

INSTITUT DE SCIENCE ET D'INGENIERIE SUPRAMOLECULAIRES

LABORATOIRE DE BIOLOGIE CHIMIQUE (Prof. Andrew Griffiths)

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE STRASBOURG

Spécialité : Sciences chimiques

présentée par :

Thomas BENEYTON

pour obtenir le grade de DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE STRASBOURG

Sujet de la thèse :

**Evolution dirigée et biopile enzymatique : étude
de la laccase CotA et optimisation par évolution
dirigée en microfluidique digitale**

soutenue le 8 décembre 2011 devant le jury composé de :

Prof. Philippe MINARD	Rapporteur
Prof. Jérôme BIBETTE	Rapporteur
Prof. Petra HELLWIG	Examineur
Dr. Daniel RIVELINE	Examineur
Dr. Jean-Christophe BARET	Examineur
Dr. Valérie TALY	Directeur de thèse

Remerciements

Il y a trois ans, après m'être spécialisé en chimie organique lors de mon cursus ingénieur chimiste, mon objectif était de changer complètement de domaine afin de diversifier mes compétences et de me réorienter vers les biotechnologies. Ces travaux de doctorat, alliant biologie, microfluidique et électrochimie des protéines, répondaient ainsi à mes attentes. Je n'aurais jamais pu les entreprendre sans le soutien et l'aide d'un grand nombre de personnes. J'aimerais donc exprimer ma vive reconnaissance à toutes les personnes ayant contribué, de près ou de loin, à la réalisation de ce projet.

Je souhaiterais tout d'abord remercier profondément Andrew Griffiths pour m'avoir ouvert la porte de son laboratoire, ainsi que pour sa constante disponibilité. Les discussions scientifiques que nous avons partagées et son incroyable aptitude à motiver m'ont été précieuses.

Je remercie grandement mon directeur de thèse Valérie Taly pour m'avoir accordé sa confiance pour la réalisation de ce projet, pour avoir pris en charge les démarches de demande financement, et surtout pour son encadrement scientifique et humain et toute son énergie.

Je tiens ensuite à remercier tout particulièrement Antoine Drevelle qui a toujours su être à l'écoute et a pris le temps de répondre avec pertinence à mes questions scientifiques et pratiques, notamment concernant la biologie moléculaire et la biochimie. Merci également pour avoir eu la gentillesse de relire et critiquer mon manuscrit de thèse, pour m'avoir considérablement aidé pour les figures de protéines ainsi que pour sa bonne humeur et ses barbecues en famille.

J'aimerais aussi remercier l'ADEME pour avoir décidé de financer le projet ainsi que Karine Filmon, ingénieur ADEME, pour avoir surveillé l'avancement des travaux et veillé à ce que cette thèse se déroule dans de bonnes conditions.

Je tiens également à remercier profondément Jean Christophe Baret et Faith Coldren pour leur expertise en microfluidique ainsi que Abdeslam El Harrak pour ses conseils avisés et son soutien concernant la partie électrochimique du projet. Merci à Felix Kleinschmidt pour m'avoir initié aux joies de la lithographie et du travail en salle blanche.

Un grand merci à Chaouki Ben Salem pour sa rigueur et son précieux travail en salle blanche, à Jean-François Bartolo pour la synthèse des tensioactifs perfluorés et surtout sa joie de vivre et son rire communicatif et enfin à Majdi Najah pour avoir si souvent fait rire Jean-François.

Je tiens ensuite à remercier l'ensemble des membres du Laboratoire de Biologie Chimique au sein duquel j'ai apprécié évoluer pendant trois ans. Les années passées dans ce laboratoire furent très riches scientifiquement et culturellement. Merci en particulier à Isabelle, sans qui le laboratoire ne

pourrait fonctionner. Merci à Putu pour son aide concernant le prototype de biopile microfluidique. Merci à Michaël pour ses conseils et sa franchise. Enfin un grand merci aux deux personnes ayant successivement partagé mon bureau, Felix et Chaouki : merci pour m'avoir supporté et soutenu dans les hauts (ça marche !) comme dans les bas (ça ne marche toujours pas !) et surtout pour avoir supporté ma musique au quotidien.

J'aimerais aussi exprimer toute ma gratitude et ma reconnaissance aux rapporteurs Philippe Minard et Jérôme Bibette ainsi qu'aux examinateurs Petra Hellwig, Daniel Riveline et Jean-Christophe Baret pour avoir généreusement accepté de consacrer du temps à l'évaluation de ce travail.

Je tiens également à remercier les membres du laboratoire "Analytische Chemie – Elektroanalytik & Sensorik" à l'Université de la Ruhr et en particulier Yvonne Beyl, Dimitrii Guschin et Wolfgang Schuhmann pour m'avoir accueilli lors de notre fructueuse collaboration.

Merci à ma famille pour leur confiance et leur soutien quotidien depuis le début de mes études.

Merci à tous mes amis qui ont toujours été là pour me distraire et m'encourager.

Je tiens pour finir à remercier infiniment, éperdument, Marion pour avoir traversé ces trois ans à mes côtés, pour m'avoir supporté et soutenu en toutes circonstances, et ce jusqu'au bout tout en gardant, ou presque, son calme.

Merci.

Avant-propos

Les piles à combustible figurent parmi les technologies vertes émergentes et prometteuses de production ponctuelle d'électricité renouvelable. La technologie de biopile enzymatique, mettant en jeu des enzymes à la place de catalyseurs inorganiques, a vu le jour dans le but de développer des piles miniatures moins coûteuses fonctionnant dans des conditions douces, potentiellement physiologiques. Cette technologie, encore naissante, ne rivalise pas avec les piles à combustible classiques en terme de puissance et de durée de vie et les biopiles enzymatiques sont à ce jour considérées pour des niches écologiques nécessitant l'utilisation de sources d'électricité miniatures peu puissantes (électronique portable, biocapteurs, implants médicaux...).

L'amélioration des performances des biopiles enzymatiques (puissance et durée de vie) constitue un défi majeur. Bien que l'optimisation des propriétés catalytiques ou de stabilité des enzymes permette intrinsèquement l'amélioration des performances des biopiles enzymatiques, cette stratégie a été peu utilisée par rapport aux techniques visant à optimiser l'environnement des enzymes à la surface des électrodes. Le peu d'exemples présents dans la littérature impliquent majoritairement des designs rationnels ou semi-rationnels des biocatalyseurs et l'évolution dirigée des protéines n'a jamais été utilisée pour de telles applications.

La laccase bactérienne extrémophile CotA de *Bacillus subtilis* possède des propriétés de stabilité très intéressantes pour des applications en biopile enzymatique. Les travaux de doctorat présentés ici ont pour objectif, dans un premier temps, d'utiliser pour la première fois cette enzyme en tant que biocatalyseur cathodique et, dans un second temps, d'optimiser ses performances par évolution dirigée en utilisant la technologie de microfluidique digitale.

La microfluidique digitale permet la création et la manipulation de microgouttelettes aqueuses de tailles particulièrement homogènes. Cette technologie récente fournit un outil puissant de micro-compartmentation pouvant permettre de relier génotype et phénotype lors d'expériences d'évolution dirigée. Ces travaux de doctorat ont pour objectif d'utiliser la microfluidique digitale pour développer une plateforme de criblage à très haut débit dédiée à l'évolution dirigée de la laccase CotA.

Sommaire

Remerciements	iii
Avant-propos	v
Liste des abréviations	xi
Introduction	1
1 Les biopiles enzymatiques	1
1.1 Les piles à combustible	1
1.2 Les piles à combustible biologiques	3
1.2.1 Généralités	3
1.2.2 Les biopiles enzymatiques	4
1.2.3 Les différents types de transfert d'électrons	7
1.2.3.1 Le transfert d'électrons direct (DET)	7
1.2.3.2 Le transfert d'électrons indirect (MET)	11
1.2.4 Les facteurs influençant les performances d'une biopile enzymatique	15
1.2.4.1 L'efficacité de la biopile enzymatique	15
1.2.4.2 La durée de vie de la biopile enzymatique	16
1.2.5 Les enzymes cathodiques : le cas des "multicopper oxidase"	17
1.2.5.1 Présentation	17
1.2.5.2 L'enzyme modèle choisie : la laccase CotA de <i>Bacillus subtilis</i>	20
1.2.6 Les enzymes anodiques	24
1.3 Conclusion	26
2 L'évolution dirigée des protéines	27
2.1 La création de la diversité génétique	28
2.2 La sélection de l'activité enzymatique	31
2.3 Ingénierie des protéines et biopile enzymatique	39
2.3.1 L'ingénierie rationnelle	40
2.3.2 L'évolution dirigée des protéines	43
2.3.3 Comment évoluer la laccase CotA pour des applications en biopile enzymatique ?	45
2.4 Conclusion	47
3 La microfluidique digitale	49
3.1 Principes	49
3.1.1 Le régime laminaire	49
3.1.2 La production de microgouttelettes	51
3.1.2.1 La jonction en T	53
3.1.2.2 La focalisation hydrodynamique	54
3.1.2.3 Comparaison entre jonction en T et focalisation hydrodynamique	56
3.1.2.4 Autres méthodes de production de microgouttelettes	57
3.1.2.5 Le type d'émulsion utilisé	57
3.1.3 Le mouillage	58
3.1.4 La stabilité des microgouttelettes	60
3.1.5 La "biocompatibilité" des tensioactifs	63
3.2 La manipulation des microgouttelettes	64
3.2.1 Pourquoi des puces en PDMS ?	64

3.2.2 Le mélange au sein des microgouttelettes.....	65
3.2.3 L'incubation de microgouttelettes	66
3.2.4 La fusion de microgouttelettes	69
3.2.5 La détection de la fluorescence au sein des microgouttelettes.....	72
3.2.6 Le tri de microgouttelettes.....	73
3.3 La microfluidique digitale : applications en biologie.....	76
3.3.1 L'amplification de l'ADN.....	77
3.3.2 La transcription et la traduction <i>in vitro</i>	78
3.3.3 La manipulation de cellules vivantes.....	79
3.4 Conclusion	85
Définition du sujet de thèse.....	87
Résultats et discussion	89
4 Développement d'une biocathode CotA avec médiateur en solution	89
4.1 Matériel et méthodes.....	89
4.2 Résultats et discussion	93
4.2.1 Développement d'une technique d'immobilisation de la laccase TvLac	93
4.2.1.1 Formation d'une SAM de thiols fonctionnalisée sur une surface d'or.....	93
4.2.1.2 Réduction de sels d'aryldiazonium sur une surface de carbone vitreux.....	95
4.2.2 Application de la technique d'immobilisation à la laccase CotA et ses mutants	97
4.2.2.1 Expression, extraction et purification de la laccase CotA et de ses mutants.....	97
4.2.2.2 Etude cinétique de la laccase CotA et de ses mutants.....	98
4.2.2.3 Immobilisation de la laccase CotA.....	99
4.2.2.4 Reproductibilité de la méthode de fonctionnalisation	100
4.2.2.5 Etude de stabilité des biocathodes CotA.....	101
4.2.2.6 Effet de la température sur les performances des biocathodes CotA	102
4.2.2.7 Comparaison CotA / TvLac	103
4.2.2.8 Immobilisation des mutants L368A, M502L, I494A et M502F	104
4.3 Conclusion	106
5 Etude électrochimique de la laccase CotA : cas d'un médiateur rédox immobilisé à la surface de l'électrode	107
5.1 Matériel et méthodes.....	108
5.2 Résultats et discussion	111
5.2.1 Mise en évidence du transfert d'électrons direct de CotA	111
5.2.2 Evaluation de polymères rédox à base de sels d'osmium en tant que médiateur rédox...112	
5.2.3 Influence de la température et du pH sur les performances des biocathodes.....	114
5.2.4 Inhibition de l'activité des biocathodes par les ions chlorures et fluorures.	116
5.3 Conclusion	119
6 Développement de biopiles enzymatiques Glucose/O₂.....	120
6.1 Matériel et méthodes.....	120
6.2 Résultats et discussion	123
6.2.1 Création d'une bioanode : immobilisation d'une glucose oxydase	123
6.2.2 Conception de biopiles enzymatiques "classiques" Glucose/O ₂	124
6.2.2.1 Biopile enzymatique de première génération.....	125
6.2.2.2 Biopile enzymatique de seconde génération.....	127
6.2.3 Conception de biopiles microfluidiques Glucose/O ₂	130
6.2.3.1 Principe de la biopile microfluidique.....	131

6.2.3.2 Formation des électrodes de nanotubes de carbone	132
6.2.3.3 Immobilisation des enzymes et étude des bioélectrodes	134
6.2.3.4 Assemblage et étude des biopiles microfluidiques	137
6.3 Conclusion	140
7 Développement d'une plateforme microfluidique pour l'évolution dirigée de la laccase CotA ..	141
7.1 Matériel et méthodes	141
7.2 Résultats	149
7.2.1 Production des microgouttelettes aqueuses	149
7.2.2 Encapsulation de bactéries.....	151
7.2.3 Incubation hors puce et la réinjection des microgouttelettes	152
7.2.4 Détection de l'activité enzymatique de CotA.....	153
7.2.5 Mise au point d'une plateforme microfluidique pour l'évolution dirigée in vivo de CotA	157
7.2.5.1 Induction de l'expression des protéines en microgouttelettes	159
7.2.5.2 La picoinjection du substrat AUR	160
7.2.5.3 Le tri et la récupération des bactéries.....	164
7.2.5.4 Développement d'une méthode de criblage modèle	166
7.3 Conclusion	171
8 Conception de banques de mutants de CotA	172
8.1 Matériel et méthodes.....	172
8.2 Résultats	176
8.2.1 Construction de l'insert	176
8.2.2 Construction d'un vecteur accepteur.....	178
8.2.3 Clonage et analyse des banques	179
8.3 Conclusion	182
Conclusion et perspectives.....	183
Annexes et publications	188
Références.....	203
English Summary.....	231

Liste des abréviations

ABTS	<i>2,2'-azino-Bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)</i>
ADH	<i>Alcool désHydrogénase</i>
ADN	<i>Acide désoxyribonucléique</i>
ADNase	<i>Désoxyribonucléase</i>
ARNase	<i>Ribonucléase</i>
ARNm	<i>Acide ribonucléique messenger</i>
ARNt	<i>Acide ribonucléique de transfert</i>
AFM	<i>Atomic Force Microscopy</i>
APTES	<i>3-aminopropyltriethoxysilane</i>
AUR	<i>Amplex® Ultra Red</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
Ca	<i>Nombre capillaire</i>
CMC	<i>Concentration micellaire critique</i>
CV	<i>Coefficient de variance</i>
DET	<i>Direct Electron Transfer</i>
DPV	<i>Differential Pulse Voltammetry</i>
DO ₆₀₀	<i>Densité optique à 600 nm</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDC	<i>1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide</i>
EDTA	<i>Acide éthylène diamine tétracétique</i>
FACS	<i>Fluorescent Activated Cell Sorter</i>
FAD	<i>Flavine Adénine Dinucléotide</i>
FADS	<i>Fluorescence Activated Droplet Sorting</i>
FPGA	<i>Field-Programmable Gate Array</i>
GDH	<i>Glucose DésHydrogénase</i>
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
GODA	<i>Glucose Oxidase Detection Assay</i>
GOx	<i>Glucose Oxydase</i>
HFE7100	<i>Methoxy-nonafluorobutane</i>
HFE7500	<i>3-ethoxy-1,1,1,2,3,4,4,5,5,6,6,6-dodecafluoro-2-(trifluoromethyl)hexane</i>
ITO	<i>Indium Tin Oxide</i>
IPTG	<i>Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside</i>

IVC *In Vitro Compartmentalization*
IVT *In Vitro Translation*
 k_{cat} *Constante catalytique*
 K_M *Constante de Michaelis-Menten*
LB *Luria-Broth*
LBA *Luria Broth Agar*
MET *Mediated Electron Transfer*
NAD *Nicotinamide Adénine Dinucléotide*
NHS *N-hydroxysuccinimide*
PCR *Polymerase Chain Reaction*
PDMS *Polydiméthylsiloxane*
 Pe *Nombre de Péclet*
PEGDGE *Poly(éthylèneglycol) diglycidyléther*
PMMA *Polyméthacrylate de méthyle*
PMT *Tube photomultiplicateur*
PQQ *Pyrroloquinoline quinone*
PTFE *Polytétrafluoroéthylène*
RBS *Ribosome Binding Site*
 Re *Nombre de Reynolds*
RFU *Unité de fluorescence relative*
rpm *rotation par minute*
SAM *Self Assembled Monolayer*
SDS *Dodécylsulfate de sodium*
SELEX *Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment*
SHE *Standard Hydrogen Electrode*
UV *Ultraviolet*
X-gal *5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside*

Introduction

1 Les biopiles enzymatiques

1.1 Les piles à combustible

Avant d'aborder les piles à combustible biologiques, il convient tout d'abord d'introduire la technologie de pile à combustible. Une pile à combustible est un dispositif électrochimique convertissant l'énergie chimique en énergie électrique. La technologie, dont le concept date du milieu du 19^{ième} siècle (Christian Friedrich Schoenbein et Sir William Robert Grove 1838-1845), demeure l'une des plus anciennes dans le domaine de la production d'électricité (*Carrete et al. 2001*). Leur développement est néanmoins resté limité jusqu'à la moitié du 20^{ième} siècle en raison d'une utilisation restreinte de l'électricité et de l'abondance d'une énergie fossile bon marché et non rationnée. Cependant, la forte croissance de la demande en électricité tout au long du 20^{ième} siècle a conduit au développement d'importantes sources d'énergie centralisées produisant de l'électricité à l'échelle du mégawatt. Au cours des vingt dernières années, en réponse à l'augmentation de la population mondiale, la tendance est au développement de sources d'énergie électrique plus performantes et décentralisées de manière à réduire les coûts de production et augmenter l'efficacité globale du réseau de distribution d'énergie (avec par exemple une cogénération électricité-chaaleur). Dans cette perspective, les piles à combustibles ont considérablement évolué ces vingt dernières années.

Le facteur environnemental a majoritairement contribué à l'essor de cette technologie. En effet, alors que les ressources fossiles ne sont pas inépuisables, la demande en énergie demeure quant à elle croissante. Dans un contexte énergétique en pleine mutation, une véritable course au développement de nouvelles sources d'énergie non polluantes et renouvelables s'est engagée dans le but de réduire notre dépendance aux énergies fossiles ainsi que l'émission de sous-produits polluants. L'un des objectifs du Grenelle de l'environnement lancé en 2007 vise à transformer le paysage énergétique français pour qu'en 2020, au moins 20 % de la production globale d'énergie soient d'origine renouvelable. Une des conditions *sine qua non* à la réalisation de cet objectif est la diversification des sources d'énergie renouvelable et le développement d'un réseau intelligent et décentralisé de distribution de l'énergie. Pouvant servir de source de production d'électricité propre ou encore d'unité de stockage d'électricité (en coopération avec l'énergie éolienne ou solaire), la technologie de pile à combustible est porteuse de beaucoup d'espoir et voit son développement en plein essor.

Le fonctionnement d'une pile à combustible est schématisé sur la Figure 1. Le système est constitué de deux électrodes séparées par un électrolyte. L'oxydation du carburant (hydrogène, méthanol...) a lieu à l'anode tandis que le comburant (principalement l'oxygène) est réduit à la cathode. Les deux compartiments fonctionnent dans des conditions sensiblement différentes et doivent être séparés par une membrane échangeuse d'ions. De plus, les catalyseurs inorganiques à base de platine utilisés sont très peu spécifiques. La séparation des compartiments est ainsi inévitable pour empêcher toute pollution d'une électrode à l'autre (empoisonnement des catalyseurs, réactions secondaires...).

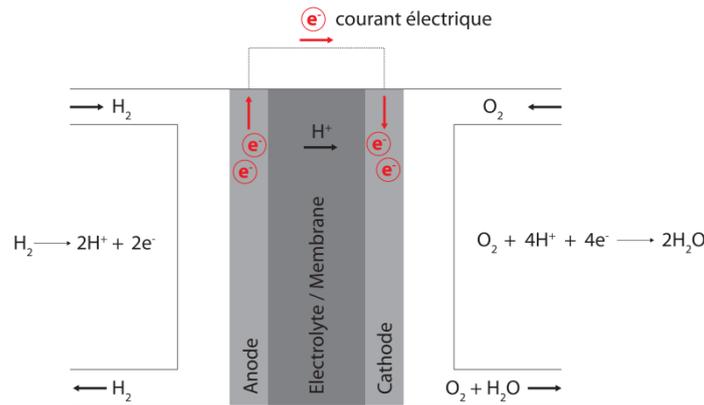


Figure 1 *Fonctionnement d'une pile à combustible* : le carburant, ici H_2 , est oxydé à l'anode tandis que le comburant, ici O_2 , est réduit à la cathode. Les deux électrodes sont séparées par un électrolyte permettant des échanges de protons ou d'anions dans certains cas. Les réactions électrochimiques ayant lieu sont précisées dans les deux compartiments

Il existe différentes technologies de piles à combustible ayant diverses applications en fonction du type de carburant, de comburant, d'électrolyte ou de membrane utilisé (Tableau 1).

