certaines difficultés. La principale contrainte est liée à la localisation du centre redox au sein d'une enzyme. Pour créer un contact électronique avec la surface d'une électrode, il est nécessaire d'une part, que le site actif de la protéine soit assez exposé à la surface et d'autre part, que l'enzyme ait une bonne orientation. Par ailleurs, dans le cas des enzymes utilisant des cofacteurs solubles, il est important de prendre en compte les contraintes de diffusion. De plus, l'oxydation électrochimique de ces coenzymes est

généralement irréversible et peut conduire à la passivation de l'électrode. Sur la base de ces différentes observations, les oxydoréductases ont été classées en 3 groupes (Heller 1992).

Le premier groupe désigne les enzymes possédant des centres redox proches de leur surface ($< 13\text{\AA}$) (Fig. 6A). Elles sont capables avec une bonne orientation, d'établir un contact électronique direct avec une électrode. Des oxydases métalliques sont généralement retrouvées parmi ces enzymes (ex : peroxydases, laccases, bilirubine oxydase).

Le deuxième groupe est celui des oxydoréductases portant un centre redox enfoui dans leur structure ou associé à un cofacteur fortement lié (Fig. 6B). Par conséquent, il est difficile ou impossible d'établir un transfert direct d'électrons avec ce type d'enzyme. Le cas de la Glucose oxydase (GOx) est l'exemple le plus connu.

Le troisième groupe désigne les déshydrogénases associées à des cofacteurs nicotiniques (NAD(P)⁺/NAD(P)H) (Fig. 6C). Ces cofacteurs ne sont pas liés à l'enzyme, ils peuvent par conséquent, être utilisés comme médiateur redox entre le site actif de la protéine et une électrode. L'oxydation et la réduction électrochimique de ces cofacteurs nécessite néanmoins, l'application d'un surpotentiel (potentiel élevé) engendrant des réactions interférentes pouvant conduire à la passivation de la surface de l'électrode (Radoi et al. 2009).

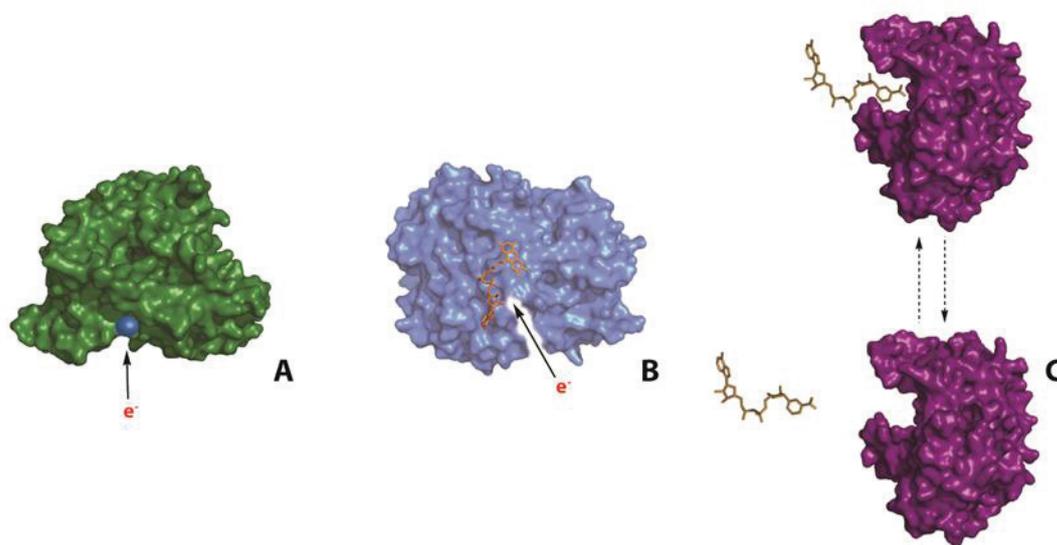


Fig. 6 : Schémas illustrant les différentes localisations des centres redox enzymatiques. (A) Enzyme avec un centre redox positionné à proximité de la surface de l'enzyme. (B) Enzyme possédant un centre redox enfouis dans sa structure et rattaché à un cofacteur fortement lié à la structure de l'enzyme). (C) Enzyme associée à un cofacteur nicotinique capable de diffuser entre le centre redox et l'extérieur de l'enzyme.

I.6. Transfert direct d'électrons (DET : *Direct Electron Transfer*)

I.6.1. Généralités

La plupart des biomolécules redox capables d'accomplir un DET avec une électrode, sont des protéines portant des groupements prosthétiques métalliques (métalloprotéine) tels que des hèmes, des complexes fer-soufres ou des complexes cuivrés (Gorton et al. 1999; Shleev et al. 2005).

Des transporteurs d'électrons sont retrouvés parmi ces métalloprotéines. Ces protéines sont dépourvues d'activités catalytiques intrinsèques et sont généralement localisées dans les chaînes de transport d'électrons au niveau des membranes biologiques. Les premiers travaux portant sur un DET ont été réalisés dans les années 70 sur une petite métalloprotéine héminique (ou hémoprotéine): le cytochrome c (Cyt c). Ces études ont été effectuées par deux équipes distinctes, l'une anglaise (Eddowes et al. 1977) et l'autre japonaise (Yeh et al. 1977). Ces deux équipes ont montré qu'il était possible d'obtenir des signaux d'oxydoréduction électrochimique sur des surfaces d'or modifiées par des bipyridines ou des surfaces d'oxyde d'indium dopées à l'étain (ITO : *Indium tin oxide*) à partir de Cyt c en solution. Plus tard, des études ont été réalisées de manière plus approfondie sur des DET avec d'autres métalloprotéines telles que l'azurine (protéine cuivrée) et la ferrédoxine (protéine fer-soufre) (Guo et al. 1991; Bond 1994).

Parallèlement, à la fin des années 70, des scientifiques russes ont démontré qu'il était aussi possible d'obtenir un DET conduisant à une activité enzymatique avec une laccase (enzyme cuivrée) ou une peroxydase héminique simplement adsorbée sur des électrodes de carbone (Tarasevich 1979; Tarasevich et al. 1979). Dans la nature, ces oxydases métalliques sont capables de catalyser l'oxydation de substrats organiques couplée soit à la réduction du dioxygène (laccase) soit à la réduction du peroxyde d'hydrogène (peroxydase). Nous verrons par la suite que l'application d'un DET impliquant ce type d'oxydase est retrouvée habituellement dans le développement de biocathodes.

Un DET efficace permettant de mesurer une activité oxydoréductase nécessite des vitesses de transfert d'électrons comprises entre 10 et 10^4 s^{-1} (Cracknell et al. 2008). Cette efficacité dépend de la distance entre le centre redox d'une protéine et sa surface. En étudiant l'implication du phénomène quantique appelé « effet tunnel » dans le transfert d'électrons entre protéines, l'équipe de Dutton a démontré que ce phénomène permet de générer des transferts entre des sites donneurs et accepteurs (intra ou intermoléculaires) situés à moins de

15 angström (Å) (Page et al. 1999). A partir de ce constat, il a été suggéré que cette distance ne doit pas être dépassée dans le cas d'un DET entre le centre redox d'une enzyme et la surface d'une électrode (Cracknell et al. 2008). Par ailleurs, pour obtenir un contact électronique, il est essentiel que l'enzyme ait une bonne orientation à la surface d'une électrode. Ainsi, de nombreuses stratégies d'assemblage supramoléculaire ont été élaborées dans le but d'immobiliser et d'orienter des protéines redox de manière contrôlée (Willner et al. 2009).

I.6.2. DET entre des métalloprotéines et des électrodes

J'exposerai dans cette partie des exemples de DET entre des électrodes et deux grands types de métalloprotéines : les hémoprotéines et les protéines cuivrées. Avant de présenter ces exemples, les hémoprotéines seront brièvement décrites d'un point de vue général. Concernant les protéines cuivrées, des descriptions structurales et fonctionnelles plus détaillées seront présentées avant chaque exemple.

I.6.2.1. Hémoprotéine

Une **hémoprotéine** est une protéine redox contenant un groupement prosthétique de nature héminique. Dans la protéine, ce complexe peut être lié covalamment ou non. Dans l'hème, le fer est capable d'être oxydé ou réduit lors de réactions inter ou intramoléculaires (Gorton et al. 1999). Cette propriété confère aux hémoprotéines la capacité, soit de catalyser des réactions d'oxydoréduction avec des substrats donneurs et accepteurs dans le cas d'enzymes (peroxydases, cellobiose déshydrogénase), soit de réaliser des transferts d'électrons au niveau des membranes biologiques (cytochromes). Certaines de ces protéines ont la capacité de transporter le dioxygène (hémoglobine, myoglobine, neuroglobine, cytoglobine et leghémoglobine). Après une description générale de l'hème, des exemples de DET impliquant quatre hémoprotéines (Cyt c ; la microperoxydase 11 (MP-11) ; la peroxydase du Raifort et la cellobioses déshydrogénases) seront décrits par la suite.

a) Hème

L'hème est un groupement prosthétique constitué d'un atome de fer (Fe) complexé par une porphyrine (Fig. 7). Les propriétés redox de l'atome de fer confèrent à l'hème la capacité de transporter et transférer des électrons à des potentiels variant selon son environnement dans la protéine. Ces potentiels sont compris entre -0,27 V (vs. NHE) pour la peroxydase du raifort

(HRP : *Horseradish peroxidase*) (Harbury 1957) et +0,26V (vs. NHE) pour le cytochrome c (Rodkey et al. 1950).

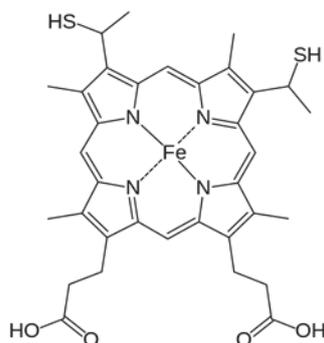


Fig. 7 : Structure de l'hème de type c retrouvé dans le cytochrome c

b) Cytochrome c (Cyt c)

Le cytochrome c (Cyt c) est une des hémoprotéines les plus connues pour son implication dans la chaîne respiratoire mitochondriale. Elle est l'une des premières protéines redox décrite en électrochimie et à l'heure actuelle, elle est toujours fortement étudiée (Gorton et al. 1999; Silveira et al. 2013). L'hème porté par cette protéine est situé à proximité de sa surface rendant possible un DET. Cependant, sa bonne orientation sur une électrode est primordiale pour obtenir un transfert d'électrons (Armstrong 1990; Guo et al. 1991). Le Cyt c présentant de nombreuses lysines sur une partie adjacente à l'hème a été adsorbé sur des électrodes fonctionnalisées par des groupements portant des charges négatives. Cela a permis d'orienter et d'adsorber la protéine par des liaisons électrostatiques facilitant ainsi un DET entre l'hème et l'électrode (Armstrong et al. 1988). Il a également été montré que la protéine pouvait être immobilisée par des liaisons hydrogène entre ses lysines et des monocouches de bipyridine (Fig. 8A). D'autres part, de nombreuses études ont été réalisées pour élucider le comportement du Cyt c associé à des électrodes de différentes natures (Or, carbone). L'usage des monocouches moléculaires auto-assemblées (SAM : *Self Assembled Monolayer*) sur des électrodes d'or a été décrit comme le moyen le plus efficace pour orienter et immobiliser le Cyt c (Clark et al. 1997; Chen et al. 2002; Ge et al. 2002). Des SAMs portant des groupements carboxyliques ont été utilisées pour fixer covalamment le Cyt c par des liaisons amides (Fig. 8B). Il est apparu que lorsque les chaînes carbonées de la SAM sont constituées de plus de 7 carbones, la vitesse de DET entre le Cyt c et la surface de l'électrode diminue exponentiellement avec la longueur des chaînes. Cela a permis de suggérer l'implication d'un effet tunnel au-delà d'une certaine distance (Canas et al. 2010). Néanmoins, si des thioalcanes de petites tailles sont utilisés, la vitesse de transfert d'électrons devient indépendante de

l'épaisseur des SAM et est d'environ 1000 s^{-1} . Plus récemment, des travaux ont montré que l'immobilisation covalente par des liaisons amides du Cyt c sur des SAM composées de thioalcènes de petites tailles (3-5 carbones) portant des carboxyles et des hydroxyles, a permis d'obtenir des vitesses de DET 5 fois plus importante (4700 s^{-1}) (Davis et al. 2008). Les auteurs de ces travaux ont montré que l'ajout de fonctions hydroxyles dans une SAM composée de fonctions carboxyliques améliore le contact électronique. A partir de ce constat, ils ont émis l'hypothèse que les hydroxyles pourraient perturber le réseau de liaisons hydrogène au sein de la SAM. Cette perturbation permettrait de rendre les carboxyles plus accessibles et ainsi favoriser l'immobilisation de Cyt c. Par ailleurs, co-immobilisé avec une cytochrome c oxydase (COx) ou une lactate déshydrogénase, le Cyt c a été utilisé comme médiateur électrochimique pour le développement d'une biocathode (Katz et al. 1999; Willner et al. 2009) (Fig. 8C).

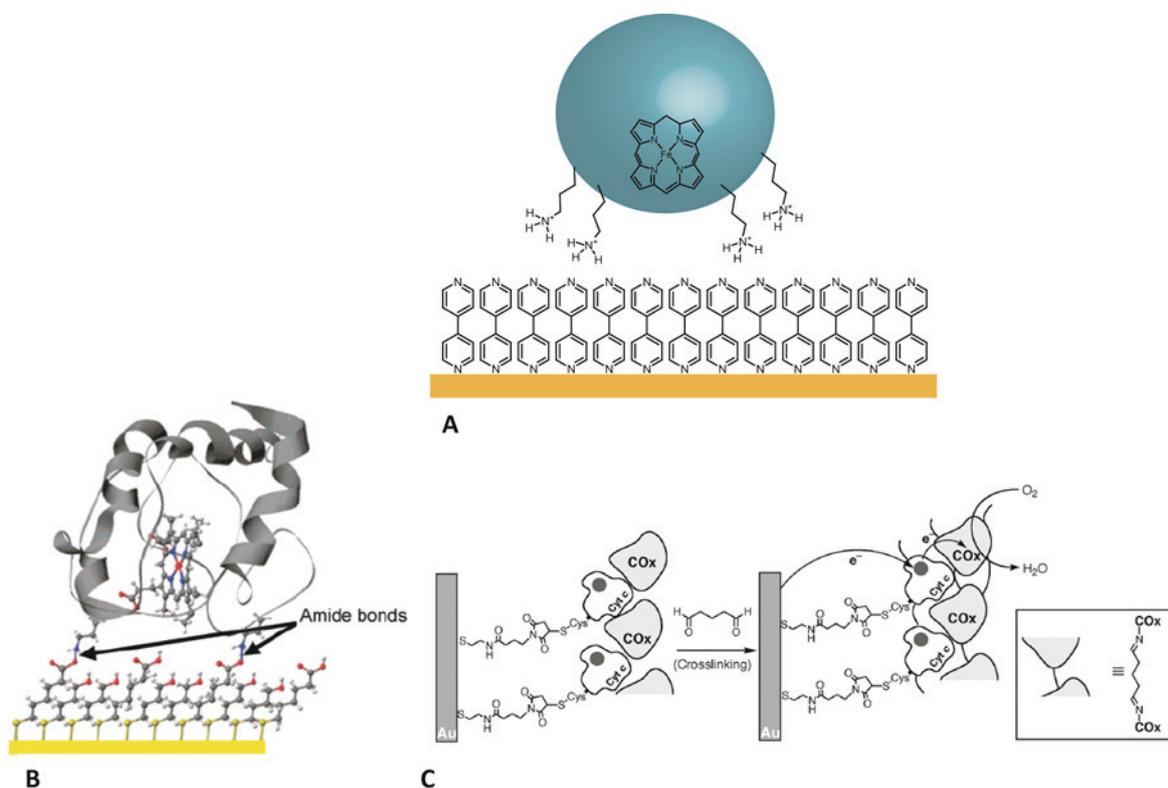


Fig. 8 : (A) Schéma de l'adsorption du Cyt c sur une électrode d'or fonctionnée par une monocouche de 4,4'-bipyridine. (B) Schéma de l'assemblage covalent du cytochrome c sur une électrode d'or fonctionnée par des SAM : l'immobilisation du Cyt c est réalisée par la formation de liaisons amides entre les fonctions carboxyles portées par les SAM et les fonctions amines portées par les lysines de la protéine (Davis et al. 2008). (C) Assemblage d'une biocathode fonctionnant avec la cytochrome c oxydase (COx,) composée de cytochrome c (Cyt c) immobilisé par une liaison thioether. Le réseau de COx a été formé par réticulation avec du glutaraldéhyde (Willner et al. 2009).

c) Microperoxydase (MP)

La microperoxydase (MP) est un oligopeptide produit à partir de la digestion protéolytique du cytochrome c. Pouvant être constitué de 6, 8, 9 ou 11 acides aminés, elle est capable de catalyser la réduction du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Dépourvue de surface, l'hème porté par la MP est exposé au solvant, ce qui en fait une bonne prétendante pour un DET. Il a cependant été montré que la vitesse d'un DET avec la MP-11 (composée de 11 acides aminés) immobilisée et orientée sur une surface d'or modifiée par des cystamines est très faible (de 12 à 20 s^{-1}) (Lotzbeyer et al. 1994; Narvaez et al. 1997) comparé aux vitesses obtenues avec l'hème adsorbé sur une électrode de graphite (4000 s^{-1}) (Brown et al. 1978). Une étude visant à comprendre ce phénomène paradoxal a montré que la vitesse de transfert d'électrons peut être plus importante sur l'or en utilisant d'autres méthodes d'immobilisation telles que l'adsorption sur des SAMs constituées de thioalcanes de petite taille (inférieur à cinq carbones) ou en utilisant le réactif de Lomant (dithiobis (succinimidyl propionate)) (Ruzgas et al. 1999). L'adsorption de la MP-11 sur une électrode d'or modifiée par une monocouche de thiobutane ou son immobilisation avec le réactif de Lomant conduit à des vitesses de DET comprises entre 1700 et 3600 s^{-1} . Ces vitesses ont été ensuite corrélées à la densité de MP-11 à la surface de ces électrodes. Ceci a permis de montrer que l'utilisation de cystamine induit la formation de multicouches de MP-11 (3 à 4 couches) favorisant le transfert d'électrons entre les protéines et non pas vers l'électrode (Ruzgas et al. 1999), tandis que l'utilisation de SAMs ou du réactif de Lomant permettent d'obtenir des monocouches de MP-11 favorisant le DET avec la surface de l'électrode (Ruzgas et al. 1999)

d) Peroxydase

Les peroxydases sont des oxydases héminiques qui utilisent des peroxydes comme accepteurs d'électrons. Elles sont utilisées dans de multiples applications analytiques (biocapteurs, immunologie, médicale). La peroxydase du raifort, (HRP : *Horseradish Peroxidase*) est la plus connue. Elle a été la première enzyme héminique décrite comme capable de réaliser un DET sur une électrode de carbone (Yaropolov et al. 1978). Gorton a présenté dans l'une de ses revues, de nombreuses études rapportant des DET entre la HRP et des électrodes de différentes natures (or, ITO, graphite) (Gorton et al. 1999). De surcroît, il a été montré que l'usage de nanotubes de carbone permet d'améliorer le contact électronique avec la HRP (Kum et al. 2007). Par ailleurs, d'autres travaux se focalisant sur l'orientation de la HRP ont été réalisés, notamment ceux basés sur la reconstitution d'une holoenzyme sur une

surface d'or modifiée par l'immobilisation d'hèmes (Fig. 9) (Zimmermann et al. 2000). Cet assemblage abouti néanmoins à un DET avec de faibles vitesses de transfert d'électrons (de l'ordre de 2 à 8 s⁻¹). L'année suivante, une étude menée par la même équipe a montré d'une part, que la déglycosylation de la HRP permet d'améliorer le contact électronique avec une électrode et d'autre part, que le DET entre l'enzyme et une électrode d'or dépend fortement de la concentration en proton (pH) à l'interface. Pour cela, une HRP recombinante déglycosylée portant une étiquette polyhistidine et une HRP sauvage ont été adsorbées sur des électrodes d'or. La présence d'une chaîne polyhistidine favorise l'adsorption de la HRP sur la surface d'or (Ferafontova et al. 2002). Avec la protéine recombinante des vitesses de l'ordre de 500 s⁻¹ sont obtenues à pH 6 au lieu de 12 s⁻¹ à des pH plus basiques (pH 8). La même tendance a pu être observée avec la HRP sauvage (glycosylée) mais avec des vitesses 40 fois plus petites (Presnova et al. 2000; Ferafontova et al. 2002).

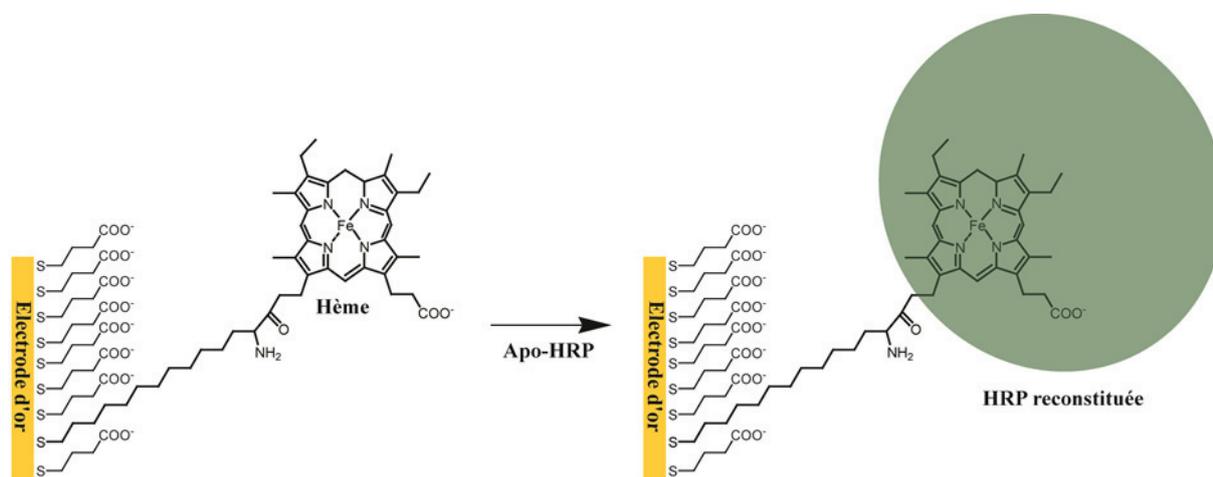


Fig. 9 : Reconstitution d'une Holo-HRP à la surface d'une électrode d'or à partir d'apo-HRP et d'hèmes immobilisés (schéma inspiré de(Zimmermann et al. 2000)).

e) Cellobiose déshydrogénase (CDH)

Les Cellobioses déshydrogénases (CDH) dont la plus étudiée est celle de *Phanerochaete chrysosporium*, une moisissure lignolitique, sont des oxydoréductases extracellulaires. Ces enzymes sont capables de catalyser l'oxydation de la cellobiose (D-glucosyl-β-(1→4)-D-glucose) et du lactose en présence d'accepteurs d'électrons tels que des quinones, le Cyt c ou parfois du dioxygène. Ces enzymes sont composées de deux grands domaines structuraux : « la tête » portant un cofacteur de type FAD et « la queue » contenant un hème (Igarashi et al. 1999). Des études sur les domaines des CDH ont montré qu'isolé, le domaine portant le FAD est capable d'oxyder ces sucres par le transfert de deux électrons vers un substrat accepteur (Fig. 10 voie 1) (Igarashi et al. 1999). Cependant, l'enzyme est aussi

capable de catalyser ces réactions par le transfert d'un électron du FAD vers la partie héminique (Fig. 10 voie 2). Dans ce cas, des partenaires tels que le Cyt c sont utilisés comme accepteurs d'électrons. A partir de ces observations, il a été montré qu'il est possible d'utiliser une électrode de graphite ou d'or comme accepteur final à travers un DET avec le domaine héminique (Fig. 10 voie 3) (Lindgren et al. 1999). De surcroît, des travaux sur l'immobilisation de CDH sur une surface d'or modifiée par des SAM ont montré l'importance de l'orientation de l'hème de la protéine pour l'obtention d'un DET (Lindgren et al. 2000). Plus récemment, une étude portant sur l'effet de la déglycosylation des CDH sur le DET a été réalisée par l'équipe de Gorton (Ortiz et al. 2012). Pour effectuer cette étude, deux CDH issues de champignons lignolitiques (*Phanerochaete chrysosporium* et *Ceriporiopsis subvermispora*) ont été utilisées et déglycosylées par traitement enzymatique puis adsorbées sur des électrodes de graphite. Des DET avec des signaux électrochimiques 2 fois plus importants ont été obtenus en absence de glycosylations. Il a été suggéré que cette augmentation est due à la diminution du rayon de Stoke (ou rayon hydrodynamique) des protéines déglycosylées permettant l'adsorption d'un plus grand nombre de CDH et l'amélioration du contact électronique entre l'hème et l'électrode.

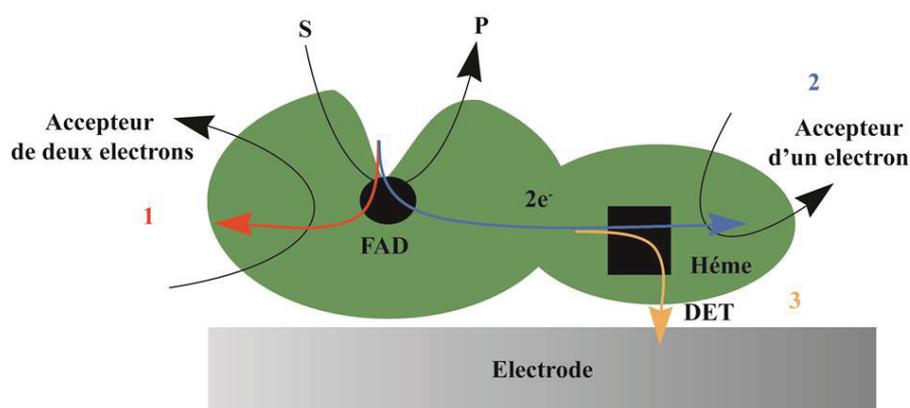


Fig. 10 : Représentation schématique des deux domaines de la cellobiose déshydrogénase sur une électrode avec les différentes voies de transferts d'électrons : en 1 la voie catalytique n'utilisant que le domaine FAD, en 2 la voie utilisant les deux domaines et en 3 la voie menant à un DET électrochimique.

I.6.2.2. Protéines cuivrées

Le cuivre, métal de transition, est un élément trace essentiel du vivant. Il est communément présent comme cofacteur dans les transferts d'électrons inter- (protéines transporteurs d'électrons) et intramoléculaire (oxydoréductase) ou dans la fixation et le transport de gaz diatomiques (Lewis et al. 2004). Dans les protéines, il est complexé par les chaînes latérales de certains acides aminés où il peut exister sous deux états redox différents :

Cu(II) (Cu^{2+}) et Cu(I) (Cu^+). La forme Cu(III) (Cu^{3+}) n'est pas présente dans les systèmes biologiques en raison du potentiel redox trop élevé du couple $\text{Cu}^{3+}/\text{Cu}^{2+}$ (2,4 V vs. NHE). Les états principalement retrouvés dans les complexes biologiques du cuivre sont donc ceux du couple $\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^+$ dont le potentiel redox est d'environ +300 mV (vs. NHE) en solution dans l'eau (Solomon et al. 2004). Dans les protéines, ce potentiel est modulé par les ligands et la géométrie du complexe ainsi que par l'environnement en acides aminés. Cette modulation permet d'atteindre des valeurs de potentiel pouvant excéder les 500 mV (Solomon et al. 2004).

Tableau 1 : Propriétés des centres cuivres retrouvées dans les protéines (inspiré de (Shleev et al. 2005)).

	Type 1	Type 2	Type 3	Type T2/T3
Nombre d'atomes de cuivre	Mononucléaire	Mononucléaire	Binucléaire	Trinucléaire
Fonctions	Transfert d'électrons	Activité catalytique et transfert d'électrons	Fixation et activation de l' O_2	Fixation et réduction de l' O_2
Exemples	Azurine, plastocyanine	Galactose oxydase, amine oxydase, cytochrome c oxydase	Tyrosinase, hémocyanine	Laccase, ascorbate oxydase, bilirubine oxydase
Etat du cuivre	Cu^{2+}	Cu^{2+}	Cu^+	$\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^+$
Type et nombre de ligant	3 ligands, 2 ligands axiaux: 1 S (Cys), 2 N (His), 1 (Ile), 1 (Leu, Phe, Met)	4 ou 5 ligands: 3N(His), Autre ligand ex: H_2O	7 ligands: 2 X 3N (His), OH ou O_2	T2: 3 ligand 2N(His), H_2O ; T3: 7 ligands, 7 ligands: 2 X 3N (His), OH ou O_2
Propriété spectroscopique d'absorbance	Absorption intense à 600 nm	Peu d'absorption	Absorption intense à 330 nm	Absorption intense à 330 nm

Les centres redox protéiques contenant un complexe cuivre (centre cuivre) ont été historiquement divisés en trois classes selon leurs propriétés spectroscopiques liées à la géométrie et à la structure électronique du complexe (Tableau 1) (Solomon et al. 1992; Kaim et al. 1996; Shleev et al. 2005) : le type I (T1) ou cuivre bleu, le type 2 (T2) ou cuivre normal, et le type 3 (T3) ou centre cuivre binucléaire (site contenant deux atomes de cuivre). Par ailleurs, de nouvelles classes ont été ajoutées incluant le centre cuivre trinucléaire T2/T3 (composé d'un centre de type 2 et d'un centre de type 3) (Messerschmidt et al. 1992), le cuivre A (Cu_A) (Iwata et al. 1995) et le cuivre B associé à l'hème A de la cytochrome c oxydase (COx) (Kaim et al. 1996) et le cuivre Z (Cu_Z) formant un centre binucléaire et retrouvé dans l'oxyde nitreux réductase (Nor : *nitrous oxide reductase*) (Farrar et al. 1991).

Les protéines cuivrées peuvent porter soit un (protéines mono-cuivrées ou *mononuclear copper proteins*) ou soit plusieurs centres cuivre (protéines multi-cuivrées ou *multi-copper proteins*). Ces centres cuivre confèrent aux protéines différentes fonctions qui peuvent être soit catalytiques (oxydase, oxygénase), soit impliquant de simples transferts d'électrons (Kaim et al. 1996). Les protéines multi-cuivrées sont généralement des oxydases (oxydase multi-cuivrée ou MCO : *MultiCopper Oxidase*) qui permettent le transfert d'électrons d'un substrat vers l'oxygène moléculaire par un transfert d'électrons intramoléculaire entre les centres redox.

Quatre groupes de protéines cuivrées seront décrits : un premier groupe portant un centre cuivre de type 1 (azurine, plastocyanine, amicyanine), un second groupe portant un centre de type 2 (galactose oxydase, cytochrome c oxydase, amine oxydase), des protéines portant un centre de type 3 (tyrosinase, hémocyanine) et enfin le groupe des MCO. Les centres T1, T2, T3 et T2/T3 seront décrit aux travers d'au moins un exemple protéique par type de centre (protéines encadrées en vert dans la Fig. 11)

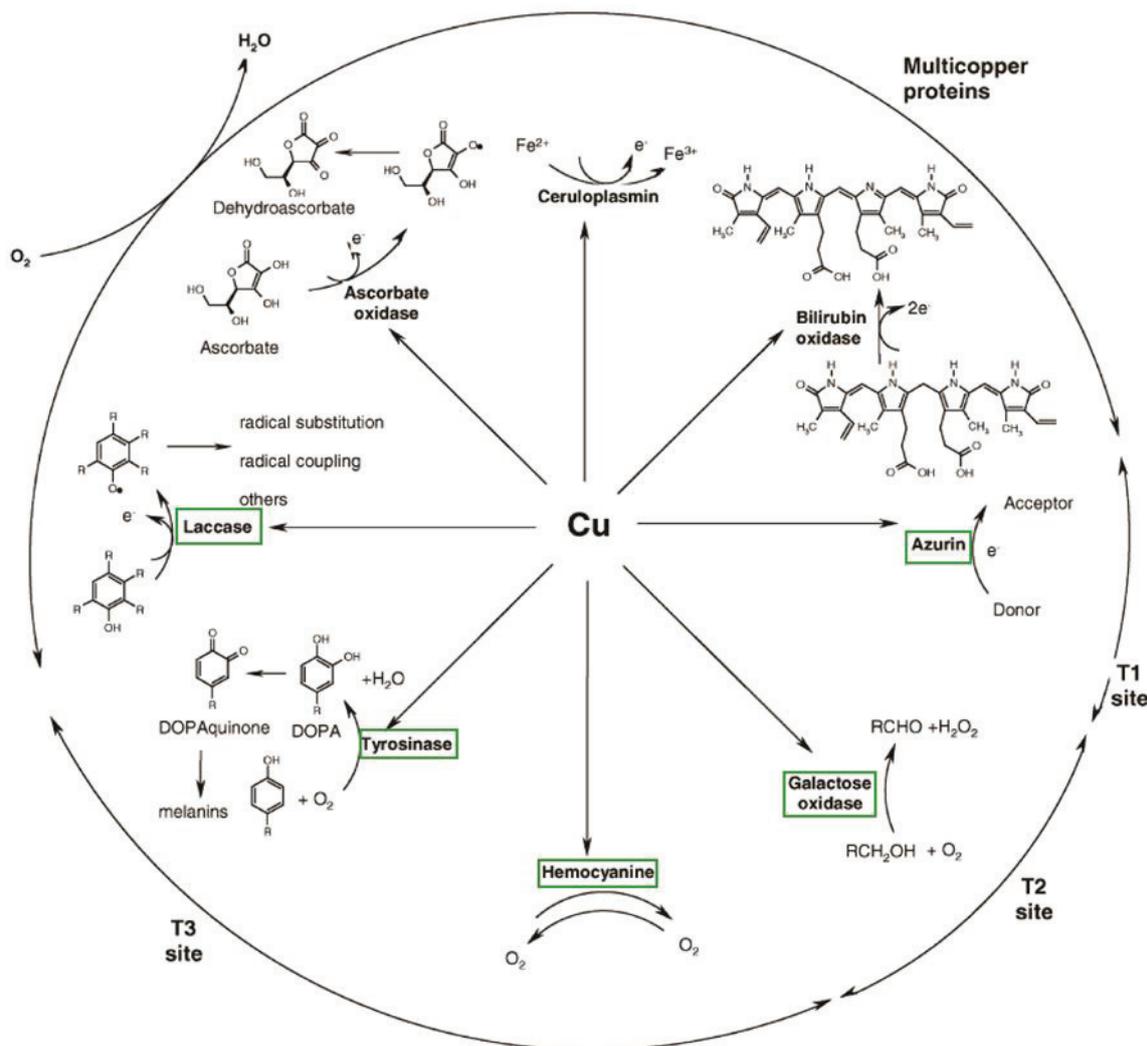


Fig. 11 : Exemples de fonctions métaboliques de quelques protéines cuivrées (Kaim et al. 1996). Les protéines encadrées en vert sont celles choisies pour illustrer les différents types de centres cuivres.

I.6.2.2.1. Centre redox protéique cuivré

a) Centre cuivre de type 1 (T1)

Le centre cuivre de type 1 (T1) aussi appelé *cupredoxin*, consiste en un atome de cuivre coordonné par deux histidines et une cystéine. Un ligand axial est aussi présent, pouvant différer selon la protéine (méthionine, isoleucine, leucine, phénylalanine). Ce dernier étant faiblement lié au cuivre, sont considérés comme non ou faiblement coordonnant. Le centre T1 présente une forte bande d'absorption dans le spectre visible à 600 nm avec un coefficient d'extinction molaire (ϵ) d'environ $5000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Cette propriété lui confère une intense coloration bleutée d'où le nom de « protéine bleue » (*blue copper protein*) donné aux protéines qui le portent. De plus, le centre T1 génère une très petite constante de couplage

caractéristique en résonance paramagnétique électronique (EPR : *Electron Paramagnetic Resonance*). Ces propriétés spectroscopiques sont liées au transfert de charges de l'atome de soufre du ligand cystéine vers l'atome de cuivre (*LMCT* : *ligand-to-metal charge transfer*) (Solomon et al. 1996). Ce centre cuivre est retrouvé dans les MCOs, leurs donnant la capacité d'oxyder de nombreux substrats (Kaim et al. 1996). Il est aussi présent chez certaines protéines mono-cuivrées impliquées dans des transferts d'électrons intermoléculaires comme l'azurine, la plastocyanine, la stielacyanine (Kaim et al. 1996).

Exemple de protéine cuivrée de type I : l'azurine

L'azurine est une petite protéine cuivrée de 9 à 14 kDa (Fig. 12) qui joue un rôle dans des transferts d'électrons intermoléculaires dans la chaîne respiratoire de certaine bactérie (Matsushita et al. 1999). Elle est l'une des plus petites protéines cuivrées dites « bleue », couleur induite par le centre cuivré T1 (Jeuken et al. 2000). Son complexe cuivre est coordonné par une cystéine, deux histidines et une méthionine et son potentiel redox est compris entre 270 et 320 mV (*vs.* NHE) selon son origine (Zhang et al. 2002; Pinho et al. 2004).

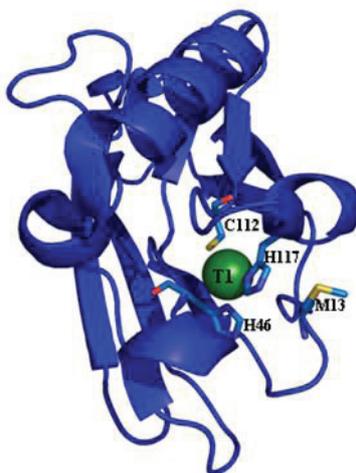


Fig. 12 : Structure cristallographique du monomère de l'azurine de *Pseudomonas aeruginosa* provenant d'un homoquadrimère (PDB : 4AZU)

Depuis le début des années 80, de nombreux travaux sur le DET entre une azurine et des électrodes de natures différentes ont été publiés (Armstrong et al. 1984; Jeuken et al. 2001; Jeuken et al. 2002). Cette petite protéine cuivrée de type 1 a son centre redox situé à 6 Å de sa surface au niveau d'une région hydrophobe. Cette zone riche en résidus apolaires offre la possibilité d'adsorber et d'orienter l'azurine sur des SAMs de thioalcane (Fig. 13A) (Chi et al. 2001; Jeuken et al. 2002). Des travaux menés par Armstrong et Jeuken ont montré

que des vitesses de DET proches de 500 s^{-1} sont obtenues à partir d'azurine adsorbée sur des SAM de thioalcane. Par ailleurs, l'immobilisation de cette protéine sur une électrode d'or portant une monocouche de stilbenyl thiolate (Fig. 13B) a permis de multiplier par trois la vitesse de DET (1600 s^{-1}) (Armstrong et al. 2004). Les groupements stylbène formant la monocouche favorise à la fois, le transfert d'électrons entre l'azurine et l'électrode, et l'orientation de la protéine. D'autres études portant sur le comportement de l'azurine immobilisée sur des surfaces d'or ont révélé que le pont disulfure (Cys3-Cys26) exposé à sa surface et à l'opposé de son centre redox est défavorable à son orientation (Fig. 13C) (Chi et al. 2000; Chi et al. 2001). En contact avec l'or ce pont disulfure est réduit libérant ainsi les groupements thiols des cystéines qui interagissent avec les atomes d'or.

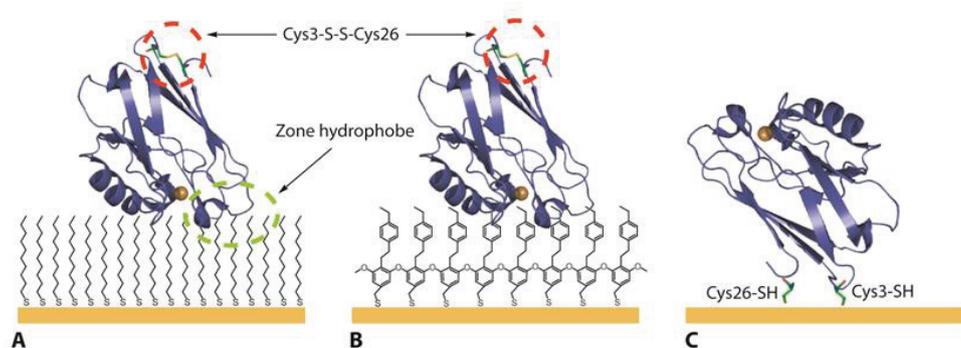


Fig. 13 : Représentations schématiques de l'immobilisation de l'azurine sur des surfaces d'or modifiées ou nues. (A) Immobilisation de l'azurine par interaction hydrophobe sur une monocouche de thioalcane. (B) Immobilisation de l'azurine sur une monocouche de stilbenyl thiolate (3,5-diéthoxy-4-[2-(4-éthylphényl)vinyl]-phényl). (C) Adsorption de l'azurine sur une surface d'or nue menant à l'interaction entre les thiols portés par les cystéines en position 3 et 26 et les atomes d'or de l'électrode.

b) Centre cuivre de type 2 (T2)

Le centre cuivre de type 2 (T2) est généralement coordonné par deux ligands histidines et un hydroxyle ou une molécule d'eau formant un complexe de géométrie plan carré (Kaim et al. 1996; Solomon et al. 1996). Il ne présente pas de propriété d'absorption particulière. Dans une enzyme mono-cuivrée telle que la galactose oxydase, certaines amines oxydases ou la cytochrome c oxydase, il est à la fois capable d'oxyder et de réduire des substrats. D'autre part, le centre T2 peut réduire le dioxygène en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (Kaim et al. 1996). Il est aussi retrouvé dans les MCOs associée à un centre T3 pour former le centre trinuécléaire T2/T3.

Exemple de protéine cuivrée de type II : la galactose oxydase (GalOD)

La galactose oxydase (D-galactose : *oxygen 6-oxydoreductase* EC 1.1.3.9) est une enzyme d'origine fongique de 68 kDa constituée de 3 domaines formés par des feuillettes β (Bilkova et al. 2002). Elle contient un site actif situé au niveau du domaine II proche de la surface (8 Å) qui permet à la fois de catalyser l'oxydation d'alcools tels que ceux portés par le D-galactose et la réduction du dioxygène en peroxyde d'hydrogène (Fig. 11) (Kaim et al. 1996). Cette enzyme tire sa particularité du fait qu'elle porte un centre cuivre T2 coordonné par deux tyrosines (Y495 et Y272) en plus de deux histidines (H496 et H581) et d'une molécule d'eau (Fig. 14). L'une des tyrosines (Y272) forme une liaison thioéther en position ortho avec une cystéine (C228) constituant un cofacteur cysteinyl-tyrosine (Fig. 14) capable de former de façon réversible, un radical phénoxy (CY^{\bullet}) (Firbank et al. 2001; Whittaker 2003). Le centre redox de cette enzyme est donc composé du couple CY^{\bullet}/CY ($E^{\circ'} = +410$ mV vs NHE pH 7) et Cu^{2+}/Cu^{+} ($E^{\circ'} = +159$ mV vs NHE pH 7). Ces couples permettent d'obtenir des enzymes sous trois états redox avec des signatures spectrales distinctes : oxydé ($Cu^{2+}-CY^{\bullet}$), semi-oxydé ($Cu^{2+}-CY$) et réduit ($Cu^{+}-CY$) (Wright et al. 2001).

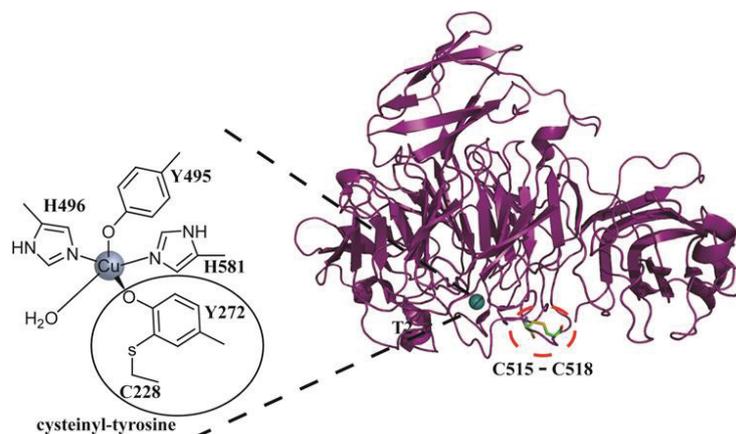


Fig. 14 : Coordination du cuivre au sein du centre T2 de la galactose oxydase. Le pont disulfure entre C515 et C518 est indiqué par un cercle en pointillé. Structure de la galactose oxydase de *Fursarium graminearum* (PDB : 2EIE)

En bioélectronique, la galactose oxydase (GalOD) est l'une des oxydases les plus énigmatiques. La pleine exposition de son centre redox à sa surface et son aisance à réaliser des échanges électroniques intermoléculaires laisserait penser que la GalOD est une bonne candidate pour des DET bio-électrochimiques (Shleev et al. 2005). Paradoxalement, le transfert d'électrons entre cette enzyme et une électrode est difficile à obtenir. En effet, il a été montré que l'interaction de la GalOD sur des surfaces chargées conduit à une adsorption

irréversible et à son inactivation (Petersen et al. 1999; Tkac et al. 2002; Shleev et al. 2005). Le DET entre la GalOD et une électrode étant difficile à mettre en évidence, une méthode indirecte a été appliquée (Tkac et al. 2002). Sachant que les différents états redox de l'enzyme ont des signatures spectrales distinctes, ce DET a été caractérisé par des mesures d'absorbances après réduction et réoxydation électrochimiques de la GalOD sur une surface d'or. Ces travaux ont montré que le DET avec cette enzyme est possible mais implique des réactions électrochimiques irréversibles. La réoxydation électrochimique de la GalOD nécessite un potentiel élevé ($\sim 0,84$ V vs. NHE) appliqué durant une longue durée (30-60 min). D'autre part, d'après Shleev, la difficulté d'effectuer un DET avec cette enzyme peut être liée à la présence d'un pont disulfure (C515-C518) situé en surface et à proximité du centre redox (~ 10 Å) (Fig. 14). Ce pont disulfure joue le rôle de donneur d'électron dans le mécanisme de passage de la forme oxydée (Cu^{2+} -CY*) à semi-oxydée (Cu^{2+} -CY) de l'enzyme (Wright et al. 2001; Wright et al. 2001). Par conséquent, l'interaction de ce pont disulfure sur certaines surfaces comme l'or, conduit à sa réduction et bloque l'enzyme sous sa forme oxydée (Shleev et al. 2005). Pour contourner ces problèmes d'interaction, des SAMs composées de thioalcanes portant différentes fonctions (amine, carboxyle, méthyle) ont été utilisées (Shleev et al. 2005). Cependant, il a été observé que lorsque l'enzyme est adsorbée sur des monocouches de thioalcanes de chaînes courtes (≤ 5 carbones), aucun DET n'est mesurable. Il a été suggéré que dans ce cas la surface d'or reste encore accessible et induit donc l'inactivation de la GalOD. L'usage des mêmes SAMs avec des chaînes plus longues (10 carbones) a été également un échec du fait de la distance entre l'enzyme et l'électrode.

c) Centre cuivre de type 3 (T3)

Le centre T3 ou centre binucléaire contient deux atomes de cuivre, chacun coordonné par trois histidines et ponté par un hydroxyle ou un ion superoxyde (O_2^-) (Fig. 15) (Shleev et al. 2005). Il est caractérisé par une bande d'absorption à 330 nm induit par un LMCT (*ligand-to-metal charge transfer*) avec un ligand hydroxyle (Solomon et al. 1996; Shin et al. 2000). Ce type de centre est présent dans les sites catalytiques des oxydases telles que les MCOs où il est associé à un centre T2, mais aussi dans les tyrosinases et l'hémocyanine (Kaim et al. 1996).

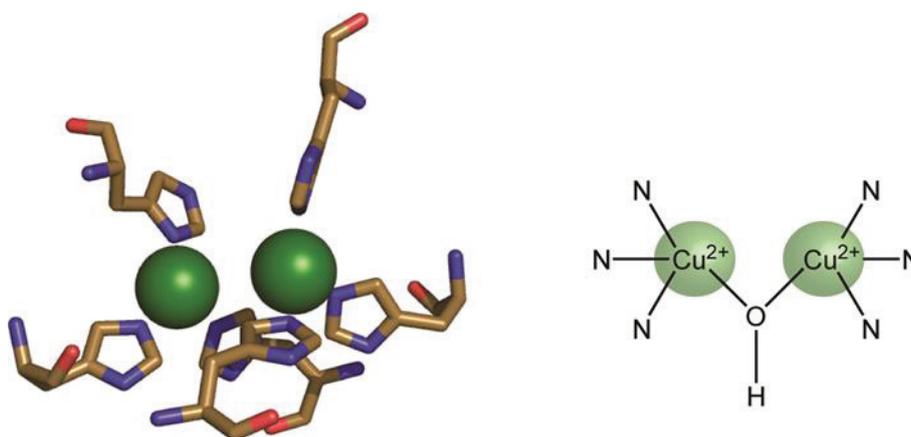


Fig. 15 : Centre cuivre de type 3, constitué de 2 atomes de cuivre (Cu^{2+}) coordonnés par 6 histidines et un hydroxyle.

Exemples de protéine cuivrée de type III :

- l'hémocyanine (Hc) :

L'hémocyanine (Hc) est une protéine cuivrée oligomérique qui joue le rôle de transporteur d'oxygène chez certaines espèces de mollusques et d'arthropodes (Chen et al. 2004). Cette protéine est capable de fixer de façon réversible le dioxygène au niveau de ses centres T3. Elle peut donc exister sous deux formes : une forme désoxy [$\text{Cu}^+ \text{Cu}^+$] et une forme oxy [$\text{Cu}^{2+} \text{O}_2^- \text{Cu}^{2+}$]. Le passage de la forme désoxy à la forme oxy est induit par le transfert d'électrons des atomes de cuivre du centre T3 à la molécule de dioxygène (Cuff et al. 1998).

- Tyrosinase (TYase) :

La tyrosinase (Tyr, *monophenol, dihydroxyphenylalanine* (DOPA) ; *dioxygene oxydoreductase*, EC 1.14.18.1) est une enzyme portant un centre cuivre T3 avec une double activité catalytique : monooxygénase et oxydase (Chen et al. 2004). Elle catalyse à la fois, l'ortho-hydroxylation de composés monophénoliques (activité crésolase), et l'oxydation de composés diphenoliques (activité catécholase). Son centre T3 a un potentiel compris entre +120 et +600 mV (vs. NHE) (Makino et al. 1974). Cette enzyme est aussi bien présente chez les organismes eucaryotes que chez les procaryotes. Elle peut être monomérique ou tétramérique selon l'organisme (Himmelwright et al. 1980; Klabunde et al. 1998). Chez les champignons et les vertébrés, elle participe à la synthèse de mélanine qui est un pigment dérivé de la tyrosine.

La première publication concernant un DET avec une Tyrosinase (TYase) est parue à la fin des années 90. Afin de mettre en évidence un DET entre cette enzyme et une électrode

de graphite, Yaropolov et ses collaborateurs ont comparé les signaux électrochimiques de la TYase native et d'une forme dépourvue de cuivre (forme apo) (Yaropolov et al. 1996). Un signal électrochimique lié à un DET a été obtenu avec la TYase native. Ces mesures ont permis de déterminer un potentiel redox de +500 mV (*vs.* NHE) proche de celui de l'enzyme en solution (+0,6 mV *vs.* NHE). De plus, ces mêmes auteurs ont montré qu'aucun DET n'est mesurable en présence d'acide benzoïque, un inhibiteur connu des TYase (Yaropolov et al. 1996). Plus récemment, dans un contexte d'assemblage de biopile, une équipe grenobloise a fabriqué une électrode produite par compression mécanique de nanotubes de carbone multifeuillet et de tyrosinase (Reuillard et al. 2012). A 0 V (*vs.* NHE). Cette électrode est capable de générer une densité de courant maximale de 0,55 mA.cm⁻² (Fig. 16).

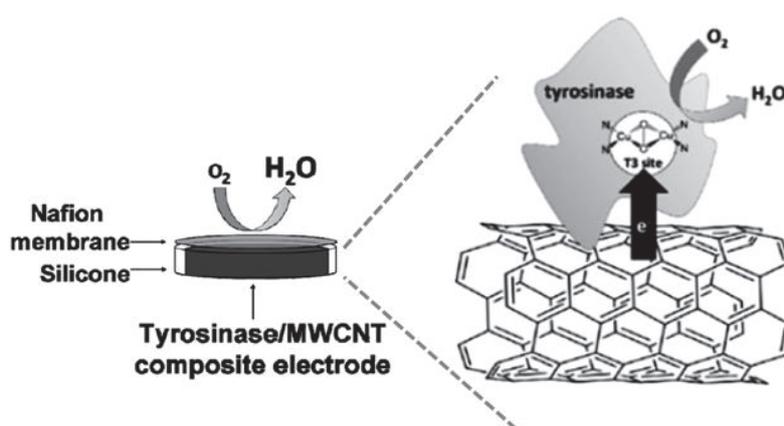


Fig. 16 : Représentation schématique de l'électrode constituée de nanotube de carbone multifeuillets (MWCNT : Multi-Walled Carbon NanoTubes) et de tyrosinase (Reuillard et al. 2012).

I.6.2.2.2. Oxydases multi-cuivrées (MCOs)

Les MCOs sont une famille de protéines cuivrées portant généralement au moins quatre atomes de cuivre dont trois proviennent d'un centre trinuécléaire T2/T3 et un d'un centre T1. Le centre T2/T3 est composé de trois atomes de cuivre formé par l'association d'un centre T2 et T3 (Fig. 17) (Messerschmidt et al. 1992). Ce centre a pour fonction de fixer et réduire l'oxygène moléculaire. Les MCOs sont aussi appelées protéine multi-cuivrées « bleues » du fait de la coloration bleutée induite par le centre T1 (Shleev et al. 2005). Ces protéines sont monomériques et sont constituées de trois domaines (1, 2, et 3) formés de brins β (Piontek et al. 2002). Les laccases, décrites pour la première fois en 1883 (Betancor et al. 2013), sont les enzymes emblématiques de cette famille. Les nombreux travaux portant sur leurs propriétés structuro-fonctionnelles (Ducros et al. 1998; Bertrand et al. 2002; Hakulinen et al. 2002; Piontek et al. 2002; Roberts et al. 2002; Claus 2004) en ont fait des modèles de

base pour l'étude des MCOs. Cependant, il existe dans cette famille des protéines plus complexes, pouvant être oligomériques et porter plus de quatre atomes de cuivre. L'ascorbate oxydase qui est une MCOs et dont la structure est bien connue peut être sous forme dimérique chez les végétaux (Avigliano et al. 1983). La ceruloplasmine (ou ferroxidase) est l'une des MCOs les plus complexes, sous forme monomérique, elle contient six atomes de cuivre, trois provenant d'un centre T2/T3 et trois autres constituant trois centres T1 (Zaitseva et al. 1996).

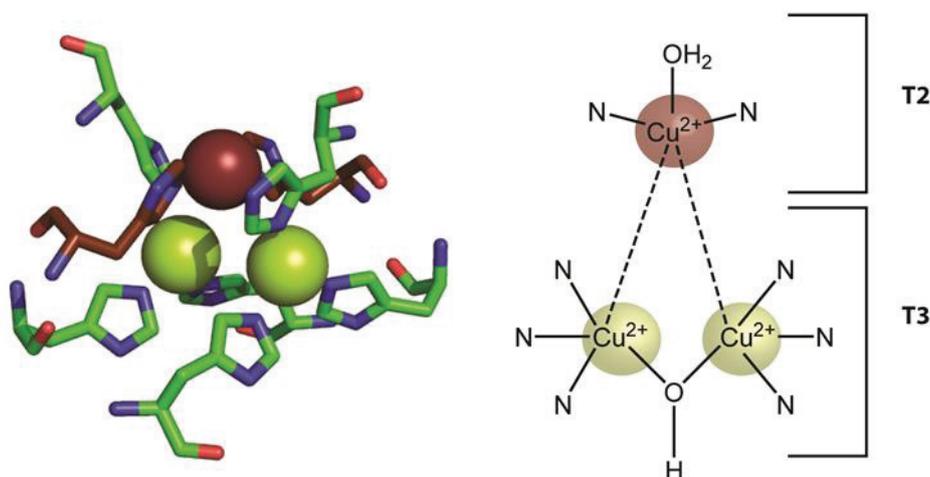


Fig. 17 : Centre cuivre trinuécléaire de type T2/T3.

a) Généralités sur les laccases

Les laccases (benzenediol : oxygène oxydoreductase, EC 1.10.3.2) sont des MCOs d'environ 70 kDa qui portent trois centres cuivres (T1, T2 et T3) dont un « cluster » trinuécléaire (T2/T3) et un centre T1. Elles catalysent l'oxydation d'une grande variété de substrats phénoliques (Fig. 11) (ortho ou para diphénoles, aminophénol, polyphénol) et de bien d'autres molécules organiques (polyamines, lignine, aryl diamines) (Yaropolov et al. 1994). Cette oxydation est réalisée par le centre cuivre T1 par simple contact électronique avec le substrat auquel un électron est arraché. Le mécanisme catalytique implique le transfert intramoléculaire de quatre électrons du centre T1 au centre T2/T3 aboutissant à la réduction d'une molécule de dioxygène en deux molécules d'eau (Solomon et al. 1996).

En plus de leur large spécificité de substrat, des donneurs d'électrons non naturels (ex : l'acide 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique), et le 2,6-diméthoxyphénol) ont été utilisés comme médiateurs redox jouant le rôle d'intermédiaire entre l'enzyme et une molécule cible ne pouvant être directement oxydée telle que la lignine (Call et al. 1997). Certaines laccases sont thermostables et peuvent fonctionner à des températures avoisinant les

70°C (Martins et al. 2002). Les laccases sont des biocatalyseurs ayant d'énormes potentiels d'applications (Riva 2006; Betancor et al. 2013) : synthèse organique, bioremédiation, agroalimentaire, industries du papier et du textile, fabrication de colorant, pharmaceutique, production d'énergie. Ces applications associées aux laccases, ont permis durant ces 20 dernières années de stimuler la recherche fondamentale et biotechnologique sur ce type d'enzymes (Fig. 18) (Rodgers et al. 2010).

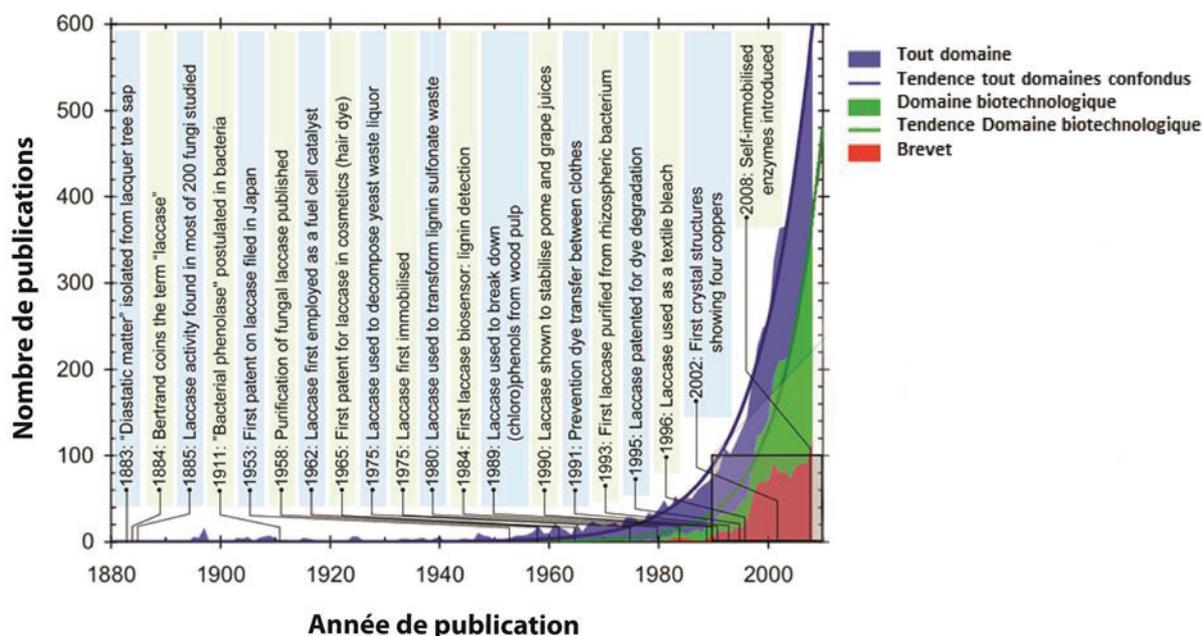


Fig. 18 : Croissance des études portant sur les laccases du début du XX^{ème} siècle au début du XXI^{ème} siècle (Rodgers et al. 2010).

Les laccases sont retrouvées chez les champignons, les végétaux, les bactéries mais aussi chez les insectes (Givaudan et al. 1993). La première laccase découverte provenant de l'« arbre à laque » (*Rhus vernicifera* ou Sumac au vernis) fut décrite en 1883 par Yoshida. Chez les végétaux, elles sont généralement impliquées dans la formation de la paroi cellulaire, tandis que chez les champignons, les laccases contribuent au système de défense de l'organisme par la dégradation de toxines ou de pathogènes mais elles peuvent aussi jouer un rôle dans la dégradation de la lignine (McGuirl et al. 1999). Ces enzymes présentent une grande diversité dans leurs structures primaires et leurs fonctions biochimiques (Shleev et al. 2005). Il est possible de retrouver dans le même organisme deux laccases de fonctions biochimiques différentes mais de séquences en acides aminés similaires, mais aussi des isoformes de même fonction mais de structures primaires différentes (Shin et al. 2000). De nombreuses structures cristallographiques de laccases d'origine fongique et bactérienne ont été résolues ces 15 dernières années (*Coprinus cinereus* (Ducros et al. 1998), *Trametes*

versicolor (Antorini et al. 2002; Piontek et al. 2002), *Pycnoporus cinnabarinus* (Antorini et al. 2002), *Melanocarpus albomyces* (Hakulinen et al. 2002), *Bacillus subtilis* (Enguita et al. 2003)). Les différentes structures présentant de fortes homologues de superposition, une structure tertiaire de base a été définie. Ces enzymes présentent généralement une structure monomérique composée de trois domaines, chacun constitué de feuillets β . Cependant il existe des exceptions, dont celle de la « *small laccase* » (Fig. 19), retrouvée chez *Streptomyces coelicolor* (Gupta et al. 2012), qui forme un homotrimère dont chaque monomère est composé de deux domaines, au lieu de trois habituellement, contenant les quatre atomes de cuivre caractéristiques des laccases. Les différences structurales entre les laccases monomériques se situent au niveau de l'organisation des boucles situées entre les brins β et la conformation des sites de fixation de substrats. Par ailleurs, le mécanisme catalytique, suivant un modèle théorique émit par Solomon, serait un mécanisme ping-pong (Solomon et al. 1996).

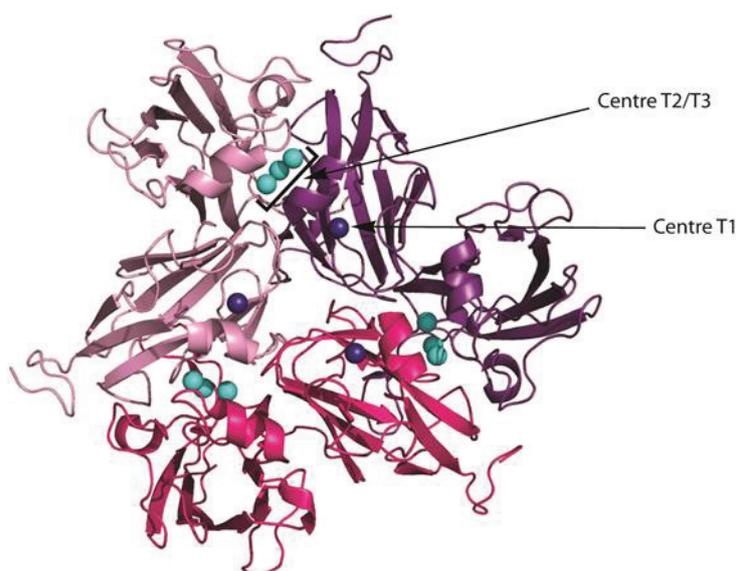


Fig. 19 : Structure homotrimérique de la « *small laccase* » de *Streptomyces coelicolor* (PDB : 3CG8).

b) Potentiel redox du centre T1 chez les laccases

Les laccases diffèrent entre elles par le potentiel redox de leur centre T1 qui est compris entre +430 mV et +780 mV (vs. NHE) (Xu et al. 1996; Koroleva et al. 2001; Durao et al. 2006). Ces valeurs de potentiels ont pu être déterminées par des mesures potentiométriques à l'aide de médiateurs redox. Par ailleurs, sachant que le centre T1 est le premier accepteur d'électrons de l'enzyme, plus le potentiel redox du centre T1 est élevé, plus l'efficacité catalytique (k_{cat}/K_M) de la réduction de l'oxygène est importante (Xu et al. 1996;

Xu et al. 2000). Cette relation suggère que le transfert mono-électronique du substrat au site T1 est l'étape limitante de la réaction catalytique des laccases (Xu et al. 2000; Mayer et al. 2002; Rodgers et al. 2010; Betancor et al. 2013). Les laccases ont pu être classées d'un point de vue électrochimique en trois groupes selon leur potentiel (Christenson et al. 2004; Shleev et al. 2005). Les laccases de faible potentiel (de +430 à +490 mV vs. NHE) sont généralement retrouvées chez les végétaux tel que *Rhus vernicifira*. Le groupe de potentiel moyen (+470 - +710 mV vs. NHE) inclus certaines laccases d'origine fongique (*Myceliophthora thermophila* (Xu et al. 1996), *basidiomycetes C30* (Klonowska et al. 2002) ou *Coprinus cinereus* (Schneider et al. 1999)) et bactériennes (laccase CotA de *Bacillus subtilis* (Duraio et al. 2006)). Finalement, parmi les laccases connues portant un centre T1 de potentiel élevé (> +710 mV vs. NHE), on retrouve celles présentes chez les champignons tels que *Trametes versicolor*, *T. hirsuta*, et *T. villosa* (Xu et al. 1996; Koroleva et al. 2001). Les grandes similarités structurales rencontrées dans les sites portant un centre T1 et la large gamme de potentiels de ces complexes sous-entend que les variations de potentiel impliquent des interactions secondaires à la coordination du cuivre (Marshall et al. 2009). Le potentiel du centre T1 est modulé par la nature de ses ligands et des résidus environnants formant le site actif. Le cuivre T1 étant toujours coordonné par deux histidines et une cystéine, son potentiel est en partie modulé par la nature du quatrième ligand axial (méthionine, isoleucine, leucine, phénylalanine). Il a été suggéré que plus l'hydrophobicité de ce ligand est important, plus le potentiel est élevé (Marshall et al. 2009) (Tableau 2) : Les laccases de faible potentiel (de +430 à +490 mV vs. NHE) portent une méthionine, celles de potentiel moyen (de +470 à +710 mV vs. NHE), une leucine et celles de potentiel élevé (de +730 à +780 mV vs. NHE), une phénylalanine. De plus, ces observations peuvent s'appliquer aux autres MCOs (Shleev et al. 2005).

Synthèse bibliographique

Tableau 2 : Tableau de comparaison des potentiels du centre T1 et des ligands (En gras) de laccases provenant de différents organismes. Classe des potentiels élevés (Bleu), moyens (rouge), faibles (vert) (Shleev et al. 2005).

Organisme	Séquence	Potentiel du Centre T1 (mV)
<i>Trametes hirsuta</i>	H ...H C HIDF H LEAG F	+780
<i>Trametes versicolor</i>	H ...H C HIDF H LEAG F	+780
<i>Trametes villosa</i>	H ...H C HIDF H LEAG F	+780
<i>Basidiomycetes C30 I</i>	H ...H C HIDF H LEAG F	+730
<i>Rhizoctonia solani</i>	H ...H C HIDF H LEAG L	+710
<i>Coprinus cinereus</i>	H ...H C HIDF H LMNG L	+550
<i>Scytalidium thermophilum</i>	H ...H C HIDF H VSGG L	+510
<i>Myceliophthora thermophila</i>	H ...H C HIDF H VSGG L	+470
<i>Bacillus subtilis</i>	H ...H C HILE H EDYD M	+455
<i>Rhus vernicifera</i>	H ...H C HFER H TTEG M	+430

En ce qui concerne l'influence des résidus environnants le centre T1, les liaisons hydrogène entre des acides aminés à proximité du centre ont un effet sur la distance des liaisons de coordinations du complexe, ainsi que sur la densité électronique du cuivre (Piontek et al. 2002; Marshall et al. 2009). Pour les laccases de potentiel élevé, la distance entre un des deux ligands histidine et le cuivre est plus importante que celle observée chez les laccases de potentiel moyen. Dans le cas de la laccase de *T. versicolor* qui porte un centre T1 de potentiel élevé (+780 mV vs. NHE), la liaison hydrogène entre la serine 113 et le glutamate 460 induit l'augmentation de la distance entre le ligand histidine 458 et le cuivre (Fig. 20) (Piontek et al. 2002). D'autres laccases de potentiel moyen telles que celle de *Coprinus cinereus*, ne présentent pas ce type de liaison hydrogène due à l'absence, soit du résidu sérine, soit du glutamate. Cependant, il existe des exceptions qui ne coïncident pas avec ces observations dont l'exemple le plus pertinent est celui des deux isoformes de la laccase de *Basidiomycète C30* (LcI et LcII) (Klonowska et al. 2002). Malgré la présence d'une phénylalanine comme ligand axial et des résidus sérine et glutamate, la LcII porte un centre T1 de potentiel moyen

(+560 mV vs. NHE) et la LcI, laccase de potentiel élevé, possède les caractéristiques structurales d'une laccase de potentiel moyen. Les variations de potentiel excédant les 200 mV ne peuvent pas seulement s'expliquer par des variations structurales isolées. En revanche, il a été montré que ces effets (nature des ligands, liaisons hydrogène, densité électronique) qui influent sur le potentiel redox du centre T1 peuvent être additifs (Marshall et al. 2009).

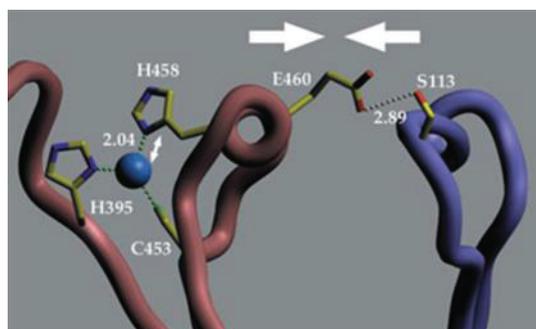


Fig. 20 : Schéma illustrant la liaison hydrogène entre les résidus E460 et S113 induisant l'élongation de la liaison entre le ligand histidine 458 et l'atome de cuivre du centre T1 de la laccase de *Trametes versicolor* (Piontek et al. 2002).

c) Deux exemples de Laccases

Laccase de *Trametes versicolor* (TvLac) :

Piontek et ses collaborateurs ont résolu la structure protéique de la laccase de *T. versicolor* (champignon lignivore) (TvLac) sous sa forme active et glycosylée (Piontek et al. 2002). La structure de TvLac a été par la suite utilisée comme modèle pour les laccases fongiques monomériques et d'autres MCOs tel que la bilirubine oxydase. La TvLac, de dimension $65 \times 55 \times 45 \text{ \AA}^3$, se présente comme une protéine monomérique de 70 kDa ayant un potentiel de +780 mV (vs. NHE) et constituée de trois domaines (domaine 1, 2 et 3) formés de brins β retrouvés dans la plupart des MCOs (Fig. 21). Elle possède en moyenne sept groupements N-acetyl-glucosamine portés par cinq sites de N-glycosylation distincts. Le domaine 1 est constitué de deux feuillets β contenant chacun quatre brins β reliés par des hélices 3_{10} . Le domaine 2 possède un feuillet formé de six brins β et un feuillet de cinq brins β ainsi que trois hélices 3_{10} . Finalement, le domaine 3 est formé de deux feuillets de cinq brins β et un de deux brins β qui forment avec une hélice α et une boucle, la cavité dans laquelle le centre T1 est localisé. La surface de la protéine présente une prédominance en charge négative (point isoélectrique = 3,5). Le centre T1, coordonné par deux histidines, une cystéine et une phénylalanine est situé à 7 Å de la surface proche d'une cavité chargée négativement. Ce centre cuivre est situé à une distance d'environ 13 Å du centre T2/T3 dont les atomes de

cuivre sont coordonnés par des résidus provenant à la fois du domaine 1 et 3. Le centre T2/T3 enfoui dans la protéine à 12 Å de la surface et formant le site de réduction, communique avec la surface de la protéine *via* deux canaux hydrophiles permettant la diffusion de molécules de dioxygène. Un tripeptide His-Cys-His conservé parmi les MCOs pouvant être impliqué dans le transfert d'électron entre le centre T1 et le centre T2/T3 est présent dans la structure de TvIac.

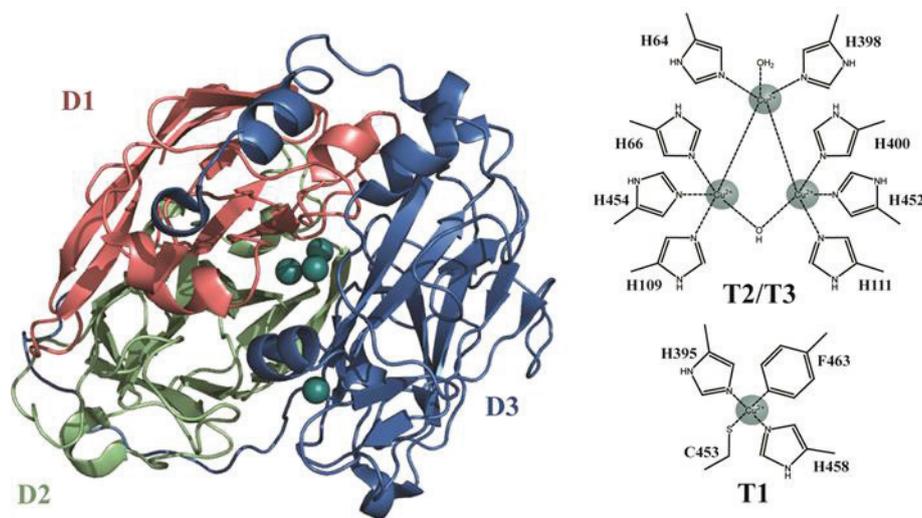


Fig. 21 : Structure cristallographique de la laccase de *T. versicolor* (PDB : 1GYC) et coordination de ses centres cuivre T1 et T2/T3. (D1, D2 et D3 correspondent aux trois domaines de l'enzyme).

CotA laccase de *Bacillus subtilis* :

La laccase CotA, enzyme particulière par ses propriétés thermostables, est une protéine d'origine bactérienne qui a été étudiée au cours de ces dix dernières années au niveau structural et biochimique par l'équipe de Lígia O Martins (Martins et al. 2002; Enguita et al. 2003; Enguita et al. 2004; Bento et al. 2005; Duro et al. 2006; Duro et al. 2008). Elle est la première laccase d'origine bactérienne dont la structure a été élucidée par cristallographie (Enguita et al. 2003). Cette enzyme est retrouvée au niveau de la paroi extérieure des endospores de *Bacillus subtilis*, une bactérie du sol gram-positif. Elle permet aux endospores de résister aux UV et aux peroxyde d'hydrogène (Donovan et al. 1987; Martins et al. 2002). CotA est une protéine monomérique de 65 kDa et possédant une température optimale d'activité enzymatique avoisinant les 70°C. De dimension de 70 x 50 x 20 Å³, similaire à la laccase de *T. versicolor*, elle est composée de trois domaines organisés majoritairement en feuillet β (Fig. 22). Le premier domaine est organisé en tonneau formé par 8 brins β (*β-barrel*) avec une partie hélicoïdale en N-terminal qui interagit et assure une bonne cohésion avec le domaine 2. Cette partie hélicoïdale n'est retrouvée que chez certaines MCOs d'origines

bactériennes telles que la protéine de tolérance au cuivre de *E. coli* (CueO) (Roberts et al. 2002). Le domaine 2, qui permet de ponter les domaines 1 et 3, est composé de 12 brins β et est connecté au domaine 1 par une petite hélice α . Une large boucle extérieure de 27 résidus permet sa connexion avec le domaine 3. Chez les laccases d'origine fongique et végétale, cette connexion est plutôt formée par une boucle interne. Finalement, le domaine 3 qui porte le centre T1 et qui contribue aussi avec le domaine 1 à former le centre T2/T3, est constitué de 8 brins β . Ce domaine porte une protubérance constituée par une boucle et une hélice α formant une sorte de « capuchon » (*lid-like*) au-dessus du site T1. En résumé, la CotA est une laccase présentant des particularités structurales différentes de celles d'origines fongiques. Ces particularités sont composées de la partie hélicoïdale en N-terminale, de la boucle externe permettant la connexion entre les domaines 2 et 3 et la partie « *lid-like* » portée par le domaine 3 et proche du site T1.