	AFC ^a	PEMFC ^b	DMFC ^c	PAFC ^d	MCFC ^e	SOFC ^f
<i>T (°C)</i>	< 100	60-120	60-120	160-220	600-800	800-1000
<i>Réaction anodique</i>	$H_2 + 2OH^- \rightarrow 2H_2O + 2e^-$	$H_2 \rightarrow 2H^+ + 2e^-$	$CH_4O + H_2O \rightarrow CO_2 + 6H^+ + 6e^-$	$H_2 \rightarrow 2H^+ + 2e^-$	$H_2 + CO_3^{2-} \rightarrow H_2O + CO_2 + 2e^-$	$H_2 + O^{2-} \rightarrow H_2O + 2e^-$
<i>Réaction cathodique</i>	$\frac{1}{2}O_2 + H_2O + 2e^- \rightarrow 2OH^-$	$\frac{1}{2}O_2 + 2H^+ + 2e^- \rightarrow H_2O$	$\frac{3}{2}O_2 + 6H^+ + 6e^- \rightarrow 3H_2O$	$\frac{1}{2}O_2 + 2H^+ + 2e^- \rightarrow H_2O$	$H_2 + CO_2 + 2e^- \rightarrow CO_3^{2-}$	$\frac{1}{2}O_2 + 2e^- \rightarrow O^{2-}$
<i>Applications</i>	Transport Stockage Energie	Transport Stockage Energie	Transport Stockage Energie	Cogénération électricité-chaleur pour sources stationnaires décentralisées	Cogénération électricité-chaleur pour sources stationnaires décentralisées Transport	Cogénération électricité-chaleur pour sources stationnaires décentralisées Transport
<i>Puissance</i>	5-150 kW	5-250 kW	5 kW	50 kW-11 MW	2-100 MW	100-250 kW
<i>Electrolyte</i>	KOH	Membrane polymère	Membrane polymère	Acide phosphorique	Li_2CO_3 et KCO_3 fondus	ZrO_2 et Y_2O_3

Tableau 1 *Les différentes technologies de pile à combustible* : leur composition et leur différents domaines d'application. ^aAlkaline Fuel Cell ; ^bPolymer Electrolyte Membrane Fuel Cell ; ^cDirect Methanol Fuel Cell ; ^dPhosphoric Acid Fuel Cell ; ^eMolten Carbonate Fuel Cell ; ^fSolide Oxide Fuel Cell

Malgré de nombreux avantages (rendement énergétique important, applications multiples,...), et bien que chaque technologie soit aujourd'hui maîtrisée et commercialisée, l'utilisation des piles à combustible reste marginale et limitée à des cas spécifiques en raison d'un coût de production très élevé. Le coût de production d'électricité (2000 à 3000€ par kW) est en effet 300 fois supérieur à un moteur à combustion interne (moins de 10€ par kW) (*Palmore et al. 2008*). Ceci est dû à la composition des électrodes comprenant d'onéreux catalyseurs (principalement à base de platine) et à la présence d'une membrane échangeuse d'ions également coûteuse. Le stockage de l'hydrogène, carburant principalement utilisé, ainsi que les conditions drastiques de fonctionnement (T, P, pH) limitent également leurs applications. En raison de ces inconvénients, la technologie est toujours en plein développement dans le but de créer une pile à combustibles « idéale » qui serait peu coûteuse à produire tout en gardant des rendements énergétiques similaires. C'est dans ce contexte que les piles à combustible biologiques ont fait leur apparition à partir des années 1990 avant de susciter un réel intérêt dans les années 2000.

1.2 Les piles à combustible biologiques

1.2.1 Généralités

Le concept de biopile est équivalent à celui des autres piles à combustible dans le sens où elles convertissent l'énergie chimique en énergie électrique. La principale différence réside dans le catalyseur qui est, dans ce cas, d'origine biologique. L'utilisation de matériel biologique comme catalyseur rend cette technologie très attrayante pour de nombreuses raisons : des conditions douces de fonctionnement (température, pH, pression), une large variété de choix du couple carburant/comburant, des catalyseurs renouvelables et parfois spécifiques ainsi qu'un faible coût de production. En effet, la spécificité des biocatalyseurs permet dans certain cas de s'affranchir de la membrane échangeuse d'ions pour un fonctionnement en compartiment unique, réduisant considérablement le coût de production de ces biopiles à combustible. Dans le cas des biopiles utilisant des microorganismes, il est en outre possible d'utiliser des carburants non purifiés voire pollués, comme par exemple des eaux usées, permettant alors de combiner la production d'électricité avec le traitement des eaux usées (*Min et al. 2005*).

Les biopiles peuvent être divisées en trois classes différentes en fonction du biocatalyseur utilisé : microorganismes, organelles ou enzymes. L'utilisation d'organelles reste cependant encore marginale tandis que les biopiles microbiologiques et enzymatiques se sont fortement développées. Les biopiles microbiologiques présentent de longues durées de vie (pouvant aller jusqu'à 5 ans) (*Moon et al. 2005*) et sont capables d'oxyder complètement de simples sucres en CO₂ (*Bond et al. 2005*). Elles sont néanmoins limitées par de faibles densités de courant générées, principalement à cause des difficultés de transport à travers la membrane cellulaire. A l'inverse, les biopiles

enzymatiques présentent de plus fortes densités de courant mais ne permettent d'oxyder que partiellement le carburant et ont une durée de vie limitée (typiquement une dizaine de jours) due à la nature fragile des enzymes (Kim *et al.* 2006 ; Barton *et al.* 2004). Un avantage majeur de l'utilisation d'enzymes comme biocatalyseurs réside dans à leur forte spécificité qui peut permettre, comme mentionné auparavant, de s'affranchir de la membrane échangeuse d'ions et de réduire considérablement taille du système et coût de production. Nous n'aborderons par la suite que le cas des biopiles enzymatiques (la revue de Du *et al.* 2007 fournit une description détaillée des biopiles utilisant des microorganismes).

1.2.2 Les biopiles enzymatiques

Comme leur nom l'indique, les biopiles enzymatiques font intervenir des enzymes comme biocatalyseurs, et plus spécialement des enzymes rédox. La Figure 2 présente schématiquement leur fonctionnement. Les enzymes catalysent les transferts d'électrons se produisant dans chacun des compartiments : dans le compartiment anodique, l'enzyme catalyse l'oxydation du carburant. Une fois le combustible oxydé, les électrons sont transférés à l'anode puis à la cathode dans le compartiment cathodique permettant à l'enzyme de réduire le comburant. Un médiateur rédox M peut être nécessaire pour faire le lien entre le site actif rédox de l'enzyme et la surface de l'électrode et ainsi assurer le transfert d'électrons.

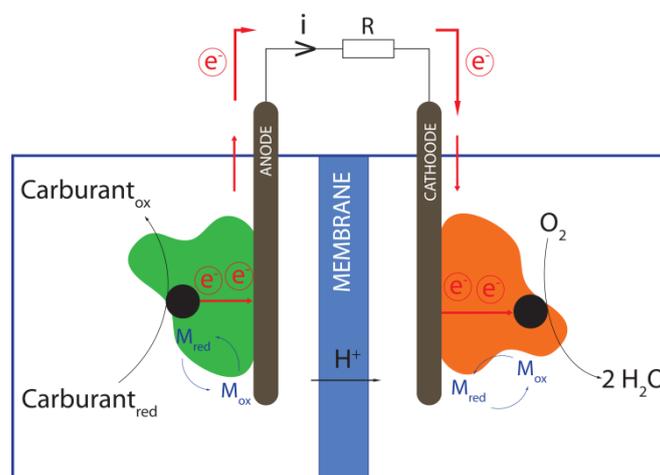


Figure 2 *Fonctionnement d'une biopile enzymatique* : le carburant est oxydé par l'enzyme anodique tandis que le comburant (l'oxygène dans la plupart des cas) est réduit par l'enzyme cathodique. Un médiateur rédox M est souvent nécessaire pour assurer le transfert d'électrons entre le site actif rédox de l'enzyme et la surface de l'électrode

Historiquement, alors que le concept de biopile est connu depuis 1911 avec la toute première biopile microbiologique (Potter 1911), les premiers exemples d'utilisation d'enzymes pour développer des bioélectrodes apparaissent dans les années 1960 : en 1964, Yahiro *et al.* rapportèrent l'emploi d'une glucose oxydase comme catalyseur anodique pour constituer la première biopile enzymatique fonctionnant au glucose (Yahiro *et al.* 1964). On ne trouve que peu d'exemples dans la littérature au

cours des trois décennies suivantes, bien que quelques avancées prometteuses aient été recensées (Bockris *et al.* 1969 ; Govil *et al.* 1982 ; Palmore *et al.* 1994).

Il faut attendre les années 2000 pour assister au véritable essor de ce domaine de recherche, comme en témoigne la multitude d'articles publiés. Ce regain d'intérêt pour les biopiles enzymatiques s'explique par une prise de conscience générale quant aux possibles applications de cette technologie. Il a en effet été admis que cette technologie ne peut être compétitive par rapport à la technologie des piles à combustible classiques en raison de puissances et de durées de vie trop limitées (voir Tableau 2). Pour ces raisons, les biopiles enzymatiques se sont développées pour des applications plus spécifiques nécessitant généralement la miniaturisation du système (alimentations portables, biocapteurs...).

	Puissance	Durée de vie
Piles à combustible	kW - MW	3 mois - 1 an
Biopiles enzymatiques	μ W - mW	1 - 30 jours

Tableau 2 Comparaison des puissances et durées de vie des piles à combustible classiques et des biopiles enzymatiques

Un progrès majeur dans le développement de ces sources d'énergie fut la première biopile enzymatique fonctionnant dans un compartiment unique, développée par le groupe de Willner en 1999, utilisant une glucose oxydase à l'anode et la microperoxydase-11 à la cathode (réduction d' H_2O_2) (Katz *et al.* 1999). Bien que la puissance générée fût très faible, cette innovation suscita un vif intérêt chez les chercheurs puisque la suppression de la membrane échangeuse d'ions simplifie grandement l'ingénierie des prototypes et ouvre la voie à la miniaturisation du système.

Les biopiles enzymatiques les plus efficaces à ce jour génèrent environ $1,5 \text{ mW.cm}^{-2}$. Une biopile utilisant un couple glucose déshydrogénase/diaphorase à l'anode et une bilirubine oxydase à la cathode et délivrant $1,45 \text{ mW.cm}^{-2}$ a été développée en 2009 par SONY (Sakai *et al.* 2009). Cette biopile fonctionne dans des conditions douces, bien que non physiologiques (pH7.0, 400 mM de glucose) et peut être associée en série pour alimenter un baladeur mp3 par exemple (Figure 3).



Figure 3 Image de quatre biopiles enzymatiques SONY en séries : chaque unité biopile utilise un couple glucose déshydrogénase/diaphorase à l'anode et une bilirubine oxydase à la cathode dans du tampon phosphate (1 M ; pH7.0) contenant 0.4 M de glucose. Chaque unité cubique produit jusqu'à 50 mW (pour 40 cm^{-3}). Leur association en série permet l'alimentation d'un lecteur mp3 (http://www.sony.net/SonyInfo/technology/technology/theme/bio_01.htm)

Puisque les biopiles enzymatiques peuvent fonctionner dans des conditions physiologiques, l'un des grands défis de cette technologie réside dans la création d'un microsystème pouvant fonctionner grâce aux carburants disponibles dans son environnement avec pour applications possibles l'implantation dans le corps humain et, par exemple, l'alimentation d'un pacemaker, d'une pompe à insuline ou encore d'un rein artificiel (Tableau 3). *Cosnier et al.* ont d'ailleurs récemment mis au point une biopile Glucose/O₂ qui, implantée dans l'espace rétro-péritonéal d'un rat, délivre de manière stable 2 μW pendant un mois (*Cinquin et al. 2010*). Le même groupe a récemment développé la plus performante des biopiles fonctionnant dans des conditions physiologiques, fournissant jusqu'à 1,3 $\text{mW}\cdot\text{cm}^{-2}$ en présence de 5 mM de glucose (*Zebda et al. 2011* ; Figure 6).

Puissance requise	100 nW – 10 μW	10 μW – 1 mW	200 μW	20 mW – 1 W
Applications	Appareils de mesure implantables	Délivrance de médicament (pompe à insuline)	Micro-actionneurs (sphincter urinaire artificiel robotisé)	Rein artificiel implantable

Tableau 3 Applications possibles de biopiles enzymatiques implantables dans le corps humain

L'intérêt croissant pour de telles applications a été confirmé cette année par le financement du projet IBFC (Implantable BioFuel Cells) porté par l'Université de Grenoble à hauteur de 2 M€ ("Investissement d'Avenir") dans le but d'optimiser des biopiles enzymatiques implantables pour le développement d'implants médicaux totalement autonomes.

Un nombre considérable de documents est consacré aux biopiles enzymatiques et analyse en détails les différents aspects de la recherche dans ce domaine : la composition des électrodes, les techniques d'immobilisation des enzymes, la puissance générée ou la stabilité du système (*Ikeda et al. 2001* ; *Katz et al. 2003* ; *Barton et al. 2004* ; *Heller et al. 2004* ; *Shulka et al. 2004* ; *Kim et al. 2006* ; *Bullen et al. 2006* ; *Zayats et al. 2007* ; *Atanassov et al. 2007* ; *Minteer et al. 2007* ; *Davis et al. 2007* ; *Palmore et al. 2008* ; *Cracknell et al. 2008* ; *Cooney et al. 2008* ; *Kim et al. 2008* ; *Moehlenbrock et al. 2008* ; *Ramanavicius et al. 2009* ; *Willner et al. 2009* ; *Barton et al. 2009*).

Nous aborderons dans les parties suivantes la conception de bioanodes et biocathodes en mettant principalement l'accent sur les familles d'enzymes utilisées lors de ce doctorat, à savoir les laccases pour la biocathode et les glucose oxydases pour la bioanode. Il convient cependant de mentionner auparavant quelques aspects importants du fonctionnement d'une biopile enzymatique : tout d'abord le transfert d'électrons entre l'électrode et le biocatalyseur puis les différents facteurs influençant les performances et la stabilité de tels systèmes.

1.2.3 Les différents types de transfert d'électrons

Faciliter le transfert d'électrons entre le site actif de l'oxydoréductase et l'électrode est un point crucial dans le développement de bioélectrodes performantes afin d'augmenter la constante de transfert des électrons entre le site actif rédox de l'enzyme et la surface de l'électrode. Les transferts d'électrons peuvent se diviser en deux classes : les transferts d'électrons direct (DET) et les transferts d'électrons indirects nécessitant la présence d'un intermédiaire, appelé médiateur, entre le site actif de l'enzyme et la surface de l'électrode (MET pour "Mediated Electron Transfert") (Figure 4).

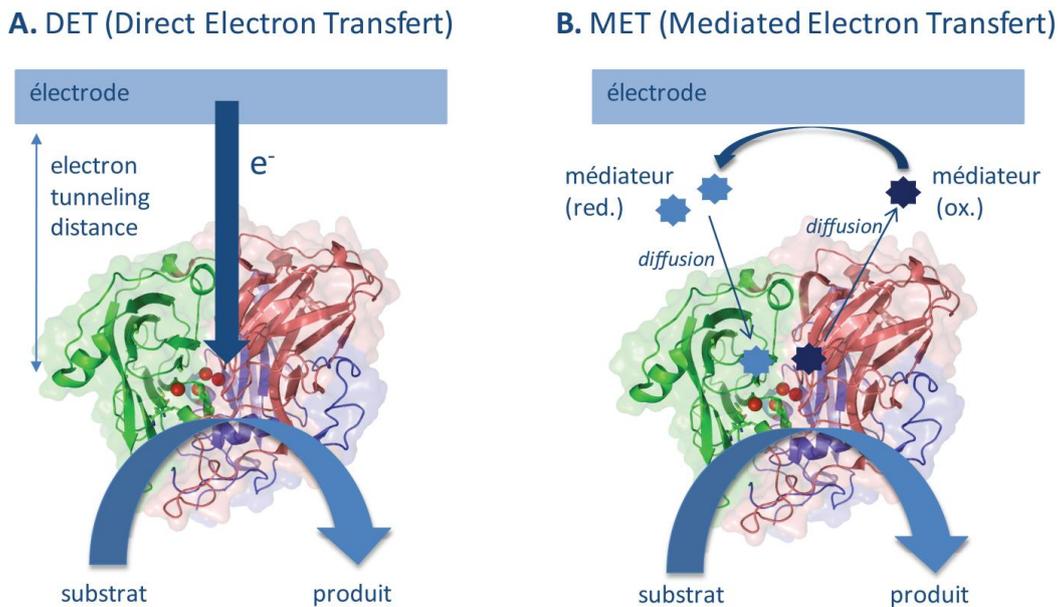


Figure 4 *Schéma représentant les deux mécanismes de transfert d'électron : (A) Transfert d'électrons direct (DET) : l'enzyme est capable de transférer directement des électrons avec l'électrode. (B) Transfert d'électrons indirect (MET) : le transfert d'électron entre le site actif de l'enzyme et l'électrode se fait par l'intermédiaire d'un médiateur rédox. Adapté depuis Barton et al. 2004*

1.2.3.1 Le transfert d'électrons direct (DET)

Le développement de bioélectrodes fonctionnant avec un DET efficace constitue l'un des défis majeurs de la recherche sur les biopiles enzymatiques. Une biopile qui fonctionnerait avec un DET à chaque électrode serait effectivement très avantageuse. La membrane échangeuse d'ions deviendrait alors inutile tandis que les performances de la pile ne seraient plus limitées par la stabilité et les constantes de diffusion du médiateur comme dans le cas d'un transfert d'électrons indirect.

Au cours des années 1980, la capacité de certaines enzymes à échanger directement des électrons avec la surface d'une électrode fut mise en évidence (peroxydase, cytochrome c, ferrédoxine, azotoflavine, azurine et surtout glucose oxydase) (Hill 1987; Frew et al. 1988). Ces études électrochimiques ont ouvert la voie à de nombreuses investigations sur les structures des oxydoréductases et les mécanismes réactionnels mettant en jeu ces transformations rédox.

Aujourd'hui, une catalyse *via* un DET a été démontrée pour un nombre important d'enzymes, comme les laccases, les lactate déshydrogénases, les alcool déshydrogénases, les méthylamine déshydrogénases, les succinate déshydrogénases, les hydrogénases, les peroxydases, les fumarate réductases, les *D*-fructose déshydrogénases ou les *D*-gluconate déshydrogénases (*Ghindilis et al. 1997* ; *Shleev et al. 2005* ; *Varfolomeev et al. 1996*).

Un transfert de type DET est un mécanisme de transfert d'électrons pouvant être décrit par la théorie de Marcus ("electron tunneling mechanism") (*Marcus 1993*). Il dépend donc intimement de l'orientation et de la distance ("electron tunneling distance") du site actif rédox de l'enzyme par rapport à la surface de l'électrode, et ainsi de la localisation du site actif rédox au sein de la protéine. De ce fait, un transfert de type DET entre une électrode et une oxydoréductase est efficace lorsque (i) le site actif est proche de la surface, (ii) l'enzyme est orientée de manière à présenter le site actif face à l'électrode, (iii) l'enzyme n'est pas dénaturée dans cette conformation (*Gutiérrez-Sanchez et al. 2011*).

De manière générale, peu d'enzymes permettent un transfert de type DET significatif une fois immobilisées à la surface d'une électrode, le site redox actif de l'enzyme étant souvent profondément enfoui dans la structure de la protéine (*Armstrong et al. 1985*). La majorité des enzymes capables d'interagir directement avec une électrode sont de petites enzymes rédox possédant dans leur site actif un centre métallique proche de la surface de la structure (hème, cluster de cuivre ou de fer) (*Gorton et al. 1999*). *Gorton et al.* ont, par exemple, démontré un DET efficace pour de nombreuses enzymes contenant un cytochrome *c*, comme des cellobiose déshydrogénases ou des alcool déshydrogénases PQQ-dépendantes (*Gorton et al. 1999* ; *Christenson et al. 2004*). Une autre catégorie d'enzymes montre généralement un DET efficace avec une surface de carbone ou d'or : les "multicopper oxidases" (*Shleev et al. 2005*). Ces métallo-enzymes, dont le fonctionnement sera décrit par la suite (voir 1.2.5), possèdent deux centres cuivreux mettant en jeu 4 atomes de cuivre et permettant la circulation des électrons d'un site à l'autre après réduction de l'oxygène. Les "multicopper oxidases" comprennent les bilirubine oxydases, les ascorbate oxydases et les laccases. Le DET de laccases fongiques (*Ivnitski et al. 2007* ; *Shleev et al. 2005 (b)*) sur des électrodes de carbone ou encore de bilirubine oxydases (*Shleev et al. 2004* ; *Ivnitski et al. 2008*) a récemment été démontré.

L'efficacité d'un DET dépend également fortement de la technique d'immobilisation de l'enzyme, l'objectif étant d'optimiser la distance du site actif par rapport à la surface de l'électrode ainsi que son orientation. La simple adsorption physique de l'enzyme à la surface de l'électrode (Figure 5a) demeure la plupart du temps peu efficace à cause de l'orientation aléatoire de l'enzyme et de l'encombrement stérique se traduisant par des problèmes de diffusion. Les travaux novateurs de Hill et Armstrong (*Armstrong et al. 1988*) ou encore Bowden (*Collinson et al. 1992*) ont démontré qu'un

DET efficace nécessite une interaction entre la surface de l'électrode et l'enzyme, aboutissant à la formation d'un film de protéines stable, idéalement en monocouche. Plusieurs techniques ont été développées pour modifier des surfaces d'or ou de carbone à l'aide des molécules permettant de générer de telles interactions. Ces molécules comprennent un groupe fonctionnel réagissant avec la surface de l'électrode (amines, thiols...), un squelette carboné plus ou moins long jouant le rôle d'espaceur et un groupement fonctionnel, permettant un couplage orienté avec la protéine (Figure 5b). *Atanassov et al.* ont, par exemple, utilisé une monocouche auto-assemblée (SAM pour Self Assembled Monolayer) de 4-aminothiophenols sur une surface d'or pour observer les DET de laccases (de *Coriolus hirsutus* et de *Rhus vernicifera*) pour la réduction de l'oxygène (*Gupta et al. 2004*).

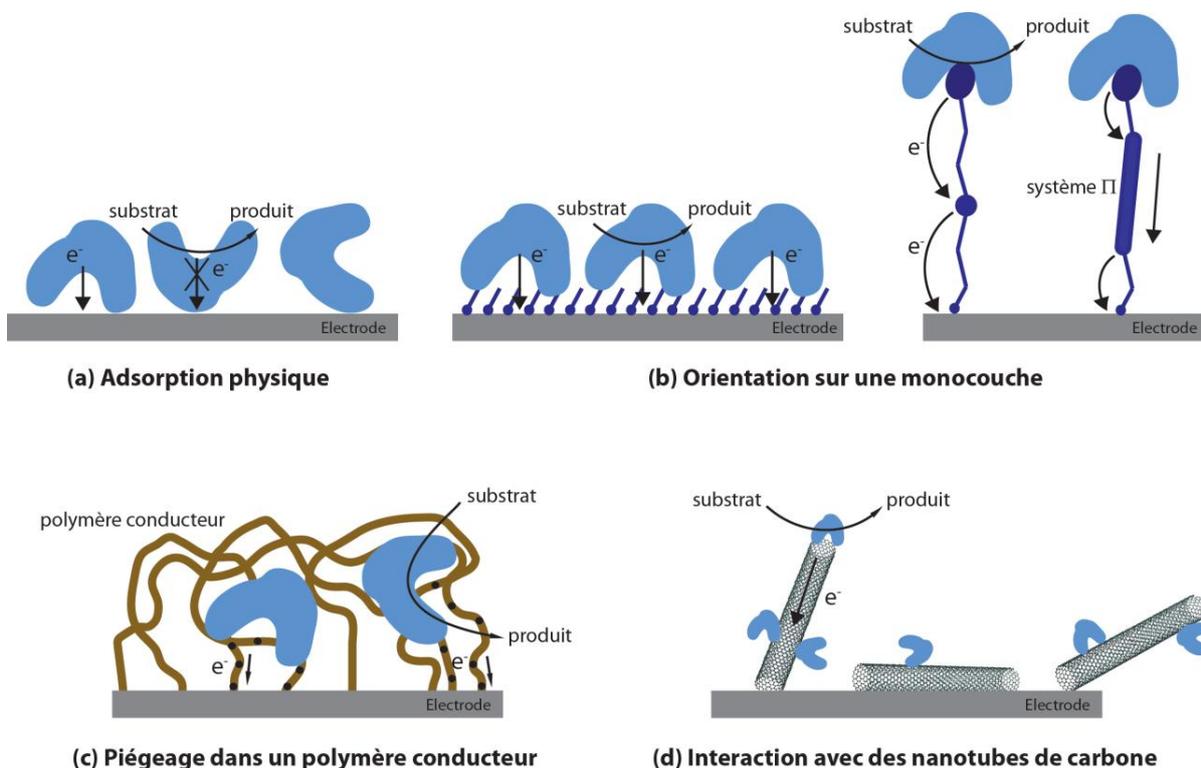


Figure 5 *Schéma représentant différentes techniques d'immobilisation d'enzymes pour l'étude d'un DET: (a) Adsorption physique de la protéine à la surface de l'électrode. (b) Orientation de la protéine sur une monocouche auto-assemblée SAM. Le squelette espaceur peut contenir des relais conducteurs (à droite). (c) Piégeage de la protéine au sein d'un polymère conducteur. (d) Immobilisation de la protéine sur des nanotubes de carbone*

Une autre stratégie peut consister à greffer le cofacteur d'une enzyme sur une surface pour assembler le film de protéines en reconstituant l'apoprotéine. *Willner et al.* ont ainsi constitué des SAM de PQQ/FAD sur une surface d'or pour immobiliser une glucose oxydase et mesurer un DET pour l'oxydation du glucose (*Willner et al. 1996*). Dans ce cas, la chaîne alkyle intègre des « promoteurs » du transfert d'électrons favorisant le transit de ces derniers le long de la chaîne entre l'enzyme et la surface de l'électrode (Figure 5b). La chaîne alkyle peut également être elle-même conductrice (*Liedberg et al. 1997*) ou partiellement conductrice en y intégrant des oligomères conducteurs. Bien que la formation de telles monocouches de protéines permette un DET, des effets

secondaires négatifs de saturation de la surface ont souvent été observés et limitent l'intensité du signal détecté (*Habermüller et al. 2000*).

Une autre stratégie prometteuse implique des polymères conducteurs pour piéger l'enzyme à la surface de l'électrode (*Ahuja et al. 2007*). Le polymère conducteur (polypyrrole dans la plupart des cas (*Ramanavicius et al. 1999*)) crée à la surface de l'électrode un réseau réticulé conducteur permettant le transport des électrons (Figure 5c). Différentes techniques piégeant la protéine au sein d'un matériau conducteur utilisent des composés sol-gel dopés avec des particules de graphite (*Coche-Guerente et al. 1997*) ou encore des polymères contenant des nanoparticules d'or (*Xiao et al. 2003*). Cependant, de faibles constantes de DET limitent l'application de ces techniques.

Toujours dans le but d'augmenter la surface de contact entre l'électrode et la protéine et d'accroître leur interaction, la fonctionnalisation des surfaces à l'aide de nanotubes de carbone permet également d'observer des DET (Figure 5d). Plusieurs approches ont été étudiées pour immobiliser des protéines sur des nanotubes de carbone : liaison covalente (*Lin et al. 2004*), adsorption physique (*Guiseppi-Elie et al. 2002*) ou piégeage (*Wang et al. 2005*). *Ivnitsky et al.* ont ainsi immobilisé une glucose oxydase sur des électrodes de papier carbone modifiées avec des nanotubes de carbone (*Ivnitski et al. 2006*). Une combinaison du polycation polyéthylèneimine et de glucose oxydase chargée négativement est déposée sur la surface de papier carbone fonctionnalisée avec des nanotubes de carbone. Après adsorption, du Nafion® modifié avec du bromure de tetrabutylammonium est alors déposé pour assurer la fixation de l'enzyme. Cette bioanode permet une catalyse de l'oxydation du glucose par DET efficace et constitue dans la littérature le premier exemple viable de DET pour des applications biopiles.

Peu d'exemples de biopiles enzymatiques fonctionnant en DET sont pour l'instant présents dans la littérature. Comme mentionné auparavant, le premier exemple historique apparaît en 1999 (Glucose/H₂O₂ (*Katz et al. 1999*)) mais les premières biopiles enzymatiques à DET présentant des caractéristiques intéressantes n'apparaissent qu'à partir de 2005. Des biopiles Glucose/O₂ ont notamment été développées en combinant une biocathode utilisant une laccase (*Yan et al. 2006* ; *Zheng et al. 2006*) ou une bilirubine oxydase (*Duma et al. 2006*) pour la réduction de l'oxygène à une bioanode utilisant une glucose oxydase pour l'oxydation du glucose (*Ivnitski et al. 2006*). Très récemment, une des biopiles enzymatiques les plus performantes mises au point à ce jour a été conçue en piégeant les enzymes, une glucose oxydase et une laccase, au sein d'un réseau de nanotube de carbone (Figure 6). Les enzymes ont été directement intégrées dans les électrodes de nanotubes de carbone compressées, assurant une communication directe très efficace avec les sites actifs rédox des deux enzymes. En fonctionnement dans un compartiment unique, la biopile enzymatique délivre jusqu'à 1,3 mW.cm⁻² dans des conditions physiologiques pendant au moins 1 mois, ce qui constitue un progrès considérable (*Zebda et al. 2011*).

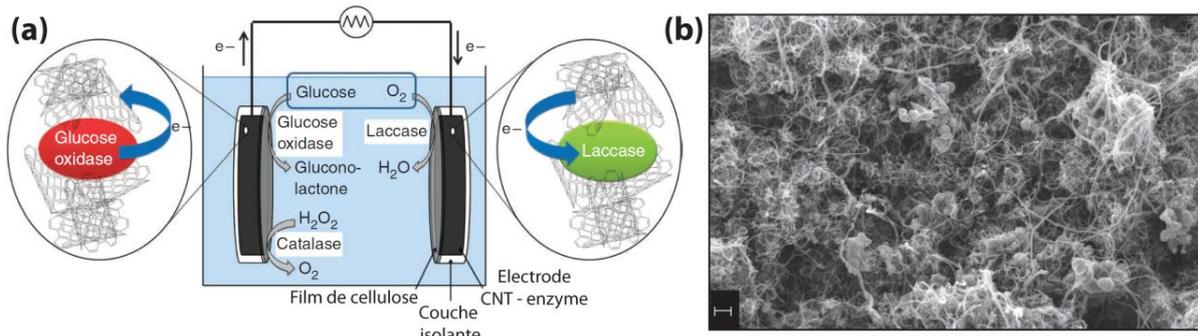


Figure 6 Exemple de biopile enzymatique à DET : **(a)** La biopile fonctionne dans un seul compartiment. Les électrodes sont constituées de pastille de nanotubes de carbone (CNT) compressés contenant les enzymes. A l'anode, une glucose oxydase (GOx) oxyde le glucose tandis qu'une catalase décompose l' H_2O_2 pouvant empoisonner la GOx. A la cathode, une laccase réduit l' O_2 . Un film de cellulose permet d'isoler les électrodes du milieu physiologique contenant $5 \cdot 10^{-3}$ M de glucose dans du tampon phosphate pH7.0. **(b)** Image au microscope électronique à balayage d'une coupe de la bioanode. Les protéines sont visibles au sein de la matrice de nanotubes de carbone. Les nanotubes de carbone interagissent intimement avec les sites actifs rédox des enzymes et permettent une communication électrique directe entre les protéines et l'électrode. Barre d'échelle : 200 nm. Adapté depuis Zebda et al. 2011

Mis à part cet exemple récent, les performances des biopiles à DET restent à ce jour limitées par rapport à la plupart des biopiles enzymatiques mettant en jeu des transferts d'électrons indirects (MET).

1.2.3.2 Le transfert d'électrons indirect (MET)

Le principal rôle d'un MET est d'augmenter la constante de transfert d'électrons entre le site actif de l'enzyme et l'électrode en éliminant l'obligation qu'a le biocatalyseur d'interagir directement avec l'électrode (Figure 7). Cela nécessite l'emploi d'une espèce appelée médiateur, qui doit participer directement à la réaction catalytique en étant oxydé ou réduit par l'enzyme ou son cofacteur pour être ensuite régénéré à la surface de l'électrode en transférant les électrons. Le choix du médiateur tient compte de critères de stabilité, de spécificité et de vitesse de réaction électrochimique. Surtout, le potentiel rédox du médiateur doit être le plus proche possible de celui de l'enzyme utilisée pour qu'une bonne communication soit assurée.

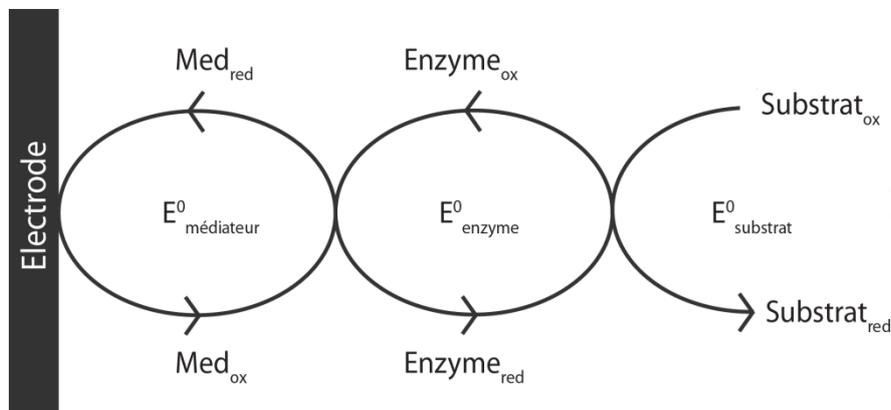


Figure 7 Transfert d'électrons indirect (MET) : le médiateur rédox permet de transférer les électrons entre l'électrode et le site actif de l'enzyme en étant régénéré à la surface de l'électrode. Les trois réactions électrochimiques en chaîne ont chacune lieu au potentiel rédox du couple mis en jeu

Les médiateurs sont généralement divisés en deux sous-classes : les médiateurs organiques et les médiateurs à base de métaux. Nous utiliserons plutôt ici une manière plus pertinente de les classer en distinguant les médiateurs en solution des médiateurs immobilisés à la surface de l'électrode. Le développement de bioélectrodes fonctionnant par MET a été largement étudié pour palier aux faibles densités de courant généré par DET. La littérature est ainsi extrêmement dense à ce sujet. Nous n'aborderons pas le sujet de manière exhaustive dans les paragraphes suivant, en limitant nos exemples aux enzymes utilisées au cours de ce doctorat.

1.2.3.2.1 Les médiateurs en solution

Les médiateurs rédox utilisés en solution sont des molécules rédox de faible poids moléculaire pour favoriser la diffusion de l'espèce jusqu'au centre rédox de la protéine. Les médiateurs anodiques les plus utilisés sont des dérivés de ferrocène (1-1'-dicarboxyferrocène (Liu *et al.* 2007), acide ferrocèncarboxylique (Nazaruk *et al.* 2007) et surtout ferrocèneméthanol (Pellisier *et al.* 2008)) généralement pour interagir avec des glucose oxydases tandis que des azines (phénothiazine, phenoxazine ou phenazine) sont utilisés avec des déshydrogénases NAD ou PQQ-dépendantes (Figure 8).

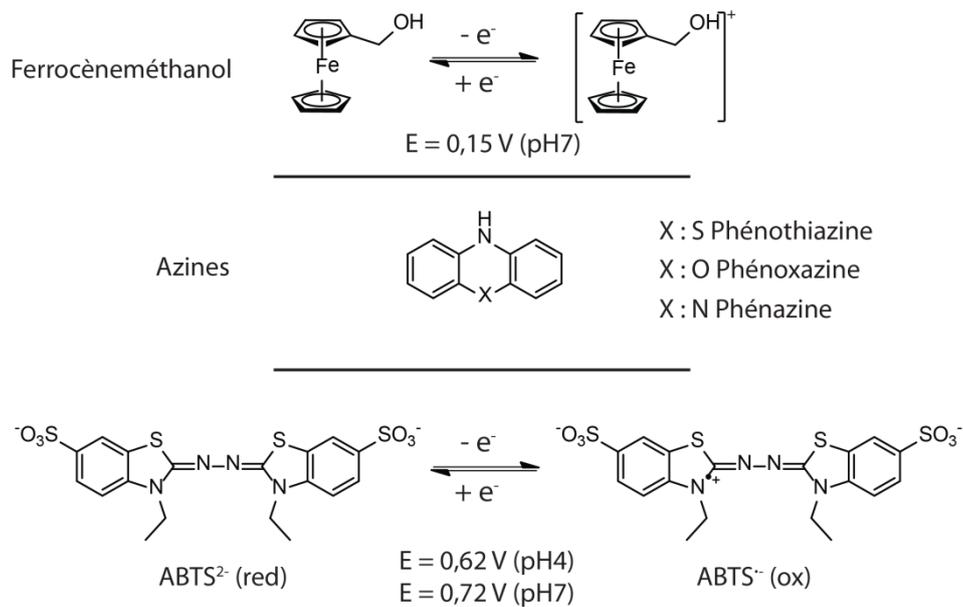


Figure 8 Différentes structures de médiateurs rédox usuellement utilisés en solution : Ferrocèneméthanol (en haut), Azines (au centre), ABTS (en bas). Les potentiels sont indiqués par rapport à l'électrode standard à hydrogène (SHE)

Le médiateur cathodique le plus fréquemment utilisé pour interagir avec des enzymes à haut potentiel rédox, comme les laccases (Palmore *et al.* 1999 ; Vaz-Dominguez *et al.* 2008 ; Merle *et al.* 2008) ou les bilirubine oxydases (Tsujiura *et al.* 2001) est le 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) (Figure 8). Sous sa forme réduite (ABTS²⁻), l'ABTS est un dianion qui agit comme co-substrat de ces enzymes lors de la réduction de l'oxygène pour être oxydé en un radical ABTS^{•-} à

un potentiel d'environ 0,72 V par rapport à l'électrode standard à hydrogène (SHE pour "Standard Hydrogen Electrode") à pH7.0. En 1999, *Palmore et al.* ont, les premiers, démontré la possibilité d'utiliser l'ABTS dans un compartiment cathodique en le combinant avec la laccase de *Pyricularia oryzae* (*Palmore et al. 1999*). Ces systèmes utilisant des médiateurs rédox en solution permettent la construction de biopiles (*Liu et al. 2005*) et donnent le plus souvent d'intéressantes densités de courant. Néanmoins, la présence du médiateur dans l'électrolyte introduit tout de même de nouvelles limitations liées à la stabilité, la sélectivité et le transport de masse du médiateur vers l'électrode. De plus, il est dans ce cas nécessaire de séparer les compartiments anodique et cathodique et ainsi de perdre un des avantages des biopiles enzymatiques. L'utilisation de médiateurs immobilisés avec l'enzyme à la surface de l'électrode s'est pour cela intensivement développée ces 20 dernières années.

1.2.3.2.2 Les médiateurs immobilisés à la surface de l'électrode

Il est tout d'abord possible d'immobiliser avec l'enzyme les médiateurs classiquement utilisés en solution par simple adsorption physique à la surface des électrodes. Il a cependant été démontré que de tels médiateurs ainsi immobilisés perdent rapidement leurs activités une fois l'électrode en solution (*Torstensson et al. 1981*). Une autre méthode permet l'immobilisation physique du médiateur avec l'enzyme au sein même de l'électrode composée de graphite pressé. *Cosnier et al.* ont ainsi développé une biopile Glucose/O₂ sans membrane en utilisant les électrodes pressées contenant à l'anode le système glucose oxydase/ferrocène et le système laccase/ABTS à la cathode (*Cosnier et al. 2010*).

Le piégeage de l'enzyme au sein d'un hydrogel rédox reste la technique de médiation la plus fréquemment reportée dans la littérature. Des complexes rédox à base d'osmium ou de ruthénium sont incorporés dans un polymère hydrosoluble (poly(vinylimidazole), poly(vinylpyridine) ou poly(allylamide)) pour former un polymère redox pouvant être immobilisé sur une surface *via* crosslinking (*Gregg et al. 1991*) ou électro-polymérisation (*Gao et al. 2002*) pour constituer un hydrogel redox. Des exemples de polymères à base de sels d'osmium sont présentés dans la Figure 9. Dans de telles structures, les complexes d'osmium ou ruthénium ont une mobilité réduite ce qui permet un transfert d'électrons efficace *via* des échanges entre les complexes d'osmium voisins l'un de l'autre. Ces transferts d'électrons sont rapides et peuvent être assimilés à des processus de diffusion. Ils sont quantifiés par un coefficient de diffusion apparente (modèle de *Blauch et Saveant* (*Blauch et al. 1992*)) dépendant fortement de la flexibilité de la chaîne d'encrage des complexes d'osmium sur le squelette du polymère (*Mao et al. 2003*). Le potentiel redox du polymère peut être adapté à l'enzyme désirée en fonction des ligands utilisés pour chélater l'atome d'osmium (*Lever 1990*) donnant accès à une large banque de polymères anodiques ou cathodiques. L'immobilisation par crosslinking ou interactions électrostatiques des enzymes dans de tels hydrogels redox a permis

d'augmenter considérablement l'efficacité des transferts d'électrons entre la surface de l'électrode et le site actif de la protéine (Galloway et al. 2008).

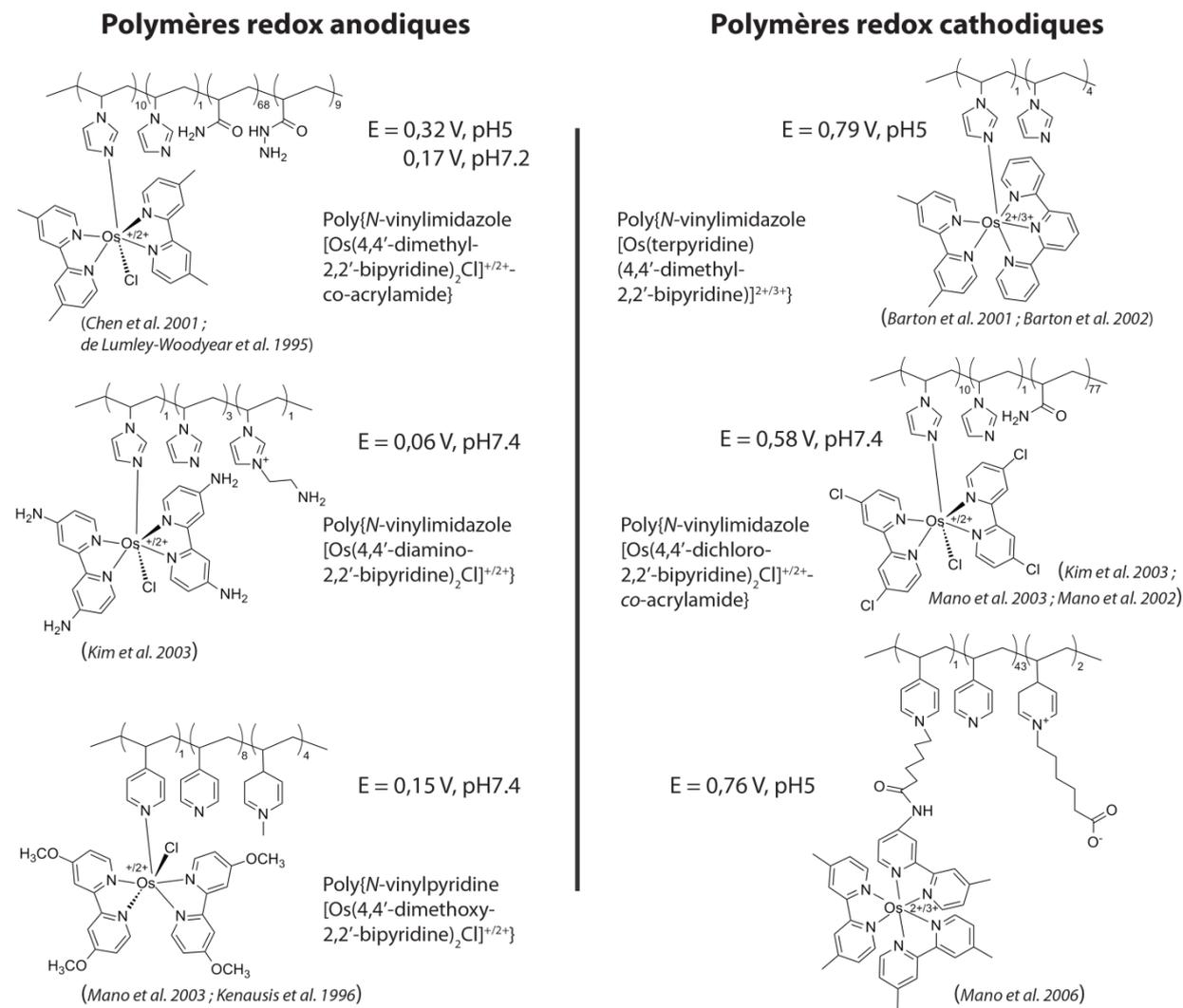


Figure 9 Différentes structures de polymères anodiques et cathodiques utilisés pour la formation d'hydrogels redox : le potentiel du polymère dépend à la fois de la structure de sa chaîne polymérique mais aussi de la structure du complexe d'osmium. Le polymère peut ainsi être anodique ($E < 0,3 \text{ V vs. SHE}$) (gauche) ou cathodique ($E > 0,6 \text{ V vs. SHE}$) (droite). (Potentiels vs. SHE)

On trouve de nombreux exemples d'utilisation de tels médiateurs pour le développement de bioanodes à base de glucose oxydase (de Lumley-Woodyear et al. 1995 ; Mao et al. 2003) et de biocathodes à base de laccases (Barton et al. 2001, 2001(b) et 2006 ; Mano et al. 2002 et 2006 ; Barrière et al. 2004 ; Jenkins et al. 2009) ou de bilirubine oxydase (Tsujiura et al. 2002 ; Mano et al. 2003(c) et 2004 ; Jenkins et al. 2009). La majorité des biopiles enzymatiques sans membrane les plus efficaces ont été développées en utilisant cette technique de médiation. Gao et al. ont ainsi mis au point une biopile glucose/O₂ générant 740 μW.cm⁻² à +0,54 V dans des conditions physiologiques, soit environ 10 fois plus que les densités de courant obtenues classiquement avec des biopiles à compartiment unique. Dans ce cas, des électrodes en microfibrilles de nanotubes de carbone ont été

fonctionnalisées avec une glucose oxydase à l'anode et une bilirubine oxydase à la cathode, toutes deux immobilisées par crosslinking dans un hydrogel rédox respectivement adapté (+0,05 V pour l'anode ; +0,54 V pour la cathode) (*Gao et al. 2010*). Plusieurs autres exemples utilisant le couple glucose oxydase/laccase sont présents dans la littérature (*Chen et al. 2001 ; Mano et al. 2003(b) ; Soukharev et al. 2004 ; Barrière et al. 2006*). Cette technique permet la miniaturisation de la biopile sans avoir à utiliser un DET (*Mano et al. 2003(d) ; Heller 2004*).