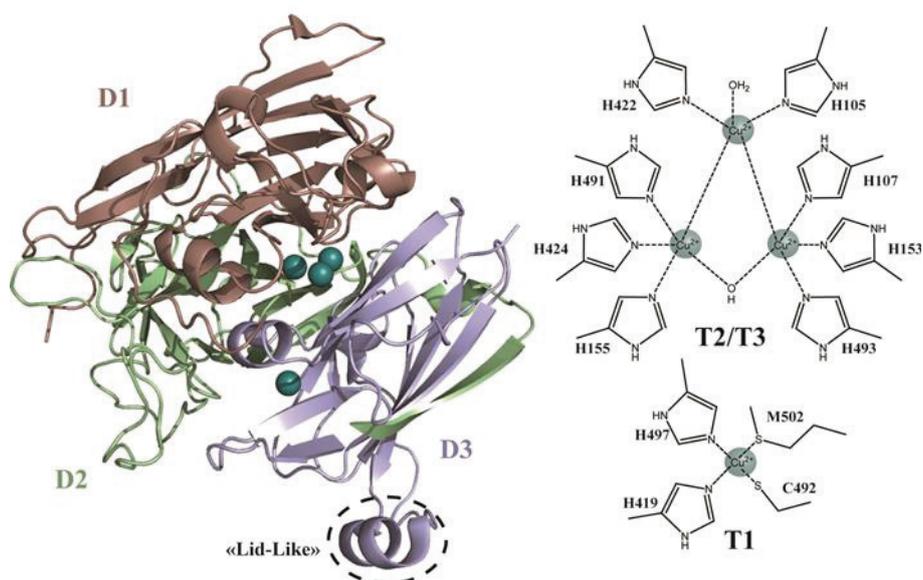


Fig. 22 : Structure cristallographique de la laccase CotA de *B. subtilis* (PDB : 1UVW) et coordination de ses centres cuivre T1 et T2/T3. (D1, D2 et D3 correspondent aux trois domaines de l'enzyme).

d) DET avec les laccases

Les premiers travaux portant sur le DET avec une laccase ont été publiés à la fin des années 70. Entre 1978 et 1979, Berezin et Tarasevich ont montré qu'il est possible de catalyser la réduction bio-électrochimique du dioxygène à partir d'un DET entre une électrode de carbone et la laccase de *T. versicolor* (Berezin et al. 1978; Tarasevich et al. 1979). Quelques années plus tard, les mêmes études ont été réalisées sur du carbone pyrolytique avec la même laccase adsorbée (Lee et al. 1984). L'application d'un potentiel de +0,739 V (vs.NHE) est

nécessaire pour induire cette réaction bio-électrochimique (réduction de l'O₂) et est proche du potentiel redox du centre T1 de cette laccase (+0,780 V vs.NHE). Cependant, les vitesses de transfert d'électrons entre ces oxydases et des électrodes sont beaucoup plus faibles que celles obtenues avec les hémoprotéines ou l'azurine. Par conséquent, les DET électrochimiques avec les laccases ont été essentiellement caractérisés à travers l'intensité des signaux électrochimiques qu'ils permettent d'obtenir. Par ailleurs, il a été admis que l'électro-réduction du dioxygène dépend principalement de l'orientation et de l'origine de la laccase (potentiel redox du centre T1), du pH, mais aussi de la quantité d'enzyme présente à la surface de l'électrode (Yaropolov et al. 1996; Tarasevich et al. 2001).

De nos jours, les études portant sur le DET avec une laccase ont plus particulièrement été focalisées sur l'orientation de l'enzyme et l'optimisation du contact électronique entre le centre T1 et la surface d'une électrode. Blanford a publié en 2007 des travaux présentant une stratégie particulière ayant pour but d'immobiliser et d'orienter la laccase de *Pycnoporus cinnabarinus* (Blanford et al. 2007). En tenant compte de l'hydrophobicité d'une partie de la surface protéique proche du site T1, l'adsorption stable avec une orientation correcte sur des électrodes portant des groupements anthracènes à leurs surfaces a été obtenue (Fig. 23A). Une densité de courant de 600 $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ à +0,45 V (vs. NHE) a été enregistrée par voltammétrie à partir d'un DET entre la laccase de *Pycnoporus cinnabarinus* et une électrode de graphite portant des groupements anthracènes. Cette valeur d'intensité est environ trois fois plus importante comparée à ce qui a été obtenu avec l'adsorption de la même laccase sur une électrode nue (180 $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ à +0,45 V vs. NHE). De plus, la densité de courant reste stable durant huit semaines tandis qu'avec une électrode nue la densité de courant diminue rapidement et devient nulle après deux semaines. A partir de ces observations, Blanford a émis l'hypothèse que l'anthracène serait capable « d'ancrer » l'enzyme à la surface de l'électrode en mimant un substrat sans être transformé.

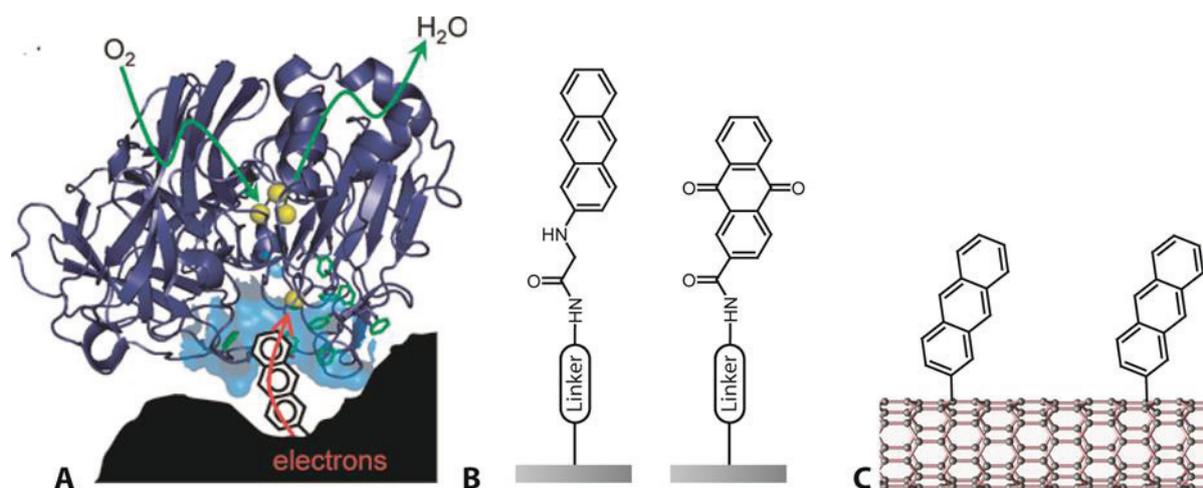


Fig. 23 : (A) Schéma du DET avec la laccase de *Pycnoporus cinnabarinus*, orientée sur une surface de graphite modifiée par le greffage d'anthracène. La poche hydrophobe est représentée par une surface bleu claire (Cracknell et al. 2008). (B) Schéma de deux électrodes modifiées soit par un résidu anthracène (à gauche), soit par une anthraquinone (à droite). Les deux molécules sont liées à un « linker » par une liaison amide (inspiré de (Sosna et al. 2010)). (C) Schéma d'anthracènes greffés sur un nanotube de carbone.

D'autre part, les résultats de Blanford ont été controversés notamment par Sosna qui a mené des études sur l'usage d'anthracènes ou d'anthraquinones liées à l'électrode par des bras « linkers » (Fig. 23B) (Sosna et al. 2010). Ainsi, les résultats obtenus par celui-ci ont révélé que les densités de courant obtenues (entre 0,4 et 1 $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$) à partir d'un DET entre la laccase de *Trametes hirsuta* et des surfaces portant des résidus anthracène, sont mille fois plus petites que celles indiquées par Blanford. Plus récemment, l'utilisation de nanotubes de carbone sur lesquels ont été greffés de l'anthracène ou de l'anthraquinone (Fig. 23C) a permis d'obtenir des signaux électrochimiques proche de 300 $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ avec la laccase de *Cerrena unicolor* (Stolarczyk et al. 2012).

Par ailleurs, différentes méthodes d'immobilisation et d'orientation impliquant des liaisons covalentes sur différent matériaux, ont été expérimentées. L'immobilisation de laccases par des liaisons amides entre des lysines exposées à leur surface et des électrodes de carbone portant des molécules carboxylées a été également étudiée. La fixation de la laccase de *Coriolopsis gallica* par ce type de liaison sur une électrode de graphite fonctionnalisée avec l'acide 4-éthylbenzoïque a permis d'obtenir une biocathode à laccase (Martinez-Ortiz et al. 2011). Une biopile hybride constituée de cette biocathode associée à une anode de zinc, fourni une densité de courant de 3 $\text{mA}\cdot\text{cm}^{-2}$. De surcroît, pour maximiser le contact électronique entre une laccase et une électrode, Gutierrez-Sanchez et ses collaborateurs ont immobilisé et orienté la laccase de *Trametes hirsuta* sur une surface de graphite poreuse

modifiée par des nanoparticules d'or (Fig. 24) (Gutierrez-Sanchez et al. 2012). Pour réaliser cet assemblage, une électrode fonctionnalisée par des groupements 4-aminophényle a été soumise à diazotation afin de générer une surface portant des groupements diazoniums. Des nanoparticules d'or ont été greffées covalamment sur cette surface par réaction spontanée entre les atomes d'or et les fonctions diazoniums. Du 4-aminophényle a été à nouveau électro-greffé suivi de la formation d'une SAM de 6-mercaptop-1-hexanol. Ces modifications permettent d'obtenir une surface exhibant des amines primaires et des fonctions hydroxyles. Les amines primaires sont utilisées pour immobiliser la laccase par des liaisons imines avec ses motifs glycosylés préalablement oxydés et ses résidus acides à la surface. La monocouche de 6-mercaptop-1-hexanol permet d'une part, de saturer les zones non modifiées de la surface et donc d'éviter les interactions non spécifiques. D'autre part les fonctions hydroxyle sont capables de réaliser des liaisons hydrogène avec la surface de la laccase stabilisant l'orientation de l'enzyme immobilisée (Pita et al. 2011). Cet assemblage a abouti à une biocathode à laccase capable de générer une densité de courant de $500 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$.

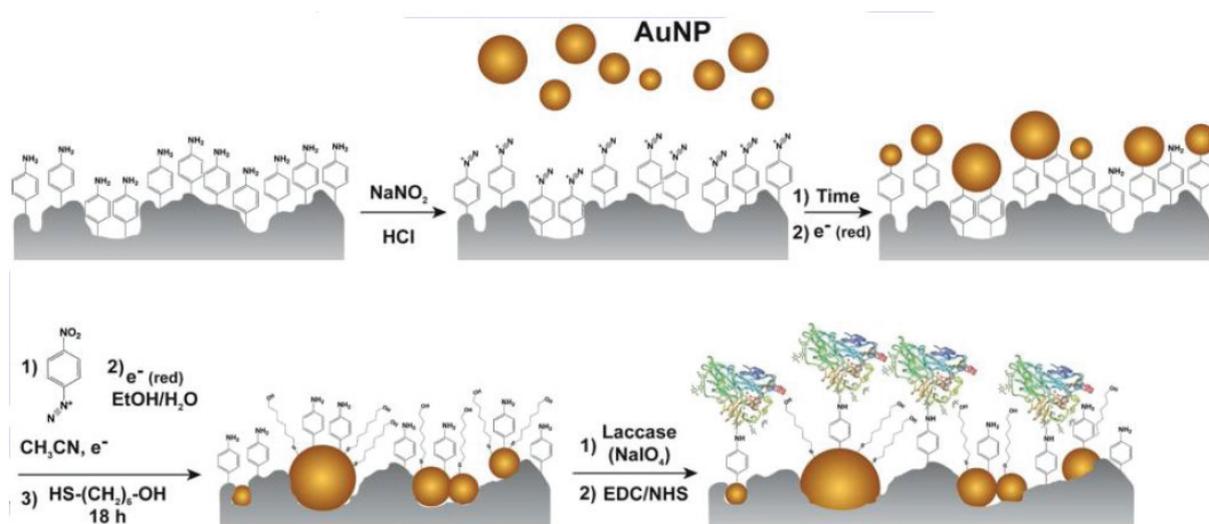


Fig. 24 : Etapes d'assemblage sur une électrode de graphite, aboutissant à l'immobilisation de la laccase de *T.hirsuta* à la fois sur des particules d'or et sur la surface de graphite (Gutierrez-Sanchez et al. 2012).

Par ailleurs, Shleev et ses collaborateurs ont publié en 2010 des travaux impliquant l'usage de particules de carbone sur lesquelles ont été adsorbées la laccase de *Trametes hirsuta* (Shleev et al. 2010). L'originalité de ces travaux est portée par le fait que ces particules sont utilisées en suspension dans l'air où le dioxygène est directement utilisé comme substrat. Cette biocathode particulière est capable de fournir une densité de courant de $500 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$. Ramasamy a immobilisé la laccase de *Trametes versicolor* sur des nanotubes de

carbone multifeuillets fonctionnalisés avec de l'acide 1-pyrènebutanoïque succinimidyl ester et déposés sur une électrode constituée de feuilles de carbone (Fig. 25) (Chen et al. 2001; Ramasamy et al. 2010). La partie aromatique (pyrenyl) interagit par interaction π - π avec les noyaux aromatiques portés par les nanotubes de carbone et la partie succinimidyl permet d'immobiliser la laccase par des liaisons amide impliquant ses amines exposées à sa surface. Une biocathode générant une densité de courant de $300 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ a été obtenue à partir de cet assemblage.

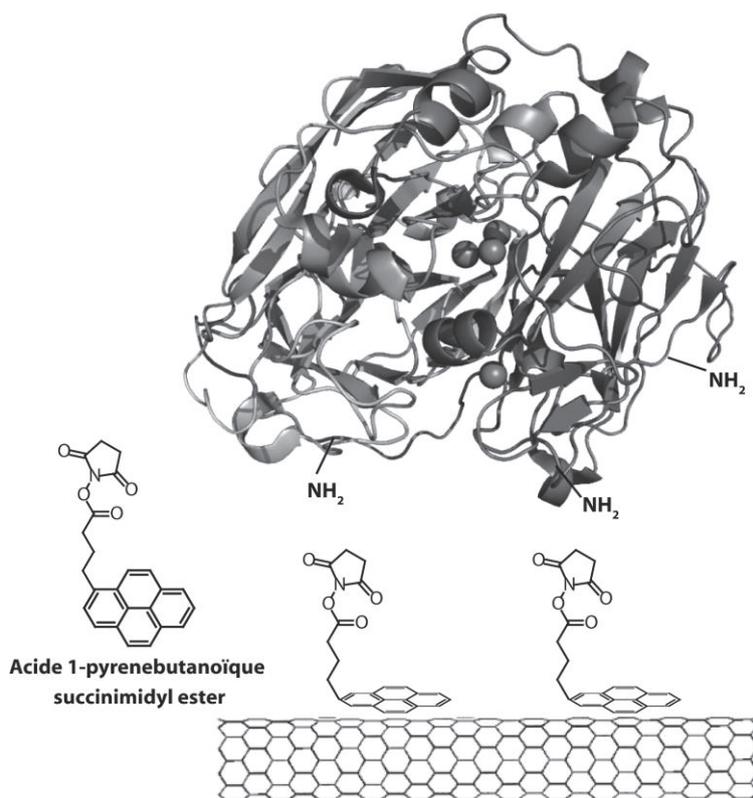


Fig. 25 : Schéma illustrant un nanotube de carbone sur lequel est adsorbé par π - π « stacking » de l'acide 1-pyrènebutanoïque succinimidyl ester. Les amines primaires à la surface d'une laccase sont représentées sur la figure et sont capables de réagir avec le succinimidyl ester pour former une liaison amide (inspiré de (Ramasamy et al. 2010))

I.7. Transfert d'électrons indirect (MET : Mediated Electron Transfer)

I.7.1. Concept et avantages

Le DET entre une oxydoréductase et une électrode reste encore difficile. La liste des contraintes concernant le transfert d'électrons dit « **hétérogène** » (transfert d'électrons de différentes natures) au sein d'une bio-électrode est exhaustive. Parmi les contraintes récurrentes, on retrouvera celles liées à l'enfouissement des centres redox enzymatiques rendant difficile ou impossible le transfert d'électrons avec une électrode. De plus, des

potentiels trop élevés sont parfois nécessaires pour générer un DET, pouvant induire des réactions secondaires parasites (Armstrong et al. 2000).

Le transfert d'électrons indirect (MET) a permis de lever certaines de ces contraintes par l'utilisation de médiateurs redox. Ces derniers sont décrits dans la littérature comme des molécules redox de faible poids moléculaire ou des complexes métalliques fonctionnant comme des navettes électroniques. Ces dernières permettent de faciliter le transfert d'électrons entre le centre redox d'une enzyme et la surface d'une électrode (Chaubey et al. 2002). Ces transferts sont générés à travers des réactions d'oxydoréduction hétérogènes (Fig. 26) : enzymatique (eq2), chimique (eq3) et électrochimique (eq4).

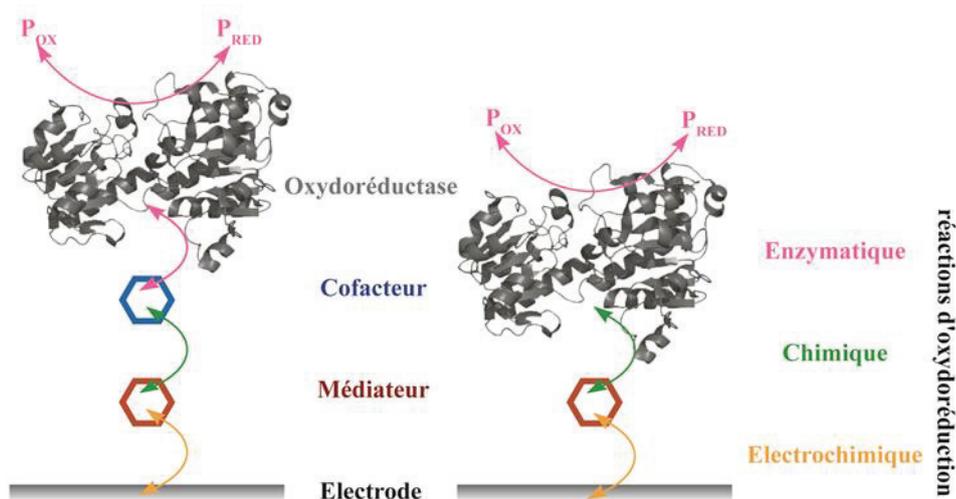
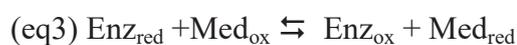


Fig. 26 : Schéma d'un transfert d'électrons hétérogènes entre une enzyme et une électrode dans un système « médié » impliquant (à droite) ou non (à gauche) un cofacteur enzymatique.

Sur une bioanode, le médiateur pourra être dans un premier temps, réduit par une enzyme ou son cofacteur puis être oxydé électrochimiquement par l'électrode et inversement dans le cas d'une biocathode (Fig. 2). Le rôle d'intermédiaire électrochimique du médiateur offre la possibilité d'effectuer plus facilement des transferts d'électrons avec les centres redox d'une enzyme. Ils permettent également de travailler à de faible potentiel redox et donc d'éviter ou de limiter la formation de produits secondaires. Ainsi, l'oxydation électrochimique directe du NADH sur une électrode peut être incomplète (transfert d'un seul électron à la fois)

et ne peut être menée qu'à des potentiels élevés ($> 0,8$ V) (Kuwana et al. 1978). La formation de radicaux libres (NAD^\bullet) résultant de l'oxydation incomplète du NADH peut conduire à la dimérisation du cofacteur et donc son inactivation (Fig. 27) (Gorton et al. 2002). De plus, un potentiel trop élevé peut induire des réactions non spécifiques telles que l'oxydation de molécules environnantes (ex : électrolyte) pouvant passiver la surface de l'électrode.

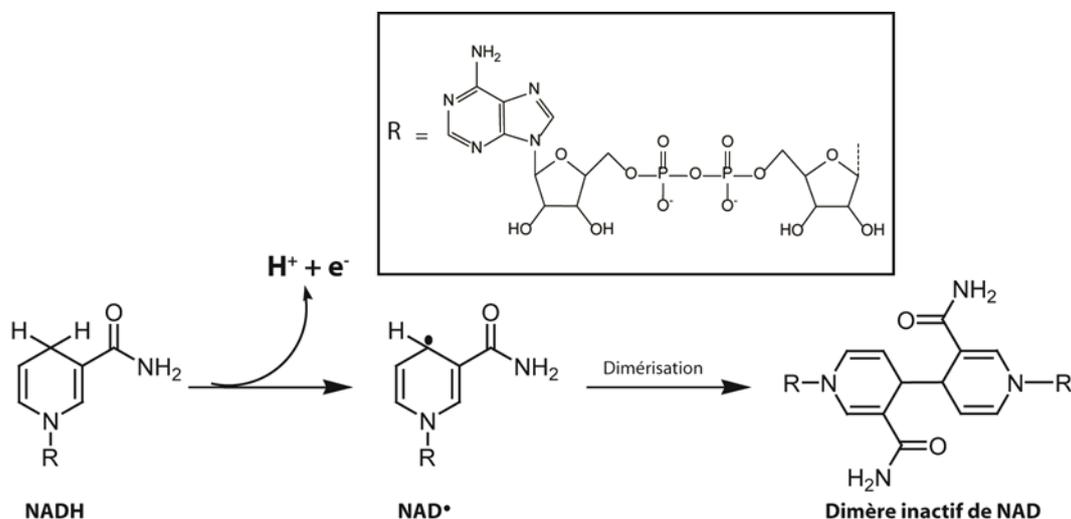


Fig. 27 : Oxydation incomplète du NADH menant à sa dimérisation et son inactivation.

Pour qu'une molécule soit considérée comme un médiateur électrochimique, elle doit présenter certaines caractéristiques telles que (Chaubey et al. 2002) :

- La capacité à oxyder ou à réduire rapidement l'enzyme ou son cofacteur.
- Être en mesure de s'oxyder et/ou de se réduire chimiquement et électrochimiquement de façon réversible.
- Pouvoir s'oxyder ou se réduire électrochimiquement à de faible potentiel.

Ces médiateurs pourront être utilisés sous différentes formes (Fig. 28) (Willner et al. 2009) :

- En solution, le médiateur devra être capable de transporter des électrons en diffusant du centre redox d'une enzyme vers la surface d'une électrode (Fig. 28A).
- Immobilisé covalamment (Fig. 28B) ou sous forme de polymère (Fig. 28C), le médiateur pourra former une couche redox à la surface de l'électrode. Dans ce cas, le médiateur est en contact étroit avec l'électrode favorisant ainsi la vitesse de transfert d'électrons. Cependant, il est nécessaire que le médiateur reste accessible à l'enzyme où à son cofacteur.

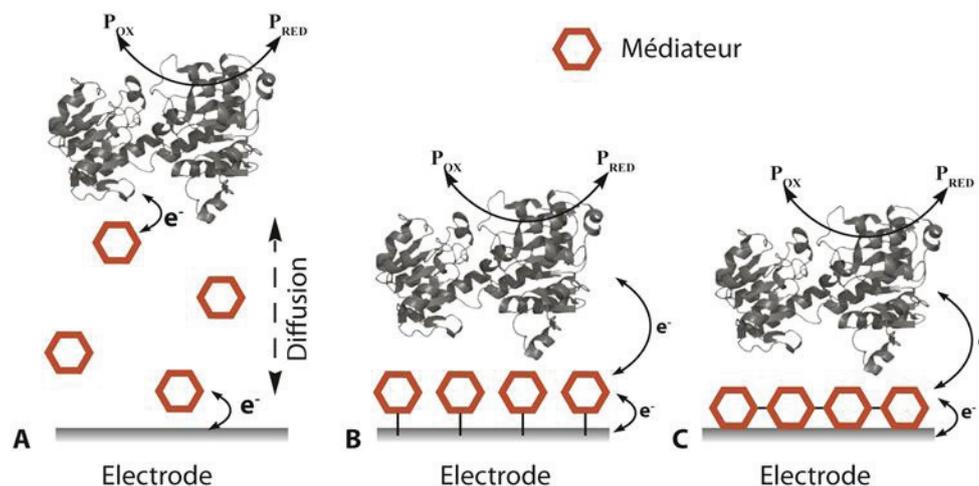


Fig. 28 : Schémas illustrant les différentes formes d'utilisation d'un médiateur : (A) en solution, (B) greffé à la surface, (C) polymérisé et adsorbé à la surface.

Dans une biopile fonctionnant avec un système en solution, il est souvent nécessaire d'utiliser une membrane afin de compartimenter les électrodes et éviter des réactions croisées entre l'anode et la cathode. De plus, il est essentiel de prendre en compte le facteur de diffusion entre le médiateur et l'électrode pouvant limiter l'efficacité du transfert d'électrons. L'immobilisation du médiateur ou son confinement à la surface de l'électrode permet entre autre de s'affranchir de ces contraintes (Tableau 3).

Tableau 3 : Contraintes du système fonctionnant avec un médiateur en solution face aux avantages d'un système avec un médiateur immobilisé.

En solution	Immobilisé
Besoin d'une membrane	Pas de membrane
Contrainte de diffusion	Pas de diffusion
Réactions croisées entre les électrodes	Transfert d'électrons vectorisé

De nombreuses stratégies impliquant l'immobilisation d'enzyme sur électrode pour un MET ont été décrites dans la littérature. D'après Willner, quatre modèles principaux peuvent être décrits (Fig. 29) (Willner et al. 2009). Le premier modèle utilise des médiateurs pouvant diffuser entre le centre redox d'une enzyme immobilisée et l'électrode (Fig. 29A), le second utilise un médiateur fixé à une enzyme immobilisée (Fig. 29B) et le troisième un médiateur associé à une matrice de polymères qui permet de piéger l'enzyme (Fig. 29C). Ces trois modèles peuvent impliquer l'immobilisation d'enzymes de façon covalentes ou non. Le

quatrième modèle illustre l'immobilisation sur l'électrode d'une système constituée d'un médiateur lié par covalence à une électrode et couplé à un cofacteur enzymatique (ex : complexe PQQ/ FAD) (Fig. 29D).

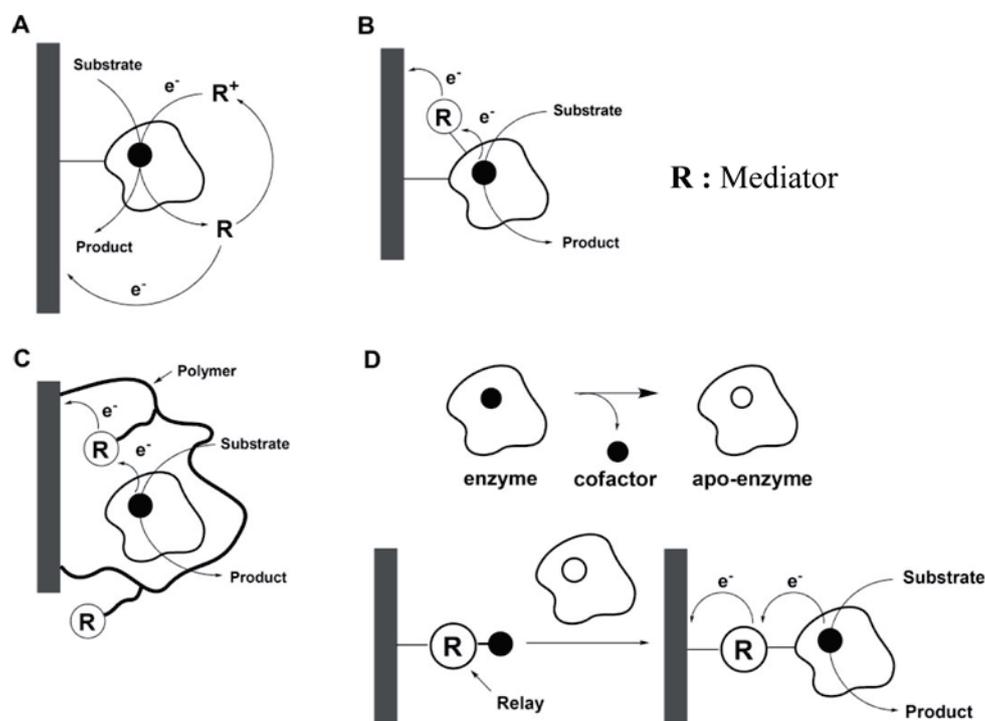


Fig. 29 : Schéma d'assemblage impliquant des MET entre le cofacteur d'une enzyme et une électrode. (A) Immobilisation de l'enzyme avec un médiateur en solution. (B) Immobilisation d'un complexe enzyme-médiateur. (C) Réseau formé par un polymère portant un médiateur et piégeant l'enzyme. (D) Assemblage permettant l'immobilisation d'un médiateur couplé au cofacteur de l'enzyme (Willner et al. 2009).

I.7.2. Les médiateurs

C'est à la fin des années 70 que sont apparus les premiers travaux portant sur l'utilisation de médiateurs. En 1978, Tse et Kuwana, publièrent une étude sur l'électro-oxydation du NADH (cofacteur de nombreuses déshydrogénases) sur des électrodes modifiées par des dérivés quinones (Kuwana et al. 1978). L'oxydation électrochimique directe de ce cofacteur est incomplète (Fig. 27) et nécessite l'application de potentiels élevés proches de +1 V. L'usage de dérivés quinones (dopamine et 3,4-dihydroxybenzylamine) comme médiateurs a permis d'oxyder le NADH totalement et de réduire son potentiel d'oxydation à +200 mV (vs. NHE) (Fig. 30).

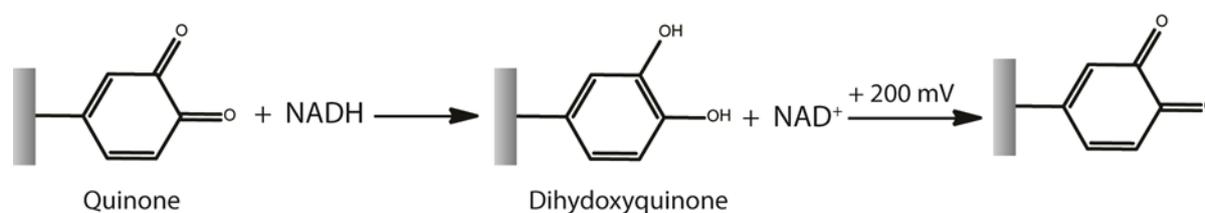
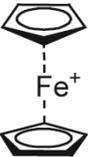
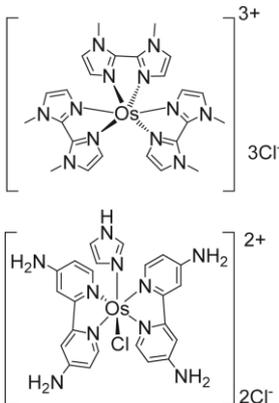


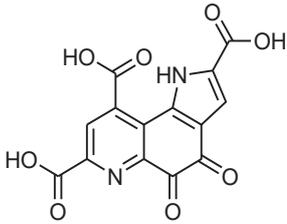
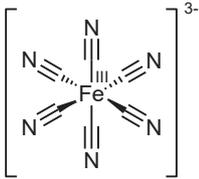
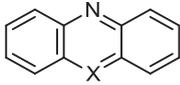
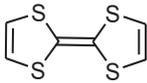
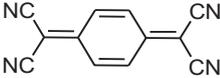
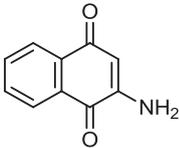
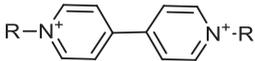
Fig. 30 : Oxydation complète du NADH à 200 mV (vs. NHE) sur une électrode portant une quinone.

Depuis les travaux de Tse et Kuwana, l'usage de nombreux médiateurs a été décrit dans la littérature (Tableau 4). Parmi ces médiateurs, on retrouvera des molécules organiques telles que des colorants, des catéchols, des hydroxybenzaldehydes mais aussi des ions inorganiques comme le couple Ferricyanure/Ferrocyanure ($[\text{Fe}^{\text{III}}\text{CN}_6]^{3-}/[\text{Fe}^{\text{II}}\text{CN}_6]^{4-}$), ou des complexes organo-métalliques comme les complexes d'osmium ou les ferrocènes. Parmi ces médiateurs, certains sont capables d'accéder et d'échanger des électrons avec les centres redox enfouis d'une enzyme et d'autres réagissent avec les cofacteurs en solution et non liés à l'enzyme comme le NAD^+ .

Tableau 4 : Exemples de médiateurs sous leur forme oxydée et exemples d'enzymes associées.

Médiateurs	Structure	Potentiel redox (vs. NHE)	Enzymes
Ferrocène		+300 mV	Glucose oxydase (Pandey et al. 2003) Déshydrogénase à NAD (Zheng et al. 2009)
Complexes d'osmium		-200 mV à +400 mV	Glucose oxydase /Bilirubine oxydase (Mano et al. 2003) Laccase (Mano et al. 2006)

Synthèse bibliographique

Pyrroloquinoline quinone (PQQ)		+100 mV	Glucose oxydase (Katz et al. 2003) Glucose déshydrogénase (Zayats et al. 2005)
Ferricyanure		+180 mV	Lactate déshydrogénase (Williams et al. 1970) Cholestérol oxydase (Kumar et al. 2001)
Phénazines	 X = N, S, O	-250 mV à +200 mV	Déshydrogénase à NAD (Hassler et al. 2006)
Tertrathiofulvalene (TTF)		+300 mV	Glucose oxydase (Campuzano et al. 2002) HRP (Campuzano et al. 2005)
Tetracyanoquinodimethane (TCNQ)		+150 mV	Déshydrogénase à NAD (Pandey et al. 1998) Cholinestérase (Nunes et al. 2004)
Tétraméthyl-paraphénylènediamine (TMPD)		+37 mV	Méthanol déshydrogénase (Zhang et al. 2006)
2-Amino-1,4-naphthoquinone (ANQ)		-400 mV (vs Ag/AgCl)	Diaphorase (Sugiyama et al. 2010)
Viologène (4,4-bipyridine)	 R = Méthyl, benzyle	-500 mV (vs Ag/AgCl)	Hydrogénase (Tsujimura et al. 2001) Déshydrogénases à NAD ⁺ (Palmore et al. 1998)

I.7.3. Médiateur du NAD(P)H

De nombreuses études sur l'oxydation électrochimique du NAD(P)H ont été décrites après les travaux menés par Tse et Kuwana. Cet engouement peut s'expliquer par le fait que plus de 300 enzymes connues sont associées à un cofacteur de type NAD(P)/NAD(P)H (Gorton et al. 2002). Dans ces études, le but est d'oxyder le NAD(P)H à de faibles potentiels par l'intermédiaire de médiateurs. L'usage de colorants organiques de type phenazine tels que le bleu de Meldola (Grundig et al. 1995), le bleu de toluidine (Karyakin et al. 1999; Doumeche et al. 2010), la thionine (Meng et al. 2009) ou le rouge neutre (Karyakin et al. 2003) a souvent été décrit. Ces derniers possédant des centres aromatiques formés de phénylamines ont pour avantages d'être chimiquement et électrochimiquement stables et permettent d'oxyder le NAD(P)H à de faibles potentiels (Grundig et al. 1995; Gorton et al. 2002). En plus d'être peu coûteux et peu toxiques, ces médiateurs peuvent être immobilisés sous différentes formes, soit par adsorption (Malinauskas et al. 2001), soit covalamment (Hassler et al. 2006). De plus, certaines de ces molécules telles que le bleu de toluidine, la thionine et le bleu de méthylène, peuvent être polymérisées électrochimiquement (électropolymérisation) à la surface d'une électrode (Karyakin et al. 1993; Karyakin et al. 1999; Karyakin et al. 2003). L'électropolymérisation permet de former une couche électro-active et stable fortement adsorbée à la surface de l'électrode.

D'autres molécules dérivées de quinone ont été utilisées comme médiateur à NAD(P)H. Willner et Zayat ont décrit de nombreux travaux portant sur l'utilisation de la pyrroloquinoline quinone (PQQ) comme médiateur à NADH (Willner et al. 1994; Bardea et al. 1997; Zayats et al. 2000; Zayats et al. 2002). Cette molécule est un cofacteur associé à certaines déshydrogénases et est capable d'oxyder le NADH. Cette propriété est conférée par le noyau ortho-quinone située dans la structure de ce coenzyme (Tableau 4). Son utilisation est lié à sa stabilité et son faible potentiel redox (proche de 0 V). De plus, les fonctions acides carboxyliques portées par le PQQ peuvent être aisément utilisées pour des assemblages covalents *via* des liaisons amides. Cependant, cette molécule est extrêmement onéreuse (~100 euro le mg) ce qui limite son utilisation à grande échelle. Par ailleurs, des médiateurs structurellement différents et moins onéreux fonctionnant avec les cofacteurs nicotiniques ont été décrits dans la littérature tels que le viologène, le ferrocène, le tetrathiofulvalene (TTF), le tetracyanoquinodimethane (TCNQ) (Tableau 4).

I.7.4. Autres médiateurs

Durant ces deux dernières décennies, le contact électronique entre une enzyme et des complexes métalliques a été intensivement étudié. Durant cette période, Heller et son équipe se sont intéressés aux complexes d'osmium coordonnés par des bipyridines ou des noyaux imidazoles (Ohara et al. 1993; Ohara et al. 1994; Mao et al. 2003). Ils ont montré que certains complexes sont capables d'oxyder les centres redox à FAD tels que celui porté par la glucose oxydase (GOx), mais également de réduire les centres cuivre T1 des laccases ou de la bilirubine oxydase. De plus, l'association de ces médiateurs à des bras flexibles formés par des polymères chargés a contribué d'une part, à l'accessibilité des centres redox enfouis et d'autre part, à la formation d'un réseau permettant de piéger les enzymes à la surface de l'électrode (Mao et al. 2003).

Par ailleurs, l'usage du coenzyme PQQ comme médiateur à FAD est aussi retrouvé dans les études menées par Willner et Katz (Willner et al. 2009). Pour le développement de bioanodes à glucose oxydase, ces derniers ont élaboré un assemblage à la surface d'une électrode constitué de PQQ conjugué à du FAD. A partir d'apo-GOx (GOx dépourvue de FAD), ce couplage a permis de reconstituer en surface une holoenzyme connectée par un relai électronique (Fig. 33A).

I.8. Applications

I.8.1. Biocapteur électrochimique

Un biocapteur électrochimique est constitué de manière générale d'un détecteur (ou récepteur) d'origine biologique (enzyme, anticorps, récepteur) immobilisé sur une électrode (transducteur) qui est chargée de transformer un signal biologique (interaction, activité enzymatique) en un signal électrique aisément exploitable (Blum et al. 1991). Les biocapteurs ampérométriques impliquant un système faradique peuvent fonctionner soit comme une biocathode soit comme une bioanode.

I.8.2. Biopile

Les biopiles sont par définition des dispositifs bio-électrochimiques capables de générer par des réactions d'oxydoréductions, de l'énergie électrique à partir de l'énergie chimique contenue dans des substrats organiques. Ces piles à carburant biochimique fonctionnent, soit avec des enzymes isolées (**biopile enzymatique**), soit avec des micro-

organismes (**biopile microbienne**). Ces dernières sont capables d'utiliser l'énergie chimique de très nombreux substrats retrouvés dans une biomasse complexe.

I.8.2.1. Biopile microbienne

Les biopiles microbiennes (MFC : *Microbial Fuel Cell*) convertissent l'énergie chimique générée par le métabolisme d'une cellule vivante en énergie électrique. Ces micro-organismes, pouvant être assimilés à des microréacteurs, offrent des conditions optimales aux fonctionnements de biocatalyseurs. En outre, de tels systèmes permettent d'utiliser des substrats contenus dans des milieux complexes tels que les eaux usées, les déchets agricoles (laiteries, lisiers, etc.), ainsi que les déchets domestiques. Des exemples de biopiles microbiennes sont donnés dans le Tableau 5.

Tableau 5 : Exemples de biopiles microbiennes.

Carburants	Anode/médiateur	Cathode/médiateur	Densité de puissance	référence
Glucose/O ₂	Suspension de <i>E. coli</i> , sur électrode de graphite/rouge neutre immobilisé	Suspension de <i>E. coli</i> , sur électrode de graphite/ferrocyanate	85,5 μW.cm ⁻²	(Park et al. 2003)
Amidon/O ₂	Suspension de <i>Clostridium butyricum</i> , sur électrode de platine/polytétrafluoroaniline	Suspension de <i>Clostridium butyricum</i> , sur électrode de graphites.	1300 μW.cm ⁻²	(Niessen et al. 2004)
H ₂ /O ₂	Suspension de <i>Desulphovibrio vulgaris</i> , sur électrode de carbone/méthyl de viologène	Bilirubine oxydase, sur électrode de graphite	176 μW.cm ⁻²	(Tsujiura et al. 2001)
Acetate/O ₂	Suspension de <i>Geobacter sulfurreducens</i> sur électrode de titane	Electrode de platine	230 μW.cm ⁻²	(Benetton et al. 2010)
Glucose/O ₂	Suspension de <i>E.coli</i> sur une électrode en acier inoxydable modifiée par du graphène	Suspension d' <i>E.coli</i> sur du papier carbone	270 μW.cm ⁻²	(Zhang et al. 2011)
Milieu complexe	Electrode en acier inoxydable immergée dans des sédiments marins	Electrode en acier inoxydable immergée dans de l'eau de mer	23 μW.cm ⁻²	(Dumas et al. 2007)

I.8.2.2. Biopile enzymatique (EBFC : *Enzymatic Biofuel Cell*)

Les biopiles enzymatiques (EBFCs) fonctionnent avec des oxydoréductases isolées. Elles sont capables de générer une puissance électrique à partir de l'association d'une bioanode et d'une biocathode séparées par un électrolyte (Fig. 31). Les bioanodes fonctionnent avec des enzymes qui catalysent l'oxydation d'un substrat carburant (donneur d'électrons), tandis que les biocathodes opèrent avec des enzymes qui catalysent la réduction d'un oxydant (accepteur d'électrons). Au cours de ces 60 dernières années, le développement des EBFC a été suscité par les avantages qu'offre l'utilisation d'oxydoréductases (Leech et al. 2012; Meredith et al. 2012) à savoir:

- Les réactions enzymatiques sont de haute spécificité.
- La catalyse enzymatique est généralement optimale à des températures et des pH modérés.
- La production d'enzymes peut être réalisée sous forme recombinante (faible coût de purification, disponibilité infinie).

La spécificité de substrats des biocatalyseurs permet de s'affranchir des problèmes liés aux réactions interférentes posées par les catalyseurs inorganiques. De plus, dans le cas d'enzymes immobilisées, il est possible de développer des dispositifs dépourvus de membrane. Dans les années 60, à partir de ces idées, la conception d'EBFC a eu pour perspective le développement de dispositifs bio-implantables (Yahiro et al. 1964). Il a été imaginé que des EBFC pourraient utiliser le glucose *in-vivo* pour alimenter une pompe à insuline ou un pacemaker. De nos jours, ces activités de recherches se sont orientées vers l'optimisation du transfert d'électron entre une enzyme et une électrode à travers le développement de nouvelles stratégies d'assemblages moléculaires. L'application actuelle des EBFCs concerne le domaine de la microélectronique et de l'appareillage électronique portable (baladeur MP3, téléphone portable) (Sakai et al. 2009). Cependant, le concept d'EBFCs bio-implantable *in-vivo*, est toujours d'actualité (Wang 2001; Heller 2004; Heller 2006; Cinquin et al. 2010; Halamkova et al. 2012).

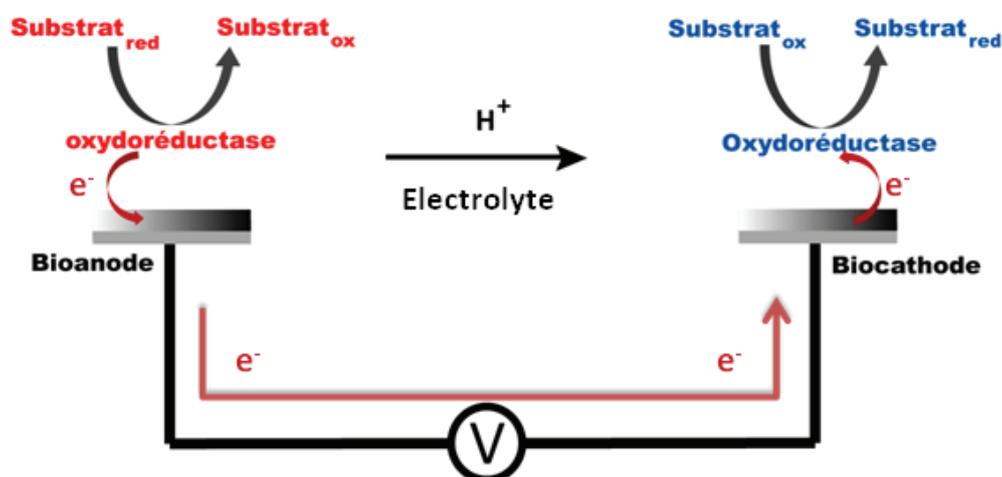


Fig. 31 : Schéma général d'une biopile enzymatique.

I.8.2.2.1. Exemples de EBFCs

La littérature fait état de divers EBFCs constituées de bio-électrodes fonctionnant avec des DET ou des MET et impliquant des molécules et des biomolécules redox en solution ou immobilisées. Parmi ces EBFCs, certaines sont composées à la fois d'une bioanode et d'une biocathode tandis que d'autres sont hybrides, où l'une des électrodes est associée à un biocatalyseur et l'autre est associée à un catalyseur inorganique tel que le platine (Bullen et al. 2006).

a) EBFC fonctionnant avec la glucose oxydase (GOx)

La grande majorité des EBFCs utilisent le glucose comme carburant et le dioxygène comme oxydant (système glucose/ O_2). Le faible coût et la biodisponibilité du glucose, ainsi que les nombreuses avancées sur les biocapteurs électrochimiques à glucose, permettent d'expliquer la notoriété de ce carburant. La glucose oxydase (GOx) est utilisée au niveau de l'anode pour oxyder le glucose en gluconolactone, tandis que l'usage d'oxydases telles que les laccases, les peroxydases ou la bilirubine oxydase est retrouvé au niveau de la cathode

Du fait de l'enfouissement de son centre redox (13 Å de la surface (Hecht et al. 1993)), la GOx est habituellement associée à un médiateur redox. Ce centre redox fonctionne avec le FAD.

Le groupe de Heller a porté une attention particulière au développement de bioanode à GOx fonctionnant avec des complexes d'osmium (Ohara et al. 1993; Mano et al. 2003; Mao

et al. 2003; Mano et al. 2006). L'intérêt de ces complexes est lié à leurs potentiels redox pouvant être proches de 0 V. Ces bioanodes sont constituées d'électrodes de carbone modifiées par des hydrogels formés par du poly(4-vinylpyridine) (PVP). Des complexes d'osmium de type $[\text{Os}(\text{N,N}'\text{-diméthyl-2,2}'\text{-biimidazole})_3]^{3+/2+}$ (-0,195 V vs. Ag/AgCl) ou $[\text{Os}(4,4'\text{-diamino-2,2}'\text{bipyridine})_3]^{3+/2+}$ (+0,36 V vs. Ag/AgCl) sont liés à ces polymères par l'intermédiaire de chaînes carbonées pouvant leur conférer une flexibilité (Fig. 32A). Le polymère I sur la Fig. 32A porte des complexes $[\text{Os}(\text{N,N}'\text{-diméthyl-2,2}'\text{-biimidazole})_3]^{3+/2+}$ par l'intermédiaire de chaînes constituées de 13 atomes leur attribuant une large flexibilité. La co-immobilisation de GOx avec cet hydrogel redox permet de former un système « enzyme connecté » (Mao et al. 2003). D'autre part, le même type d'assemblage avec le polymère II portant des complexes $[\text{Os}(4,4'\text{-diamino-2,2}'\text{bipyridine})_3]^{3+/2+}$ (Fig. 32A) a permis de mettre au point des biocathodes fonctionnant avec une laccase ou une bilirubine oxydase (Mano et al. 2006). Dans ce polymère, les complexes ne sont pas portés par des longues chaînes et permettent d'avoir un contact électronique avec les centres redox de ces oxydases qui sont à proximités de la surface. A partir de ces bio-électrodes, des EBFCs avec des densités de puissance pouvant atteindre $400 \mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$ à +0,88 V ont pu être développées (Fig. 32B) (Soukharev et al. 2004). De plus, ces EBFCs sont capables d'opérer *in vivo* dans un grain de raisin (Fig. 32C) (Mano et al. 2003) ou dans un cactus (Fig. 32D) (Flexer et al. 2010). Dans le cas du cactus, les densités de puissance et de courant de l'EBFC sont influencées par le cycle lumière/obscurité appliqué sur la plante. Par conséquent, cela a permis de suggérer que ces EBFCs pourraient potentiellement s'appliquer à l'étude des processus de photosynthèse.

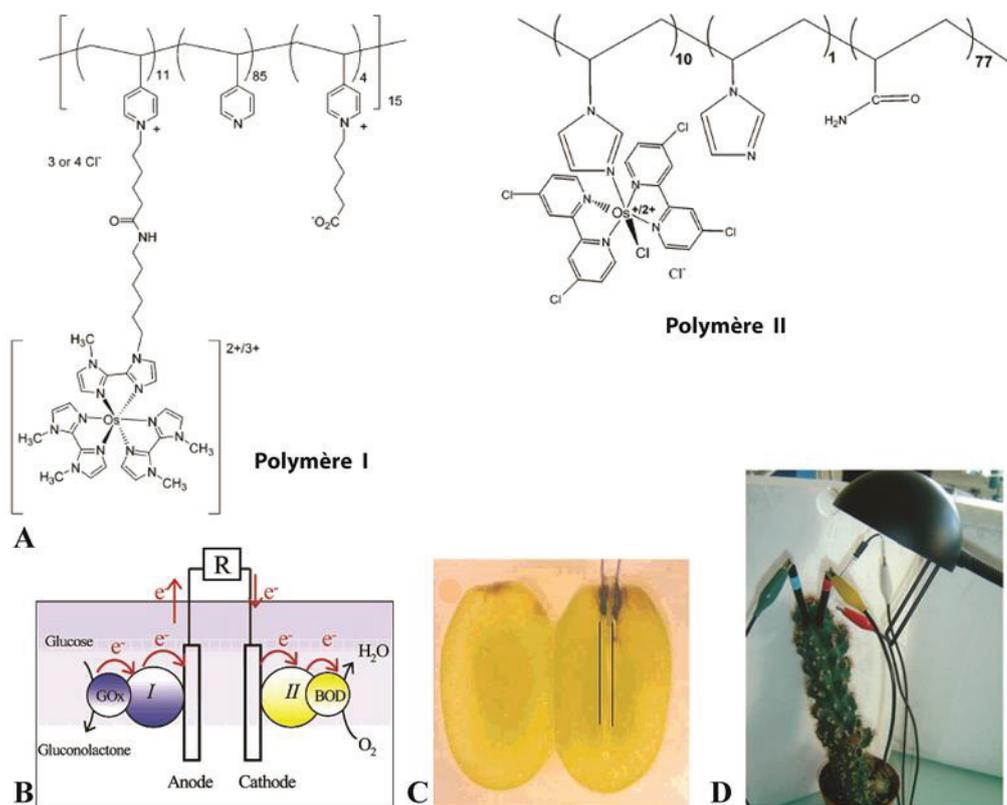


Fig. 32 (A) Polymères chargés permettant de former un système enzyme connectée. Ces polymères contiennent des complexes d'osmiums. Le polymère I (Poly(4-vinylpyridine)-[Os(N,N'-dialkylated-2,2'-biimidazole) $3^{3+/2+}$] (à gauche), le polymère II (poly(acrylic acid)-poly(vinylimidazole)-[Os(4,4'-dichloro-2,2'-bipyridine) $2Cl^{3+/2+}$] (à droite). (B) Schéma d'une biopile fonctionnant avec le couple Glucose/ H_2O . La bioanode est constituée du polymère I associé à une glucose oxydase (GOx) et la biocathode est composée du polymère II associé à une bilirubine oxydase (BOD) (C) L'usage de ces polymères a permis de mettre au point une pile dépourvue de membrane et alimentée avec le glucose *in-vivo* contenu, soit dans un raisin (C), soit dans un cactus (D) (Mano et al. 2003; Flexer et al. 2010)

De nombreux médiateurs autres que les complexes d'osmium ont été utilisés pour l'élaboration de bioanode à GOx. Des particules de carbone portant des hydroxyquinones couplées à des polyéthers ont permis d'obtenir avec la GOx des densités de courant de l'ordre du mA par cm^2 (Tamaki et al. 2007). Le ferrocène fait aussi partie des médiateurs qui ont été souvent associés à la GOx mais dans un contexte biocapteur (Chaubey et al. 2002). Une équipe de l'université d'Oklaoma (USA) a développé une EBFC en graphite composée d'une bioanode à GOx fonctionnant avec un polymère portant des dérivés ferrocènes (poly(éthylèneimine)-3-(diméthylferrocényl)propyl) et une biocathode à laccase fonctionnant avec des complexes d'osmium (Meredith et al. 2011). Une biopile résultant de l'assemblage de ces deux bio-électrodes est capable de générer une densité de puissance de $146 \mu W \cdot cm^{-2}$.

Une autre approche pour la mise au point d'une bioanode à GOx a été développée par Katz et Willner (Fig. 33A) (Willner et al. 2009). Ces derniers ont élaboré différentes stratégies

d'assemblage ayant pour but de reconstituer une holoenzyme à la surface d'une électrode. Dans le cas de la GOx, la forme apo de l'enzyme est déposée sur une électrode d'or modifiée par une surface constituée de pyrroloquinoline quinone (PQQ) sur laquelle est greffée du FAD. Une EBFC a été développée avec cette bioanode couplée à une biocathode fonctionnant avec la cytochrome c oxydase (COx) (Fig. 33B) (Katz et al. 1999). Cette biocathode est constituée d'une électrode d'or modifiée par l'immobilisation de cytochrome c (Cyt c) sur laquelle un réseau de COx a été formé à l'aide de glutaraldéhyde (Fig. 8B). Une densité de puissance de $20 \mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$ a été mesurée avec cette EBFC. Avec la même bioanode, une biopile fournissant une densité de puissance de $160 \mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$ a été développée avec une biocathode fonctionnant avec la microperoxydase 11 (MP-11) (Patolsky et al. 1999).

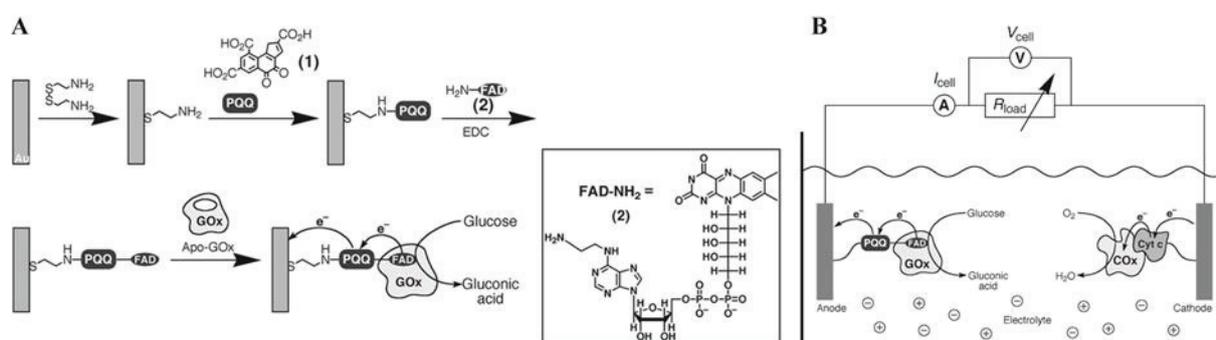


Fig. 33 : (A) Reconstitution d'une holo-GOx sur un assemblage PQQ-FAD. (B) EBFC fonctionnant avec la GOx et la COx (Willner et al. 2009).

Récemment, une équipe Grenobloise a développé une EBFC à glucose implantée dans un rat vivant (Cinquin et al. 2010). Cette biopile implantée dans l'espace retro-péritonéal de l'animal est alimentée par le glucose et le dioxygène physiologique (Fig. 34A). Sa bioanode fonctionne avec une GOx associée au couple ubiquinone/ubiquinol jouant le rôle de médiateur (Fig. 34B). Afin d'éviter d'intoxiquer le rat par le peroxyde d'hydrogène formé au niveau de la bioanode, une catalase a été ajoutée. La biocathode fonctionne avec une polyphénol oxydase (PPO) capable de réduire l'O₂, et associée à une quinone servant de médiateur (Fig. 34B). Les bio-électrodes composées de graphite ont été compartimentées par des membranes de dialyse avec différents seuils de coupure (*cut-off*). *In vivo*, ce dispositif est capable de générer une puissance de $24,4 \mu\text{W}\cdot\text{ml}^{-1}$ avec des électrodes sous formes de disque présentant un volume de 0.133 ml (disque de 1.33 cm² de surface et 0,1 cm d'épaisseur). De surcroît, il a été montré qu'au bout de 3 mois d'implantation, aucun signe d'inflammation ou de rejet n'est observable chez l'animal.

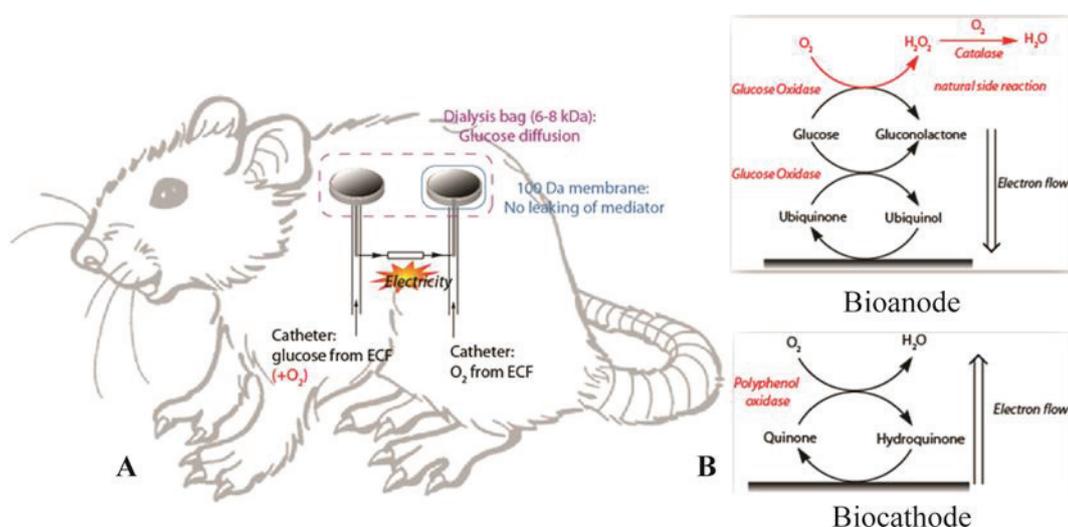


Fig. 34 : (A) Schéma de l'EBFC implantée dans le rat. (B) Réaction au niveau de la bioanode et de la biocathode (image de Doumèche B., 2012, d'après (Cinquin et al. 2010)).

Jusqu'à récemment, il était admis qu'un DET entre la GOx et une électrode ne pouvait être réalisé du fait de la distance trop importante entre son centre redox et sa surface. Ce constat a été réfuté par des travaux publiés depuis peu qui montrent qu'un DET peut être réalisé à l'aide de nanotubes de carbone ou de nanoparticules métalliques (Guisseppi-Elie et al. 2002; Ivnitski et al. 2008; Pan et al. 2010). Ces derniers permettent de créer un contact électronique direct entre le site flavinique de la GOx et la surface d'une électrode. Ces travaux sont donc à l'origine des bioanodes à GOx fonctionnant sans médiateur. L'équipe de Cosnier a publié des travaux en 2011 décrivant le développement d'une EBFC fonctionnant avec ce type de bioanode (Fig. 35) (Zebda et al. 2011). Cette EBFC est composée de bio-électrodes formées à partir de la compression mécanique d'une mixture d'enzymes et de nanotubes de carbone. La GOx est utilisée au niveau de l'anode pour l'oxydation du glucose et une laccase est retrouvée au niveau de la cathode permettant la réduction du dioxygène. Une puissance de $1,3 \text{ mW.cm}^{-2}$ à $+0,95 \text{ V}$ a pu être obtenue avec cette EBFC.

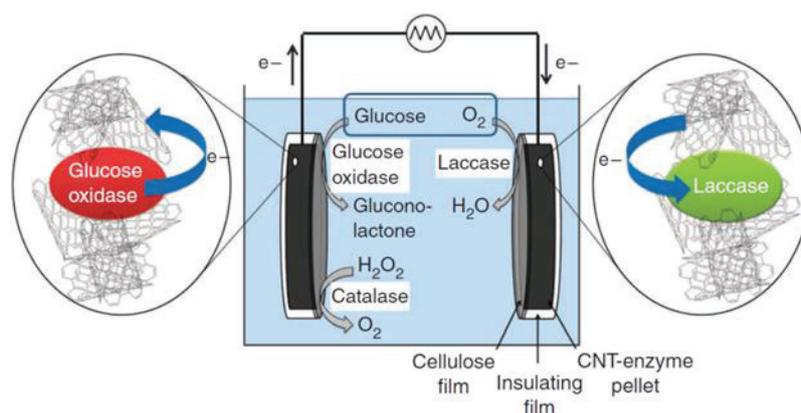


Fig. 35 : Schéma de l'EBFC composée d'une bioanode à GOx et d'une biocathode à laccase, toutes deux fonctionnant par un DET (Zebda et al. 2011).

b) EBFC fonctionnant avec les déshydrogénases

Les EBFCs à glucose fonctionnant avec une bioanode à GOx permettent d'utiliser seulement deux électrons par molécule de glucide. Sachant qu'une molécule de glucose est capable de fournir théoriquement 24 électrons, il serait intéressant d'un point de vue énergétique de développer une EBFC capable d'utiliser l'intégralité de cette source. Pour cela, il est nécessaire de développer une anode fonctionnant avec un système multienzymatique impliquant particulièrement les déshydrogénases à NAD^+ . Dans ce contexte, Palmore et ses collaborateurs ont mis au point une EBFC fonctionnant avec une bioanode capable d'oxyder complètement le méthanol (Palmore et al. 1998). Cette oxydation a pu être réalisée avec une bioanode combinant l'action de 3 déshydrogénases à NAD^+ (une alcool déshydrogénase, une aldéhyde déshydrogénase et une formiate déshydrogénase). En présence de NAD^+ couplé à un médiateur redox (benzylviologène), le méthanol est oxydé en CO_2 . Une EBFC constituée de cette bioanode et d'une cathode de platine est capable de fournir une puissance de $0,67 \text{ mW.cm}^{-2}$ avec une tension de $+0,49 \text{ V}$. En s'inspirant de la glycolyse et du cycle de Krebs, le groupe de Minter s'est également focalisé sur la mise au point de bioanode fonctionnant avec des systèmes multienzymatiques (Sokic-Lazic et al. 2010). Ces recherches ont été à l'origine du développement de EBFCs à pyruvate impliquant jusqu'à 5 déshydrogénases à NAD^+ (Fig. 36) (Sokic-Lazic et al. 2009; Moehlenbrock et al. 2010). Ces EBFCs sont constituées, d'une cathode de platine et d'une bioanode modifiée par une couche de vert de méthylène (médiateur du NAD(P)H) électropolymérisé sur laquelle ont été immobilisées jusqu'à 9 enzymes du cycle de Krebs dont cinq déshydrogénases à cofacteur nicotinique (enzymes commerciales sauf la succinate déshydrogénase qui a été isolée à partir de mitochondrie provenant de tubercules de pomme de terre Russet). L'immobilisation de ces enzymes est

réalisée à l'aide d'une membrane de nafion. Des densités de puissances proches de $1\text{mW}\cdot\text{cm}^{-2}$ ont été générées par ces biopiles.

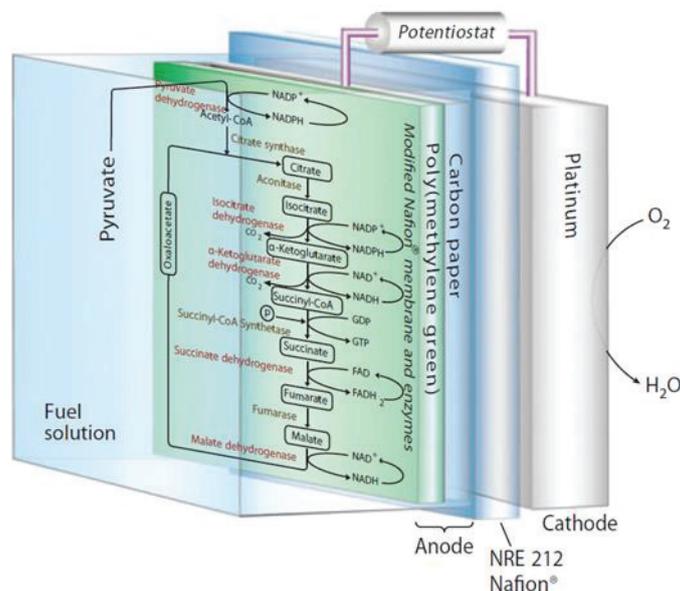


Fig. 36 : Schéma de l'EBFC fonctionnant avec des enzymes du cycle de Krebs avec le système pyruvate/O₂. Les déshydrogénases sont indiquées en rouge (Sokic-Lazic et al. 2009).

Des biopiles constituées de bioanodes à glucose déshydrogénase (GDH) sont aussi décrites dans la littérature. Certaines de ces enzymes utilisent des cofacteurs nicotiniques et d'autres du PQQ. En 2012, l'équipe de Katz a présenté une EBFC bio-implantable opérant dans un escargot (Fig. 37A) avec une bioanode à GDH PQQ-dépendante et une biocathode à laccase (Halamkova et al. 2012). Cette EBFC fonctionne avec le dioxygène et le glucose présent *in vivo* dans le gastéropode. La bioanode de cette EBFC est constituée de nanotubes de carbone modifiés par de l'acide 1-pyrènebutanoïque succinimidyl ester (Fig. 25) sur lesquels sont immobilisés les GDH à PQQ (Fig. 37B). La biocathode est aussi constituée de nanotubes de carbone sur lesquels sont immobilisées des laccases (Fig. 37B). Cette EBFC est capable de fonctionner plusieurs mois dans l'escargot sans porter atteinte à la physiologie de l'animal. Cependant, les performances de l'EBFC diminuent rapidement au cours du temps dû à l'augmentation de la résistance causée par la passivation de l'électrode, mais aussi à cause de la faible stabilité dans le temps des enzymes immobilisées.

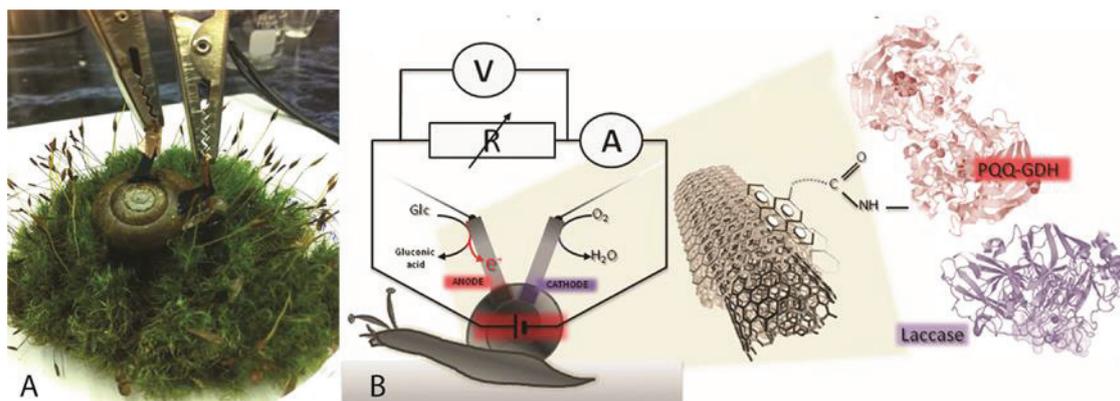


Fig. 37 : (A) Photo de l'escargot avec les électrodes implantées. (B) Circuit de l'EBFC implantée dans un escargot couplant une bioanode à Gdh et une biocathode à laccase, toutes deux constituées de nanotubes de carbone (Halamkova et al. 2012).

c) EBFC fonctionnant avec d'autres types d'enzymes

Parmi d'autres exemples d'EBFCs, certaines ont été développées avec une bioanode à cellobiose déshydrogénase (CDH) fonctionnant avec un DET. Les CDH sont capables de catalyser l'oxydation de la cellobiose et du lactose mais elles peuvent aussi selon leurs origines, oxyder des monosaccharides tels que le glucose (Zamocky et al. 2006). Ces enzymes sont composées de deux grands domaines structuraux : « la tête » portant un cofacteur de type FAD et « la queue » contenant un hème (Igarashi et al. 1999) (Fig. 10). En 2010, une équipe suédo-autrichienne a publié des travaux décrivant le développement d'une EBFC à glucose opérant dans un sérum humain (Fig. 38) (Coman et al. 2010). Sur des électrodes de graphite, la cellobiose déshydrogénase de *Corynascus thermophilus* (CDH_{ct}) et la bilirubine oxydase (BOD) de *myrothecium verrucaria*, toutes deux purifiées, ont été adsorbées respectivement au niveau de l'anode et de la cathode. La CDH_{ct} oxyde la cellulose mais a aussi la particularité d'avoir une activité catalytique pour l'oxydation du glucose à pH neutre. Par conséquent, au niveau de la bioanode, le glucose est oxydé en gluconolactone par le domaine flavinique. Les électrons sont ensuite transférés de l'hème à l'électrode par un DET. Au niveau de la cathode, la BOD catalyse la réduction du dioxygène. Dans un sérum humain, cette biopile est capable de fournir une densité de puissance de $4 \mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$ à +0,19 V.

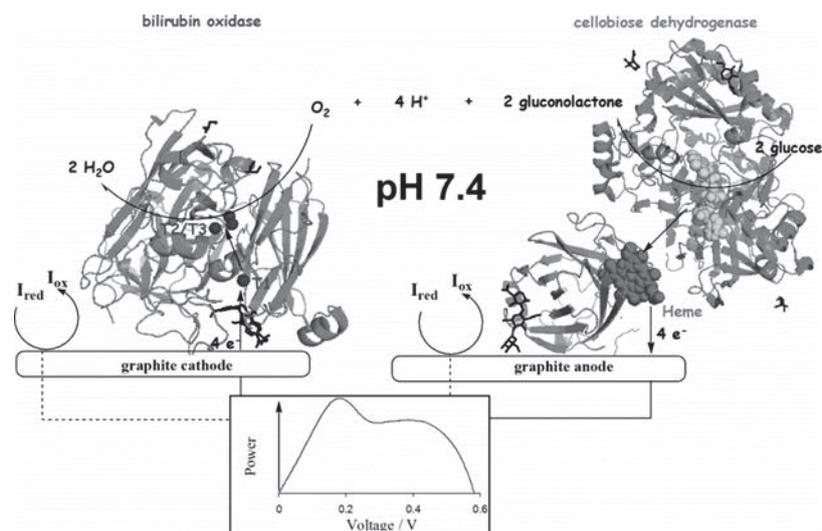


Fig. 38 : Schéma d'une EBFC alimentée par le couple glucose/oxygène dans un sérum humain. Cette EBFC est constituée d'une bioanode fonctionnant avec un DET impliquant une cellobiose déshydrogénase (*Corynascus thermophilus*) et une biocathode opérant avec une bilirubine oxydase (*myrothecium verrucaria*) par un DET (Coman et al. 2010).

Depuis 2007, Sony corporation a travaillé sur le développement d'une EBFC à glucose très performante en terme de puissance électrique (10 mW.cm^{-2}) (Sakai et al. 2009). Elle est composée de bio-électrodes en fibres de carbone poreux et d'assemblages formés à partir de polymères chargés. La bioanode est composée d'une couche de médiateurs associée à deux enzymes : une Glucose déshydrogénase (GDH) et une diaphorase (ou NAD(P)H *dehydrogenase*). Les diaphorases sont des déshydrogénase à NAD(P)H qui sont capables de réduire des substrats organiques comme le nitrobleu de tétrazolium et d'oxyder les cofacteurs nicotiniques réduits. Sur la bioanode, La GDH permet d'oxyder le glucose en présence de NAD^+ et le NADH produit est ensuite oxydé par la diaphorase qui est capable de réduire le 2-méthyl-1,4-naphtoquinone (vitamine K3) utilisée comme médiateur (Fig. 39A). Tous ces éléments sont immobilisés sur l'électrode à l'aide d'un polymère anionique (polyacrylate) associé à un polymère cationique (poly-L-lysine). La biocathode fonctionne avec une bilirubine oxydase associée au médiateur $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$, tous deux immobilisés avec de la poly-L-lysine (Fig. 39A). De 2007 à 2010, Sony a pu augmenter les performances de sa biopile en optimisant son fonctionnement (Fig. 39B). En 2007, une biopile utilisant le 2-méthyl-1,4-naphtoquinone (vitamine K3) comme médiateur au niveau de la bioanode, a fourni une puissance de $1,5 \text{ mW.cm}^{-2}$. En 2008, le remplacement de ce dernier par du 2-amino-1,4-naphtoquinone (ANQ) a doublé la puissance de la pile (3 mW.cm^{-2}). La modification de l'électrolyte (tampon imidazole à la place d'un tampon phosphate) a permis la même année d'atteindre une densité de puissance de 5 mW.cm^{-2} . Finalement en 2010, une puissance de 10

$\text{mW}\cdot\text{cm}^{-2}$ a été obtenue grâce à l'usage d'une biocathode hydrofuge (impermeable à l'eau) permettant de garder l'électrode en contact avec l'air pour une oxygénation optimale. Lors du FC EXPO 2009, le « *Advanced Materials Laboratories* » de Sony a présenté une biopile de 39,7 g fonctionnant avec le couple Glucose/oxygène et pouvant alimenter un lecteur MP3 (Fig. 39C)

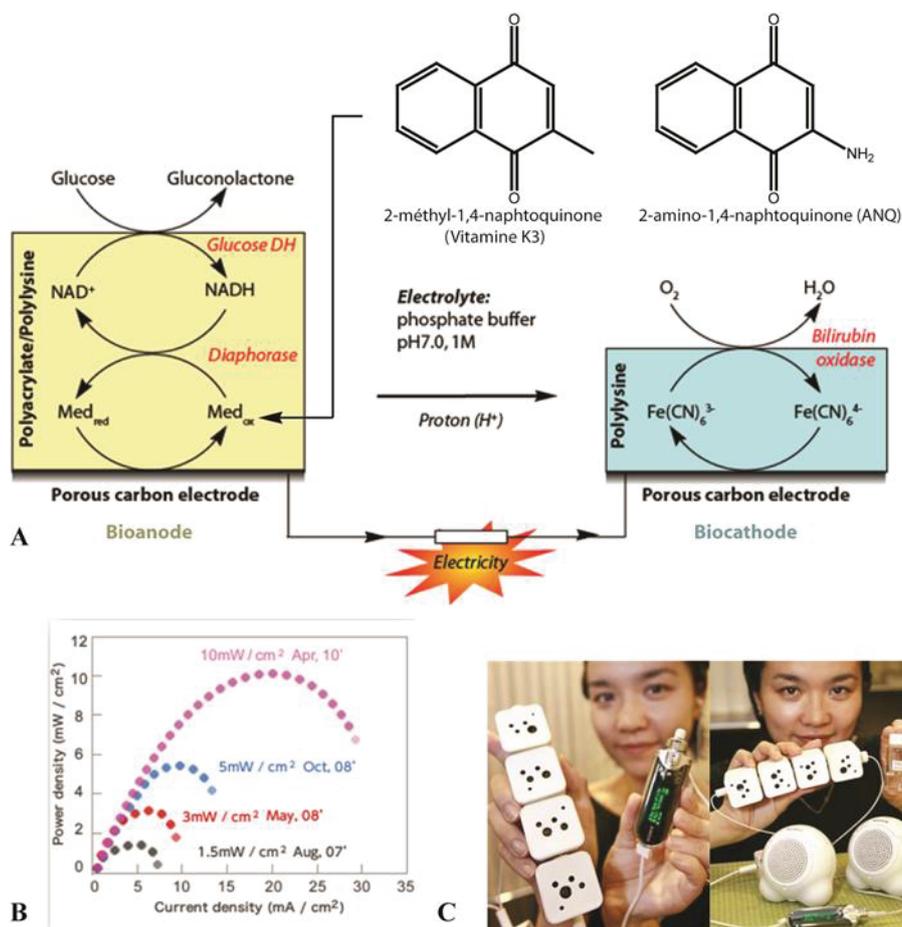


Fig. 39 : (A) Schéma du fonctionnement de l'EBFC de Sony© avec les structures des médiateurs utilisés à l'anode. (B) courbes de densité de puissance décrivant l'accroissement en puissance de l'EBFC à travers son développement entre 2007 et 2010. (C) Photos illustrant l'alimentation d'un lecteur MP3 par l'EBFC (source : <http://www.sony.net/SonyInfo/technology>).

I.8.2.3. Etat actuel des biopiles et perspectives

L'utilisation des biopiles dans les applications de la vie courante nécessite de combler un « gap » de crédibilité sur l'échelle des puissances électriques (Fig. 40) (Bullen et al. 2006). Calabress Barton (Barton et al. 2004) estime qu'une surface de 100 nm^2 recouverte d'une monocouche d'enzyme capable de réaliser un transfert de 500 électrons par seconde peut générer une densité de courant de $80 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$. Cependant, pour être utilisé comme source d'alimentation commune, cette surface doit fournir une densité de courant 100 fois plus

importante. De plus les tensions électriques générées par ces biopiles sont loin de pouvoir rivaliser avec les piles à combustible actuelles. Il en résulte ainsi une faible densité de puissance électrique ne dépassant pas les $\text{mW}\cdot\text{cm}^{-2}$, tandis que les batteries inorganique sont capables de fournir des puissances comprises entre 10 et $100 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$. Afin de combler cet écart, le développement des biopiles doit viser à accroître l'efficacité des réactions bio-électrochimiques en améliorant les interfaces électrode-enzyme. Par ailleurs, les outils de biologie moléculaire permettraient d'améliorer ou de créer de nouveaux biocatalyseurs adaptés aux applications en bioélectronique.