1.2.4 Les facteurs influençant les performances d'une biopile enzymatique

Bien que l'objectif de ce doctorat ne soit pas spécifiquement le développement d'une biopile la plus performante possible, il convient néanmoins de rappeler les différents facteurs influençant l'efficacité et la durée de vie d'une biopile enzymatique.

1.2.4.1 L'efficacité de la biopile enzymatique

La puissance P générée par une biopile est déterminée par l'équation suivante :

$$P = E \int I dt$$

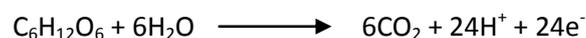
Si le courant est constant, alors : $P = E \cdot I$, où la tension de la biopile E dépend de la différence de potentiel entre cathode et anode ($E_c - E_a$) mais également des pertes ohmiques liées aux résistances du système : $E = E_c - E_a - \sum iR$. Pour maximiser la puissance générée, il faut donc maximiser la densité de courant délivrée (la quantité de courant par unité de surface) tout en maximisant la tension E.

La densité de courant est influencée par la quantité de biocatalyseurs immobilisés à la surface des électrodes, l'efficacité des transferts d'électrons entre électrodes et site actif des enzymes (donc également la quantité de médiateur dans le cas d'un MET), l'aire de la surface active des électrodes et les phénomènes de diffusion des substrats et/ou médiateurs vers la surface des électrodes et le site actif des enzymes.

La densité de courant est également améliorée en cas d'oxydation totale du carburant. Contrairement aux microorganismes entiers, l'utilisation d'enzymes comme biocatalyseurs ne permet qu'une oxydation partielle. Dans le cas du glucose par exemple, la glucose oxydase (GOx) ne catalyse que l'oxydation à deux électrons du glucose en gluconolactone :



alors qu'une molécule de glucose peut potentiellement libérer $24e^-$ lors de son oxydation complète en CO_2 :



L'immobilisation de plusieurs enzymes sur une même électrode peut permettre la catalyse de l'oxydation en cascade du carburant, mais peu d'exemples sont pour l'instant présents dans la littérature (*Palmore et al. 1998 ; Akers et al. 2005 ; Sokic-Lazic et al. 2011*).

Pour obtenir une tension E_{cell} optimale, il est tout d'abord nécessaire de maximiser la force électromotrice $E_c - E_a$ par un choix judicieux des systèmes rédox mis en jeu. Dans le cas d'un DET, cette force électromotrice ne va dépendre que du potentiel rédox formel des biocatalyseurs utilisés. Par contre, le potentiel d'opération d'une électrode fonctionnant avec un MET est dominé par le potentiel rédox du médiateur. Ainsi, dans ce cas, la force électromotrice de la biopile sera principalement imposée par les potentiels rédox des médiateurs utilisés (Figure 10). Les résistances ohmiques ΣiR doivent, quand à elles, être minimisées, principalement par des considérations géométriques (orientation des électrodes, distance entre les électrodes, connexions électriques...) mais également en favorisant la conductivité des protons dans l'électrolyte et aux électrodes (la présence d'une membrane séparatrice introduit une résistance supplémentaire). Un prototype miniature fonctionnant au sein d'un compartiment unique est donc à favoriser pour réduire les pertes ohmiques.

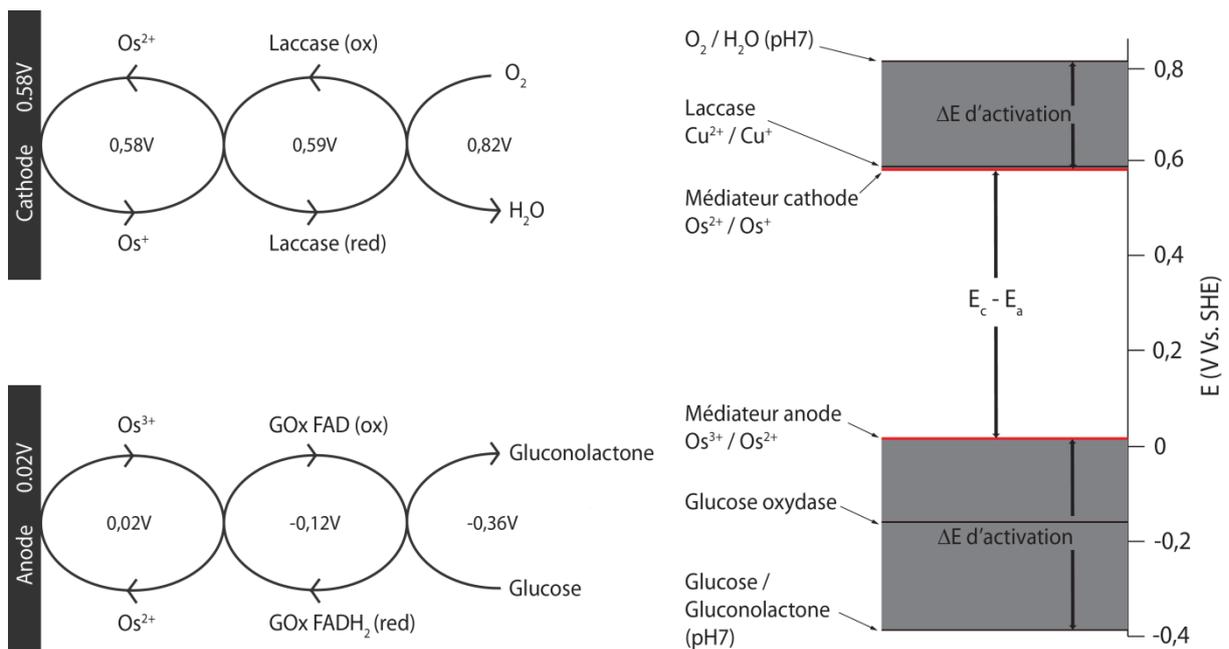


Figure 10 Exemple de biopile glucose/O₂ utilisant des hydrogels redox : la force électromotrice réelle de la biopile ($E_c - E_a$) est imposée par les potentiels rédox des médiateurs (ici des polymères à base d'osmium) et est inférieure à un maximum théorique donné par la différence formelle de potentiel entre carburant (glucose) et oxydant (O₂). A droite : les différentes réactions mises en jeu à l'anode et à la cathode. A gauche : diagramme de potentiel figurant les différents couples rédox mis en jeu. Adapté depuis Barton et al. 2004

1.2.4.2 La durée de vie de la biopile enzymatique

Plusieurs facteurs conditionnent la durée de vie d'une biopile enzymatique. Tout d'abord, celle-ci dépend intrinsèquement de la stabilité des enzymes immobilisées à la surface des électrodes. Les

enzymes étant des protéines ayant des durée de vie de l'ordre de 8 h à 2 jours en solution tampon, la plupart des biopiles enzymatiques fonctionnent en opération continue sur une durée de quelques jours seulement. La structure tridimensionnelle du site actif ainsi que celle de la protéine entière participant à l'activité catalytique de l'enzyme, la technique d'immobilisation doit idéalement permettre de garder la conformation native de la protéine intacte pour ne pas la dénaturer ou l'inactiver (*Moehlenbrock et al. 2008*).

Le développement de nouvelles techniques d'immobilisation, comme par exemple l'utilisation d'hydrogels rédox, a permis d'augmenter la durée de vie des biopiles à l'échelle du mois. Une des techniques les plus prometteuses est l'encapsulation physique de l'enzyme au sein d'un matériau poreux, la plupart du temps un polymère. La taille des pores est maintenue suffisamment large pour faciliter la diffusion des substrats et médiateurs ainsi que des protons (et ainsi maximiser les densités de courant tout en minimisant les pertes ohmiques) mais également suffisamment petite pour limiter la diffusion de l'enzyme en dehors de la matrice poreuse. L'enzyme se retrouve capturée dans sa conformation native dans un microenvironnement tamponné et conserve son activité catalytique sur de plus longues périodes. *Minteer et al.* ont ainsi utilisé du Nafion® modifié avec du bromure de tetrabutylammonium pour développer une biopile EtOH/O₂ dont la durée de vie s'est avérée supérieure à un mois (*Moore et al. 2004 ; Topcagic et al. 2006*). En raison du coût du Nafion® et de sa structure perfluorée non biodégradable, les intérêts se portent récemment sur le chitosan, un polysaccharide cristallin biocompatible possédant des fonctions amines et acides carboxyliques et dont la porosité peut être contrôlée, permettant l'immobilisation de protéines (*Klotzbach et al. 2006*). *Liu et al.* ont démontré qu'une matrice de chitosan dopée avec des nanotubes de carbone permettait de mesurer un DET avec une GOx (*Liu et al. 2005(b)*). Cette technique n'a cependant été que peu utilisée pour des applications biopiles (*Tan et al. 2009*). Pour plus de détails sur l'influence des différentes techniques d'immobilisation sur la stabilité des biopiles voir *Moehlenbrock et al. 2008* et sur l'utilisation de matériau mésoporeux voir *Kim et al. 2005*. Dans le cas d'une biopile fonctionnant avec des MET, la stabilité des médiateurs rentre évidemment en compte dans la durée de vie de la biopile (*Barton et al. 2004*).

1.2.5 Les enzymes cathodiques : le cas des "multicopper oxidase"

1.2.5.1 Présentation

La plupart des biocathodes enzymatiques utilisent l'oxygène comme oxydant, tout simplement en raison de sa disponibilité et de son haut potentiel de réduction. On trouve également des exemples utilisant l'eau oxygénée, les cathodes étant dans ce cas modifiées avec des peroxydases (*Pizzariello et al. 2002*) ou des microperoxydases (*Katz et al. 1999 ; Ramanavicius et al. 2005 et 2008*). Les deux enzymes les plus utilisées pour la réduction de l'O₂ en H₂O appartiennent à la classe des "multicopper oxidases" : il s'agit des bilirubines oxydases (bilirubin: oxygen oxidoreductase, EC 1.3.3.5) et des

laccases (Lc, benzenediol: oxygen oxidoreductase, EC 1.10.3.2). Les "multicopper oxidases" constituent une classe importante d'enzymes qui catalysent la réduction à $4e^-$ de $l'O_2$ en H_2O avec l'oxydation concomitante à $1e^-$ de leur substrat. Plusieurs revues décrivent en détail les propriétés physico-chimiques de ces enzymes (Solomon *et al.* 1996 et 2001) ainsi que leur électrochimie en relation avec leur biochimie et leur structure (Shleev *et al.* 2005). Nous nous limiterons ici aux laccases étant donné le sujet de ce doctorat (pour des exemples de biocathodes fonctionnant avec une bilirubine oxydase, voir Gao *et al.* 2007 ; Habrioux *et al.* 2008).

Historiquement, les laccases ont été découvertes par Yoshida en 1883 en constatant le rapide durcissement en présence d'air du latex produit par les arbres à laque du Japon (*Rhus verniciflua*) (Call *et al.* 1997). Les laccases sont classées en fonction de leur origine : elles sont abondantes dans la nature et sont principalement produites par les plantes et les champignons, mais sont également présentes chez les bactéries ou encore les insectes (Claus 2004). Les laccases ont la caractéristique d'être peu spécifiques vis-à-vis de leur substrat, étant capables d'oxyder diphénols, aminophénol, polyphénols, polyamines, lignines et aryldiamines (Thurston 1994 ; Quintanar *et al.* 2007 ; Gutiérrez *et al.* 2009). Elles sont utilisées dans de nombreuses applications illustrées dans les revues suivantes : Mayer *et al.* 2002, Duran *et al.* 2002, Couto *et al.* 2006 et Mikolasch *et al.* 2009. Elles sont particulièrement prometteuses en tant que catalyseurs "verts" pour de nombreuses applications biotechnologiques comme les biocapteurs (Jarosz-Wilkolazka *et al.* 2005), le blanchiment de la pâte à papier (Rochefort *et al.* 2004) et notamment les biopiles pour la réduction de $l'O_2$ en H_2O .

En tant que "multicopper oxidase", les laccases sont caractérisées par la présence de quatre atomes de cuivre ayant des propriétés spectroscopiques différentes (Figure 11a). Un atome de cuivre dit de type 1 (T_1) exhibant une bande d'absorption très intense à environ 600 nm responsable de la couleur bleue de la protéine en solution (ces enzymes sont souvent appelées "blue copper oxidase"). Un atome dit de type 2 (T_2) qui ne présente aucune absorption dans le visible et enfin deux atomes dits de type 3 (T_3) formant un cluster binucléaire et présentant une bande d'absorption à environ 330 nm. Ces atomes de cuivre peuvent être divisés en deux centres cuivreux, l'un constitué par l'atome T_1 et l'autre par le cluster trinucléaire T_2 - T_3 . Comme dans l'exemple présenté en Figure 11a et b (Laccase TvLac de *Trametes versicolor*), l'atome T_1 présente toujours une coordination de type bipyramidale à base triangulaire avec systématiquement deux histidines et une cystéine. Une des positions axiales est vacante pour permettre la fixation du substrat tandis qu'un ligand axial, variant suivant l'origine de l'enzyme, complète la bipyramide. Le centre T_2 - T_3 possède huit ligands histidines : l'atome T_2 est lié à deux histidines et un ligand oxygène tandis que le centre T_3 interagit avec six histidines, un pont hydroxyle liant les deux atomes Cu_3 et Cu_4 . Le centre T_1 est plus proche de la surface de la protéine et de la cavité de fixation du substrat, généralement à environ 13 Å du centre T_2 - T_3 plus enfoui dans la structure protéique.

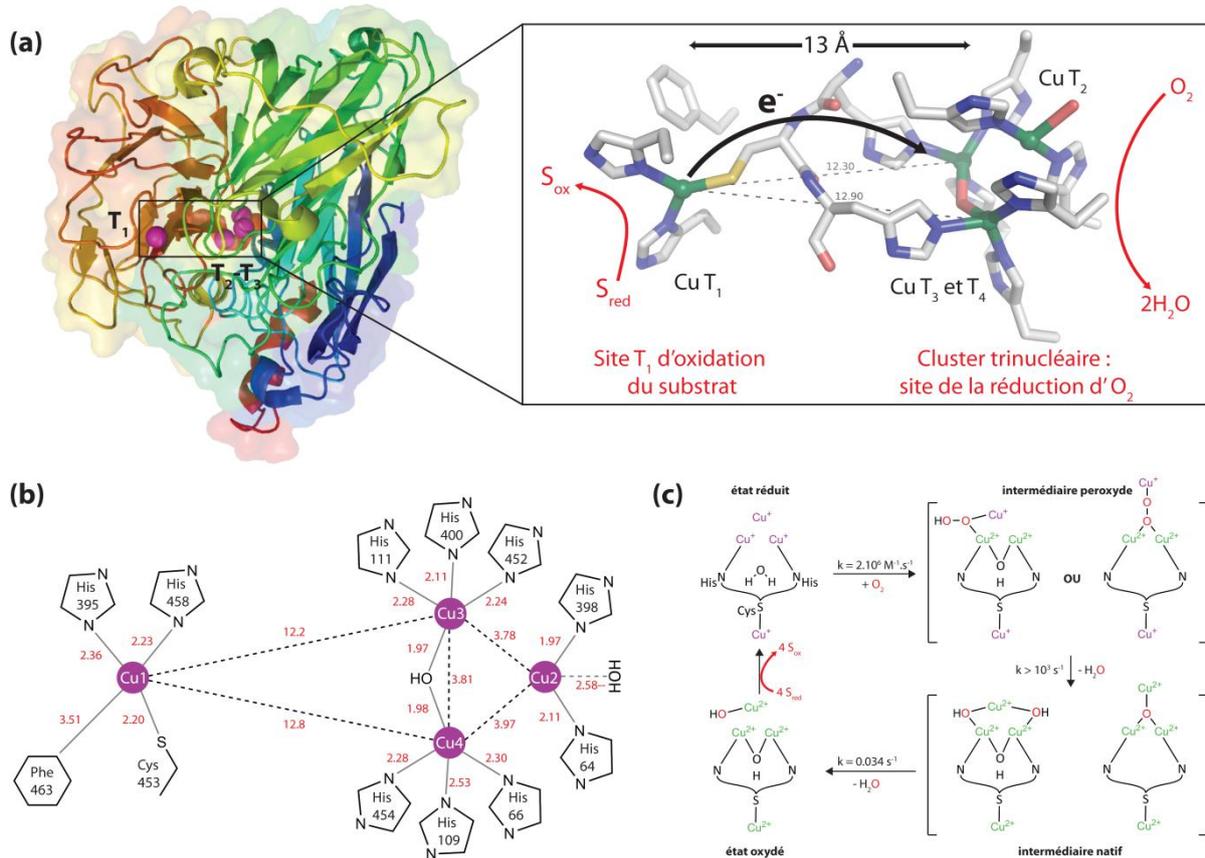


Figure 11 *Un exemple de multicopper oxidase : la laccase de *Trametes versicolor* (TvLac) :* **(a)** Localisation des centres cuivreux T_1 et T_2 - T_3 au sein de la structure de la protéine. Schématisation du transfert d'électron d'un site cuivreux à l'autre. L'oxydation du substrat a lieu au niveau du centre T_1 . Les électrons sont transférés via un motif His-Cys-His au site T_2 - T_3 où l'oxygène est réduit en H_2O . **(b)** Coordinations des différents atomes de cuivre T_1 , T_2 et T_3 . L'atome T_1 présente deux ligands His et un ligand Cys ainsi qu'un ligand axial Ile faiblement coordonnant. Les deux atomes T_3 possèdent six ligands His et sont reliés par un pont hydroxyle. Le centre T_2 possède deux ligands His. **(c)** Mécanisme supposé de réduction de O_2 en H_2O

Les deux centres cuivreux interviennent dans l'activité catalytique de l'enzyme : après fixation du substrat donneur d'électron, celui-ci est oxydé au niveau du centre T_1 selon un mécanisme de type ping-pong (Solomon *et al.* 1996). La réduction de O_2 en H_2O a lieu au niveau du centre T_2 - T_3 où les électrons sont transférés via un motif His-Cys-His reliant le centre T_1 au centre T_3 (Yamanaka *et al.* 1999) (Figure 11a). Le mécanisme de la réduction de O_2 n'est pour l'instant pas totalement compris mais un mécanisme se décomposant en deux réductions à $2e^-$ a pu être proposé en corrélation avec les données cinétiques et structurales disponibles (Palmer *et al.* 2001) (Figure 11c). Ce mécanisme est détaillé dans la revue Solomon *et al.* 2008.

Une des caractéristiques clefs des laccases, importante notamment pour des applications biopile, est le potentiel de ses deux sites rédox. L'efficacité catalytique de l'enzyme envers ses substrats dépend principalement du potentiel formel du centre T_1 (Xu *et al.* 1996). La valeur du potentiel rédox du centre T_1 a ainsi été déterminée par titrage potentiométrique pour de nombreuses laccases et varie entre 400 et 800 mV Vs. SHE) suivant l'origine de l'enzyme (Barton *et al.* 2004 ; Shleev *et al.* 2005(b)). On peut ainsi classer les laccases en trois catégories en fonction de leur potentiel rédox : les laccases

à bas potentiel (plantes, comme par exemple *Rhus verniciflua* ; 400-420 mV Vs. SHE)), les laccases à potentiel dit moyen (champignons comme basidiomycètes (*Coprinus cinereus* ou *Rhizoctonia solani*) ; 470-700 mV Vs.SHE) et les laccases à haut potentiel (champignons comme *Trametes hirsuta*, *Trametes versicolor* ou *Trametes villosa* ; 770-790 mV Vs. SHE).

Les laccases fongiques à haut potentiel ont reçu beaucoup d'attention ces dernières années en raison de leur abondance et de leur potentiel rédox élevé. Bien que, comme nous l'avons vu auparavant, la plupart des laccases fongiques à haut potentiels aient démontré des propriétés de DET avec une électrode (Shleev et al. 2005b ; Ivnitski et al. 2007), la plupart des systèmes développés aujourd'hui utilisent soit un médiateur en solution, l'ABTS (Palmore et al. 1999 ; Vaz-Dominguez et al. 2008 ; Merle et al. 2008), soit un médiateur immobilisé à la surface de l'électrode, comme des hydrogels rédox (Barton et al. 2001, 2001(b) et 2006 ; Mano et al. 2002 et 2006 ; Barrière et al. 2004 ; Jenkins et al. 2009). Deux laccases sont majoritairement utilisées dans la littérature. Tout d'abord, la laccase commerciale de *Trametes versicolor* (TvLac) est considérée comme la laccase de référence pour la conception de biocathodes (Barrière et al. 2004 ; Servat et al. 2007 ; Deng et al. 2008 ; Merle et al. 2008 ; Tan et al. 2009). Plusieurs biopiles glucose/O₂ utilisant cette enzyme couplée à une GOx ont été décrites, que se soit dans un unique compartiment (Barrière et al. 2006 ; Brunel et al. 2007 ; Li et al. 2008 ; Cosnier et al. 2010) ou dans deux compartiments séparés (Liu et al. 2005). Plus récemment, la laccase de *Trametes hirsuta* a été également largement utilisée pour la fonctionnalisation de biocathodes (Vaz-Dominguez et al. 2008 ; Frascioni et al. 2010 ; Ackermann et al. 2010), notamment en association avec des hydrogels redox (Chen et al. 2001 ; Barton et al. 2001b ; Mano et al. 2003, 2006 et 2008 ; Soukharev et al. 2004 ; Coman et al. 2008).

Nous avons dans un premier temps choisi d'utiliser la laccase de *Trametes versicolor* disponible commercialement pour le développement des outils électrochimiques. Ces outils ont été ensuite appliqués à la laccase modèle du projet : CotA de *Bacillus subtilis*.

1.2.5.2 L'enzyme modèle choisie : la laccase CotA de *Bacillus subtilis*

1.2.5.2.1 Généralités

Les laccases bactériennes n'ont été que très peu utilisées dans le domaine des biopiles en raison de potentiels rédox généralement plus faibles que ceux des laccases fongiques. La laccase bactérienne CotA de *Bacillus subtilis* présente cependant des propriétés extrêmophiles très intéressantes pour le développement de biocathodes utilisables dans une biopile.

La laccase CotA, protéine de 65 kDa, est un constituant abondant de l'enveloppe externe des endospores produits par les bactéries Gram+ *Bacillus subtilis* (Driks 1999 ; Henriques et al. 2000). Les endospores sont produits par la bactérie afin de résister à des conditions extrêmes, c'est-à-dire un environnement physique ou chimique pouvant rapidement détruire la bactérie originelle, ce qui

confère à CotA une forte stabilité sur une large plage de température et de pH. La fonction exacte de CotA au sein de l'enveloppe externe de l'endospore est encore méconnue bien que l'expression du gène *cotA* soit considérée comme impliquée dans la biosynthèse d'un pigment brun protégeant l'endospore contre les rayonnements UV (Hullo *et al.* 2001). L'expression de la CotA est également nécessaire pour la résistance de l'endospore à H₂O₂ (Riesenman *et al.* 2000).

1.2.5.2.2 Structure de la laccase CotA

La structure cristallographique de CotA (PDB : 1gsk) a été déterminée par diffraction des rayons X pour donner la première structure tridimensionnelle d'une laccase bactérienne (Enguita *et al.* 2003). Sa structure a pu être comparée aux différentes structures connues de laccase. Les structures cristallographiques de nombreuses laccases principalement fongiques ont en effet été déterminées ces dernières années : *Trametes versicolor* (PDB : 1gyc) (Piontek *et al.* 2002), *Trametes hirsuta* (PDB : 3fpx) (Polyakov *et al.* 2009), *Melanocarpus albomyces* (PDB : 1gw0) (Hakulinen *et al.* 2002). Un alignement avec plusieurs séquences homologues, notamment TvLac, est fourni pour information en Annexe 1. CotA est une protéine monomérique (70 x 50 x 20 Å) dont le repliement global est similaire aux autres laccases et "multicopper oxidases" en général avec trois domaines cuprédoxines incluant les deux sites cuivreux T₁ et T₂-T₃ (Figure 12).

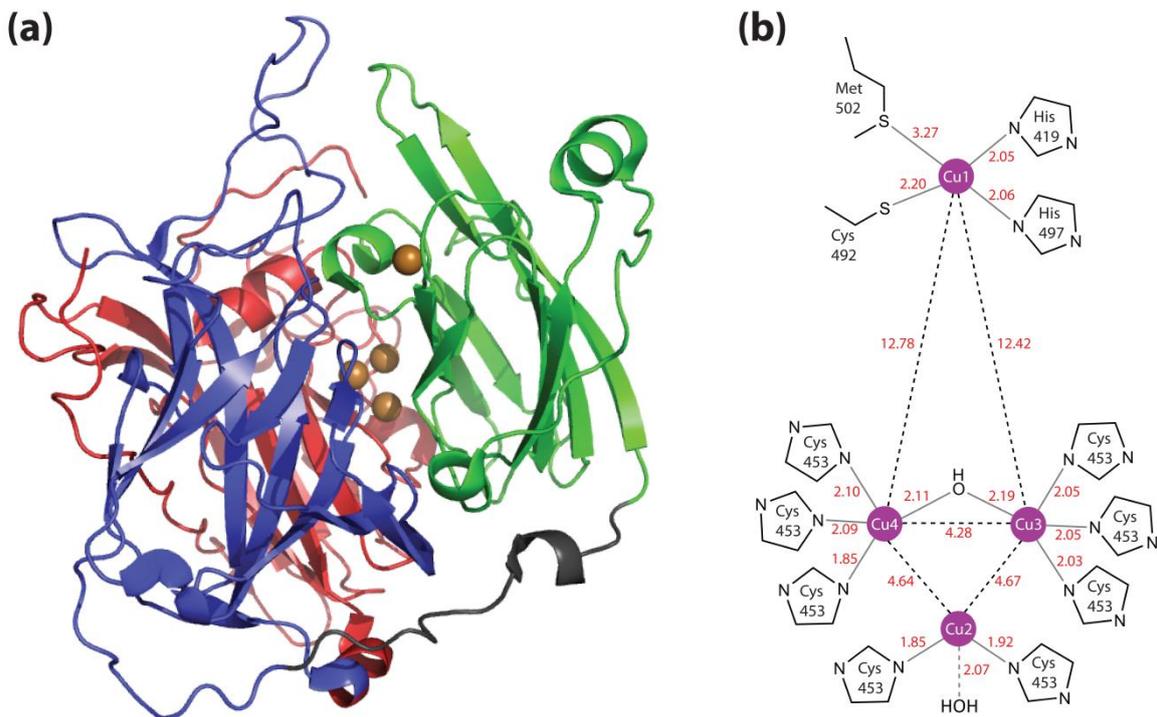


Figure 12 *La laccase CotA* : (a) Structure tridimensionnelle de la laccase CotA présentant les trois domaines 1 (bleu), 2 (rouge) et 3 (vert) ainsi que la localisation des atomes de cuivre au sein de la protéine. (b) Coordinations des différents atomes de cuivre T₁, T₂ et T₃

Un repliement cuprédoxine est principalement constitué de 8 brins de tonneau β en motif de clef grecque, comprenant deux feuillets β composés de quatre brins, arrangé dans une conformation de

type sandwich. Le domaine 1 (bleu, résidus 2-176) comprend huit brins organisés en tonneau β et commence par une courte région torsadée connectant les domaines 1 et 2 et stabilisée par des liaisons hydrogènes. Cette région torsadée est absente chez les laccases fongiques et contribue au haut degré d'empilement de la structure. Le domaine 2 (rouge, résidus 183-340) comprend un tonneau β formés de 12 brins et agit comme un pont entre les domaines 1 et 3 : une courte hélice α (résidus 177-182) connecte le domaine 1 tandis qu'une large boucle est liée au domaine 3 (résidus 341-368). Le domaine 3 (vert, résidus 369-501) contient le site T_1 et contribue à la formation du site T_2-T_3 se trouvant à l'interface entre les domaines 1 et 3. Le domaine 3 contient également la cavité de fixation du substrat, localisée à la surface de la protéine proche du site T_1 . L'atome T_1 présente la coordination typique de bipyramide à base triangulaire avec deux histidines et une cystéine et possède un résidu Met en position axiale (résidu Phe pour TvLac) (Figure 13). Le centre T_2-T_3 possède également les huit ligands histidines caractéristiques : l'atome T_2 est lié à deux histidines et un ligand oxygène tandis que le centre T_3 interagit avec six histidines, un pont hydroxyle liant les deux atomes Cu_3 et Cu_4 .

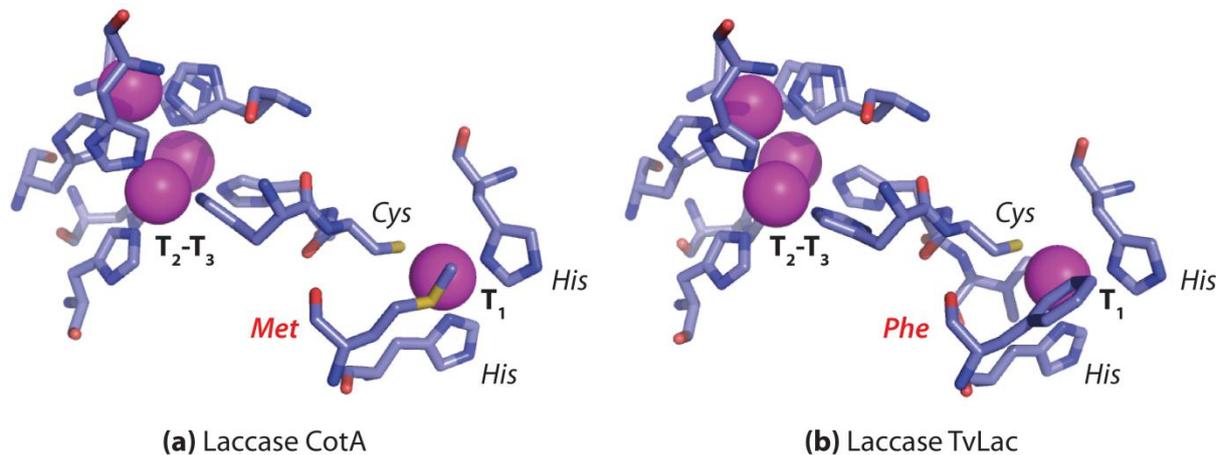


Figure 13 *Comparaison de l'environnement des atomes de cuivre chez CotA et TvLac : (a) Ligand axial Met pour CotA. (b) Ligand axial Phe pour TvLac*

Plusieurs caractéristiques structurales semblent cependant spécifiques de CotA en comparaison aux laccases fongiques (la Figure 14 présente la comparaison avec TvLac). Tout d'abord, la cavité de fixation du substrat, principalement formée d'acides aminés apolaires, est bien plus large que d'ordinaire (1346 Å contre 268 Å pour TvLac) (en bleu sur Figure 14c et d). Une boucle et une courte hélice α constitue un bras proche du site de fixation et semble jouer le rôle de clapet pour réguler l'accessibilité du substrat (en rouge sur Figure 14a). Enfin, les trois domaines de la protéine sont liés les uns aux autres par des boucles externes, des liaisons hydrogènes et des interactions hydrophobes, ce qui confère à la structure globale une compacité supérieure à la moyenne pour une "multicopper oxidase". Il a été proposé que ce haut degré de compacité de la structure protéique soit à l'origine des propriétés thermophiles de CotA.

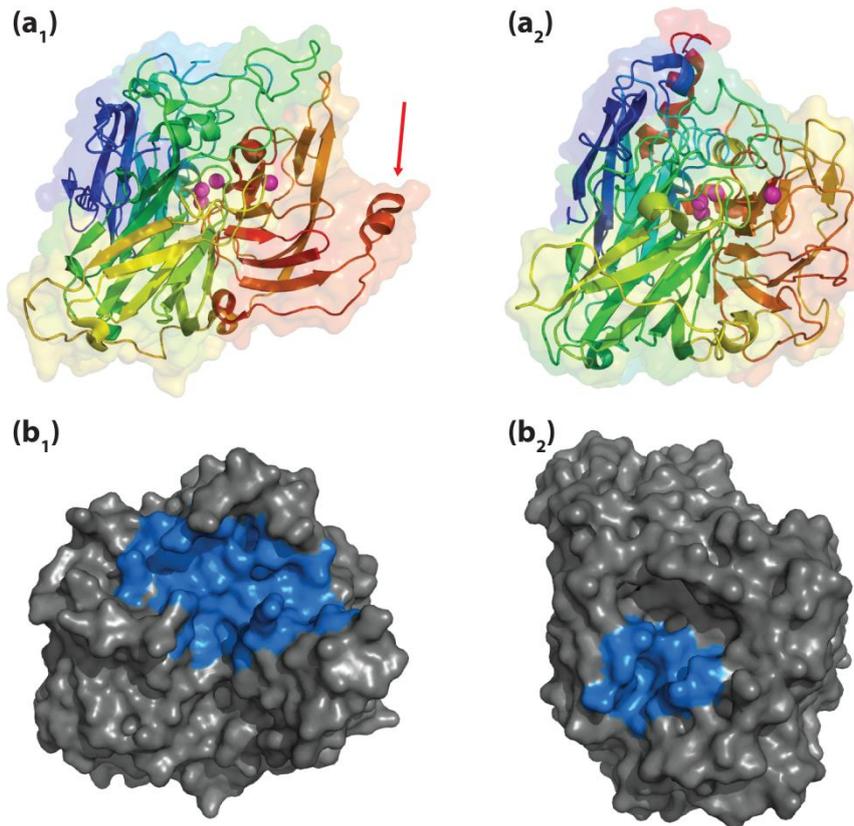


Figure 14 Structures tridimensionnelles des laccases CotA (colonne de gauche) et TvLac (colonne de droite) : **(a₁)** et **(a₂)** Représentations arc en ciel du N-terminal en bleu au C-terminal en rouge, incluant la localisation des atomes de cuivre en violet. **(b₁)** et **(b₂)** Représentation de la surface des protéines. La cavité de fixation du substrat est précisée en bleu (déterminée en utilisant le serveur CASTP (Liang et al. 1998)). Les vues correspondent à une rotation horaire de 45° (axe des x pour (b₁) et des y pour (b₂)) par rapport à (a₁) et (a₂) pour faciliter la visualisation de la cavité de fixation du substrat

1.2.5.2.3 Pourquoi la laccase CotA comme modèle ?

Bien que certaines laccases présentent des propriétés thermostables (Hilden et al. 2009), aucune d'entre elles n'a jamais été utilisée dans le domaine des biopiles. Alors que les laccases fongiques classiquement utilisées ont une température optimale de fonctionnement comprise entre 30 et 50°C, CotA présente des propriétés thermophiles très intéressantes avec une température optimale de fonctionnement de 75°C et une demi-vie d'inactivation de 2 h à 80°C (Martins et al. 2002). Même si l'activité maximale de CotA est atteinte pour une température de 75°C, l'enzyme est également active à 20°C et possède à cette température une efficacité catalytique plus élevée que TvLac. CotA est donc potentiellement utilisable dans une biopile fonctionnant dans des conditions de température physiologique. Ses propriétés thermophiles sont en plus intéressantes du point de vue de la stabilité qu'elles lui confèrent. La création de biocathodes stables est en effet un point crucial dans le développement de biopiles. Pour ces raisons, nous avons décidé d'évaluer cette enzyme modèle en tant que catalyseur cathodique pour la réduction de l'O₂ en H₂O et d'optimiser ses performances par évolution dirigée des protéines. Les critères à évoluer et la stratégie adoptée seront discutés dans les parties suivantes.

1.2.6 Les enzymes anodiques

Trois carburants sont principalement utilisés pour le fonctionnement des bioanodes : l'hydrogène, les alcools et les sucres. Les hydrogénases se sont montrées aussi efficaces que le platine pour l'oxydation de l' H_2 (Jones et al. 2002 ; Karyakin et al. 2007). Cependant, ces enzymes sont généralement sensibles à l' O_2 (Vincent et al. 2005) et sont souvent instables une fois immobilisées à la surface d'une électrode (Vincent et al. 2006). L'utilisation d'alcools simples a également été considérée avec l'utilisation d'alcool déshydrogénases, soit NAD-dépendantes (Palmore et al. 1998 ; Topcagic et al. 2006), soit PQQ-dépendantes (Ramanavicius et al. 1999 ; Razumiene et al. 2001 ; Laurinavicius et al. 2002). Un autre substrat intéressant est le lactate, qui peut être oxydé par une lactate déshydrogénase (Treu et al. 2008 ; Lee et al. 2008).

Le type de carburant le plus étudié pour le compartiment anodique d'une biopile enzymatique reste cependant les sucres, qui abondent dans la nature. Parmi les différents sucres communément utilisés, le glucose a reçu le plus d'attention. Les enzymes pouvant oxyder le glucose se divisent en deux catégories : les glucoses oxydases (GOx), qui utilisent l' O_2 comme accepteur d'électrons, et les glucoses déshydrogénases (GDH) qui utilisent un autre accepteur d'électrons (NAD, PQQ...). Bien que ces enzymes ne présentent que très rarement un DET avec les électrodes, elles demeurent les enzymes les plus fréquemment utilisées pour la conception de bioanodes. La littérature regorge d'exemples utilisant une GOx pour fonctionnaliser une électrode (Degani et al. 1985 ; Schuhmann et al. 1991 ; Liu et al. 2005 ; Ivnitski et al. 2006 ; Kuwahara et al. 2006 ; Pellissier et al. 2008). Dans la plupart des cas, les GOx sont associées à des laccases pour constituer des biopiles Glucose/ O_2 (Mano et al. 2003, 2006 et 2008 ; Barrière et al. 2006 ; Liu et al. 2007b ; Kavanagh et al. 2009). La GOx la plus couramment utilisée est la GOx d'*Aspergillus niger*, même si l'on trouve dans la littérature d'autres exemples (GOx de *Penicillium pinophilum*, Mano 2008).

La GOx d'*Aspergillus niger* est une enzyme qui catalyse l'oxydation du β -D-glucose en glucono- δ -lactone, qui s'hydrolyse par la suite en acide D-gluconique (Figure 15c). Parallèlement, l' O_2 est réduit en H_2O_2 . La protéine est dimérique et d'une taille de 155-160 KDa (Figure 15a ; PDB : 1gal ; Hecht et al. 1993). Les deux sous-unités contiennent chacune une molécule de cofacteur rédox flavine adénine dinucléotide (FAD) non liée de manière covalente à l'apoenzyme et qui jouent le rôle de centre rédox lors de la catalyse (Figure 15b). La structure cristallographique de l'enzyme a été déterminée avec une résolution de 2,3 Å (Hecht et al. 1993). Le potentiel redox réversible du couple FAD/FADH₂ dépend de son environnement : à pH7.0, le potentiel de la flavine en solution est de -0,23 V vs. SHE tandis qu'il est de -0,12 V vs SHE une fois le FAD immobilisé au sein de la GOx. L'utilisation d'un médiateur en solution comme le ferrocène-méthanol permet de s'affranchir de la dépendance de l'enzyme en O_2 pour la régénération du FAD (Figure 15c).

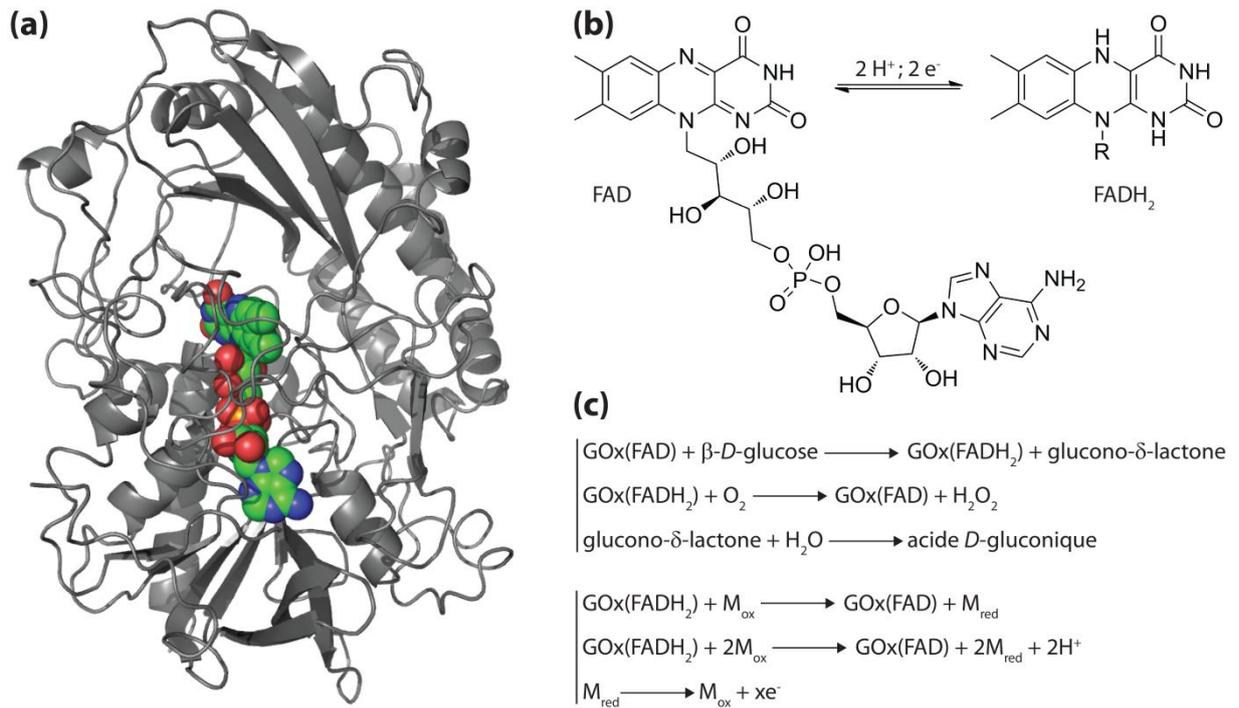


Figure 15 *La glucose oxydase d'Aspergillus niger*: **(a)** Structure tridimensionnelle de la GOx d'Aspergillus niger avec localisation des molécules de FAD au sein de la structure. **(b)** Structure du couple FAD / FADH₂ **(c)** Réactions catalysées par la GOx en absence et en présence de médiateur rédox

Nous avons utilisé dans ce doctorat cette GOx largement utilisée et disponible commercialement pour développer une bioanode de référence permettant de pouvoir évaluer et comparer les différentes biocathodes développées.

1.3 Conclusion

*Les objectifs de ces travaux de doctorat sont, pour cette partie du projet, de mettre au point les outils électrochimiques nécessaires à l'évaluation de CotA en tant que biocatalyseur de la réduction de l'O₂ en H₂O. Les outils développés devront permettre une analyse reproductible de l'activité de la protéine immobilisée à la surface d'une électrode et devront donc comprendre une technique fiable d'immobilisation de la protéine à la surface de l'électrode. Les biocathodes ainsi fonctionnalisées seront dans un premier temps étudiées séparément dans un système électrochimique classique à trois électrodes puis seront ensuite évaluées dans une biopile enzymatique complète glucose/O₂ en les couplant à une bioanode de référence développée avec la GOx d'*Aspergillus niger*. Les outils seront tout d'abord développés avec la laccase commerciale TvLac pour être ensuite appliqués à CotA.*

Ces outils électrochimiques seront disponibles pour la caractérisation et l'évaluation de différents mutants optimisés de la laccase CotA. L'objectif de ce doctorat est en effet d'utiliser l'évolution dirigée des protéines pour améliorer les performances de CotA pour son utilisation dans une biopile enzymatique.