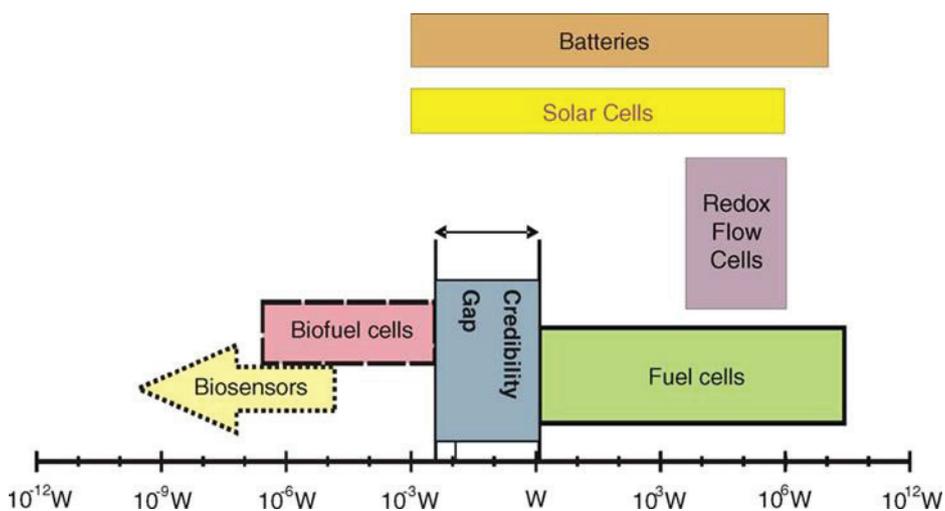


Fig. 40 Estimation des puissances électriques produites par les biocapteurs, les biopiles et les piles et batteries inorganiques actuelles (Bullen et al. 2006)

II. Ingénierie enzymatique pour la bioélectronique

II.1. Problématique

En bioélectronique, les enzymes principalement employées sont la glucose oxydase et les déshydrogénases au niveau de l'anode. Les laccases, les peroxydases ainsi que la bilirubine oxydases sont employées sur la cathode. Les centres redox de ces protéines sont souvent enfouis et les transferts d'électrons générés par ces enzymes sont liés à des mécanismes sophistiqués. Par conséquent, dans la nature, elles ne sont pas optimisées pour des transferts bio-électrochimiques. Dans le cas des biopiles enzymatiques, la stabilité et l'orientation des biocatalyseurs sur une électrode sont les principaux facteurs limitant. Certaines enzymes comme la glucose oxydase fonctionnent naturellement à des pH inférieures à 7. D'après Wong, son usage dans des biocapteurs enzymatiques bio-implantables dans le sang est compromise par le pH physiologique et la concentration en NaCl sanguin (pH 7,3 ; [NaCl] 98-109 mM.) (Wong et al. 2003). Le potentiel redox des oxydoréductases dans une biopile, est également un paramètre important en terme de puissance électrique (Bullen et al. 2006; Rodgers et al. 2010). D'autre part, afin d'améliorer le transfert électronique, il est parfois nécessaire de déglycosyler l'enzyme pour réduire la distance avec l'électrode. Cette opération nécessite, un prétraitement (oxydation, digestion enzymatique) pouvant altérer l'activité de l'enzyme (Tiziani et al. 2003). En résumé, l'association entre un centre redox d'une enzyme et une électrode peut être vue comme un couple accepteur-donneur d'électron séparé par une « coque » isolante formée d'acides aminés et de groupements glycosylés.

II.2. Solutions apportées par l'ingénierie des protéines

L'ingénierie enzymatique permettrait de créer de nouveaux « *designs* » structuraux qui amélioreraient le contact électronique, les vitesses de transfert d'électrons et la stabilité des enzymes aux interfaces enzyme-électrode (Gueven et al. 2010). De plus, ces modifications permettraient également d'obtenir des enzymes fonctionnant dans un plus large spectre de conditions physico-chimiques (pH, force ionique, température). Par ailleurs, l'insertion de sites d'ancrages localisés à la surface d'enzymes conduirait à la possibilité d'immobiliser et d'orienter ces protéines de manière contrôlée sur une électrode.

Dans le but d'optimiser des enzymes pour diverses applications biotechnologiques, deux grandes stratégies peuvent être utilisées (Tableau 6) : l'approche de conception rationnelle impliquant des modifications ciblées sur une enzyme par mutagenèse dirigée

(Wong et al. 2007), et l'approche par évolution dirigée ou mutagenèse aléatoire qui requièrent une méthode de criblage adaptée à la propriété recherchée (Wong et al. 2006).

Tableau 6 : Principales stratégies pour améliorer le transfert d'électrons entre une enzyme et une électrode.

Approche rationnelle	Evolution dirigée
<ul style="list-style-type: none"> • Clivage de domaine protéique • Modification de la surface protéique pour l'orientation et l'immobilisation en surface • Mutation au niveau du site actif 	<ul style="list-style-type: none"> • Activité pour de nouveaux substrats ou cofacteurs • Stabilité (pH, température, force ionique, solvant organique, stress oxydatif) • Accessibilité du site actif

II.2.1. Approche de conception rationnelle : modifications ciblées

L'approche rationnelle vise à introduire des mutations de manière réfléchie dans le gène qui code pour le biocatalyseur. Cette approche nécessite une connaissance structurale et fonctionnelle approfondie de l'enzyme.

Afin d'améliorer le transfert d'électrons sur une électrode, la substitution de résidus au niveau ou à proximité du centre redox d'une enzyme peut être réalisée. Ce type de modification a permis d'augmenter d'un facteur 4 la sensibilité d'un biocapteur ampérométrique à histamine fonctionnant avec une méthyle amine déshydrogénase (MaDH). Un mutant de la MaDH avec une plus grande affinité pour son substrat (K_M diminué de 400 fois) a été obtenu en substituant une phénylalanine par une alanine au niveau de la poche du site actif (Phe55Ala) (Bao et al. 2002). Un mutant thermostable de la glucose deshydrogénase de *Acinetobacter calcoaceticus* fonctionnant à 55°C a été obtenu par l'introduction de résidus hydrophobes au niveau de l'interface de dimérisation (Tanaka et al. 2005).

Un mutant de la pyranose 2-oxydase (P2Ox) avec une activité catalytique accrue pour une application dans une biopile a été obtenu par une approche semi-rationnelle (Spadiut et al. 2009). Cette approche consiste à générer de multiples mutations dans une zone ciblée d'une protéine notamment la région du site actif. Cette méthode a conduit à un double mutant P2Ox (V546C/T169G) avec une constante catalytique (k_{cat}) pour des médiateurs redox (1,4 benzoquinone (BQ) et ferrocène (Fc)) 40 à 50 fois supérieures à celle de l'enzyme sauvage. En présence de D-galactose et de BQ ou de Fc, ce mutant présente une efficacité catalytique 10 fois supérieure à celle obtenu avec l'enzyme sauvage. La mise au point d'une biopile fonctionnant avec une bioanode associée à ce mutant sera donc intéressante.

Les oxydases multi-cuivrées ont une efficacité catalytique corrélée au potentiel de leur centre cuivre de type 1. Ce dernier est coordonné par des acides aminés modulant son potentiel (Shleev et al. 2005). Une étude portant sur la compréhension des variations du potentiel de ce centre cuivre a été réalisée à partir de mutations ciblées sur l'azurine de *Pseudomonas aeruginosa* (Marshall et al. 2009). Il a été suggéré que plusieurs effets sont impliqués dans la modulation de ce potentiel tel que l'hydrophobicité des ligands axiaux et les interactions π - π (*stacking*) entre résidus aromatiques. Les liaisons hydrogène adjacentes au centre redox influençant la distance entre le cuivre et ces ligands et d'autres liaisons ioniques, sont également impliquées. A partir de ces observations, trois mutations ciblées ont été introduites dans l'azurine (N47S, F114N, M121L) permettant de passer d'un potentiel faible (265 mV) à un potentiel élevé (640 mV) au niveau du cuivre T1. L'une de ces mutations permet d'augmenter l'hydrophobicité du ligand axial du complexe T1 en position 121 (M121L). Les deux autres mutations permettent de moduler des liaisons hydrogène à proximité du complexe modifiant l'environnement électronique du cuivre. Cette étude a montré que les effets modulant le potentiel du cuivre T1 sont multiples et additifs.

Un transfert d'électrons entre une enzyme et une électrode nécessite souvent l'immobilisation et l'orientation du biocatalyseur sur une surface, et cela sans altérer son activité enzymatique. Grâce à l'ingénierie moléculaire, plusieurs méthodes visant à introduire des sites d'ancrages dans la protéine ont été développées. L'adsorption directe de certains biocatalyseurs sur une surface a pu être réalisée par l'insertion par substitution de résidus chargés proches de leurs centres redox (Gueven et al. 2010). Par ailleurs, la substitution de certains résidus par des cystéines, offre la possibilité d'immobiliser des biocatalyseurs par des ponts disulfures. Cette stratégie a été utilisée pour immobiliser sur une surface d'or, une azurine et une plastocyanine (Davis et al. 2003; Andolfi et al. 2004; Kim et al. 2008). L'introduction d'un site d'affinité à l'extrémité C- ou N-terminale d'une enzyme, permettrait d'immobiliser des protéines sur des surfaces affines à ces sites. Balland et ses collaborateurs ont immobilisé une laccase recombinante portant une étiquette polyhistidine sur une surface d'or modifiée par une monocouche de thiol-NTA (acide nitrilotriacétique) (Balland et al. 2008). Cet assemblage a conduit à la formation d'une monocouche dense de laccases immobilisées présentant une stabilité et une activité enzymatique équivalente à celles obtenues en solution. Une peroxydase portant une étiquette poly-histidine en C-terminal et immobilisée sur une surface d'or a permis d'obtenir une vitesse de transfert d'électrons 30 fois supérieure à celle de la protéine sauvage adsorbée (Ferapontova et al. 2002). D'autre part,

des acides ferrocènes carboxyliques greffés sur une GOx modifiée génétiquement par l'ajout d'une chaîne polylysine (C-terminal) a permis de développer un biocapteur à glucose avec une gamme linéaire 2 fois plus importante qu'avec l'enzyme native (de 0 à 45 mM au lieu de 0 à 20 mM) (Chen et al. 2002).

Malgré de nombreux résultats prometteurs, toutes ces stratégies mènent le plus souvent à des échecs. Cependant, l'essor constant des techniques de biologie moléculaire et l'accumulation permanente d'informations concernant les structures et les fonctions des enzymes permettent de voir émerger de nouvelles approches rationnelles.

II.2.2. Evolution dirigée

L'obtention de biocatalyseurs taillés sur mesure pour le développement de biopiles ou de biocapteurs électrochimiques nécessite des modifications structurales complexes. L'évolution dirigée permet de contourner cette complexité. Au départ nommée mutagenèse aléatoire (Arnold 1993; Arnold 1998), l'évolution dirigée désigne aujourd'hui l'ensemble des techniques de biologie moléculaire qui ont pour but d'améliorer un ou des paramètres d'une enzyme *via* la création de banques de mutants. Ces banques sont composées de quelques centaines à plusieurs milliers de mutants générés de façon aléatoire. Généralement, les mutations sont introduites soit par PCR de basse fidélité, soit par recombinaison de fragments de gènes (Fig. 41). Cependant, la difficulté de cette approche est liée à la nécessité d'utiliser une méthode de criblage à haut débit permettant de sélectionner les mutants d'intérêt. Cette contrainte est accrue par le fait que la méthode de criblage doit être adaptée spécifiquement à ce que l'on recherche.

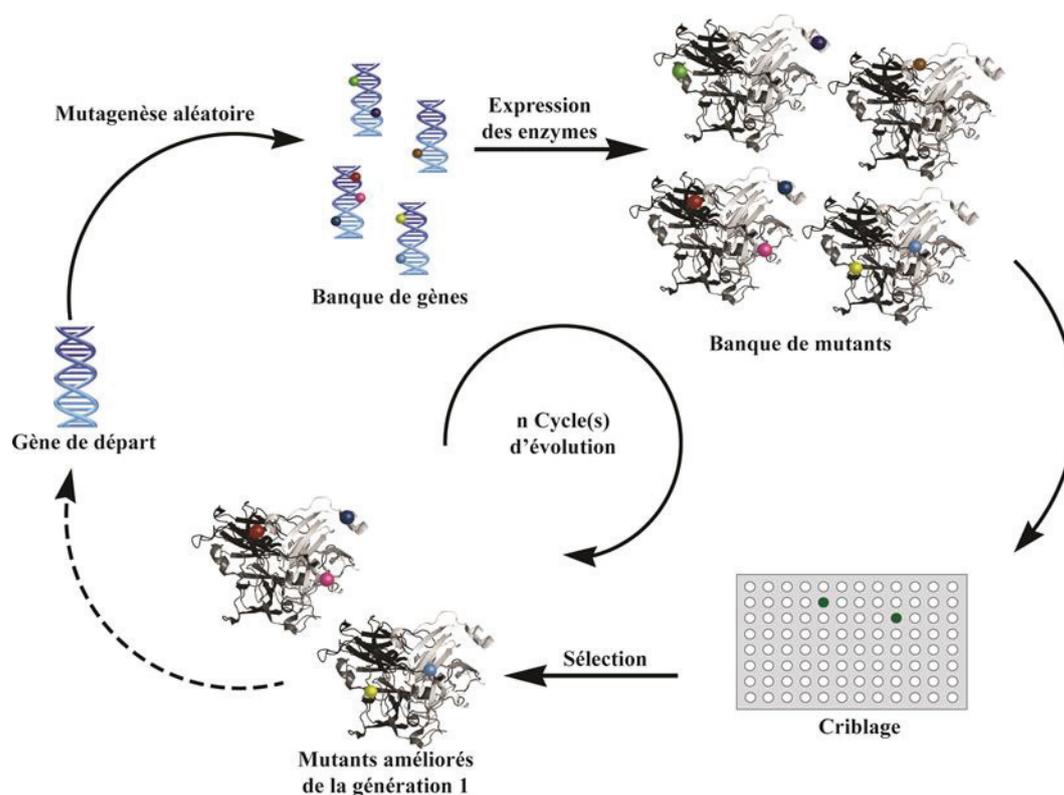


Fig. 41 : Schéma de principe d'un cycle d'évolution dirigée.

Dans le cas des laccases, la stratégie d'évolution dirigée a été appliquée à des fins industrielles impliquant des procédés de biocatalyse tels que l'industrie du textile et de l'agro-alimentaire, la fabrication de papier et le traitement de la biomasse (ex : lignocellulose) (Couto et al. 2006; Widsten et al. 2008; Canas et al. 2010). En plus de l'énorme potentiel porté par ces enzymes, cette stratégie vise à améliorer leur expression et à élargir leur spectre d'activité afin d'optimiser et parfaire leur usage dans ces nombreuses applications. Pour cela, l'évolution dirigée a pour but de cibler des mutants laccases avec des potentiels redox élevés et/ou thermostable et/ou fonctionnant dans des conditions physico-chimiques non conventionnelles pour ces enzymes (solvant organique, pH extrême...). Le rendement d'expression de la laccase thermostable de *Myceliophthora thermophila* a été augmenté de 170 fois dans un système d'expression utilisant *Saccharomyces cerevisiae*. Cette augmentation est le produit entre l'obtention d'un mutant avec un k_{cat} 22 fois plus élevé que celui de l'enzyme sauvage et une quantité de laccase exprimée huit fois plus importante. Ce résultat a été obtenu après un cycle de mutagenèse par PCR de basse fidélité suivi de 9 cycles par recombinaison *in vivo* « *shuffling* » (Bulter et al. 2003). Un brassage par recombinaison a été réalisé entre le gène *lac3* et le gène *lac1*, *lac2* ou *lac5* codant pour des laccases provenant de *Trametes sp.* (souche C30) et présentant de forte homologie de séquence (entre 65 et 71 %)

(Cusano et al. 2009). Une laccase chimère avec un k_{cat} 31 fois plus élevé à pH alcalin (pH 8) (comparé aux laccases sauvages) a été obtenue à partir de la recombinaison entre le gène lac3 et lac1. Cette évolution a donc permis entre autre d'augmenter la stabilité de l'enzyme à pH alcalin. D'autres travaux ont permis d'obtenir une laccase fonctionnant à des pH proches de celui du sang humain (~ pH 7,4) et résistante à l'effet inhibiteur des ions chlorures présent dans le sang humain (~ 150 mM) (Mate et al. 2013).

D'autre part, dans un contexte bioélectronique, l'évolution dirigée des laccases reste encore dans le cadre des perspectives (Shleev et al. 2008; Rodgers et al. 2010) car aucun outil électrochimique ne permet de cribler des banques contenant un nombre conséquent de mutants.

Ainsi, l'évolution dirigée appliquée à la bioélectronique nécessiterait idéalement une méthode de criblage électrochimique. Néanmoins, la plupart des travaux publiés utilisant l'évolution dirigée en vue d'applications à la bioélectronique, sont basés sur des méthodes de criblages colorimétriques (Cusano et al. 2009; Miele et al. 2010; Camarero et al. 2012). De telles méthodes permettent uniquement de cribler des mutants fonctionnant avec des substrats en solution. L'équipe de Schwaneberg a criblé des banques de mutants de la glucose oxydase (de *Aspergillus niger*) pour le développement de biopiles enzymatiques (Zhu et al. 2006; Zhu et al. 2007; Gueven et al. 2010; Yu et al. 2011). Des mutants ont été criblés par une méthode colorimétrique impliquant une séquence de trois réactions enzymatiques aboutissant à la formation de NADPH dosé par absorbance à 340 nm (Fig. 42). Le gluconolactone produit à partir de l'oxydation du glucose par la GOx est hydrolysé en D-gluconate à pH basique. Ce dernier est ensuite phosphorylé par la gluconate kinase (GK) pour donner du D-gluconate-6-phosphate qui est par la suite oxydé par une 6-phosphogluconate déshydrogénase (6-PGDH) en ribulose-5-phosphate. Cette dernière oxydation enzymatique permet de réduire du NADP^+ en NADPH.

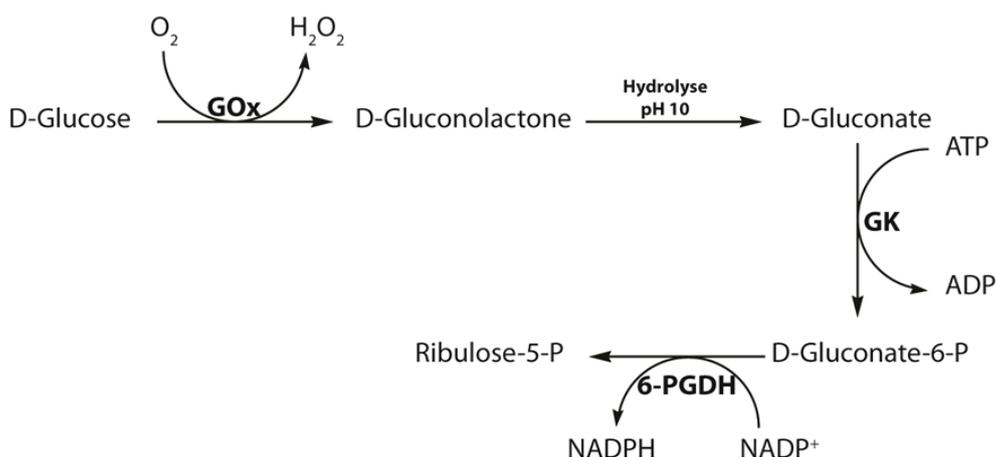


Fig. 42 : Schéma réactionnel menant à la formation de NADPH mesurée à 340 nm, permettant de détecter une activité glucose oxydase (GOx). GK : gluconate kinase ; 6-PGDH : 6-phosphogluconate déshydrogénase (Zhu et al. 2006).

Les mêmes auteurs ont également développé, pour l'évolution dirigée de la même enzyme (GOx d'*Aspergillus niger*), un test colorimétrique avec un médiateur redox : le ferrocène-méthanol (Zhu et al. 2007). Sous sa forme réduite, ce dernier présente une coloration jaune et une coloration bleue sous sa forme oxydée. Ce changement de coloration peut être suivi à 625 nm. En présence de glucose, la GOx est capable d'utiliser ce médiateur comme accepteur d'électron à la place du dioxygène (Fig. 43). Ainsi, un test capable de mesurer l'activité de la GOx avec le ferrocène-méthanol a permis de cribler une banque de mutants produite par PCR de basse fidélité. Un double mutant (T30S I94V) a été obtenu avec une thermostabilité accrue (de 58°C à 62°C), et une meilleure stabilité à pH alcalin.

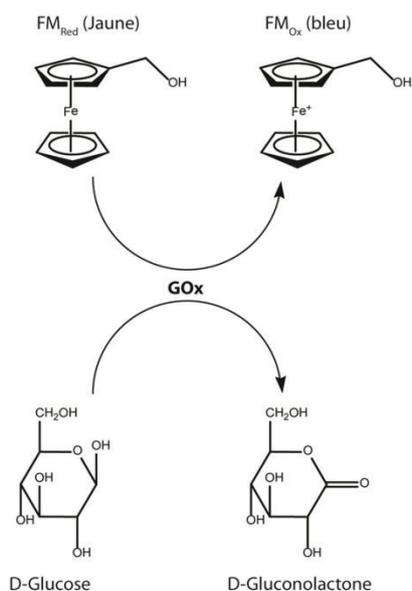


Fig. 43 : Schéma réactionnel entre le ferrocène-méthanol (FM) et la GOx.

Ces tests sont intéressants dans le cadre du criblage de mutants fonctionnant avec des médiateurs redox, tandis que dans le cas d'un DET il est nécessaire d'utiliser une méthode électrochimique. A l'heure actuelle, il existe peu de travaux décrivant des méthodes électrochimiques permettant de cribler aisément et à haut débit un DET ou un MET entre enzyme et une électrode. Parmi des exceptions, on retrouve les récents travaux menés par Bartlett décrivant la mise au point d'une méthode permettant de cribler électrochimiquement et simultanément des médiateurs redox du NADH (Pinczewska et al. 2012). Cette méthode de criblage offre la possibilité de réaliser simultanément des mesures voltammétriques sur 60 électrodes (Fig. 44). Cependant, ces mesures ne peuvent être effectuées que dans un seul électrolyte car le système utilisé est limité à l'usage d'une seule contre-électrode et d'une seule référence.

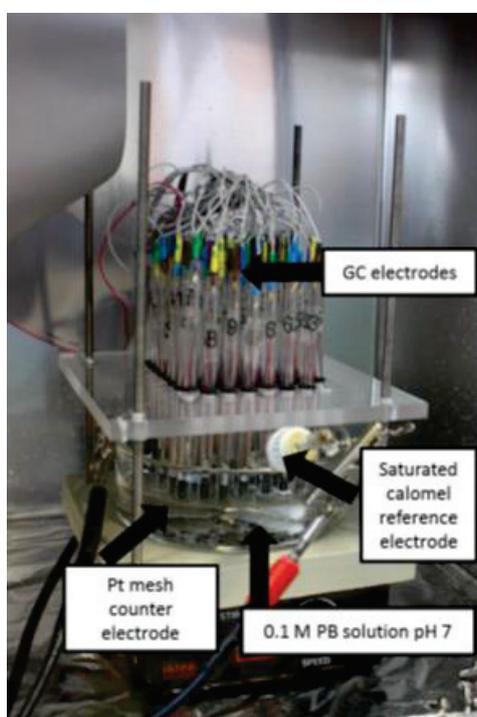


Fig. 44 : Photo du système de criblage à 60 électrodes élaboré par l'équipe de Bartlett. Ce système est composé de 60 électrodes de travail en carbone vitreux (GC electrodes) associées à une électrode de référence de calomel (chlorure mercureux) saturée au KCl, et d'une contre électrode de platine (Pt mesh counter electrode). Cette ensemble d'électrodes est immergé dans du tampon phosphate (0,1 M, pH 7) (Pinczewska et al. 2012).

L'évolution dirigée permet donc d'améliorer des biocatalyseurs sans la nécessité d'avoir des connaissances approfondies sur leurs structures. Cependant, il est essentiel d'utiliser des outils de criblage adaptés aux propriétés recherchées.

Matériels et méthodes

I. Produits et appareillages

I.1. Produits chimiques

Les sels monosodiques et disodiques de β -nicotinamide adénine dinucléotide oxydé (NAD^+) et réduit (NADH), l'Alizarine Red S (ARS), le 4-aminophenylboronate de pinacol (PE), le bleu de toluidine (TBO), le rouge neutre (NR), l'azure A (AA), le bleu de cresyl brillant (BCB), la thionine (Th), le perchlorate de sodium (NaClO_4), le fluorure de sodium (NaF), le périodate de sodium (NaIO_4), le chlorure de cuivre (CuCl_2), le chlorure de nickel (NiCl_2), le chlorure de manganèse (MnCl_2), l'imidazole, la L-cystéine, le dithiothréitol (DTT), l'albumine de sérum bovin (BSA), le phénazine éthosulfate et le nitrobleu de tétrazolium (NBT) proviennent de Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France). Les sels monosodiques et disodiques de phosphate (NaH_2PO_4 et Na_2HPO_4), le chlorure de potassium (KCl), l'acide chloridrique (HCl), l'hydroxyde de sodium (NaOH), le tétraborate de sodium ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$), le nitrite de sodium (NaNO_2), le nitrate de sodium (NaNO_3), le sulfate d'ammonium ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), le formiate de sodium (NaHCO_2), l'acide citrique, l'acide acétique, l'azoture de sodium (NaN_3), le 2,2'-azino-bis(acide 3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique) (ABTS), le ferrocyanure de potassium ($\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$) et le ferricyanure de potassium ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$) ont été fournis par Prolabo (Val de Fontenay, France). L'acide 3-aminophénylboronique (AB) et le nitrosonium tétrafluoroborate (NOBF_4) ont été fournis par Alfa Aesar (Karlsruhe, Allemagne). Le 4-bromophényl diazonium tétrafluoroborate (Br^+) provient de Fluka (Buchs, Suisse). Le réactif de Bradford a été fourni par Biorad (Marne-la-Coquette, France).

I.2. Enzymes

La formiate déshydrogénase de *Candida boidini* (FDH, E.C. 1.2.1.2, 200 $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$) provient de Jülich Fine Chemicals (Jülich, Allemagne). La laccase de *Trametes versicolor* (TvLac, E.C 1.10.3.2, 21,7 $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$) a été fournie par Fluka (Buchs, Suisse)

I.3. Electrodes

Les mesures avec le potentiostat Voltalab PGZ 301 et avec le multi potentiostat VMP3 ont été réalisées, soit sur des électrodes de carbone vitreux (ECV) de surface 7 mm^2 achetées chez Bioanalytical Systems (Lafayette, USA), soit sur des électrodes d'or de 29 mm^2 de surface, fournies par Sigma-Aldrich (Lyon, France).

I.4. Sérigraphie

Les encres de sérigraphie d'argent/chlorure d'argent (Ag/AgCl) (Electrodag® 6038SS) et de carbone (Electrodag® PF-407C) ont été fournies par ACHESON (Scheemda, Pays Bas).

Des plaques de circuit imprimé (PCB) ont été conçues sur-mesure par Cirly (Brignais, France).

Une machine à sérigraphie DEK 248 (Weymouth, Royaume Uni) a été utilisée pour sérigraphier les 96 paires d'électrodes sur les PCB.

I.5. Appareillages

I.5.1. Electrochimie

Les mesures de voltammétrie cyclique, de chrono-ampérométrie, et de spectroscopie d'impédance électrochimique (SIE) ont été réalisées avec le potentiostat Voltalab PGZ 301, (Radiometer Analytical, Villeurbanne, France) à l'aide du logiciel Voltmaster 4 V5 (Radiometer Analytical, Villeurbanne, France).

Le Multi Potentiostat VMP3 (Bio-logic, Claix, France) a été utilisé pour les mesures de voltammétrie cyclique avec le rouge d'alizarine S (ARS). L'appareil est contrôlé par le logiciel EC-Lab v.9.46.

Les mesures ampérométriques pulsées par intermittence (IPA) ont été effectuées sur le lecteur de plaque électrochimique AndCare 9600 (Fig. 49C) fourni par Alderon Biosciences (Beaufort, Caroline du Nord, USA). L'appareil est utilisé avec le logiciel « 96 well reader » développé par Alderon Biosciences.

I.5.2. Spectrométrie

Les mesures d'adsorption et de fluorescence ont été réalisées à l'aide du lecteur de plaque Tecan Infinite M200 (Salzburg, Autriche). Les données ont été acquises avec le logiciel Magelan v. 6.5 (Tecan, Grödig, Autriche).

Les spectres infrarouges ont été obtenus avec le spectrophotomètre FT-IR iS10 de Thermo Scientific (Courtaboeuf, France) avec le logiciel Omnic V8 de Thermo Fisher Scientific.

Les spectres de masse ESI⁺ (« ElectroSpray Ionisation ») ont été réalisés par le service commun de spectrométrie de masse de l'ICBMS. L'appareil utilisé est le THERMO LCQ Advantage.

I.5.3. Mesures de profilométrie

Les analyses topographiques des électrodes de sérigraphie des plaques de criblage électrochimique (PCE) ont été réalisées avec le profilomètre NJ-optimal-imager (Nanojura, Besançon, France). Les mesures ont été traitées avec le logiciel Mountain Map de Digital Soft (Besançon, France).

I.5.4. Mesures par imagerie de résonance plasmonique de surface (SPRi)

Pour étudier l'immobilisation de molécule sur des surfaces d'or, des mesures de réflectivité ont été réalisées sur des prismes SPRi (SPRi-bioshipTM) à l'aide du système SPRi-Lab+ de Genoptics (Orsay, France).

I.6. Biologie moléculaire

I.6.1. Produits et matériel

Les expériences de biologie moléculaire ont été réalisées au sein du laboratoire d'Organisation et Dynamique de Membranes Biologiques (ODMB) de l'ICBMS. Le gène de la laccase CotA de *Bacillus subtilis* a été fourni dans le vecteur d'expression pET-28b, par le Dr Alexandre Noiriél (ODMB). Les souches électro-compétentes de clonage *E.coli* Top 10 ont été achetées chez Invitrogen (Saint Aubin, France) et les souches électro-compétentes d'expression *E.coli* BL21 (DE3) proviennent de Lucigen (Middletown, USA). Le milieu de culture LB (Lysogeny Broth ou Luria-Bertani) contenant 10 g.l⁻¹ de tryptone, 10 g.l⁻¹ de NaCl et 5 g.l⁻¹ d'extrait de levure, a été fourni par Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France). L'agar provenant du même fournisseur a été utilisé avec le LB pour préparer des milieux de culture solides sur boîte de Petri. La kanamycine et l'isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) proviennent d'Interchim (Montluçon, France). Le lysozyme de blanc d'œuf de poulet a été fournis par Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-en-Fallavier, France). Les séquençages ont été réalisés par Euronfins MGW Operon (Ebersberg, Allemagne). Les ADN ont été quantifiés à l'aide d'un spectrophotomètre « NanoDrop 2000 » (Fisher scientific, Illkirch, France). Les ADN plasmidiques ont été extraits et purifiés par Midiprep avec le kit NucleoBond[®] Xtra Midi/Maxi/EF provenant de Macherey Nagel (Hoerdts, France). Le kit de dessalage d'ADN

QIAquick de Qiagen (Courtaboeuf, France) a été utilisé. Les dNTP (désoxy Adénosine/Cytosine/Guanosine/Thymidine triphosphate) ont été fournis par Invitrogen (Cergy Pontoise, France). Les enzymes de restriction XbaI (10 U. μ l⁻¹) et NheI (10 U. μ l⁻¹) proviennent de Jena Bioscience (Jena, Allemagne) ; les enzymes BglII (10 U. μ l⁻¹) et XhoI (20 U. μ l⁻¹) ont été fournies par New England Biolabs (Evry, France). La taq polymérase (5 U. μ l⁻¹) provient de Roche Diagnostic (Mannheim, Allemagne), la 5'phosphatase (Antartic phosphatase, 5 U. μ l⁻¹) a été fournie par New England Biolabs (Evry, France) et la T4 DNA ligase (1 Weiss U. μ l⁻¹) a été achetée chez Invitrogen[®] (Cergy Pontoise, France).

Les plaques de culture stériles Masterblock de 96 puits de 2 ml ont été fournies par Greiner Bio-one (Vienne, Autriche). Les micro-colonnes (1ml) à l'unité et en format 96 sur plaque (plaque Chromafil[®]) proviennent de Macherey Nagel (Hoerd, France). Un électroporateur MicroPulser 165-2100 et des cuves d'électroporations Gene pulser/Micropulser ont été fournis par Biorad (Marne-la-Coquette, France).

I.6.2. Vecteur d'expression pET-28b

Le vecteur pET-28b (Fig. 45) a été utilisé comme vecteur d'expression dans *E. coli* pour la laccase CotA (pET-28b-CotA_{wt}) (annexe 1). Ce vecteur de 5368 pb possède une origine de répllication bactérienne (pBR322), le gène *lacI* codant pour le répresseur de l'expression de l'ARN polymérase du phage T7 elle-même exprimée par la souche d'*E.coli* utilisée (BL21 (DE3)), un gène de résistance à la kanamycine (*kan^R*), une origine de répllication du phage f1 (f1 Ori), un site multiple de clonage (MCS) avec en amont un promoteur fort du phage T7 (T7 pro) et en aval le site de terminaison de ce promoteur (T7 ter). Dans la bactérie, les gènes *lacI* et *kan^R* sont exprimés de manière constitutive. L'expression de CotA est induite par l'ajout d'IPTG qui se lie au répresseur de l'ARN polymérase du phage T7, formant un complexe incapable de se fixer sur l'opérateur en aval du promoteur T7. L'ARN polymérase peut ainsi transcrire le gène CotA.

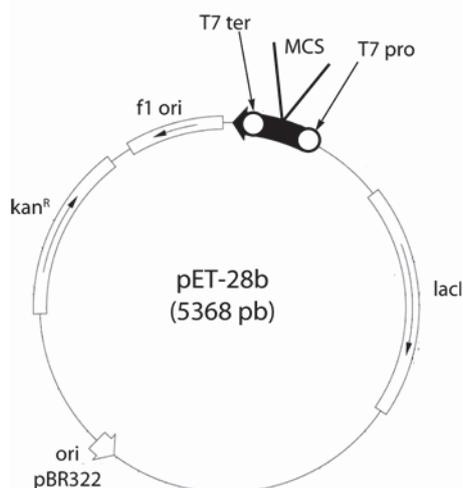


Fig. 45 : Schéma du vecteur *pET-28b* composé d'un gène de résistance à la kanamycine (kan^R), du gène *lacI*, d'une origine de réplication (*ori*) *pBR322* et du phage *f1*, d'un site multiple de clonage (MCS) avec en amont un promoteur fort du phage T7 (*T7 pro*) et en aval le site de terminaison de ce promoteur (*T7 ter*).

II. Méthodes

II.1. Bioanode à déshydrogénase

II.1.1. Préparations et modifications des électrodes

a) Préparations des électrodes

Avant usage, les électrodes de carbone vitreux (ECV) ont été nettoyées par polissage à la pâte de diamant (1 micron, Metadi, Lake Bluff, USA) puis soumises à un traitement aux ultrasons dans l'acétone pour finalement être rincées à l'eau distillée puis séchées à l'air.

Les électrodes d'or (Au) ont été traitées de la même manière aux ultrasons dans un bain d'acétone puis rincées à l'eau distillée avant utilisation.

b) Greffages de diazoniums

Les greffages sur électrodes du bleu de toluidine (TBO), du 4-aminophenylboronate de pinacol (PE), et de bromophényl ont été effectués à partir de leur forme diazotée. Pour le bromophényl, un sel de diazonium commercial a été utilisé : le 4-bromophényl diazonium tétrafluoroborate (Br^+). Avant greffage, 20 mM de Br^+ ont été solubilisés dans une solution de HCl (200 mM). Dans le cas du TBO et du PE, la diazotation de leur fonction aryl amine a été réalisée en milieu aqueux. La diazotation de 1 mM de TBO a été effectuée dans un volume de 5 ml contenant 5 mM de $NaNO_2$, 200 mM de HCl et 10 % (v/v) d'éthanol. La diazotation de

20 mM de PE a été réalisée avec 40 mM de NaNO_2 , 200 mM de HCl et 10 % (v/v) d'éthanol. Ces deux milieux réactionnels ont été incubés 15 min dans la glace sous agitation.

Par ailleurs, un sel de 4-diazonium-phénylboronate de pinacol ($[\text{PE}^+][\text{BF}_4^-]$) a été synthétisé en milieu anhydre en se basant sur les méthodes décrites dans la littérature (Bahr et al. 2001; Harper et al. 2009). Sous argon, 242 mg (2,3 mmol) de NOBF_4 ont été solubilisés dans un volume de 15 ml d'acétonitrile anhydre préalablement refroidit à -40°C dans de l'acétonitrile contenant de la carboglace. Parallèlement, 548 mg (2,4 mmol) de PE ont été solubilisés dans 15 ml d'acétonitrile anhydre sous argon puis ajoutés goutte à goutte dans la solution de NOBF_4 sous agitation. La réaction a été laissée sous agitation jusqu'à que la température atteigne 0°C (environ 2h30). Le produit a été ensuite précipité par l'addition de 250 mM d'éther anhydre froid (4°C) dans le milieu réactionnel sous agitation. Le précipité a été récupéré par filtration sous vide puis séché à l'évaporateur rotatif. Le produit a ensuite été caractérisé par spectroscopie d'infrarouge afin de mettre en évidence la présence de la fonction diazonium. Le spectre obtenu a permis d'observer un pic à 2293 cm^{-1} propre à la fonction aryl diazonium.

Le greffage de diazonium a été réalisé, soit par réduction électrochimique (électro-réduction) à l'aide du potentiostat Voltalab PGZ 301, soit par hydrolyse spontanée en milieu basique de la fonction diazonium. Pour le TBO et le PE, les greffages par électro-réduction ont été réalisés par immersion de l'électrode de travail (carbone vitreux ou or) et d'une électrode platine (contre-électrode et référence) dans le milieu réactionnel directement après la fin de la réaction de diazotation. Le Br^+ a été électro-greffé juste après sa solubilisation dans une solution de HCl (200 mM). Ces greffages électrochimiques ont été effectués par voltammétrie cyclique de deux ou trois cycles de potentiels compris entre 0 et $-1,2\text{ V}$ (*vs.* Pt) à une vitesse de balayage de $0,1\text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$. Le greffage spontané en milieu alcalin a été effectué pour fixer des acides phénylboroniques à la surface d'une électrode modifiée par l'électropolymère du TBO. Ce greffage a été réalisé avec le sel $[\text{PE}^+][\text{BF}_4^-]$. Les conditions alcalines permettent d'une part d'hydrolyser la fonction diazonium pour générer des radicaux (Podvorica et al. 2009). D'autre part, ces mêmes conditions induisent l'hydrolyse de l'ester de pinacol aboutissant ainsi à la déprotection de l'acide boronique. Pour cela 0,4 mM de $[\text{PE}^+][\text{BF}_4^-]$ ont été solubilisés dans du tampon borate (10mM) à pH 9,1 puis l'électrode a été immédiatement incubée dans cette solution 5 min à température ambiante. Après incubation, l'électrode est rincée à l'eau distillée.

c) Electropolymérisation

l'électropolymérisations du TBO et de l'acide 3-aminophényl boronique ont été réalisées par voltammétrie cyclique sur des ECV à l'aide du potentiostat Voltalab PGZ 301, avec une contre-électrode de platine et une référence en Ag/AgCl dans les conditions optimales d'électropolymérisation du TBO (Karyakin et al. 1999). Les 10 cycles de voltammétrie ont été effectués à des potentiels compris entre -0,4 et +0,8 V (vs. Ag/AgCl) à une vitesse de balayage de 0,05 V.s⁻¹.

Le polymère de TBO (polyTBO) a été généré par électropolymérisation de 0,4 mM de TBO dans du tampon borate (10 mM, pH 9,1 contenant 100 mM de NaNO₃). L'électropolymérisation de l'acide 3-aminophénylboronique (3AB) a été effectuée dans les mêmes conditions. Les co-électropolymérisations ont également été réalisées dans ces conditions à partir de solutions contenant 0,4 mM de TBO et différentes concentrations de 3AB (0,1 ; 0,4 ; 0,8 mM).

d) Déprotection de l'acide boronique

Afin de déprotéger les phénylboronates de pinacol gréffés à la surface des électrodes, celles-ci ont été incubées 30 min dans une solution de NaIO₄ à 50 mM (Polsky et al. 2008). Après incubation, les électrodes ont été rincées rigoureusement à l'eau distillée.

e) Immobilisation

L'immobilisation de l'ARS, du NAD⁺ et du NADH a été obtenue sur des électrodes modifiées par des acides phénylboroniques. Ces électrodes ont été incubées 15 min à température ambiante dans des solutions d'ARS (1 mM), de NAD⁺ (10 mM) ou de NADH (10 mM) dans du tampon phosphate (10 mM, pH 7) suivie d'un rinçage à l'eau distillée.

II.1.2. Mesures électrochimiques

a) Caractérisation par voltammétrie cyclique

La voltammétrie cyclique permet de mesurer l'intensité du courant traversant une électrode sous l'effet d'un balayage cyclique d'une gamme de potentiel (Fig. 46). Ces mesures permettent de caractériser les potentiels d'oxydoréduction de molécules à la surface d'une électrode. De plus, la possibilité d'effectuer des balayages cycliques de potentiels permet de vérifier si l'oxydation et la réduction des molécules à la surface de l'électrode est réversible.

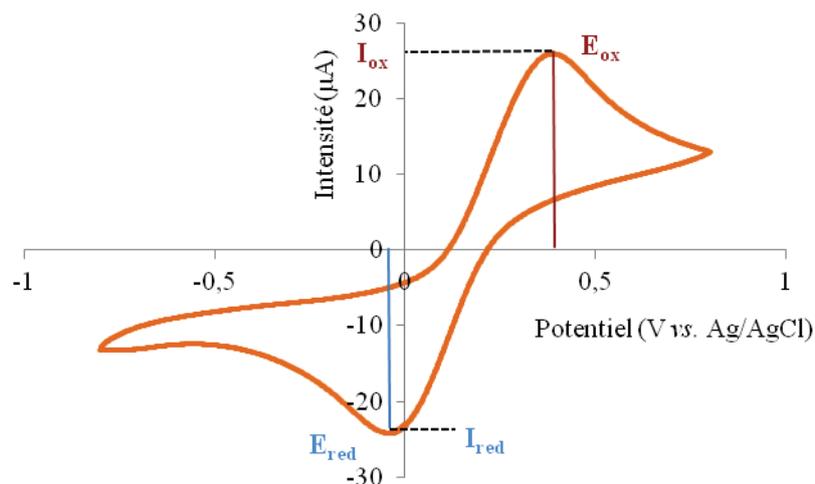


Fig. 46 : Exemple d'un voltammogramme obtenu avec le couple ferricyanure/ferrocyanure (5 mM de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ dans du tampon phosphate 100 mM pH 7) contre une référence Ag/AgCl. E_{ox} et E_{red} correspondent aux pics de potentiel d'oxydation et de réduction. I_{ox} et I_{red} sont les intensités des pics d'oxydation et de réduction

Toutes les caractérisations par voltammétrie cyclique à l'exception de celles réalisées pour l'oxydation directe du NADH et de l'ARS ont été effectuées avec le potentiostat Voltalab PGZ 301 avec un système à trois électrodes comprenant une électrode de travail (ECV ou électrode d'or), une contre-électrode de platine et une référence en Ag/AgCl.

Les caractérisations des ECV nues et modifiées par greffage de TBO ou par électropolymérisation du TBO ont été réalisées dans du tampon phosphate (100 mM, pH 7 contenant 100 mM de KCl). Les voltammétries cycliques ont été effectuées sur deux cycles entre -0,6 et +0,6 V (vs. Ag/AgCl) à une vitesse de balayage de $0,05 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$.

Les voltammogrammes obtenus avec les électrodes d'or modifiées par l'immobilisation d'ARS ont été enregistrés à l'aide du Potentiostat VMP3 dans du tampon phosphate (10 mM, pH7 contenant 100 mM de KCl). Les mesures ont été effectuées entre -1,0 et +0,8 V (vs. Ag/AgCl) à des vitesses de balayage comprises entre $0,01$ et $1 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$.

Les mesures d'oxydation électrochimique du NADH immobilisé sur une surface d'or ont été réalisées à l'aide du Potentiostat VMP3 sur quatre cycles entre -0,1 et +1,0 V (vs. Pt) à $0,1 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$ dans du tampon phosphate (10 mM, pH7 contenant 100 mM de KCl). Les deux premiers cycles ont été effectués immédiatement après immobilisation du NADH. Le troisième et le quatrième cycle ont été réalisés après 15 min d'incubation de l'électrode avec une solution contenant 300 mM de formiate de sodium et $0,07 \text{ U}\cdot\text{ml}^{-1}$ de formiate déshydrogénase (FDH) à température ambiante.

b) Mesures d'oxydation du NADH par chrono-ampérométrie.

La chrono-ampérométrie consiste à réaliser des mesures de l'intensité de courant en fonction du temps à potentiel fixe.

Les mesures d'oxydation du NADH sur une ECV nue et celles modifiées par le greffage et l'électropolymérisation du TBO ont été réalisées sur le potentiostat Voltalab PGZ 301 par chrono-ampérométrie à +0,15 V (*vs.* Ag/AgCl) avec une contre électrode de platine et une référence en Ag/AgCl. Ces mesures ont été effectuées sous agitation dans 5 ml de tampon phosphate (100 mM, pH 7 contenant 100 mM de KCl). Dans un cas, les signaux d'oxydation sont enregistrés lors d'injections consécutives de 10 μ l d'une solution de 10 mM de NADH. Dans un autre cas, les signaux sont mesurés à partir de NADH produit par réduction enzymatique du NAD⁺. Pour cela, les électrodes sont immergées dans une solution sous agitation contenant des concentrations saturantes de substrats de la FDH (300 mM de formiate de sodium et 5 mM de NAD⁺) et l'enregistrement de l'intensité débute après injection de la FDH (concentration finale : 0,16 U.ml⁻¹).

c) Courbe de puissance

Les mesures de densité de puissance ont été effectuées sur le potentiostat Voltalab PGZ 301 avec des électrodes d'or sur lesquelles a été immobilisé du NAD⁺ associées à une contre électrode de platine et une référence en Ag/AgCl. Les courbes obtenues ont été mesurées à température ambiante et sous agitation par voltammétrie dans une solution de formiate à 300 mM dans du tampon phosphate (100 mM, pH 7 contenant 100 mM de KCl). Ces mesures ont été réalisées entre +0,8 et -1,0 V et (*vs.* Ag/AgCl) avec une vitesse de balayage de 0,1 mV.s⁻¹, en présence ou en absence de 0,07 U.ml⁻¹ de FDH.

d) Mesures de spectroscopie d'impédance électrochimique (SIE)

Cette méthode permet de mesurer la résistance en courant alternatif (impédance) de faible amplitude au niveau de l'interface électrode/électrolyte. Cette résistance est mesurée à différentes fréquences de courant alternatif, ce qui permet d'obtenir une représentation illustrant la résistance créée à cette interface. Les données obtenues sont représentées sous forme d'un diagramme d'impédance dans le plan complexe de Nyquist ($-Z_i$ en fonction de Z_r ; Z_i étant la résistance imaginaire et Z_r la résistance réelle mesurée).

Toutes les mesures SIE ont été effectuées sur le potentiostat Voltalab PGZ 301 avec un système à trois électrodes comprenant une électrode de travail (ECV), une contre électrode

de platine et une référence en Ag/AgCl. Ces mesures ont été réalisées dans une solution contenant 2,5 mM de ferrocyanure de potassium ($K_4[Fe(CN)_6]$) et 2,5 mM de ferricyanure de potassium ($K_3[Fe(CN)_6]$), dans du tampon phosphate (100 mM, pH 7, contenant 100 mM de KCl). Ces mesures ont été effectuées avec un courant alternatif de $\pm 0,05$ V (vs. Ag/AgCl), superposé à un courant continu de 0 V (vs. Ag/AgCl) avec des fréquences comprises entre 5 kHz et 50 mHz.

II.1.3. Mesures de réflectivité par SPRi

La résonance plasmonique de surface (SPR) est un phénomène physique utilisé comme méthode de détection optique. Les méthodes de détection par SPR consistent généralement à mesurer des interactions entre un ligand et un récepteur immobilisé sur une surface d'or où une onde lumineuse (incidente) est réfléchi. Lorsque cette lumière est dirigée sous un certain angle, les photons provoquent une oscillation des électrons libres de l'or (phénomène de résonance plasmonique de surface). Ce phénomène se traduit par une dissipation d'énergie sous forme d'onde évanescente perpendiculaire à la surface et conduit à une diminution de l'intensité de l'onde réfléchi (Fig. 47A). Cette perte d'énergie peut être observée à un angle spécifique (angle de résonance). La variation de cet angle est proportionnelle à l'indice de réfraction du milieu situé au voisinage immédiat de la surface métallique à concurrence de $1\mu\text{m}$ de profondeur. La présence de molécule à la surface modifie l'indice de réfraction permettant ainsi de suivre des interactions de natures différentes. Les méthodes de SPR classique permettent de mesurer la variation de l'angle de résonance en suivant le déplacement de l'angle incident (θ). La SPR par imagerie (SPRi) consiste à mesurer la variation de réflectivité du faisceau lumineux à un angle d'incidence fixe (Fig. 47B).

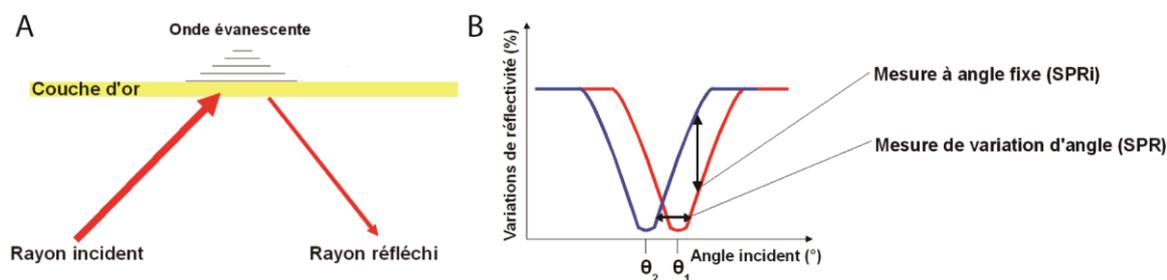


Fig. 47 : (A) Schéma illustrant la perte d'intensité lumineuse sur le faisceau réfléchi traduit par la formation d'une onde évanescente. (B) Graphique décrivant la méthode de SPR classique qui consiste à mesurer la variation de l'angle incident et la SPRi qui permet de mesurer la variation de réflectivité à partir d'un angle incident fixe.

Les mesures de réflectivité ont été réalisées dans du tampon phosphate (10 mM, pH 7) sur un prisme SPRi. Sur ce dernier, trois surfaces de 3 mm² ont été délimitées à l'aide d'un film plastique. Ces surfaces ont été modifiées par électro-greffage de PE⁺ (4-diazoniumphenylboronate de pinacol) et de Br⁺ en utilisant les modalités décrites ci-dessus. Le PE⁺ obtenu par diazotation en milieu aqueux du PE, a été électro-greffé sur les deux premières surfaces dont l'une a été traitée au NaIO₄ afin d'obtenir une surface avec les fonctions acides boroniques déprotégées (AB-Au). L'autre n'a pas subi de déprotection (PE-Au). La troisième surface a été modifiée par électro-greffage de Br⁺ (Br-Au). Durant les mesures de réflectivité, une première série d'injections de trois solutions de NAD⁺ de concentrations croissantes (1, 5, 10 μM dans du tampon phosphate 10 mM, pH 7) ont été réalisées. Par la suite, ces mêmes surfaces ont été soumises à une série d'injection 7 solution de FDH de concentrations croissantes (1 ; 2,5 ; 5 ; 10 ; 25 ; 100 et 500 μg.ml⁻¹ dans du tampon phosphate 10 mM, pH 7). Les volumes des échantillons sont de 500 μl et ont été injectés avec un débit de 130 μl.min⁻¹ à l'aide d'une pompe péristaltique.

II.1.4. Mesure de fluorescence

Excité à 495 nm à un pH de 7, l'ARS émet une fluorescence d'intensité maximale à 580 nm. Cette fluorescence est amplifiée lorsqu'un acide boronique est estérifié avec l'ARS. Il est connu qu'un transfert de proton des hydroxyles aux cétones de l'ARS à un effet atténuateur sur la fluorescence de l'ARS (Palit et al. 1990). Par conséquent, l'estérification avec un acide boronique permet de supprimer cet effet ce qui expliquerait cette amplification de fluorescence. Springsteen a utilisé ce fluorophore pour mettre au point une méthode permettant d'étudier l'estérification entre des acides boroniques et des molécules portant des hydroxyles vicinaux telles que les glucides (Fig. 48) (Springsteen et al. 2001). Cette méthode fonctionne avec un système réactionnel à deux équilibres en compétition. Le premier équilibre s'effectue entre un acide boronique et l'ARS et est directement mesurable par l'augmentation de l'intensité de fluorescence. L'addition de glucide conduit à un deuxième équilibre qui rentre en compétition avec le premier. Ceci déplace le premier équilibre conduisant à une baisse de l'intensité de fluorescence.

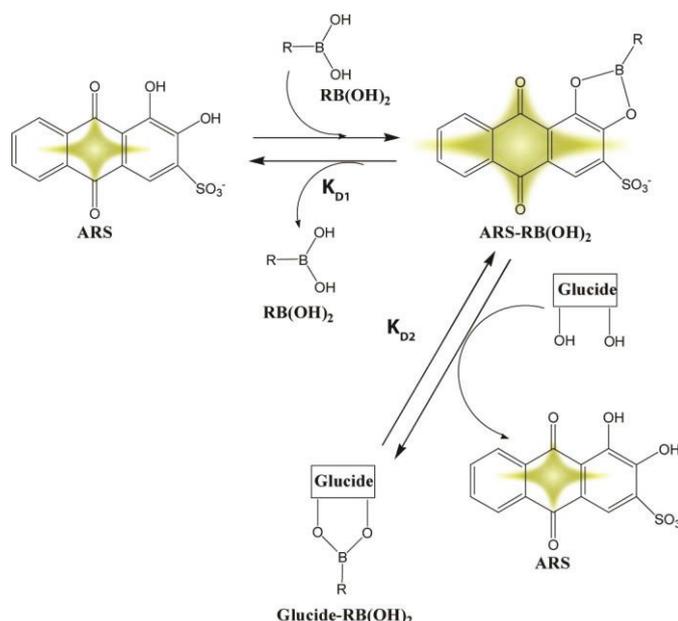


Fig. 48 : Compétition entre deux réactions impliquant un acide boronique ($RB(OH)_2$) avec, soit le rouge d'alizarine S (ARS), soit un glucide. K_{D1} et K_{D2} correspondent aux constantes de dissociation des deux équilibres réactionnels. L'intensité de fluorescence de l'ARS est représentée par les étoiles vertes.

Ce système a donc été utilisé pour étudier l'estérification en solution entre l'acide 3-aminophényl boronique (3AB) et les riboses du NAD^+ . Pour cela, des spectres d'émission de fluorescence avec une longueur d'onde d'excitation à 495 (λ_{ex}), ont été mesurées sur plaque 96 puits. Dans un premier temps, des mesures ont été effectuées avec deux solutions contenant 0,1 mM d'ARS dans du tampon phosphate (100 mM, pH 7), l'une en absence et l'autre en présence de 3AB à 1 mM. Pour montrer l'estérification entre le 3AB et le NAD^+ , la fluorescence de cinq solutions contenant les mêmes concentrations d'ARS et de 3AB en présence de différentes concentrations de NAD^+ (1 - 50 mM) a été mesurée.

Afin de déterminer les constantes de dissociation entre le 3AB et le NAD^+ , des mesures d'émission de fluorescence à 590 nm (λ_{em}) avec un λ_{ex} de 495 nm ont été effectuées avec une concentration fixe d'ARS de 0,1 mM en présence de différentes concentrations de 3AB (0 - 10 mM) et en présence de 2 et 5 mM de NAD^+ . En utilisant un modèle de fixation, les constantes de dissociation des réactions entre l'ARS et le 3AB (K_{D1}) et entre le NAD^+ et le 3AB (K_{D2}) ont été déterminées. Ces courbes ont été obtenues par régression non linéaire d'équation (eq5) :

$$(eq5) \quad \frac{[cplx]}{[ARS]_t} = \frac{[3AB]_l}{[3AB]_l + K_{D1}}$$

$$(eq6) \quad [cplx] = \frac{I_{590}}{I_{cplx}^0}$$

$$(eq7) [3AB]_l = [3AB]_t - [cplx]$$

Dans ces équations, [cplx] désigne la concentration de complexe ARS-3AB calculée à partir de l'équation 6 où I_{590} est l'intensité d'émission de fluorescence mesurée à 590 nm et I_{cplx}^0 est le coefficient de fluorescence spécifique du complexe ARS-3AB. $[ARS]_t$ désigne la concentration totale d'ARS qui est de 0,1 mM. $[3AB]_l$ correspond à la concentration de 3AB non lié à l'ARS calculée à partir de l'équation 7 ou $[3AB]_t$ est la concentration totale en 3AB. Un K_{D1} de 0,5 mM a pu être déterminé. En s'inspirant du modèle d'inhibition enzymatique par compétition, un K_{D2} de 3,6 mM a été calculé à partir de l'équation 8.

$$(eq8) K'_{D1} = K_{D1} \left(1 + \frac{[NAD]}{K_{D2}} \right)$$

K'_{D1} représente la constante de dissociation apparente de la réaction entre l'ARS et le 3AB obtenue en présence de NAD^+ .

II.1.5. Synthèse chimique

En s'inspirant des travaux de Stock (Chin et al. 1981; Hung et al. 1982) portant sur le couplage entre des molécules aromatiques diazotées et des bases puriques, le couplage entre le TBO et le PE diazoté a été réalisé. Avant réaction, 10 μ mol de sel de $[PE^+][BF_4^-]$ ont été solubilisés dans 0,1 ml d'eau glacée. Parallèlement, 10 μ mol de TBO ont été solubilisées dans 1,9 ml d'une solution aqueuse contenant 0,62 N de NaOH à un pH compris entre 10 et 11. Après solubilisation des réactifs, la solution de $PE^+BF_4^-$ a été ajoutée goutte à goutte dans la solution basique de TBO. La réaction est laissée sous agitation 24h à température ambiante. Après réaction, une extraction au chloroforme a été réalisée. La phase organique a été récupérée puis séchée. Le solide obtenu a été analysé par spectroscopie de masse (ESI^+).

Des mesures de fluorescence avec l'ARS ont été réalisées dans les mêmes conditions décrites ci-dessus avec une solution de produit à 0,3 $mg.ml^{-1}$ (tampon phosphate 100 mM pH 7). Par ailleurs, l'électropolymérisation du produit par voltammétrie cyclique (10 cycles entre -0,4 et +0,8 V (vs. Ag/AgCl) à une vitesse de balayage de 0,05 $V.s^{-1}$) a été réalisée avec une solution à 3 $mg.ml^{-1}$ dans du tampon borate (10 mM, pH 9,1 contenant 100 mM de $NaNO_3$).

II.2. Mesure sur plaque de criblage électrochimique (PCE)

II.2.1. Préparation des PCE

a) Description des PCE

Les mesures ampérométriques pulsées par intermittence (IPA) sur le lecteur de plaque électrochimique AndCare 9600 ont été effectuées sur des plaques de circuit imprimées (PCB). Les PCB ont été conçues sur-mesure et sont constituées de 192 connecteurs de cuivres sur lesquels ont été sérigraphiées 96 paires d'électrodes chacune composée d'une électrode de carbone (électrode de travail) et d'une électrode d'argent (Ag/AgCl) (électrode de référence et contre-électrode) (Fig. 49A). Afin de délimiter chaque paire d'électrode, un film plastique adhésif de 2,5 mm d'épaisseur et perforé de 96 trous de 6 mm de diamètre a été utilisé (3M, Cergy-Pontoise, France). Les perforations du film plastique ont été réalisées avec une imprimante craft ROBO (Silhouette America, Inc., Orem, Ut, USA). Les plaques de 96 électrodes ont été nommées plaque de criblage électrochimique (PCE) (Fig. 49B).

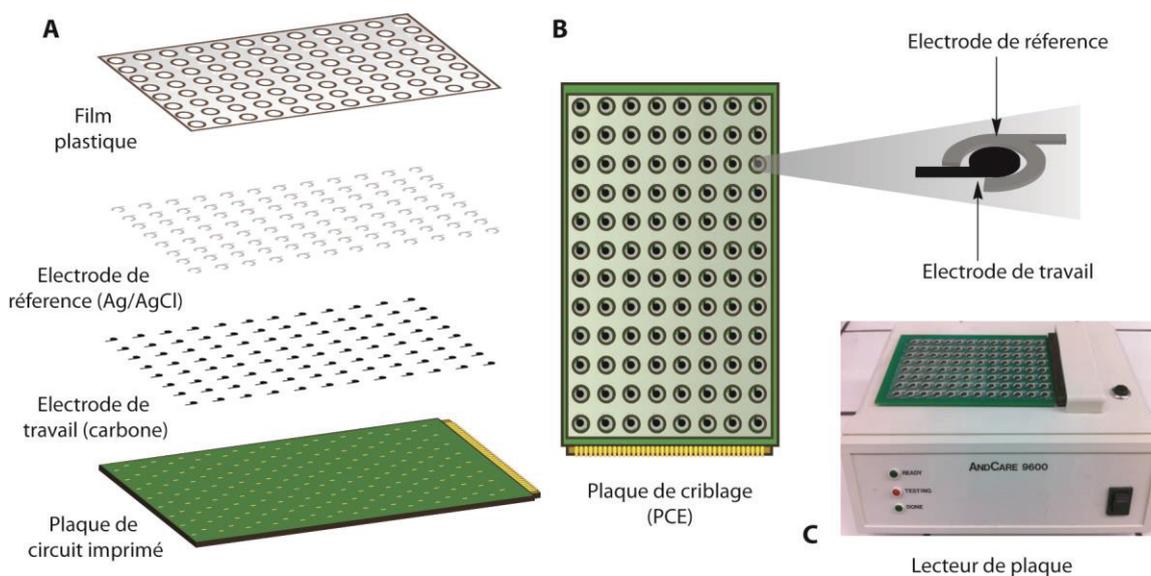


Fig. 49 : (A) Schéma éclaté de la plaque de 96 électrodes. (B) PCE entièrement assemblées. (C) Photo d'une PCE connectée au lecteur de plaque AndCare 9600.

b) Sérigraphie

Deux masques de polyester portant les motifs correspondant aux électrodes de référence et aux électrodes de travail, ont été appliqués sur une PCB. L'encre de carbone ou d'Ag/AgCl a été déposée en amont des motifs (étape 1 de la Fig. 50), puis un jeu de patin permet d'étaler l'encre afin de transférer les motifs sur la PCB (étape 2 de la Fig. 50). La pression appliquée sur le masque par le patin est de 5 kg et sa vitesse de passage est de 35

mm.s^{-1} . Après sérigraphie, les électrodes sont séchées 15 min à 100°C . Après usage, les PCB sont nettoyées à l'acétone afin d'éliminer les encres pour une nouvelle utilisation.

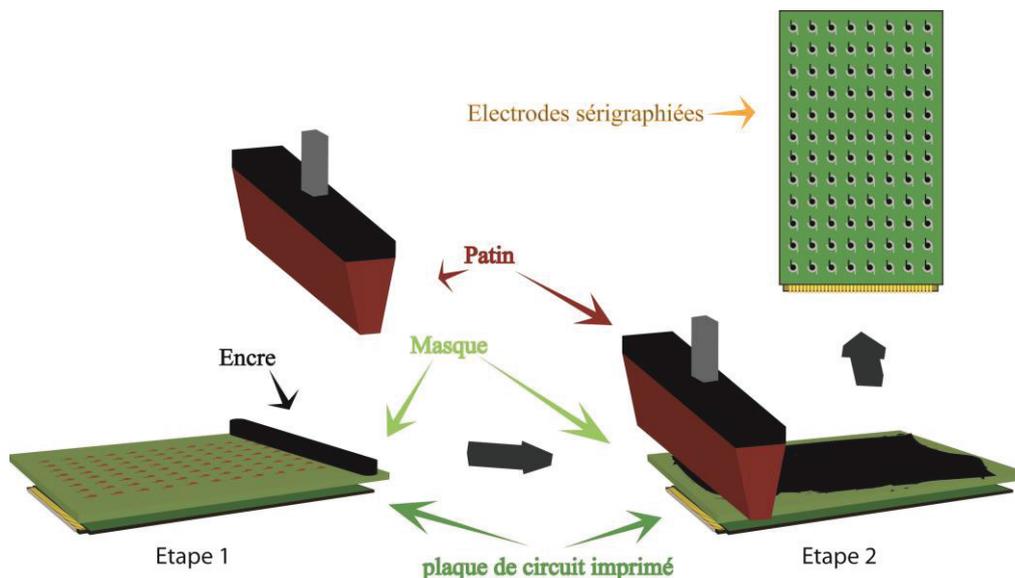


Fig. 50 : Schéma des étapes de sérigraphie.

II.2.2. Mesures IPA

Ce type de mesure consiste à appliquer des pulsations de potentiel fixe de quelques millisecondes à une fréquence choisie, séparées par des périodes de latence (périodes durant lesquelles le circuit est déconnecté).

Les mesures IPA sur PCE ont été réalisées en recouvrant la surface des électrodes sérigraphiées avec des gouttes de 40 à 50 μl d'électrolyte (tampon phosphate-citrate 150 mM à des pH compris entre 2,2 et 8 contenant 100 mM de NaClO_4 ou tampon phosphate 100 mM à pH 7 contenant 100 mM de KCl). Toutes les mesures ont été effectuées en 1 min avec des pulsations de potentiel de 41 ms à une fréquence de 1 Hz (soit 60 points de mesure).

II.2.3. Calcul du rapport signal/bruit (S/N)

Les surfaces et les reliefs des électrodes de sérigraphie varient d'une électrode à une autre ce qui peut conduire à des problèmes de reproductibilité. Pour s'affranchir de cette contrainte, des mesures IPA ont été réalisées avant (I^0) et après (I) modification de la surface des électrodes (adsorption ou greffage). Les I^0 et I correspondent aux moyennes d'intensités mesurées durant les dix dernières secondes de mesure. Les rapports signal-sur-bruit (S/N) ont été calculés à partir de ces mesures en utilisant l'équation 9:

$$\text{(eq9)} \quad \frac{S}{N} = \left| \frac{I - I^0}{I^0} \right|$$

Une valeur de S/N inférieure à 3 est considérée comme non significative.

II.2.4. Criblage du transfert indirect d'électrons (MET)

a) Diazotation et électro-greffage des phénazine

Les diazotations des cinq phénazines (bleu de toluidine (TBO), rouge neutre (NR), azure A (AA), bleu de cressy brillant (BCB) et thionine (Th)) ont été réalisées en milieu aqueux utilisant le même procédé que celui décrit ci-dessus : 40 μ l de phénazine (10 mM dans l'éthanol) ont été ajoutés à 340 μ l d'une solution de HCl 1 M sous agitation à 4°C (concentration finale de phénazine : 1 mM). Pour initier la réaction de diazotation, 20 μ l d'une solution de NaNO₂ à 20 mM ont été ajoutés lentement (concentration finale de NaNO₂ : 1 mM). Le milieu réactionnel a été incubé à 4°C durant 20 min.

Pour électro-greffer les phénazines diazotées sur les électrodes sérigraphiées des PCE, 10 μ l des milieux réactionnels ont été ajoutés à 40 μ l d'une solution de HCl 1 M préalablement déposés sur les électrodes (concentration finale de molécules diazotées : 0,1 mM). A l'aide du lecteur de plaque (AndCare 9600), des pulsations de potentiel à -1,5 V (vs. Ag/AgCl) de 164 ms avec une fréquence de 0,5 Hz, ont été appliqués sur les électrodes durant 5 min. Après électro-greffage, les électrodes ont été rincées à l'eau distillée. Des contrôles ont été effectués en absence de phénazines et de NaNO₂.

b) Expression d'une banque de mutants de la FDH de *Candida boidinii*

Le clonage et la construction de la banque de mutants de la FDH ont été réalisés par M. Bekhouche dans le cadre de sa thèse effectuée au sein du laboratoire. Le gène de la FDH (AJ245935, 1095 pb) a été synthétisé par GenScript (Piscataway, New Jersey, USA). Ce gène a été cloné dans le vecteur pET28b utilisé pour l'expression de la FDH. La construction pET-28b-FDH a été ensuite utilisée pour transformer des souches *E. coli* BL-21(DE3). Après induction avec 1 mM d'IPTG, il a été vérifié que la FDH sauvage est bien surexprimée et fonctionnelle.

Une banque de 77 mutants a été produite par PCR de basse fidélité sur le gène de la FDH contenu dans pUC57, avec la Taq-polymérase en présence de 250 mM de Mn²⁺. Une réplique de cette banque contenue dans une plaque 96 puits a été mis en culture à 37°C jusqu'à atteindre une densité optique de 1 à 600 nm (une DO_{600nm} = 1 correspond à environ 5.10⁸ bactéries/ml). L'induction par 1 mM d'IPTG a été réalisée et suivi d'une incubation de

5h à 37°C sous agitation. Les cellules ont été finalement récupérées par centrifugation à 2000 g durant 15 min à 4°C, puis resuspendues et lysées dans 400 µl de tampon phosphate (100 mM, pH 7,4) contenant 0,1 % de Triton X-100 et 200 mM d'EDTA. Les lysats ont été ensuite centrifugés à 2000 g (15 min à 4°C). Les surnageants récupérés ont été directement utilisés pour réaliser les mesures d'activité par colorimétrie et par électrochimie.

c) Activités des mutants FDH en solution

Les mesures d'activités en solution avec les surnageants, ont été réalisées sur plaque 96 puits. Dans chaque puits de 200 µl, 40 µl de surnageant ont été ajoutés à une solution dans du tampon phosphate (100 mM, pH 7) contenant les substrats de la FDH en condition saturante (150 mM de formiate de sodium et 5 mM de NAD⁺) et 8 µM de phénazine éthosulfate et 50 µM de nitrobleu de tétrazolium. Après 5 min de réaction, la formation de bleu de formazan a été mesurée par absorbance à 560 nm.

d) Mesure IPA de l'oxydation du NADH

Avant de réaliser les mesures d'oxydation du NADH, les électrodes d'une plaque de criblage électrochimique (PCE) modifiées par l'électro-greffage de phénazines, ont été chacune recouvertes par 40 µl de tampon phosphate (100 mM, pH 7 contenant 100 mM de KCl). Un potentiel de 0,6 V (*vs.* Ag/AgCl) a été appliqué (application de pulsations de 41 ms durant 1 min avec une fréquence de 1 Hz) sur les électrodes pour oxyder préalablement les couches de phénazines greffées. Les mesures ont ensuite été réalisées à 0 V (*vs.* Ag/AgCl) avant et après l'addition de 10 µl de NADH à différentes concentration (de 0 à 1 mM).

e) Activités des mutants FDH sur PCE

Les mesures d'activité de la FDH ont été réalisées sur les électrodes modifiées par électro-greffage du TBO. Après addition de la FDH commerciale (10 µl de solution à des concentrations comprises entre 0 et 2,2 U.ml⁻¹) dans 40 µl de tampon phosphate (100 mM, pH 7) contenant les substrats en condition saturante (300 mM de formiate de sodium et 5 mM de NAD⁺), des mesures IPA à 0 V (*vs.* Ag/AgCl) ont été effectuées. Les mesures d'activité des mutants de la FDH ont été réalisées suivant le même procédé. Dans ce cas 20 µl de surnageant ont été ajoutés à 30 µl de solution de substrats déposés au préalable sur les électrodes modifiées par électro-greffage du TBO.

II.2.5. Mesure du transfert direct d'électros (DET) sur PCE avec la laccase de *Trametes versicolor* (TvLac)

a) Purification de la TvLac

La laccase de *Trametes versicolor* (TvLac) commerciale a été utilisée dans cette étude. La TvLac a été purifiée selon le protocole décrit par Blanford sur colonne échangeuse d'anion DEAE-Sepharose (Diéthylaminoéthyl-Sepharose) fournie par Pharmacia (Uppsala, Suède) (Blanford et al. 2007). Dans un premier temps, 40 mg de TvLac commerciale ont été solubilisés dans 1 ml de tampon acétate (20 mM, pH 5,5). Cette solution a ensuite été centrifugée 1h à 14000 g à 4°C afin d'éliminer les particules insolubles. Le surnageant a été déposé sur une colonne de DEAE-Sepharose (3 ml) préalablement équilibrée avec du tampon acétate (20 mM, pH 5,5). Après lavage avec un volume de 8 ml de tampon acétate (20 mM, pH 5,5), la TvLac a été éluée avec 3 ml d'une solution de 60 mM de sulfate d'ammonium ((NH₄)₂SO₄) dans le même tampon. L'éluat a été finalement concentré à l'aide de micro-concentrateurs possédant des membranes avec un seuil d'exclusion de 30 kDa (Amicon Ultra 30 kD, Millipore, Irlande). Les concentrations protéiques ont été mesurées par la méthode de Bradford (Bradford 1976). Une solution de TvLac purifiée avec une activité spécifique de 90 U.mg⁻¹ a été obtenue (mesure réalisée avec l'ABTS).

b) Mesure du DET avec TvLac

Le calcul du rapport S/N a été réalisé pour étudier le DET entre la TvLac et les électrodes de carbone sérigraphié des PCE. Ces S/N ont été obtenus en réalisant des mesures IPA dans du tampon phosphate-citrate (150 mM, à des pH variant de 2,2 à 8, contenant 100 mM de NaClO₄) avant (I⁰) et après adsorption toute la nuit à 4°C (I) de 3µl de TvLac purifiée ou non purifiée (activité spécifique : 90 U.mg⁻¹ ; concentration en protéine : 0,33 mg.ml⁻¹) en solution dans 20 mM de tampon acétate (pH 5,5 contenant 60 mM de (NH₄)₂SO₄).

Les valeurs de S/N en présence d'inhibiteur ont été obtenues en réalisant des mesures IPA avant et après adsorption de 1 µg TvLac (3 µl d'une solution de TvLac à 0,33 mg.ml⁻¹) en présence de NaF (0 – 5 mM) ou NaN₃ (0 – 100 µM) en solution dans du tampon phosphate-citrate (150 mM, pH 4,4, contenant 100 mM de NaClO₄).

Les mesures réalisées avec les molécules interférentes ont été réalisées dans du tampon phosphate-citrate (150 mM, pH 4,4, contenant 100 mM de NaClO₄) par adsorption ou en solution dans l'électrolyte. Dans le premier cas, différentes quantités de BSA (1µg et 3

µg), de NiCl₂ (9 nmol, 90 nmol et 510 nmol), de CuCl₂ (9 nmol, 90 nmol et 510 nmol) et d'imidazole (300nmol et 750 nmol) ont été adsorbées en absence ou en présence de 1 µg TvLac. Les mesures en solution ont été effectuées avec différentes concentrations de cystéine (10 et 50 µM) et de DTT (10 et 50 µM) sur des électrodes nues ou modifiées par l'adsorption de 1 µg de TvLac.

c) Mesures de l'activité de la TvLac en solution

L'activité enzymatique en solution de la TvLac a été mesurée avec l'ABTS comme substrat. Ces mesures ont été réalisées sur plaque 96 puits dans un volume total de 200 µl, en suivant l'oxydation de l'ABTS par absorbance à 420 nm ($\epsilon_M^{420nm} = 36000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Chaque mesure a été réalisée avec une concentration de 0,1 U.ml⁻¹ de TvLac en présence de 5 mM d'ABTS, soit dans du tampon phosphate-citrate (150 mM, à des pH compris entre 2,2 et 8, et contenant 100 mM de NaClO₄), soit dans du tampon acétate (20 mM, pH 5,5). Les paramètres cinétiques ont été déterminés avec des concentrations d'ABTS comprises entre 1 µM et 1 mM dans du tampon acétate (20 mM, pH 5,5).

II.3. Protocole de criblage électrochimique pour l'évolution dirigée de la laccase CotA

II.3.1. Expression de la laccase CotA en système bactérien

a) Amplification du gène de CotA

Le gène sauvage codant pour la laccase CotA de *Bacillus subtilis* (CotA_{wt}) (entrée EMBL : GU972592) a été fourni dans le vecteur d'expression pET-28b par le Dr Alexandre Noiriél (équipe ODMB, ICBMS) (annexe I et Fig. 51). La construction pET-28b-CotA_{wt} a été utilisée pour transformer par électroporation des souches *E. coli* Top 10. L'électroporation est une méthode physique de transformation de cellules qui consiste à appliquer un choc électrique déstabilisant les membranes cellulaires et permettant d'introduire de l'ADN dans la cellule. Pour cela, 50 µl de suspension de cellules d'*E. coli* BL21 (DE3) commerciale décongelés puis mélangés à 1 µl de pET-28b-CotA_{wt} à 50 ng.µl⁻¹ ont été introduits dans une cuve d'électroporation. Après application de pulsations de 5 ms à 2500 V, les cellules ont été resuspendues dans 300 µl de milieu LB et incubées 1h à 37°C sous agitation à 250 rpm. Les cellules transformées ont ensuite été sélectionnées sur gel LB-agar contenant de la kanamycine (100 µg.ml⁻¹). Une colonie a été remise en culture toute une nuit à 37°C sous agitation (250 rpm) dans 200 ml de LB contenant de la kanamycine (100 µg.ml⁻¹).

L'extraction et la purification de l'ADN plasmidique ont ensuite été effectuées à l'aide du kit « NucleoBonD Xtra Midi/Maxi/EF ». L'ADN a été récupéré dans 150 µl d'eau. Une mesure au spectrophotomètre « NanoDrop200 » à 230 nm a permis d'estimer la concentration d'ADN à 110 ng.µl⁻¹. Un séquençage a été effectué pour vérifier la séquence de l'insert.