Trois stratégies sont aujourd'hui suivies pour augmenter l'efficacité et la durée de vie d'une biopile enzymatique. La première, majoritairement utilisée, consiste à modeler l'environnement de l'enzyme à la surface de l'électrode (optimisation de la technique d'immobilisation de la protéine et du matériau de l'électrode) afin d'augmenter la constante de transfert d'électrons entre l'enzyme et l'électrode et la stabilité de la protéine immobilisée. La seconde vise au développement de la géométrie de la cellule de la biopile permettant d'associer un couple biocathode/bioanode judicieusement choisi tout en minimisant les pertes liées aux résistances du système. Enfin, la dernière stratégie, très peu explorée pour l'instant, vise à optimiser directement les propriétés catalytiques et/ou la stabilité des enzymes elles-mêmes en utilisant l'évolution dirigée des protéines.

2 L'évolution dirigée des protéines

Dans la nature, l'évolution est assurée par la survie et la reproduction des cellules, organismes ou populations les mieux adaptées à leur environnement. A travers de nombreux cycles itératifs de mutations et sélection, l'évolution naturelle a créé des milliers de protéines ayant différentes fonctions. Nos connaissances quant au processus permettant l'émergence de protéines possédant une nouvelle fonction demeurent relativement restreintes. Cependant, en mimant de manière accélérée les principes de l'évolution naturelle à l'échelle du laboratoire, l'homme a tenté avec succès d'altérer la fonction ou les propriétés d'une protéine par rapport à ses propres besoins. Aujourd'hui, la communauté scientifique se sert de l'évolution dirigée comme un outil extrêmement performant pour la production de nouveaux catalyseurs utiles dans les biotechnologies, en diagnostique, ou encore en médecine. Le principe de base de l'évolution dirigée repose sur l'application des principes Darwinien de l'évolution naturelle à l'échelle du laboratoire et peut se décomposer en trois étapes majeures : création de diversité génétique sous la forme d'une banque de gènes ; sélection ou criblage des gènes codant pour l'activité désirée ; amplification et caractérisation des gènes (Figure 16).

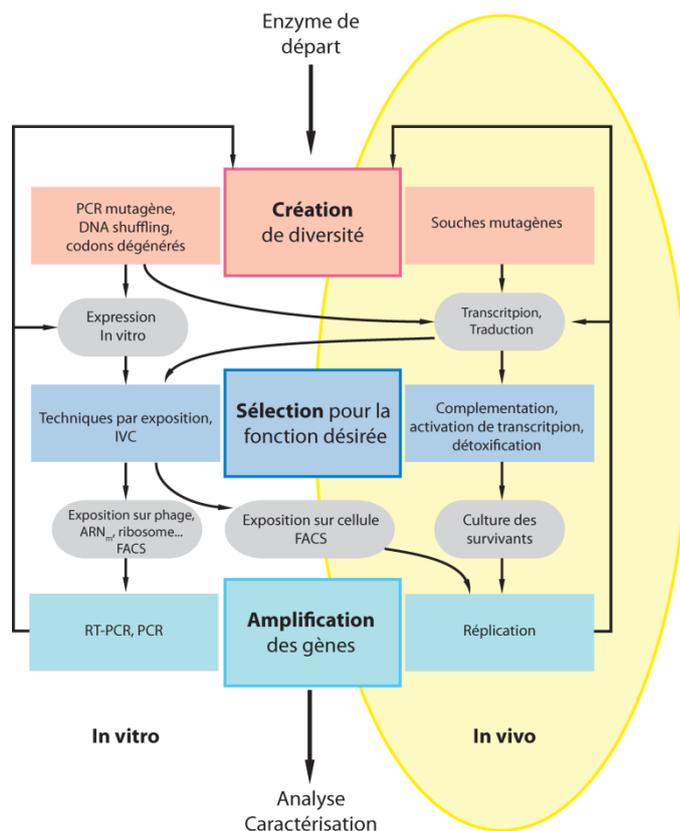


Figure 16 *Représentation schématique des principales stratégies et techniques de l'évolution dirigée : les principes Darwinien représentés par les rectangles centraux peuvent être accomplis dans des systèmes in vivo (à droite) ou in vitro (à gauche). Les flèches indiquent les différentes voies possibles reliant les étapes d'évolution. Adapté à partir de Jäckel et al. 2008*

En suivant cette voie, de nombreux ARN, ADN et protéines ont été évolués pour des applications industrielles, biotechnologiques ou pharmaceutiques, comme par exemple l'évolution de protéases résistantes aux détergents et à l'eau de javel pour les lessives (Kirk et al. 2002) ou encore l'évolution d'enzymes pour la biosynthèse de polymères (McCarthy et al. 2003) ou d'intermédiaires

pharmaceutiques (Fox et al. 2007). Toutefois, nos connaissances des relations structure/propriétés des protéines étant encore limitées, le succès d'une approche d'évolution dirigée dépend principalement de la technique utilisée et est un délicat compromis entre la qualité de la diversité génétique, la taille de la banque de gènes et la capacité à détecter l'activité optimisée. Un grand nombre de stratégies ont été développées ces vingt dernières années permettant la conception et l'optimisation de protéines, d'ARN ou d'ADN (Griffiths et al. 2000 ; Yuan et al. 2005 ; Turner 2009). La littérature extrêmement dense dans le domaine ne pouvant pas être mentionnée de manière exhaustive, il s'agit ici de présenter les principes de base de l'évolution dirigée et les stratégies permettant d'améliorer les propriétés catalytiques d'une enzyme.

2.1 La création de la diversité génétique

Les techniques de création de diversité génétique peuvent être regroupées en trois principales familles: i) mutagenèse dirigée, ii) mutagenèse aléatoire et iii) recombinaison (Figure 17) (Neylon 2004 ; Yuan et al. 2005 ; Sen et al. 2007). Le choix de la méthode de création de diversité génétique dépend intimement du degré de connaissance de la protéine d'intérêt ainsi que de nombreux paramètres comme le nombre, l'emplacement et le type de mutation à introduire.

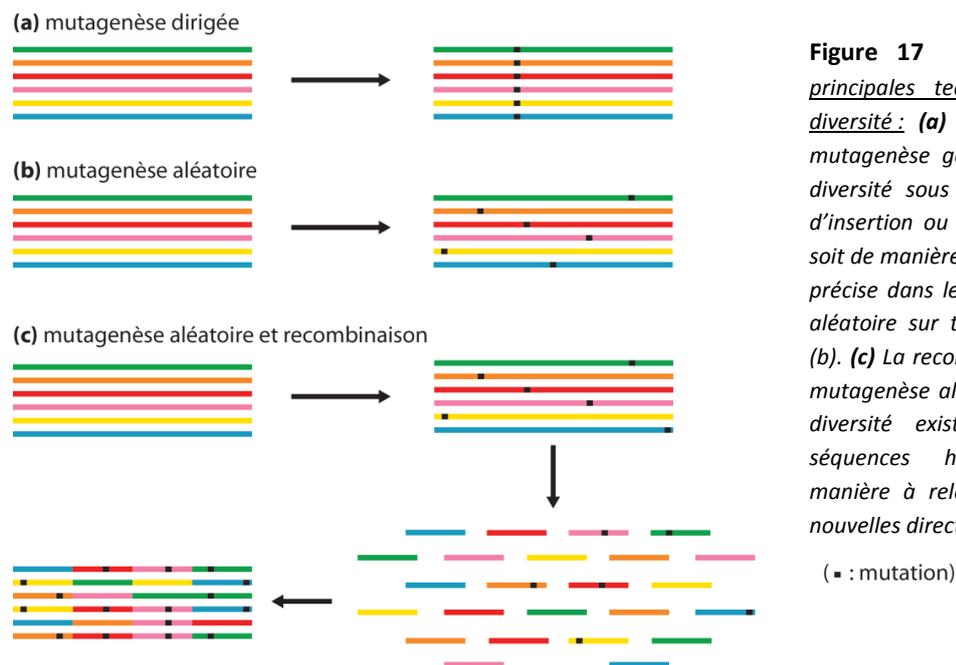


Figure 17 *Schématisation des trois principales techniques de création de diversité: (a) et (b) Les techniques de mutagenèse génèrent directement de la diversité sous la forme de substitution, d'insertion ou de délétion de nucléotide, soit de manière dirigée à une position bien précise dans le gène (a), soit de manière aléatoire sur toute la longueur du gène (b). (c) La recombinaison, ici associée à la mutagenèse aléatoire, vise à combiner la diversité existante (recombinaison de séquences homologues d'ADN) de manière à relancer la diversité vers de nouvelles directions*

Dans certains cas, lorsqu'on dispose d'une connaissance détaillée de la structure de la protéine modèle et des relations entre séquence, structure et fonction, une conception rationnelle de la protéine peut être envisagée. Dans ce cas, la mutagenèse dirigée est utilisée pour introduire un acide aminé défini à une position précise. Bien que de plus en plus de données structurales soient accessibles, et même si de plus en plus de programmes de modélisation moléculaire permettent de cibler certaines positions, il demeure néanmoins difficile de prédire quelle mutation sera bénéfique.

De plus, les effets de mutations multiples restent tout aussi difficilement prévisibles. L'ingénierie rationnelle des protéines s'est ainsi montrée beaucoup moins efficace que l'évolution dirigée des protéines.

L'évolution dirigée d'une protéine de structure connue peut être envisagée par mutagenèse aléatoire dirigée en introduisant alternativement un certain nombre d'acides aminés différents à une ou plusieurs positions contrôlées. Cette technique a souvent porté ses fruits notamment lorsque le site actif de l'enzyme comprend un nombre réduit d'acides aminés (*Chen-Goodspeed et al. 2001 ; Magnusson et al. 2001 ; Bornscheuer et al. 2002 ; Yoshikuni et al. 2006*). L'intérêt de choisir une stratégie de mutagenèse adéquate est de minimiser les cycles de sélection et d'augmenter les chances de trouver une mutation bénéfique (*Reetz et al. 2008*). Plusieurs exemples ont cependant montré que les données structurales ne suffisent pas pour définir les acides aminés à modifier au sein de la protéine (*Park et al. 2006*). Il est en effet important de combiner bioinformatique, données cinétiques et thermodynamiques pour l'ingénierie de la protéine ciblée et de ce fait, la mutagenèse dirigée n'a seulement été efficace que pour un nombre réduit d'enzymes bien connues.

La mutagenèse aléatoire est, elle, plus fréquemment utilisée lorsque les relations structure/propriété de la protéine ne sont pas connues en détail. Cette stratégie vise à induire des mutations à des positions aléatoires le long de l'ADN *via* plusieurs techniques (mutagènes chimiques ou physiques, souches mutantes, PCR mutagène...). La mutagenèse aléatoire est souvent intéressante puisque les mutations affectant les propriétés de l'enzyme se trouvent généralement à des positions éloignées du site actif et sont difficiles à prédire même lorsque les données structurales sont disponibles (*Morley et al. 2005 ; Turner 2009*). Des mutations distantes du site actif peuvent en effet affecter l'activité catalytique d'une enzyme en modifiant légèrement la géométrie, les propriétés électrostatiques ou la mobilité des acides aminés du site actif. Le principal désavantage de la mutagenèse aléatoire est qu'elle ne permet d'introduire qu'un nombre limité de mutations par gène. Il est en effet très peu probable d'avoir plus d'une mutation sur un codon de trois bases. Chaque codon donne ainsi le plus souvent accès à son codon voisin d'une base dans le code génétique, ce qui réduit en pratique considérablement l'espace des séquences explorables. La redondance du code génétique réduit d'autant plus la diversité de ces voisins d'une base. Ainsi, une PCR mutagène ne remplacera seulement qu'entre 3,15 et 7,4 des acides aminés possibles (*Wong et al. 2006*). Ce biais implique que certaines interversions d'acides aminés seront moins courantes que d'autres et qu'un grand nombre de mutations potentiellement bénéfiques seront oubliées en utilisant cette approche.

Il est également possible, en l'absence de données structurales, d'utiliser des techniques de recombinaison pour introduire de la diversité en créant des banques de gènes chimériques par recombinaison de l'ADN de gènes homologues. La technique a initialement été associée à la mutagenèse aléatoire : après mutagenèse, les gènes sont coupés en fragments de taille aléatoire puis réassemblés pendant la PCR (*Stemmer et al. 1994*). La diversité peut également être introduite

en recombinant des gènes homologues d'organismes différents (*Crameri et al. 1998*). Ce processus de recombinaison permet, après plusieurs cycles d'évolution, de combiner les mutations positives compatibles avec la structure et l'activité de la protéine et d'éliminer simultanément les mutations négatives du mélange global de séquences ADN (*Crameri et al. 1998*). De nombreuses méthodes de recombinaison d'ADN ont été décrites et couplées à la mutagenèse aléatoire pour l'évolution de diverses protéines (*Patten et al. 1997 ; Giver et al. 1998 ; Abécassis et al. 2000 ; Suzanne Brackmann 2002 ; Robertson 2004*).

Un autre aspect important à considérer est la capacité à introduire plusieurs mutations simultanément. Ceci peut en effet être avantageux et révéler des mutations coopératives qui resteraient indétectables dans le cas de substitutions uniques. L'introduction de mutations multiples est cependant souvent limitée par la taille de la banque : il y a, pour une protéine de 300 acides aminés, 5700 possibilités de substitution d'un seul acide aminé, 32 381 700 possibilités pour substituer deux acides aminés et plus de 10^{11} possibilités pour remplacer trois acides aminés (*Tracewell et al. 2009*). Il faut, de plus, prendre en considération le fait que la plupart des chemins d'évolution conduisent à des protéines inactives : plus de 80% des mutations sont en effet délétères en raison de leur effet déstabilisateur (*DePristo et al. 2005*) tandis que certains chemins d'évolution sont limités en raison du phénomène appelé « sign epistasis », signifiant que certaines mutations peuvent être bénéfiques seulement dans un environnement génétique particulier et neutres ou délétères dans les autres cas (*Weinreich et al. 2005 ; Bershtein et al. 2006*). *Weinreich et al.* ont par exemple démontré qu'à partir de 120 chemins d'évolution théoriquement possibles (substitution d'acides aminés en 5 positions distinctes), seuls 18 chemins s'avèrent bénéfiques et conduisent à l'amélioration des propriétés de l'enzyme β -lactamase (*Weinreich et al. 2006*). De plus, parmi ces 18 chemins d'évolution, peu ont été caractérisés comme étant plausibles. Les stratégies de recombinaison peuvent partiellement remédier à ces limitations en permettant la recombinaison directe des mutations bénéfiques à partir de plusieurs gènes (*Crameri et al. 1998 ; Coco et al. 2001*). Il semblerait en effet que le fait de prendre plusieurs mutants à chaque étape de sélection augmente la probabilité de générer à la fin le mutant le plus actif, alors qu'il a été démontré que le fait de sélectionner uniquement le meilleur mutant à chaque étape conduit plus probablement à une impasse (*Bloom et al. 2006 ; Tracewell et al. 2009*). Il est toutefois envisageable d'apporter de nouvelles améliorations à partir de ces "impasses" une fois la protéine stabilisée par des mutations compensatoires (*Bloom et al. 2006*) ou la surexpression d'une protéine chaperonne, la chaperonine (*Tokuriki et al. 2009*).

Une autre approche pour échapper aux impasses d'évolution utilise le "neutral drift", qui consiste à accumuler des mutations sans altérer la fonction et la stabilité originelle de la protéine (*Peisajovich et al. 2007*). Il en résulte une variété de séquences autour de la séquence sauvage contenant de large variations polymorphiques qui agissent comme des supprimeurs augmentant la tolérance de la protéine aux effets délétères de mutations déstabilisantes et limitant ainsi les impasses d'évolution

(*Bershtein et al. 2008 ; Gupta et al. 2008*). Le "neutral drift" augmente le potentiel d'évolution de la protéine et le nombre de mutant possédant des activités de promiscuité pouvant être amplifiées en appliquant des techniques de sélection et de criblage rigoureuses (*Aharoni et al. 2005 ; Fasan et al. 2007*). Le même phénomène semble avoir lieu dans la nature pour l'évolution des protéines : lors d'une phase d'adaptation, plusieurs mutations jouent le rôle de supprimeurs pouvant neutraliser les effets d'autres mutations qui auraient autrement déstabilisé ou dénaturé la protéine (*Elena et al. 2003 ; Dean et al. 2007 ; Bloom et al. 2009*). Il s'agit probablement d'une des raisons pour laquelle la nature n'emploie qu'un nombre relativement limité de structures protéiques (de l'ordre du millier) pour générer un nombre incroyable de fonctions différentes (*Tawfik 2006*).

La stratégie adéquate pour créer la diversité génétique dépendra ainsi des informations disponibles au sujet de la protéine (données structurales, thermodynamiques et cinétiques, mécanisme d'action...), de la propriété recherchée. Il serait par exemple préférable de se focaliser sur le site actif de l'enzyme pour améliorer sa spécificité vis-à-vis d'un substrat tandis que des mutations plus éloignées du site actif seraient souhaitables pour optimiser la thermostabilité de la protéine (*Park et al. 2005 ; Kazlauskas et al. 2009*). Les mutations affectant l'activité catalytique semblent elles être localisées à divers endroit (proche du site de fixation du substrat, dans le site actif ou encore éloigné de ces sites et modifiant la flexibilité générale de la protéine) et une approche de mutagenèse aléatoire est alors intéressante. La taille des banques générées est alors plus importante. Plus le nombre de mutants est élevé, plus les chances de trouver un mutant intéressant sont importantes, mais ce mutant sera d'autant plus difficile à détecter et isoler. Des approches d'évolution *in silico* ont récemment été mises au point pour tenter de limiter la taille des banques. De récents travaux ont en effet démontré l'utilité de méthodes informatiques et statistiques pour prédire la position et la nature d'une mutation en fonction de l'activité souhaitée. Par exemple, le programme RosettaMatch permet de tester et d'éliminer rapidement différents sites actifs non favorables pour une structure donnée. Entre autre, il a notamment facilité avec succès l'ingénierie de retro-aldolases (*Jiang et al. 2008*) ou encore d'enzymes catalysant l'élimination de Kemp (*Rothlisberger et al. 2009*). Le programme ProSAR permet quant à lui d'éliminer toute séquence incompatible avec le repliement de la protéine et a permis d'identifier avec succès les mutations bénéfiques lors de l'évolution d'une déshalogénase halohydrine (*Fox et al. 2007*). L'ingénierie de nouvelles protéines devrait être plus efficace dans le futur en s'appuyant sur des données de simulation informatique.

2.2 La sélection de l'activité enzymatique

Quelque soit la méthode de création de diversité utilisée, la réussite de l'évolution dirigée reposera en grande partie sur la méthode de sélection ou de criblage utilisée. On parle de criblage lorsque l'activité de chaque mutant est mesurée de manière systématique généralement en utilisant un test colorimétrique. On parle de sélection lorsque seul les mutants actifs sont capturés et les mutants inactifs éliminés sans analyse systématique. Le choix d'une méthode de sélection ou criblage

conditionne la taille des banques qu'il est possible d'analyser. Dans le cas du criblage, la taille des banques doit être limitée, puisque, par principe, chaque mutant est testé individuellement. La vitesse de criblage déterminera alors la taille de banque analysable. Les méthodes de sélections peuvent quant à elle s'appliquer à des banques beaucoup plus importantes. Beaucoup de travail a été réalisé dans le domaine visant à l'améliorer l'échelle dynamique et le débit des techniques de sélection et de criblage. De nombreuses techniques sont disponibles pour la sélection d'activité de reconnaissance ou d'activité catalytique en simple turnover en travaillant sur de grandes banques ($>10^7$). Toutefois, les techniques de criblage d'activité catalytique sur plusieurs turnovers sont encore limitées et reposent majoritairement sur des techniques de criblage en microplaque. Le faible débit de ces techniques réduit considérablement la taille des banques analysables (10^3 - 10^4) et donc les probabilités de succès de l'évolution dirigée.

Les processus de sélection et de criblage doivent respecter la règle d'or de l'évolution dirigée : "*You get what you screen for*" (Prof. Frances Arnold : *You et al. 1994 ; Romero et al. 2009*). Ainsi, la sélection de mutants optimisés devra se faire dans des conditions aussi proches que possible des caractéristiques et propriétés désirées de la protéine pour éviter tout effet secondaire non souhaités. Par exemple, la sélection d'activité enzymatique devra se faire dans des conditions de turnover multiple, de basse concentration en substrat (proche ou plus faible que le K_M ; dans le but d'optimiser l'efficacité catalytique k_{cat}/K_M) et devra être assez sensible sur une large plage pour détecter la moindre amélioration, aussi faible soit elle (Griffiths et al. 2000). La réussite de l'évolution dirigée est largement déterminée par la manière dont le génotype est lié au phénotype. En effet, le principe de base commun à toutes les méthodes de sélection ou de criblage est d'assurer un lien entre le gène codant pour une enzyme (le génotype) et les différentes molécules produites par l'activité de cette enzyme (phénotype) (Griffiths et al. 2000) (Figure 18).

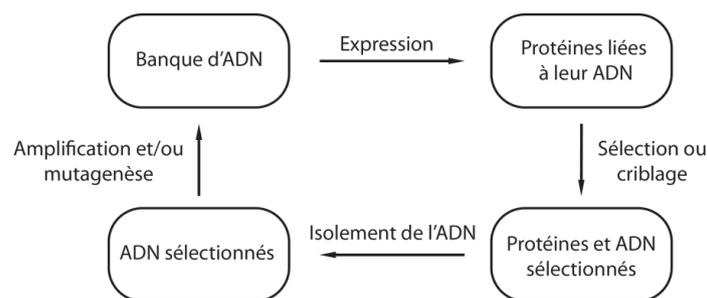
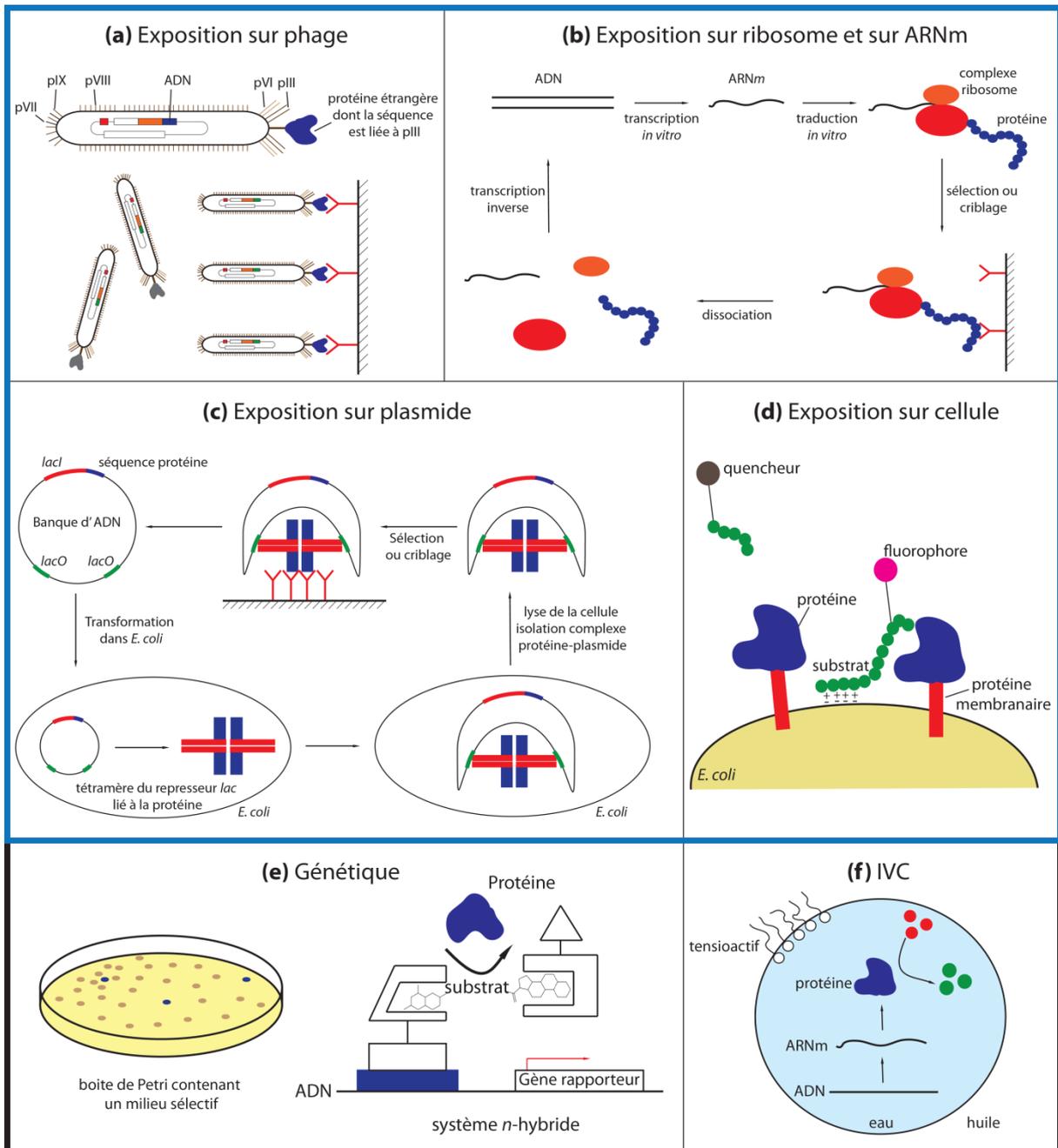


Figure 18 Représentation schématique de la stratégie globale permettant l'analyse à grande échelle de fonctions protéiques. Adapté à partir de Lin et al. 2002

Il existe deux grandes catégories de techniques pour relier génotype et phénotype. Le génotype et le phénotype peuvent être liés directement de manière physique *via* des interactions ou bien par compartimentation (spatiale ou au sein d'une vésicule comme par exemple la cellule ou encore une microgouttelette aqueuse). Les différentes méthodes de sélection ou de criblage développées sont pour la plupart présentées schématiquement dans la Figure 19.



(g) Microplaque et puce à protéines

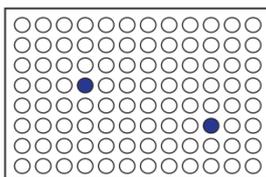


Figure 19 *Représentation schématique des différentes techniques de sélection et criblage. Lien génotype/phénotype physique (encadré bleu) : (a) Exposition sur phage : l'ADN simple brin est entouré de protéines de l'enveloppe (pVIII, pVII, pIX, pIII et pVI). Une protéine étrangère peut être fusionnée à ces protéines (ici pIII) en intégrant son gène à la séquence d'ADN. Les phages sont enrichis par affinité. (b) Exposition sur ribosome : les séquences d'ADN sont transcrites en ARNm puis la traduction de l'ARNm en protéine est stoppée. Le complexe ribosomal est alors stabilisé et peut être sélectionné par affinité.*

Une variante introduit un lien covalent entre la séquence d'acide aminé traduite et l'ARNm en utilisant la puromycine, un antibiotique mimant la terminaison aminoacyl d'un ARNt, qui, liée à l'extrémité 3' de l'ARNm via un espaceur, pourra interrompre la traduction en se liant avec la séquence déjà traduite. On parle alors d'exposition sur ARNm. Sélection par affinité. (c) Exposition sur plasmide : une protéine pouvant reconnaître et se lier à l'ADN (ici le répresseur lac se lie aux séquences lacO) est utilisée pour assurer le lien avec une protéine étrangère dont le gène a été inséré dans le plasmide. Sélection par affinité. (d) Exposition sur cellule : la protéine d'intérêt est ici liée à une protéine membranaire servant d'ancrage afin de présenter la protéine d'intérêt à la surface de la cellule contenant son gène. Les cellules sont

généralement sélectionnées en utilisant le FACS (Fluorescent Activated Cell Sorter). **Lien génotype/phénotype par compartimentation (encadré noir) : (e) Génétique :** les cellules jouent le rôle de micro-compartiments reliant *in vivo* génotype et phénotype. Les sélections dans des cellules vivantes reposent traditionnellement sur l'ajout d'une fonction dans une souche auxotrophe, la neutralisation d'un composé toxique, l'apport d'une substance nécessaire à la survie ou encore l'indication colorée d'une activité enzymatique. Le spectre des activités détectables peut être élargi par le système *n*-hybride reliant l'activité de la protéine cible à la transcription du gène rapporteur *lacZ* (Baker et al. 2002). **(f) Compartimentation *In Vitro* (IVC) :** la cellule est mimée par une microgouttelette aqueuse renfermant génotype et phénotype. Les gènes et un mélange réactionnel de transcription et traduction *in vitro* sont encapsulés dans des microgouttelettes. Après expression, le gène, l'enzyme et ses produits sont retenus au sein du même compartiment. Ce type de compartimentation inclus également les sélections basées sur les doubles émulsions. **Lien génotype/phénotype par compartimentation spatiale (encadré rouge) : (g) Microplaque et puces à protéines :** l'identification des protéines et de leurs gènes est assurée par un confinement spatial offrant un large choix dans les activités sélectionnables. Les microplaques 96 ou 384 puits ont depuis longtemps été utilisées à cet effet et ont amenés de nombreux progrès comme la dérivation d'un support solide avec des protéines pour créer des puces à protéines

Comme mentionné auparavant, le choix de la technique se fait en fonction de la taille de la banque, mais également en fonction du compartiment d'expression de la protéine. La plupart des systèmes concernent des techniques de sélection par exposition et sont basées sur un lien physique entre génotype et phénotype (Figure 19 ; encadré bleu) : une interaction directe entre un gène et la protéine qu'il encode peut être assuré par exposition sur phage (Figure 19a ; Smith 1985 ; Sidhu 2000 ; Kehoe et al. 2005), exposition sur ribosome (Figure 19b ; Mattheakis et al. 1994 ; Hanes et al. 1997 ; Matsuura et al. 2003), exposition sur ARN (Roberts et al. 1997 ; Seelig et al. 2007), exposition sur cellule (Figure 19d ; Georgiou et al. 1997 ; Olsen et al. 2000 ; Garcia-Rodriguez et al. 2007) et d'autres techniques (Kehoe et al. 2005). Dans la plupart des cas (mis à part l'exposition sur cellule), la sélection est effectuée par purification d'affinité sur une surface immobilisée et les gènes ainsi sélectionnés sont amplifiés et engagés dans un nouveau cycle d'évolution si nécessaire. En conséquence, ces techniques ont été majoritairement appliquées à la sélection d'activités de reconnaissance. Il faut avoir à l'esprit que le nombre de protéines exposées est important et peut conditionner le choix de la technique : en cas d'exposition multiple, l'augmentation de l'affinité peut être biaisée par un effet d'avidité. Il est également possible de sélectionner des protéines sur l'activité catalytique à simple turnover en les exposant à des analogues d'états de transition (Hilvert 2000), à des inhibiteurs suicides (Soumillion et al. 1994) ou à des ligands réactifs présents sur la surface de purification. Plus récemment, un lien physique génotype/phénotype a pu être adapté pour la sélection d'anticorps avec plusieurs turnovers catalytiques (Cesaro-Tadic et al. 2003) ou pour la sélection de nouvelles activités d'ADN polymérase (Fa et al. 2004). Bien que puissantes pour la sélection d'activités de reconnaissance et permettant de travailler avec des banques très importantes (jusqu'à 10^{13} pour l'exposition sur ARNm), ces techniques sont limitées pour la sélection d'activité catalytique sur plusieurs turnovers à cause de la difficulté de maintenir le lien entre le gène et les produits de la réaction enzymatique (Aharoni et al. 2005c).

Dans la nature, le génotype et le phénotype sont généralement reliés par compartimentation dans les cellules. Les systèmes de sélection *in vivo* permettent ainsi la sélection de nombreuses fonctions biologiques (de reconnaissance, de catalyse, de régulation) impliquant plusieurs gènes et protéines.

Plusieurs protéines ont ainsi été évoluées avec succès dans des cellules vivantes (*Buchholz et al. 2001 ; Taylor et al. 2001*). La plupart du temps, les sélections *in vivo* reposent sur des activités essentielles à la survie de la cellule permettant une sélection sur boîte d'Agar (Figure 19e). Bien que ces méthodes de sélection permettent d'analyser de grandes banques, le spectre d'activités sélectionnables reste cependant limité. Des criblages *in vivo* impliquant la production d'un chromophore ou d'un produit coloré sur boîte LBA peuvent également être réalisés, comme par exemple le criblage blanc/bleu utilisant X-gal. Cependant, les sélections basées sur la production d'un chromophore ont généralement une sensibilité et une échelle dynamique limitée. Des techniques comme la complémentation chimique (*n*-hybride système), qui relie l'activité catalytique de l'enzyme à la transcription du gène rapporteur *lacZ* dans la cellule, peuvent néanmoins permettre augmenter le spectre d'activités sélectionnables (*Baker et al. 2002*) (Figure 19e). Il faut en plus prendre en considération le fait que des systèmes *in vivo* puissent produire un certain phénotype via différentes voies, ce qui complique d'autant plus l'identification des mutants.

Alternativement, le criblage à haut débit de cellules est possible grâce au FACS (Fluorescent Activated Cell Sorter). Le FACS permet le tri d'environ 10^7 cellules par heure et a été appliqué à de nombreux travaux d'évolution dirigée utilisant la technique d'exposition sur cellules (*Bershtein et al. 2008b*) (Figure 19d). Le FACS est particulièrement adapté pour la sélection d'activité de reconnaissance (*Chen et al 2001b*) tandis que la sélection d'activité catalytique est plus compliquée en raison de la difficulté à maintenir le lien entre le gène, l'enzyme et ses produits (*Bershtein et al. 2008b*). Quelques exemples existent cependant lorsque le substrat en excès est lavé et le produit reste à l'intérieur de la cellule (*Aharoni et al. 2006*), lorsque le produit fluorescent est directement capturé sur la surface de la cellule (*Antipov et al 2008*) ou encore lorsqu'il est encapsulé avec le gène et l'enzyme dans une double émulsion (*Aharoni et al. 2005b*) (Figure 21). Cependant, le nombre de tests enzymatiques pouvant être utilisé en FACS est limité principalement par la faible perméabilité de la membrane cellulaire et la difficulté d'associer activité enzymatique et produits de réaction.

Très peu de méthodes permettent le criblage d'activité enzymatique sur plusieurs turnovers, ce qui nécessite généralement une compartimentation spatiale entre génotype et phénotype. Les criblages en microplaque robotisés sont utilisés dans ce cas mais leurs faibles débits limitent considérablement la taille des banques analysables (Figure 19g). Pour réduire ces limitations, les gènes et tous les composants biologiques nécessaires à leur expression et à la détection de l'activité de la protéine traduite peuvent être compartimentés dans des microgouttelettes aqueuses : on parle alors de compartimentation *in vitro* (IVC, Figure 19f). Ces petits compartiments fournissent un outil pour relier le génotype au phénotype et permettent la sélection de grandes banques de gènes (*Tawfik et al. 1998*). L'émulsion contenant les gènes (à raison d'au maximum un gène par goutte) avec tout le matériel nécessaire à l'expression *in vitro* peut être comparée à une population de cellules artificielles pouvant être sélectionnées pour un phénotype particulier, comme par exemple une plus

grande activité catalytique. L'IVC a initialement été utilisée avec une banque de gène comprenant le substrat sur la même molécule d'ADN pour la sélection d'enzyme modifiant l'ADN (Figure 20).

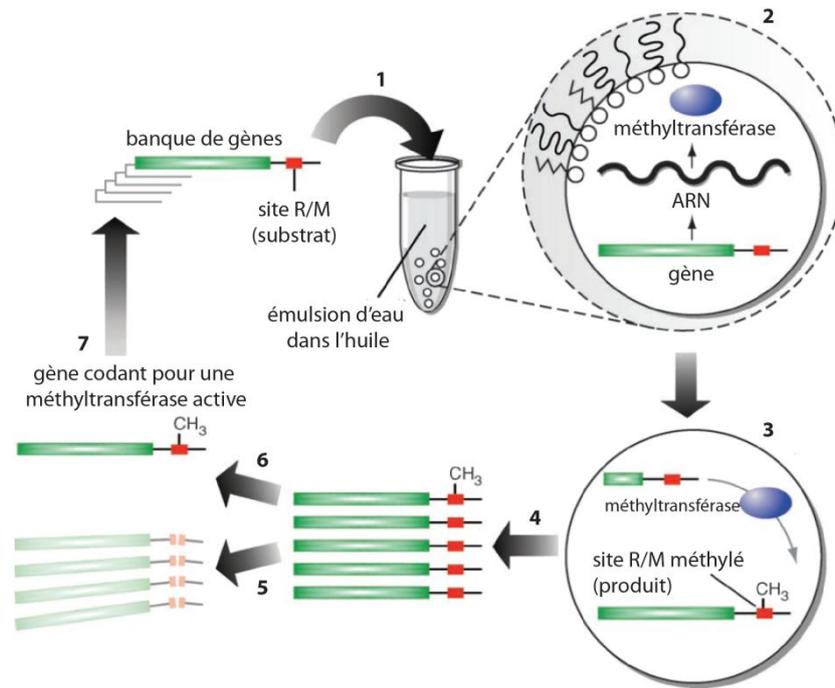


Figure 20 *Sélection d'ADN méthyltransférases par IVC* : (1) Un mélange réactionnel de transcription/traduction contenant une banque de gènes codant pour des variants de méthyltransférase lié à un site de restriction/méthylation (R/M) est encapsulé dans des microgouttelettes aqueuses de manière à avoir au maximum un gène par goutte. (2) Les gènes sont transcrits et traduits au sein de leur compartiment. (3) Le site R/M est méthylé dans les compartiments contenant une méthyltransférase active pour ce site de méthylation. Puisque les méthyltransférases ne peuvent pas quitter la goutte dans lesquelles elles ont été exprimées, elles ne peuvent modifier les gènes contenus dans les autres gouttes. (4) Après incubation, l'émulsion est cassée, toutes les réactions stoppées et les compartiments aqueux réunis. L'ADN récupéré est incubé en présence d'une endonucléase de restriction. (5) Les gènes non modifiés (ceux ne codant pas pour une méthyltransférase capable de méthyler le site R/M) sont digérés tandis que les gènes méthylés (ceux codant pour une méthyltransférase capable de méthyler le site R/M) restent intacts. Les gènes intacts sont ensuite amplifiés par PCR puis soit caractérisés (6), soit encapsulé de nouveau pour un nouveau cycle de sélection (7). Adapté à partir de Taly et al. 2007

Cette technique a dans un premier temps été limitée à des activités enzymatiques dont le substrat est porté par le gène, comme les ADN méthyltransférases (Cohen et al. 2004), les endonucléases de restriction (Doi et al. 2004) ou les ADN polymérases (Ghadessy et al. 2001 et 2004). Les conditions de sélection de l'activité sont, dans ces systèmes, limitées aux conditions d'expression des protéines.

Les systèmes d'IVC ont ensuite évolués vers des techniques de sélections plus performantes. Dans un premier temps, il a été possible, tout en conservant un lien covalent entre génotype et phénotype, de développer des méthodes permettant de séparer les étapes d'expression et de sélection d'activité, en utilisant par exemple des microbilles de streptavidine portant le gène et la protéine qu'il encode avec des substrats contenant une biotine en cage (Griffiths et al. 2003). Il est envisageable dans ce cas de réaliser une sélection dans des conditions de multiples turnovers non limitées par la stœchiométrie d'un substrat pour un gène (Kelly et al. 2007). L'IVC a également été combinée avec SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment) pour la sélection

de ribozymes catalysant la réaction de Diels-Alder de manière bimoléculaire et avec de multiples turnovers (Agresti et al. 2005).

Dans un second temps, une autre approche permettant de passer de la sélection au criblage a été développée en éliminant le lien physique entre génotype et phénotype : l'utilisation de double émulsions eau-dans-huile-dans-eau pouvant être criblées par le FACS permet le criblage efficace d'activité catalytique (Figure 21 ; Aharoni et al. 2005b ; Mastrobattista et al. 2005).

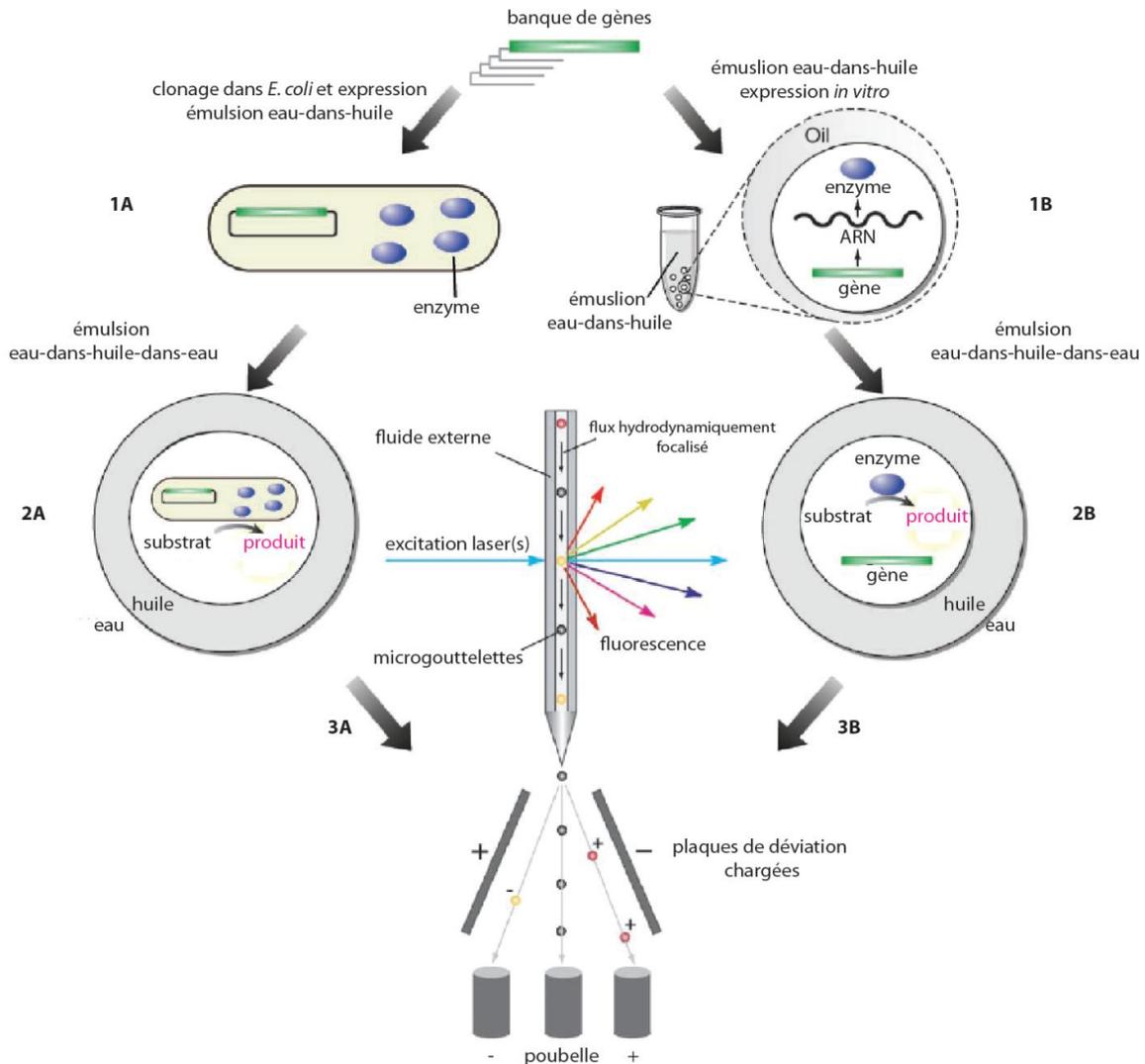


Figure 21 Criblage de doubles émulsions par FACS. **(1A)** Une banque de gènes est clonée et exprimée dans *E. coli* (dans le cytoplasme, le périplasme ou à la surface de la cellule). Les bactéries sont dispersées pour former une émulsion eau-dans-huile avec typiquement au maximum une cellule par microgouttelette aqueuse. **(1B)** Alternativement, un mélange réactionnel de transcription/traduction contenant une banque de gènes est dispersé pour former une émulsion d'eau-dans-huile avec typiquement un gène par microgouttelette aqueuse. Les gènes sont transcrits et traduits au sein des gouttes. **(2A)** et **(2B)** Les protéines ayant une activité enzymatique convertissent le substrat fluorogénique en produit fluorescent et l'émulsion eau-dans-huile est convertie en double émulsion eau-dans-huile-dans-eau. **(3A)** et **(3B)** Les microgouttelettes fluorescentes sont sélectionnées et séparées de celles non fluorescentes par FACS. Les bactéries ou les gènes des gouttes fluorescentes sont récupérés. Les bactéries sont mises en culture ou les gènes amplifiés par PCR puis de nouveau compartimentés pour d'autres cycles de sélection. Adapté à partir de Taly et al 2007

Il est intéressant de noter que dans ce cas, le criblage peut avoir lieu en IVC classique mais également de manière *in vivo* en encapsulant directement des cellules bactériennes (exprimant une banque de gènes dans leur périplasme, leur cytoplasme ou à leur surface) à raison d'au maximum une cellule par gouttelette (Aharoni et al. 2005b). Le FACS ne fonctionnant qu'avec un fluide externe aqueux, le système est toutefois limité à l'utilisation de doubles émulsions eau-dans-huile-dans-eau et ne peut pas être appliqué à des émulsions simples eau-dans-huile.