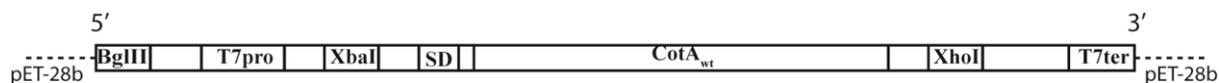


Fig. 51 : Schéma de construction de l'insert (gène *CotA*) dans le vecteur pET-28b. En amont du gène, sont représentés les sites de restriction *BglIII* et *XbaI* ainsi que le promoteur T7 (*T7pro*) et la position de la séquence de Shine-dalgarno permettant la fixation du facteur σ (facteur de transcription bactérien). Le site de restriction *XhoI* et la séquence terminale du promoteur T7 (*T7ter*) sont représentés en aval du gène *CotA*.

b) Expression de CotA sur plaque 96 puits

La construction pET-28b-CotA_{wt} a été utilisée pour transformer par électroporation des souches d'expression *E. coli* BL21 (DE3). L'électroporation a été réalisée en utilisant les mêmes paramètres décrits pour la transformation des souches *E. coli* Top 10. Les cellules transformées ont été sélectionnées sur gel LB-agar contenant de la kanamycine (100 µg.ml⁻¹). Une pré-culture de cellules sélectionnées a été réalisée dans 25 ml de LB à 37°C une nuit sous agitation (250 rpm). Des cultures de 1,5 ml dans des puits de 2ml (Plaque Masterblock 96 puits fournie par Greiner Bio-One, Vienne, Autriche) ont été effectuées à partir de 100 µl de pré-culture et incubé à 37°C sous agitation à 400 rpm. Lorsqu'une densité optique (600 nm) d'environ 0,6 est atteinte, l'induction est réalisée avec 1 mM d'IPTG et addition de 250 µM de CuCl₂. Après 4h d'induction à 25°C sous agitation (400 rpm), les cellules ont été incubées 20h à la même température sans agitation (condition microaérobie (Duraio et al. 2006)). Les cellules ont ensuite été récupérées par centrifugation (3000 g, 1h, 4°C) puis lavées à l'eau distillée et centrifugées une deuxième fois (3000 g, 1h, 4°C) avant d'être stockées à -28°C.

II.3.2. Purification de CotA

a) Lyse cellulaire

Les cellules ont été lysées directement dans les puits où elles ont été cultivées et induites, suivant une procédure en deux étapes. Premièrement, les cellules ont été resuspendues dans 400 µl de tampon phosphate (20 mM pH 7,6) contenant 1 mg.ml⁻¹ de lysozyme et incubées dans la glace durant 45 min. Dans un second temps, les suspensions ont été incubées 60 min à 65°C puis centrifugées 1h à 3000 g à 4°C.

b) Purification sur micro-colonne CM-Sepharose

La purification de CotA a été réalisée par chromatographie échangeuse de cations dans des micro-colonnes de 1 ml (avec des filtres 0,20 μm) dans lesquelles ont été coulées 400 μl de gel CM-Sepharose (CarboxyMéthyl-Sepharose). Après avoir équilibré les colonnes avec du tampon phosphate (20 mM pH 7,6), 300 μl de surnageant ont été déposés sur les colonnes, suivi de quatre lavages (4 x 400 μl) avec du tampon phosphate (20 mM pH 7,6) et 2 lavages (2 X 400 μl) avec le même tampon contenant 100 mM de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. La laccase CotA a été éluée avec 400 μl de tampon phosphate (20 mM pH 7,6) contenant 250 mM de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Des aliquots de 10 μl de surnageants et d'éluats ont été utilisés pour mesurer l'activité enzymatique en solution avec l'ABTS. Pour cela, les 10 μl de surnageant ont été ajoutés dans une solution contenant 1 mM d'ABTS dans du tampon phosphate-citrate (150 mM, à des pH compris entre 2,2 et 8) pour un volume final de 200 μl . L'oxydation de l'ABTS a été suivie par absorbance à 420 nm. Les quantités de protéines dans les échantillons ont été estimées par la méthode de Bradford.

II.3.3. PCR

a) Matrice

Les PCR ont été réalisées sur le vecteur pET-28b-CotA_{wt} linéarisé et déphosphorylé afin de ne pas avoir persistance du vecteur d'origine après purification des produits de PCR. La linéarisation a été réalisée par digestion du vecteur au niveau du site unique BglIII (Fig. 51). Pour cela, un milieu réactionnel de 50 μl composé de 5 μl de tampon Tris-HCl 500 mM (pH 7,9 contenant 100 mM de MgCl_2 , 1 M de NaCl et 1 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ de BSA), de 5 μl de vecteur pEt-28b-CotA_{wt} (110 $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$), 1 μl de BglIII (10 $\text{U}\cdot\mu\text{l}^{-1}$) et 39 μl d'eau a été incubé 1h sous agitation à 37°C. Après incubation, la déphosphorylation a été effectuée dans le même milieu réactionnel (de volume total 50 μl) en ajoutant 10 μl de tampon Bis-Tris-Propane-HCl (1,3-bis(tris(hydroxyméthyl)méthylamino)propane) 500 mM (pH 6, contenant 10 mM de MgCl_2 , 1 mM de ZnCl_2) et 1 μl de phosphatase (Antartic phosphatase, 5 $\text{U}\cdot\mu\text{l}^{-1}$) et 39 μl d'eau distillée permettant d'obtenir un volume final de 100 μl . Après mélange, le milieu est incubé 20 min à 37°C. La solution de vecteur linéarisé et déphosphorylé a été finalement dessalé (Kit de purification QIAquick) puis une mesure d'absorbance à 230 nm au spectrophotomètre « NanoDrop 2000 » a permis d'estimer une concentration de 6,5 $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$.

b) Amorces

Pour effectuer ces PCR, les amorces suivantes ont été utilisées : 5'-TCCCCGCTAGCATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAG-3' (A-NheI) et 5'-TGTTAGCAGCCGGATCTC-3' (A-XhoI) (Fig. 52). Ces amorces ont été synthétisées par Eurofinsdna MGW Operon. L'amorce A-NheI s'hybride en 5' de l'insert CotA et a permis d'insérer le site de restriction de NheI (G/CTAGC) à la place du site XbaI (T/CTAGC) retrouvé sur le vecteur pET-28b. La digestion par ces deux enzymes permet de générer des extrémités cohésives compatibles (Fig. 53). L'amorce A-XhoI, s'hybride en aval du site XhoI en 3' de l'insert CotA.

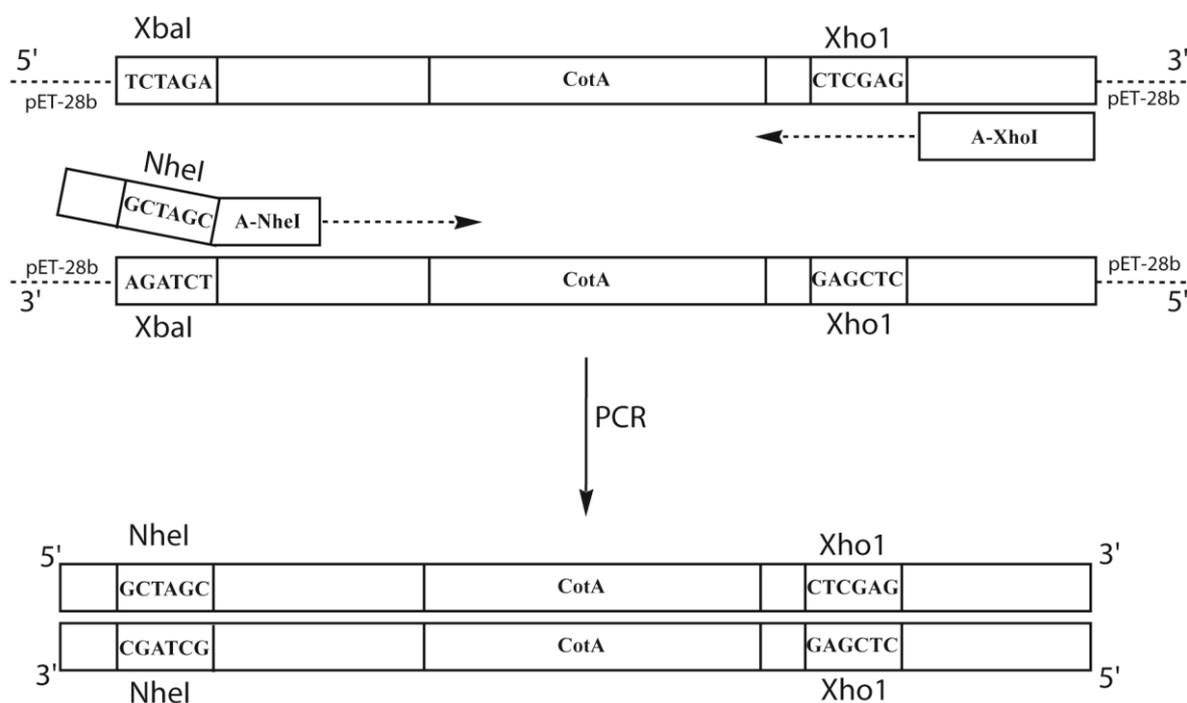


Fig. 52 : Schéma d'hybridation des amorces A-NheI et A-XhoI sur pET-28b-CotA_{wt} et du produit de PCR.

Les amorces A-T7 (5'-TAATACGACTCACTATAGGGG-3') et A-D1 (5'-GGAGGGAGATCGCGATGGAGCT-3') ont été utilisées pour réaliser des PCR de contrôle directement sur cellule provenant de clones sélectionnés pour vérifier la présence de l'insert CotA. A-T7 s'hybride sur le promoteur T7 et A-D1 sur un segment du gène de CotA.

c) PCR de basse fidélité

Les PCR de basse fidélité ont été réalisées en présence d'ions Mn²⁺ dans des volumes réactionnels de 25 µl avec un mélange contenant 2,5 µL de tampon Tris-HCl 100 mM (pH 8,3

contenant 500 mM de KCl et 15 mM de MgCl₂), 2,5 µL d'un mélange de dNTP (2,5 mM), 2,5 µl de MnCl₂ (2,5 mM), 5 µl de chacune des amorces A-NheI (1 µM) et A-XhoI (1 µM), 1 µl de vecteur pET-28b-CotA_{wt} linéarisé et déphosphorylé (1 ng.µl⁻¹) et 1 µl de Taq polymérase (5 U.µl⁻¹). Le programme de PCR utilisé est le suivant : 5 min à 95°C pour séparer les deux brins d'ADN; 30 cycles de 30 secondes à 95°C puis 30 secondes d'hybridation à 40°C et 1 min 30 secondes d'élongation à 72°C; pour finir 5 min à 72°C et 4°C pour conservation des produits de PCR.

d) PCR de contrôle

Afin de vérifier la présence d'insert dans 10 clones sélectionnés, des PCR ont été réalisées directement sur des cellules provenant de préculture. Ces PCR ont été effectuées dans un volume réactionnel de 25 µl contenant 2,5 µL de tampon Tris-HCl 100 mM (pH 8,3 contenant 500 mM de KCl et 15 mM de MgCl₂), 2,5 µL d'un mélange de dNTP (2,5 mM), 5 µl de chacune des amorces (A-T7 à 1 µM et A-D1 à 1 µM), 0,1 µl de préculture et 1 µl de Taq polymérase (5 U.µl⁻¹).

Les produits de PCR ont été contrôlés sur gel d'agarose 0,7%. Des aliquots de 10 µl de produit de PCR supplémentés de 2 µl de tampon de charge (Tris-HCl 10 mM, pH 7,6 contenant du bleu de bromophénol 0,03%, du Xylène cyanol FF 0,03%, du Glycérol 60% et de l'EDTA 60 mM). La migration des échantillons a été effectuée durant 15 min à 100 V. L'ADN a été coloré au bromure d'éthidium (0,01% (V/V)) et révélé sous lampe UV. Les fragments obtenus sont de 1639 pb

e) Digestion et ligation

Les inserts obtenus par PCR de basse fidélité ont été dessalés (Kit de purification QIAquick) puis digérés par les enzymes de restriction NheI et XhoI pour être cloner dans un nouveau vecteur pET-28b. Cette réaction de digestion a été réalisée dans un volume total de 100 µl contenant 10 µl de tampon Tris-HCl 100 mM (pH 7,9 contenant 100 mM de MgCl₂, 500 mM de NaCl et 1 mg.ml⁻¹ de BSA), 15 µl de produit de PCR (36,8 ng.µl⁻¹), 1 µl de NheI (10 U.µl⁻¹), 1 µl de XhoI (20 U.µl⁻¹) et 73 µl d'eau. Parallèlement, le vecteur pET-28b a été digéré par les enzymes XbaI et XhoI. Cette réaction de digestion a été réalisée dans un volume total de 100 µl contenant 10 µl de tampon Tris-acétate 200 mM (pH 7,9, contenant 100 mM d'acétate de magnésium, 500 mM d'acétate de potassium et 1 mg.ml⁻¹ de BSA), 15 µl de produit de PCR (36,8 ng.µl⁻¹), 1 µl de NheI (10 U.µl⁻¹), 1 µl de XhoI (20 U.µl⁻¹) et 73 µl d'eau. Ces deux milieux de réaction ont été incubés 1h à 37°C sous agitation.

Les deux produits de digestion ont été de nouveau dessalés puis ligués avec la T4 DNA ligase. La ligation entre l'extrémité 5' des inserts digérés par NheI et l'extrémité 3' du vecteur digéré par XbaI, forment des bouts cohésifs compatibles (Fig. 53). La ligation de ces deux extrémités induit la disparition des sites de restrictions XbaI et NheI. Les inserts (1639 pb) et le vecteur pET-28b (5328 pb) digérés ont été incubés dans un volume final de 10 μ l durant 1h à température ambiante, dans des rapports molaires 1/1 (80ng/24ng ; mol/mol ; vecteur/insert) ou 1/3 (80ng/72ng ; mol/mol ; vecteur/insert) en présence d'une unité enzymatique de T4 DNA ligase dans du tampon Tris-HCl 50 mM (pH 7,6 contenant 10 mM de MgCl₂, 1 mM d'ATP, 1mM de DTT, et 5 % de polyéthylène glycol-8000 (w:v)). Un témoin a été réalisé dans les mêmes conditions sans utiliser d'inserts. Ce témoin permet d'observer le taux de vecteur non digéré. Les produits de ligation (1 μ l) ont été directement utilisés pour transformer des souches *E. coli* BL21 (DE3) par électroporation. Les cellules transformées ont ensuite été sélectionnées sur milieu LB-agar contenant 100 μ g.ml⁻¹ de kanamycine et sur milieu permettant de cribler l'expression de mutants CotA actifs (LB-agar, 100 μ g.ml⁻¹ de kanamycine, 0,1 mM d'IPTG, 250 μ M de CuCl₂, et 1 mM d'ABTS).

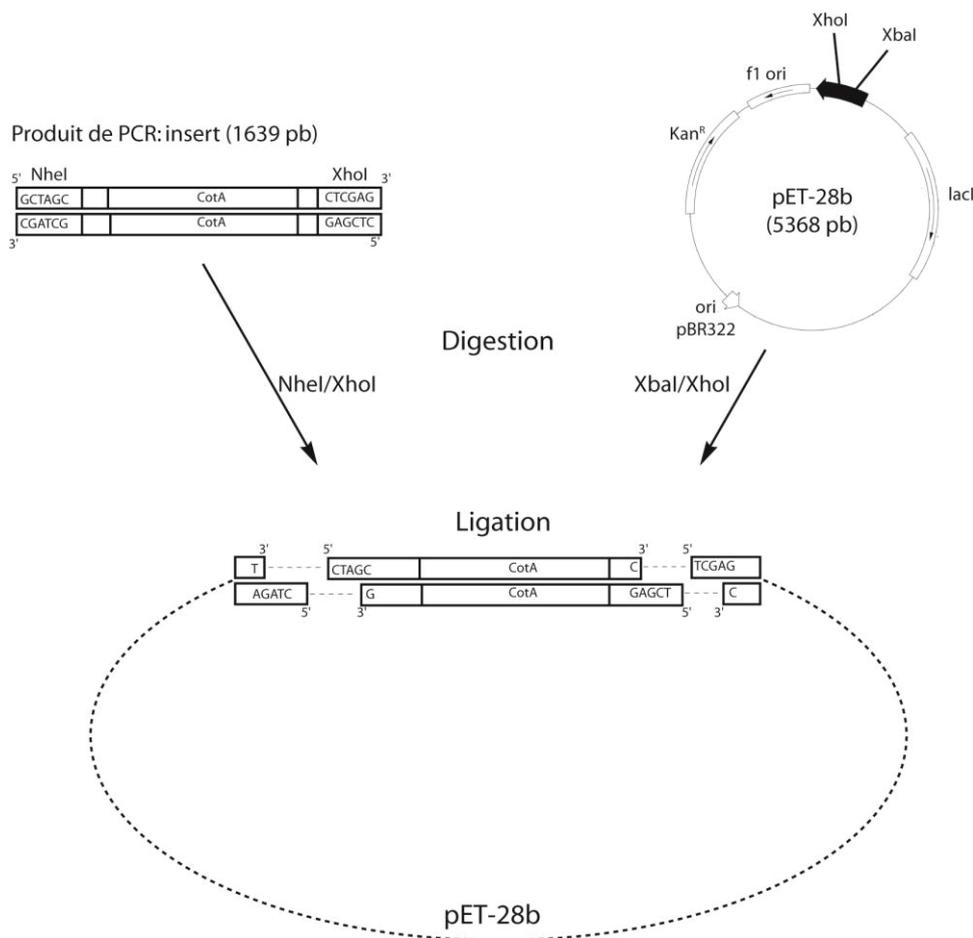


Fig. 53 : Schéma de la digestion et de la ligation d'un produit de PCR et du vecteur pET-28b

II.3.4. Criblage sur boîte de petri

Le criblage de CotA a été réalisé sur boîte de Petri en milieu solide (Boîte de criblage). Ces boîtes de criblage ont été produites à partir de 30 ml de LB-agar préchauffé contenant 100 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ de kanamycine, 0,1 mM d'IPTG, 250 μM de CuCl_2 et 1 mM d'ABTS. Des volumes de 100 μl de souches d'*E. coli* BL21 (DE3) transformées, ont été étalés sur les boîtes de criblage incubées à 37°C. Après 72h, une coloration rougeâtre induit par l'oxydation de l'ABTS est nettement visible et permet de révéler distinctement les colonies exprimant l'enzyme active.

II.3.5. Criblage sur PCE

La mise en évidence d'un DET entre CotA et les électrodes sérigraphiées des PCE a été réalisée par mesures des valeurs de S/N avec la même méthodologie décrite pour TvLac. Ces mesures ont été effectuées dans du tampon phosphate-citrate (150 mM, à des pH compris entre 2,2 et 8, contenant 100 mM de NaClO_4) après adsorption (2h d'incubation à température ambiante) de 5 μl d'éluats de CotA obtenus après purification sur des colonnes de CM-Sephrose. Les éluats ont une concentration protéique d'environ 10 ng.ml^{-1} et contiennent 250 mM de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ dans du tampon phosphate (20 mM, pH 7,6).

Résultats et discussion : Assemblage
moléculaire pour la mise au point d'une
bioanode fonctionnant avec les
déshydrogénases à NAD⁺

I. Objectif

Les travaux présentés dans cette partie portent sur l'élaboration d'un assemblage moléculaire permettant l'immobilisation des cofacteurs nicotiniques sur une électrode de carbone ayant pour finalité de concevoir une bioanode de carbone fonctionnant avec les déshydrogénases à NAD⁺. Cet assemblage devra être facile à mettre en œuvre et permettre de vectoriser le transfert indirect d'électrons (MET) entre des substrats des déshydrogénases et l'électrode. Cet assemblage sera constitué d'une surface modifiée par l'immobilisation de médiateurs sur laquelle sera fixée le NAD⁺ par l'intermédiaire d'une molécule « *linker* » (Fig. 54). Pour cela, une étude en trois temps a été réalisée.

- Dans un premier temps, une étude visant à immobiliser un médiateur capable d'oxyder le NADH a été effectuée sur des électrodes de carbone vitreux (ECV). Le bleu de toluidine (TBO) est le médiateur qui a été choisi car il permet de réduire le NADH à de faibles potentiels (Gorton et al. 2002), mais aussi parce qu'il peut être immobilisé sous différentes formes (greffé et polymérisé).

- L'usage d'acides phénylboroniques a été choisi pour immobiliser le NAD⁺. Ces acides sont capables de s'estérifier avec les hydroxyles vicinaux des riboses portés par le cofacteur (Ozdemir et al. 2000). Dans une seconde étude, cette estérification a été caractérisée dans deux conditions : en solution puis en surface sur une électrode.

- Finalement, des stratégies ayant pour but d'intégrer ces acides boroniques dans une couche de TBO, ont été abordées.

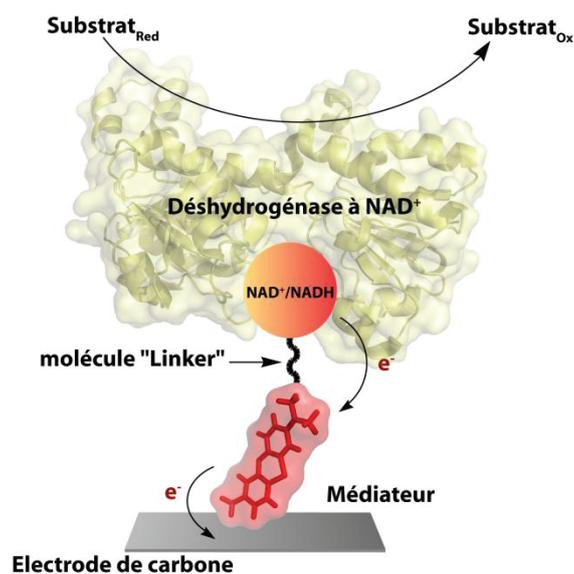


Fig. 54 : Schéma d'assemblage et de fonctionnement de la bioanode à déshydrogénase à NAD⁺.

II. Couche de Bleu de toluidine (TBO) pour l'oxydation électrochimique du NADH

Deux approches ont été utilisées pour immobiliser le TBO sur des électrodes de carbone vitreux (ECV): l'électro-greffage de TBO préalablement diazotés (TBO⁺) et l'électropolymérisation du médiateur par voltammétrie cyclique. Par la suite, les deux surfaces modifiées par ces deux approches ont été comparées par des mesures d'électro-oxydation du NADH.

a) Diazotation et électro-greffage du TBO

Au sein du laboratoire GEMBAS, l'électro-greffage de TBO a été initialement effectué à partir d'un sel de diazonium ([TBO⁺][BF₄⁻]). Cependant la synthèse de ce sel étant difficile due à des problèmes de solubilité du TBO, la diazotation a été réalisée en milieu aqueux. L'électro-greffage du TBO⁺ sur une ECV est réalisé par la réduction électrochimique de la fonction diazonium (N₂⁺) à la surface d'une ECV (Fig. 57A). La réaction de diazotation est opérée en milieu acide et en présence de nitrite de sodium (NaNO₂) durant laquelle l'aryl amine (Φ-NH₂) est nitrosée par l'attaque nucléophile sur une molécule d'acide nitreux (HNO₂) (Fig. 55). La tautomérisation du composé N-nitrosé permet de former un groupement hydroxyde diazoïque qui après protonation et réarrangement électronique, libère une fonction diazonium par élimination d'une molécule d'eau. L'électro-réduction de la fonction diazonium induit la formation de radicaux libres à la surface de l'électrode (Fig. 56) (Delamar et al. 1992). La réduction électrochimique à de faibles potentiels permet aux espèces radicalaires de se lier covalamment avec les atomes exposés à la surface de l'électrode. Ce procédé peut être réalisé par voltammétrie cyclique où la réduction du diazonium et le greffage peuvent être suivis en temps réel.

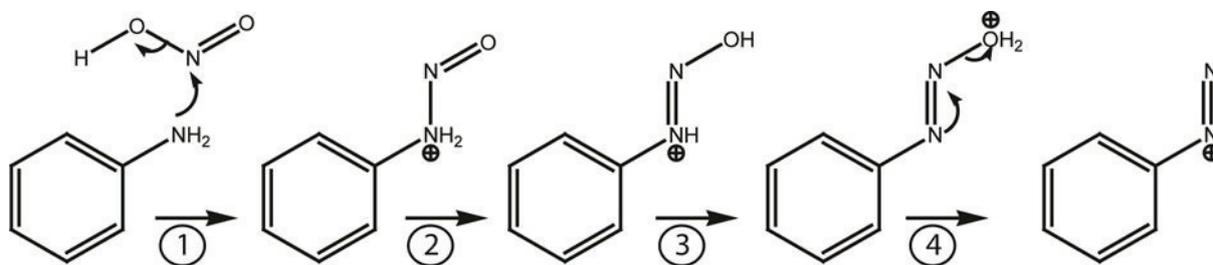


Fig. 55 : Mécanisme réactionnel de diazotation : 1- L'amine primaire est nitrosée par un acide nitreux pour produire un composé N-nitrosé ; 2- Après tautomérisation du composé N-nitrosé, un hydroxyde diazoïque est formé ; 3- Le groupe hydroxyle de l'hydroxyde diazoïque est protoné ; 4- Une molécule d'eau est éliminée conduisant à un diazonium.

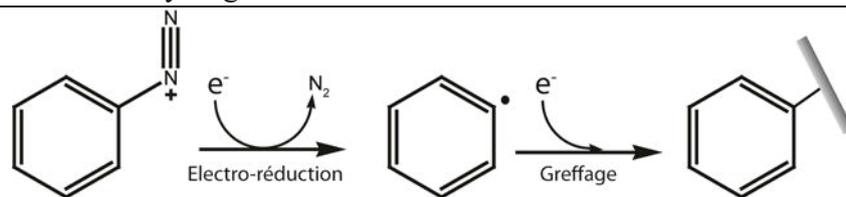


Fig. 56 : Electro-greffage sur une électrode d'un aryle diazonium.

Afin d'électro-greffer du TBO⁺ (Fig. 57A), une ECV de 7 mm² de surface est immergée dans une solution de médiateur diazoté, puis un balayage de potentiel de deux cycles entre 0 et -1 V (vs. Ag/AgCl) est appliqué (Fig. 57B). Le pic correspondant à la réduction de la fonction diazonium peut être observé durant le premier cycle à un potentiel de -0,85 V (vs. Ag/AgCl). La disparition de ce signal lors du deuxième cycle suggère que la surface a été saturée par le greffage du TBO⁺.

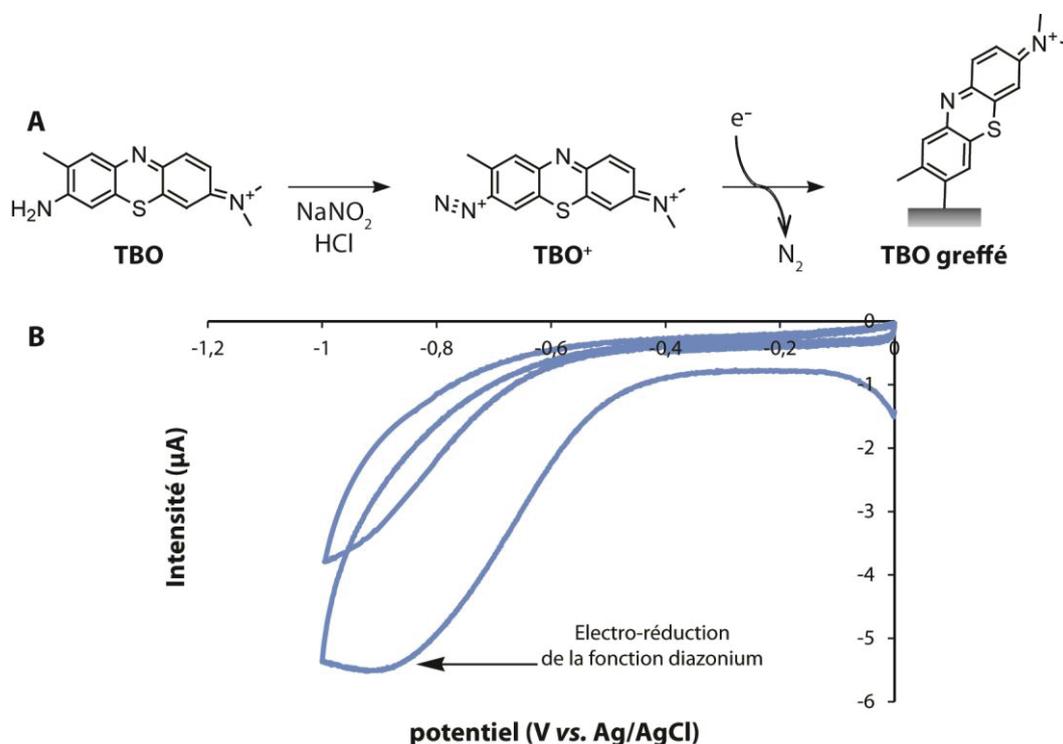


Fig. 57 : (A) Schéma réactionnel de la diazotation du TBO (TBO⁺) suivie de son électro-greffage à la surface d'une électrode. (B) Electro-réduction par voltammétrie cyclique de 5 mM de TBO⁺ (dans une solution de HCl 0,2 M) sur une ECV. Greffage réalisé sur 2 cycles, de 0 à -1 V (vs. Ag/AgCl) avec une vitesse de 50 mVs⁻¹ à température ambiante.

b) Electropolymérisation du TBO

L'électropolymérisation est une méthode qui permet de produire un polymère à la surface d'une électrode par oxydation électrochimique de monomères (Fig. 58A). Cette méthode peut être réalisée par voltammétrie cyclique dont l'avantage est de pouvoir suivre la

Résultats et discussion : Assemblage moléculaire pour la mise au point d'une bioanode fonctionnant avec les déshydrogénases à NAD⁺

formation et la croissance d'un polymère redox en temps réel. Ce suivi s'observe par l'augmentation d'intensité des pics anodiques (pic d'oxydation : I_{ox}) et cathodiques (pics de réduction : I_{red}) correspondant au polymère. L'électropolymérisation s'applique généralement à des molécules possédant des groupements aryl amines. Dans le cas du TBO, un pH basique (pH 9,1) est nécessaire pour obtenir une électropolymérisation optimale, contrairement à l'aniline ou au pyrrole, qui nécessitent des pH acides ou neutres (Karyakin et al. 1993; Karyakin et al. 1999). Il a été montré que les ions hydroxydes (OH⁻) ont un effet catalytique sur l'électropolymérisation du TBO ainsi que sur d'autres phénazines telles que le bleu de méthylène ou le rouge neutre (Karyakin et al. 1999).

L'électropolymérisation du TBO sur une ECV (7 mm² de surface) est réalisée par voltammétrie cyclique dans les conditions optimales décrites par Karyakin (Karyakin et al. 1999). L'ECV est immergée dans une solution de TBO (0,4 mM) dans du tampon borate (10 mM, pH 9,1, contenant 100mM de NaNO₃) et dix cycles balayant les potentiels compris entre -0,4 et 0,8 V (vs. Ag/AgCl) à une vitesse de 50 mV.s⁻¹ sont effectués (Fig. 58B). L'oxydation des monomères est observable au cours du premier cycle par un pic d'oxydation à +0,7 V (I_{mono}). La disparition de ce pic à partir du second balayage indique l'irréversibilité de cette oxydation. D'autre part, deux nouveaux pics propres à la formation du polyTBO apparaissent à partir du deuxième cycle : un pic anodique à -0,1 V (vs. Ag/AgCl) (I_{ox}), et un pic cathodique à -0,2 V (vs. Ag/AgCl) (I_{red}). Ces pics croissent en intensité au fur et à mesure des cycles pour atteindre au dixième cycle des valeurs de 9,8 μ A et de -9,6 μ A (140 et -137 μ A.cm⁻²). L'augmentation d'intensité de ces signaux redox reflète la formation d'une couche constituée d'un polymère redox de TBO (polyTBO) ayant la capacité de se réduire et s'oxyder électrochimiquement à de faibles potentiels et de manière réversible.

Résultats et discussion : Assemblage moléculaire pour la mise au point d'une bioanode fonctionnant avec les déshydrogénases à NAD⁺

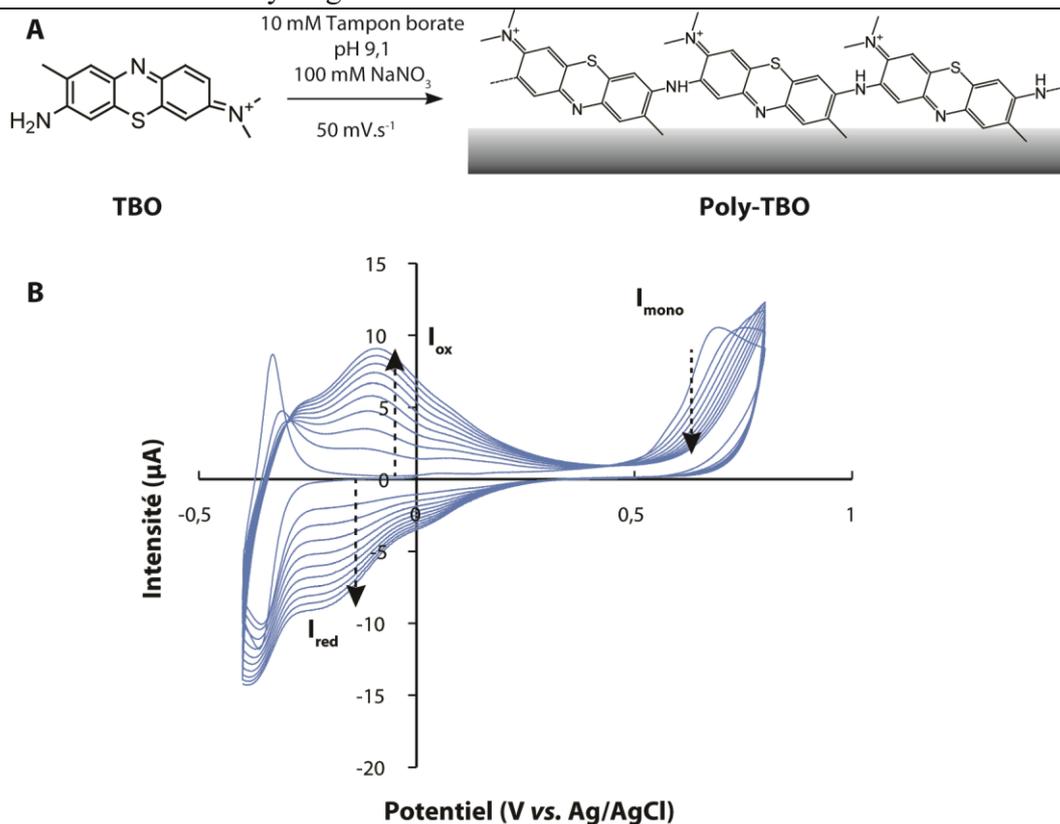


Fig. 58 : (A) Réaction putative de la formation du polyTBO à la surface d'une électrode. (B) Electropolymérisation par voltammétrie cyclique, de 0,4 mM de TBO en solution dans du tampon borate (10 mM, pH 9,1 contenant 100 mM de NaNO₃) sur une ECV. Les pics anodique (I_{ox}) et cathodique (I_{red}) du polymère, ainsi que le pic d'oxydation des monomères (I_{mono}) sont indiqués sur le voltammogramme avec leurs sens de croissance. Electropolymérisation réalisée sur 10 cycles, de +0,8 à -0,4 V avec une vitesse de balayage de 50 mV.s⁻¹, à température ambiante.

c) Electro-oxydation du NADH

Afin de comparer la capacité des deux surfaces de TBO (TBO greffé et polyTBO) à oxyder le NADH, trois type de caractérisations électrochimiques ont été réalisées : une caractérisation par voltammétrie cyclique dans un électrolyte; et deux mesures ampérométriques, l'une en présence de différentes concentrations de NADH et l'autre en présence de NAD⁺ réduit par la formiate déshydrogénase (FDH). Ces mesures ont été effectuées sur trois ECVs : une ECV nue (ECV), une ECV modifiée par l'électro-greffage de TBO⁺ (ECV_{TBO}), et une ECV modifiée par l'électropolymérisation du TBO (ECV_{polyTBO}).

Dans un premier temps, le comportement redox des trois électrodes a été étudié par voltammétrie cyclique dans du tampon phosphate (pH 7) (Fig. 59). Les voltammogrammes obtenus permettent d'observer au préalable, un pic anodique (I_{TBOox}) et un pic cathodique (I_{TBOred}) pour chacune des deux électrodes modifiées contrairement à l'électrode nue (ECV).

Résultats et discussion : Assemblage moléculaire pour la mise au point d'une bioanode fonctionnant avec les déshydrogénases à NAD⁺

I_{TBOred} et I_{TBOox} reflétant respectivement la réduction et l'oxydation électrochimique des couches de TBO, sont à -20 et +10 mV (vs. Ag/AgCl) pour l' ECV_{TBO} , et à -200 et 0 mV pour l' $ECV_{polyTBO}$. Ces observations permettent de constater que l'électro-greffage et l'électropolymérisation du TBO engendrent tous deux une couche de médiateurs redox. Néanmoins, les intensités des signaux redox obtenues avec l' $ECV_{polyTBO}$ (I_{TBOox} : 9,5 μA et I_{TBOred} : -9 μA) sont 10 fois plus importantes que celles obtenues avec l' ECV_{TBO} (I_{TBOox} : 1,2 μA et I_{TBOred} : -0,9 μA).

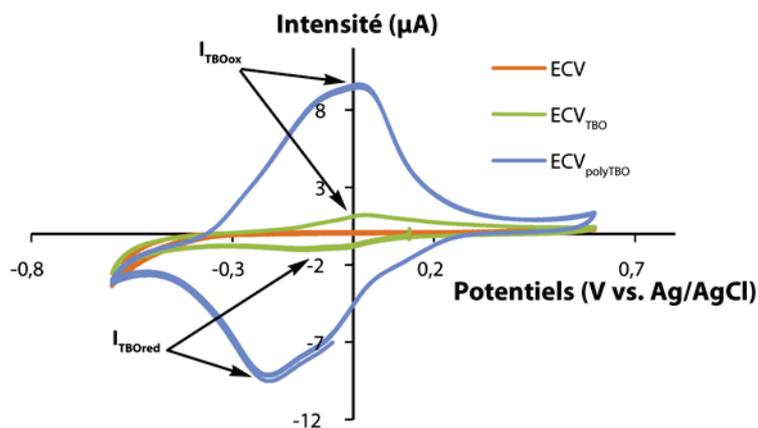


Fig. 59 : Caractérisation par voltammétrie cyclique de trois ECVs : ECV nue (ECV), ECV modifiée par l'électro-greffage du TBO⁺ (ECV_{TBO}), ECV modifiée par l'électropolymérisation du TBO ($ECV_{polyTBO}$). Mesures réalisées dans du tampon phosphate (100 mM, pH 7 contenant 100 mM de KCl) durant 2 cycles de -0,6 à +0,6 V (vs. Ag/AgCl) à 50 $mV.s^{-1}$, à température ambiante.

Afin de vérifier que les couches de TBO sont capables d'électro-oxyder le NADH, des mesures ampérométriques à +0,15 mV (vs. Ag/AgCl) sont effectuées sur les trois électrodes durant lesquelles des injections successives de NADH sont effectuées. Les intensités mesurées au cours de ces injections, reflètent l'oxydation électrochimique du NADH à la surface des électrodes. Des courbes d'intensité en fonction de la concentration en NADH sont obtenues à partir de ces mesures et permettent de comparer la capacité des trois électrodes à oxyder le cofacteur (Fig. 60A). Aucune variation d'intensité liée à l'oxydation du NADH n'est enregistrée avec l'ECV non modifiée. Ceci indique qu'un potentiel de +0,15 V (vs. Ag/AgCl) n'est pas suffisant pour induire l'oxydation électrochimique directe du cofacteur. Par ailleurs, une augmentation de l'intensité sous forme de courbes hyperboliques est obtenue avec l' ECV_{TBO} et l' $ECV_{polyTBO}$. Les courants mesurés sur ces dernières sont induits par un transfert d'électrons « médié » (MET) par le TBO (Fig. 60B). L'intensité maximale (I_{max}) mesurée sur l' $ECV_{polyTBO}$ est de 10,5 μA ($150 \mu A.cm^{-2}$) tandis qu'un I_{max} de 1,4 μA ($20 \mu A.cm^{-2}$) est atteinte avec l' ECV_{TBO} . Par conséquent, le polyTBO est capable de

Résultats et discussion : Assemblage moléculaire pour la mise au point d'une bioanode fonctionnant avec les déshydrogénases à NAD⁺

produire un courant dix fois plus important qu'avec le TBO électro-greffé. Cette comparaison permet de suggérer que la surface électro-active formée par le polymère est plus importante que celle obtenue par l'électro-greffage.

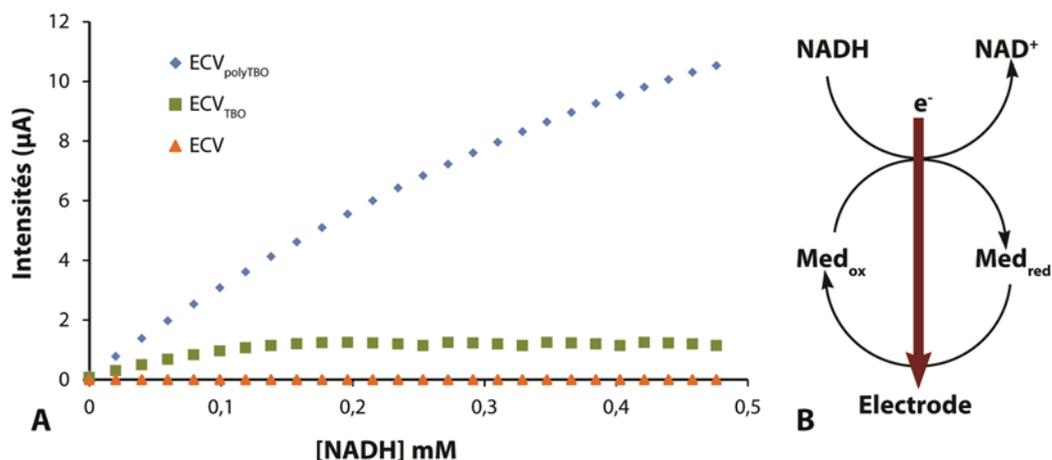
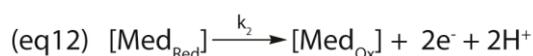
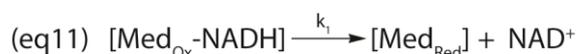


Fig. 60 : (A) Signaux électrochimiques d'oxydation du NADH en solution enregistrés sur trois ECVs : ECV nue (ECV), ECV modifiée par l'électro-greffage de TBO⁺ (ECV_{TBO}), ECV modifiée par l'électropolymérisation du TBO (ECV_{polyTBO}). Mesures réalisées sous agitation par chrono-ampérométrie à +0,15 V (vs. Ag/AgCl) dans du tampon phosphate (100 mM, pH 7 contenant 100 mM de KCl). Signaux obtenus par des injections de 10 µl de NADH 10 mM sous agitation, à température ambiante. (B) Schéma du transfert d'électron sur l'électrode.

L'électro-oxydation du NADH sur une couche de médiateur peut être décrite d'après Bartlett par un mécanisme Michaelien (Pinczewska et al. 2012). Dans un modèle simplifié, le NADH forme dans un premier temps un complexe avec le médiateur (eq10) suivit de son oxydation par le médiateur lui-même réduit (eq11) puis oxydé électrochimiquement à l'électrode (eq12). Une constante de Michaelis apparente (K_M) permet de caractériser l'affinité du cofacteur au médiateur immobilisé. Il est important de noter que cette constante ne correspond pas au K_M décrit en enzymologie et tient compte des phénomènes de diffusion à l'interface entre la surface de l'électrode et l'électrolyte. Les constantes de vitesse k_1 et k_2 sont liées respectivement à la vitesse d'oxydation chimique du NADH et à l'oxydation électrochimique du médiateur confiné à la surface de l'électrode.



En utilisant l'équation 13 où I est l'intensité mesurée et I_{max} est l'intensité maximale, des K_M correspondant à la formation du complexe [TBO-NADH] ont pu être calculés à partir

Résultats et discussion : Assemblage moléculaire pour la mise au point d'une bioanode fonctionnant avec les déshydrogénases à NAD⁺

des courbes d'intensité en fonction de la concentration en NADH. Des valeurs de K_M de $0,824 \pm 0,044$ mM et de $0,088 \pm 0,004$ mM ont été obtenues respectivement pour l'ECV_{polyTBO} et l'ECV_{TBO}. On peut ainsi constater que la surface modifiée par l'électro-greffage de TBO à un K_M dix fois plus faible que celui obtenu avec le polyTBO. Ceci peut s'expliquer par le fait que la surface de l'ECV_{TBO} est saturée à des concentrations plus petites ($> 0,2$ mM) que celle sur l'ECV_{polyTBO} ($> 0,45$ mM).

$$(eq13) \quad I = \frac{I_{max} [NADH]}{K_M + [NADH]}$$

Dans un troisième temps, des mesures ampérométriques en présence de NADH produit par une réaction enzymatique ont été réalisées (Fig. 61B). La formiate déshydrogénase (FDH) de *Candida boidinii* a été utilisée au cours de cette expérience. Cette dernière catalyse l'oxydation du formiate en présence de NAD⁺ qui joue le rôle d'accepteur d'électron (réaction décrite par l'équation 14).



Pour réaliser ces mesures, les trois électrodes sont immergées dans une solution sous agitation contenant les substrats de la FDH (NAD⁺ et formiate). Afin que la réaction enzymatique ne soit pas limitante, des concentrations saturantes de substrats sont utilisées ($[NAD^+] = 5$ mM pour un K_M de $50 \mu M$ et $[HCOO^-] = 300$ mM pour un K_M de 3 mM) (Schutte et al. 1976). Un potentiel de $+0,15$ V (vs. Ag/AgCl) est imposé durant les mesures (Fig. 61A). Après stabilisation du signal ampérométrique, la réaction enzymatique est initiée par l'addition de FDH (activité finale : $0,16$ U/ml). Après l'ajout d'enzyme, une augmentation de l'intensité est observée sur l'ECV_{TBO} et l'ECV_{polyTBO} jusqu'à atteindre au bout de trois minutes, des valeurs d'intensités maximales. Des intensités de $23 \mu A$ ($329 \mu A.cm^{-2}$) et de $0,6 \mu A$ ($9 \mu A.cm^{-2}$) sont respectivement obtenues avec l'ECV_{polyTBO} et l'ECV_{TBO}. Ces mesures permettent de constater qu'à partir d'une réaction enzymatique en conditions saturante, l'ECV_{polyTBO} est capable de fournir une intensité maximale 40 fois supérieure à celle développée par l'ECV_{TBO}. D'autre part, les deux courbes enregistrées ont un comportement linéaire durant les 30 secondes qui suivent l'injection de FDH. Les pentes de ces parties linéaires ont été calculées et reflètent la vitesse d'oxydation électrochimique du NADH. Cette vitesse est de $3 nA.s^{-1}$ pour l'ECV_{TBO}, et est cent fois plus élevée pour l'ECV_{polyTBO} ($307 nA.s^{-1}$). Ces observations indiquent que la couche de polyTBO permet d'oxyder le NADH de manière plus efficace que la couche de TBO électro-greffé.

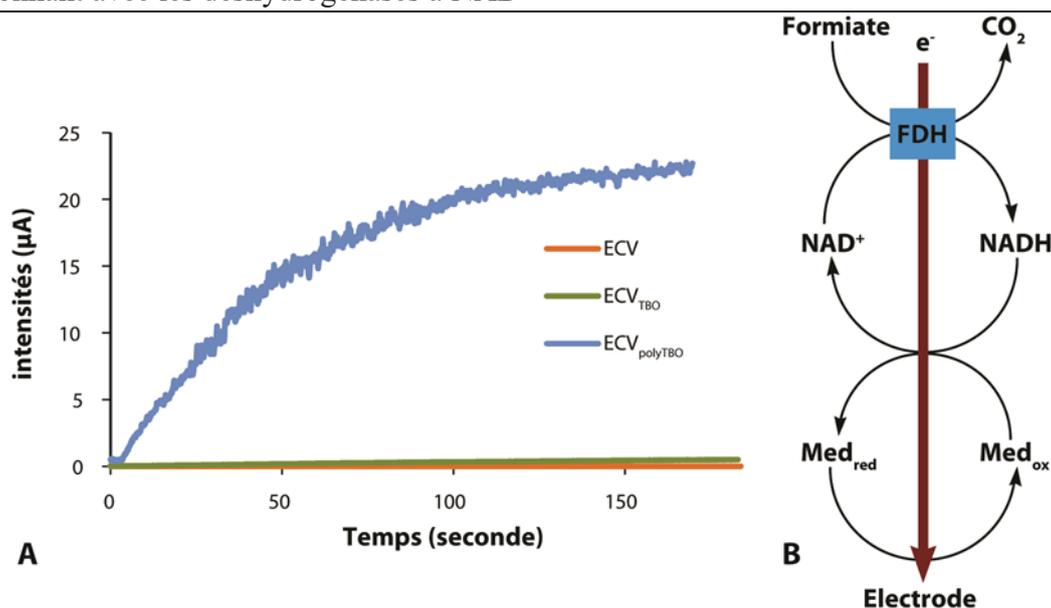


Fig. 61 : (A) Signaux électrochimiques d'oxydation du NADH en solution produit par la formiate déshydrogénase (FDH), enregistrés sur trois ECVs : ECV nue (ECV), ECV modifiée par l'électro-greffage de TBO⁺ (ECV_{TBO}), ECV modifiée par l'électropolymérisation du TBO (ECV_{polyTBO}). Mesures réalisées à température ambiante sous agitation par chrono-ampérométrie à +0,15 V (vs. Ag/AgCl) dans du tampon phosphate (100 mM, pH 7 contenant 100 mM de KCl) contenant 5 mM de NAD⁺ et 300 mM de formiate. Après 5 secondes de mesures, la FDH a été injectée pour une activité finale de 0,16 U.ml⁻¹. (B) Schéma du transfert d'électron sur l'électrode.

D'après ces résultats, la couche de TBO générée par électropolymérisation, conduit à de meilleurs signaux d'oxydation électrochimique du NADH comparés à ceux obtenus par électro-greffage. Par conséquent, l'étude portant sur l'immobilisation de cofacteurs nicotiniques, sera réalisée sur des ECVs modifiées par un polyTBO. Cependant, il va être nécessaire d'utiliser une molécule intermédiaire « linker », pour fixer du NAD⁺ sur la couche de poly TBO.

III. Etude de l'immobilisation du NAD⁺ par une molécule « linker » : les acides phénylboroniques

Cette partie est dédiée à l'étude de la fixation entre un acide phénylboronique et le NAD⁺. Les acides boroniques sont de bons candidats « linkers » car ils sont capables de former des liaisons esters avec les hydroxyles vicinaux de certains sucres et plus particulièrement avec les riboses portés par le couple NAD⁺/NADH (Fig. 62). L'équipe de Polsky a utilisé ces acides greffés sur des électrodes de carbone pour immobiliser des cellules vivantes *via* les motifs de glycosylations exposées à leur surface membranaire (Polsky et al.

Résultats et discussion : Assemblage moléculaire pour la mise au point d'une bioanode fonctionnant avec les déshydrogénases à NAD⁺ (2008). L'usage de ces molécules est aussi retrouvé dans la mise au point de capteurs électrochimiques à glucose (Morita et al. 2011).

Dans notre étude, la fixation covalente du NAD⁺ doit être réalisée sur la couche de polyTBO décrite ci-dessus. De prime abord, avant d'étudier cet assemblage, l'estérification entre les riboses du NAD⁺ et des acides phénylboroniques a été étudiée en solution puis en surfaces.

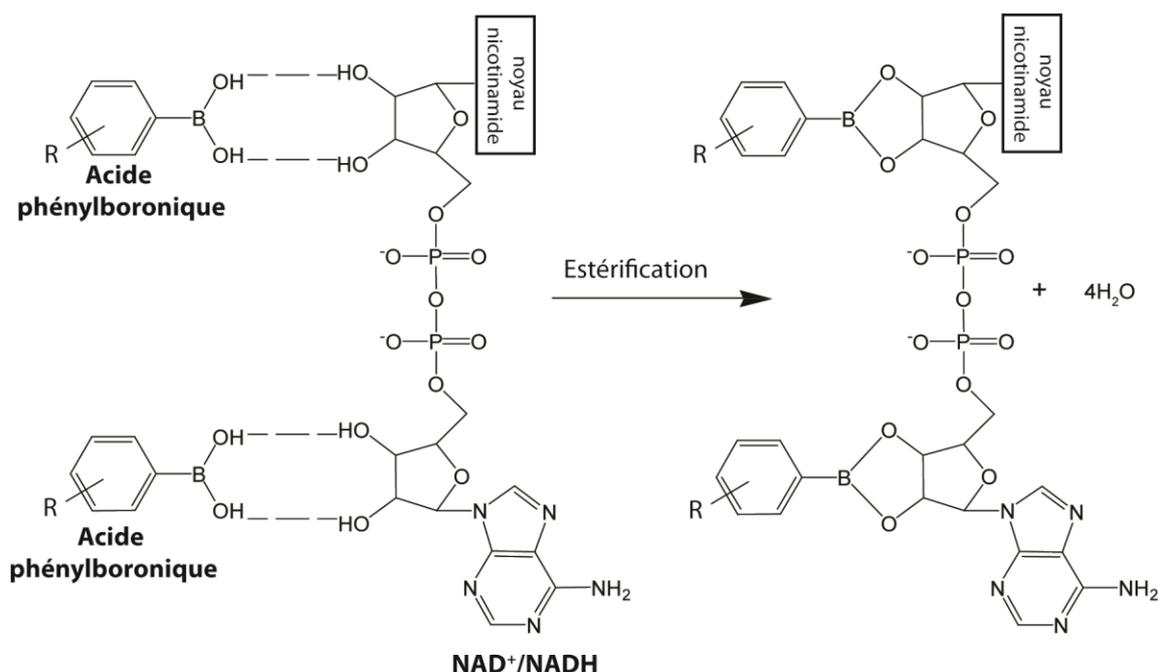


Fig. 62 : Estérification entre les riboses du couple NAD⁺/NADH et un acide phénylboronique.

III.1. Etude en solution

Dans le but de vérifier l'estérification d'un acide phénylboronique avec le NAD⁺ en solution, un marqueur de fluorescence a été utilisé : le rouge d'alizarine S (ARS : Alizarin Red S). Excité à 495 nm, l'ARS fluoresce à des longueurs d'ondes comprises entre 500 et 700 nm. Cette fluorescence est amplifiée et déplacée vers des longueurs d'onde plus élevées en présence d'acides boroniques. L'ARS est une dihydroxy-anthraquinone dont les deux hydroxyles sont vicinaux et peuvent s'estérifier avec des acides boroniques. L'échange de protons entre la partie anthraquinone de la molécule et ces hydroxyles a un effet atténuateur sur la fluorescence de la molécule. L'estérification avec un acide boronique permet de bloquer cet effet et ainsi augmenter la fluorescence de l'ARS (Springsteen et al. 2001). Ce phénomène peut être utilisé comme un outil pour d'une part, mettre en évidence l'estérification entre un acide boronique et les riboses portés par le NAD⁺ (Fig. 63A), et d'autre part, de déterminer des constantes de dissociation. L'estérification entre un acide boronique et un diol est décrite

Résultats et discussion : Assemblage moléculaire pour la mise au point d'une bioanode fonctionnant avec les déshydrogénases à NAD⁺ comme dépendant du pH. La littérature indique que pour obtenir des esters stables, il est nécessaire d'utiliser des pH supérieurs au pKa de l'acide boronique utilisé (Vanduin et al. 1985; Verchere et al. 1987). Cependant, Springsteen a montré que les tests avec l'ARS peuvent être réalisés à pH neutre indépendamment du pKa de l'acide boronique (Springsteen et al. 2002). Des mesures avec l'ARS et l'acide 3-amino-phénylboronique (3AB) de pKa 8,7 ont donc été réalisées à pH 7. Le 3AB a été choisi car la fonction amine pourra être utilisée pour son immobilisation.

La fluorescence de 0,1 mM d'ARS a été mesurée en absence ou en présence de 1 mM d'acide 3-amino-phénylboronique (3AB) (Fig. 63B). En présence de 3AB, le pic de fluorescence de l'ARS se déplace de 545 à 590 nm et son intensité augmente de six fois environ. Aux mêmes concentrations, une diminution de l'intensité de fluorescence est observée en présence de concentrations croissantes de NAD⁺ (1 ; 2,5 ; 5 ; 10 ; 50 mM). A 50 mM de NAD⁺ (50 mM), un retour à une longueur d'onde et à une intensité initiale est observé. Ces résultats indiquent donc que le 3AB est capable de s'estérifier avec le NAD⁺. Néanmoins il n'est pas possible de déterminer si l'un des deux riboses portés par le cofacteur est favorisé ou si l'estérification s'effectue simultanément sur les deux.

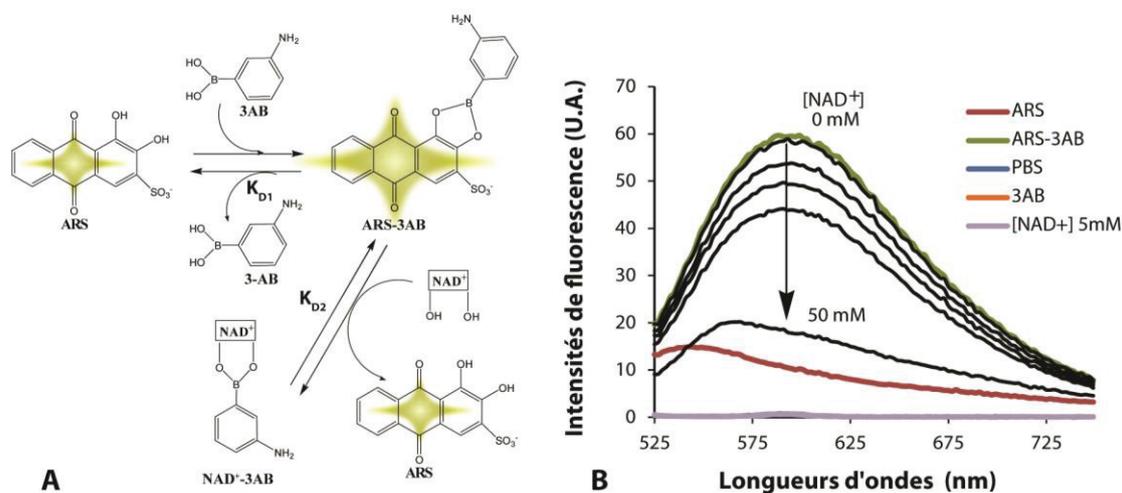


Fig. 63 : (A) Compétition entre deux réactions impliquant l'acide 3-amino-phénylboronique (3AB) avec, soit le rouge d'alizarine S (ARS), soit le NAD⁺. L'intensité de fluorescence de l'ARS est représentée par les étoiles vertes. (B) Intensité d'émission de fluorescence ($\lambda_{ex} = 495\text{nm}$) de l'ARS (0,1 mM) dans du tampon phosphate (100 mM, pH 7) en présence (ARS+3AB) ou non de 3AB (1 mM). Des solutions contenant les mêmes concentrations d'ARS et de 3AB ont été mises en présence de différentes concentrations NAD⁺ (1; 2,5; 5; 10; 50 mM) (courbes noires). Des mesures de fluorescence du tampon (PBS) et du NAD⁺ ont été réalisées dans les mêmes conditions

Résultats et discussion : Assemblage moléculaire pour la mise au point d'une bioanode fonctionnant avec les déshydrogénases à NAD⁺

En utilisant un modèle de fixation (d'écrit par l'équation 5 page 88), les constantes de dissociation des réactions entre l'ARS et le 3AB (K_{D1}) et entre le NAD⁺ et le 3AB (K_{D2}) ont été déterminées (voir partie II.1.4, page 87). Pour cela, trois séries de mesures d'émission de fluorescence à 590 nm (λ_{em}) à un λ_{ex} de 495 nm ont été réalisées avec une concentration fixe d'ARS de 0,1 mM en présence de différentes concentrations de 3AB. La première série de mesures a été réalisée en absence de NAD⁺ et les deux autres en présence d'une concentration fixe de NAD⁺ de 2 mM et 5 mM. Ces mesures ont permis de calculer les concentrations de complexe ARS-3AB ($[cplx]$) et de 3AB non lié à l'ARS ($[3AB]_l$). Ces valeurs ont été utilisées pour tracer les courbes représentées sur la Fig. 64. En présence de 3AB, la fluorescence de l'ARS augmente traduisant la formation de complexe ARS-3AB. L'ajout de NAD⁺ a un effet atténuateur sur la fluorescence. La présence du cofacteur induit donc un déplacement de l'équilibre entre l'ARS et le 3AB pouvant être assimilé à une inhibition compétitive retrouvée dans un mécanisme enzymatique. Une valeur de K_{D1} de 0,5 mM et un K_{D2} de 3,6 mM à un pH de 7 a été déterminé à partir des équations 5, 6, 7 et 8. Toute les expériences suivantes seront réalisées à ce pH.

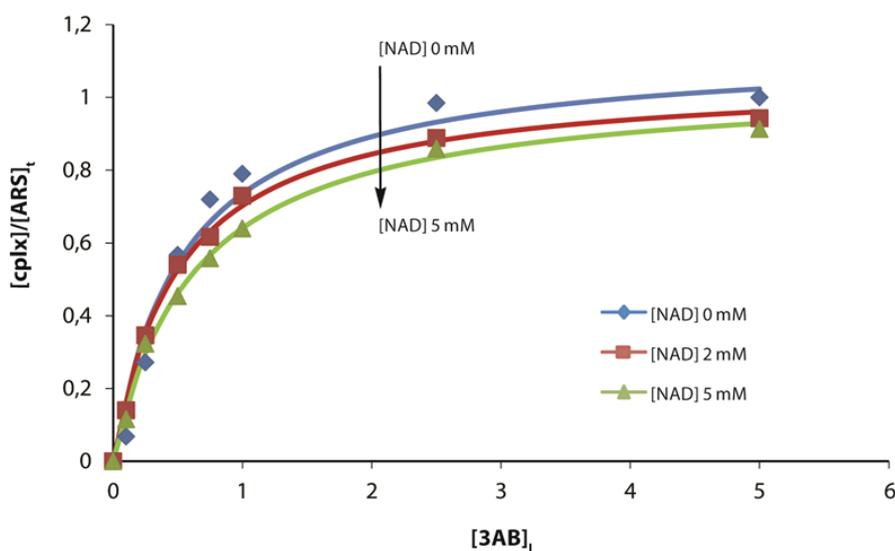


Fig. 64 : Courbes obtenues avec les concentrations du complexe ARS-3AB $[cplx]$ normalisée par la concentration totale d'ARS $[ARS]_t$, en fonction de la concentration de 3AB non lié à l'ARS $[3AB]_l$, en absence ou en présence de NAD⁺. Les concentrations $[cplx]$ et $[3AB]_l$ ont été calculées à partir de mesures d'émission de fluorescence à 590 nm avec un λ_{ex} de 495 nm. Ces mesures ont été réalisées dans du tampon phosphate (100 mM, pH 7) avec 0,1 mM d'ARS et différentes concentrations de 3AB (0,1 ; 0,25 ; 0,5 ; 0,75 ; 1 ; 2,5 ; 5 ; 7,5 ; 10 mM).

III.2. Étude en surface

Pour vérifier si le NAD⁺ est capable de s'estérifier sur des surfaces portant des molécules « *Linker* », une étude a été réalisée sur des électrodes modifiées par l'électro-greffage d'acide phénylboronique. Ces travaux ont également permis de vérifier l'accessibilité du cofacteur immobilisé à des enzymes en solution. Différentes méthodes de mesure ont été utilisées pour caractériser l'immobilisation du NAD⁺ en surface. Dans un premier temps des mesures de réflectivité par imagerie de résonance plasmonique de surface (SPRi) ont été effectuées, suivies de mesures électrochimiques. Dans cette partie, les ECV ont été remplacées par des électrodes d'or afin d'effectuer des caractérisations électrochimiques comparables aux caractérisations effectuées par SPRi sur prisme d'or. La FDH de *Candida boidinii* a été utilisée comme enzyme modèle tout au long de ces expériences.

a) Modification des surfaces d'or

Pour cette étude, un assemblage a été réalisé en quatre étapes sur une surface d'or (Fig. 65) :

- Premièrement, du 4-aminophénylboronate (PE) portant une fonction acide boronique protégée par un ester de pinacol, est diazoté en milieu aqueux pour donner un 4-diazonium-phénylbonate de pinacol (PE⁺). Cette forme protégée permet de conserver la fonction acide boronique du milieu de diazotation.
- Deuxièmement, le PE⁺ est électro-greffé par voltammétrie cyclique.
- Troisièmement, la fonction ester de pinacol est déprotégée par oxydation chimique par le périodate de sodium (NaIO₄).
- Quatrièmement, la surface est incubée successivement avec une solution de NAD⁺ et de FDH puis rincée.

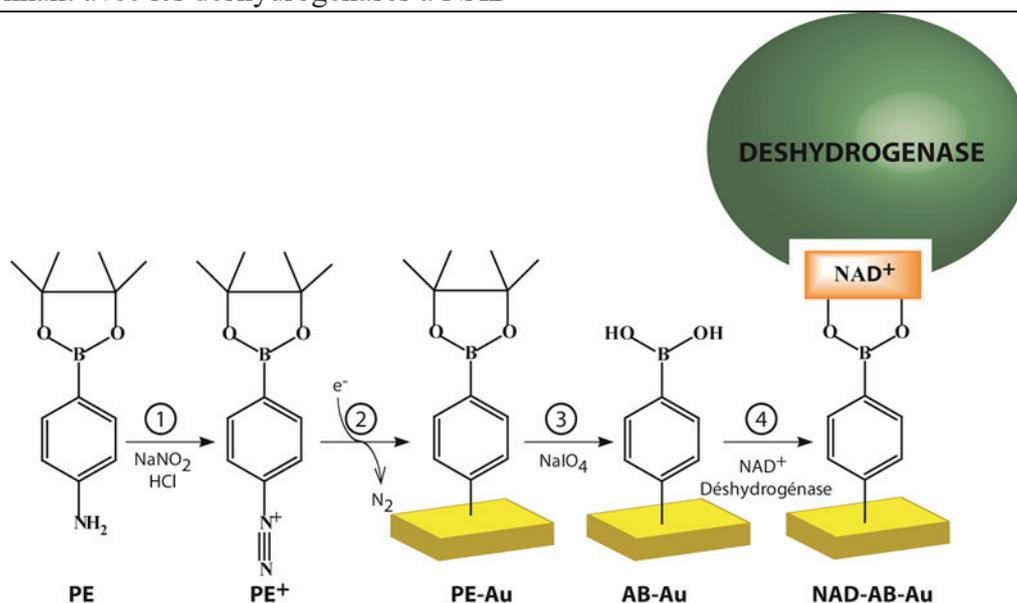


Fig. 65 : Etapes d'assemblages permettant l'immobilisation du NAD⁺ sur une surface d'or (Au) : (1) diazotation d'un phénylboronate de pinacol (PE) ; (2) électrogreffage du diazonium (PE⁺) ; (3) déprotection de la fonction acide boronique (AB) par du périodate (NaIO₄) ; (4) immobilisation du NAD⁺ et d'une déshydrogénase.

Le même assemblage est réalisé avec un diazonium commercial : le 4-diazonium-bromobenzène (Br⁺). Ce dernier permet d'obtenir une surface témoin exposant des atomes de brome incapables de fixer le NAD⁺. Le PE⁺ et le Br⁺ ont ainsi été électro-greffés par voltammétrie cyclique sur deux surfaces d'or distinctes (Fig. 66). Les voltammogrammes obtenus lors du greffage de ces deux molécules décrivent un pic d'électro-réduction à environ -0,8 V (vs. Pt). La disparition de ce signal lors du second cycle suggère que les surfaces ont été saturées par le greffage de molécules. Par ailleurs, dans le cas du PE⁺, un deuxième pic est observé à -1,1 V (vs. Pt) pouvant correspondre à la réduction électrochimique de l'acide boronique en alcool, conduisant à la formation de phénol (Hosoi et al. 2010).

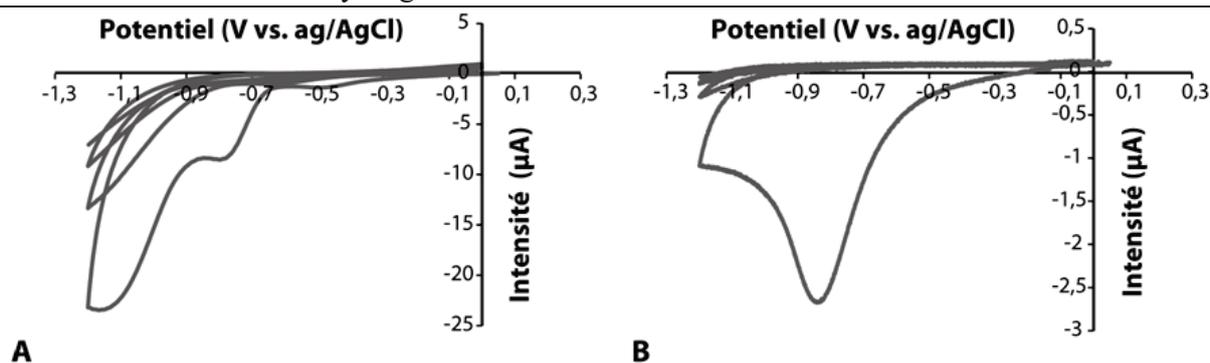


Fig. 66 Electro-réduction par voltammétrie cyclique de 20 mM de PE⁺ (A) et 20 mM de Br⁺ (B) (dans une solution de HCl 0,2 mM) sur des électrodes d'or (Au). Mesures réalisées sur 3 cycles, de 0 à -1 V (vs. Ag/AgCl) avec une vitesse de 100 mV.s⁻¹.

b) Caractérisation par mesure de résonance plasmonique de surface (SPR)

Des mesures de SPR ont été réalisées afin d'étudier d'une part, l'interaction entre le NAD⁺ et des surfaces portant des acides phénylboroniques, d'autre part, l'accessibilité de la FDH au NAD⁺ immobilisé. Ces mesures ont été effectuées sur un prisme d'or portant trois surfaces modifiées (3 mm²) séparées par un film plastique adhésif. Deux surfaces sont modifiées par électro-greffage de PE⁺ dont l'une est ensuite traitée au périodate pour déprotéger l'acide boronique (AB-Au) tandis que la deuxième n'est pas déprotégée (PE-Au). La troisième surface est modifiée par électro-greffage de Br⁺ (Br-Au). Les surfaces PE-Au et Br-Au serviront de surfaces témoins de l'immobilisation spécifique du NAD⁺ sur la surface AB-Au.

Des mesures de réflectivité (variation de l'angle de réflexion en %) sont réalisées sur ces trois surfaces durant lesquelles deux séries d'injections successives sont réalisées à débit constant (130 µl.min⁻¹). La première série est constituée de trois injections de solutions de NAD⁺ de concentrations croissantes (1 ; 5 ; 10 µM), suivie de sept injections de FDH (1 ; 2,5 ; 5 ; 10 ; 25 ; 100 et 500 µg/ml).

Première série : Lors des injections de NAD⁺, la réflectivité sur la surface AB-Au augmente pour atteindre une valeur maximum de 0,9 % pour une concentration de 10 µM (Fig. 67 insertA). Cette variation indique qu'au contact d'une solution de NAD⁺ la surface AB-Au a été modifiée et que le cofacteur a été immobilisé par les acide phénylboroniques exposés sur cette surface. D'autre part, des fluctuations négatives de réflectivité sont observées sur les surfaces PE-Au et Br-Au (réflectivité inférieure à 0,1 %) indiquant que le cofacteur n'interfère pas avec ces surfaces. Il est nécessaire de noter, que la faible, mais

Résultats et discussion : Assemblage moléculaire pour la mise au point d'une bioanode fonctionnant avec les déshydrogénases à NAD⁺

significative variation de réflectivité obtenue pour la surface AB-Au est due à la petite taille du NAD⁺ (662 Da). Lors de la deuxième série d'injection la surface AB-Au sera nommée NAD⁺-AB-Au.

Deuxième série : Afin d'étudier l'accessibilité du NAD⁺ à l'enzyme en solution, les injections de FDH sont réalisées sur ces mêmes surfaces (Fig. 67A). Après chaque injection, la réflectivité de la surface NAD⁺-AB-Au croît de manière significative. La même tendance est observée pour les surfaces PE-Au et Br-Au mais avec des variations beaucoup plus faibles. Des variations de réflectivité (Δ réflectivité) calculées à partir de la différence entre les réflectivités mesurées après chaque injection et celle de départ conduit à un comportement hyperboliques en fonction de la concentration de FDH (Fig. 67B). Les hyperboles obtenues permettent de montrer un effet de saturation sur les trois surfaces. La surface NAD⁺-AB-Au est saturée à une valeur de variation de réflectivité supérieure à 14 % à partir de 0,5 mg.ml⁻¹ de FDH, tandis que les deux autres surfaces sont saturées à des valeurs comprises entre 3 et 4 % pour une concentration de 0,1 mg.ml⁻¹ de FDH. Les valeurs obtenues sur ces deux dernières surfaces peuvent correspondre à des interactions non spécifiques entre l'enzyme et l'or et sont de 4 à 5 fois inférieures à la variation de réflectivité obtenue sur la surface NAD⁺-AB-Au. Ces résultats indiquent que la FDH interagit spécifiquement avec la surface NAD⁺-AB-Au. Il est donc possible d'affirmer que d'une part, la surface AB-Au permet d'immobiliser le NAD⁺ et que d'autre part, le cofacteur fixé est accessible à la FDH en solution. De surcroît, la densité de molécules immobilisées a pu être estimée en utilisant l'équation de calibration (eq 15) de l'appareillage utilisé :

$$(eq15) \Gamma = \frac{\Delta R \cdot L_{zc}}{S_{P,R} \cdot \partial n / \partial C}$$

où ΔR est la variation de réflectivité en pourcent, L_{zc} , la profondeur de pénétration de l'onde plasmonique ($1,02 \cdot 10^{-4}$ mm), le rapport $\partial n / \partial C$ est fixé à $1,9 \cdot 10^{-10}$ mm³.pg⁻¹, le $S_{P,R}$ désigne la sensibilité de la SPR en pourcent par unité d'index de réfraction ($2,25 \cdot 10^3$ %.RIU⁻¹), et Γ correspond à la densité de molécule en pmol.mm⁻². Des densités moléculaires de $0,324 \pm 0,070$ pmol.mm⁻² et $0,0509 \pm 0,001$ pmol.mm⁻² ont été calculées respectivement pour le NAD⁺ et la FDH. Par conséquent, 15,7 % de NAD⁺ immobilisés sont accessible à l'enzyme. Ce faible taux peut s'expliquer par la gêne stérique induit entre les enzymes en surface.

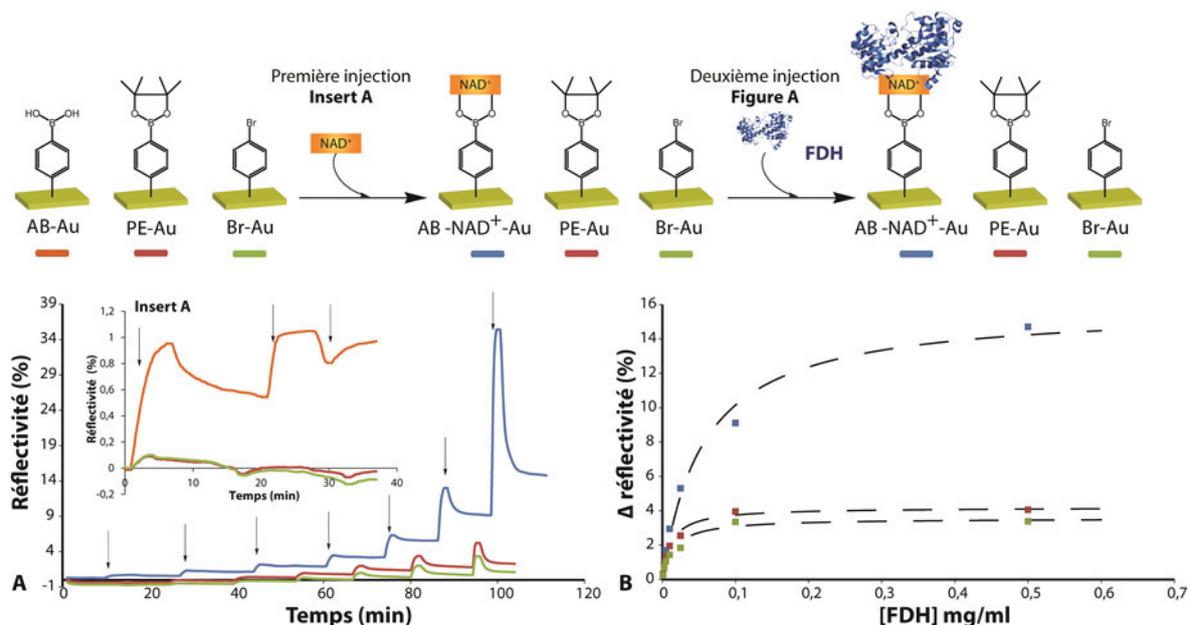


Fig. 67 : (A) Mesures de réflectivité sur 3 surfaces d'or (Au) modifiées par un acide phénylboronique (AB-Au), par du phénylboronate de pinacol (PE-Au) ou par du bromophényl (Br-Au). Deux séries d'injections consécutives (désignées par des flèches) sont réalisées sur ces surfaces dans du tampon phosphate (10 mM, pH 7,5). (Insert Figure A) Première injection : trois concentrations croissantes de NAD⁺ (1 ; 5 et 10 μM). (A) Deuxième injection : sept concentrations croissantes de formiate déshydrogénase (FDH) (1 ; 2,5 ; 5 ; 10 ; 25 ; 100 et 500 μg/ml). (B) Courbes des variations de réflectivités (Δréflectivité) en fonction de la quantité de FDH injectée.

c) Caractérisation électrochimique

En plus d'être un fluorophore, l'ARS peut être utilisé comme médiateur électrochimique. Afin de quantifier électrochimiquement le nombre d'acides phénylboroniques disponibles sur une surface AB-Au, l'ARS a été immobilisée sur cette dernière (ARS-AB-Au) (Fig. 68). Par ailleurs, cette étude a aussi pour but de confirmer les valeurs quantitatives obtenues par SPRi pour le NAD⁺ ($0,324 \pm 0,070 \text{ pmol}\cdot\text{mm}^{-2}$)

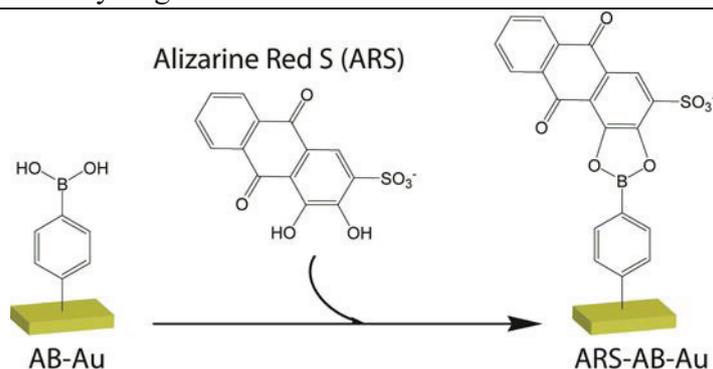


Fig. 68 : Immobilisation de l'ARS sur une surface d'or portant un acide phénylboronique.

Après avoir incubé une électrode portant une surface AB-Au avec une solution d'ARS, une série de mesures voltammétriques sont effectuée sur celle-ci à différentes vitesses de balayage allant de 1 à 0,01 V.s⁻¹ (Fig. 69A). Des couples de pics redox de potentiel et d'intensité différents sont obtenus décrivant la réversibilité des états redox de l'ARS. Ces signaux sont obtenus à différents potentiels selon la vitesse de balayage entre -0,15 et -0,02 V (vs. Pt) pour les pics anodiques, et entre -0,6 et -0,1 V (vs. Pt) pour les pics cathodiques. L'intensité en fonction de la vitesse de balayage est une droite ce qui signifie que les molécules d'ARS sont confinées et donc immobilisées à la surface de l'électrode (Laviron 1979) (Fig. 69B). A partir de ces résultats, la densité de molécules d'ARS immobilisées à la surface a pu être calculée à l'aide de l'équation 16 des droites obtenues ($i = f(v)$) :

$$(eq16) \quad i = \frac{n^2 \cdot F^2 \cdot \Gamma \cdot A}{4 \cdot R \cdot T} \cdot v$$

n est le nombre d'électron transféré (2 pour l'ARS), F est la constante de Faraday (96485 C.mol⁻¹), R la constante des gaz parfait (8,31 J.mol⁻¹.K⁻¹), T la température (293 K), A la surface de l'électrode (0,3 cm²), Γ la densité de molécule (mol.cm⁻²) et v la vitesse de balayage (V.s⁻¹). A partir des pentes des droites décrites sur la Fig. 69B, une densité d'ARS de 0,30 ± 0,03 pmol.mm⁻² a été calculée. Cette valeur vient ainsi confirmer celle obtenue par SPR pour le NAD⁺.

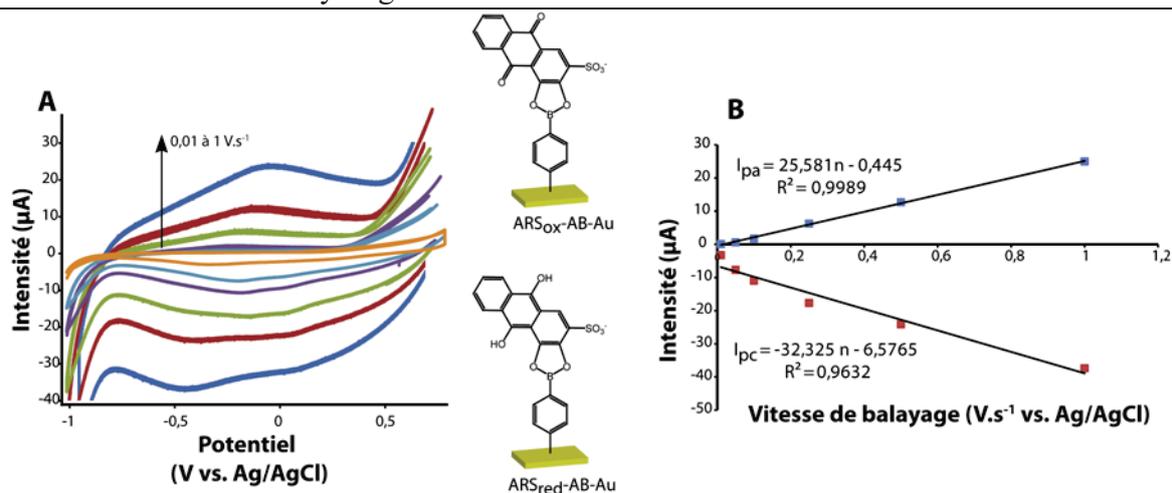


Fig. 69 : (A) Voltammogrammes obtenus à partir de mesures réalisées à des vitesses de balayage comprises entre 1 et 0,01 $V s^{-1}$ sur une électrode d'or modifiée par le complexe ARS-AB (ARS-AB-Au). (B) Droites d'intensité en fonction de la vitesse de balayage obtenues à partir des pics anodiques (I_{pa}) et cathodiques (I_{pc}). Mesures réalisées dans du tampon phosphate (10 mM, pH 7 contenant 100 mM de NaCl) à température ambiante.

Afin de mettre en évidence la possibilité de transformer électrochimiquement le cofacteur nicotinique immobilisé sur une surface AB-Au, mais aussi son accessibilité à une enzyme en solution, la forme réduite du cofacteur (NADH) a été immobilisée pour former une surface NADH-AB-Au. Des mesures voltamétriques entre -0,1 et +1 V (vs. Pt) sur quatre cycles ont été réalisées sur cette l'électrode (Fig. 70A). Au cours du premier cycle, un large pic correspondant à l'oxydation du NADH est observé à +0,5 V (vs. Pt) (Fig. 70A, Courbe a, réaction 1 sur la Fig. 70B). Ce signal disparaît lors du deuxième cycle indiquant que le NADH a été totalement oxydé électrochimiquement (Fig. 70A, Courbe b). Afin de vérifier que les cofacteurs oxydés sur l'électrode peuvent être réduits enzymatiquement, l'électrode est incubée dans une solution contenant de la FDH (0,07 U. ml⁻¹) et du formiate (300 mM) (réaction 2 sur la Fig. 70B). Après rinçage à l'eau distillée, une troisième mesure permet de constater que le pic d'oxydation du NADH est retrouvé avec la même intensité (Fig. 70A, Courbe d, réaction 3 sur la Fig. 70B). Parallèlement, une électrode NADH-AB-Au identique a été soumise au même test en absence de FDH et n'a présenté aucun signal correspondant à la régénération du NADH. Ces résultats ont donc permis de montrer que le cofacteur nicotinique immobilisé sur une surface fonctionnalisée par un acide phénylboronique, peut être à la fois électro-oxydé et réduit enzymatiquement.

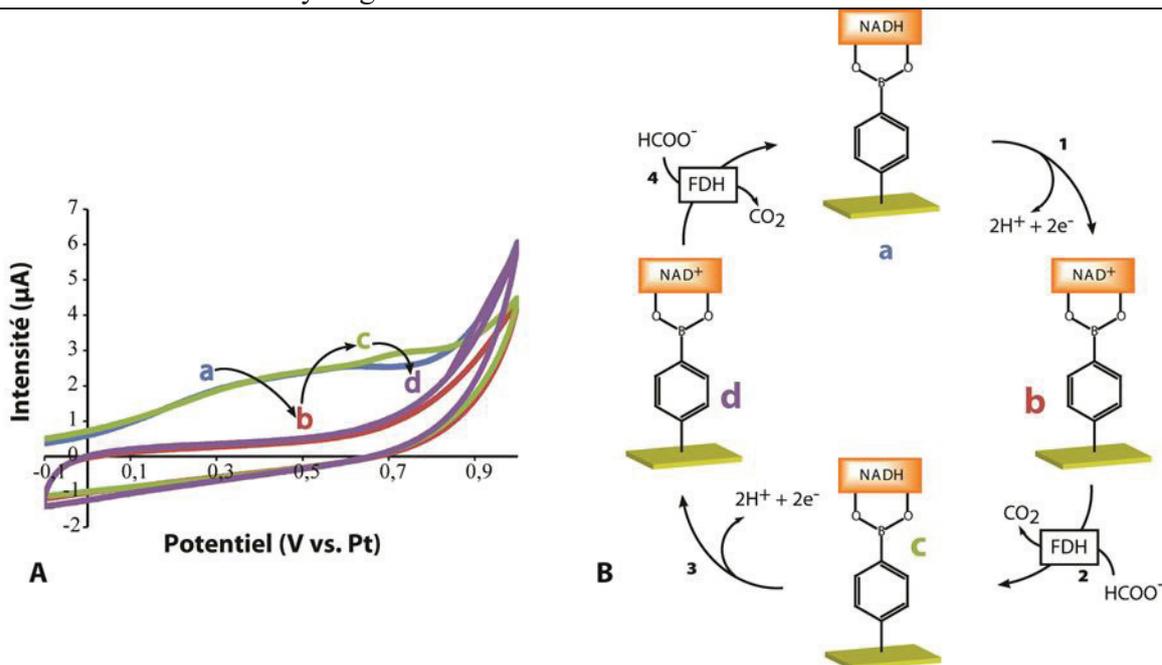


Fig. 70 : (A) Voltammétrie cyclique réalisée sur une électrode d'or modifiée par l'assemblage NADH-AB-Au. Le premier et le deuxième cycles de voltammétrie (a et b) ont été effectués après immobilisation du NADH, le troisième et quatrième cycles (c et d) ont été réalisés après 15 min d'incubation et rinçage de l'électrode dans une solution contenant 0,07 U.mL⁻¹ de FDH et 300 mM de formiate. Ces mesures ont été effectuées entre -0,1 V et +1 V (vs. Pt) à 0,1 V.s⁻¹ dans du tampon phosphate (100 mM, pH 7 contenant 100 mM de NaCl) à température ambiante. (B) Schéma décrivant les différentes étapes de réaction sur l'électrode. Les réactions 1 et 3 correspondent à l'électro-oxydation du NADH et les réactions 2 et 4 illustrent la réduction enzymatique du cofacteur immobilisé.

Finalement, afin d'évaluer la puissance électrique générée par l'assemblage NAD⁺-AB-Au, une électrode modifiée par celui-ci a été utilisée comme une bioanode dans un système constitué d'une cathode de platine et d'une électrode de référence Ag/AgCl. Ce système d'électrodes formant une demi-biopile a été immergé dans une solution sous agitation contenant du formiate en présence ou non de FDH. Une mesure voltammétrique a ensuite été effectuée avec une vitesse de 0,1 mV.s⁻¹ (Fig. 71). La courbe de puissance en présence de FDH montre qu'une densité de puissance maximale de 14 µW.cm⁻² est générée à +690 mV (vs.Ag/AgCl) tandis qu'une densité de puissance de 1,8 µW.cm⁻² au même potentiel est obtenue en absence d'enzyme. Par conséquent, l'électrode NAD⁺-AB-Au peut être utilisée comme une bioanode capable d'électro-oxider le cofacteur par un transfert direct d'électrons et de façon réversible en présence d'une déshydrogénase.

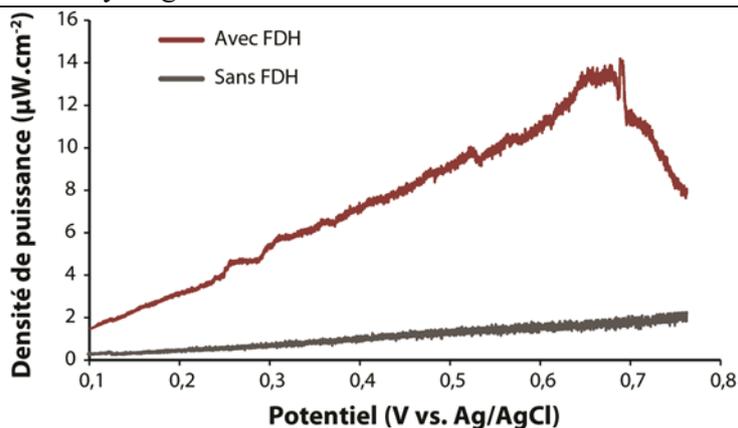


Fig. 71 : Densités de puissance en fonction du potentiel mesurées à partir de systèmes d'électrodes comprenant une bioanode NAD⁺-AB-Au, une cathode de platine et une électrode de référence Ag/AgCl. Mesures réalisées à 0,1 mV.s⁻¹ dans des solutions sous agitation en présence ou en absence de FDH (0,07 U.ml⁻¹) et du formiate (300 mM) dans du tampon phosphate (100 mM, pH 7 contenant 100 mM de NaCl) à température ambiante.

Le greffage électrochimique d'acide phénylboronique sur une surface d'or a permis de caractériser l'immobilisation du cofacteur nicotinique sous ses deux formes redox. Les mesures de SPR et d'électrochimie ont montré que le NAD⁺ immobilisé est électrochimiquement actif et capable de participer à des réactions enzymatiques avec des biocatalyseurs en solution. De plus, ces travaux ont montré que le NAD⁺ immobilisé semble apte à s'oxyder électrochimiquement et réversiblement sans l'aide de médiateurs redox sur une électrode d'or.

IV. Stratégies d'immobilisation du NAD⁺ sur une couche de polyTBO par un acide phénylboronique.

L'immobilisation du NAD⁺ sur une surface portant des acides phénylboroniques étant bien établie, il est à présent nécessaire de mettre au point une méthode permettant de coupler ces « *linkers* » à une couche de polyTBO afin d'immobiliser le cofacteur (Fig. 72). Cet assemblage doit être réalisé sans que les propriétés redox de la couche de médiateur ne soient altérées mais aussi de façon à ce que le NAD⁺ immobilisé soit à la fois capable d'interagir électrochimiquement avec le polyTBO et accessible à des enzymes en solution. Trois stratégies ayant pour but de générer une surface constituée de polyTBO et d'acide phénylboronique ont été abordées. Premièrement, des essais de co-électropolymérisation entre le TBO et un acide amino-phénylboronique ont été effectués. Deuxièmement, le greffage spontané d'acide phénylboronique diazotée sur la couche de polyTBO a été étudié. Troisièmement, la synthèse et l'utilisation d'une molécule unique électropolymérisable

Résultats et discussion : Assemblage moléculaire pour la mise au point d'une bioanode fonctionnant avec les déshydrogénases à NAD⁺ produite par un couplage chimique entre le TBO et un acide phénylboronique, a été expérimentée.

Ces trois stratégies ont été étudiées à travers des mesures ampérométriques et par spectroscopie d'impédance électrochimique (SIE) en présence d'un couple redox ([Fe(CN)₆]³⁻/[Fe(CN)₆]⁴⁻). La SIE consiste à mesurer la résistance en courant alternatif (impédance) à différentes fréquences à l'interface électrode/électrolyte. Cette technique permet donc de caractériser la surface de l'électrode à travers l'augmentation de la résistance ou de la conductivité. Les résultats fournis par ce type de mesure, sont représentés dans un plan complexe sous la forme de graphique de Nyquist avec des courbes de d'impédance imaginaire (Z_i) en fonction de d'impédance réelle (Z_r). Ces courbes présentent deux composantes, une partie circulaire générée à de hautes fréquences et une partie linéaire obtenue à de faibles fréquences. Les réactions faradiques à l'interface de l'électrode pourront être représentées par un circuit équivalent de Randles établi à partir de ce type de courbe (Fig. 73). Ce type de circuit est composé d'une résistance liée à l'électrolyte (R_s) en série avec un montage en parallèle constitué d'une capacitance en double couche (C_{dl}) et d'une résistance de transfert de charge à l'interface électrolyte-électrode (R_{ct}) associée à une composante de diffusion électrochimique appelée impédance de Warburg (Z_w). Dans notre étude, nous nous focaliserons sur la partie circulaire dont le diamètre permet d'estimer la R_{ct} . Les valeurs de R_{ct} obtenues à chaque étape d'assemblage, seront comparées pour montrer la présence et la nature des couches formées à la surface de l'électrode.

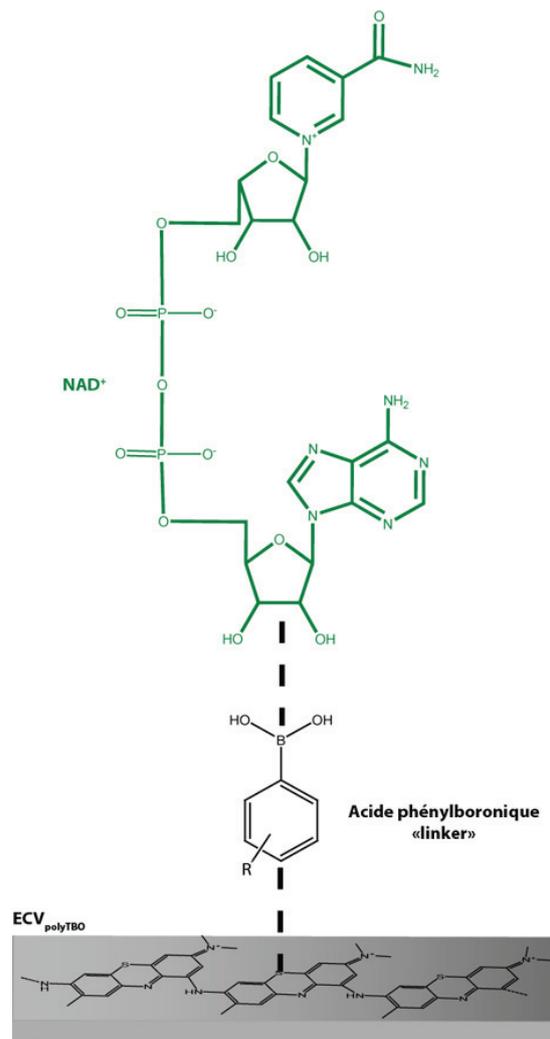


Fig. 72 : Assemblage de la bioanode à déshydrogénase.

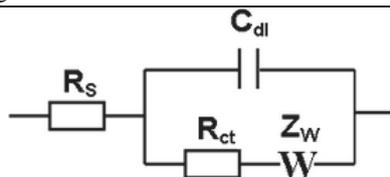


Fig. 73 : circuit équivalent de Randles

Avant d'étudier les différentes stratégies d'assemblage, une série de mesures préliminaires de SIE ont été effectuées sur des ECVs modifiées en deux étapes. Premièrement, les électrodes ont été modifiées, soit par l'électropolymère de TBO (ECV_{polyTBO}), soit par électropolymérisation d'acide 3-amino-phénylboronique (3AB) (ECV_{polyAB}). Pour réaliser l'électropolymérisation du 3AB dans des conditions idéales, il est nécessaire d'utiliser un milieu acide (Deore et al. 2008). Cependant, en vue d'étudier la copolymérisation entre le TBO et le 3AB, ce dernier a été électropolymérisé dans les conditions optimales du TBO (pH basique en présence de NaNO₃) (Karyakin et al. 1999). Dans un second temps, ces électrodes ont été incubées avec une solution de NAD⁺ (10 mM, pH 7) puis rincées rigoureusement à l'eau distillée. Les électrodes seront nommées ECV_{polyTBO-NAD⁺} et ECV_{polyAB-NAD⁺}.

Des mesures d'impédance ont été effectuées sur les deux électrodes entre chaque étape de modification. Ces expériences ont d'une part, pour but de vérifier l'effet du polyTBO sur la résistance au transfert de charge à la surface de l'électrode. D'autre part, ces mesures permettront d'observer si les conditions de l'électropolymérisation du TBO permettent de former un polymère avec le 3AB. L'interaction entre ces polymères et le cofacteur nicotinique après incubation dans une solution de NAD⁺, sera également étudiée au travers des signaux d'impédance.

Les mesures d'impédance ont été réalisées à des potentiels oscillants entre -50 et +50 mV (*vs.* Ag/AgCl) à des fréquences allant de 5 kHz à 50 mHz. La Fig. 74A décrit trois courbes de Nyquist, la première obtenue à partir d'une ECV nue, la deuxième après électropolymérisation du TBO (Fig. 74B) et la troisième après incubation avec le NAD⁺. Des R_{ct} de 7,2, 0,4 et 0,3 kOhm.cm⁻² sont calculées respectivement pour l'ECV nue, l'ECV_{polyTBO} et l'ECV_{polyTBO-NAD⁺}. Une diminution de résistance est donc observable après électropolymérisation du TBO indiquant qu'une surface électro-active a été formée. Cette diminution peut également s'expliquer par le fait que des transferts d'électrons entre le polyTBO et l'électrode sont générés pendant la mesure car les potentiels appliqués (courant alternatif entre -50 et +50 mV *vs.* Ag/AgCl) chevauchent les potentiels d'oxydation et de

Résultats et discussion : Assemblage moléculaire pour la mise au point d'une bioanode fonctionnant avec les déshydrogénases à NAD⁺

réduction du polyTBO ($E_{red} \approx -200$ mV et $E_{ox} \approx 0$ mV vs. Ag/AgCl). Après dépôt de NAD⁺, la valeur de R_{ct} reste inchangée ce qui démontre que le polyTBO, à lui seul, ne semble pas capable d'immobiliser le cofacteur.

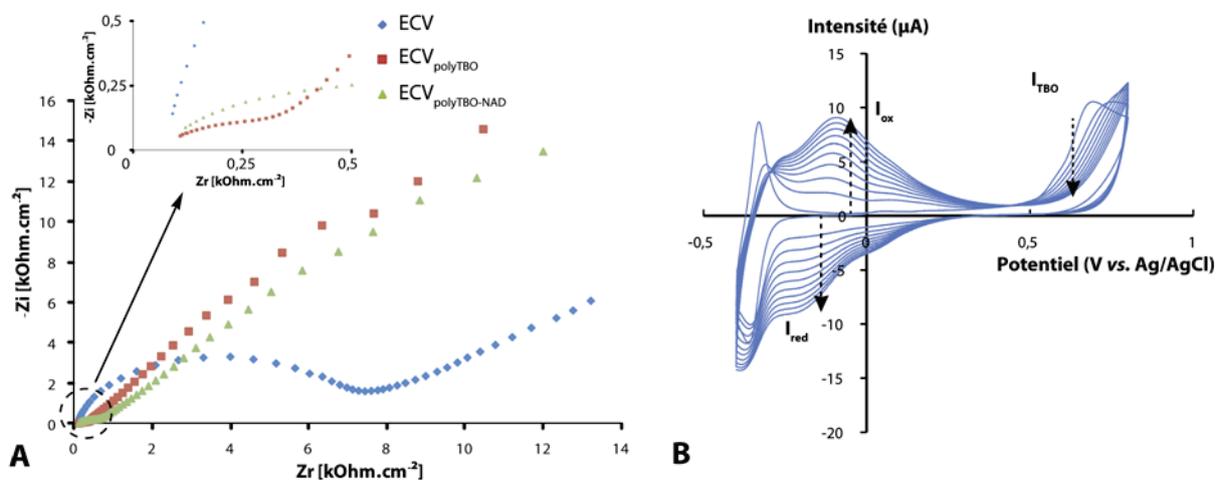


Fig. 74 : (A) Electropolymérisation par voltammétrie cyclique, de 0,4 mM de TBO en solution dans du tampon borate (10 mM, pH 9,1, contenant 100 mM de NaNO₃) sur une ECV. Les pics anodique (I_{ox}) et cathodique (I_{red}) du polymère, ainsi que le pic d'oxydation des monomères de TBO (I_{TBO}) sont indiqués sur le voltammogramme avec leurs sens de croissance. Electropolymérisation réalisée sur 10 cycles, de +0,8 à -0,4 V avec une vitesse de balayage de 50 mV.s⁻¹, à température ambiante. (B) Mesures d'impédance effectuées étape de modification d'une ECV : ECV nue (ECV), ECV modifiée par l'électropolymérisation du TBO (ECV_{polyTBO}), suivie de l'incubation dans une solution de 10mM de NAD⁺ (ECV_{polyTBO-NAD}). Mesures réalisées entre 5 kHz et 50 mHz à température ambiante, avec un courant alternatif de ± 50 mV (vs. Ag/AgCl), dans du tampon phosphate (100 mM, pH 7 contenant 100 mM de KCl) en présence de 5 mM de K₄[Fe(CN)₆]/K₃[Fe₃(CN)₆].

Le voltammogramme de l'électropolymérisation du 3AB réalisée dans les mêmes conditions que le TBO (Fig. 75A) présente un profil différent de celui obtenu avec le polyTBO (Fig. 74B). Durant l'électropolymérisation, aucun signal électrochimique visible ne permet de suggérer qu'un polymère redox est formé. Néanmoins, un pic d'oxydation à +500 mV (I_{3AB}) qui décroît en intensité au cours des cycles semble correspondre à l'oxydation irréversible du 3AB. Les mesures d'impédance montrent une R_{ct} multipliée par quatre après électropolymérisation du 3AB, avec une valeur de 7,8 kOhm.cm⁻² pour l'ECV nue et de 27,4 kOhm.cm⁻² pour l'ECV_{polyAB} (Fig. 75B). Par la suite, après incubation dans une solution de NAD⁺, la R_{ct} continue d'augmenter pour atteindre une valeur de 31,2 kOhm.cm⁻². Ces augmentations montrent donc qu'une surface modifiée plus résistante que celle de l'ECV nue a été formée par l'électropolymérisation de 3AB. Cette observation suggère donc qu'un électropolymère de 3AB a pu être obtenu dans les conditions du TBO. Cependant, à la surface de l'électrode, ce polymère forme une couche électriquement résistante. Après incubation

Résultats et discussion : Assemblage moléculaire pour la mise au point d'une bioanode fonctionnant avec les déshydrogénases à NAD⁺

avec du NAD⁺, une augmentation peu significative de la R_{ct} a été observée et ne permet pas d'affirmer que le polyAB est capable d'immobiliser du NAD⁺.

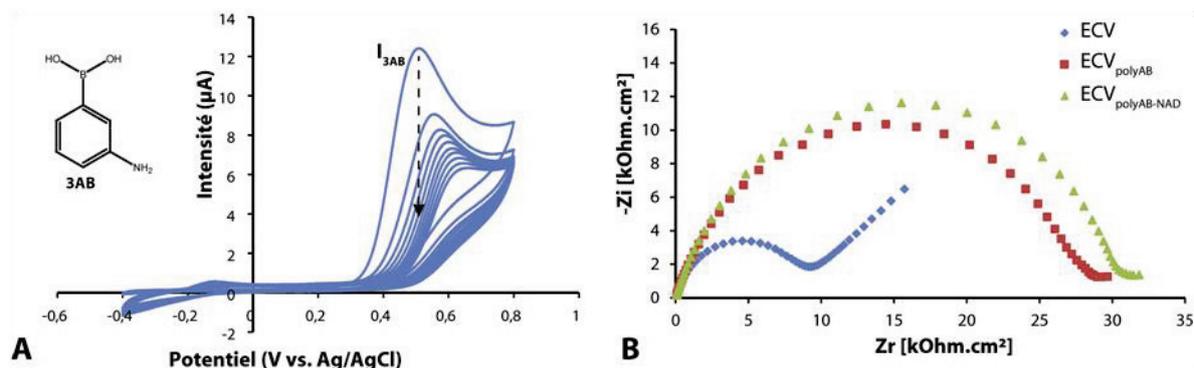


Fig. 75 : (A) Electropolymérisation par voltammétrie cyclique, de 0,4 mM d'acide 3-amino-phénylbonique (3AB) en solution dans du tampon borate (10 mM, pH 9,1 contenant 100 mM de NaNO₃) sur une ECV. Le pic d'oxydation du 3AB (I_{3AB}) est indiqué sur le voltammogramme. Electropolymérisation réalisée sur 10 cycles, de +0,8 à -0,4 V avec une vitesse de 50 mV.s⁻¹, à température ambiante. (B) Mesures d'impédance effectuées entre chaque étape de modification d'une ECV : ECV nue (ECV), ECV modifiée par l'électropolymérisation du 3AB (ECV_{polyAB}), suivie de l'incubation dans une solution de 10mM de NAD⁺ (ECV_{polyAB-NAD}). Mesures réalisées entre 5 kHz et 50 mHz à température ambiante, avec un courant alternatif de ± 50mV (vs. Ag/AgCl), dans du tampon phosphate (100 mM, pH 7 contenant 100 mM de KCl) en présence 5 mM de K₄[Fe(CN)₆]/K₃[Fe₃(CN)₆].

Ces résultats ont permis de constater d'une part, que le polyTBO formé à la surface d'une électrode conduit à une couche électro-active à des potentiels proches de 0 V, mais qui n'est pas capable d'immobiliser le NAD⁺. L'électropolymérisation par VC du 3AB en milieu basique, génère une couche électriquement résistante qui ne semble pas être capable d'immobiliser le NAD⁺ en surface. Cependant, l'immobilisation du cofacteur sera étudiée sur des surfaces modifiées par du polyTBO dans lequel du 3AB sera introduit par différentes stratégies. Par ailleurs, cette partie a permis d'introduire et de présenter la caractérisation par SIE. Il est important de noter que les mesures d'impédance ont été utilisées dans cette étude uniquement comme outil qualitatif. Les interprétations de caractérisation et de comparaison des mesures d'impédance réalisées ci-dessus, seront effectuées de la même manière par la suite.

IV.1. Co-électropolymérisation entre le TBO et le 3AB

L'objectif de la co-électropolymérisation entre du TBO et du 3AB (polyTBO/AB) est de réaliser un assemblage simple par la formation d'une couche qui aurait à la fois la capacité d'immobiliser et d'effectuer un MET avec les cofacteurs nicotinamidiques (Fig. 76).

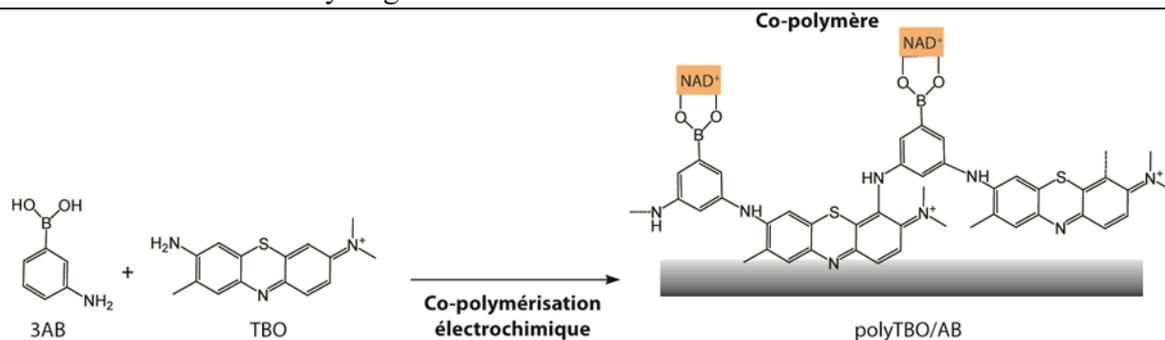


Fig. 76 : Etapes d'assemblage de la bioanode impliquant la copolymérisation électrochimique entre le TBO et le 3AB.

Dans un premier temps, le TBO a été électropolymérisé sur des ECVs, seul et en présence de trois concentrations différentes de 3AB (0,1 ; 0,4 ; 0,8 mM) (Fig. 77). Ces polymérisations ont été réalisées par voltammétrie cyclique sur dix cycles dans les conditions optimales utilisées pour la formation du polyTBO (0,4 mM de TBO, pH 9,1). Les voltammogrammes obtenus lors des polymérisations, indiquent que plus la concentration en 3AB est élevée plus l'intensité des pics cathodiques et anodiques du polymère (I_{ox} et I_{red}) est faible. Au dernier cycle, l'intensité de I_{ox} du polyTBO est de 9 μA ($128,57 \mu A.cm^{-2}$) et diminue aux valeurs de 7,56 μA , 3,24 μA et 2,60 μA (108 ; 46,29 et 37,14 $\mu A.cm^{-2}$) respectivement en présence de 0,1, 0,4 et 0,8 mM de 3AB. Concernant I_{red} , une intensité de -8,62 μA ($-123,14 \mu A.cm^{-2}$) est observée dans le cas du polyTBO, tandis que des intensités de -6,51, -3,72 et -2,79 μA (-93 ; $-53,14$ et $-39,86 \mu A.cm^{-2}$) sont mesurées en présence de 0,1, 0,4 et 0,8 mM de 3AB. En outre, un déplacement du potentiel de ces pics vers des valeurs plus négatives est induit par la présence de 3AB. Les signaux I_{ox} et I_{red} , se situant à des potentiels de -0,1 V et -0,2 V (*vs.* Ag/AgCl) pour le polyTBO, sont déplacés à des valeurs de -0,19 et -0,28 V (*vs.* Ag/AgCl) en présence de 3AB. De même, le signal d'oxydation des monomères (I_{mono}) du TBO est modifié lorsque du 3AB est ajouté. En présence de 0,1 mM de 3AB, son potentiel est déplacé de +0,7 V à +0,58 V avec l'apparition d'un épaulement à +0,5 V correspondant à l'oxydation du 3AB. Ces résultats permettent de déduire que l'ajout de 3AB lors de l'électropolymérisation du TBO engendre une couche moléculaire avec des propriétés redox différentes du polyTBO. Le déplacement des potentiels de I_{ox} et I_{red} permettent de suggérer qu'un copolymère TBO/AB est généré lors de l'électropolymérisation du TBO en présence de 3AB. Il est cependant nécessaire de caractériser chimiquement la couche formée en surface pour affirmer qu'un copolymère a été formé

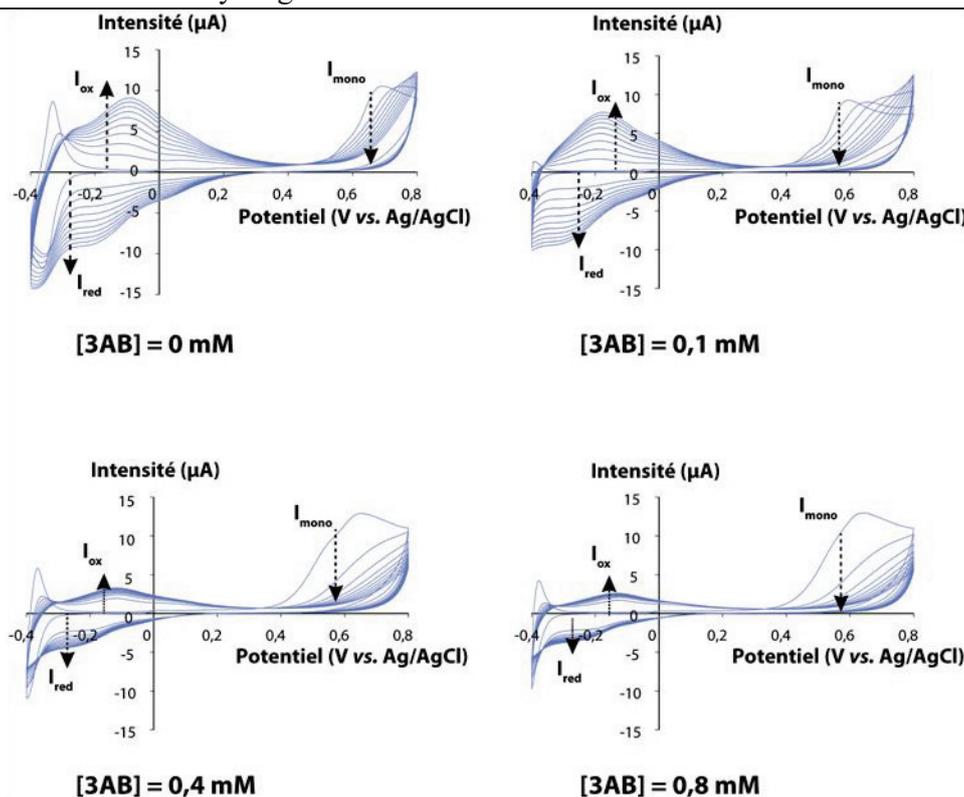


Fig. 77 : Electropolymérisation par voltammétrie cyclique de 0,4 mM de TBO, et co-électropolymérisation avec du 3AB, en solution dans du tampon borate (10 mM, pH 9,1 contenant 100 mM de NaNO₃) sur une ECV. Le pic anodique (I_{ox}) et cathodique (I_{red}) du polymère, ainsi que le pic d'oxydation des monomères (I_{mono}) sont indiqués sur le voltammogramme avec leurs sens de croissance. Electropolymérisation réalisées sur 10 cycles, de +0,8 à -0,4 V avec une vitesse de 50 mV.s⁻¹, à température ambiante¹.

Dans un second temps, afin d'étudier la résistance des couches formées et leurs capacités à immobiliser le NAD⁺, les quatre électrodes modifiées ci-dessus (ECV_{polyTBO/AB}) ont été caractérisées par SIE avant et après incubation dans une solution de NAD⁺ (Fig. 78). La première électrode modifiée par l'électropolymérisation du TBO (l'ECV_{polyTBO}) en absence de 3AB possède une R_{ct} de 0,2 kOhm.cm⁻². Une valeur équivalente (0,3 kOhm.cm⁻²) est obtenue pour l'ECV_{polyTBO/AB} généré en présence de 0,1 mM de 3AB. Par conséquent, à cette concentration de 3AB un polymère avec la même résistance que le poly TBO est obtenu. Après incubation avec du NAD⁺, les R_{ct} de ces deux électrodes ne présentent pas de variations significatives (0,4 kOhm.cm⁻² pour l'ECV_{polyTBO} et l'ECV_{polyTBO/AB}). D'autre part, des variations plus importantes de résistance sont observées avec les ECV_{polyTBO/AB} formées à de plus grandes concentrations de 3AB. L'électropolymérisation réalisée avec 0,4 et 0,8 mM de 3AB conduit à des surfaces 20 à 40 fois plus résistantes que les deux premières avec des R_{ct} de 7,2 et 11,7 kOhm.cm⁻². De plus, ces valeurs augmentent après incubation avec du NAD⁺ pour atteindre respectivement 11,9 et 16,8 kOhm.cm⁻², pour les ECV_{polyTBO/AB} produites à

Résultats et discussion : Assemblage moléculaire pour la mise au point d'une bioanode fonctionnant avec les déshydrogénases à NAD⁺

partir d'une concentration de 0,4 et 0,8 mM de 3AB. Ces augmentations indiquent qu'à partir de 0,4 mM de 3AB, des électropolymères différents du polyTBO sont générés et sont capables d'immobiliser le NAD⁺. Ces résultats permettent de suggérer que la co-électropolymérisation entre du TBO et du 3AB forme, à partir d'une concentration en 3AB de 0,4 mM, une couche électriquement plus résistante que celle formée par le polyTBO, mais qui semble capable d'immobiliser le cofacteur nicotinique.

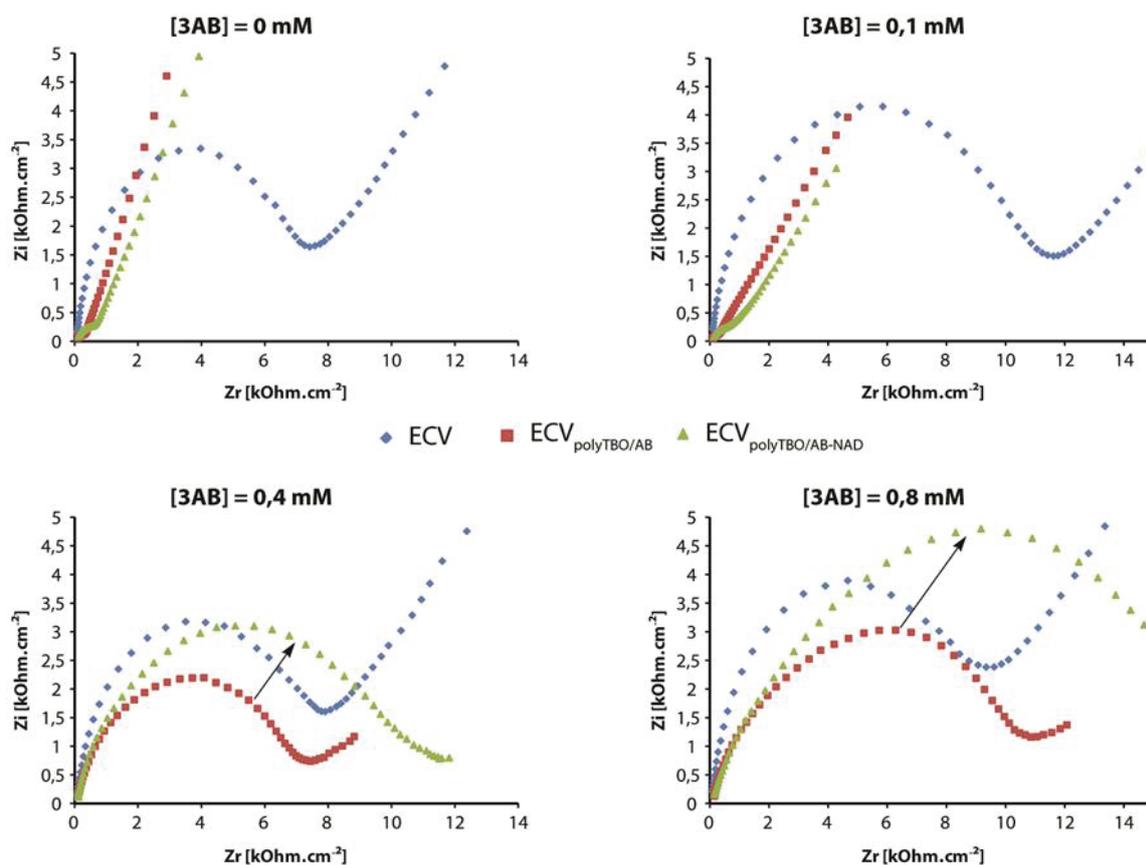


Fig. 78 : Mesures d'impédance effectuées entre chaque étape de modification d'une ECV : ECV nue (ECV), ECV modifiée par l'électropolymérisation du TBO ou par co-électropolymérisation avec le 3AB (ECV_{polyTBO/AB}), suivie de l'incubation dans une solution de 10 mM de NAD⁺ (ECV_{polyTBO/AB-NAD}) (indiquée par une flèche). Mesures réalisées entre 5 kHz et 50 mHz à température ambiante, avec un courant alternatif de ± 50 mV (vs. Ag/AgCl), dans du tampon phosphate (100 mM, pH 7 contenant 100 mM de KCl) en présence de 5 mM de K₄[Fe(CN)₆]/K₃[Fe₃(CN)₆].

Dans le but d'évaluer la capacité des couches de polyTBO/AB à oxyder le NADH, des mesures ampérométriques à +0,15 V (vs. Ag/AgCl) ont été effectuées dans une solution contenant la FDH de *Candida boidinii* (0,16 U.ml⁻¹) et ses substrats en condition saturante (5 mM de NAD⁺ et 300mM de formiate) (Fig. 79). Une intensité maximale de 22 μ A (314 μ A.cm⁻²) est obtenue avec l'ECV_{polyTBO}. Cette intensité est 5 fois plus petite avec l'ECV_{polyTBP/AB} formée en présence de 0,1 mM de 3AB. Sur l'ECV_{polyTBP/AB} formée avec 0,4

Résultats et discussion : Assemblage moléculaire pour la mise au point d'une bioanode fonctionnant avec les déshydrogénases à NAD⁺

mM de 3AB, l'intensité atteint une valeur de 0,25 μA ($3,57 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$) à 0,4 mM. L'absence de signaux d'oxydation est observée avec l'ECV_{polyTBP/AB} produite avec 0,8 mM de 3AB. Ces mesures ont permis de montrer que l'électropolymérisation du TBO avec le 3AB induit la formation de couches moins sensibles pour l'oxydation du NADH que celles formées avec le polyTBO.

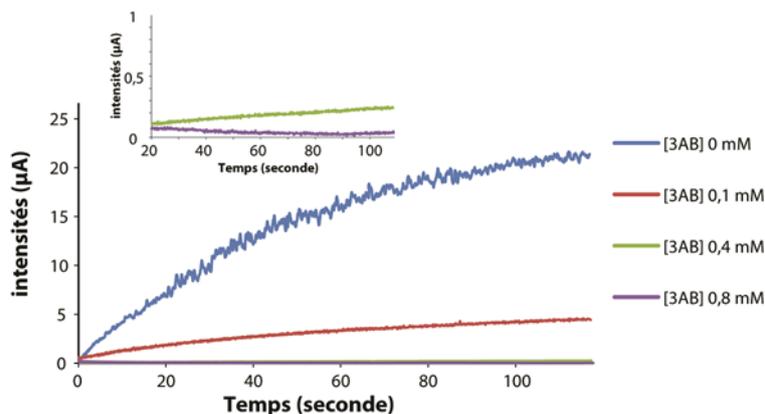


Fig. 79 : Mesures des signaux électrochimiques d'oxydation du NADH en solution produit par la formiate déshydrogénase (FDH) à partir de NAD⁺ et de formiate, enregistrés sur quatre ECVs modifiées par l'électropolymérisation du TBO ou par co-électropolymérisation avec le 3AB. Expériences effectuées à température ambiante, sous agitation par chrono-ampérométrie à +0,15 V (vs. Ag/AgCl) dans du tampon phosphate (100 mM, pH 7 contenant 100 mM de KCl) en présence de 5 mM NAD⁺ et 300 mM de formiate. Après 5 secondes de mesures la FDH a été injectée pour une concentration finale de 0,16 U.mL⁻¹.

Par la suite, il a été vérifié que des signaux électrochimiques pouvaient être mesurés à partir de cofacteurs immobilisés. Pour cela, deux ECV_{polyTBO/AB} préparées à partir de 0,1 et 0,4 mM de 3AB ont été incubées dans une solution de NAD⁺ (10 mM). Après immersions de ces électrodes dans une solution de FDH contenant uniquement du formiate (300 mM), des mesures ampérométriques ont été réalisées à +0,15 V (vs. Ag/AgCl). Aucun signal significatif n'a pu être observé sur les deux électrodes.

L'assemblage par co-électropolymérisation entre le TBO et le 3AB ne semble pas être une stratégie favorable à la formation d'une bioanode fonctionnelle. Les résultats obtenus par impédance suggèrent qu'une faible concentration de 3AB (< 0,4 mM) ne permet pas de former une couche capable d'immobiliser du NAD⁺. Ces mesures ont aussi montré, qu'à des concentrations de 3AB plus élevées, des électropolymères aptes à immobiliser le cofacteur peuvent être obtenus. Cependant, les propriétés redox du TBO sont fortement altérées lorsqu'il est co-électropolymérisé avec le 3AB générant ainsi des couches insensibles au

Résultats et discussion : Assemblage moléculaire pour la mise au point d'une bioanode fonctionnant avec les déshydrogénases à NAD⁺
 NADH. En perspective il serait intéressant de caractériser la structure chimique du polymère formé lors de cette co-électropolymérisation.

IV.2. Greffage spontané de diazonium sur la couche de poly TBO

Les fonctions diazonium portées par des cycles aromatiques s'hydrolysent de façon quasi spontanée en milieu basique (Doyle et al. 2008; Podvorica et al. 2009) et forment des radicaux libres. Ce phénomène peut être utilisé pour réaliser un greffage de molécules diazotées à la surface d'une électrode. Dans le but d'intégrer des acides phénylboroniques sur une couche de polyTBO, le greffage de PE⁺ (4-diazonium-phénylbonate de pinacol) en milieu basique a été expérimenté sur une ECV_{polyTBO} (Fig. 80). L'ester de pinacol pouvant s'hydrolyser à des pH basiques, donc dans ces conditions, la déprotection et le greffage de l'acide phénylboronique pourront être réalisées simultanément.

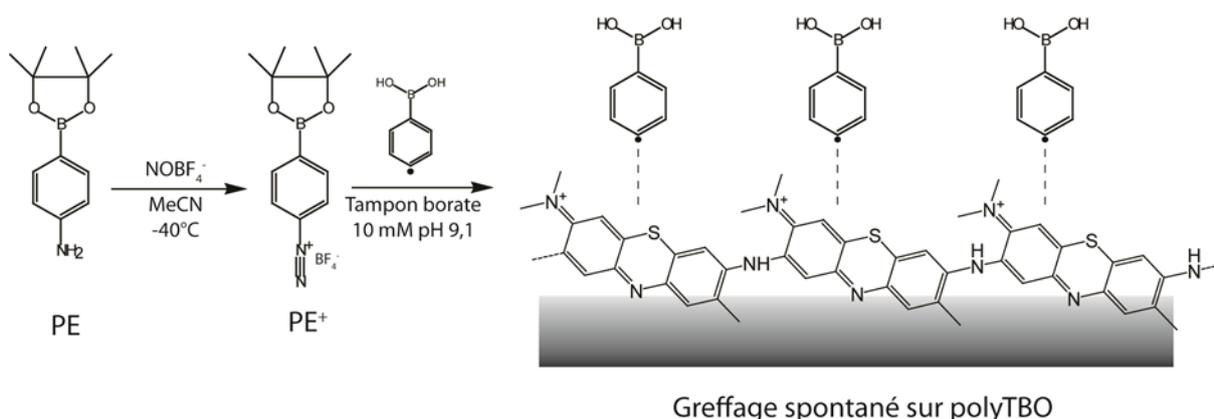


Fig. 80 : Schéma réactionnel de la synthèse de sel de [PE⁺][BF₄⁻], et du greffage spontané sur une ECV_{polyTBO}.

Dans un premier temps, un sel de 4-diazonium-phénylboronate de pinacol ([PE⁺][BF₄⁻]) a été synthétisé en milieu anhydre, puis caractérisé par spectroscopie d'infra-rouge (Fig. 81). Un signal situé à 2293 cm⁻¹ correspondant à la fonction diazonium peut être observé sur le spectre et confirme la présence de PE⁺ dans le produit de réaction.

Résultats et discussion : Assemblage moléculaire pour la mise au point d'une bioanode fonctionnant avec les déshydrogénases à NAD⁺

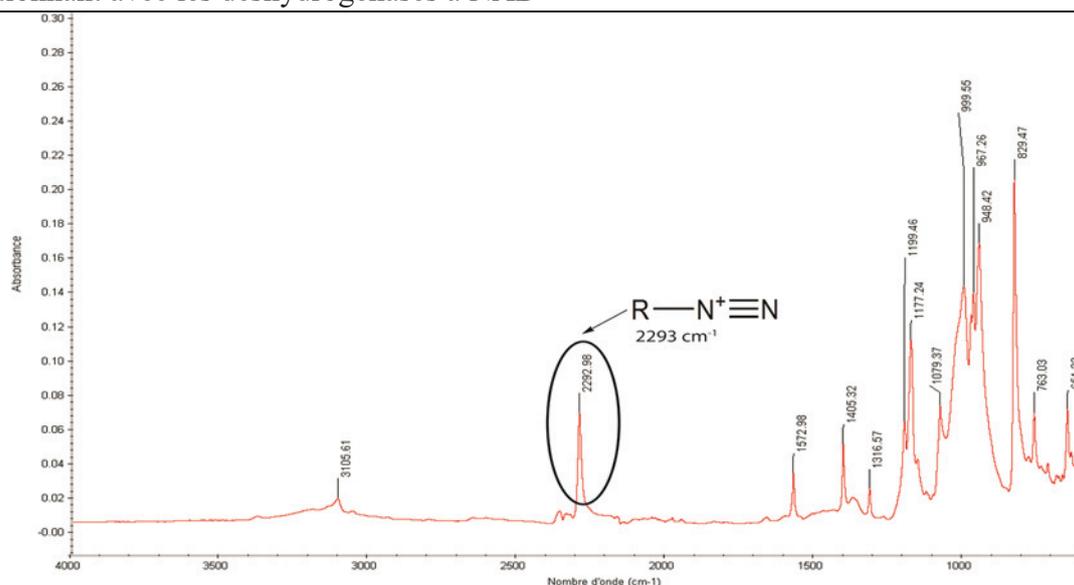


Fig. 81 : Spectre IR du sel [PE⁺][BF₄⁻] obtenu par des mesures ATR FT-IR (Spectrométrie infrarouge par transformée de Fourier et par réflexion total atténuée).

Ce sel est solubilisé dans le même tampon utilisé que celui pour l'électropolymérisation du TBO (tampon borate 10 mM, pH 9,1). Après solubilisation, une ECV_{polyTBO} est aussitôt immergée dans la solution et incubée durant 5 min à température ambiante. Après incubation de l'électrode (que l'on nommera ECV_{polyTBO-AB}), celle-ci est caractérisée par voltammétrie cyclique et comparée avec une ECV nue et une ECV_{polyTBO} (Fig. 82). Les voltammogrammes obtenus indiquent que les propriétés redox de la surface de polyTBO après incubation ont été altérées. Le signal anodique est déplacé et diminué de 14,21 μA à +20 mV (vs. Ag/AgCl) à 5,87 μA à -70 mV (vs. Ag/AgCl)). Le signal cathodique est également modifié de 10,28 μA à -100 mV (vs. Ag/AgCl) à 6,96 μA à -270 mV (vs. Ag/AgCl)).

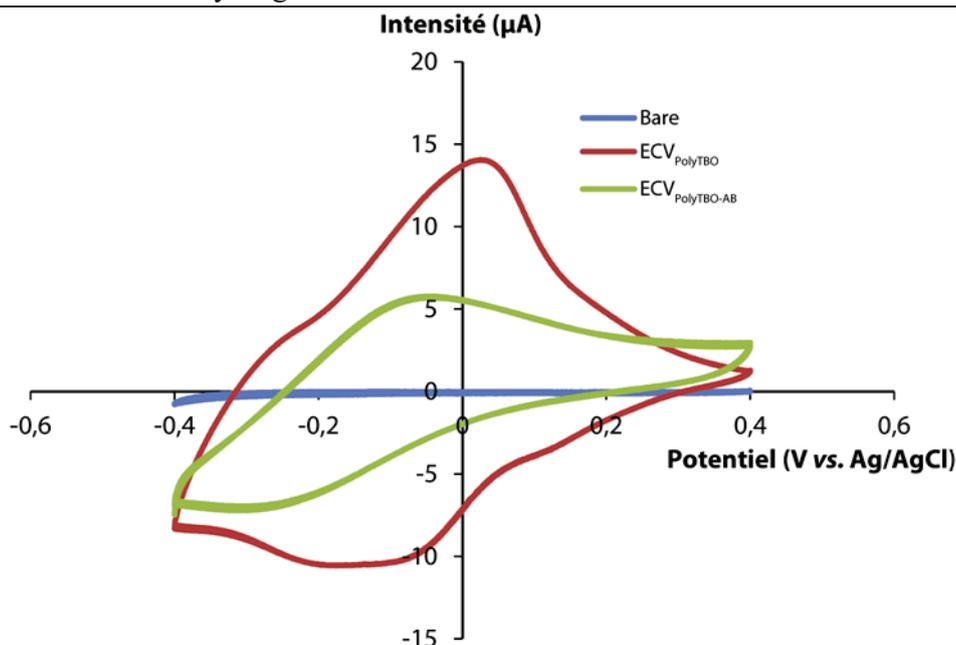


Fig. 82 : Caractérisation par VC de trois ECVs : ECV nue (ECV), ECV modifiée par l'électropolymérisation du TBO ($ECV_{polyTBO}$), $ECV_{polyTBO}$ incubée 5 min dans une solution de 0,4 mM de $[PE^+][BF_4^-]$ dans du tampon borate (10 mM, pH 9,1) ($ECV_{polyTBO-AB}$). Mesures réalisées dans du tampon phosphate (100 mM, pH 7 contenant 100 mM de KCl), durant 2 cycles, -0,6 à +0,6 V (vs. Ag/AgCl) à $50\text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$, à température ambiante.

Afin de vérifier que l'électrode obtenue après incubation avec le PE^+ , est capable d'immobiliser le NAD^+ , des mesures d'impédance ont été effectuées sur les trois électrodes (ECV nue $ECV_{polyTBO}$ $ECV_{polyTBO-AB}$) ainsi que sur une $ECV_{polyTBO-AB}$ incubée dans une solution de NAD^+ ($ECV_{polyTBO-AB-NAD}$) (Fig. 83). Les résultats montrent qu'après incubation avec la solution de diazonium, la R_{ct} à la surface de l' $ECV_{polyTBO-AB}$ ($60\text{ k}\Omega\cdot\text{cm}^{-2}$) est beaucoup plus élevée que sur l' $ECV_{polyTBO}$ ($1,1\text{ k}\Omega\cdot\text{cm}^{-2}$). Après incubation de l' $ECV_{polyTBO-AB}$ dans une solution de NAD^+ , aucune variation significative de R_{ct} n'a pu être observée. Ces mesures permettent de constater que le greffage spontané de PE^+ conduit à une couche électriquement résistante. Par ailleurs, des tests d'oxydation électrochimique ont montré que la couche formée par cet assemblage est incapable d'oxyder le NADH. Cette stratégie ne semble donc pas être favorable à la réalisation d'une bioanode fonctionnelle.

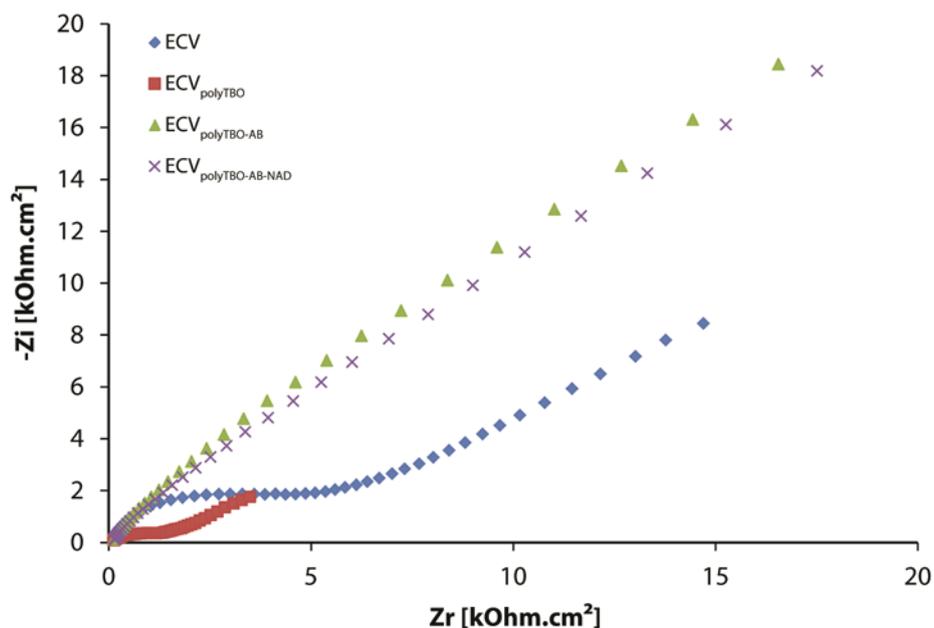


Fig. 83 Mesures d'impédance effectuées sur quatre ECVs : une ECV nue (ECV), une ECV modifiée par l'électropolymérisation du TBO (ECV_{polyTBO}), une ECV_{polyTBO} incubée 5 min dans une solution de 0,4 mM de [PE⁺][BF₄⁻] dans du tampon borate (10 mM, pH 9,1) (ECV_{polyTBO-AB}) et une ECV_{polyTBO-AB} incubée dans une solution de 10 mM de NAD⁺ (ECV_{polyTBO-AB-NAD}). Mesures réalisées entre 5 kHz et 50 mHz à température ambiante, avec un courant alternatif de ± 50mV (vs. Ag/AgCl), dans du tampon phosphate (100 mM, pH 7 contenant 100 mM de KCl) en présence de 5 mM de K₄[Fe(CN)₆]/K₃[Fe₃(CN)₆].

IV.3. Couplage chimique entre le TBO et un acide phénylboronique

Dans les années 80, Leon M. Stock et ses collaborateurs ont publié des travaux montrant la possibilité de coupler, en milieu basique, des molécules aromatiques diazotées sur des dérivés puriques et pyrimidiques (Chin et al. 1981; Hung et al. 1982). En m'inspirant de ces travaux j'ai couplé le TBO avec un acide phénylboronique à partir du sel [PE⁺][BF₄⁻]. Avant d'étudier ce couplage, une réaction témoin entre le 4-diazonium-bromobenzene (Br⁺) et le TBO a été réalisée (Fig. 84A). Après 24 heures de réaction (réactif en quantité équimolaire : 10 μmol dans un volume de 2 ml) en milieu aqueux à pH 10 et 11 et extraction des produits au chloroforme, une analyse par spectrométrie de masse de type ESI⁺ a permis de mettre en évidence les produits formés. Les spectres obtenus permettent de distinguer les molécules par leur masse mais aussi par les signatures isotopiques de certains atomes comme le bore (¹⁰B : 20 % ; ¹¹B : 80 %) ou le brome (⁷⁹Br : 50 % ; ⁸¹Br : 50 %). La présence du produit de couplage (TBO-Br) a pu être mise en évidence sur spectre de masse (Fig. 84B). Deux pics majoritaires sont observés : un pic unique à 270 Da correspondant au TBO monochargé et un signal à 424 Da correspondant au produit de couplage contenant le massif

Résultats et discussion : Assemblage moléculaire pour la mise au point d'une bioanode fonctionnant avec les déshydrogénases à NAD⁺

isotopique spécifique du produit bromé (424 Da (100%) ; 425 Da (26,5%) ; 426 Da (97,5 %)).

Ce spectre indique que le produit a été formé avec la perte d'un proton en milieu basique permettant de conserver une aromaticité.

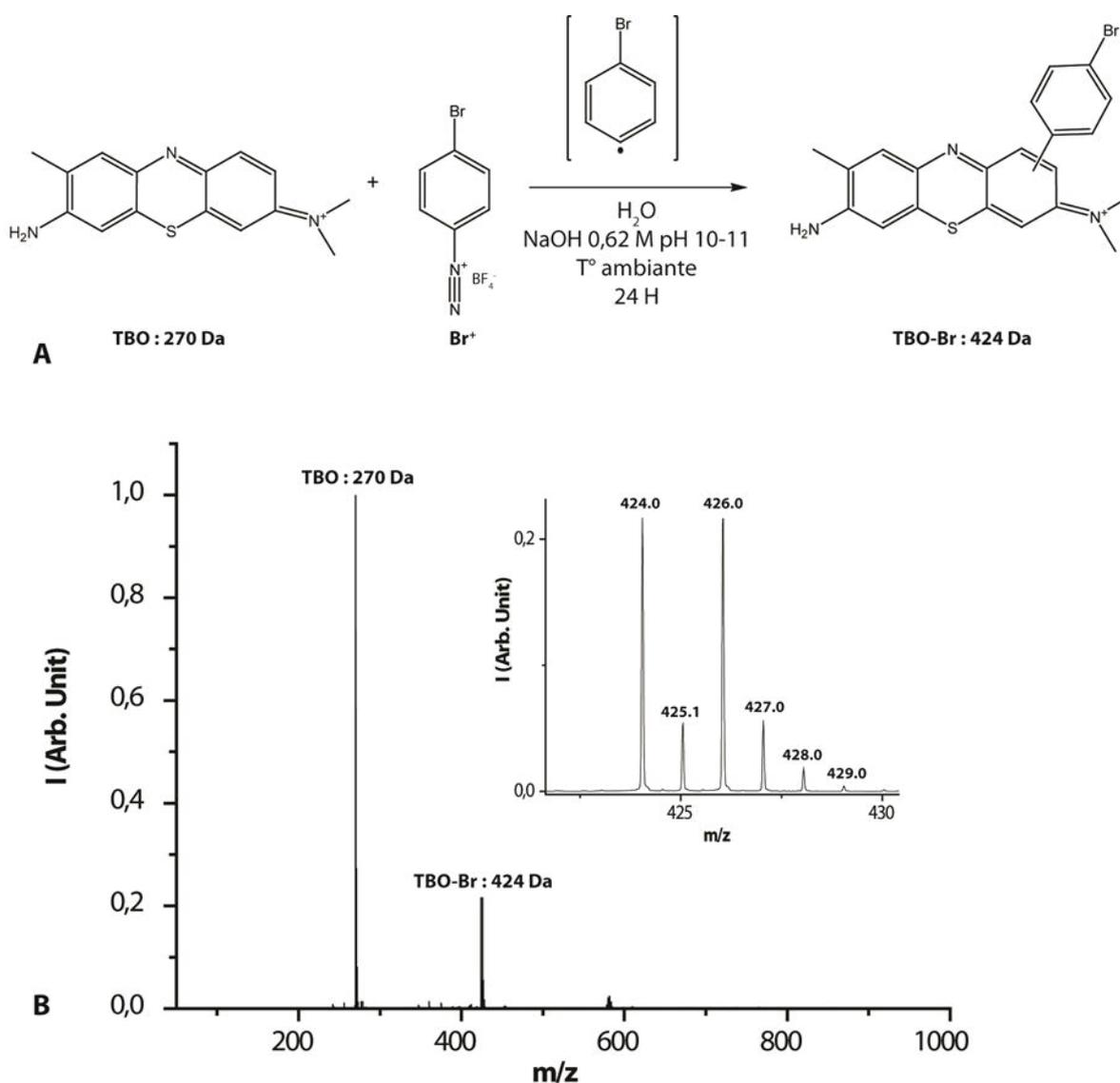


Fig. 84 : (A) Réaction de couplage entre le 4-diazonium-bromobenzène et le TBO. (B) Spectre de masse obtenu suite à l'extraction au chloroforme du milieu réactionnel.

Ces résultats ne fournissent aucune information sur le rendement de la réaction, ni sur la nature et la localisation de la liaison formée entre le groupement bromophényl et le TBO. Ces observations ayant néanmoins permis de prouver que la réaction fonctionne, le couplage entre le TBO et le PE⁺ a été par la suite réalisé dans les mêmes conditions (Fig. 85A). Il est intéressant de noter, que les conditions alcalines de la réaction devraient mener à l'hydrolyse de l'ester de pinacol et ainsi aboutir à un produit de couplage avec une fonction acide

Résultats et discussion : Assemblage moléculaire pour la mise au point d'une bioanode fonctionnant avec les déshydrogénases à NAD⁺ boronique déprotégée. Le spectre ESI⁺, obtenu, indique que le produit attendu à 390 Da, a bien été formé (Fig. 85B). Le motif isotopique correspondant à la masse du produit mono chargé est constitué de trois pics de proportions : 389 Da (25 %) ; 390 Da (100 %) ; 391 Da (25 %). Ce motif montre la présence d'un atome de bore dans la molécule.

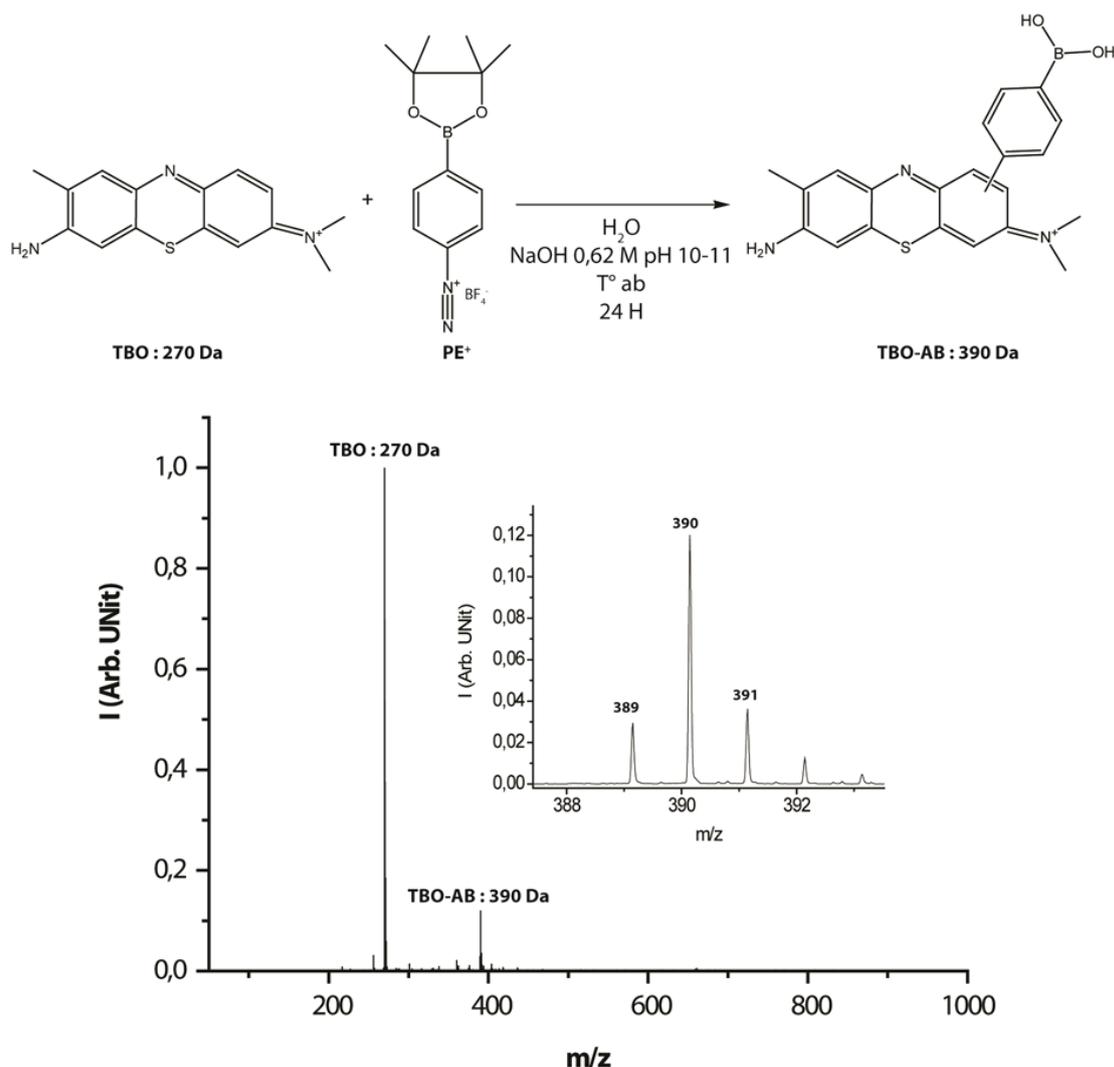


Fig. 85 : (A) Réaction de couplage entre le PE⁺ et le TBO. (B) Spectre de masse obtenu suite à l'extraction au chloroforme du milieu réactionnel.

Cette réaction a donc permis d'obtenir une molécule de TBO portant un acide phénylboronique qui devrait être capable à la fois d'immobiliser les cofacteurs nicotiniques et de les oxyder. Elle se base sur la formation de radicaux dont la forte réactivité rend le procédé non spécifique et peut engendrer de multiples réactions secondaires. De plus, la réaction étant réalisée en milieu alcalin, des acides hydroxy-phénylboroniques ont été probablement formés en grande quantité. Cependant, aucun pic montrant la présence de molécules borées autres que

Résultats et discussion : Assemblage moléculaire pour la mise au point d'une bioanode fonctionnant avec les déshydrogénases à NAD⁺

le produit, n'a été observé sur les spectres de masse obtenus après extraction au chloroforme. Du TBO n'ayant pas réagi subsiste néanmoins dans le milieu d'extraction. Malheureusement, la séparation entre le TBO et le TBO-AB sur colonne de silice ou d'alumine n'a aboutie. Toutefois, le produit de réaction non purifié a été utilisé pour réaliser des tests de caractérisation de fluorescence et d'électrochimie.

Des mesures de fluorescence avec le rouge d'alizarine S (ARS) ont été effectuées afin de montrer l'existence de la fonction acide phénylboronique dans le produit du couplage entre le TBO et le PE⁺. Des spectres d'émission de l'ARS ($\lambda_{\text{excitation}}$: 495 nm) ont été mesurés seul ou en présence de 3-amino-phénylboronique (3AB), de TBO et du produit de réaction non purifié. Des témoins ont été réalisés avec ce dernier et le TBO en absence d'ARS (Fig. 86). L'ARS présente un pic de fluorescence à 550 nm et le TBO à 675 nm. D'autre part, le pic caractéristique du TBO apparaît à 675 nm lorsque le spectre est mesuré à partir d'une solution contenant le produit réactionnel. Ces deux pics de fluorescence sont inchangés lorsque l'ARS est mis en présence de TBO (ARS+TBO). Ce dernier n'influe donc pas sur la fluorescence de l'ARS. En présence de 3AB (ARS+3AB), le pic de fluorescence de l'ARS est déplacé à 575 nm et son intensité augmente comme observée précédemment. Lorsque l'ARS est mis en présence du produit de réaction non purifié (ARS+M), un déplacement du pic de fluorescence à 590 nm est mesuré avec une intensité qui augmente environ quatre fois. Si l'on considère que l'extraction au chloroforme a permis d'éliminer les produits secondaires portant des acides boroniques (non détectés en ESI⁺), il est possible d'affirmer que cette augmentation est causée par le produit de couplage TBO-AB. Ces résultats permettent donc de suggérer que le produit TBO-AB porte une fonction acide boronique accessible pour une estérification avec des diols vicinaux.

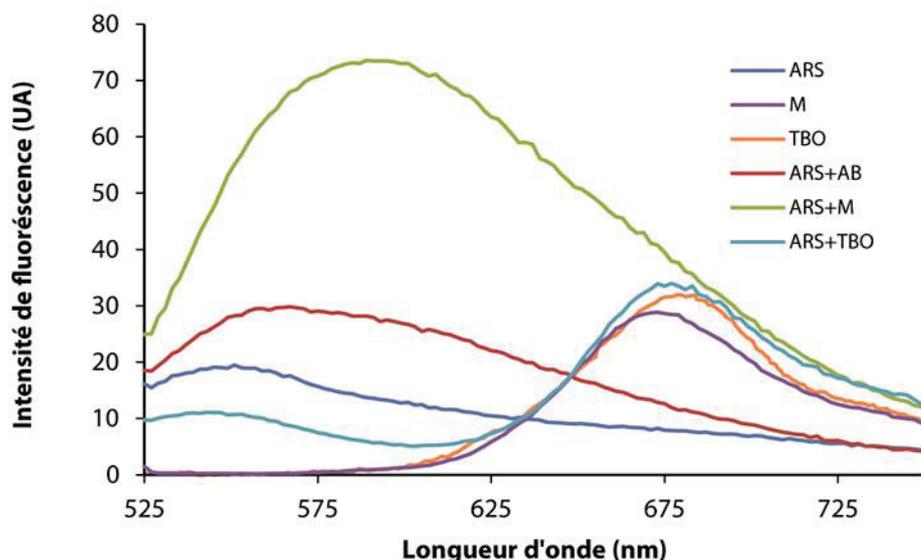


Fig. 86 : Spectres d'émission de fluorescence de l'alizarine red S (ARS) mesurés à un λ_{ex} de 495 nm. Mesures réalisées avec une concentration d'ARS de 0,1 mM dans du tampon phosphate (100 mM, pH 7 contenant 100 mM de KCl) en présence de 3-aminophényl boronique ([3AB] = 1 mM) ou de TBO (0,1 mM). Une solution dans le même tampon phosphate contenant 3 mg de produit de réaction non purifié (M) a été diluée d'un facteur 10 lors des mesures de fluorescence.

Le TBO-AB est ensuite électropolymérisé par voltammétrie cyclique sur une ECV dans les conditions de formation du polyTBO (Fig. 87). Sur le voltammogramme, un profil de polymérisation identique à celui du polyTBO est obtenu mais avec des intensités redox moins importantes. Le produit utilisé n'étant pas purifié et ne connaissant ni sa concentration et ni la proportion de TBO présent, il n'est pas possible de définir la composition du polymère.

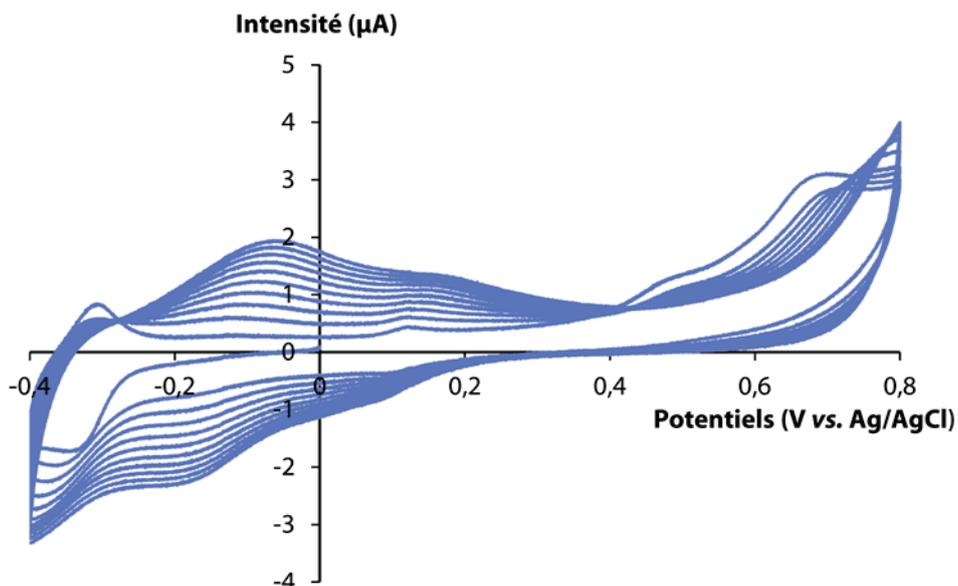


Fig. 87 : Electropolymérisation par voltammétrie cyclique sur une ECV réalisée à partir d'une solution dans du tampon borate (0,01 M, pH 9,1 contenant 100 mM de NaNO₃) contenant 3 mg de produit de réaction

Résultats et discussion : Assemblage moléculaire pour la mise au point d'une bioanode fonctionnant avec les déshydrogénases à NAD⁺

non purifié dans un volume de 5 ml. Electropolymérisation réalisée sur 10 cycles, de 0,8 à -0,4 V avec une vitesse de 50 mV.s⁻¹.

Par la suite, cette électrode (ECV_{polyM}) est étudiée par SIE (Fig. 88). Une R_{ct} de 8,8 kOhm.cm⁻² est mesurée sur l'ECV_{polyM}. Cette valeur est vingt fois plus importante que celle obtenue par les ECV_{polyTBO} (~ 0,4 kOhm.cm⁻²), mais plus faible que l'ECV nue (~ 10,7 kOhm.cm⁻²). Après avoir incubé cette électrode dans une solution de NAD⁺ (10 mM), une augmentation significative de la R_{ct} est observée sur la courbe de Nyquist avec une valeur de 23,7 kOhm.cm⁻². Cette observation indique que le NAD⁺ a interagi et modifié la résistance de la surface de l'ECV_{polyM} ce qui permet de suggérer que le produit de couplage TBO-AB semble être capable d'immobiliser le cofacteur.

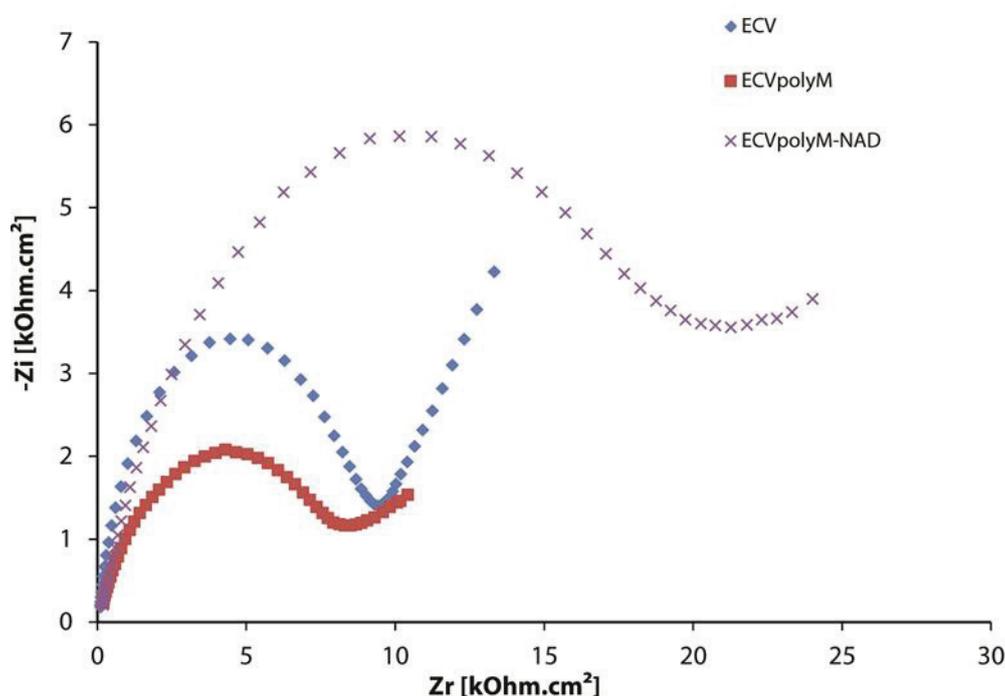


Fig. 88 : Mesures d'impédance effectuées entre chaque étape de modification d'une ECV : ECV nue (ECV), ECV modifiée par l'électropolymérisation du produit de couplage (ECV_{polyM}), et le dépôt de 10 mM de NAD⁺ (ECV_{polyM-NAD}). Mesures réalisées entre 5 kHz et 50mHz, avec un courant alternatif de ± 50mV (vs. Ag/AgCl) dans du tampon phosphate (100 mM, pH 7 contenant 100 mM de KCl) en présence de 5 mM de K₄[Fe(CN)₆]/K₃[Fe₃(CN)₆].

La formation d'un nouveau médiateur produit à partir du couplage entre du TBO et un acide phénylboronique, apparait comme une voie prometteuse pour le développement d'une bioanode. Il serait donc intéressant d'une part, d'améliorer le protocole de synthèse et d'autre part, de développer une méthode de purification pour isoler le produit et ainsi mieux le caractériser.

V. Conclusion

Ces études ont permis dans un premier temps d'obtenir une couche de TBO sur une électrode formant une surface de médiateur redox électrochimiquement active et sensible au NADH. Ces résultats ont montrés que la couche de médiateurs générée par électropolymérisation conduit à des signaux électrochimiques plus importants qu'une couche produite par électro-greffage. Cela peut s'expliquer d'une part par les modifications chimiques induites par la diazotation du TBO qui peuvent altérer ses propriétés redox et d'autre part, par le fait que l'électro-greffage n'est pas un procédé contrôlé et peut induire la formation de multicouches moléculaires pouvant mener à une passivation de l'électrode. Dans le cas de l'électropolymérisation, le TBO est directement polymérisé sans modification chimique préalable et forme un polymère fortement adsorbé à la surface de l'électrode. Ce processus permet donc de former une couche électro-active s'étalant sur toute la surface de l'électrode et qui peut être contrôlée en temps réel lors de sa formation par voltammétrie cyclique.

Par la suite des études visant à montrer que le NAD⁺ peut être immobilisé sur une électrode à l'aide d'acide phénylboronique, ont été effectuées. Ces études ont ainsi permis de caractériser et valider de façon qualitative et quantitative l'immobilisation du cofacteur sur une surface fonctionnalisée par des acides phénylboroniques. Il a également été montré que le NAD⁺ immobilisé peut être à la fois électro-oxydé et réduit par une déshydrogénase en solution. Par conséquent, ces études qui étaient destinées à la caractérisation de l'immobilisation du cofacteur ont pu aussi mener à la mise au point d'une bioanode à NAD⁺ fournissant une densité de puissance de 14 $\mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$ à une tension de 690 mV.

Finalement, après avoir étudié la couche de TBO et la fixation du NAD⁺ par des acides phénylboroniques, des stratégies ayant pour but d'intégrer ces acides dans la couche de TBO ont été expérimentées. Parmi celles-ci, la voie de co-électropolymérisation entre le TBO et le 3AB a été explorée ainsi que le greffage direct de radicaux phénylboronates sur le polymère de TBO. Des caractérisations par SIE ont permis de vérifier l'immobilisation du cofacteur par ces stratégies. Cependant, les propriétés redox de l'électropolymère de TBO sont altérées par l'introduction de ces acides dans sa structure. D'autre part, le couplage entre le TBO et un acide phénylboronique a été réalisé dans le but d'obtenir un nouveau médiateur électropolymérisable et capable d'immobiliser le NAD⁺. Un produit non purifié mais qui semble être capable de fixer le NAD⁺ a pu être obtenu. Pour étudier ses propriétés redox il sera nécessaire de purifier ce produit.

Résultats et discussion : Assemblage moléculaire pour la mise au point d'une bioanode fonctionnant avec les déshydrogénases à NAD⁺

A ce jour, l'objectif premier de cette partie n'a pas été atteint car aucun assemblage avec le TBO présenté dans ce chapitre n'a pu aboutir à une bioanode fonctionnelle. Cependant, il est important de noter que les bioanodes à NAD⁺ décrites dans la littérature sont produites à partir d'assemblages moléculaires complexes et souvent onéreux. Dans notre cas, l'objectif a été de tenter d'apporter de nouvelles idées d'assemblages aisés et peu onéreux. Malgré un objectif final non atteint, ces résultats ont permis de décrire le comportement du NAD⁺ sur des interfaces électrochimiques particulières. Par ailleurs, les stratégies d'assemblages étudiées ont apporté des preuves de concepts intéressantes dans le cadre de l'immobilisation de cofacteurs nicotiniques.



Résultats et discussion : Mise au point d'un
système de criblage électrochimique

I. Objectif

Les dispositifs bioélectroniques tels que les biopiles enzymatiques, sont actuellement limités en termes de puissance électrique et de stabilité (demi-vie des enzymes). Pour repousser ces limites, depuis cette dernière décennie, de plus en plus d'intérêts sont portés sur les outils d'ingénierie moléculaire (Wong et al. 2003). L'évolution dirigée est l'une des méthodes d'ingénierie les plus intéressantes pour créer ou améliorer de nouvelles enzymes. Contrairement aux outils rationnels tels que la mutagenèse dirigée, elle ne nécessite pas de connaissances structurales approfondies sur la protéine. En bioélectronique, l'usage de cette méthode permettrait d'obtenir des biocatalyseurs avec une activité bio-électrochimique améliorée, mais aussi avec une meilleure stabilité à la surface d'une électrode. Dans ce cadre, des systèmes capables de cribler électrochimiquement des banques de mutants sont nécessaires. De plus, de tels systèmes pourraient servir à déterminer aisément les conditions optimales (pH, électrolyte) pour les transferts d'électrons direct (DET) ou indirect (MET) entre des enzymes et des électrodes. Cependant, contrairement aux méthodes optiques, les dispositifs de mesure électrochimique retrouvés sur le marché sont limités en termes de criblage. Les appareils les plus sophistiqués (et les plus onéreux) permettent d'effectuer des mesures sur un maximum de 16 systèmes d'électrodes indépendants. Par conséquent l'analyse d'une grande quantité d'échantillons (>100) nécessiterait des temps très longs.

L'un des principaux objectifs de ma thèse a été de concevoir une méthode simple et rapide dédiée au criblage électrochimique d'un MET ou d'un DET entre une enzyme et une électrode. Dans ce chapitre, je décrirai dans un premier temps, cette méthode et l'appareillage utilisé suivi de son application pour le criblage d'un MET avec une déshydrogénase à NAD^+ . Finalement, une étude portant sur la validation de cette méthode pour le criblage d'un DET avec une laccase sera présentée, suivi de son application dans une approche d'évolution dirigée.

II. Système de mesure sur plaque de criblage électrochimique (PCE)

II.1. Description du système

Pour mettre au point une méthode de criblage électrochimique, nous avons utilisé un dispositif conçu pour effectuer des mesures ampérométriques sur des plaques de circuits imprimés (PCB). Ces PCB sont composées de 96 systèmes à deux électrodes sérigraphiées sur des connecteurs en cuivre. Chaque système est constitué d'une électrode de travail en carbone et d'une électrode de référence d'argent/chlorure d'argent (Ag/AgCl) fonctionnant également

comme une contre-électrode (Fig. 49A, page 90). Afin de délimiter chaque paire d'électrode, un film plastique adhésif perforé de 96 trous est utilisé. Cet assemblage forme ainsi une plaque de criblage électrochimique (PCE) de 96 puits (Fig. 49B, page 90), chacun pouvant être recouvert d'une goutte d'électrolyte de 20 à 50 μl . Après usage, ces plaques peuvent être régénérées par un simple nettoyage à l'acétone permettant d'éliminer les encres de sérigraphie.

Le dispositif (lecteur de plaque AndCare 9600) associé au PCE (Fig. 49C, page 90) a été conçu par la société Alderon Biosciences et dont l'usage initial est le diagnostic électrochimique dans les domaines du médical, de l'environnement et de la recherche (Wojciechowski et al. 1999; Piermarini et al. 2007; Neagu et al. 2009). Cet appareil est capable d'effectuer en une seconde et simultanément sur les 96 électrodes, des mesures ampérométriques pulsées par intermittence (IPA : *Intermittent Pulse Amperometry*). Ce type de mesure consiste à appliquer sur les électrodes des pulsations de potentiel fixe de quelques millisecondes avec une fréquence choisie, séparés par des périodes de latence (période durant laquelle les électrodes sont déconnectées du circuit).

Afin de caractériser la topographie des électrodes, une analyse par profilométrie a été réalisée sur une PCE avant (Fig. 89A) et après application du film plastique (Fig. 89D). Des profils en deux dimensions ont permis de calculer une surface moyenne de $7,98 \pm 0,17 \text{ mm}^2$ pour l'électrode de travail (W). Les reliefs formés par les électrodes, les connecteurs de cuivre et le film plastique ont pu être représentés en trois dimensions (Fig. 89B et 89E). D'autre part, afin de déterminer les hauteurs moyennes des électrodes et des puits, des coupes transversales ont été effectuées (Fig. 89C et 89F). Une hauteur moyenne de $18,738 \pm 2,06 \mu\text{m}$ pour les électrodes de travail (W) et $27,59 \pm 1,37 \mu\text{m}$ pour les électrodes de référence (Ref), ont été mesurées sur 12 électrodes d'une même ligne. Une déviation standard de 11 % indique une variabilité de hauteur non négligeable sur les électrodes de travail. Cette observation est liée au fait que l'épaisseur des couches de carbone formées par sérigraphie ne peuvent être contrôlées totalement avec le dispositif utilisé (DEK 248). Cette variation pouvant influencer sur la reproductibilité de mesure d'une électrode à l'autre, une normalisation des signaux IPA sera réalisée (voir partie II.2.3 page 91).

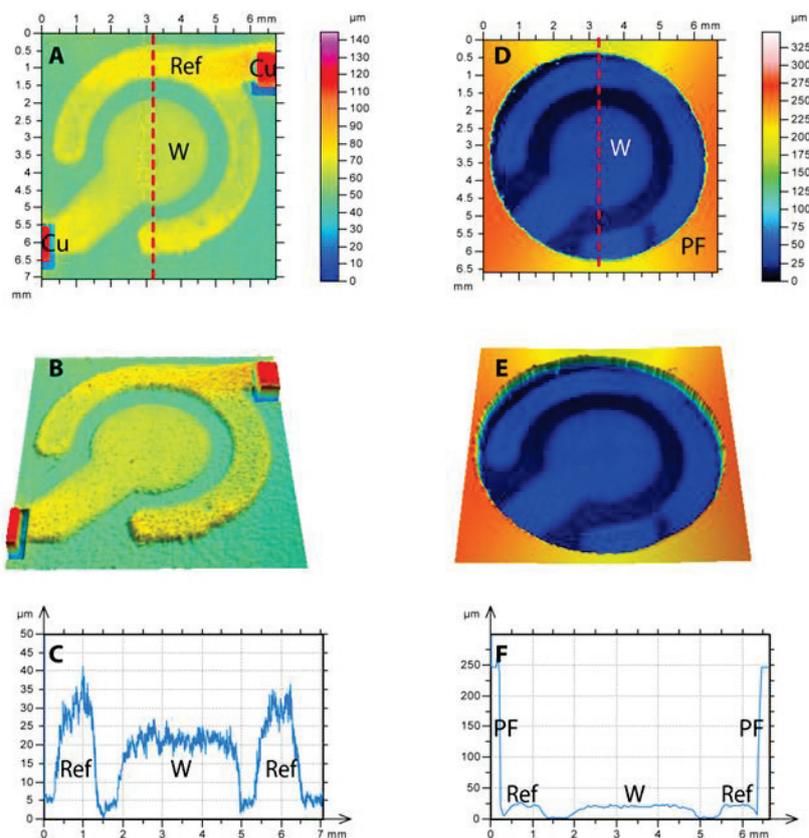


Fig. 89 : Exemples d'analyses profilométriques réalisées sur une électrode avant (A, B, C) et après application du film plastique (D,E, F). Des images en deux dimensions (A,D) et en trois dimensions (B, E) ont été obtenues à partir de ces analyses. Les profils de hauteurs (C, F) ont été obtenus à partir de coupes transversales représentées sur les images A et D par une ligne rouge en pointillé. Sur ces images, l'électrode de travail est indiquée par la lettre W et les connecteurs de cuivre par Cu. Ref et PF désignent respectivement l'électrode de référence et le film plastique.

II.2. Exemple de mesure sur PCE

Afin de présenter le fonctionnement de ce dispositif, un exemple de mesure avec un couple redox en solutions a été réalisé. Pour cela, une mesure IPA d'une minute à +0,1 V (vs.Ag/AgCl) (pulsations de 41 ms à une fréquence de 1Hz) a été effectuée sur les 96 électrodes d'une plaque. Au cours de cette expérience, la moitié de la plaque (48 électrodes) a été mise en présence d'une solution de ferricyanure/ferrocyanure ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$) de potentiel 0,35 V (NHE). Les 48 électrodes restantes ont été recouvertes de tampon phosphate (100 mM, pH 7, contenant 100 mM de KCl). Les intensités enregistrées sur les 96 électrodes sont représentées sur la Fig. 90A. Sur la première moitié de la PCE, 48 signaux d'intensité comprise entre 11 et 16 μA ont été enregistrés correspondant à la réduction électrochimique du ferricyanure ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-} + 1e^- \rightleftharpoons [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$). D'autre part, des signaux se stabilisant à

des intensités inférieures à 5 nA, sont enregistrés à partir des 48 électrodes témoins. Les moyennes d'intensités obtenues sur la première et la deuxième moitié de la plaque, ont été calculées à partir des dix dernières secondes de mesure (de 50 à 60 secondes). Cette zone de mesure a été choisie car les signaux d'intensités y sont stables. Des intensités moyennes de $12,97 \pm 1,98 \mu\text{A}$ et $1,26 \pm 0,79 \text{ nA}$ sont obtenues respectivement pour les 48 électrodes mises en présence de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ et les 48 électrodes témoins (Fig. 90B). La moyenne d'intensité obtenue avec le couple redox (coefficient de variation : 15 %) est plus de 10000 fois supérieure à celle calculée à partir des mesures dans le tampon. Les PCE permettent donc de détecter spécifiquement et de manière reproductible les signaux électrochimiques induits par une espèce redox en solution. Ainsi ce système pourrait être appliqué au criblage électrochimique de molécules redox en solution.

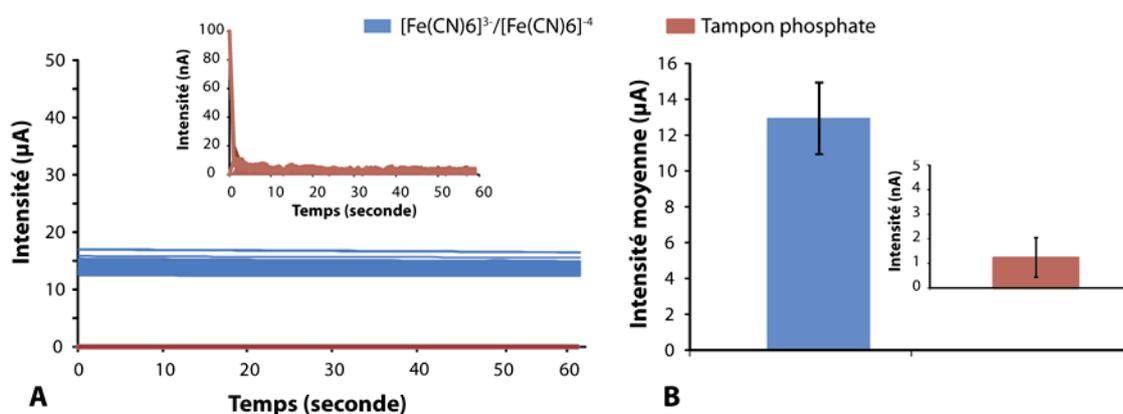


Fig. 90 : (A) Intensité en fonction du temps obtenue par une mesure IPA à +0,1 V (vs. Ag/AgCl) effectuée sur une PCE entière. Les 48 premières électrodes sont mises en présence de 5mM de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (ligne bleu), les 48 autres sont mises en présence de tampon phosphate (100 mM, pH 7 contenant 100mM de KCl) (ligne rouge). (B) Moyennes des intensités obtenues sur les 48 électrodes en contact avec le couple $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (Bleu) et sur les 48 en contact avec le tampon (rouge). Moyennes calculées à partir des intensités mesurées durant les dix dernières secondes. Les mesures IPA ont été réalisées sur une durée de 60 secondes avec des pulsations de 41 ms à une fréquence de 1 Hz.

III. Criblage du transfert indirect d'électrons (MET)

Les plaques de criblage électrochimique (PCE) ont été utilisées pour cribler le MET entre une déshydrogénase à NAD^+ et des électrodes modifiées par l'électro-greffage de médiateur. Les déshydrogénases à NAD^+ sont des enzymes utilisées dans de nombreuses applications en raison de leur diversité de substrats. Leur caractéristique commune est de réduire le NAD^+ en NADH . Comme il a été décrit pour le TBO, les phénazines et les phénothiazines sont connues pour être utilisées comme des médiateurs pour le NADH

permettant d'électro-oxyster le cofacteur à des potentiels proches de 0 V. Dans cette étude, cinq médiateurs ont été criblés sur une PCE afin de comparer leur sensibilité et leur limite de détection au NADH. Dans un second temps, le médiateur fournissant les meilleurs signaux d'oxydation électrochimique du NADH a été utilisé pour cribler une banque de mutant de la formiate déshydrogénase.

III.1. Criblage de médiateur pour le NADH

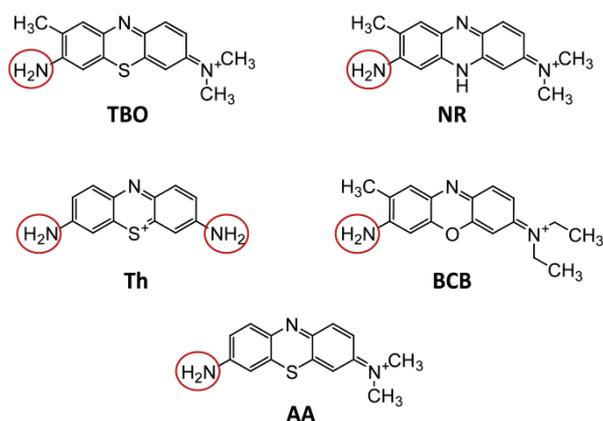


Fig. 91 : Structure des deux phenazines (rouge neutre (NR) et bleu de crétyl brillant (BCB)) et des trois phénothiazines (thionine (Th), bleu de toluidine (TBO) et azure A (AA)) portant au moins une fonction aryl amine (désignée par un cercle rouge).

Deux phénazines (bleu de crétyl brillant (BCB) et rouge neutre (NR)) et trois phénothiazine (thionine (Th), bleu de toluidine (TBO), et azure A (AA)) portant au moins une fonction aryl amine ont été choisies (Fig. 91) pour être diazotée puis électro-greffées sur les électrodes d'une PCE. Après diazotation en milieu aqueux, ces cinq molécules sont simultanément greffées sur 16 électrodes (deux colonnes d'électrodes) par électro-réduction (Fig. 92). Au total, 80 électrodes ont été modifiées en même temps par l'application de pulsations de potentiel de -1,5 V (vs. Ag/AgCl) durant 5 minutes (pulsations de 164 ms émis à une fréquence de 0,5 Hz). Les 16 dernières électrodes de la PCE n'ont pas été modifiées (électrodes nues) afin de mesurer l'électro-oxyster du NADH en absence de médiateur.

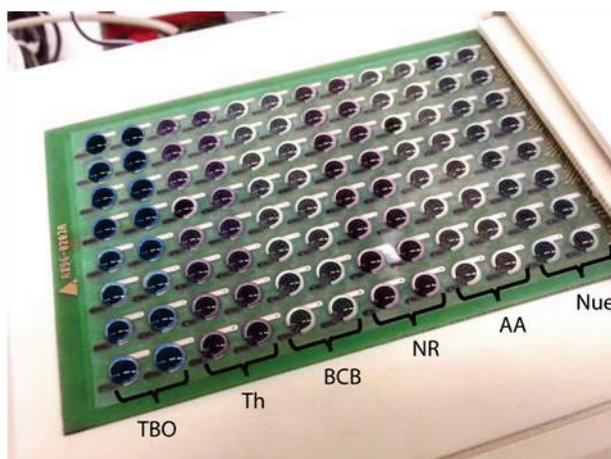


Fig. 92 : Photo prise durant l'électro-greffage des cinq molécules préalablement diazotées.

Après greffage, une mesure IPA d'une minute à 0 V (vs. Ag/AgCl) a été effectuée sur les électrodes dans du tampon phosphate (100 mM, pH 7) en présence de différentes concentrations de NADH (0 à 0,2 mM). Des variations d'intensité ont été calculées à partir de la différence entre les intensités mesurées en présence et en absence de NADH. Ces variations d'intensité correspondant à l'électro-oxydation du cofacteur sont décrites en fonction de la concentration en NADH sur le graphe de la Fig. 93. Ces signaux d'électro-oxydation ont permis de calculer les sensibilités des différentes électrodes modifiées ainsi que leur limite de détection à l'oxydation du NADH (

Tableau 7). La sensibilité est la pente de la partie linéaire du signal d'intensité en fonction de la concentration de NADH (nA.mM^{-1}), et la limite de détection correspond à la plus basse concentration de NADH oxydé détectable. Des valeurs de sensibilité de 199 ± 12 et de $149 \pm 8 \text{ nA.mM}^{-1}$ sont calculées respectivement pour les électrodes modifiées avec le rouge neutre (NR) et celles modifiées par le bleu de crésyl brillant (BCB). Ces sensibilités sont du même ordre de grandeur ($199 \pm 12 \text{ nA.mM}^{-1}$ pour le NR et $149 \pm 8 \text{ nA.mM}^{-1}$ pour le BCB) que celle obtenue avec les électrodes nues ($224 \pm 12 \text{ nA.mM}^{-1}$) dans la même gamme linéaire. Par conséquent, l'électro-greffage de NR ou de BCB sur du carbone sérigraphié ne permet pas de former des surfaces plus sensibles à l'oxydation du NADH. Par ailleurs, l'usage de ces phénazines comme médiateur des cofacteurs nicotiniques est généralement décrit sous forme d'électropolymère (Karyakin et al. 1999; Chen et al. 2001; Yang et al. 2009; Dilgin et al. 2011). De plus, l'électropolymérisation du NR permet de former un polymère de médiateur capable d'oxyder et de réduire le cofacteur de manière réversible (Karyakin et al. 1995; Karyakin et al. 2003; Arechederra et al. 2011). Contrairement à leur électropolymère, il semblerait que ces phénazines sous forme électro-greffée ne peuvent être utilisées comme

médiateur pour le NADH. Dans le cas des électrodes modifiées par l'électro-greffage d'azure A (AA), aucune variation d'intensité n'est observée. Le greffage d'AA semble donc former une surface électrochimiquement isolante. Dans la gamme de concentration en NADH utilisée, les électrodes modifiées par la thionine (Th) conduisent rapidement à des valeurs d'intensité saturantes (Fig. 93 encart). Cependant, une sensibilité importante de 5970 ± 993 nA.mM⁻¹ a été obtenue dans une gamme linéaire comprise entre 2 et 20 μ M et une limite de détection de 2 μ M. Les signaux d'oxydation du NADH mesurés sur les électrodes modifiées par le bleu de toluidine (TBO) ont permis de calculer une sensibilité de 3586 ± 164 nA.mM⁻¹ dans une gamme linéaire comprise entre 2 et 200 μ M, et une limite de détection de 1 μ M. Ces deux phénothiazines offrent ainsi des sensibilités 15 à 25 fois plus élevées que celle obtenues avec les électrodes nues ou modifiées avec le NR ou le BCB. Le greffage de TBO a pour résultat la formation d'une surface 1,5 fois moins sensible à l'oxydation du NADH que celle formée par la thionine. Cependant, avec ce premier, il est possible de mesurer cette oxydation avec la même sensibilité, dans une gamme en NADH dix fois plus importante. Ainsi, une mesure d'une minute a permis de désigner parmi cinq molécules, le TBO comme le meilleur candidat pour réaliser les tests avec la FDH.

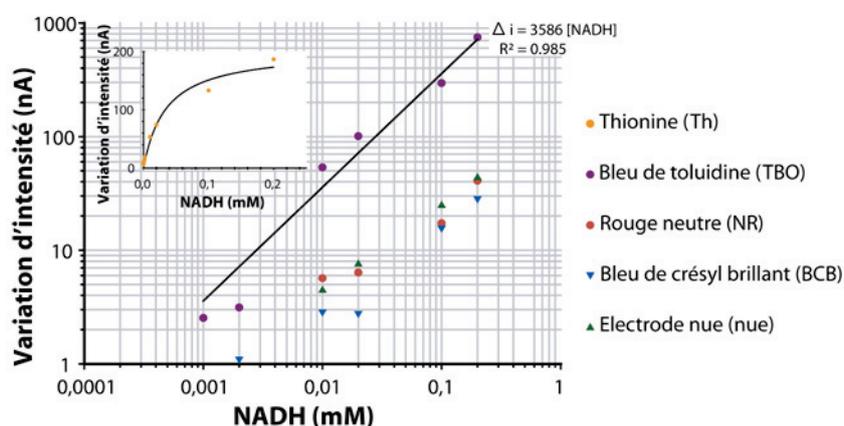


Fig. 93 : Variation d'intensité en fonction de la concentration en NADH (0 à 0,2 mM), obtenue à partir de mesures IPA réalisées sur des électrodes modifiées par l'électro-greffage des molécules suivantes : bleu de toluidine (TBO), rouge neutre (NR) et bleu de crésyl brillant (BCB). La droite indique la pente de la gamme linéaire obtenue avec le TBO. (Encart) Hyperbole décrivant la variation d'intensité en fonction de la concentration en NADH, obtenue à partir de mesure IPA réalisées sur des électrodes modifiées par l'électro-greffage de la thionine (Th). Les intensités ont été mesurées par IPA de 60 secondes à 0 V (vs. Ag/AgCl) avec des pulsations de 41 ms à une fréquence de 1 Hz dans du tampon phosphate (100 mM, pH 7, contenant 100 mM de KCl).

Tableau 7 : Détection électrochimique du NADH.

Phenazine	Limite de Detection (μM)	Gamme linéaire (μM)	Sensibilité ($\text{nA}\cdot\text{mM}^{-1}$)
TBO	1	1 - 200	3586 ± 164
NR	10	20 – 200	199 ± 12
AA	N/A	N/A	N/A
BCB	20	20 - 200	149 ± 8
Th	2	2 – 34	5970 ± 993
Electrode nue	10	10 - 200	224 ± 12

Thionine (Th), Bleu de Toluidine (TBO), Rouge Neutre (NR), Azure A (AA) et Bleu de Crésyl Brillant (BCB). N/A (Non Applicable)

III.2. Mesure d'une activité déshydrogénase par MET

Les électrodes d'une PCE ont été modifiées par l'électro-greffage du TBO pour détecter par mesure IPA d'une minute à 0 V (vs. Ag/AgCl), le NADH produit par la formiate déshydrogénase (FDH) commerciale de *Candida boidinii*. Avant d'initier la mesure, les électrodes modifiées ont été au préalable recouvertes d'une solution d'électrolyte (100 mM de tampon phosphate à pH 7, 100 mM de KCl) contenant les deux substrats de l'enzyme (5 mM de NAD^+ et 300 mM de formiate). Une première mesure IPA est réalisée en absence d'enzyme. Des mesures sont ensuite effectuées après addition sur chaque électrode de différentes quantités de FDH (activités comprises entre $0,1 \cdot 10^{-3}$ à $0,22$ U). Les deux premières mesures sont réalisées après 1 et 3 min d'incubation suivi de mesures à 10 et 15 min (Fig. 94). L'intensité augmente au cours du temps reflétant l'électro-oxydation du NADH produit par la FDH. Cette augmentation est d'autant plus importante que la quantité de FDH est élevée. Lorsque l'on reporte les intensités obtenues au bout de 3 min en fonction de la quantité de FDH, une courbe de saturation peut être obtenue (Fig. 94 encart). La partie linéaire de cette courbe permet de doser l'activité déshydrogénase avec une sensibilité de $1983 \pm 123 \text{ nA}\cdot\text{U}^{-1}$ et une limite de détection de $1,08 \cdot 10^{-3}$ U. Cependant, de faibles activités enzymatiques peuvent être détectées avec des temps de mesure plus longs.

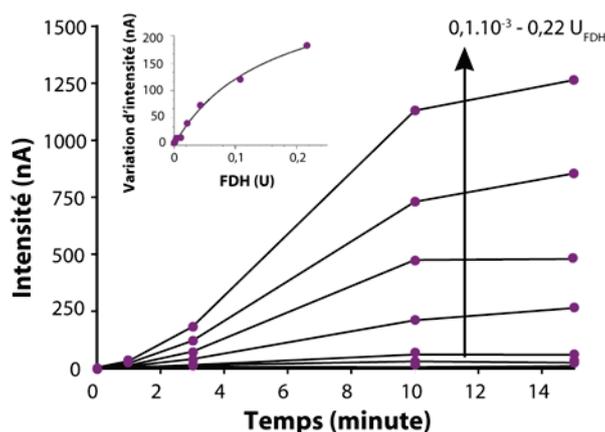


Fig. 94 : Intensité enregistrée en fonction du temps après addition de différentes quantités de FDH ($0,1 \cdot 10^{-3}$ à $0,22 U$: quantités croissantes indiquées par la flèche) en présence de ses substrats (5 mM de NAD^+ et 300 mM de formiate) sur des électrodes modifiées par l'électro-greffage de TBO. (Encart) Variation d'intensité en fonction de la quantité de FDH après trois minutes de réaction. Les intensités ont été mesurées (après incubation avec l'enzyme de 1, 3, 10 et 15 min) par IPA de 60 secondes à 0 V (vs. Ag/AgCl) avec des pulsations de 41 ms à une fréquence de 1 Hz dans du tampon phosphate (100 mM , $\text{pH} 7$, contenant 100 mM de KCl).

III.3. Criblage par MET d'une banque de mutants FDH

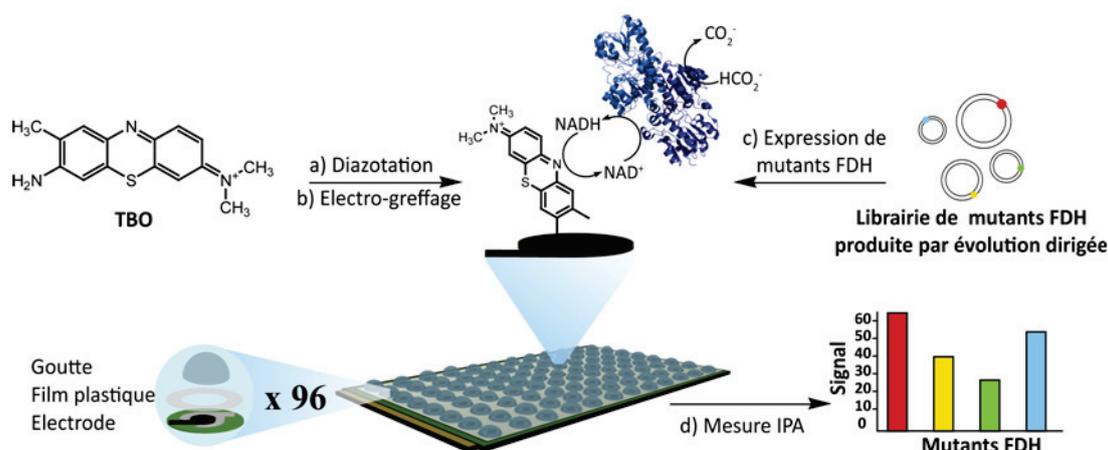


Fig. 95 : Schéma général illustrant l'utilisation d'une PCE pour le criblage d'une banque de mutants de la FDH par MET. Les électrodes sont dans un premier temps modifiées par l'électro-greffage de TBO diazotées. Des mesures IPA sur les 96 électrodes en présence de NAD^+ et de formiate permettent de comparer les activités de mutants de la formiate déshydrogénase exprimés à partir d'une banque.

Afin de montrer que cette méthode peut être utilisée comme outil de criblage dans une stratégie d'évolution dirigée (Fig. 95), une banque de mutants de la FDH a été utilisée. Cette banque composée de 77 mutants a été produite par PCR de basse fidélité par M. Bekhouche lors de ses travaux de thèse. Ces mutants proviennent de clones positifs sélectionnés par

détection colorimétrique au précipité bleu de formazan sur boîte de Petri (sur milieu inducteur) et en présence des substrats de la FDH (NAD^+ et formiate) (Ansorge-Schumacher et al. 2006). Cette détection est réalisée à l'aide du couple PES/NBT (Phénazine Ethosulfate/Nitrobleu de tétrazolium (NBT)) (Fig. 96). Le PES oxyde chimiquement le NADH formé par la FDH. Le PES réduit est à son tour oxydé par le NBT conduisant à la formation de NBT diformazan détectable par absorbance à 560 nm.

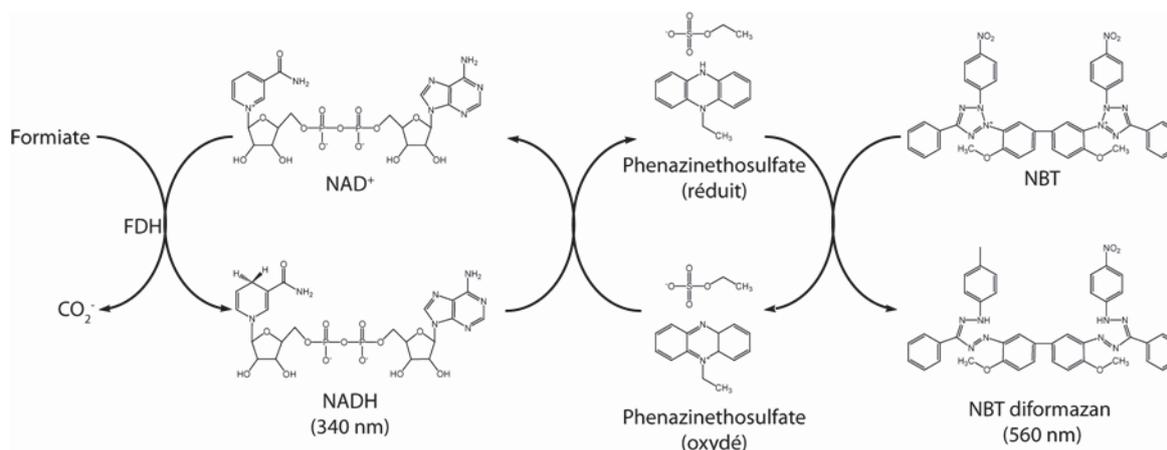


Fig. 96 : Schéma de la réaction catalysée par la FDH illustrant l'oxydation chimique du NADH par le couple PES/NBT. La formation de NADH peut être suivie par absorbance 340 nm et la formation de NBT diformazan est suivie à 560 nm.

Les 77 clones de la banque sont chacun mis en culture dans un volume de 1,5 ml sur plaque de culture 96 puits. L'expression de ces mutants est induite par ajout d'IPTG (1 mM) lorsque les cultures ont atteint une DO (600 nm) de 1. Après induction de 4h à 37°C sous agitation, les cellules sont lysées avec un détergent (Triton X-100 à 0,1 %) puis centrifugées (2000 g, 15 min à 4°C). Les 77 surnageants récupérés contenant les mutants de la FDH en solution sont directement utilisés pour mesurer l'activité de l'enzyme par électrochimie et colorimétrie.

Sur des électrodes modifiées par électro-greffage de TBO, 20 μl de chaque surnageant sont déposés en présence des substrats de la FDH en condition saturante. Après une minute d'incubation (à température ambiante), une mesure IPA à 0 V (vs. Ag/AgCl) a permis de calculer des rapports signal-sur-bruit (S/N) (eq9 page 91). Le bruit de fond (I^0) est obtenu à partir de mesures effectuées en absence de FDH. Les S/N obtenus ont permis de discriminer les mutants les plus actifs des moins actifs (Fig. 97). Les valeurs de S/N les plus importantes sont obtenues avec les mutants 34 et 70.

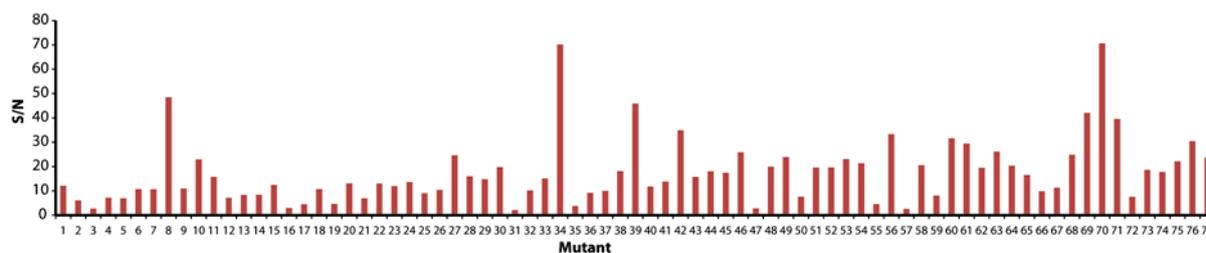


Fig. 97 : criblage électrochimique de l'activité FDH. Les S/N (signal-sur-bruit) ont été calculés à partir des intensités mesurées par IPA après 1 min d'incubation des électrodes avec 20 μ l de surnageant en présence de 5 mM de NAD^+ et 3 mM de formiate. Mesure IPA de 60 secondes à 0 V (vs. Ag/AgCl) avec des pulsations de 41 ms à une fréquence de 1 Hz dans du tampon phosphate (100 mM, pH 7, contenant 100 mM de KCl)

En parallèle, l'activité de ces mutants a été mesurée avec le couple de médiateurs NBT/PES. Ces activités auraient pu être mesurées en suivant la formation de NADH à 340 nm. Cependant, les éléments protéiques et nucléiques ainsi que le triton-X contenus dans les surnageants absorbent la lumière dans l'UV et interfèrent avec les mesures d'absorbance du NADH. C'est pourquoi le NBT/PES est utilisé car la formation de bleu de formazan est suivie par absorbance dans le visible (560 nm). Les activités détectées par absorbance après 5 min d'incubation sont corrélées avec celles mesurées par électrochimie (Fig. 98). Un coefficient de corrélation (r) de 0,80 est calculé à partir de la régression linéaire des points obtenus sur le graphe de la Fig. 98. Cette valeur a permis de déterminer une valeur de p inférieure à 0,001 (p -value < 0,001, $n = 77$) indiquant donc une forte corrélation entre les activités mesurées par colorimétrie et électrochimie (Motulsky 1995). De plus, les deux mutants les plus actifs (34 et 70) observés après criblage électrochimique (Fig. 97) présentent également de fortes activités par absorbance ($DO_{560}^{34} = 0,25$; $DO_{560}^{70} = 0,28$) (Fig. 98). Ainsi, les résultats de criblage électrochimique sur PCE d'activité déshydrogénase sont similaires à ceux obtenus par colorimétrie. Par ailleurs, il est important de souligner que les mesures réalisées avec la méthode électrochimique ont été effectuées en deux minutes (1 min d'incubation et 1 min de mesure). De plus, il n'a pas été nécessaire de purifier l'enzyme montrant que cette méthode de mesure électrochimique peut être utilisée avec des milieux complexes (présence de triton-X100, d'EDTA, de protéines contaminantes...). Cet avantage, permet ainsi de s'affranchir des problèmes de turbidité rencontrés en spectrophotométrie.

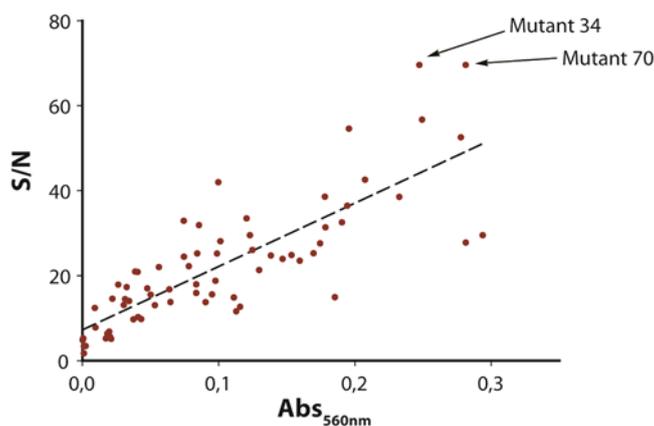


Fig. 98 : Corrélation entre les activités des 77 mutants de la FDH mesurées par colorimétrie (formation de formazan à partir de nitrobleu de tétrazolium, suivie à 560 nm) et par oxydation électrochimique du NADH sur des électrodes modifiées par l'électro-greffage de TBO (mesurées par IPA de 60 secondes à 0 V vs. Ag/AgCl avec des pulsations de 41 ms à une fréquence de 1 Hz dans du tampon phosphate (100 mM, pH 7, contenant 100 mM de KCl). La valeur P (P-value) est inférieure à 0,001. Les mesures d'activité sont réalisées en présence de 5 mM de NAD^+ et 300 mM de formiate.

IV. Criblage de transfert direct d'électron (DET)

Après avoir montré qu'il est possible de cribler une activité enzymatique par transfert indirect d'électrons (MET), les plaques de criblage électrochimique (PCE) ont été utilisées pour cribler et caractériser le DET avec une oxydase multicuivrée. Dans cette famille, les laccases sont les plus étudiées du fait des nombreuses applications qui lui sont associées (Couto et al. 2006). En bioélectronique, ces oxydases présentent un intérêt certain par la proximité de leur centre cuivre T1 à la surface et leur potentiel redox élevé (jusqu'à +0,8 V vs. NHE) (Shlev et al. 2005). De surcroît, de nombreuses études biochimiques sur les laccases ont permis d'accumuler un grand nombre d'informations structurales et fonctionnelles (Rodgers et al. 2010). Ces connaissances ont donc ouvert des perspectives d'ingénierie moléculaire ayant pour but d'améliorer leurs usages dans des interfaces électrochimiques. Dans ce contexte, les PCE ont été utilisées pour mettre au point une méthode électrochimique permettant de cribler et de caractériser l'activité bio-électronique d'une laccase simplement adsorbée sur les électrodes de carbone sérigraphié (Fig. 99). Dans un premier temps, pour valider cette méthode, la laccase commerciale de *Trametes versicolor* (TvLac) a été choisie comme modèle. Dans un second temps, ce système a été utilisé pour développer un protocole de criblage pour l'évolution dirigée de la laccase CotA de *Bacillus subtilis*.

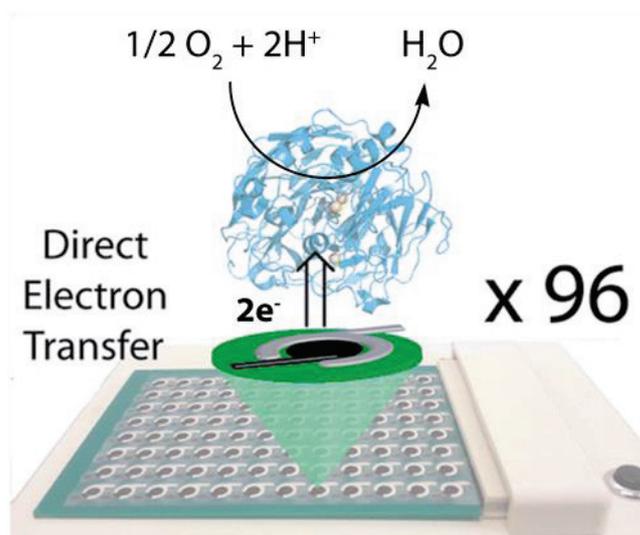


Fig. 99 : Schéma illustrant l'activité bio-électrochimique d'une laccase induit par un DET sur 96 électrodes de carbone sérigraphié.

IV.1. Mesure d'un DET sur PCE avec la laccase de *Trametes versicolor* (TvLac)

Les mesures de DET avec la laccase de *Trametes versicolor* (TvLac) ont été réalisées par adsorption sans contrôle de l'orientation de l'enzyme sur l'électrode.

a) Préparation de l'enzyme

La TvLac est une enzyme d'origine fongique d'environ 70 kDa. Commerciale, elle est fournie sous forme de poudre beige indiquant la présence d'impuretés (extrait commercial brut contenant des polyphénols et d'autres molécules non protéiques). Il a été nécessaire de la purifier. Pour cela, une colonne échangeuse d'anion (DEAE-Sepharose) a été utilisée. Après élution avec 60 mM de sulfate d'ammonium ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) une solution bleutée a été obtenue (protocole de purification dans la partie II.2.5.a page 94). Un contrôle sur SDS-Page 10 % a montré que le même nombre de bandes protéiques est présent avant (piste 1 Fig. 100) et après (piste 2 Fig. 100) purification (deux bandes principale à 62 et 75 kDa et une troisième bande à 40 kDa). D'après Blanford, les deux bandes principales correspondent aux isoformes de la TvLac. Par ailleurs, la même activité spécifique de 90 U.ml^{-1} (obtenue avec l'ABTS comme substrat) a été calculée pour les solutions d'enzyme purifiée et non purifiée. Pour mesurer un DET avec l'enzyme, $3 \mu\text{l}$ de solutions d'enzyme à $0,33 \text{ mg.ml}^{-1}$ (concentration protéique) sont adsorbés (une nuit à 4°C) sur les électrodes de carbone sérigraphié des PCE.

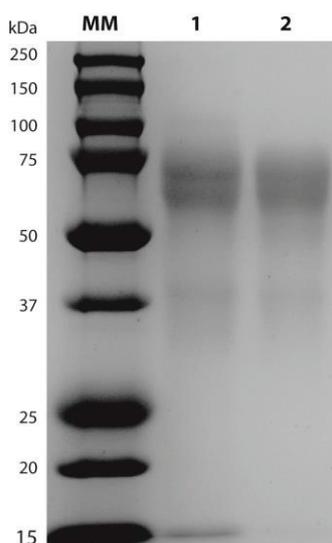


Fig. 100 : Contrôle de la purification de la TvLac par électrophorèse sur gel polyacrylamide 10% en condition dénaturante (SDS-PAGE). Les TvLac non purifiée et purifiée ont été respectivement déposées sur les pistes 1 et 2. Tous les échantillons ont été au préalable incubés 5 min à 100°C (β -mercaptoéthanol 0,01 % (V/V)). Les tailles des marqueurs de masse moléculaire (MM) sont indiquées à gauche du gel.

b) Faisabilité de la mesure du DET par mesures ampérométriques pulsées par intermittence (IPA)

Dans un premier temps, la faisabilité de cette méthode a été étudiée avec la TvLac préalablement purifiée. Le graphe sur la Fig. 101 représente les intensités mesurées à +0,1 V (vs. Ag/AgCl) sur les 96 électrodes d'une PCE, avant et après adsorption de 1 μ g de TvLac (une nuit à 4°C). Avant adsorption, un très faible courant est mesuré sur l'ensemble des électrodes, tandis que des intensités s'élevant à 280 nA sur les dix dernières mesures, sont obtenues après adsorption de l'enzyme. Ces intensités reflètent la réduction bio-électrochimique de l'oxygène moléculaire induite par un DET avec les laccases adsorbées (activité bio-électrochimique). Une moyenne de 180 ± 40 nA est obtenue sur les 96 mesures après adsorption avec un coefficient de variation de 22 %. Cette valeur de dispersion est relativement élevée comparée à celles obtenues pour les tests de criblage colorimétrique qui sont généralement inférieur à 20 % (Zhu et al. 2007; Brissos et al. 2009). Par ailleurs, il n'existe aucun test de criblage électrochimique dans la littérature afin de comparer la qualité de notre méthode. En tenant compte de la sérigraphie des électrodes et de la possibilité de désorption d'enzyme lors des mesures, il est possible de suggérer que la reproductibilité est de bonne qualité. D'autre part, des essais réalisés dans les mêmes conditions à partir de solutions de TvLac obtenues après élution avec 100 mM de NaCl (au lieu de 60 mM de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) ont conduit à des signaux d'intensité nuls. L'ion chlorure (Cl^-) ainsi que d'autres halogénures

comme le fluorure (F^-), sont connus pour être des inhibiteurs de l'activité laccase (Spirasolomon et al. 1986). Par conséquent, l'adsorption de solution de TvLac contenant un de ces ions en grande quantité conduirait à son inactivation. Il est donc normal qu'aucun signal de DET ne soit observable en présence de NaCl. Ces résultats ont donc montré que l'usage des PCE permet de détecter simultanément sur 96 électrodes, un DET avec une laccase simplement adsorbée et sans contrôle de l'orientation.

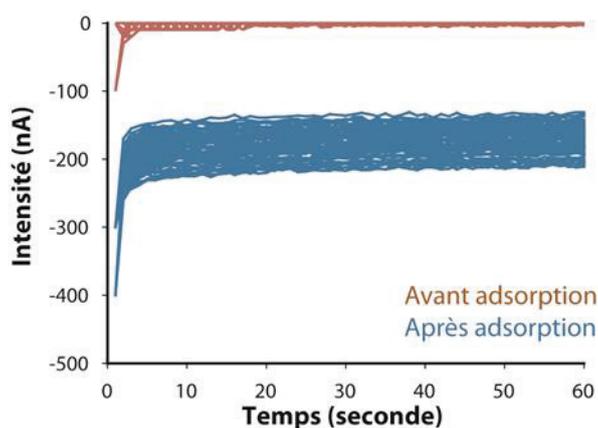


Fig. 101 : Intensités obtenues à +0,1V (vs. Ag/AgCl) avant (ligne rouge) et après adsorption (ligne bleu) de 1 μ g de TvLac purifiée sur les électrodes de carbone. Mesures IPA de 60 secondes réalisées avec des pulsations de 41 ms à une fréquence de 1 Hz, dans du tampon phosphate-citrate (150 mM, pH 4,4) contenant 100 mM de $NaClO_4$.

c) Optimisation des mesures de DET

Afin de déterminer le potentiel optimal pour réaliser un DET entre la TvLac et les électrodes, des mesures de +0,6 à -0,6 V (vs. Ag/AgCl) ont été effectuées avant et après adsorption de 1 μ g d'enzyme purifiée (Fig. 102). Lorsque des potentiels supérieurs à +0,3 V (vs. Ag/AgCl) ou inférieurs à -0,2 V (vs. Ag/AgCl) sont appliqués sur les électrodes nues, des intensités allant de |50| à |1300| nA sont obtenues. Entre ces deux potentiels, des intensités proches de 0 nA sont mesurées sur ces mêmes électrodes. Après adsorption, une augmentation significative des intensités est observée aux potentiels compris entre +0,3 et -0,1 V (vs. Ag/AgCl) correspondant à l'activité bio-électrochimique de la TvLac. Il est nécessaire de noter que le potentiel redox du centre T1 de la TvLac est de +0,78 V (vs. NHE) (Shleev et al. 2005). Un écart de plus de 0,4 V est obtenu entre cette valeur et le potentiel auquel le signal électrochimique est généré (+0,3 V). Cette différence peut s'expliquer d'une part, par l'utilisation d'une électrode de référence Ag/AgCl (potentiel redox standard $E^\circ = 0,22$ V) induisant un décalage d'environ -0,2 V par rapport à une référence NHE (électrode normale à

hydrogène, potentiel redox standard $E^\circ = 0$ V). D'autre part, la résistance électrique non négligeable des électrodes de carbone sérigraphié peut être également mise en cause.

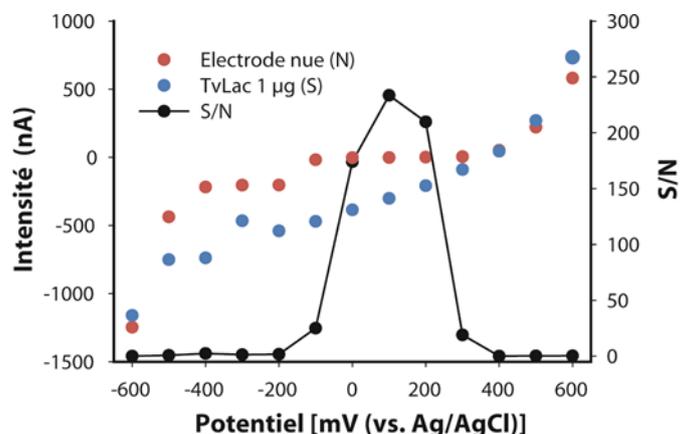


Fig. 102 : Intensités mesurées entre +0,6 et -0,6 V (vs. Ag/AgCl) avant (ronds rouges) et après adsorption de 1 µg de TvLac purifiée (ronds bleus). Valeurs de S/N calculées à partir des d'intensités. Mesures IPA de 60 secondes réalisées avec des pulsations de 41 ms à une fréquence de 1 Hz, dans du tampon phosphate-citrate (150 mM, pH 4,4) contenant 100 mM de NaClO_4 .

Contrairement à des mesures voltammétriques classiques, les mesures d'IPA n'offrent pas la possibilité d'observer des signaux d'oxydoréduction électrochimique au travers de pics d'intensité. Ce type de mesure permet néanmoins de mettre en évidence une activité laccase avec une meilleure sensibilité (Wojciechowski et al. 1999). A des potentiels inférieurs à -0,1 V ou supérieurs à +0,3 V, des signaux d'intensités liées à l'oxydation et la réduction des électrolytes peuvent interférer avec la détection du signal de l'enzyme. Afin de s'affranchir de ces signaux non spécifiques, le rapport S/N est utilisé (eq 9 page 91), où S (Signal) et N (bruit de fond) correspondent respectivement aux signaux obtenus après et avant adsorption de la TvLac. Sur le même graphique de la Fig. 102, les valeurs de S/N ont été reportées en fonction du potentiel et la valeur la plus élevée (240) est située à +0,1 V (vs. Ag/AgCl). Ce potentiel sera fixé par la suite afin de détecter de façon optimale l'activité bio-électrochimique de la TvLac. Par ailleurs, il est important de souligner que des S/N significatifs (>20) sont également obtenus aux potentiels adjacents situés entre -0,1 et +0,3 V (vs. Ag/AgCl).

Par la suite, nous avons comparé les valeurs de S/N mesurées à partir de l'adsorption de 1 µg TvLac purifiée et non purifiée (extrait commercial brut contenant des polyphénols et d'autres molécules non protéiques) (Fig. 103). Dans les deux cas, des signaux correspondant à l'activité bio-électrochimique de TvLac, sont obtenus entre -0,3 et +0,3 V (vs. Ag/AgCl) avec des valeurs maximales à +0,1 V (vs. Ag/AgCl). Cependant, Les valeurs de S/N calculées pour la TvLac purifiée sont 1,5 à 3 fois plus grandes que celles obtenues avec l'enzyme non

purifiée. De plus, un écart-type 3 fois plus important est obtenu avec la TvLac non purifiée. Par conséquent, l'usage de l'enzyme purifiée permet d'avoir une meilleure reproductibilité de mesure. Il apparaît également, que la présence d'impuretés non protéiques peut affecter l'activité bio-électrochimique de la TvLac adsorbée. Ainsi les études suivantes seront réalisées avec la TvLac purifiée.

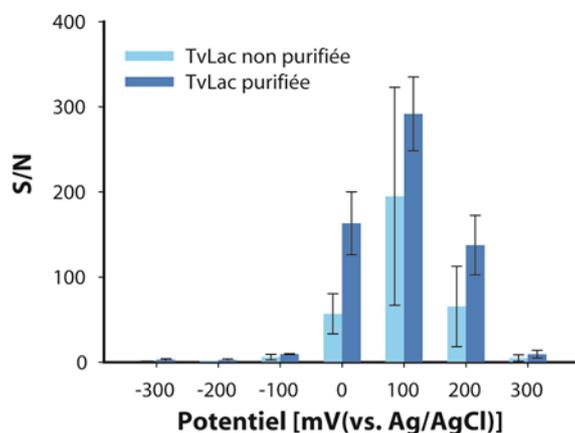


Fig. 103 : Valeurs de S/N obtenues entre +0,3 et -0,3 V (vs. Ag/AgCl) après adsorption de 1 µg de TvLac purifiée et non purifiée. Mesures IPA de 60 secondes réalisées avec des pulsations de 41 ms à une fréquence de 1 Hz, dans du tampon phosphate-citrate (150 mM, pH 4,4) contenant 100 mM de NaClO₄.

Une analyse quantitative à +0,1 V a ensuite été réalisée afin d'étudier la relation entre les valeurs de S/N et la quantité de TvLac adsorbée. Des mesures IPA ont été réalisées avec des quantités de TvLac adsorbées comprises entre 0,5 ng et 15 µg ($7,7 \cdot 10^{-15}$ à $2 \cdot 10^{-10}$ mol considérant un poids moléculaire moyen de 65 kDa). Une augmentation des valeurs de S/N en fonction de la quantité de TvLac adsorbée est enregistrée avec une valeur maximale d'environ 250 pour 0,1 µg de TvLac (Fig. 104A). Le S/N reste maximal jusqu'à 1 µg de protéine adsorbée et diminue fortement au-delà de 10 µg de TvLac adsorbée. Cette diminution permet de suggérer qu'à partir d'une certaine quantité, des agrégats protéiques peuvent se former et contraindre l'activité bio-électrochimique des laccases. Par ailleurs, une courbe de saturation est obtenue à partir des valeurs de S/N mesurées entre 0 et 1 µg de TvLac adsorbées et présente une partie linéaire comprise entre 0,5 et 75 ng (correspondant à une activité enzymatique de $62 \cdot 10^{-6}$ et $9,37 \cdot 10^{-3}$ U) (Fig. 104B). Une sensibilité de $3027 \mu\text{g}^{-1}$ à +0,1 V (vs. Ag/AgCl) (Fig. 104B encart) et une limite de détection de 0,5 ng ($7,7 \cdot 10^{-15}$ mol), ont pu être estimées à partir de la partie linéaire.

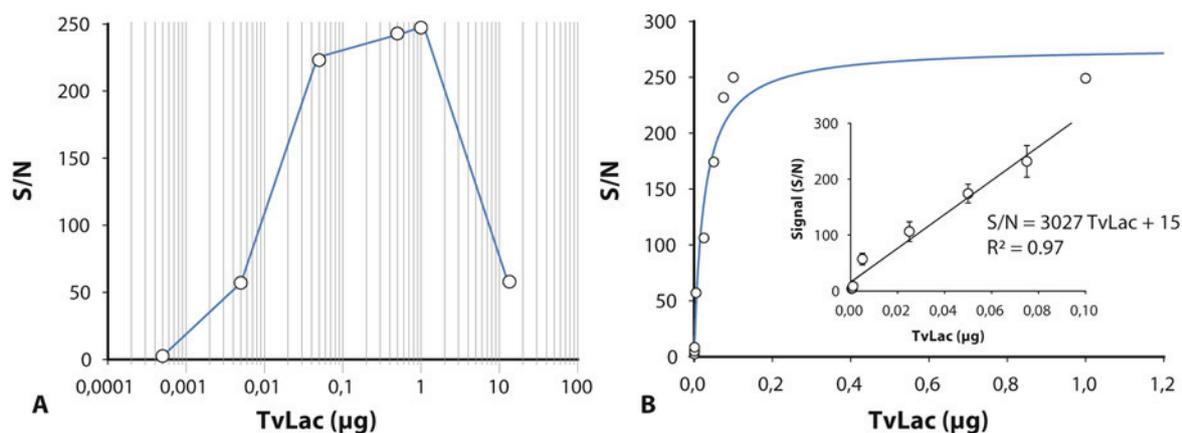


Fig. 104 : valeurs de S/N obtenues à +0,1 V (vs. Ag/AgCl) en fonction de la quantité de TvLac purifiée et adsorbée. (A) signaux mesurés de 0,5 ng à 15 µg. (B) signaux mesurés entre 0 et 1 µg. Une courbe de regression hyperbolique est obtenue à partir des points mesurés. Un zoom sur la partie linéaire est décrit dans l'encart de la figure. Valeurs de S/N calculées à partir de mesures IPA de 60 secondes réalisées avec des pulsations de 41 ms à une fréquence de 1 Hz, dans du tampon phosphate-citrate (150 mM, pH 4,4) contenant 100 mM de NaClO₄.

Cette méthode de mesure électrochimique devrait aussi permettre de cribler les conditions de réaction bio-électrochimique telles que le pH. Pour vérifier cela, des mesures IPA à +0,1 V (vs. Ag/AgCl) avec la TvLac adsorbée ont été réalisées à différents pH (pH 2,2 à 8). Les valeurs de S/N obtenues ont ensuite été comparées avec les activités enzymatiques en solution avec l'ABTS comme substrat dans la même gamme de pH. En accord avec la littérature, la TvLac présente une activité enzymatique optimale en solution à pH 3 avec l'ABTS (Madzak et al. 2006). D'autre part, une activité bio-électrochimique optimale est enregistrée à pH 5,2 (Fig. 105). Cette différence peut s'expliquer par le fait que les électrodes étant polarisées à +0,1 V (vs. Ag/AgCl), l'environnement (concentration en proton) de TvLac adsorbée diffère de celui de l'enzyme en solution. Par ailleurs, des modifications structurales induites par l'adsorption de l'enzyme peuvent aussi expliquer cette différence de pH. On peut également souligner le fait que la TvLac ainsi que la plupart des laccases d'origine fongique catalysent l'oxydation de substrat non phénolique (ex : ABTS) et phénolique (ex : 2,6-diméthylphénol) à des pH optimaux acides (Madzak et al. 2006). L'oxydation à pH acide de substrats phénoliques qui nécessitent la présence de charges négatives au niveau du site actif, est facilitée par la présence de résidus acides tels que l'acide aspartique en position 206 chez la TvLac. Par ailleurs, il a été suggéré que l'ABTS ne dépend pas de la présence de charge mais de résidus apolaires avec lesquels il interagit par des liaisons hydrophobes (Enguita et al. 2004). Par ailleurs, l'effet du pH sur le centre T2/T3 pourrait être étudié en mesurant l'activité bio-électrochimique de la laccase adsorbée.

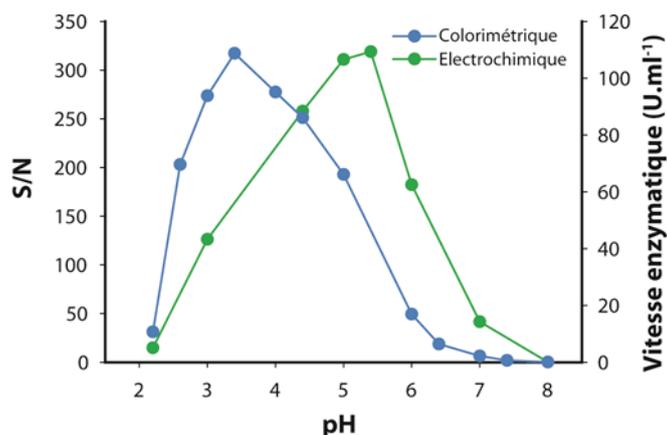


Fig. 105 : Valeurs de S/N en fonction du pH obtenus avec 1 μg de TvLac adsorbée (points vert) et activités de TvLac avec l'ABTS en solution mesurées par colorimétrie (Points bleus). La gamme de pH est comprise entre 2,2 et 8 (tampon phosphate-citrate 150 mM contenant 100 mM de NaClO_4). Les vitesses enzymatiques ont été mesurées par absorbance à 420 nm (oxydation de l'ABTS) avec 5 mM d'ABTS et 0,5 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ de TvLac (90 $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$). Les valeurs de S/N ont été calculées à partir de mesures IPA de 60 secondes à +0,1 V (vs. Ag/AgCl) avec des pulsations de 41 ms à une fréquence de 1 Hz.

Cette série de mesures a donc permis de déterminer les paramètres optimaux pour réaliser un DET entre la TvLac et les électrodes de sérigraphie des PCE : Mesure IPA à +0,1 V (vs. Ag/AgCl) à pH 5,2 avec 1 μg de TvLac adsorbée.

d) Mesure de DET en présence d'inhibiteur

Dans le but de montrer qu'il est possible de cribler des inhibiteurs de laccase à partir de mesures sur PCE, des mesures en présence d'ion fluorure (F^-) et d'ion azoture (N_3^-) ont été effectuées. Ces derniers sont des inhibiteurs de laccase connus pour interagir avec le centre redox T2/T3 et empêchent la réduction de l'oxygène moléculaire (Branden et al. 1973; Gromov et al. 1999). Les réactions catalytiques des laccases s'effectuent selon un mécanisme ping-pong où le dioxygène est réduit puis libéré après l'oxydation de quatre substrats donneurs (Solomon et al. 1996; Blanford et al. 2007). Par conséquent, l'activité bio-électrochimique générée à partir d'un DET entre une laccase et une électrode, pourra être seulement affectée par des molécules entrant en compétition avec le dioxygène. Les effets de ces inhibiteurs sur l'activité de la TvLac en solution et adsorbée sur une électrode ont été comparés.

Dans un premier temps, l'inhibition de l'activité de la TvLac par les ions fluorure et azoture est étudiée en solution avec l'ABTS (Fig. 106A et B). Les constantes de cinétique enzymatique déterminées par un modèle Michaelis-Menten classique, indiquent une diminution du V_{max} apparent lorsque la concentration en $[\text{F}^-]$ augmente de 0 à 1 mM (de $229 \pm$

13 $\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$ à $87 \pm 4 \mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$). Par ailleurs, des variations non significatives du K_M^{ABTS} sont observées (entre $50 \pm 10 \mu\text{M}$ et $43 \pm 8 \mu\text{M}$) montrant qu'il n'est pas affecté par l'inhibiteur. Ces résultats soutiennent le fait que le F^- est un inhibiteur non-compétitif avec un $K_I^{\text{F}^-}$ de 0,43 mM (Naki et al. 1981). En présence d'ion azoture, un comportement similaire est observé. Des V_{max} apparent de $229 \pm 4 \mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$ et $102 \pm 4 \mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$ sont obtenues lorsque l'on passe d'une concentration en $[\text{N}_3^-]$ de 0 à 10 μM . Comme pour l'ion fluorure, une légère variation du K_M^{ABTS} est observée (entre $38 \pm 1 \mu\text{M}$ et $48 \pm 1 \mu\text{M}$). Un $K_I^{\text{N}_3^-}$ de 10,9 μM est calculé. Ces mesures ont donc permis de vérifier l'effet inhibiteur de ces ions sur l'activité laccase.

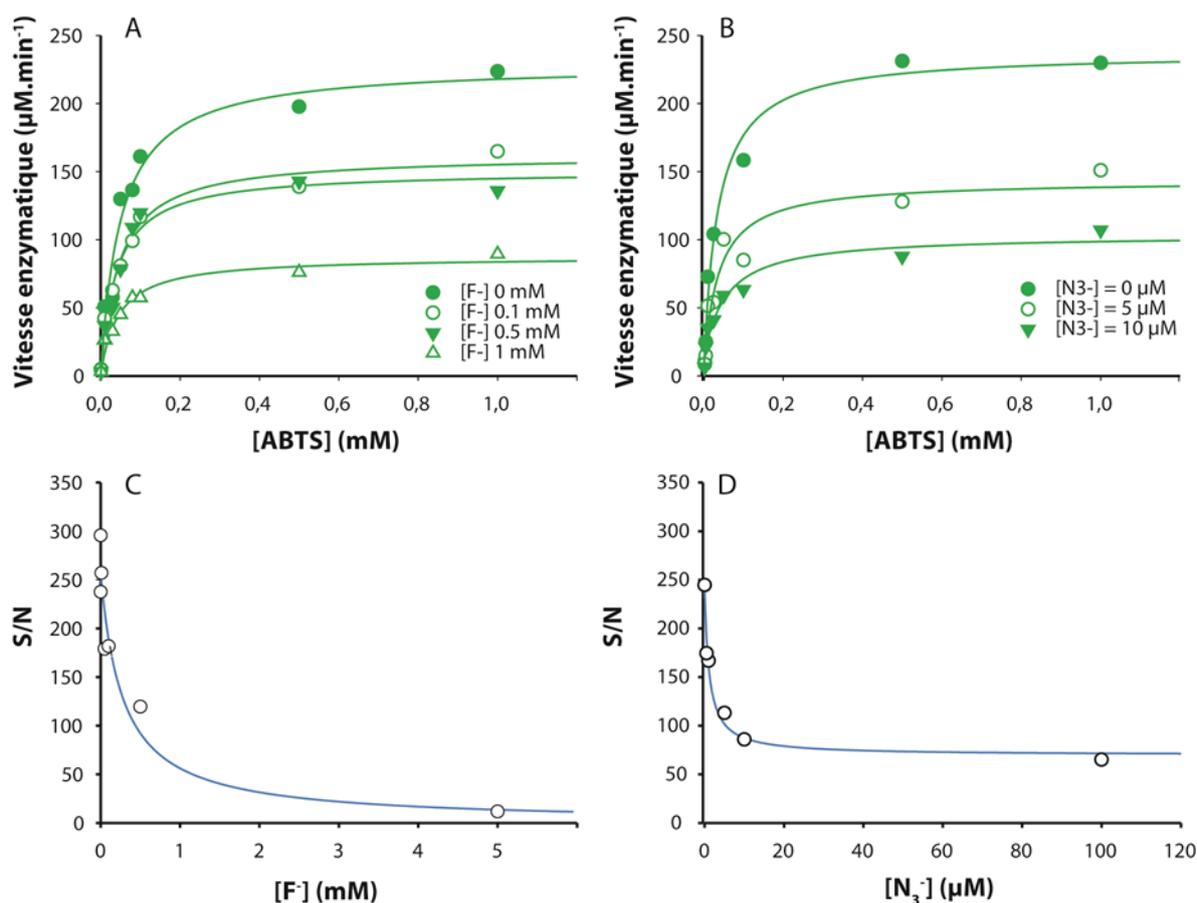


Fig. 106 : Courbes de type Michaelis-Menten d'activités enzymatiques de TvLac en solution et en présence (A) d'ion fluorure [F⁻] ou (B) d'ion azoture [N₃⁻], obtenues par mesures d'absorbance à 420 nm avec l'ABTS comme substrat (Tampon acétate 20 mM, pH 5,5 contenant 60 mM de sulfate d'ammonium). Valeurs de S/N en fonctions de la concentration d'inhibiteur, obtenues à partir de mesures à +0,1 V (vs. Ag/AgCl) réalisées avec 1 μg de TvLac adsorbées en présence (C) de 0 à 5 mM d'ion fluorure ou (D) de 0 à 100 μM d'ion azoture dans du tampon phosphate-citrate (150 mM, pH 4,4 contenant 100 mM de NaClO₄). Mesures IPA de 60 secondes à +0,1 V (vs. Ag/AgCl) avec des pulsations de 41 ms à une fréquence de 1 Hz

Parallèlement, l'activité bio-électrochimique de la TvLac adsorbée a été mesurée en présence d'une gamme de concentrations d'ions fluorure (0 à 5 mM) et d'ions azoture (0 à

100 μM) en solution dans l'électrolyte (Fig. 106C et D). Dans le cas du fluorure, lorsque l'on passe de 0 à 5 mM, la valeur de S/N mesurée à +0,1 V (vs. Ag/AgCl) diminue de 300 à 11 et de 250 à 65 pour des concentrations allant de 0 à 5 mM pour le $[\text{F}^-]$ et de 0 à 100 pour le $[\text{N}_3^-]$. Pour ce dernier, la possibilité qu'il soit électro-oxydé en N_2 (Dalmia et al. 1996), pourrait expliquer la persistance d'un signal électrochimique élevé (> 50). D'autre part, Les signaux mesurés ont permis de tracer des hyperboles en fonction de la concentration en inhibiteur. Ces résultats indiquent clairement que les signaux électrochimiques mesurés reflètent l'électro-réduction du dioxygène catalysée par la TvLac adsorbée. Certains paramètres n'étant pas contrôlés ($[\text{O}_2]$, pH à la surface de l'électrode polarisée), les constantes d'inhibition (K_I) ainsi que le K_M du dioxygène pour les enzymes adsorbées ne peuvent être déterminées. Néanmoins, l'estimation des concentrations inhibitrices médianes (IC_{50}) permet de comparer les inhibiteurs entre eux. Des valeurs d' IC_{50} de $280 \pm 14 \mu\text{M}$ et $1,2 \pm 0,4 \mu\text{M}$ correspondant au fluorure et à l'azoture ont été calculées. Ainsi, tous ces résultats montrent que l'ion N_3^- a un effet inhibiteur plus important que l'ion F^- sur la TvLac en solution ou adsorbée sur une électrode. Le criblage d'une banque d'inhibiteurs associés à des oxydases peut donc être réalisé en une minute. D'autre part, des mesures effectuées dans un tampon saturé en argon ont présenté des valeurs de S/N diminuées de moitié (de 230 à 120) (Fig. 107). L'atténuation totale du signal n'est pas observée car les mesures ont été réalisées au contact de l'air ambiant. Cette expérience vient confirmer une nouvelle fois que les signaux mesurés reflètent l'électro-réduction du dioxygène générée par un DET entre TvLac et les électrodes.

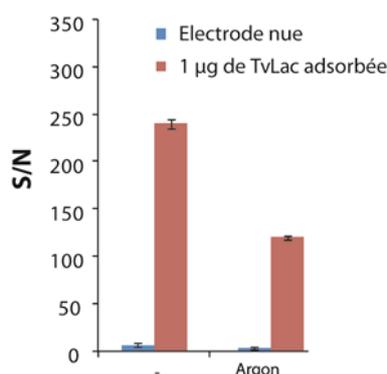


Fig. 107 : Valeurs de S/N avec 1 μg de TvLac adsorbée mesurées dans du tampon phosphate-citrate (150 mM, pH 4,4 contenant 100 mM de NaClO_4) en présence ou non (-) d'argon. Mesures IPA de 60 secondes à +0,1 V (vs. Ag/AgCl) avec des pulsations de 41 ms à une fréquence de 1 Hz.

e) Mesures de DET en présence de molécules interférentes

Des espèces redox présentes dans une solution d'enzyme purifiée ou dans un milieu complexe (ex : lysat cellulaire), peuvent interférer avec les signaux électrochimiques liés à

une activité bio-électrochimique. Généralement pour éviter ces problèmes, des médiateurs redox spécifiques et immobilisés à la surface d'une électrode sont utilisés (MET). Dans le cas de cette étude, l'adsorption de TvLac sur une électrode permet d'obtenir une surface spécifique à l'électro-réduction du dioxygène. Cette adsorption n'étant pas contrôlée, des zones de la surface de l'électrode peuvent rester accessibles pour l'oxydation ou la réduction de molécules interférentes. Par conséquent, l'étude d'un DET sur les PCE avec une laccase recombinante, nécessite de vérifier l'effet de molécules pouvant être présentes après les étapes d'expression et de purification de l'enzyme. Nous avons donc étudié l'influence sur les signaux électrochimique de molécules susceptibles d'être co-adsorbées avec l'enzyme ou retrouvées en solution dans l'électrolyte (Fig. 108 et Fig. 109)

En vue d'étudier l'influence d'une protéine contaminante sur les mesures de l'activité bio-électrochimique de TvLac à +0,1 V (vs. Ag/AgCl), de l'albumine de sérum bovin (BSA) a été adsorbé ou co-adsorbé avec 1µg de TvLac (Fig. 108). Lorsque cette dernière est adsorbée seul sur une électrode, aucun signal électrochimique n'est enregistré. D'autre part, 1µg de BSA co-adsorbé avec la TvLac, diminue le S/N de l'enzyme de 1,5 fois. Pour de plus hautes quantités de BSA (> 3µg), le S/N de la TvLac est réduit de 15 fois avec une valeur de 15 pour 3µg de BSA. Il est suggéré que la présence d'une protéine contaminante est capable de conduire à la formation d'agrégats protéiques gênant le DET entre la laccase et l'électrode. Ces observations indiquent également que pour obtenir un signal électrochimique de bonne qualité, il est nécessaire que l'enzyme adsorbée soit au moins partiellement purifiée. Lorsque 3 µg de BSA sont adsorbés avec 1 µg de TvLac, cette dernière représente 25 % de la quantité totale de protéine. Dans ces conditions la valeur de S/N est fortement diminuée mais reste significative (S/N > 3). Dans un système bactérien utilisant une souche d'*E.coli* permettant la surexpression d'une protéine, la quantité maximale de protéine recombinante produite peut atteindre 40 % des protéines totales (Baneyx 1999). Idéalement, il serait donc possible de mesurer un DET sans utiliser une étape de purification. Cependant, la surexpression d'une laccase native telle que la laccase CotA de *Bacillus subtilis* permet d'obtenir une proportion d'environ 5 % (Duraio et al. 2008). Dans ce cas, il serait nécessaire de purifier l'enzyme avant adsorption.

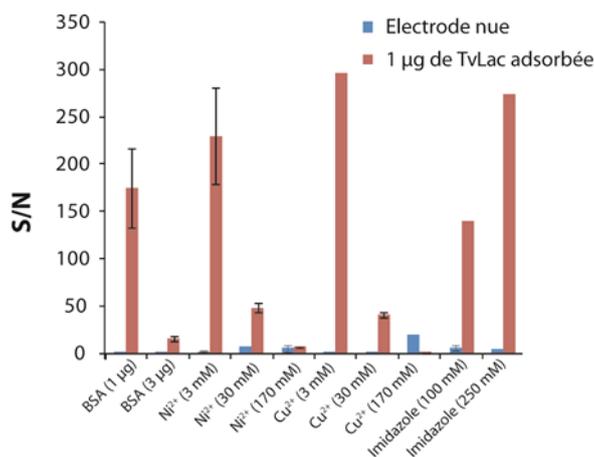


Fig. 108 : Effets de différentes espèces co-adsorbées avec 1 µg de TvLac (BSA, Ni²⁺, Cu²⁺, et imidazole). Les valeurs de S/N ont été calculées à partir de mesures IPA de 60 secondes réalisées à +0,1 V (vs. Ag/AgCl) avec des pulsations de 41 ms à une fréquence de 1 Hz.

Lors d'une purification par chromatographie d'affinité, il est commun qu'une protéine recombinante soit fusionnée avec un segment peptidique tel qu'une étiquette polyhistidine (His-tag). Nous avons donc étudié l'effet sur électrode à +0,1 V (vs. Ag/AgCl) de certaines espèces moléculaires pouvant être présentes après la purification d'une enzyme portant un His-tag (Fig. 108). Le Nickel (Ni) présent sous forme complexée dans les colonnes d'affinité His-tag (Ni complexé à de l'acide iminodiacétique (Ni-IDA)) et l'imidazole utilisé pour l'éluion, ont été adsorbés ou co-adsorbés avec 1 µg de TvLac sur les électrodes. Lorsque 3 µl d'une solution d'imidazole de 100 mM (30 nmol) ou 250 mM (75 nmol), sont déposés et adsorbés, de très faibles valeurs de S/N sont obtenues (4 et 6). Par ailleurs, la co-adsorption de ces mêmes concentrations d'imidazole avec la TvLac, ne semble pas ou peu affecter le S/N de l'enzyme (139 et 274). Par conséquent, l'éluat d'enzyme collecté à partir d'une colonne d'affinité His-tag pourrait être directement adsorbé sur une électrode pour une analyse électrochimique. L'adsorption de 3 µl d'une solution de Ni²⁺ (NiCl₂) à 3, 30 et 170 mM (9, 90 et 510 nmol) a permis d'observer qu'en dessous de 30 mM (90nmol) ce cation génère un signal électrochimique à +0,1 V (vs. Ag/AgCl) non significatif (S/N < 3). Au-delà de cette quantité, le S/N est faiblement amplifié pour atteindre une valeur de 5 à 510 nmol. D'autre part, la co-adsorption de 9 nmol de Ni²⁺ avec la TvLac affecte peu le S/N de l'enzyme. Cependant, au-delà de 90 nmol le S/N diminue fortement et devient négligeable en présence de 510 nmol de Ni²⁺. L'effet d'un autre cation a été étudié : le Cu²⁺ (Fig. 108). Afin d'obtenir une surexpression d'enzymes natives, la production d'oxydase cuivrée dans un système bactérien, nécessite une supplémentation du milieu de culture avec du cuivre (Duraio et al. 2008). Comme pour l'ion Ni²⁺, du Cu²⁺ (CuCl₂) a été adsorbé et co-adsorbé avec les mêmes

quantités. En dessous de 90 nmol, le cation adsorbé n'engendre pas de valeurs S/N significatives, tandis qu'à 510 nmol un S/N de 20 est mesuré. Sa co-adsorption avec la TvLac présente le même effet qu'avec le Ni^{2+} : à partir de 90 nmol le S/N de l'enzyme est fortement diminué (~ 40) et devient nul à 510 nmol de Cu^{2+} . Ainsi, ces résultats indiquent que l'activité bio-électrochimique de TvLac sur les électrodes est affectée lorsque l'enzyme est adsorbée en présence de ces cations métalliques. Cela pourrait être causé par son inactivation ou par l'effet inhibant du contre ion chlorure associé à ces cations (NiCl_2 et CuCl_2).

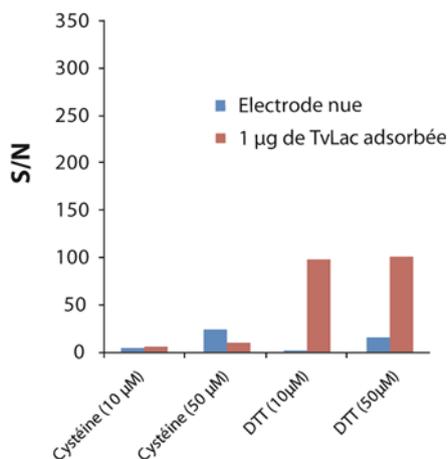


Fig. 109 : Effets de deux espèces en solution portant des groupements sulfhydryle (dithiothréitol (DTT) et cystéine). Les valeurs de S/N ont été calculées à partir de mesures IPA de 60 secondes réalisées à +0,1 V (vs. Ag/AgCl) avec des pulsations de 41 ms à une fréquence de 1 Hz

Finalement, lors des mesures électrochimiques avec la TvLac adsorbée, nous avons étudié l'influence de la cystéine et du dithiothréitol (DTT) en solution dans l'électrolyte (Fig. 109). Ces molécules sont des agents réducteurs portant des groupements sulfhydryle (SH) pouvant être également utilisés au cours d'une purification d'enzyme pour éviter la formation d'agrégats. A +0,1 V (vs. Ag/AgCl), sur des électrodes nues, 10 µM de Cystéine ou de DTT induisent respectivement des S/N de 5 ou 1,8. Au-delà d'une concentration de 50 µM, ces signaux atteignent des valeurs de 23 et 15 respectivement pour la cystéine et le DTT, ce qui permet d'affirmer que ces molécules peuvent être réduites ou oxydées électrochimiquement à +0,1 V (vs. Ag/AgCl) (potentiel redox du DTT : - 0,33 V vs. NHE ; potentiel redox de la cystéine : +0,22 vs. NHE) (Jocelyn 1967) et (Maryadele 2013). Avec la TvLac adsorbée, les S/N de l'enzyme deviennent négligeables (< 10) en présence de cystéine. Pareillement, lorsque du DTT est ajouté, les S/N associés à l'activité de la TvLac diminuent (~ 100). Ces deux agents réducteurs ont donc un effet inhibiteur sur l'activité bio-électrochimique de la TvLac. Cet effet pourrait être causé par l'interaction de ces molécules avec les atomes de

cuire des centres redox de l'enzyme ou par la réduction de résidus cystéines (la TvLac contient un total de cinq cystéines) menant à l'inactivation de la laccase.

Cette dernière série d'expériences a donc permis en partie, d'évaluer les problèmes d'interférence pouvant être rencontrés dans le cas où ce système de mesure électrochimique serait appliqué au criblage d'un DET avec une oxydase recombinante. Nous avons pu constater, que la présence de protéines contaminantes peut fortement influencer sur les signaux électrochimiques d'un DET. D'autre part, on a pu remarquer que la présence de certaines molécules non protéiques peuvent interférer ou contraindre l'activité bio-électrochimique d'une oxydase adsorbée. Par conséquent, l'application des PCE pour un criblage d'un DET avec une laccase recombinante nécessiterait une étape de purification.

IV.2. Criblage électrochimique sur PCE appliqué à l'évolution dirigée de la laccase CotA

L'évolution dirigée appliquée à une enzyme consiste à insérer des mutations aléatoirement (mutagenèse aléatoire) permettant d'obtenir des mutants avec une activité et une stabilité nouvelle ou accrue. L'étape limitante de cette méthode est la mise en œuvre d'une stratégie permettant de cribler une banque de mutants par une application donnée. En bioélectronique, le criblage d'enzyme avec une activité bio-électrochimique élevée, nécessite une méthode de criblage électrochimique. L'étude réalisée avec la TvLac a montré la possibilité d'utiliser les 96 électrodes des plaques de criblage électrochimique (PCE) pour l'étude d'un DET (*direct electron transfer*). Ces PCE ont donc été appliquées à l'évolution dirigée d'une laccase dans le but de cribler des mutants ayant la capacité accrue de réaliser un DET avec des électrodes de carbone. La laccase CotA de *Bacillus subtilis* a été choisie comme modèle d'étude. D'origine bactérienne, elle peut être aisément surexprimée dans un système bactérien. De plus, elle a la particularité d'être thermostable (Martins et al. 2002) ce qui peut être avantageux pour la mise au point d'une biopile (enzyme plus stable dans le temps).

Pour réaliser cette étude, il a été nécessaire au préalable, de mettre au point un protocole de criblage composé de quatre étapes (Fig. 110) : production d'une banque de mutants ; criblage de mutants positifs sur boîte de Petri ; expression et purification au format 96 puits ; criblage électrochimique sur PCE. Des résultats préliminaires montrant la faisabilité de ces étapes seront présentés.

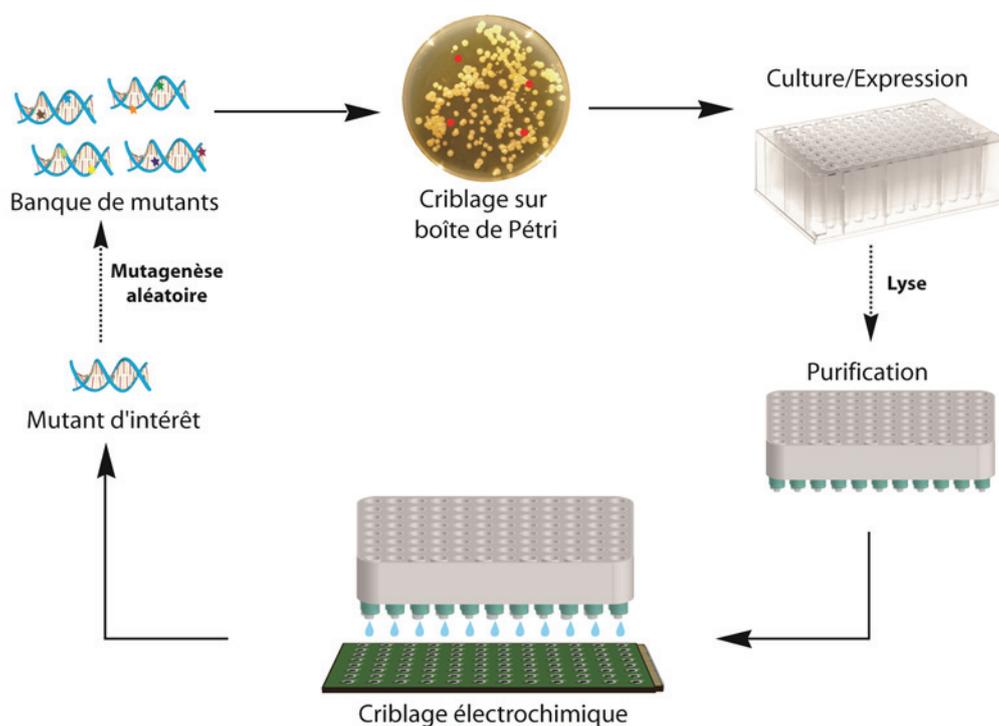


Fig. 110 : Plateforme de criblage pour l'évolution dirigée de laccase CotA.

a) Criblage d'activité laccase sur boîte de Petri

Cette étape a pour but de discriminer à partir d'une librairie, les clones exprimant des mutants de CotA actifs de ceux exprimant des mutants inactifs, et ceci dans le but de créer une banque de mutants actifs à cribler électrochimiquement sur PCE. Au préalable, des essais ont été effectués avec des souches de *E. coli* BL21 (DE3) transformées, soit avec le vecteur d'expression pET-28b portant l'insert codant pour CotA_{wt} (souche pET-28b-CotA_{wt}), soit avec pET-28b vide (souche pET-28b). Afin de révéler l'expression d'enzymes actives, des boîtes de Petri ont été utilisées avec un milieu de sélection (LB-agar avec 100 µg.ml⁻¹ de kanamycine) contenant les éléments nécessaires pour l'expression de laccases actives (0,1 mM d'IPTG et 0,25 mM de CuCl₂) ainsi qu'un substrat révélateur (1 mM d'ABTS). « Boîte de criblage » est le terme choisi pour désigner ces boîtes de culture

Dans un premier temps, des souches pET-28b-CotA_{wt} sont étalées sur boîte de criblage. Après incubation de 24h à 37°C, des colonies d'aspect normal peuvent être observées et indiquent que le milieu inducteur et la présence de 1 mM d'ABTS ne sont pas toxiques à la croissance des cellules (Fig. 111A). Après 72h d'incubation, ces mêmes colonies présentent une coloration rougeâtre révélant l'expression de laccase CotA active (Fig. 111B). Cette couleur est induite par l'oxydation de l'ABTS dans le milieu LB et est donc le reflet de l'activité laccase.

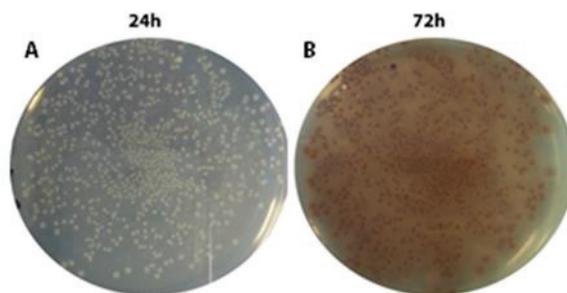


Fig. 111 : Photos d'une boîte de criblage prise après 24h (A) et 72h (B) d'incubation à 37°C, après étalement de souches pET-28b-CotA_{wt}. Le milieu de culture est constitué de LB-agar contenant 100 µg.ml⁻¹ de kanamycine, 0,1 mM d'IPTG, 0,25 mM de CuCl₂ et 1 mM d'ABTS.

Afin de confirmer ces résultats et de montrer qu'il est possible de différencier des clones positifs des négatifs, des suspensions contenant à la fois des souches pET-28b-CotA_{wt} et des souches pET-28b, ont été utilisées. Une suspension contenant le mélange de 100 µl d'une préculture de souche pET-28b-CotA_{wt} et 900 µl d'une préculture de souche pET-28b vide, a été préparée (Rapport 1/10 : souche pET-28b-CotA_{wt}/ souche pET-28b vide). Des dilutions au 1/1000 et au 1/10000 ont été réalisées avec cette suspension, puis étalées sur des boîtes de criblage. Après 24h, environ 1500 colonies sont dénombrées après étalement de la dilution au 1/1000 (Fig. 112A). Parmi ces colonies, 190 contenant des clones positifs sont nettement observables après 72h (Fig. 112B). Au 1/10000, 35 clones positifs sur 390 sont recensés (Fig. 112C et 112D). Les rapports entre les nombres de clones positifs sur la totalité des colonies (1/10 pour la dilution au 1/1000 et au 1/10000), sont équivalents à la proportion initiale retrouvée dans la suspension de départ (1/10). Ainsi, ces boîtes de criblage offrent une bonne fiabilité pour le crible de clones exprimant des laccases actives. Cependant, une incubation de longue durée (72h) est nécessaire pour obtenir une révélation colorimétrique de bonne qualité.

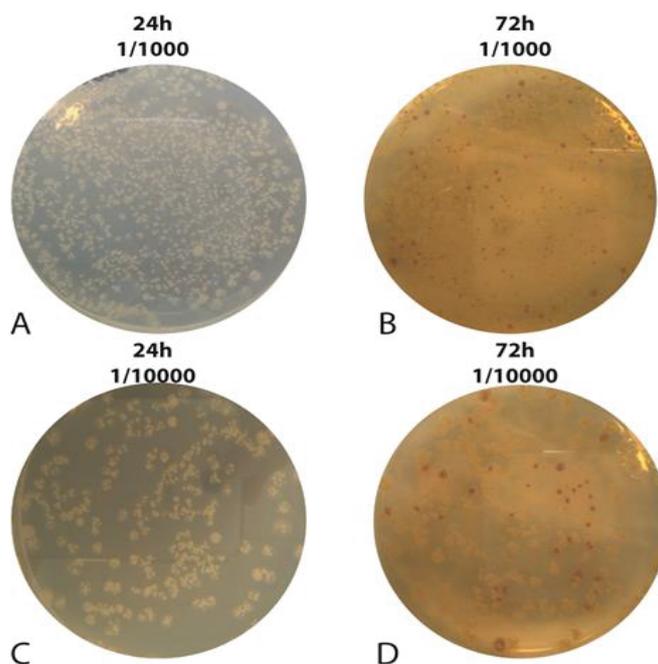


Fig. 112 : Photos prises à partir de deux boîtes de criblage, après 24h et 72h d'incubation à 37°C. En (A) et (B) la boîte a été préparée à partir d'une dilution au 1/1000 d'une suspension obtenue en mélangeant 100 μ l de préculture de souches pET-28b-CotA_{WT}, avec 900 μ l de préculture de souches pET-28b-CotA_{WT} vide. En (C) et (D) la boîte a été préparée à partir d'une dilution au 1/10000 de la même suspension. Le milieu de culture est constitué de LB-agar contenant 100 μ g.mL⁻¹ de kanamycine, 0,1 mM d'IPTG, 0,25 mM de CuCl₂ et 1 mM d'ABTS.

Pour vérifier à la fois, la viabilité des cellules induites sur boîte et leur capacité à exprimer CotA, trois clones positifs révélés par une coloration rougeâtre ainsi que trois clones négatifs, ont été repiqués sur une nouvelle boîte de criblage (Fig. 113). Après 72h d'incubation, il a pu être observé que les cellules repiquées ont repoussé, et que les trois clones positifs ont été capables d'exprimer une enzyme active.

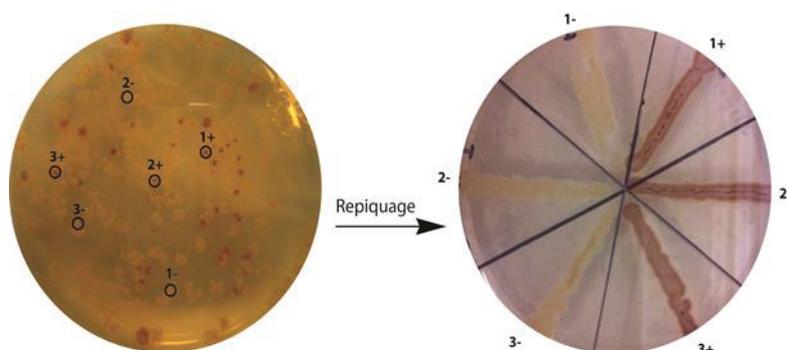


Fig. 113 : Repiquage de trois clones positifs (1+, 2+, 3+) et trois clones négatifs (1-, 2-, 3-) sur une boîte de criblage incubée 72 h à 37°C. Les clones proviennent de la boîte de criblage obtenue après étalement de la dilution au 1/1000 présentée sur la Fig. 112D.

Cette méthode de criblage sur boîte permet donc de cribler des clones qui expriment la laccase CotA active, mais aussi d'utiliser ces clones directement pour une culture en suspension. Ainsi, cette méthode ne nécessite pas d'étape de lyse cellulaire ni de réplication des colonies. Elle offre ainsi des avantages certains en termes de temps et de simplicité.

b) Expression et purification de CotA

Entre l'étape de criblage sur boîte de Pétri et l'étape de criblage électrochimique, il est essentiel d'exprimer et purifier les mutants de CotA sélectionnés sur boîte de criblage. Pour cela, une étape d'expression sur plaque 96 puits et de purification de CotA sur plaque 96 colonnes doit être optimisée.

- Optimisation de l'expression de la laccase CotA sur plaque 96 puits

Des souches pET-28b et pET-28b-CotA_{wt} ont été utilisées pour mettre au point un protocole d'expression sur plaque 96 puits (puits de 2 ml). Les précultures et les cultures de ces souches ont été réalisées dans 1,5 ml de milieu LB à 37°C sous une agitation de 400 rpm (rotation par minute). Lors des cultures, l'expression de CotA est induite à une densité optique de 0,6 à 600 nm (DO₆₀₀). L'induction est initiée par l'ajout de 1 mM d'IPTG et 250 µM de CuCl₂ suivie d'une incubation de 4h à 25°C avec la même vitesse d'agitation (400 rpm) (condition aérobie). Par la suite, l'agitation est stoppée et les cultures sont laissées à incuber 20h à 25°C (condition microaérobie). Ces conditions particulières d'induction ont été utilisées car il a été montré que la surexpression d'oxydases cuivrées natives nécessite une supplémentation du milieu en ion cuivre (CuCl₂) (Martins et al. 2002). De surcroît, Martins et ses collaborateurs ont indiqué l'importance de réaliser l'induction de CotA en condition microaérobie (sans agitation) à basse température (25°C) durant 20 h permettant aux cellules d'assimiler le cuivre (Duraó et al. 2006). Il a été suggéré que ces conditions diminuent le métabolisme aérobie des cellules freinant ainsi le fonctionnement des pompes chargées de maintenir l'homéostasie du cuivre dans le cytoplasme. La photo de la Fig. 114 permet de comparer la coloration de trois culots bactériens après culture et induction. Les deux premiers correspondent à une induction en microaérobiose de souches pET-28b-CotA_{wt} (Fig. 114A) et de souches pET-28b (Fig. 114B). Le troisième culot provient de l'induction en aérobie (4h à 25°C sous agitation) de souches pET-28b-CotA_{wt} (Fig. 114C). Un culot verdâtre est obtenu après induction de 20h en microaérobiose des souches exprimant CotA et les deux autres culots présentent une coloration jaune. La coloration verte semble donc liée à la présence de complexe cuivre T1 (cuivre bleu) témoignant de la surexpression de CotA native.

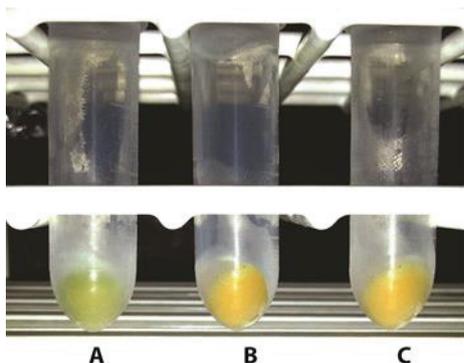


Fig. 114 : Photo de culots bactériens après culture et induction en microaérobiose de souches exprimant *CotA* (A) et de souches portant le vecteur *pET-28b* vide (B) et induction en aérobiose de souches exprimant *CotA* (C).

Les cultures étant réalisées dans des puits de 2 ml, il a été nécessaire de déterminer le moyen de lyser les cellules sans l'usage de méthodes mécaniques (par traitement aux ultrasons ou par presse de French). Sachant que *CotA* est stable à des températures élevées avoisinant les 70°C (Martins et al. 2002), les bactéries ont été lysées par incubation à 65°C. Afin de déterminer les meilleures conditions de lyse, des culots bactériens provenant de cultures induites de souches *pET-28b-CotA_{wt}* et *pET-28b*, ont été resuspendus dans du tampon phosphate (20mM pH 7,6) puis traités avec du lysozyme (1mg/ml 45 min dans la glace). Le lysozyme permet d'hydrolyser les peptidoglycanes constituant la paroi de *E.coli*. Des incubations de 0, 10, 30 et 60 min à 65°C, ont été effectuées. Les surnageants sont ensuite récupérés après centrifugation (30 min à 3000 g, à 4°C). Afin de mettre en évidence la présence de *CotA* dans les surnageants, des mesures d'activité enzymatique avec l'ABTS ont été réalisées. L'apparition d'une coloration verte reflétant l'oxydation enzymatique du substrat, a permis dans un premier temps de révéler qualitativement la présence de *CotA* (Fig. 115A). Les puits présentant cette coloration sont ceux contenant du surnageants obtenus après traitement avec du lysozyme et incubation à 65°C. Cette coloration est plus prononcée lorsque le temps d'incubation à 65°C est supérieur à 30 min correspondant à une plus grande quantité de laccase native. La vitesse enzymatique mesurée avec une incubation de 10 min (0,0035 U.ml⁻¹) est 120 à 140 fois plus petite que celles obtenues après 30 et 60 min d'incubation à 65°C (0,43 et 0,5 U.ml⁻¹) (Fig. 115B). Par ailleurs, Aucune activité laccase n'est visible avec les surnageants provenant des bactéries transformées avec le vecteur vide. Ces résultats montrent donc que pour lyser efficacement les cellules, il est nécessaire d'une part, de les traiter avec du lysozyme et d'autre part, de les incubé à 65°C pendant plus de 30 min.

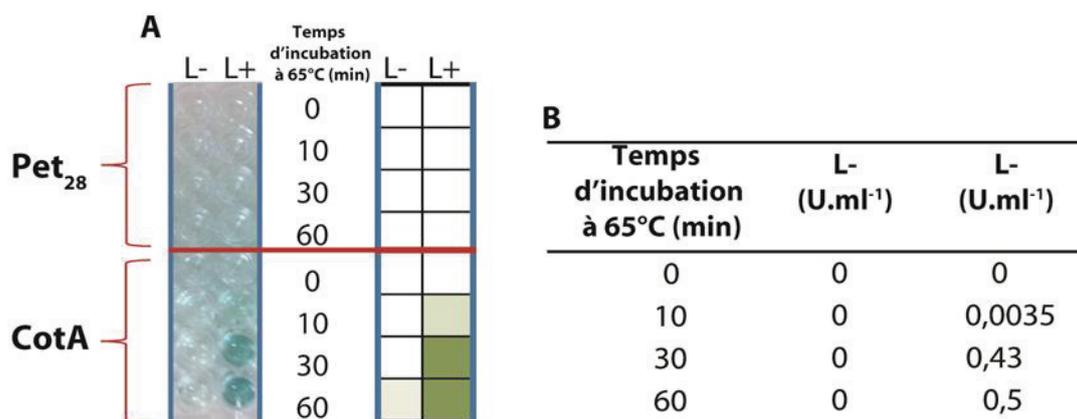


Fig. 115 : (A) Révélation par colorimétrie de l'activité de CotA dans les surnageants en présence d'ABTS. Tests réalisés dans du tampon phosphate-citrate (150 mM, pH 3,4 contenant 100mM de NaClO₄) avec 1mM d'ABTS en présence de 20 µl de surnageant obtenu à partir de lyses cellulaires effectuées par traitement (L+) ou non (L-) avec du lysozyme (1 mg.ml⁻¹) puis incubation à 65°C pendant différentes périodes. (B) Vitesses mesurées par variation d'absorbance à 420 nm dans les mêmes conditions que (A) à partir des différents surnageants.

- Optimisation de la purification

L'étude du DET sur PCE avec la laccase de *Trametes versicolor* (TvLac), a montré la nécessité d'avoir une enzyme purifiée pour obtenir des signaux électrochimiques de bonne qualité. Ainsi, pour mesurer un DET avec CotA il est indispensable de la purifier. De plus, dans le cadre du criblage, il est essentiel de purifier l'enzyme sur plaque 96 colonnes. Pour cela, une plaque 96 micro-colonnes sera utilisée. Dans un premier temps, l'optimisation de la purification de CotA a été réalisée sur une micro-colonne identique à celles portées par la plaque. Cette purification a donc été effectuée par chromatographie échangeuse de cation à pH 7,6 à partir de culture de 1,5 ml décrite ci-dessus. Durant cette étape, 300 µl de surnageant récupérés après lyse d'une culture (traitement au lysozyme et incubation à 65°C) sont déposés sur une micro-colonne contenant 400 µl de gel CM-Sephrose (CarboxyMéthyl-Sephrose) et préalablement équilibrée avec du tampon phosphate (20 mM, pH 7,6). Après lavage avec 800 µl d'une solution de 100 mM de sulfate d'ammonium ((NH₄)₂SO₄), l'enzyme est récupérée à partir d'une simple élution avec 400 µl de (NH₄)₂SO₄ à 250 mM contenue dans le même tampon phosphate. Le (NH₄)₂SO₄ a été utilisé à la place du NaCl communément utilisé dans ce type de purification, du fait de l'effet inhibiteur de l'ion chlorure lorsque l'enzyme est adsorbée sur l'électrode.

Tableau 8 : Tableau de purification de CotA. Les quantités de protéines ont été estimées selon la méthode Bradford. Les activités ont été mesurées avec l'ABTS (1 mM) comme substrat dans du tampon phosphate-citrate (150 mM, pH 3,4 contenant 100mM de NaClO₄). Les activités spécifiques ont été calculées à partir des activités totales rapportées aux quantités totales de protéines. Le facteur de purification a été calculé à partir des activités spécifiques et le rendement de purification à partir des activités totales.

Etape	Protéines totales (µg)	Activité totale (U)	Activité spécifique (U.mg ⁻¹)	Facteur de purification	Rendement (%)
Surnageant	71	0,33	4,65	1	100
Colonne CM-Sephrose	3,8	0,14	36,85	7,92	42

Une analyse sur SDS-PAGE a été réalisée pour suivre l'expression et la purification de CotA. En comparaison aux cellules non induites (Fig. 116 piste 1), une bande intense à 70 kDa correspondant à la surexpression de CotA (taille théorique : 65 kDa), est visible dans le contenu des cellules induites (Fig. 116 piste 2). Après lyse, le surnageant présente une activité spécifique de 4,65 U.mg⁻¹ avec une quantité de protéines totales de 71 µg (Tableau 8). Sur gel, deux bandes principales peuvent être discernées, la bande à 70 kDa correspondant à CotA et une autre bande à 82 kDa (Fig. 116 piste 3). Cette deuxième bande peut correspondre à une protéine thermostable provenant des souches d'expression *E. coli* ayant persistée après incubation à 65°C. Par ailleurs, on peut observer que la lyse cellulaire par incubation à 65°C permet d'éliminer par précipitation une grande quantité de protéines contaminantes. Après purification, une bande unique correspondant à CotA peut être observée sur le gel, montrant ainsi la bonne qualité de la purification. A cette étape, l'activité spécifique est de 36,85 U.mg⁻¹ ce qui signifie que CotA a été purifiée à partir du surnageant avec un facteur de purification d'environ 8. D'autre part, un rendement de purification de 42 % a été calculé à partir de l'activité totale de l'enzyme (tableau 8)

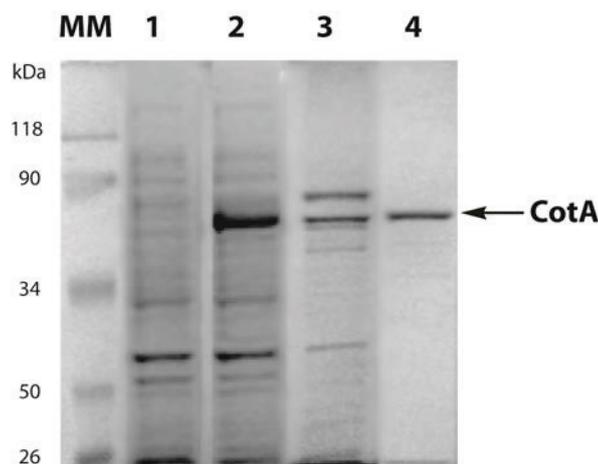


Fig. 116 : Contrôle de la purification de CotA par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 10% en condition dénaturante (SDS-PAGE). Des cellules non induites et induites sont déposées sur les pistes 1 et 2 ($2\mu\text{l}$ de cellules), les protéines du surnageant et de la purification par CM-Sepharose sont respectivement déposées sur les piste 3 et 4. Tous les échantillons ont été au préalable incubés 5 min à 100°C en présence de β -mercaptoéthanol (0,01 % (v/v)). Les tailles des marqueurs de masse moléculaire (MM) sont à gauche du gel.

Avant de réaliser 96 purifications, la solution de CotA purifiée obtenue dans cette partie est utilisée pour valider la détection d'un DET par mesures électrochimiques sur PCE.

c) Mesure du transfert direct d'électrons (DET) avec CotA sur plaque de criblage électrochimique (PCE)

Dans le but de valider l'étape de criblage électrochimique, des mesures IPA sur PCE ont été réalisées avec CotA purifiée. Pour cela, $5\mu\text{l}$ provenant directement de l'élution de CotA sur colonne CM-Sepharose ont été déposés sur les électrodes de carbone puis laissés adsorber 2h à température ambiante. L'éluat a une concentration en protéine de $10\text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ dans 250 mM de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ et 20 mM de tampon phosphate (pH 7), ce qui correspond à une quantité de 50 ng de protéines adsorbées.

Dans un premier temps, des valeurs de S/N avec CotA adsorbée, ont été mesurées à des potentiels compris entre -0,3 et +0,3 V (vs Ag/AgCl) dans du tampon phosphate-citrate (150 mM, pH 4, contenant 100 mM de NaClO_4) (Fig. 117). Une valeur de S/N maximale de 25 est obtenue à 0 V (vs Ag/AgCl). Précédemment, il a été observé qu'avec une quantité dix fois plus importante de TvLac adsorbée (500 ng), un signal maximal dix fois plus élevé (S/N ~ 250) est mesuré à un potentiel de +0,1 V (vs Ag/AgCl). Par conséquent, une bonne corrélation peut être constatée entre les résultats obtenus avec ces deux laccases. Par ailleurs,

le décalage du potentiel optimal peut s'expliquer par le fait que le potentiel redox du centre T1 de TvLac (+0,78 V vs. NHE) est supérieur à celui du centre T1 de CotA (+0,46 V vs. NHE). Ces résultats montrent la possibilité de détecter un DET avec CotA adsorbée directement après son élution. D'autre part, nous avons pu déterminer le potentiel optimal (0 V vs Ag/AgCl) pour induire un DET avec CotA. Ce potentiel sera fixé lors des essais suivants.

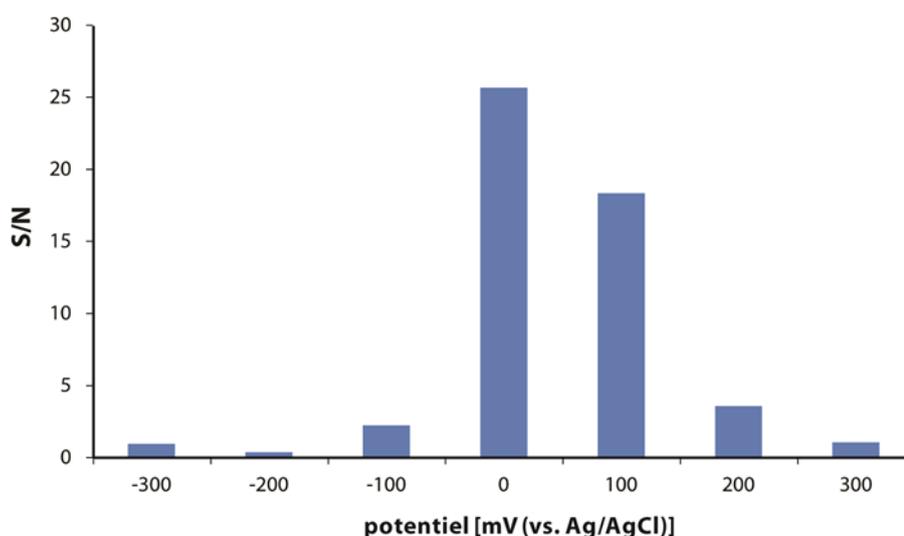


Fig. 117 : Valeurs de S/N en fonction du potentiel calculées à partir de moyennes d'intensités mesurées par IPA avant et après adsorption de 50 ng de CotA. Mesures IPA de 60 secondes réalisées avec des pulsations de 41 ms à une fréquence de 1 Hz, dans du tampon phosphate-citrate (150 mM, pH 4) contenant 100 mM de NaClO₄.

Dans un second temps, des mesures de S/N à 0 V (vs Ag/AgCl) avec la même quantité de CotA adsorbée (50 ng), sont effectuées à différent pH (gamme de pH comprise entre 2,2 et 8) (Fig. 118). Les valeurs de S/N obtenues indiquent que le pH optimal pour réaliser un DET avec CotA est d'approximativement 3,4 (S/N = 17 ± 2,82). Ce même pH est également optimal pour l'activité de CotA en solution avec l'ABTS. Par ailleurs, aucun signal significatif n'est enregistré lorsque la solution témoin est adsorbée sur les électrodes. Ces observations permettent de fixer un pH optimal (3,4) pour obtenir un DET avec CotA adsorbée. Pour TvLac, une différence de 2,2 unités de pH avait été observée entre son activité en solution avec l'ABTS (pH 3) et adsorbée sur une électrode (pH 5,2). Ces deux laccases sont donc capables d'oxyder l'ABTS au même pH. Cependant, adsorbées sur une électrode, elles ne fonctionnent pas au même pH. Il est connu que la TvLac oxyde les substrats phénoliques à des pH acides contrairement à CotA qui nécessite des pH plus basique (Enguita

et al. 2004; Madzak et al. 2006). Cette différence est liée à la présence de résidus chargés négativement (résidu acide) proches du site actif de la TvLac et absents chez CotA. La présence ou non de charges négatives modulée par le pH peut entre autres avoir une influence sur l'adsorption et l'orientation de l'enzyme et donc sur son activité bio-électrochimique.

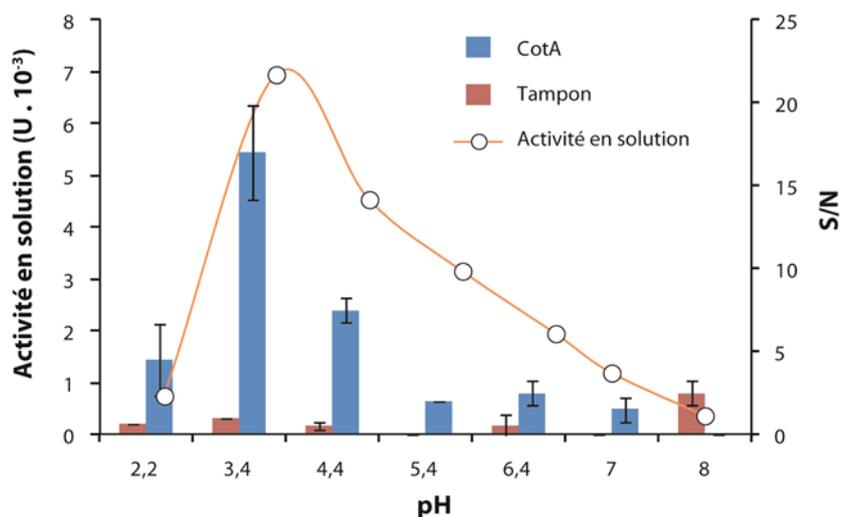


Fig. 118 : Valeurs de S/N à 0 V (vs Ag/AgCl) et activité enzymatique en solution de CotA en fonction du pH. Les valeurs de S/N sont calculées à partir de moyennes d'intensités mesurées par IPA avant et après adsorption de 50 ng de CotA ou de Tampon phosphate (20 mM, pH6, contenant 250 mM de $(NH_4)_2SO_4$). Mesures IPA de 60 secondes réalisées avec des pulsations de 41 ms à une fréquence de 1 Hz. Les activités en solution sont calculées à partir de mesure d'absorbance à 420 nm avec l'ABTS (1mM) en présence de 5 μ l de solution de CotA purifiée. Les deux types de mesures sont effectués dans des tampons phosphates citrates (150 mM contenant 100 mM de $NaClO_4$) à des pH compris entre 2,2 et 8.

Pour montrer que les signaux obtenus avec CotA sont bien liés à une activité bio-électrochimique, des mesures sont réalisées en présence d'ions fluorures (F^-) en solution dans l'électrolyte. L'ajout de cet inhibiteur diminue d'un facteur cinq le S/N avec CotA adsorbée, avec des valeurs de $25 \pm 5,65$ et de $4,5 \pm 1,32$ en absence et en présence de 5 mM de NaF (Fig. 119). Sur l'électrode nue aucun signal n'est observé en présence de NaF. Comme pour TvLac, l'ion fluorure a un effet inhibiteur sur l'activité bio-électrochimique de l'enzyme.

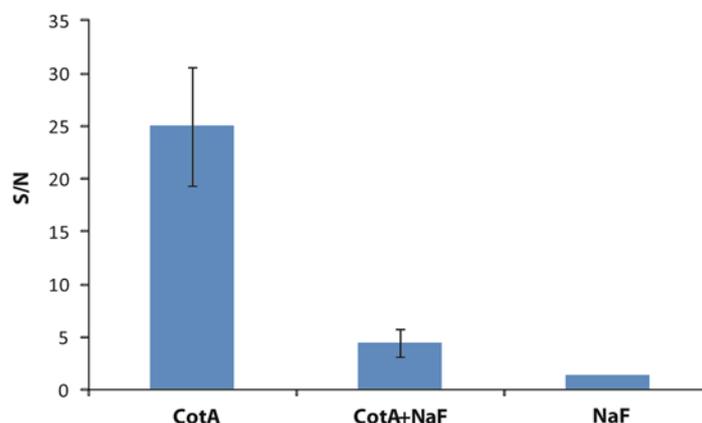


Fig. 119 : Valeurs de S/N à 0 V (vs Ag/AgCl) calculées à partir de moyennes d'intensités mesurées par IPA avant et après adsorption de 50 ng de CotA ou sur électrode nue. Mesures IPA de 60 secondes réalisées avec des pulsations de 41 ms à une fréquence de 1 Hz, dans du tampon phosphate-citrate (150 mM, pH 3,4) contenant 100 mM de NaClO₄, en présence ou en absence de 5mM de NaF.

Ces résultats ont donc montré, qu'un DET peut être aisément mesuré entre CotA et les électrodes de carbone sérigraphié des PCE. De plus, ces mesures ont été réalisées directement par adsorption sur les électrodes de l'éluat récupéré après purification, sans qu'il soit nécessaire de dessaler ou de concentrer l'échantillon. Ainsi, une connexion direct entre l'étape de purification de CotA et l'étape de criblage électrochimique est possible.

d) Evaluation au format 96 puits/colonnes

Afin d'évaluer l'ensemble des étapes expression/purification/criblage électrochimique, un premier essai de mesure sur une PCE a été effectué avec 96 éluats de CotA. Ces échantillons proviennent de 96 purifications réalisées à partir de 96 cultures induites d'une même souche pET-28b-CotA_{wt}. Après adsorption des 96 échantillons, un coefficient de variation de 53 % est calculé à partir des 96 S/N mesurés (Fig. 120). Comparé à ce qui a été obtenu avec la TvLac (22%), ce résultat montre une mauvaise reproductibilité. Plusieurs facteurs peuvent être remis en causes, notamment le manque d'optimisation de la préparation des 96 micro-colonnes de CM-Sepharose qui ont été coulées manuellement. L'écoulement des colonnes étant réalisé par gravité, il est difficile de contrôler simultanément le débit des 96 colonnes. De plus, des variations non négligeables peuvent être liées à l'usage d'électrodes de sérigraphie. Cependant, ces problèmes peuvent être résolus en revisitant l'aspect technique de chaque étape. L'usage d'automates disponibles au laboratoire permettra d'optimiser l'étape de purification.

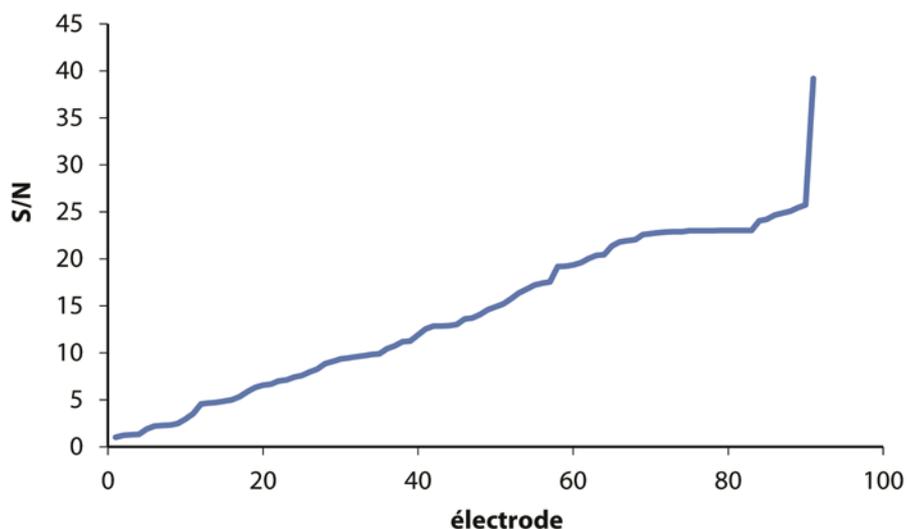


Fig. 120 : Valeurs de S/N obtenues sur 96 électrodes après adsorption de 96 éluats provenant de 96 purifications de CotA.

e) Mutagenèse aléatoire : création d'une banque de mutants

L'évolution dirigée d'une enzyme peut être réalisée grâce à plusieurs cycles de mutagenèse aléatoire (Fig. 41 page 72) afin d'accumuler un maximum de mutations bénéfiques en adéquation avec l'application ciblée. Pour cela, une banque de mutants peut être créée selon deux approches. La première consiste à introduire un grand nombre de mutations en effectuant peu de cycles de mutagenèse. Cette approche permet de créer des bibliothèques de mutants conséquentes (de l'ordre de 10^8) parmi lesquels nombreux sont inactifs ou redondants (Arnold 1998). L'avantage est qu'il est possible d'obtenir rapidement un ou des mutants d'intérêts. Cependant, les méthodes de criblage à très haut débit sont encore trop limitées pour être adaptées à des nombres de mutants aussi importants. De plus, dans un contexte bioélectronique, il serait difficile de cribler électrochimiquement de telles banques.

La seconde approche, consiste à introduire un faible nombre de mutations et de réaliser plusieurs cycles de mutagenèse. Ainsi, des banques de mutants plus petites et comptant moins de mutants inactifs et de redondances, peuvent être créées. En outre, le faible nombre de mutations permet également, en aval d'analyser de manière rationnelle la structure et le fonctionnement des mutants d'intérêt. Cette approche étant plus appropriée à notre système de criblage électrochimique, a été choisie pour produire une librairie de mutants de CotA.

Parmi les différentes techniques de mutagenèse aléatoire existantes, la PCR de basse fidélité a été utilisée pour sa facilité de mise en œuvre. En se basant sur l'évolution dirigée d'une formiate déshydrogénase réalisée par M. Bekhouche (Bekhouche 2011), ces PCR ont été effectuées avec une Taq-polymérase en présence d'ion Mn^{2+} . La Taq-polymérase étant dépourvue d'activité exonucléasique (activité correctrice ou *proof-reading*), favorise l'introduction de mutations et la présence d'ion Mn^{2+} permet de diminuer la fidélité de la polymérase. Il a été montré qu'un taux de mutation moyen de 2,5 mutations pour 1000 pb pouvait être obtenu avec cette polymérase en présence de 250 mM de $MnCl_2$. En considérant que le gène codant pour CotA est d'environ 1500 pb, deux à trois mutations aléatoires par copie pourront être introduite avec cette méthode.

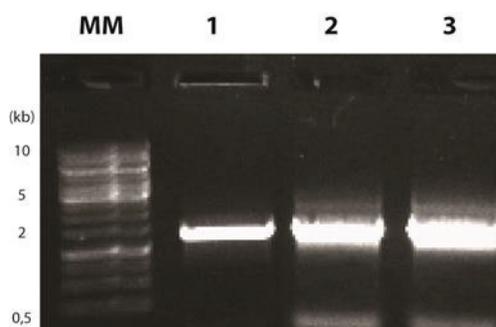


Fig. 121 : Contrôle de PCR de basse fidélité sur gel d'agarose (0,7 %). Le premier puits (MM) correspond au marqueur de taille, le puits 1 au produit de PCR en absence de Mn^{2+} , et les puits 2 et 3 à deux PCR réalisées en présence de 250 mM de Mn^{2+} .

Des PCR de basse fidélité avec la Taq-polymérase en présence de 250 mM de Mn^{2+} , ont été réalisées sur le gène sauvage de CotA ($CotA_{wt}$) contenu dans le vecteur d'expression pET-28b à l'aide de deux amorces. Des produits de PCR de 1639 pb correspondant à l'amplification du gène de CotA, sont obtenus (Fig. 121, piste 2 et 3). Ces produits de PCR sont ensuite digérés puis ligués de nouveau dans un vecteur pET-28b avec des rapports 1/0, 1/1 et 1/3 (vecteur/insert). Le premier rapport est utilisé comme témoin qui en théorie ne devrait pas donner de colonies car le vecteur a été digéré par deux enzymes de restriction différentes et non compatibles (XbaI et XhoI). Ce témoin permet d'évaluer le bruit de fond induit par les vecteurs non digérés et la religation de ceux digérés par une seule enzyme. Les produits de ligation sont ensuite utilisés pour transformer par électroporation des souches d'*E. coli* BL21 (DE3). Ces dernières sont ensuite étalées sur 22 boîtes de criblage (milieu inducteur et révélateur), dont 10 correspondent aux souches transformées par le produit de ligation de rapport 1/1, 10 autres au rapport 1/3, et 2 boîtes sont utilisées pour étaler les souches témoins (rapport 1/0). Des boîtes de criblage ont été directement utilisées afin de

créer une première banque de mutant. Après 24h d'incubation à 37°C, environ quatre colonies par boîte sont observées pour le témoin, 30 par boîte pour le rapport 1/1 et 10 par boîte pour le rapport 1/3. Après 72h, seul 1 clone positif (CotA_{M1}) est observé parmi les 20 boîtes correspondant à un rendement total de 1 mutant actif sur 400. Ce faible rendement n'a donc pas permis de créer une banque de mutant. Par ailleurs, un taux de transformation par électroporation des souches *E coli* BL21 (DE3) de 1.10^4 cfu.µg⁻¹ a été calculé au lieu de 5.10^7 cfu.µg⁻¹ indiqué par le fournisseur. Ce taux est donc 5000 fois moins important, mais cela n'explique pas pourquoi une quantité quasi nulle de mutant positif est obtenue.

Afin de vérifier la présence d'insert dans les clones obtenus sur boîte, des PCR ont été réalisées directement sur des cellules provenant de 10 colonies négatives choisies au hasard. Deux nouvelles amorces sont utilisées permettant d'amplifier un fragment d'environ 220 pb compris entre le promoteur T7 du vecteur pET-28b et les 184 premières paires de base de la séquence codant pour CotA (Fig. 122). La migration des 10 produits de PCR sur gel d'agarose (1%) permet de révéler la présence du fragment amplifié par une bande intense superposée avec celle correspondant aux amorces (au front de migration). Ainsi 7 clones sur 10 présentent cette bande (piste 1, 3, 4, 5, 6, 9, 10) tandis que les trois autres permettent seulement d'observer la bande de faible intensité correspondant aux amorces. Une deuxième bande à environ 2 kb est visible avec ces trois clones pouvant correspondre à des produits obtenus par l'hybridation non spécifique des amorces. Ainsi, on peut estimer que 70 % des clones contiennent le vecteur portant l'insert codant pour la laccase CotA. Ces résultats suggèrent que l'absence de clones positifs ne semble pas être liée à un dysfonctionnement des étapes de digestion et de ligation mais probablement à un taux de mutation trop élevé généré par la PCR de basse fidélité en présence de Mn²⁺.

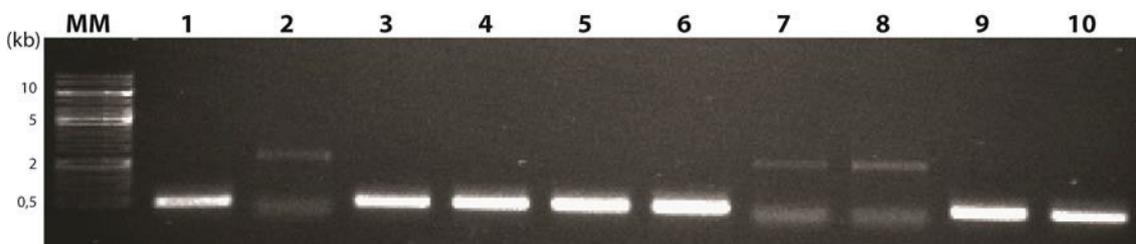


Fig. 122 : Contrôle sur gel agarose (0,7 %) des PCR réalisées sur cellules provenant de 10 colonies négatives repiquées au hasard. Le premier puits (MM) correspond au marqueur de taille, les puits 1 à 10 correspondent aux produits de PCR des 10 colonies.

Pour vérifier le taux de mutation, l'ADN plasmidique du clone positif CotA_{M1} a été séquencé. L'alignement entre la séquence codante de CotA_{wt} et celle de CotA_{M1} a permis de

dénombrer deux mutations sur 1542 pb (Fig. 123) : une transversion de purine à pyrimidine (A →C) et une transversion de pyrimidine à purine (C → G).

Cot _{A_{WT}}	ATGTCACCTTGAAAAATTTGTGGATGCTCTCCCAATCCCAGATACACTAAA	50
Cot _{A_{M1}}	ATGTCACCTTGAAAAATTTGTGGATGCTCTCCCAATCCCAGATACACTAAA	50
Cot _{A_{WT}}	GCCAGTACAGCAATCAAAGAAAAAACATACTACGAAGTCACCATGGAGG	100
Cot _{A_{M1}}	GCCAGTACAGCAATCAAAGAAAAAACATACTACGAAGTCACCATGGAGG	100
Cot _{A_{WT}}	AATGCACTCATCAGCTCCATCGCGATCTCCCTCCAACCCGCCTGTGGGGC	150
Cot _{A_{M1}}	AATGCACTCATCAGCTCCATCGCGATCTCCCTCCAACCCGCCTGTGGGGC	150
Cot _{A_{WT}}	TACAACGGCTTATTTCCGGGACCGACCATTGAGGTTAAAAGAAATGAAAA	200
Cot _{A_{M1}}	TACAACGGCTTATTTCCGGGACCGACCATTGAGGTTAAAAGAAATGAAAA	200
Cot _{A_{WT}}	CGTATATGTAAAATGGATGAATAACCTTCCTTCCACGCATTTCTTCCGA	250
Cot _{A_{M1}}	CGTATATGTAAAATGGATGAATAACCTTCCTTCCACGCATTTCTTCCGA	250
Cot _{A_{WT}}	TTGATCACACCATTTCATCACAGTGACAGCCAGCATGAAGAGCCCGAGGTA	300
Cot _{A_{M1}}	TTGATCACACCATTTCATCACAGTGACAGCCAGCATGAAGAGCCCGAGGTA	300
Cot _{A_{WT}}	AAGACTGTTGTTTCATTTACACGGCGGCGTCACGCCAGATGATAGTGACGG	350
Cot _{A_{M1}}	AAGACTGTTGTTTCATTTACACGGCGGCGTCACGCCAGATGATAGTGACGG	350
Cot _{A_{WT}}	GTATCCGGAGGCTTGGTTTTTCCAAAGACTTTGAACAAACAGGACCTTATT	400
Cot _{A_{M1}}	GTATCCGGAGGCTTGGTTTTTCCAAAGACTTTGAACAAACAGGACCTTATT	400
Cot _{A_{WT}}	TCAAAGAGAGGTTTATCATTATCCAAACCAGCAGCGCGGGGCTATATTG	450
Cot _{A_{M1}}	TCAAAGAGAGGTTTATCATTATCCAAACCAGCAGCGCGGGGCTATATTG	450
Cot _{A_{WT}}	TGGTATCACGATCACGCCATGGCGCTCACCAGGCTAAATGTCTATGCCGG	500
Cot _{A_{M1}}	TGGTATCACGATCACGCCATGGCGCTCACCAGGCTAAATGTCTATGCCGG	500
Cot _{A_{WT}}	ACTTGTCCGGTGCATATATCATTCATGACCCAAAGGAAAAACGCTTAAAAAC	550
Cot _{A_{M1}}	ACTTGTCCGGTGCATATATCATTCATGACCCAAAGGAAAAACGCTTAAAAAC	550
Cot _{A_{WT}}	TGCCTTCAGACGAATACGATGTGCCGCTTCTTATCACAGACCGCACGATC	600
Cot _{A_{M1}}	TGCCTTCAGACGAATACGATGTGCCGCTTCTTATCACAGACCGCACGATC	600
Cot _{A_{WT}}	AATGAGGATGGTTCTTTGTTTTATCCGAGCGCACCGGAAAACCTTCTCC	650
Cot _{A_{M1}}	AATGAGGATGGTTCTTTGTTTTATCCGAGCGCACCGGAAAACCTTCTCC	650
Cot _{A_{WT}}	GTCACCTGCCTAATCCTTCAATCGTTCCGGCTTTTTGCGGAGAAACCATAC	700
Cot _{A_{M1}}	GTCACCTGCCTAATCCTTCAATCGTTCCGGCTTTTTGCGGAGAAACCATAC	700
Cot _{A_{WT}}	TCGTCAACGGGAAGGTATGGCCATACTTGGAAAGTCGAGCCAAGGAAATAC	750
Cot _{A_{M1}}	TCGTCAACGGGAAGGTATGGCCATACTTGGAAAGTCGAGCCAAGGAAATAC	750
Cot _{A_{WT}}	CGATTCCGTGTCATCAACGCCTCCAATACAGAACCCTATAACCTGTCACCT	800
Cot _{A_{M1}}	CGATTCCGTGTCATCAACGCCTCCAATACAGAACCCTATAACCTGTCACCT	800
Cot _{A_{WT}}	CGATAATGGCGGAGATTTTATTCAGATTGGTTTCAGATGGAGGGCTCCTGC	850
Cot _{A_{M1}}	CGATAATGGCGGAGATTTTATTCAGATTGGTTTCAGATGGAGGGCTCCTGC	850
Cot _{A_{WT}}	CGCGATCTGTAAACTGAATTCTTTTCAGCCTTGCCTGCTGAACGTTAC	900
Cot _{A_{M1}}	CGCGATCTGTAAACTGAATTCTTTTCAGCCTTGCCTGCTGAACGTTAC	900
Cot _{A_{WT}}	GATATCATCATTGACTTCACAGCATATGAAGGAGAATCGATCATTTTGGC	950
Cot _{A_{M1}}	GATATCATCATTGACTTCACAGCATATGAAGGAGAATCGATCATTTTGGC	950
Cot _{A_{WT}}	AAACAGCGCGGGCTGCGGCGGTGACGTCAATCCTGAAACAGATGCGAATA	1000
Cot _{A_{M1}}	AAACAGCGCGGGCTGCGGCGGTGACGTCAATCCTGAAACAGATGCGAATA	1000
Cot _{A_{WT}}	TCATGCAATTCAGAGTCACAAAACCATTGGCACAAAAGACGAAAGCAGA	1050
Cot _{A_{M1}}	TCATGCAATTCAGAGTCACAAAACCATTGGCACAAAAGACGAAAGCAGA	1050
Cot _{A_{WT}}	AAGCCGAAGTACCTCGCCTCATACCCTTCGGTACAGCATGAAAGAATACA	1100
Cot _{A_{M1}}	AAGCCGAAGTACCTCGCCTCATACCCTTCGGTACAGCATGAAAGAATACA	1100
Cot _{A_{WT}}	AAACATCAGAACGTTAAACTGGCAGGCACCCAGGACGAATACGGCAGAC	1150
Cot _{A_{M1}}	AAACATCAGAACGTTAAACTGGCAGGCACCCAGGACGAATACGGCAGAC	1150
Cot _{A_{WT}}	CCGTCTTCTGCTTAATAACAAACGCTGGCAGCATCCCGTCACAGAAACA	1200
Cot _{A_{M1}}	CCGTCTTCTGCTTAATAACAAACGCTGGCAGCATCCCGTCACAGAAACA	1200

CotA _{WT}	CCAAAAGTCGGCACAACCTGAAATATGGTCCATTATCAACCCGACACGCGG	1250
CotA _{M1}	CCAAAAGTCGGCACAACCTGAAATATGGTCCATTATCAACCCGACACGCGG	1250
CotA _{WT}	AACACATCCGATCCACCTGCATCTAGTCTCCTTCCGTGTATTAGACCGGC	1300
CotA _{M1}	AACACATCCGATCCACCTGCATCTAGTCTCCTTCCGTGTATTAGACCGGC	1300
CotA _{WT}	GGCCGTTTGATATCGCCCGTTATCAAGAAAGCGGGGAATTGTCTTATACC	1350
CotA _{M1}	GGCCGTTTGATATCGCCCGTTATCAAGAAAGCGGGGAATTGTCTTATACC	1350
CotA _{WT}	GGTCCGGCTGTCCC GCCCGCCAAGTGAAAAGGGCTGGAAAGACACCAT	1400
CotA _{M1}	GGTCCGGCTGTCCC GCCCGCCAAGTGAAAAGGGCTGGAAAGACACCAT	1400
CotA _{WT}	TCAAGCGCATGCAGGTGAAGTCTGAGAATCGCGGCGACATTTCGGTCCGT	1450
CotA _{M1}	TCAAGCGCATGCAGGTGAAGTCTGAGAATCGCGGCGACATTTCGGTCCGT	1450
CotA _{WT}	ACAGCGGACGATACGTATGGCATTGCCATATTCTAGAGCATGAAGACTAT	1500
CotA _{M1}	ACAGCGGACGATACGTATGGCATTGCCATATTCTAGAGCATGAAGACTAT	1500
CotA _{WT}	GACATGATGAGACCGATGGATATAACTGATCCCCATAAATAA	1542
CotA _{M1}	GACATGATGAGACCGATGGATATAACTGATCCCCATAAATAA	1542

Fig. 123 : Alignement des séquences géniques entre le gène de CotA_{WT} et du mutant CotA_{M1}. L'alignement a été réalisé à l'aide du programme APE. Les mutations sont représentées en rouge et surlignées en bleu. Les séquences sont numérotées selon la séquence du gène de CotA_{WT} de *Bacillus subtilis* (CotA_{WT}) (entrée EMBL : GU972592). CotA_{M1} est la séquence génique du clone positif obtenu après PCR de basse de fidélité en présence de Mn²⁺.

Ces deux mutations conduisent à deux substitutions en acides aminés : la proline en position 284 est remplacée par une thréonine (P284T) et l'acide glutamique en position 380 est remplacé par une glutamine (E380Q) (Fig. 124). La première mutation P284T se situe sur le 8^{ème} brin β du domaine 2 de CotA (Fig. 125). La substitution d'une proline par une tyrosine pourrait créer de nouvelles interactions au sein de la protéine telles que la formation de liaisons hydrogène ou hydrophobes avec les résidus environnants. La deuxième mutation (E380Q) est localisée sur une boucle entre le premier et le deuxième brin β du domaine 3 et correspond à la substitution d'un acide aminé chargé négativement (l'acide aspartique) à un acide aminé polaire et non chargé (la glutamine). Cette mutation se situe à proximité de la surface et du centre T1. La perte d'une charge proche du site actif serait susceptible d'influencer l'interaction enzyme-substrat. Ces deux mutations pourraient donc induire des modifications sur la structure et l'activité de l'enzyme. Pour vérifier cela il sera nécessaire d'exprimer et caractériser cet unique mutant.

CotA _{WT}	MSLEKFVDALFIPD TLKPVQQSKEKTYEVTMEECTHQLHRDLPPTRLWGYNGLFPGP TI	60
CotA _{M1}	MSLEKFVDALFIPD TLKPVQQSKEKTYEVTMEECTHQLHRDLPPTRLWGYNGLFPGP TI	60
CotA _{WT}	EVKR NENVYVKWMNNLPSTHFLPIDHTIHHSDSQHEEPEVKTVVHLHGGVTPDDSDGYPE	120
CotA _{M1}	EVKR NENVYVKWMNNLPSTHFLPIDHTIHHSDSQHEEPEVKTVVHLHGGVTPDDSDGYPE	120
CotA _{WT}	AWFSKD FEQTGPYFKREVYHYPNQQRGAILWYHDHAMA LTRLN VYAGLVGAYIIHDPKEK	180
CotA _{M1}	AWFSKD FEQTGPYFKREVYHYPNQQRGAILWYHDHAMA LTRLN VYAGLVGAYIIHDPKEK	180
CotA _{WT}	RLKLP SDEYDV PLLITDRTINEDGSLFYPSAPENPSPSLPNP SIVPAFCGETILVNGK VW	240
CotA _{M1}	RLKLP SDEYDV PLLITDRTINEDGSLFYPSAPENPSPSLPNP SIVPAFCGETILVNGK VW	240
CotA _{WT}	PYLEVEPRKYRFRVINASNTRTYNLSLDNGGDFIQIGSDGGLLP RSVKLN SFLAPAERY	300

CotA _{M1}	PYLEVEPRKYRFRVINASNTRTYNLSLDNGGDFIQIGSDGGLL <u>T</u> RSVKLNSFSLAPAERY	300
CotA _{WT}	DIIIDFTAYEGESIIILANSAGCGDVNPETDANIMQFRVTKPLAQKDESRRPKYLASYPS	360
CotA _{M1}	DIIIDFTAYEGESIIILANSAGCGDVNPETDANIMQFRVTKPLAQKDESRRPKYLASYPS	360
CotA _{WT}	VQHERIQNIRTLKLAGTQDEYGRPVLLLNKRWHDPVTETPKVGTTEIWSIINPTRGTHP	420
CotA _{M1}	VQHERIQNIRTLKLAGTQ <u>D</u> YGRPVLLLNKRWHDPVTETPKVGTTEIWSIINPTRGTHP	420
CotA _{WT}	IHLHLVSFRVLDLRRPFDIARYQESGELSYTGPAVPPPSEKGWKDTIQAHAGEVLRIAAT	480
CotA _{M1}	IHLHLVSFRVLDLRRPFDIARYQESGELSYTGPAVPPPSEKGWKDTIQAHAGEVLRIAAT	480
CotA _{WT}	FGPYSGRYVWHCHILEHEDYDMMRPMDDITDPHK STOP	513
CotA _{M1}	FGPYSGRYVWHCHILEHEDYDMMRPMDDITDPHK STOP	513

Fig. 124 : Alignement des séquences protéiques de CotA_{WT} et de CotA_{M1} obtenue par PCR de basse fidélité en présence de 250 mM Mn²⁺. L'alignement a été réalisé sur web.expasy.org. Les mutations sont représentées en rouge et surlignées en bleu.

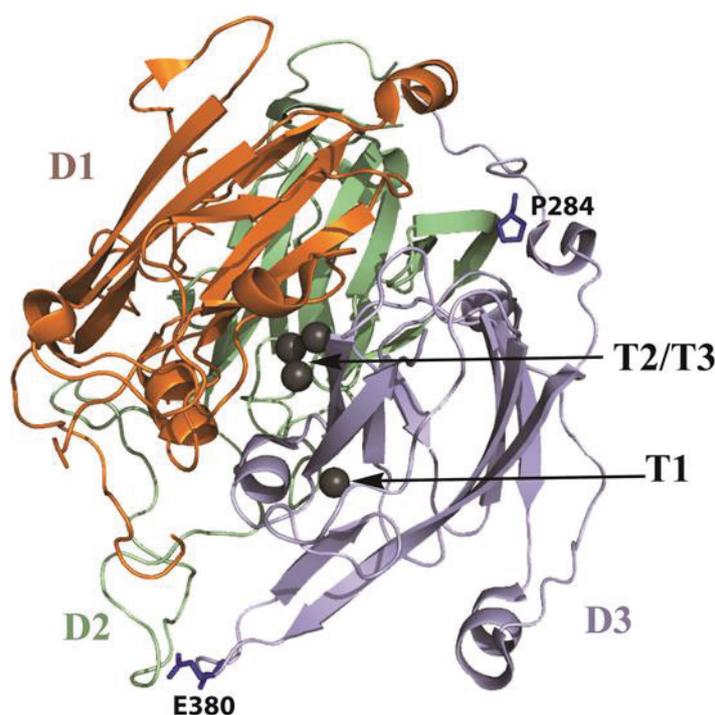


Fig. 125 : Localisation des résidus P284 et E380 dans structure de la laccase CotA (PDB : 1UVW). (D1, D2, et D3 correspondent aux trois domaines 1, 2, et 3 de l'enzyme, T1 et T2/T3 sont les deux centres redox cuivrés).

Ces conditions de PCR semblent générer peu de mutations avec un taux (2 sur 1500 pb) comparable à celui observé par Bekouche avec la FDH. Cela entre en contradiction avec le faible rendement de mutant actif (1/400). Cependant, ces essais restent préliminaires, il est donc nécessaire d'approfondir cette étude en séquençant plus de mutants. Par ailleurs, Les conditions de mutagenèse utilisées (PCR de basse fidélité en présence de 250 mM de Mn²⁺) ont pourtant déjà permis de produire des banques de mutants pour l'évolution dirigée de laccases d'origine fongique (Bulter et al. 2003; Camarero et al. 2012; Mate et al. 2013). Dans le cas de la laccase CotA, une banque de mutant avec un taux de mutation compris entre 0 et 5

mutation/kb a pu être obtenue avec un kit de mutagenèse aléatoire contenant un mélange de deux ADN polymérases modifiées (Kit Mutazyme[®] II polymerase) (Brissos et al. 2009). En dépit des résultats obtenus, les conditions de PCR de basse fidélité semblent être adaptées à la création d'une banque de mutants de CotA. Il serait donc nécessaire d'utiliser d'autres conditions de mutagenèse et de vérifier la sensibilité du protocole de criblage sur boîte de culture.

V. Conclusion

V.1. Mesure sur plaque de criblage électrochimique (PCE)

Une méthode de criblage électrochimique simple et rapide d'utilisation a été décrite. Cette méthode fonctionne avec des PCE de 96 électrodes sérigraphiées. De plus, un simple nettoyage à l'acétone régénère les plaques pour une nouvelle utilisation et ceci de manière illimitée, apportant ainsi un avantage économique. L'appareil de mesure associé à ces plaques (Andcare 9600) offre la possibilité d'effectuer simultanément sur 96 électrodes des mesures d'ampérométrie pulsée par intermittence (IPA) qui présente une sensibilité plus importante que les mesures ampérométriques classiques (Wojciechowski et al. 1999)

Les PCE ont été utilisées pour cribler une activité déshydrogénase par un transfert indirect d'électrons (MET) avec un médiateur permettant l'électro-oxydation du NADH à 0 V (*vs.* Ag/AgCl). Après avoir criblé la sensibilité au NADH de cinq médiateurs électro-greffés (le bleu de crésyl brillant (BCB), le rouge neutre (NR), la thionine (Th), le bleu de toluidine (TBO) et l'azure A (AA)), du fait de sa sensibilité, le TBO a été choisi pour cribler des activités enzymatiques. Les 96 électrodes d'une PCE ont été modifiées par l'électro-greffage de ce dernier, puis utilisées pour cribler une banque de 77 mutants de la formiate déshydrogénase. Une bonne corrélation a été obtenue entre les résultats du criblage électrochimique et ceux fournis par un criblage colorimétrique. De plus, les mesures ont été réalisées à partir de surnageants provenant directement de lysats cellulaires.

Un transfert direct d'électrons (DET) a pu être caractérisé de manière qualitative et quantitative avec la TvLac simplement adsorbée sur les électrodes des PCE. Ces dernières ont permis d'étudier et de comparer l'effet de deux inhibiteurs des laccases (l'ion fluorure et l'ion azoture) sur ce DET. D'autres mesures ont montré la nécessité d'utiliser une enzyme purifiée pour obtenir des signaux de DET significatifs et reproductibles. On a pu également évaluer l'effet de molécules interférentes susceptibles d'être co-adsorbées avec une enzyme après sa purification ou présentes dans l'électrolyte.

Ces mesures ont permis de présenter l'énorme potentiel de ce système en termes de criblage électrochimique. Par ailleurs, un dispositif de sérigraphie plus performant permettrait d'obtenir des électrodes de meilleure qualité avec une topographie plus contrôlée. L'optimisation de la sérigraphie améliorerait également la reproductibilité des mesures électrochimiques et diminuerait ainsi la valeur du coefficient de variation qui est de 15 % lorsque les mesures sont réalisées avec une espèce redox en solution (ex : ferricyanure/ferrocyanure) et de 22 % avec une espèce adsorbée (ex : la TvLac).

V.2. Protocole de criblage électrochimique pour l'évolution dirigée de la laccase CotA

Un protocole de criblage électrochimique impliquant l'usage des PCE et destinée à l'évolution dirigée de la laccase CotA a été décrit dans cette partie.

Une méthode de criblage colorimétrique sur boîte a été validée (boîte de criblage). Cette méthode permet de sélectionner directement les clones exprimant des mutants de CotA actifs avec l'ABTS, sans étapes de lyse cellulaire ni de réplication des colonies.

Un faible rendement de clones positifs a été obtenu lors d'un premier essai avec les produits de PCR de basse fidélité (1 clone positif sur 400). Cette observation reste paradoxale par rapport au faible taux de mutation généré par les conditions de PCR de basse fidélité utilisées (2 mutations/1500 pb) qui reste néanmoins à vérifier. De plus, 70 % des clones sélectionnés sur boîte de criblage portent l'insert. Ainsi rien n'explique pourquoi une quantité presque nulle de mutant positif est obtenue. Il serait donc judicieux d'une part de vérifier avec certitude le taux de mutation obtenu avec la PCR en présence de Mn^{2+} . D'autre part, des PCR de basse fidélité réalisées dans d'autres conditions devront être expérimenté (ajout d'acide acétique ou formique, concentrations de dNTP biaisées, concentrations différentes d'ion Mn^{2+}) (Motulsky 1995).

La faisabilité de l'étape d'expression et purification de CotA, a été vérifiée. Il a été montré que les fractions de purification contenant CotA peuvent être directement adsorbées sur les électrodes des PCE pour le criblage électrochimique d'un DET. Il n'est donc pas nécessaire d'employer des étapes supplémentaires tels que l'usage d'une colonne d'exclusion ou/et une étape de concentration des échantillons. Toutefois, lorsqu'un test sur 96 éluats de CotA sauvage a été réalisé, une faible reproductibilité sur les signaux électrochimiques a été constatée avec un coefficient de variation de 53 %. Il est donc important de revisiter l'aspect

technique de l'étape de purification et de contrôler la qualité des éluats obtenus sur 96 colonnes.

Conclusion générale et perspectives

Ces 30 dernières années, le développement de la bioélectronique a conduit à l'émergence d'une multitude de stratégies visant à créer et optimiser les transferts d'électrons entre des oxydoréductases et des électrodes. Parmi ces stratégies, des assemblages supramoléculaires à la surface d'électrodes sont retrouvés et permettent la formation de systèmes bio-électrochimiques immobilisés et orientés destinés à la fabrication de biocapteurs électrochimiques ou de biopiles enzymatiques. Cependant, ces assemblages présentent souvent une complexité de mise en œuvre et un coût élevé rendant ainsi difficile le passage à une échelle industrielle.

Dans ce contexte, les travaux portant sur la première partie de ma thèse ont eu pour but d'élaborer un assemblage moléculaire peu onéreux et facile à mettre en œuvre permettant l'immobilisation des cofacteurs nicotiniques sur une électrode de carbone. La finalité de cet assemblage est de concevoir une bioanode fonctionnant avec les déshydrogénases à NAD^+ par transfert indirect d'électron (MET).

Un électropolymère de bleu de toluidine (TBO) généré à la surface d'une électrode de carbone vitreux a été choisi comme structure médiatrice pour réaliser un MET avec le NADH. Ce polymère, produit par électropolymérisation du TBO, forme une surface électro-active stable permettant d'électro-oxyder complètement le NADH à des potentiels proches de 0 V et fournissant une densité de courant maximale de $329 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$.

Afin d'immobiliser le cofacteur nicotinique sur l'électropolymère de TBO, il a été nécessaire d'utiliser une molécule « *linker* ». Les acides phénylboroniques sont de bon candidat car leur fonction acide boronique est capable de s'estérifier avec les hydroxyles portés par les riboses du NAD^+ . Les substitutions (amine, thiol, halogène) sur la partie phényle peuvent être utilisées pour leur immobilisation. Des mesures de fluorescence, de SPRi et d'électrochimie ont montrées qualitativement et quantitativement qu'une surface fonctionnalisée avec ces acides permet d'immobiliser le cofacteur à pH neutre. De plus, il a également été montré que immobilisé, le cofacteur peut être à la fois électro-oxydé et réduit par une déshydrogénase en solution de manière réversible. Ces études qui étaient destinées à la caractérisation de l'immobilisation du cofacteur ont pu aussi conduire à la mise au point d'une bioanode à NAD^+ fonctionnant sans médiateur et fournissant une densité de puissance de $14 \mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$ à une tension de 690 mV.

Des stratégies ayant pour but d'intégrer ces acides phénylboroniques sur une surface portant un polymère de TBO ont été abordées. La co-électropolymérisation entre le TBO et le

3-amino-phénylboronique (3AB) a été expérimentée ainsi que le greffage direct de radicaux phénylboronates sur le polymère de TBO. Des caractérisations par impédance ont permis de valider l'immobilisation du cofacteur par la stratégie de co-polymérisation. Cependant, la présence d'acides phénylboroniques dans la composition de l'électropolymère de TBO induit la formation d'une surface inerte à l'oxydation du NADH. Par ailleurs, un nouveau médiateur capable d'immobiliser le NAD^+ a été synthétisé par un couplage simple entre le TBO et un acide phénylboronique. Un produit caractérisé par ESI^+ a été obtenu. Malgré des problèmes de purification, il a été montré qu'électropolymérisé, le produit est capable d'immobiliser le NAD^+ . Cependant, le produit n'étant pas pur, ses propriétés redox n'ont pas pu être clairement étudiées.

Mise à part l'immobilisation et l'orientation moléculaire, il existe d'autres stratégies visant à améliorer le transfert d'électrons entre une enzyme et une électrode. De nos jours, l'ingénierie des protéines est de plus en plus appliquée à la bioélectronique et vise à créer ou améliorer des biocatalyseurs pour des activités bio-électrochimiques accrues. Certaines de ces approches telles que l'évolution dirigée nécessite des outils de criblage qui sont souvent non adaptés à la bioélectronique.

Dans la deuxième partie de ma thèse, une méthode de criblage électrochimique simple et rapide d'utilisation a été présentée. Cette dernière, fonctionne avec un système capable de réaliser simultanément des mesures d'ampérométrie pulsée par intermittence (IPA) sur 96 paires d'électrodes sérigraphiées. Ces paires d'électrodes, constituées d'une électrode de travail en carbone et d'une référence en argent/chlorure d'argent (Ag/AgCl), sont portées par une plaque de circuit imprimé (PCB), l'ensemble constituant une plaque de criblage électrochimique (PCE).

L'application de ces PCE pour le criblage d'un MET avec le NADH a montré d'une part, qu'elles permettent d'évaluer simultanément sur 96 électrodes et en 1 minute les sensibilités et les limites de détections de différents médiateurs redox électro-greffés. D'autre part, ces travaux ont décrit une méthode de criblage électrochimique unique capable de mesurer des activités déshydrogénase à partir d'un milieu complexe (surnageant de lysat cellulaire). Cette capacité a permis de cribler électrochimiquement l'activité de 77 mutants de la formiate déshydrogénase en 2 minutes.

Par ailleurs, cette méthode de mesure a permis d'étudier un transfert direct d'électrons (DET) avec la laccase de *Trametes versicolore* (TvLac) simplement adsorbée sur les

électrodes de carbone. Il a été possible d'étudier ce DET à différents pH, différents potentiels et avec différentes quantités d'enzymes adsorbées. Cette méthode a également permis d'évaluer l'effet d'inhibiteurs connus des laccases (l'ion fluorure, azoture, ion chlorure) sur ce DET.

Après avoir montré l'énorme potentiel porté par ces PCE pour le criblage électrochimique, celles-ci ont été appliquées à un protocole de criblage pour l'évolution dirigée de la laccase CotA. Ce protocole est composé de quatre étapes qui consistent à cribler au format 96, des mutants produits par mutagenèse aléatoire et exprimés dans un système bactérien. Les faisabilités de ces quatre étapes ont été distinctement étudiées lors de ces travaux. Premièrement, il a été montré que la sélection de cellules exprimant une laccase active peut être réalisée sur boîte de Petri contenant un milieu inducteur et un substrat révélateur (ABTS). Deuxièmement, la faisabilité de l'étape d'expression et de purification de la laccase CotA a été vérifiée. L'expression de l'enzyme dans une souche de *E. coli* a été optimisée sur plaque 96 puits dans des volumes de culture de 1,5 ml. La purification par chromatographie échangeuse de cation (CM-Sepharose) sur micro-colonne (400 μ l) a été vérifiée pour être adaptée sur plaque contenant 96 micro-colonnes. Troisièmement, il a été montré que les éluats de purification contenant CotA peuvent être directement adsorbés sur les électrodes des PCE pour le criblage électrochimique d'un DET. Toutefois, lorsque les mesures de DET de 96 éluats de CotA provenant de l'expression d'une même souche ont été réalisées, une faible reproductibilité sur les signaux électrochimiques a été constatée avec un coefficient de variation de 53 %. Quatrièmement, des premiers essais de mutagenèse par PCR de basse fidélité ont été effectués afin de créer une première banque de mutants CotA. Cependant, cet objectif n'a pas pu être atteint à cause du faible nombre de clones positifs obtenus (1 clones positifs sur 400).

Aucun assemblage n'a pu aboutir à une bioanode fonctionnelle. Ces résultats ont néanmoins permis de décrire le comportement du NAD^+ immobilisé sur des surfaces portant des acides phénylboroniques. En perspective, il serait intéressant de tester ces surfaces avec le cofacteur immobilisé en présence de médiateurs en solution. Par ailleurs, les stratégies d'assemblages étudiées ont apporté des preuves de concepts intéressantes dans le cadre de l'immobilisation de cofacteurs nicotiniques. La co-électropolymérisation entre le TBO et un acide phénylboronique pourrait être améliorée dans de nouvelles conditions (pH, électrolyte). D'autres médiateurs sensibles au NADH tels que le bleu de méthylène ou la thionine pourront être utilisés pour réaliser cette co-électropolymérisation. Par ailleurs, la création de nouveaux médiateurs permettant d'oxyder et d'immobiliser le NADH se présente comme une voie intéressante.

Les 96 électrodes de PCE peuvent être modifiées par l'électro-greffage de différentes molécules élargissant les perspectives de criblage. Par ailleurs, Dans un système automatisé, cette méthode permettrait de cribler par MET une banque de mutants avec un débit de 1400 clones par heure. De ce fait, cet outil électrochimique serait capable de résoudre les problèmes de criblage retrouvés en bioélectronique, notamment lorsque la stratégie d'évolution dirigée est utilisée. Avec ces PCE, il serait donc possible de cribler en quelques minutes un DET dans 96 conditions différentes (électrolyte, pH, inhibiteur).

La mise au point des étapes du protocole de criblage électrochimique pour l'évolution dirigée de la laccase CotA a montré encore une fois les possibilités qu'offre l'usage des PCE. Ces travaux ont permis d'aborder les problèmes de reproductibilité de mesure du DET au sur 96 électrodes et donc de fiabilité du criblage. L'optimisation de l'aspect technique de l'étape de purification permettra de faire face à ces problèmes. Cette étape pourra être réalisée avec l'usage d'automates pour une préparation plus rigoureuse des colonnes de chromatographie et l'utilisation de système tel que des pompes à vide permettra de contrôler l'élution sur 96 colonnes. L'amélioration de la sérigraphie des PCE pourra également augmenter la fiabilité du criblage. D'autre part, les difficultés liées à la création d'une banque de mutants devront être étudiées en revisitant en profondeur chaque étape (PCR, taux de mutation, vecteur, criblage d'activité). Des PCR de basse fidélité réalisées dans d'autres conditions pourront être expérimentées (ajout d'acide acétique ou formique, concentrations de dNTP biaisées, concentrations différentes d'ion Mn^{2+}).

Ces approches d'assemblages biomoléculaires et d'évolution permettront d'obtenir des anodes et cathodes fonctionnelles qui seront idéalement assemblées pour constituer une biopile enzymatique.

Références

- Andolfi, L., D. Bruce, S. Cannistraro, G. W. Canters, J. J. Davis, H. A. O. Hill, J. Crozier, M. P. Verbeet, C. L. Wrathmell and Y. Astier (2004). "The electrochemical characteristics of blue copper protein monolayers on gold." Journal Of Electroanalytical Chemistry **565**(1): 21-28.
- Ansorge-Schumacher, M. B., H. Slusarczyk, J. Schuemers and D. Hirtz (2006). "Directed evolution of formate dehydrogenase from *Candida boidinii* for improved stability during entrapment in polyacrylamide." Febs Journal **273**(17): 3938-3945.
- Antorini, M., I. Herpoel-Gimbert, T. Choinowski, J. C. Sigoillot, M. Asther, K. Winterhalter and K. Piontek (2002). "Purification, crystallisation and X-ray diffraction study of fully functional laccases from two ligninolytic fungi." Biochimica Et Biophysica Acta-Protein Structure And Molecular Enzymology **1594**(1): 109-114.
- Arechederra, M. N., P. K. Addo and S. D. Minter (2011). "Poly(neutral red) as a NAD(+) reduction catalyst and a NADH oxidation catalyst: Towards the development of a rechargeable biobattery." Electrochimica Acta **56**(3): 1585-1590.
- Armstrong, F. A. (1990). "Probing metalloproteins by voltammetry." Structure And Bonding **72**: 137-230.
- Armstrong, F. A., N. L. Barlow, P. L. Burn, K. R. Hoke, L. J. C. Jeuken, C. Shenton and G. R. Webster (2004). "Fast, long-range electron-transfer reactions of a 'blue' copper protein coupled non-covalently to an electrode through a stilbenyl thiolate monolayer." Chemical Communications(3): 316-317.
- Armstrong, F. A., H. A. O. Hill, B. N. Oliver and N. J. Walton (1984). "Direct electrochemistry of redox proteins at pyrolytic-graphite electrodes." Journal Of The American Chemical Society **106**(4): 921-923.
- Armstrong, F. A., H. A. O. Hill and N. J. Walton (1988). "Direct electrochemistry of redox proteins." Accounts Of Chemical Research **21**(11): 407-413.
- Armstrong, F. A. and G. S. Wilson (2000). "Recent developments in faradaic bioelectrochemistry." Electrochimica Acta **45**(15-16): 2623-2645.
- Arnold, F. H. (1993). "Engineering proteins for nonnatural environments." Faseb Journal **7**(9): 744-749.
- Arnold, F. H. (1998). "Design by directed evolution." Accounts Of Chemical Research **31**(3): 125-131.
- Avigliano, L., P. Vecchini, P. Sirianni, G. Marcozzi, A. Marchesini and B. Mondovi (1983). "A reinvestigation on the quaternary structure of ascorbate oxidase from *Cucurbita pepo-medullosa*." Molecular and Cellular Biochemistry **56**(2): 107-112.
- Bahr, J. L., J. P. Yang, D. V. Kosynkin, M. J. Bronikowski, R. E. Smalley and J. M. Tour (2001). "Functionalization of carbon nanotubes by electrochemical reduction of aryl diazonium salts: A bucky paper electrode." Journal Of The American Chemical Society **123**(27): 6536-6542.
- Balland, V., C. Hureau, A. M. Cusano, Y. Liu, T. Tron and B. Limoges (2008). "Oriented immobilization of a fully active monolayer of histidine-tagged recombinant laccase on modified gold electrodes." Chemistry-A European Journal **14**(24): 7186-7192.
- Baneyx, F. (1999). "Recombinant protein expression in *Escherichia coli*." Current Opinion in Biotechnology **10**(5): 411-421.
- Bao, L. L., D. P. Sun, H. Tachikawa and V. L. Davidson (2002). "Improved sensitivity of a histamine sensor using an engineered methylamine dehydrogenase." Analytical Chemistry **74**(5): 1144-+.
- Bardea, A., E. Katz, A. F. Buckmann and I. Willner (1997). "NAD(+)-dependent enzyme electrodes: Electrical contact of cofactor-dependent enzymes and electrodes." Journal Of The American Chemical Society **119**(39): 9114-9119.

- Barton, S. C., J. Gallaway and P. Atanassov (2004). "Enzymatic biofuel cells for implantable and microscale devices." Chemical Reviews **104**(10): 4867-4886.
- Bekhouche, M. (2011). Modifications chimiques et évolution dirigée de la formiate déshydrogénase de *Candida boidinii* : vers une compréhension de la relation structure/fonction d'une déshydrogénase en liquide ionique. docteur en biochimie biochimie, Claude Bernard Lyon I.
- Benetton, X. D., S. G. Navarro-Avila and C. Carrera-Figueiras (2010). "Electrochemical evaluation of ti/tio2-polyaniline anodes for microbial fuel cells using hypersaline microbial consortia for synthetic-wastewater treatment." Journal of New Materials for Electrochemical Systems **13**(1): 1-6.
- Bento, I., L. O. Martins, G. G. Lopes, M. A. Carrondo and P. F. Lindley (2005). "Dioxygen reduction by multi-copper oxidases; a structural perspective." Dalton Transactions(21): 3507-3513.
- Berezin, I. V., V. A. Bogdanovskaia, S. D. Varfolomeev, M. R. Tarasevich and A. I. Iaropolov (1978). "Bioelectrocatalysis - equilibrium oxygen potential in presence of laccase." Doklady Akademii Nauk Sssr **240**(3): 615-618.
- Bertrand, T., C. Jolival, P. Briozzo, E. Caminade, N. Joly, C. Madzak and C. Mougin (2002). "Crystal structure of a four-copper laccase complexed with an arylamine: Insights into substrate recognition and correlation with kinetics." Biochemistry **41**(23): 7325-7333.
- Betancor, L., G. R. Johnson and H. R. Luckarift (2013). "Stabilized Laccases as Heterogeneous Bioelectrocatalysts." Chemcatchem **5**(1): 46-60.
- Bilkova, Z., M. Slovakova, A. Lycka, D. Horak, J. Lenfeld, J. Turkova and J. Churacek (2002). "Oriented immobilization of galactose oxidase to bead and magnetic bead cellulose and poly(HEMA-co-EDMA) and magnetic poly(HEMA-co-EDMA) microspheres." Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences **770**(1-2): 25-34.
- Blanford, C. F., R. S. Heath and F. A. Armstrong (2007). "A stable electrode for high-potential, electrocatalytic O₂ reduction based on rational attachment of a blue copper oxidase to a graphite surface." Chemical Communications(17): 1710-1712.
- Blum, L. J. and P. R. Coulet (1991). Biosensor principles and applications, Marcel DEKKER.
- Bond, A. M. (1994). "Chemical and electrochemical approaches to the investigation of redox reactions of simple electron-transfer metalloproteins." Inorganica Chimica Acta **226**(1-2): 293-340.
- Bradford, M. M. (1976). "Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding." Analytical Biochemistry **72**(1-2): 248-254.
- Branden, R., Malmstro.Bg and T. Vanngard (1973). "Effect of fluoride on spectral and catalytic properties of 3 copper-containing oxidases." European Journal of Biochemistry **36**(1): 195-200.
- Brissos, V., L. Pereira, F.-D. Munteanu, A. Cavaco-Paulo and L. O. Martins (2009). "Expression system of CotA-laccase for directed evolution and high-throughput screenings for the oxidation of high-redox potential dyes." Biotechnology journal **4**(4): 558-563.
- Brown, A. P. and F. C. Anson (1978). "Electron-transfer kinetics with both reactant and product attached to electrode surface." Journal Of Electroanalytical Chemistry **92**(2): 133-145.
- Bullen, R. A., T. C. Arnot, J. B. Lakeman and F. C. Walsh (2006). "Biofuel cells and their development." Biosensors & Bioelectronics **21**(11): 2015-2045.

- Bulter, T., M. Alcalde, V. Sieber, P. Meinhold, C. Schlachtbauer and F. H. Arnold (2003). "Functional expression of a fungal laccase in *Saccharomyces cerevisiae* by directed evolution." Applied and Environmental Microbiology **69**(2): 987-995.
- Call, H. P. and I. Mucke (1997). "History, overview and applications of mediated lignolytic systems, especially laccase-mediator-systems (Lignozym(R)-process)." Journal of biotechnology **53**(2-3): 163-202.
- Camarero, S., I. Pardo, A. I. Canas, P. Molina, E. Record, A. T. Martinez, M. J. Martinez and M. Alcalde (2012). "Engineering platforms for directed evolution of laccase from *Pycnoporus cinnabarinus*." Applied and Environmental Microbiology **78**(5): 1370-1384.
- Campuzano, S., R. Galvez, M. Pedero, F. J. M. de Villena and J. M. Pingarron (2002). "Preparation, characterization and application of alkanethiol self-assembled monolayers modified with tetrathiafulvalene and glucose oxidase at a gold disk electrode." Journal Of Electroanalytical Chemistry **526**(1-2): 92-100.
- Campuzano, S., M. Pedrero and J. A. Pingarron (2005). "A peroxidase-tetrathiafulvalene biosensor based on self-assembled monolayer modified Au electrodes for the flow-injection determination of hydrogen peroxide." Talanta **66**(5): 1310-1319.
- Canas, A. I. and S. Camarero (2010). "Laccases and their natural mediators: Biotechnological tools for sustainable eco-friendly processes." Biotechnology Advances **28**(6): 694-705.
- Chaubey, A. and B. D. Malhotra (2002). "Mediated biosensors." Biosensors & Bioelectronics **17**(6-7): 441-456.
- Chen, L. Q., X. E. Zhang, W. H. Xie, Y. F. Zhou, Z. P. Zhang and A. E. G. Cass (2002). "Genetic modification of glucose oxidase for improving performance of an amperometric glucose biosensor." Biosensors & Bioelectronics **17**(10): 851-857.
- Chen, P. and E. I. Solomon (2004). "Oxygen activation by the noncoupled binuclear copper site in peptidylglycine alpha-hydroxylating monooxygenase. Reaction mechanism and role of the noncoupled nature of the active site." Journal Of The American Chemical Society **126**(15): 4991-5000.
- Chen, R. J., Y. G. Zhang, D. W. Wang and H. J. Dai (2001). "Noncovalent sidewall functionalization of single-walled carbon nanotubes for protein immobilization." Journal Of The American Chemical Society **123**(16): 3838-3839.
- Chen, S. M. and K. C. Lin (2001). "The electrocatalytic properties of polymerized neutral red film modified electrodes." Journal Of Electroanalytical Chemistry **511**(1-2): 101-114.
- Chen, X. X., R. Ferrigno, J. Yang and G. A. Whitesides (2002). "Redox properties of cytochrome c adsorbed on self-assembled monolayers: A probe for protein conformation and orientation." Langmuir **18**(18): 7009-7015.
- Chi, Q. J., J. D. Zhang, J. E. T. Andersen and J. Ulstrup (2001). "Ordered assembly and controlled electron transfer of the blue copper protein azurin at gold (111) single-crystal substrates." Journal Of Physical Chemistry B **105**(20): 4669-4679.
- Chi, Q. J., J. D. Zhang, J. U. Nielsen, E. P. Friis, I. Chorkendorff, G. W. Canters, J. E. T. Andersen and J. Ulstrup (2000). "Molecular monolayers and interfacial electron transfer of *Pseudomonas aeruginosa* azurin on Au(111)." Journal Of The American Chemical Society **122**(17): 4047-4055.
- Chin, A., M. H. Hung and L. M. Stock (1981). "Reactions of benzenediazonium ions with adenine and its derivatives." Journal Of Organic Chemistry **46**(11): 2203-2207.
- Christenson, A., N. Dimcheva, E. E. Ferapontova, L. Gorton, T. Ruzgas, L. Stoica, S. Shleev, A. L. Yaropolov, D. Haltrich, R. N. F. Thorneley and S. D. Aust (2004). "Direct electron transfer between ligninolytic redox enzymes and electrodes." Electroanalysis **16**(13-14): 1074-1092.

- Cinquin, P., C. Gondran, F. Giroud, S. Mazabrard, A. Pellissier, F. Boucher, J.-P. Alcaraz, K. Gorgy, F. Lenouvel, S. Mathe, P. Porcu and S. Cosnier (2010). "A glucose biofuel cell implanted in rats." Plos One **5**(5).
- Clark, R. A. and E. F. Bowden (1997). "Voltammetric peak broadening for cytochrome c/alkanethiolate monolayer structures: Dispersion of formal potentials." Langmuir **13**(3): 559-565.
- Claus, H. (2004). "Laccases: structure, reactions, distribution." Micron **35**(1-2): 93-96.
- Coman, V., R. Ludwig, W. Harreither, D. Haltrich, L. Gorton, T. Ruzgas and S. Shleev (2010). "A Direct Electron Transfer-Based Glucose/Oxygen Biofuel Cell Operating in Human Serum." Fuel Cells **10**(1): 9-16.
- Couto, S. R. and J. L. T. Herrera (2006). "Industrial and biotechnological applications of laccases: A review." Biotechnology Advances **24**(5): 500-513.
- Cracknell, J. A., K. A. Vincent and F. A. Armstrong (2008). "Enzymes as working or inspirational electrocatalysts for fuel cells and electrolysis." Chemical Reviews **108**(7): 2439-2461.
- Cuff, M. E., K. I. Miller, K. E. van Holde and W. A. Hendrickson (1998). "Crystal structure of a functional unit from Octopus hemocyanin." Journal of Molecular Biology **278**(4): 855-870.
- Cusano, A. M., Y. Mekmouche, E. Meglec and T. Tron (2009). "Plasticity of laccase generated by homeologous recombination in yeast." Febs Journal **276**(19): 5471-5480.
- Dalmia, A., S. Wasmus, R. F. Savinell and C. C. Liu (1996). "The anodic behavior of azide ions at carbon electrodes in neutral electrolyte." Journal of the Electrochemical Society **143**(2): 556-560.
- Davis, J. J., D. Bruce, G. W. Canters, J. Crozier and H. A. O. Hill (2003). "Genetic modulation of metalloprotein electron transfer at bare gold." Chemical Communications(5): 576-577.
- Davis, K. L., B. J. Drews, H. Yue, D. H. Waldeck, K. Knorr and R. A. Clark (2008). "Electron-transfer kinetics of covalently attached cytochrome c/SAM/Au electrode assemblies." Journal Of Physical Chemistry C **112**(16): 6571-6576.
- Delamar, M., R. Hitmi, J. Pinson and J. M. Saveant (1992). "Covalent modification of carbon surfaces by grafting of functionalized aryl radicals produced from electrochemical reduction of diazonium salts." Journal Of The American Chemical Society **114**(14): 5883-5884.
- Deore, B. A., I. Yu, J. Woodmass and M. S. Freund (2008). "Conducting poly(anilineboronic acid) nanostructures: Controlled synthesis and characterization." Macromolecular Chemistry and Physics **209**(11): 1094-1105.
- Dilgin, D. G., D. Gligor, H. I. Gokcel, Z. Dursun and Y. Dilgin (2011). "Glassy carbon electrode modified with poly-Neutral Red for photoelectrocatalytic oxidation of NADH." Microchimica Acta **173**(3-4): 469-476.
- Donovan, W., L. Zheng, K. Sandman and R. Losick (1987). "Genes encoding spore coat polypeptides from *Bacillus subtilis*." Journal of Molecular Biology **196**(1): 1-10.
- Doumeche, B. and L. J. Blum (2010). "NADH oxidation on screen-printed electrode modified with a new phenothiazine diazonium salt." Electrochemistry Communications **12**(10): 1398-1402.
- Doyle, C. D., J.-D. R. Rocha, R. B. Weisman and J. M. Tour (2008). "Structure-dependent reactivity of semiconducting single-walled carbon nanotubes with benzenediazonium salts." Journal Of The American Chemical Society **130**(21): 6795-6800.
- Ducros, V., A. M. Brzozowski, K. S. Wilson, S. H. Brown, P. Ostergaard, P. Schneider, D. S. Yaver, A. H. Pedersen and G. J. Davies (1998). "Crystal structure of the type-2 Cu

- depleted laccase from *Coprinus cinereus* at 2.2 angstrom resolution." Nature Structural Biology **5**(4): 310-316.
- Dumas, C., A. Mollica, D. Feron, R. Basseguy, L. Etcheverry and A. Bergel (2007). "Marine microbial fuel cell: Use of stainless steel electrodes as anode and cathode materials." Electrochimica Acta **53**(2): 468-473.
- Durao, P., I. Bento, A. T. Fernandes, E. P. Melo, P. F. Lindley and L. O. Martins (2006). "Perturbations of the T1 copper site in the CotA laccase from *Bacillus subtilis*: structural, biochemical, enzymatic and stability studies." Journal Of Biological Inorganic Chemistry **11**(4): 514-526.
- Durao, P., Z. Chen, A. T. Fernandes, P. Hildebrandt, D. H. Murgida, S. Todorovic, M. M. Pereira, E. P. Melo and L. O. Martins (2008). "Copper incorporation into recombinant CotA laccase from *Bacillus subtilis*: characterization of fully copper loaded enzymes." Journal of Biological Inorganic Chemistry **13**(2): 183-193.
- Durao, P., Z. J. Chen, C. S. Silva, C. M. Soares, M. M. Pereira, S. Todorovic, P. Hildebrandt, I. Bento, P. F. Lindley and L. O. Martins (2008). "Proximal mutations at the type 1 copper site of CotA laccase: spectroscopic, redox, kinetic and structural characterization of I494A and L386A mutants." Biochemical Journal **412**: 339-346.
- Eddowes, M. J. and H. A. O. Hill (1977). "Novel method for investigation of electrochemistry of metalloproteins - cytochrome-c." Journal Of The Chemical Society-Chemical Communications(21): 771-772.
- Enguita, F. J., D. Marcal, L. O. Martins, R. Grenha, A. O. Henriques, P. F. Lindley and M. A. Carrondo (2004). "Substrate and doxygen binding to the endospore coat laccase from *Bacillus subtilis*." Journal Of Biological Chemistry **279**(22): 23472-23476.
- Enguita, F. J., L. O. Martins, A. O. Henriques and M. A. Carrondo (2003). "Crystal structure of a bacterial endospore coat component - A laccase with enhanced thermostability properties." Journal Of Biological Chemistry **278**(21): 19416-19425.
- Farrar, J. A., A. J. Thomson, M. R. Cheesman, D. M. Dooley and W. G. Zumft (1991). "A model of the copper centers of nitrous-oxide reductase (*Pseudomonas stutzeri*) - evidence from optical, epr and mcd spectroscopy." Febs Letters **294**(1-2): 11-15.
- Ferapontova, E. and E. Dominguez (2002). "Adsorption of differently charged forms of horseradish peroxidase on metal electrodes of different nature: effect of surface charges." Bioelectrochemistry **55**(1-2): 127-130.
- Ferapontova, E. and L. Gorton (2002). "Effect of pH on direct electron transfer in the system gold electrode-recombinant horseradish peroxidase." Bioelectrochemistry **55**(1-2): 83-87.
- Firbank, S. J., M. S. Rogers, C. M. Wilmot, D. M. Dooley, M. A. Halcrow, P. F. Knowles, M. J. McPherson and S. E. V. Phillips (2001). "Crystal structure of the precursor of galactose oxidase: An unusual self-processing enzyme." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **98**(23): 12932-12937.
- Flexer, V. and N. Mano (2010). "From dynamic measurements of, photosynthesis in a living plant to sunlight transformation into electricity." Analytical Chemistry **82**(4): 1444-1449.
- Ge, B. and F. Lisdat (2002). "Superoxide sensor based on cytochrome c immobilized on mixed-thiol SAM with a new calibration method." Analytica Chimica Acta **454**(1): 53-64.
- Givaudan, A., A. Effosse, D. Faure, P. Potier, M. L. Bouillant and R. Bally (1993). "Polyphenol oxidase in *Azospirillum-lipoferum* isolated from rice rhizosphere - evidence for laccase activity in nonmotile strains of *Azospirillum-lipoferum*." Fems Microbiology Letters **108**(2): 205-210.

- Gorton, L. and E. Dominguez (2002). "Electrocatalytic oxidation of NAD(P) H at mediator-modified electrodes." Journal of biotechnology **82**(4): 371-392.
- Gorton, L. and E. Domínguez (2002). "Electrocatalytic oxidation of NAD(P)H at mediator-modified electrodes." Reviews in Molecular Biotechnology **82**(4): 371.
- Gorton, L., A. Lindgren, T. Larsson, F. D. Munteanu, T. Ruzgas and I. Gazaryan (1999). "Direct electron transfer between heme-containing enzymes and electrodes as basis for third generation biosensors." Analytica Chimica Acta **400**: 91-108.
- Gromov, I., A. Marchesini, O. Farver, I. Pecht and D. Goldfarb (1999). "Azide binding to the trinuclear copper center in laccase and ascorbate oxidase." European Journal of Biochemistry **266**(3): 820-830.
- Grundig, B., G. Wittstock, U. Rudel and B. Strehlitz (1995). "Mediator-modified electrodes for electrocatalytic oxidation of nadh." Journal Of Electroanalytical Chemistry **395**(1-2): 143-157.
- Gueven, G., R. Prodanovic and U. Schwaneberg (2010). "Protein engineering - an option for enzymatic biofuel cell design." Electroanalysis **22**(7-8): 765-+.
- Guisseppi-Elie, A., C. H. Lei and R. H. Baughman (2002). "Direct electron transfer of glucose oxidase on carbon nanotubes." Nanotechnology **13**(5): 559-564.
- Guo, L. H. and H. A. O. Hill (1991). "Direct electrochemistry of proteins and enzymes." Advances In Inorganic Chemistry **36**: 341-375.
- Gupta, A., I. Nederlof, S. Sottini, A. W. J. W. Tepper, E. J. J. Groenen, E. A. J. Thomassen and G. W. Canters (2012). "Involvement of Tyr108 in the Enzyme Mechanism of the Small Laccase from *Streptomyces coelicolor*." Journal Of The American Chemical Society **134**(44): 18213-18216.
- Gutierrez-Sanchez, C., M. Pita, C. Vaz-Dominguez, S. Shleev and A. L. De Lacey (2012). "Gold nanoparticles as electronic bridges for laccase-based biocathodes." Journal Of The American Chemical Society **134**(41): 17212-17220.
- Hakulinen, N., L. L. Kiiskinen, K. Kruus, M. Saloheimo, A. Paananen, A. Koivula and J. Rouvinen (2002). "Crystal structure of a laccase from *Melanocarpus albomyces* with an intact trinuclear copper site." Nature Structural Biology **9**(8): 601-605.
- Halamkova, L., J. Halamek, V. Bocharova, A. Szczupak, L. Alfonta and E. Katz (2012). "Implanted Biofuel Cell Operating in a Living Snail." Journal Of The American Chemical Society **134**(11): 5040-5043.
- Harbury, H. A. (1957). "Oxidation-Reduction Potentials Of Horseradish Peroxidase." Journal Of Biological Chemistry **225**(2): 1009-1024.
- Harper, J. C., R. Polsky, D. R. Wheeler, D. M. Lopez, D. C. Arango and S. M. Brozik (2009). "A multifunctional thin film au electrode surface formed by consecutive electrochemical reduction of aryl diazonium salts." Langmuir **25**(5): 3282-3288.
- Hassler, B. L. and R. M. Worden (2006). "Versatile bioelectronic interfaces based on heterotrifunctional linking molecules." Biosensors & Bioelectronics **21**(11): 2146-2154.
- Hecht, H. J., H. M. Kalisz, J. Hendle, R. D. Schmid and D. Schomburg (1993). "Crystal-structure of glucose-oxidase from *Aspergillus niger* refined at 2.3 angstrom resolution." Journal of Molecular Biology **229**(1): 153-172.
- Heller, A. (1992). "Electrical connection of enzyme redox centers to electrodes." Journal Of Physical Chemistry **96**(9): 3579-3587.
- Heller, A. (2004). "Miniature biofuel cells." Physical Chemistry Chemical Physics **6**(2): 209-216.
- Heller, A. (2006). "Potentially implantable miniature batteries." Analytical and bioanalytical chemistry **385**(3): 469-473.

- Himmelwright, R. S., N. C. Eickman, C. D. Lubien, K. Lerch and E. I. Solomon (1980). "Chemical and spectroscopic studies of the binuclear copper active-site of neurospora tyrosinase - comparison to hemocyanins." Journal Of The American Chemical Society **102**(24): 7339-7344.
- Hosoi, K., Y. Kuriyama, S. Inagi and T. Fuchigami (2010). "Electrochemical hydroxylation of organoboron compounds." Chemical Communications **46**(8): 1284-1286.
- Hung, M. H. and L. M. Stock (1982). "The reactions of benzenediazonium ions with some purines and pyrimidines." Heterocycles **18**: 67-75.
- Igarashi, K., M. Verhagen, M. Samejima, M. Schulein, K. E. L. Eriksson and T. Nishino (1999). "Cellobiose dehydrogenase from the fungi *Phanerochaete chrysosporium* and *Humicola insolens* - A flavohemoprotein from *Humicola insolens* contains 6-hydroxy-FAD as the dominant active cofactor." Journal Of Biological Chemistry **274**(6): 3338-3344.
- Ivnitski, D., K. Artyushkova, R. A. Rincon, P. Atanassov, H. R. Luckarift and G. R. Johnson (2008). "Entrapment of enzymes and carbon nanotubes in biologically synthesized silica: Glucose oxidase-catalyzed direct electron transfer." Small **4**(3): 357-364.
- Iwata, S., C. Ostermeier, B. Ludwig and H. Michel (1995). "Structure at 2.8-angstrom resolution of cytochrome-c-oxidase from *Paracoccus denitrificans*." Nature **376**(6542): 660-669.
- Jeuken, L. J. C. and F. A. Armstrong (2001). "Electrochemical origin of hysteresis in the electron-transfer reactions of adsorbed proteins: Contrasting behavior of the "blue" copper protein, azurin, adsorbed on pyrolytic graphite and modified gold electrodes." Journal Of Physical Chemistry B **105**(22): 5271-5282.
- Jeuken, L. J. C., J. P. McEvoy and F. A. Armstrong (2002). "Insights into gated electron-transfer kinetics at the electrode-protein interface: A square wave voltammetry study of the blue copper protein azurin." Journal Of Physical Chemistry B **106**(9): 2304-2313.
- Jeuken, L. J. C., P. van Vliet, M. P. Verbeet, R. Camba, J. P. McEvoy, F. A. Armstrong and G. W. Canters (2000). "Role of the surface-exposed and copper-coordinating histidine in blue copper proteins: The electron-transfer and redox-coupled ligand binding properties of His117Gly azurin." Journal Of The American Chemical Society **122**(49): 12186-12194.
- Jocelyn, P. C. (1967). "Standard redox potential of cysteine-cystine from thiol-disulphide exchange reaction with glutathione and lipoic acid." European Journal of Biochemistry **2**(3): 327-&.
- Kaim, W. and J. Rall (1996). "Copper - A "modern" bioelement." Angewandte Chemie-International Edition In English **35**(1): 43-60.
- Karyakin, A. A., O. A. Bobrova and E. E. Karyakina (1995). "Electroreduction of NAD(+) to enzymatically active NADH at poly(neutral red) modified electrodes." Journal Of Electroanalytical Chemistry **399**(1-2): 179-184.
- Karyakin, A. A., Y. N. Ivanova and E. E. Karyakina (2003). "Equilibrium (NAD(+)/NADH) potential on poly(Neutral Red) modified electrode." Electrochemistry Communications **5**(8): 677-680.
- Karyakin, A. A., E. E. Karyakina and H. L. Schmidt (1999). "Electropolymerized azines: A new group of electroactive polymers." Electroanalysis **11**(3): 149-155.
- Karyakin, A. A., E. E. Karyakina, W. Schuhmann and H. L. Schmidt (1999). "Electropolymerized azines: Part II. In a search of the best electrocatalyst of NADH oxidation." Electroanalysis **11**(8): 553-557.
- Karyakin, A. A., A. K. Strakhova, E. E. Karyakina, S. D. Varfolomeyev and A. K. Yatsimirsky (1993). "The electrochemical polymerization of methylene-blue and

- bioelectrochemical activity of the resulting film." Bioelectrochemistry And Bioenergetics **32**(1): 35-43.
- Katz, E. and I. Willner (2003). "A biofuel cell with electrochemically switchable and tunable power output." Journal Of The American Chemical Society **125**(22): 6803-6813.
- Katz, E., I. Willner and A. B. Kotlyar (1999). "A non-compartmentalized glucose vertical bar O-2 biofuel cell by bioengineered electrode surfaces." Journal Of Electroanalytical Chemistry **479**(1): 64-68.
- Kim, S.-U., Y. J. Kim, S.-G. Choi, C.-H. Yea, R. R. Singh, J. Min, B.-K. Oh and J.-W. Choi (2008). "Direct immobilization of cupredoxin azurin modified by site-directed mutagenesis on gold surface." Ultramicroscopy **108**(10): 1390-1395.
- Klabunde, T., C. Eicken, J. C. Sacchettini and B. Krebs (1998). "Crystal structure of a plant catechol oxidase containing a dicopper center." Nature Structural Biology **5**(12): 1084-1090.
- Klonowska, A., C. Gaudin, A. Fournel, M. Asso, J. Le Petit, M. Giorgi and T. Tron (2002). "Characterization of a low redox potential laccase from the basidiomycete C30." European Journal of Biochemistry **269**(24): 6119-6125.
- Koroleva, O. V., I. S. Yavmetdinov, S. V. Shleev, E. V. Stepanova and V. P. Gavrilova (2001). "Isolation and study of some properties of laccase from the Basidiomycetes *Cerrena maxima*." Biochemistry-Moscow **66**(6): 618-622.
- Kum, M. C., K. A. Joshi, W. Chen, N. V. Myung and A. Mulchandani (2007). "Biomolecules-carbon nanotubes doped conducting polymer nanocomposites and their sensor application." Talanta **74**(3): 370-375.
- Kumar, A., Rajesh, A. Chaubey, S. K. Grover and B. D. Malhotra (2001). "Immobilization of cholesterol oxidase and potassium ferricyanide on dodecylbenzene sulfonate ion-doped polypyrrole film." Journal of Applied Polymer Science **82**(14): 3486-3491.
- Kuwana, T. and D. C. S. Tse (1978). "Electrocatalysis of nadh using quinones and modified quinone electrodes." Abstracts Of Papers Of The American Chemical Society **176**(SEP): 31-31.
- Laviron, E. (1979). "General expression of the linear potential sweep voltammogram in the case of diffusionless electrochemical systems." Journal Of Electroanalytical Chemistry **101**(1): 19-28.
- Lee, C. W., H. B. Gray, F. C. Anson and B. G. Malmstrom (1984). "Catalysis of the reduction of dioxygen at graphite-electrodes coated with fungal laccase A." Journal Of Electroanalytical Chemistry **172**(1-2): 289-300.
- Leech, D., P. Kavanagh and W. Schuhmann (2012). "Enzymatic fuel cells: Recent progress." Electrochimica Acta **84**: 223-234.
- Lewis, E. A. and W. B. Tolman (2004). "Reactivity of dioxygen-copper systems." Chemical Reviews **104**(2): 1047-1076.
- Lindgren, A., T. Larsson, T. Ruzgas and L. Gorton (2000). "Direct electron transfer between the heme of cellobiose dehydrogenase and thiol modified gold electrodes." Journal Of Electroanalytical Chemistry **494**(2): 105-113.
- Lindgren, A., L. Stoica, T. Ruzgas, A. Ciucu and L. Gorton (1999). "Development of a cellobiose dehydrogenase modified electrode for amperometric detection of diphenols." Analyst **124**(4): 527-532.
- Lotzbeyer, T., W. Schuhmann, E. Katz, J. Falter and H. L. Schmidt (1994). "Direct electron-transfer between the covalently immobilized enzyme microperoxidase mp-11 and a cystamine-modified gold electrode." Journal Of Electroanalytical Chemistry **377**(1-2): 291-294.
- Madzak, C., M. C. Mimmi, E. Caminade, A. Brault, S. Baumberger, P. Briozzo, C. Mougin and C. Jolivald (2006). "Shifting the optimal pH of activity for a laccase from the

- fungus *Trametes versicolor* by structure-based mutagenesis." Protein Engineering Design & Selection **19**(2): 77-84.
- Makino, N., P. McMahon, H. S. Mason and T. H. Moss (1974). "Oxidation-state of copper in resting tyrosinase." Journal Of Biological Chemistry **249**(19): 6062-6066.
- Malinauskas, A., T. Ruzgas and L. Gorton (2001). "Electrochemical study of glassy carbon electrodes modified with zirconium phosphate and some azine-type redox dyes." Journal of Solid State Electrochemistry **5**(4): 287-292.
- Mano, N., F. Mao and A. Heller (2003). "Characteristics of a miniature compartment-less glucose-O₂ biofuel cell and its operation in a living plant." Journal Of The American Chemical Society **125**(21): 6588-6594.
- Mano, N., V. Soukharev and A. Heller (2006). "A laccase-wiring redox hydrogel for efficient catalysis of O₂ electroreduction." Journal Of Physical Chemistry B **110**(23): 11180-11187.
- Mao, F., N. Mano and A. Heller (2003). "Long tethers binding redox centers to polymer backbones enhance electron transport in enzyme "wiring" hydrogels." Journal Of The American Chemical Society **125**(16): 4951-4957.
- Marshall, N. M., D. K. Garner, T. D. Wilson, Y.-G. Gao, H. Robinson, M. J. Nilges and Y. Lu (2009). "Rationally tuning the reduction potential of a single cupredoxin beyond the natural range." Nature **462**(7269): 113-U127.
- Martinez-Ortiz, J., R. Flores and R. Vazquez-Duhalt (2011). "Molecular design of laccase cathode for direct electron transfer in a biofuel cell." Biosensors & Bioelectronics **26**(5): 2626-2631.
- Martins, L. O., C. M. Soares, M. M. Pereira, M. Teixeira, T. Costa, G. H. Jones and A. O. Henriques (2002). "Molecular and biochemical characterization of a highly stable bacterial laccase that occurs as a structural component of the *Bacillus subtilis* endospore coat." Journal Of Biological Chemistry **277**(21): 18849-18859.
- Maryadele, J. O. (2013). The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals
- Mate, D. M., D. Gonzalez-Perez, M. Falk, R. Kittl, M. Pita, A. L. De Lacey, R. Ludwig, S. Shleev and M. Alcalde (2013). "Blood tolerant laccase by directed evolution." chemistry & biology **20**(2): 223-231.
- Matsushita, K., T. Yamashita, N. Aoki, H. Toyama and O. Adachi (1999). "Electron transfer from quinohemoprotein alcohol dehydrogenase to blue copper protein azurin in the alcohol oxidase respiratory chain of *Pseudomonas putida* HK5." Biochemistry **38**(19): 6111-6118.
- Mayer, A. M. and R. C. Staples (2002). "Laccase: new functions for an old enzyme." Phytochemistry **60**(6): 551-565.
- McGuirl, M. A. and D. M. Dooley (1999). "Copper-containing oxidases." Current Opinion in Chemical Biology **3**(2): 138-144.
- Meng, L., P. Wu, G. X. Chen, C. X. Cai, Y. M. Sun and Z. H. Yuan (2009). "Low potential detection of glutamate based on the electrocatalytic oxidation of NADH at thionine/single-walled carbon nanotubes composite modified electrode." Biosensors & Bioelectronics **24**(6): 1751-1756.
- Meredith, M. T., D. Y. Kao, D. Hickey, D. W. Schmidtke and D. T. Glatzhofer (2011). "High current density ferrocene-modified linear poly(ethylenimine) bioanodes and their use in biofuel cells." Journal of the Electrochemical Society **158**(2): B166-B174.
- Meredith, M. T. and S. D. Minteer (2012). Biofuel cells: Enhanced enzymatic bioelectrocatalysis. Annual Review of Analytical Chemistry, Vol 5. R. G. Cooks and E. S. Yeung. **5**: 157-179.

- Messerschmidt, A., R. Ladenstein, R. Huber, M. Bolognesi, L. Avigliano, R. Petruzzelli, A. Rossi and A. Finazziagro (1992). "Refined crystal-structure of ascorbate oxidase at 1.9 Å resolution." *Journal of Molecular Biology* **224**(1): 179-205.
- Miele, A., P. Giardina, E. Notomista, A. Piscitelli, G. Sannia and V. Faraco (2010). "A semi-rational approach to engineering laccase enzymes." *Molecular Biotechnology* **46**(2): 149-156.
- Moehlenbrock, M. J., T. K. Toby, A. Waheed and S. D. Minter (2010). "Metabolon catalyzed pyruvate/air biofuel cell." *Journal Of The American Chemical Society* **132**(18): 6288-+.
- Morita, K., N. Hirayama, H. Imura, A. Yamaguchi and N. Teramae (2011). "Grafting of phenylboronic acid on a glassy carbon electrode and its application as a reagentless glucose sensor." *Journal Of Electroanalytical Chemistry* **656**(1-2): 192-197.
- Motulsky, H. (1995). *Intuitive Biostatistics*.
- Naki, A. and S. D. Varfolomeev (1981). "Mechanism of the inhibition of laccase activity from *Polyporus versicolor* by halide-ions." *Biochemistry-Moscow* **46**(9): 1344-1350.
- Narvaez, A., E. Dominguez, I. Katakis, E. Katz, K. T. Ranjit, I. Ben-Dov and I. Willner (1997). "Microperoxidase-11-mediated reduction of hemoproteins: electrocatalyzed reduction of cytochrome c, myoglobin and hemoglobin and electrocatalytic reduction of nitrate in the presence of cytochrome-dependent nitrate reductase." *Journal Of Electroanalytical Chemistry* **430**(1-2): 227-233.
- Neagu, D., S. Perrino, L. Micheli, G. Palleschi and D. Moscone (2009). "Aflatoxin M-1 determination and stability study in milk samples using a screen-printed 96-well electrochemical microplate." *International Dairy Journal* **19**(12): 753-758.
- Niessen, J., U. Schroder and F. Scholz (2004). "Exploiting complex carbohydrates for microbial electricity generation - a bacterial fuel cell operating on starch." *Electrochemistry Communications* **6**(9): 955-958.
- Nunes, G. S., G. Jeanty and J. L. Marty (2004). "Enzyme immobilization procedures on screen-printed electrodes used for the detection of anticholinesterase pesticides - Comparative study." *Analytica Chimica Acta* **523**(1): 107-115.
- Ohara, T. J., R. Rajagopalan and A. Heller (1993). "Glucose electrodes based on cross-linked os(bpy)₂ (+/2+) complexed poly(1-vinylimidazole) films." *Analytical Chemistry* **65**(23): 3512-3517.
- Ohara, T. J., R. Rajagopalan and A. Heller (1994). "Wired enzyme electrodes for amperometric determination of glucose or lactate in the presence of interfering substances." *Analytical Chemistry* **66**(15): 2451-2457.
- Ortiz, R., H. Matsumura, F. Tasca, K. Zahma, M. Samejima, K. Igarashi, R. Ludwig and L. Gorton (2012). "Effect of deglycosylation of cellobiose dehydrogenases on the enhancement of direct electron transfer with electrodes." *Analytical Chemistry* **84**(23): 10315-10323.
- Ozdemir, A. and A. Tuncel (2000). "Boronic acid-functionalized HEMA-based gels for nucleotide adsorption." *Journal Of Applied Polymer Science* **78**(2): 268-277.
- Page, C. C., C. C. Moser, X. X. Chen and P. L. Dutton (1999). "Natural engineering principles of electron tunnelling in biological oxidation-reduction." *Nature* **402**(6757): 47-52.
- Palit, D. K., H. Pal, T. Mukherjee and J. P. Mittal (1990). "Photodynamics of the s₁ state of some hydroxy-substituted and amino-substituted naphthoquinones and anthraquinones." *Journal of the Chemical Society-Faraday Transactions* **86**(23): 3861-3869.
- Palmore, G. T. R., H. Bertschy, S. H. Bergens and G. M. Whitesides (1998). "A methanol/dioxygen biofuel cell that uses NAD(+)-dependent dehydrogenases as

- catalysts: application of an electro-enzymatic method to regenerate nicotinamide adenine dinucleotide at low overpotentials." Journal Of Electroanalytical Chemistry **443**(1): 155-161.
- Pan, C., Y. Fang, H. Wu, M. Ahmad, Z. Luo, Q. Li, J. Xie, X. Yan, L. Wu, Z. L. Wang and J. Zhu (2010). "Generating electricity from biofluid with a nanowire-based biofuel cell for self-powered nanodevices." Advanced Materials **22**(47): 5388-+.
- Pandey, P. C., S. Upadhyay, H. C. Pathak and C. M. D. Pandey (1998). "Sensitivity, selectivity and reproducibility of some mediated electrochemical biosensors/sensors." Analytical Letters **31**(14): 2327-2348.
- Pandey, P. C., S. Upadhyay, N. K. Shukla and S. Sharma (2003). "Studies on the electrochemical performance of glucose biosensor based on ferrocene encapsulated ORMOSIL and glucose oxidase modified graphite paste electrode." Biosensors & Bioelectronics **18**(10): 1257-1268.
- Park, D. H. and J. G. Zeikus (2003). "Improved fuel cell and electrode designs for producing electricity from microbial degradation." Biotechnology and Bioengineering **81**(3): 348-355.
- Patolsky, F., T. Gabriel and I. Willner (1999). "Controlled electrocatalysis by microperoxidase-11 and Au-nanoparticle superstructures on conductive supports." Journal Of Electroanalytical Chemistry **479**(1): 69-73.
- Petersen, A. and E. Steckhan (1999). "Continuous indirect electrochemical regeneration of galactose oxidase." Bioorganic & Medicinal Chemistry **7**(10): 2203-2208.
- Piermarini, S., L. Micheli, N. H. S. Ammida, G. Palleschi and D. Moscone (2007). "Electrochemical immunosensor array using a 96-well screen-printed microplate for aflatoxin B-1 detection." Biosensors & Bioelectronics **22**(7): 1434-1440.
- Pinczewska, A., M. Sosna, S. Bloodworth, J. D. Kilburn and P. N. Bartlett (2012). "High-throughput synthesis and electrochemical screening of a library of modified electrodes for nadh oxidation." Journal Of The American Chemical Society **134**(43): 18022-18033.
- Pinho, D., S. Besson, C. D. Brondino, E. Pereira, B. de Castro and I. Moura (2004). "Two azurins with unusual redox and spectroscopic properties isolated from the *Pseudomonas chlororaphis* strains DSM 50083(T) and DSM 50135." Journal Of Inorganic Biochemistry **98**(2): 276-286.
- Piontek, K., M. Antorini and T. Choinowski (2002). "Crystal structure of a laccase from the fungus *Trametes versicolor* at 1.90-angstrom resolution containing a full complement of coppers." Journal Of Biological Chemistry **277**(40): 37663-37669.
- Pita, M., C. Gutierrez-Sanchez, D. Olea, M. Velez, C. Garcia-Diego, S. Shleev, V. M. Fernandez and A. L. De Lacey (2011). "High redox potential cathode based on laccase covalently attached to gold electrode." Journal Of Physical Chemistry C **115**(27): 13420-13428.
- Podvorica, F. I., F. Kanoufi, J. Pinson and C. Combellas (2009). "Spontaneous grafting of diazoates on metals." Electrochimica Acta **54**(8): 2164-2170.
- Polsky, R., J. C. Harper, D. R. Wheeler, D. C. Arango and S. M. Brozik (2008). "Electrically addressable cell immobilization using phenylboronic acid diazonium salts." Angewandte Chemie-International Edition **47**(14): 2631-2634.
- Presnova, G., V. Grigorenko, A. Egorov, T. Ruzgas, A. Lindgren, L. Gorton and T. Borchers (2000). "Direct heterogeneous electron transfer of recombinant horseradish peroxidases on gold." Faraday Discussions **116**: 281-289.
- Radoi, A. and D. Compagnone (2009). "Recent advances in NADH electrochemical sensing design." Bioelectrochemistry **76**(1-2): 126-134.

- Ramasamy, R. P., H. R. Luckarift, D. M. Ivnitski, P. B. Atanassov and G. R. Johnson (2010). "High electrocatalytic activity of tethered multicopper oxidase-carbon nanotube conjugates." Chemical Communications **46**(33): 6045-6047.
- Reuillard, B., A. Le Goff, C. Agnes, A. Zebda, M. Holzinger and S. Cosnier (2012). "Direct electron transfer between tyrosinase and multi-walled carbon nanotubes for bioelectrocatalytic oxygen reduction." Electrochemistry Communications **20**: 19-22.
- Riva, S. (2006). "Laccases: blue enzymes for green chemistry." Trends in Biotechnology **24**(5): 219-226.
- Roberts, S. A., A. Weichsel, G. Grass, K. Thakali, J. T. Hazzard, G. Tollin, C. Rensing and W. R. Montfort (2002). "Crystal structure and electron transfer kinetics of CueO, a multicopper oxidase required for copper homeostasis in *Escherichia coli*." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **99**(5): 2766-2771.
- Rodgers, C. J., C. F. Blanford, S. R. Giddens, P. Skamnioti, F. A. Armstrong and S. J. Gurr (2010). "Designer laccases: a vogue for high-potential fungal enzymes?" Trends in Biotechnology **28**(2): 63-72.
- Rodkey, F. L. and E. G. Ball (1950). "Oxidation-reduction potentials of the cytochrome-c system." Journal Of Biological Chemistry **182**(1): 17-28.
- Ruzgas, T., A. Gaigalas and L. Gorton (1999). "Diffusionless electron transfer of microperoxidase-11 on gold electrodes." Journal Of Electroanalytical Chemistry **469**(2): 123-131.
- Sakai, H., T. Nakagawa, Y. Tokita, T. Hatazawa, T. Ikeda, S. Tsujimura and K. Kano (2009). "A high-power glucose/oxygen biofuel cell operating under quiescent conditions." Energy & Environmental Science **2**(1): 133-138.
- Schneider, P., M. B. Caspersen, K. Mondorf, T. Halkier, L. K. Skov, P. R. Ostergaard, K. M. Brown, S. H. Brown and F. Xu (1999). "Characterization of a *Coprinus cinereus* laccase." Enzyme and Microbial Technology **25**(6): 502-508.
- Schutte, H., J. Flossdorf, H. Sahn and M. R. Kula (1976). "Purification and properties of formaldehyde dehydrogenase and formate dehydrogenase from *Candida-boidinii*." European Journal of Biochemistry **62**(1): 151-160.
- Shin, K. S. and Y. J. Lee (2000). "Purification and characterization of a new member of the laccase family from the white-rot basidiomycete *Coriolus hirsutus*." Archives of Biochemistry and Biophysics **384**(1): 109-115.
- Shleev, S. and T. Ruzgas (2008). "Transistor-like behavior of a fungal laccase." Angewandte Chemie-International Edition **47**(38): 7270-7274.
- Shleev, S., G. Shumakovich, O. Morozova and A. Yaropolov (2010). "Stable 'floating' air diffusion biocathode based on direct electron transfer reactions between carbon particles and high redox potential laccase." Fuel Cells **10**(4): 726-733.
- Shleev, S., J. Tkac, A. Christenson, T. Ruzgas, A. I. Yaropolov, J. W. Whittaker and L. Gorton (2005). "Direct electron transfer between copper-containing proteins and electrodes." Biosensors & Bioelectronics **20**(12): 2517-2554.
- Silveira, C. M. and M. G. Almeida (2013). "Small electron-transfer proteins as mediators in enzymatic electrochemical biosensors." Analytical and bioanalytical chemistry **405**(11): 3619-3635.
- Sokic-Lazic, D., R. L. Arechederra, B. L. Treu and S. D. Minteer (2010). "Oxidation of biofuels: fuel diversity and effectiveness of fuel oxidation through multiple enzyme cascades." Electroanalysis **22**(7-8): 757-764.
- Sokic-Lazic, D. and S. D. Minteer (2009). "Pyruvate/air enzymatic biofuel cell capable of complete oxidation." Electrochemical and Solid State Letters **12**(9): F26-F28.

- Solomon, E. I., M. J. Baldwin and M. D. Lowery (1992). "Electronic-structures of active-sites in copper proteins - contributions to reactivity." Chemical Reviews **92**(4): 521-542.
- Solomon, E. I., U. M. Sundaram and T. E. Machonkin (1996). "Multicopper oxidases and oxygenases." Chemical Reviews **96**(7): 2563-2605.
- Solomon, E. I., R. K. Szilagy, S. D. George and L. Basumallick (2004). "Electronic structures of metal sites in proteins and models: Contributions to function in blue copper proteins." Chemical Reviews **104**(2): 419-458.
- Sosna, M., J.-M. Chretien, J. D. Kilburn and P. N. Bartlett (2010). "Monolayer anthracene and anthraquinone modified electrodes as platforms for *Trametes hirsuta* laccase immobilisation." Physical Chemistry Chemical Physics **12**(34): 10018-10026.
- Soukharev, V., N. Mano and A. Heller (2004). "A four-electron O₂-electroreduction biocatalyst superior to platinum and a biofuel cell operating at 0.88 V." Journal Of The American Chemical Society **126**(27): 8368-8369.
- Spadiut, O., I. Pisanelli, T. Maischberger, C. Peterbauer, L. Gorton, P. Chaiyen and D. Haltrich (2009). "Engineering of pyranose 2-oxidase: Improvement for biofuel cell and food applications through semi-rational protein design." Journal of biotechnology **139**(3): 250-257.
- Spirasolomon, D. J., M. D. Allendorf and E. I. Solomon (1986). "Low-temperature magnetic circular-dichroism studies of native laccase - confirmation of a trinuclear copper active-site." Journal Of The American Chemical Society **108**(17): 5318-5328.
- Springsteen, G. and B. H. Wang (2001). "Alizarin Red S. as a general optical reporter for studying the binding of boronic acids with carbohydrates." Chemical Communications(17): 1608-1609.
- Springsteen, G. and B. H. Wang (2002). "A detailed examination of boronic acid-diol complexation." Tetrahedron **58**(26): 5291-5300.
- Stolarczyk, K., M. Sepelowska, D. Lyp, K. Zelechowska, J. F. Biernat, J. Rogalski, K. D. Farmer, K. N. Roberts and R. Bilewicz (2012). "Hybrid biobattery based on arylated carbon nanotubes and laccase." Bioelectrochemistry **87**: 154-163.
- Sugiyama, T., Y. Goto, R. Matsumoto, H. Sakai, Y. Tokita and T. Hatazawa (2010). "A mediator-adapted diaphorase variant for a glucose dehydrogenase-diaphorase biocatalytic system." Biosensors & Bioelectronics **26**(2): 452-457.
- Tamaki, T., T. Ito and T. Yamaguchi (2007). "Immobilization of hydroquinone through a spacer to polymer grafted on carbon black for a high-surface-area biofuel cell electrode." Journal Of Physical Chemistry B **111**(34): 10312-10319.
- Tanaka, S., S. Igarashi, S. Ferri and K. Sode (2005). "Increasing stability of water-soluble PQQ glucose dehydrogenase by increasing hydrophobic interaction at dimeric interface." BMC biochemistry **6**: 1-1.
- Tarasevich, M. R. (1979). "Ways Of Using Enzymes For Acceleration Of Electrochemical Reactions." Bioelectrochemistry And Bioenergetics **6**(4): 587-597.
- Tarasevich, M. R., V. A. Bogdanovskaya and L. N. Kuznetsova (2001). "Bioelectrocatalytic reduction of oxygen in the presence of laccase adsorbed on carbon electrodes." Russian Journal Of Electrochemistry **37**(8): 833-837.
- Tarasevich, M. R., A. I. Yaropolov, V. A. Bogdanovskaya and S. D. Varfolomeev (1979). "Electrocatalysis of a cathodic oxygen reduction by laccase." Bioelectrochemistry And Bioenergetics **6**(3): 393-403.
- Tiziani, S., F. Sussich and A. Cesaro (2003). "The kinetics of periodate oxidation of carbohydrates 2. Polymeric substrates." Carbohydrate Research **338**(10): 1083-1095.
- Tkac, J., I. Vostiar, P. Gemeiner and E. Sturdik (2002). "Indirect evidence of direct electron communication between the active site of galactose oxidase and a graphite electrode." Bioelectrochemistry **56**(1-2): 23-25.

- Tsujimura, S., M. Fujita, H. Tatsumi, K. Kano and T. Ikeda (2001). "Bioelectrocatalysis-based dihydrogen/dioxygen fuel cell operating at physiological pH." Physical Chemistry Chemical Physics **3**(7): 1331-1335.
- Vanduin, M., J. A. Peters, A. P. G. Kieboom and H. Vanbekkum (1985). "Studies on borate esters .2. structure and stability of borate esters of polyhydroxycarboxylates and related polyols in aqueous alkaline media as studied by b-11 nmr." Tetrahedron **41**(16): 3411-3421.
- Verchere, J. F. and M. Hlaibi (1987). "Stability-constants of borate complexes of oligosaccharides." Polyhedron **6**(6): 1415-1420.
- Wang, J. (2001). "Glucose biosensors: 40 years of advances and challenges." Electroanalysis **13**(12): 983-988.
- Whittaker, J. W. (2003). "Free radical catalysis by galactose oxidase." Chemical Reviews **103**(6): 2347-2363.
- Widsten, P. and A. Kandelbauer (2008). "Laccase applications in the forest products industry: A review." Enzyme and Microbial Technology **42**(4): 293-307.
- Williams, D. L., A. R. Doig and A. Korosi (1970). "Electrochemical-enzymatic analysis of blood glucose and lactate." Analytical Chemistry **42**(1): 118-&.
- Willner, I. and A. Riklin (1994). "Electrical communication between electrodes and nad(p)(+)-dependent enzymes using pyrroloquinolinequinone-enzyme electrodes in a self-assembled monolayer configuration - design of a new glass of amperometric biosensors." Analytical Chemistry **66**(9): 1535-1539.
- Willner, I., Y. M. Yan, B. Willner and R. Tel-Vered (2009). "Integrated enzyme-based biofuel cells-a review." Fuel Cells **9**(1): 7-24.
- Wojciechowski, M., R. Sundseth, M. Moreno and R. Henkens (1999). "Multichannel electrochemical detection system for quantitative monitoring of PCR amplification." Clinical Chemistry **45**(9): 1690-1693.
- Wong, T. S., D. Roccatano and U. Schwaneberg (2007). "Steering directed protein evolution: strategies to manage combinatorial complexity of mutant libraries." Environmental Microbiology **9**(11): 2645-2659.
- Wong, T. S. and U. Schwaneberg (2003). "Protein engineering in bioelectrocatalysis." Current Opinion in Biotechnology **14**(6): 590-596.
- Wong, T. S., D. Zhurina and U. Schwaneberg (2006). "The diversity challenge in directed protein evolution." Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening **9**(4): 271-288.
- Wright, C. and A. G. Sykes (2001). "Autoredox interconversion of two galactose oxidase forms GOase(ox) and GOase(semi) with and without dioxygen." Inorganic Chemistry **40**(11): 2528-2533.
- Wright, C. and A. G. Sykes (2001). "Interconversion of Cu-I and Cu-II forms of galactose oxidase: comparison of reduction potentials." Journal Of Inorganic Biochemistry **85**(4): 237-243.
- Xu, F., J. J. Kulys, K. Duke, K. C. Li, K. Krikstopaitis, H. J. W. Deussen, E. Abbate, V. Galinyte and P. Schneider (2000). "Redox chemistry in laccase-catalyzed oxidation of N-hydroxy compounds." Applied and Environmental Microbiology **66**(5): 2052-2056.
- Xu, F., W. S. Shin, S. H. Brown, J. A. Wahleithner, U. M. Sundaram and E. I. Solomon (1996). "A study of a series of recombinant fungal laccases and bilirubin oxidase that exhibit significant differences in redox potential, substrate specificity, and stability." Biochimica Et Biophysica Acta-Protein Structure And Molecular Enzymology **1292**(2): 303-311.
- Yahiro, A. T., S. M. Lee and D. O. Kimble (1964). "Bioelectrochemistry .i. enzyme utilizing bio-fuel cell studies." Biochimica Et Biophysica Acta **88**(2): 375-&.

- Yan, Y. M., I. Baravik, R. Tel-Vered and I. Willner (2009). "An ethanol/O₂ biofuel cell based on an electropolymerized bilirubin oxidase/pt nanoparticle bioelectrocatalytic o₂-reduction cathode." Advanced Materials **21**(42): 4275-+.
- Yang, D.-W. and H.-H. Liu (2009). "Poly(brilliant cresyl blue)-carbonnanotube modified electrodes for determination of NADH and fabrication of ethanol dehydrogenase-based biosensor." Biosensors & Bioelectronics **25**(4): 733-738.
- Yaropolov, A. I., A. N. Kharybin, J. Emneus, G. MarkoVarga and L. Gorton (1996). "Electrochemical properties of some copper-containing oxidases." Bioelectrochemistry And Bioenergetics **40**(1): 49-57.
- Yaropolov, A. I., O. V. Skorobogatko, S. S. Vartanov and S. D. Varfolomeyev (1994). "Laccase - properties, catalytic mechanism, and applicability." Applied Biochemistry and Biotechnology **49**(3): 257-280.
- Yaropolov, A. I., M. R. Tarasevich and S. D. Varfolomeev (1978). "Electrochemical properties of peroxidase." Bioelectrochemistry And Bioenergetics **5**(1): 18-24.
- Yeh, P. and T. Kuwana (1977). "Reversible electrode-reaction of cytochrome-c." Chemistry Letters(10): 1145-1148.
- Yu, E. H., R. Prodanovic, G. Gueven, R. Ostafe and U. Schwaneberg (2011). "Electrochemical oxidation of glucose using mutant glucose oxidase from directed protein evolution for biosensor and biofuel cell applications." Applied Biochemistry and Biotechnology **165**(7-8): 1448-1457.
- Zaitseva, I., V. Zaitsev, G. Card, K. Moshkov, B. Bax, A. Ralph and P. Lindley (1996). "The X-ray structure of human serum ceruloplasmin at 3.1 angstrom: Nature of the copper centres." Journal of Biological Inorganic Chemistry **1**(1): 15-23.
- Zamocky, M., R. Ludwig, C. Peterbauer, B. M. Hallberg, C. Divne, P. Nicholls and D. Haltrich (2006). "Cellobiose dehydrogenase - A flavocytochrome from wood-degrading, phytopathogenic and saprotropic fungi." Current Protein & Peptide Science **7**(3): 255-280.
- Zayats, M., E. Katz, R. Baron and I. Willner (2005). "Reconstitution of apo-glucose dehydrogenase on pyrroloquinoline quinone-functionalized Au nanoparticles yields an electrically contacted biocatalyst." Journal Of The American Chemical Society **127**(35): 12400-12406.
- Zayats, M., E. Katz and I. Willner (2002). "Electrical contacting of flavoenzymes and NAD(P)(+)-dependent enzymes by reconstitution and affinity interactions on phenylboronic acid monolayers associated with Au-electrodes." Journal Of The American Chemical Society **124**(49): 14724-14735.
- Zayats, M., A. B. Kharitonov, E. Katz, A. F. Buckmann and I. Willner (2000). "An integrated NAD(+)-dependent enzyme-functionalized field-effect transistor (ENFET) system: development of a lactate biosensor." Biosensors & Bioelectronics **15**(11-12): 671-680.
- Zebda, A., C. Gondran, A. Le Goff, M. Holzinger, P. Cinquin and S. Cosnier (2011). "Mediatorless high-power glucose biofuel cells based on compressed carbon nanotube-enzyme electrodes." Nature Communications **2**.
- Zhang, J., Q. Chi, A. M. Kuznetsov, A. G. Hansen, H. Wackerbarth, H. E. M. Christensen, J. E. T. Andersen and J. Ulstrup (2002). "Electronic properties of functional biomolecules at metal/aqueous solution interfaces." Journal Of Physical Chemistry B **106**(6): 1131-1152.
- Zhang, X. C., A. Ranta and A. Halme (2006). "Direct methanol biocatalytic fuel cell - Considerations of restraints on electron transfer." Biosensors & Bioelectronics **21**(11): 2052-2057.

- Zhang, Y., G. Mo, X. Li, W. Zhang, J. Zhang, J. Ye, X. Huang and C. Yu (2011). "A graphene modified anode to improve the performance of microbial fuel cells." Journal of Power Sources **196**(13): 5402-5407.
- Zheng, H., J. Zhou, J. Zhang, R. Huang, H. Jia and S.-i. Suye (2009). "Electrical communication between electrode and dehydrogenase by a ferrocene-labeled high molecular-weight cofactor derivative: application to a reagentless biosensor." Microchimica Acta **165**(1-2): 109-115.
- Zhu, Z., M. Wang, A. Gautam, J. Nazor, C. Momeu, R. Prodanovic and U. Schwaneberg (2007). "Directed evolution of glucose oxidase from *Aspergillus niger* for ferrocenemethanol-mediated electron transfer." Biotechnology journal **2**(2): 241-248.
- Zhu, Z. W., C. Momeu, M. Zakhartsev and U. Schwaneberg (2006). "Making glucose oxidase fit for biofuel cell applications by directed protein evolution." Biosensors & Bioelectronics **21**(11): 2046-2051.
- Zimmermann, H., A. Lindgren, W. Schuhmann and L. Gorton (2000). "Anisotropic orientation of horseradish peroxidase by reconstitution on a thiol-modified gold electrode." Chemistry-A European Journal **6**(4): 592-599.

Annexes

Annexe I : Séquence du gène de CotA (en gras) dans le plasmide pET-28b

Annexe II : Publications

Annexe I : Séquence du gène de CotA (en gras) dans le plasmide pET-28b.

.....gcccgaagtggcgagcccgatcttccccatcgggtgatgtcggcgatataggcgcagcaaccgcacctgt
ggcgccggtgatgcccggccacgatgcggtccggcgtagaggatcgAGATCTcgatcccgcgaaatTAATACGACTC
ACTATAgggggaattgtgagcggataacaatTCCCCCTCTAGATAataattttgtttaactttaagAAGGAGATATACC
ATGTCACCTTGAAAAATTTGTGGATGCTCTCCCAATCCCAGATACACTAAAGCCAGTACAGCAATCAAAAGAAAA
ACATACTACGAAGTCACCATGGAGGAATGCACTCATCAGCTCCATCGCGATCTCCCTCCAACCCGCCTGTGGGGC
TACAACGGCTTATTTCCGGGACCGACCATTGAGGTTAAAAGAAATGAAAACGTATATGTAATAATGGATGAATAAC
CTTCCTTCCACGCATTTCTTCCGATTGATCACACCATTTCATCACAGTGACAGCCAGCATGAAGAGCCCGAGGTA
AAGACTGTTGTTTCAATTTACACGGCGGCGTCACGCCAGATGATAGTGACGGGTATCCGGAGGCTTGGTTTTCCAAA
GACTTTGAACAAACAGGACCTTATTTCAAAGAGAGGTTTATCATTATCCAAACCAGCAGCGCGGGGCTATATTG
TGGTATCACGATCACGCCATGGCGCTCACCAGGCTAAATGTCTATGCCGGACTTGTCGGTGCATATATCATTCAT
GACCCAAAGGAAAAACGCTTAAACTGCCTTCAGACGAATACGATGTGCCGCTTCTTATCACAGACCGCACGATC
AATGAGGATGGTTCTTTGTTTTATCCGAGCGCACCGGAAAACCTTCTCCGTCACCTGCCTAATCCTTCAATCGTT
CCGGCTTTTTGCGGAGAAACCATACTCGTCAACGGGAAGGTATGGCCATACTTGAAGTCGAGCCAAGGAAATAC
CGATTCCGTGTCATCAACGCCTCCAATACAAGAACCTATAACCTGTCACCTCGATAATGGCGGAGATTTTATTCAG
ATTGGTTCAGATGGAGGGCTCCTGCCGCGATCTGTTAAACTGAATTCCTTTTCAGCCTTGCGCCTGCTGAACGTTAC
GATATCATCATTGACTTCACAGCATATGAAGGAGAATCGATCATTTTGGCAAACAGCGCGGGCTGCGGCGGTGAC
GTCAATCCTGAAACAGATGCGAATATCATGCAATTCAGAGTCACAAAACCATTTGGCACAAAAAGACGAAAGCAGA
AAGCCGAAGTACCTCGCCTCATACCCTTCGGTACAGCATGAAAGAATACAAAACATCAGAAGCTTAAACTGGCA
GGCACCCAGGACGAATACGGCAGACCCGTCCTTCTGCTTAATAACAAACGCTGGCACGATCCCGTCACAGAAACA
CCAAAAGTCGGCACAACTGAAATATGGTCCATTATCAACCCGACACGCGGAACACATCCGATCCACCTGCATCTA
GTCTCCTTCCGTGTATTAGACCGGCGGCCGTTTGATATCGCCGTTATCAAGAAAGCGGGGAATTGTCTTATACC
GGTCCGGCTGTCCCGCCGCCCAAGTGAAGGGGCTGGAAAGACACCATTCAAGCGCATGCAGGTGAAGTCCTG
AGAATCGCGGCGACATTCCGGTCCGTACAGCGGACGATACGTATGGCATTGCCATATTCTAGAGCATGAAGACTAT
GACATGATGAGACCGATGGATATAACTGATCCCCATAAATAAgcgggccgcaCTCGAGcaccaccaccaccaccac
tGAGATCCGGCTGCTAACAAGcccgaaaggaagctgaggttggtgctgcccaccgctgagcaataactagcataa
ccccttggggcctctaaacgggtcttgaggggttttttctgaaaggaggaactatatccggat.....

- Promoteur T7
- Termineur T7
- Site BglII
- Site XbaI
- Site XhoI
- Séquence de Shine-Dalgarno

Taille des fragments d'ADN plasmidique :

- pET-28b : 5368 pb
- pET-28b-CotA_{wt} : 6910 pb

Amorces :

- A-NheI

5'-TCCCCGCTAGCATAATTTGTTTAACTTTAAGAAGGAG-3'

- A-XhoI

5'-TGTTAGCAGCCGGATCTC-3'

Déshydrogénases et laccases sur des surfaces redox : vers des applications en bioélectronique.

Afin de concevoir une bioanode fonctionnant avec les déshydrogénases à NAD^+ , un assemblage moléculaire permettant l'immobilisation des cofacteurs nicotiniques sur une électrode de carbone a été étudié. Un électropolymère de bleu de toluidine O (TBO) généré à la surface d'une électrode de carbone vitreux a été choisi comme électrocatalyseur pour réaliser l'oxydation du NADH par transfert indirect d'électron (MET). Afin d'immobiliser le cofacteur nicotinique sur l'électropolymère de TBO, l'acide 3-aminophénylboronique (3AB) a été utilisé comme molécule « linker ». Des mesures par imagerie de résonance plasmonique de surface (SPRi) et électrochimiques ont été réalisées sur des électrodes d'or modifiées par l'électro-greffage de 3AB préalablement diazotés. Ces électrodes sont capables d'immobiliser le NAD^+ avec une densité moléculaire de $0,3 \pm 0,03 \text{ pmol.mm}^{-2}$. Des mesures de voltammétrie linéaire ont montré qu'en présence de formiate déshydrogénase et de formiate, ces électrodes fournissent une densité de puissance de $14 \mu\text{W.cm}^{-2}$ à $+690 \text{ mV}$ (vs. Ag/AgCl).

Une méthode de criblage électrochimique permettant de mesurer des activités oxydoreductases à par la suite été développée. Cette méthode utilise un système capable d'effectuer simultanément des mesures ampérométriques pulsées par intermittence (IPA) sur 96 électrodes de carbone sérigraphiées sur une plaque de circuit imprimé. Il a été utilisé pour cribler par MET l'oxydation du NADH à l'aide de médiateurs redox de type phénazine électro-greffés. La sensibilité au NADH est de $3586 \pm 164 \text{ nA.mM}^{-1}$ pour le TBO électro-greffé. Ce dernier a été utilisé pour cribler une banque de mutants de la formiate déshydrogénase. Une valeur de p inférieure à 0,001 (p -value $< 0,001$, $n = 77$) a permis de montrer une forte corrélation entre le crible électrochimique et le crible colorimétrique réalisé en présence du couple PES/NBT (Phénazine Ethosulfate/Nitrobleu de tétrazolium). Cette méthode a également permis de mesurer le transfert direct d'électrons (DET) avec la laccase de *Trametes versicolor* (TvLac) adsorbée sur les 96 électrodes de carbone avec un coefficient de variation de 22%. Ce DET peut être mesuré à $+100 \text{ mV}$ (vs. Ag/AgCl) à un pH de 5,4 avec une gamme linéaire de TvLac adsorbé comprise entre 0,5 et 75 ng (correspondant à une activité enzymatique de $62 \cdot 10^{-6}$ et $9,37 \cdot 10^{-3} \text{ U}$) et une sensibilité de $3027 \mu\text{g}^{-1}$. Cette méthode a également été utilisée pour évaluer l'effet inhibiteur du fluorure (F^-) et à l'azote (N_3^-) sur ce DET avec des valeurs d' IC_{50} de $280 \pm 14 \mu\text{M}$ et $1,2 \pm 0,4 \mu\text{M}$. La validation de cette étude a permis par la suite d'initier la mise en place d'un protocole de criblage pour l'évolution dirigée de la laccase CotA de *Bacillus subtilis*.

Dehydrogenases and laccases on the redox surfaces: toward applications in bioelectronic.

In order to design a bioanode working with NAD^+ -dependent-dehydrogenases, we have studied a molecular assembly on carbon electrodes allowing for the immobilization of nicotinic cofactors. An electropolymer of toluidin blue O (TBO) formed at the surface of vitreous carbon electrodes was used as an electrocatalyst to induce NADH oxidation by Mediated Electron Transfer (MET). In an effort to immobilize the nicotinic cofactor on the TBO electropolymer, the 3-aminophenylboronic acid (3AB) was used as a linker molecule. Surface plasmon resonance imaging (SPRi) and electrochemistry measures were carried out on gold electrodes modified by electrografted 3AB previously diazotized. These electrodes are able to immobilize the NAD^+ with a molecular density of $0.3 \pm 0.03 \text{ pmol.mm}^{-2}$. The linear voltammetry measures have shown that in presence of formate dehydrogenase (FDH) and formate, these electrodes provide a power density of $14 \mu\text{W.cm}^{-2}$ at $+690 \text{ mV}$ (vs. Ag/AgCl).

Next, an electrochemistry method enabling the measurement of oxidoreductase activities was developed. This method works with a device able to perform simultaneously intermittent pulse amperometry (IPA) on 96 screen-printed carbon electrodes. This device was used for the NADH oxidation by MET using electrografted redox phenazine mediators. The electrografted TBO had a NADH sensibility of $3586 \pm 164 \text{ nA.mM}^{-1}$. This construct was used to screen a library of FDH mutants. A p -value lower than 0.001 (p -value $< 0,001$, $n = 77$) showed a high correlation between the results obtained via electrochemical screening and colorimetric screening using PES/NBT couple (Phénazine Ethosulfate/Nitrobleu de tétrazolium). This method was also used to measure the Direct Electron Transfer (DET) with the laccase from *Trametes versicolor* (TvLac) adsorbed onto 96 carbon electrodes with a coefficient of variation of 22%. This DET can be measured at $+100 \text{ mV}$ (vs. Ag/AgCl) and at pH 5.4 with a linear range of adsorbed TvLac between 0.5 ng and 75 ng (corresponding to an enzymatic activity of $62 \cdot 10^{-6} \text{ U}$ et $9.37 \cdot 10^{-3} \text{ U}$) and a sensibility of $3027 \mu\text{g}^{-1}$. In addition, this electrochemical device was used to evaluate the inhibitor effect of the DET of fluoride (F^-) and azide (N_3^-) yielding IC_{50} values of $280 \pm 14 \mu\text{M}$ et $1.2 \pm 0.4 \mu\text{M}$. The validation of this study has subsequently allowed to initiate the establishment of a protocol screening for the directed evolution of CotA laccase from *Bacillus subtilis*.

Discipline : Biochimie

Mots-clés : Bioélectronique, Biopile, Déshydrogénase, Laccases, Criblage, Bio-électrochimie, Evolution dirigée, Evolution dirigée

**Laboratoire de Génie Enzymatique Membrane Biomimétique et Assemblages Supramoléculaires (GEMBAS)
Institut de Chimie et Biochimie Moléculaire et Supramoléculaire (ICBMS)
UMR Université Claude Bernard Lyon 1 – CNRS 5246
Bâtiment Curien, 43 bd du 11 novembre 1918, 69622 Villeurbanne Cedex, France**