De nombreuses autres applications des émulsions pour l'évolution moléculaire et le séquençage à haut débit ont été décrites dans la littérature (incluant la sélection de large banques de gène ($>10^9$) ou l'isolement de protéines et d'ARN avec des fonctions de reconnaissance, de catalyse ou de régulation) et sont commentées dans Griffiths et al. 2006.

En dépit du succès initial de ces techniques utilisant des émulsions mécaniques (formées par extrusion ou vortex), de nombreux progrès restent à faire pour élargir leur spectre d'application, notamment dans le domaine de la production et de la manipulation des microgouttelettes. Dans le cas de l'évolution dirigée utilisant l'IVC par exemple, le fait que les microgouttelettes ne possèdent pas toutes la même taille crée un biais dans la sélection dans le sens où un gène identique encapsulé dans des gouttes de taille différentes pourra donner différents phénotypes. Par exemple, dans le cas d'un criblage basé sur la production d'un fluorophore, les petits compartiments seront favorisés vis-à-vis des plus gros. Il est de plus compliqué de sélectionner pour une faible différence d'activité enzymatique. La polydispersité de la taille des microgouttelettes rend également difficile le contrôle précis de la distribution des gènes (ou cellules) dans les microgouttelettes. C'est pour cette raison que, pour réduire la probabilité d'encapsuler plus d'un gène par goutte, la concentration en ADN de départ doit être relativement faible, sensiblement plus faible que si la taille des gouttes avait été monodisperse. Une importante limitation concerne notre incapacité à manipuler précisément les microgouttelettes après leur formation. En effet, la sélection de l'activité enzymatique ayant lieu dans des conditions réactionnelles très spécifiques permettant la transcription et la traduction *in vitro*, de nombreuses incompatibilités avec l'activité de l'enzyme peuvent émerger (pH, température, force ionique...). Il serait ainsi très avantageux de pouvoir manipuler les microgouttelettes à façon avec par exemple la possibilité de modifier leur contenu afin, par exemple, d'initier une réaction enzymatique ou faire varier les conditions de criblage. Il est bien sûr possible de délivrer des substrats hydrophobes à travers la phase huile (Griffiths et al. 2003 ; Agresti et al. 2005), de délivrer des composés solubles dans l'eau via des nanogouttes ou des micelles gonflées (Bernath et al. 2005), de modifier le pH à l'intérieur des gouttes en délivrant de l'acide acétique (Griffiths et al. 2003), mais aucune de ces techniques n'est universelle et contrôlable, surtout comparées par exemple à l'utilisation de microplaques. Pour finir, il est de plus impossible de mesurer les cinétiques de réaction au sein d'une microgouttelette dans ces systèmes : les mesures sont limitées à une mesure de fluorescence. Toutes ces limitations peuvent cependant être potentiellement surmontées en

utilisant la microfluidique digitale. Comme nous le verrons dans la partie 3, la microfluidique digitale permet en effet de produire des microgouttelettes dont la taille est extrêmement monodisperse à des fréquences supérieures à 10 kHz et de les manipuler de manière contrôlée et sophistiquée. Cette technologie a été appliquée à de nombreux systèmes biologiques et permet notamment l'amplification des gènes, la traduction/transcription *in vitro* de protéines et la manipulation de cellules au sein de microgouttelettes aqueuses. Cette technologie offre des outils très prometteurs pour le développement de techniques de criblage à haut débit pour la sélection d'activité enzymatique avec plusieurs turnovers catalytiques. Ces aspects seront détaillés dans la partie 3.3.

2.3 Ingénierie des protéines et biopile enzymatique

Comme nous l'avons mentionné dans la première partie de ce manuscrit, trois stratégies sont de nos jours suivies pour améliorer l'efficacité et la stabilité d'une électrode fonctionnalisée avec une enzyme. La stratégie majoritairement utilisée vise à optimiser l'interaction entre la surface de l'électrode et une enzyme donnée en développant de nouvelles techniques d'immobilisation et de nouveaux matériaux. Une technique restée minoritaire vise à optimiser directement les propriétés de l'enzyme utilisée. Les protéines peuvent être modifiées soit *via* une conception rationnelle définissant les mutations à opérer, soit *via* l'évolution dirigée des protéines. Le choix d'une des deux stratégies dépendra du niveau de connaissance de la protéine d'intérêt ainsi que de la propriété recherchée chez la nouvelle protéine. La Figure 22 résume les différentes modifications généralement ciblées lors de l'ingénierie d'un nouveau biocatalyseur pour biopile enzymatique.

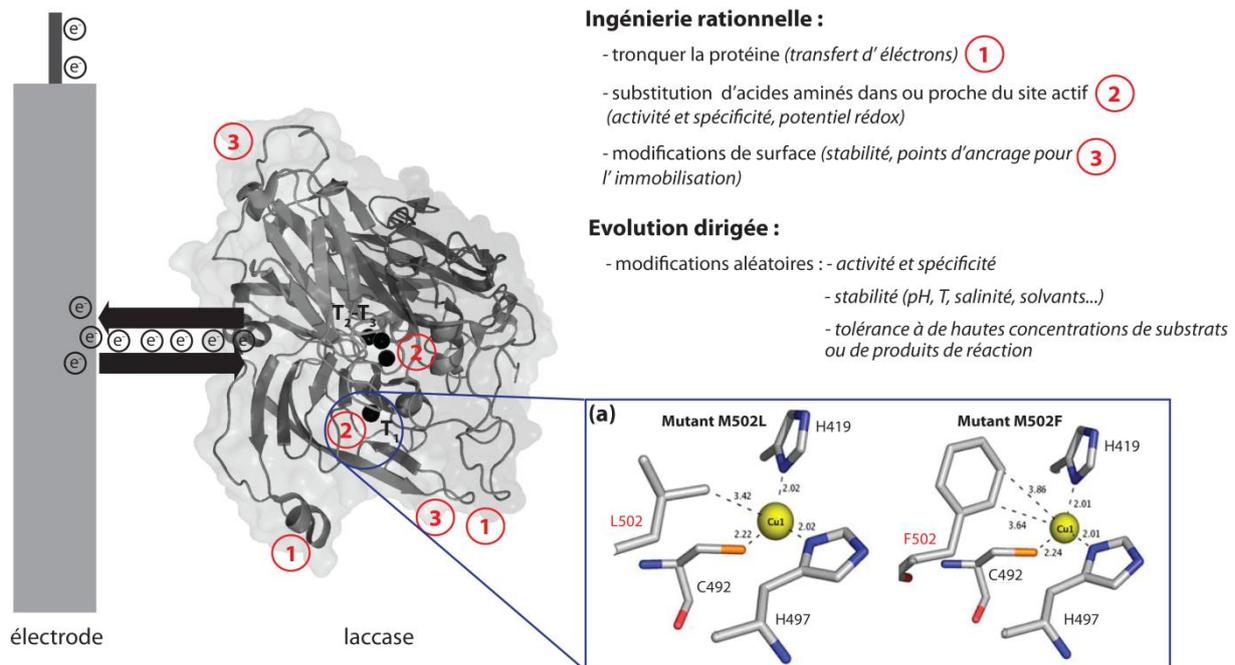


Figure 22 Les différentes modifications envisageables pour optimiser le catalyseur d'une biopile enzymatique. **(a)** Cas particulier du centre cuivreux T_1 chez la laccase CotA. La modification de l'environnement proche de l'atome de cuivre (M502L ou M502F) se traduit par une variation du potentiel rédox de l'enzyme.

Les modifications visent à augmenter l'activité catalytique, la spécificité (vis-à-vis du substrat ou du donneur/accepteur d'électron), la stabilité (température, pH, solvants...), la tolérance à de hautes concentrations de substrats (carburant/comburant) ou de produits, ou encore le potentiel rédox. La stratégie peut également viser à insérer des points d'interaction avec l'électrode en fonction de la méthode d'immobilisation utilisée.

2.3.1 L'ingénierie rationnelle

La conception rationnelle peut être utilisée pour faciliter le transfert d'électrons entre le site actif de la protéine et la surface de l'électrode. L'électrode et le site actif de l'enzyme peuvent en effet être considérés comme un couple donneur/accepteur d'électrons séparé par un squelette d'acides aminés et/ou de glycosylation entourant le site actif de l'enzyme et faisant obstacle à la communication électrique avec l'électrode. Les nouvelles enzymes peuvent ainsi être conçues de manière à réduire la distance entre le site actif et la surface de l'enzyme et donc l'électrode. Pour cela, il est par exemple possible de tronquer la protéine au niveau C- ou N-terminal ou de raccourcir une boucle protéique. Le concept a été appliqué avec succès pour améliorer le taux de transfert d'électron de la laccase TvLac (*Gelo-Pujic et al. 1999*) ou d'une microperoxydase (*Katz et al. 2002*). La déglycosylation de la protéine peut également augmenter la proximité entre le site actif de l'enzyme et la surface de l'électrode (*Ferapontova et al. 2002*). Une approche similaire pour faciliter l'accès au site actif consiste à remplacer les acides aminés encombrant stériquement par d'autres plus compacts, ou d'introduire de la flexibilité dans la structure de la protéine en substituant des résidus glycine ou proline (*Güven et al. 2010*). Ces techniques restent cependant risquées puisque le repliement et l'activité de la protéine peuvent être lourdement perturbés.

Une autre approche rationnelle vise à modifier les protéines afin de faciliter leur immobilisation à la surface de l'électrode et d'optimiser leur orientation. L'insertion d'une étiquette histidine en position C-terminale a ainsi permis d'augmenter 30 fois le taux de transfert d'électrons d'une peroxydase sur une surface d'or (*Ferapontova et al. 2002*). L'insertion d'une étiquette cystéine en position C- ou N-terminale permet de créer des interactions avec une surface d'or via des liaisons S-Au et ainsi d'augmenter l'efficacité du transfert direct d'électrons (*Ferapontova et al. 2002b*). Une L-lactate déshydrogénase modifiée avec une étiquette histidine en C-terminal et une cystéine en N-terminal présente ainsi des courants 5 fois supérieurs à ceux de l'enzyme sauvage une fois immobilisée sur une électrode d'or (*Halliwell et al. 2002*). La déglycosylation de la protéine peut également s'avérer avantageuse pour modifier la surface de la protéine et les interactions avec la surface de l'électrode. La déglycosylation de la GOx d'*Aspergillus niger* facilite notamment son immobilisation au sein d'un hydrogel rédox en raison d'une plus faible taille et de plus fortes interactions électrostatiques. La bioanode correspondante génère 13% de courant en plus comparé à la GOx sous sa forme glycosylée

(Prévost et al. 2010). En dépit de quelques réussites, ces techniques se traduisent souvent par la modification du repliement de la protéine et la diminution de son activité.

L'ingénierie rationnelle peut également viser à augmenter la stabilité de la protéine en introduisant des liaisons stabilisatrices à des positions préalablement identifiées. L'introduction d'un pont disulfure entre les dimères constitutifs d'une PQQ-glucose déshydrogénase (PQQGDH) via la mutation Ser415Cys a permis d'augmenter 30 fois la stabilité de la protéine à 55°C (Igarashi et al. 2003). L'utilisation de ce mutant dans une biopile enzymatique glucose/O₂ a engendré une stabilité de la pile en opération 6 fois supérieure à celle employant l'enzyme sauvage (150 h) (Yuhashi et al. 2005).

La cavité de fixation du substrat est également visée afin d'augmenter la spécificité ou l'activité catalytique du biocatalyseur. L'activité catalytique d'une PQQGDH a ainsi pu être multipliée par 2 via l'introduction d'un résidu cystéine alternativement à neuf positions comprises dans une sphère de 8 Å autour du D-glucose lorsque celui-ci est fixé dans la poche de fixation de l'enzyme (Figure 23 ; Durand et al. 2010).

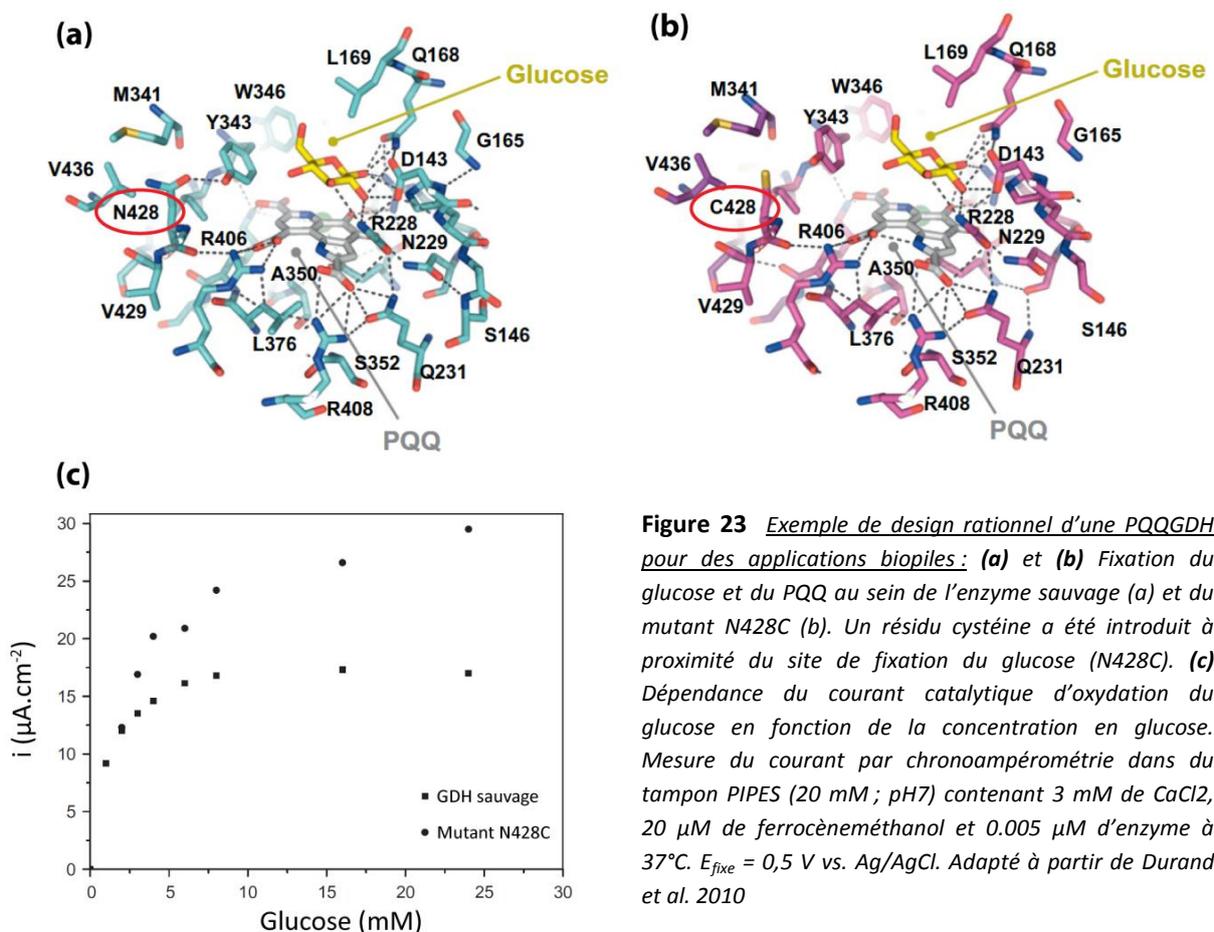


Figure 23 Exemple de design rationnel d'une PQQGDH pour des applications biopiles : (a) et (b) Fixation du glucose et du PQQ au sein de l'enzyme sauvage (a) et du mutant N428C (b). Un résidu cystéine a été introduit à proximité du site de fixation du glucose (N428C). (c) Dépendance du courant catalytique d'oxydation du glucose en fonction de la concentration en glucose. Mesure du courant par chronoampérométrie dans du tampon PIPES (20 mM ; pH7) contenant 3 mM de CaCl₂, 20 μM de ferrocène-méthanol et 0.005 μM d'enzyme à 37°C. $E_{\text{fixe}} = 0,5 \text{ V vs. Ag/AgCl}$. Adapté à partir de Durand et al. 2010

La mutation N428C entraîne la rupture de la liaison hydrogène entre le groupement hydroxyle de Y343 et le groupement carbonyle de N428, induisant un déplacement de la chaîne latérale du résidu Y343 vers l'environnement hydrophobe des résidus M341, V436 et N438. Il en résulte un environnement polaire plus favorable pour la fixation du PQQ, en particulier autour des fonctions

acides carboxyliques du groupement pyridine. La bioanode correspondante présente bien une densité de courant 2 fois supérieure à celle fonctionnalisée avec la PQQGDH sauvage (Figure 23c).

Enfin, une approche rationnelle peut évidemment viser à augmenter les propriétés catalytiques de l'enzyme via des substitutions dans ou proche du site actif (activité catalytique) et/ou du site de reconnaissance du substrat (spécificité). Peu d'exemples sont cependant présents dans la littérature hormis dans le domaine des biocapteurs (sensibilité accrue en diminuant le K_M) (Güven *et al.* 2010).

Dans le cas particulier des laccases, des modifications ponctuelles au sein du centre cuivre T_1 ont été utilisées pour modifier le potentiel rédox du site catalytique. Nous avons vu dans la partie 1.2.5 que les laccases étaient réparties en trois classes en fonction du potentiel rédox de leur centre T_1 (bas (400-420 mV), moyen (470-700 mV) ou haut (770-790 mV Vs. SHE)). Ce potentiel rédox régit majoritairement l'efficacité catalytique de la laccase et de nombreuses tentatives ont ainsi été effectuée afin d'augmenter ce potentiel rédox, notamment pour des utilisations en biopiles enzymatiques. L'obtention de laccases à haut potentiel rédox (le plus proche possible du potentiel de réduction de l' O_2 en H_2O , 1V à pH4, 810 mV à pH7 (Vs SHE)) est effectivement idéale afin de maximiser la force électromotrice de la pile (voir 1.2.4 ; Figure 10). La géométrie du centre T_1 est largement responsable du haut potentiel rédox des laccases fongiques à haut potentiel : deux histidines et une cystéine sont arrangées de manière trigonale et coplanaire autour de l'atome de cuivre alors qu'un résidu faiblement coordonnant se trouve en position axiale et varie selon les laccases (Phe, Leu ou Met) (Figure 24).

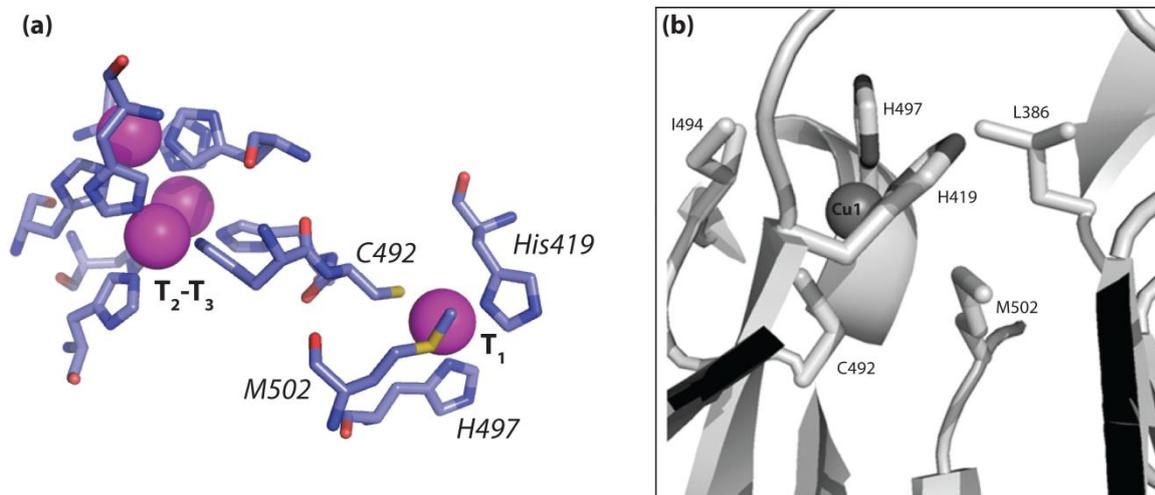


Figure 24 Rappel de la sphère de coordination des centres cuivre dans la laccase CotA : (a) Coordinations des différents atomes de cuivre T_1 et T_2-T_3 . (b) Représentation tridimensionnelle de l'environnement du site T_1 .

Il a été démontré que la substitution d'un résidu dans la sphère de coordination ou à proximité de l'atome de cuivre pouvait modifier la valeur du potentiel rédox (Sakurai *et al.* 2007). Une modeste contribution au potentiel rédox du site T_1 est attribuée au résidu axial (Palmer *et al.* 1999 ; Sakurai *et*

al. 2007). Ainsi, la présence d'un résidu phénylalanine se traduit à chaque fois par un haut potentiel (*Eggert et al. 1998*). Une mutation Phe→Met diminue le potentiel rédox d'environ 100 mV (*Kumar et al. 2003*) tandis qu'une mutation Met→Gln réduit encore plus ce potentiel (*Kamitaka et al. 2007*). Dans le cas de CotA, des mutations Met→Phe et Met→Leu (Figure 22) ont permis d'augmenter le potentiel rédox de 60 et 100 mV à chaque fois au détriment de l'activité catalytique de l'enzyme (*Durao et al. 2006*). Les mutations de résidus hydrophobes proches du centre T₁ ont elles pour conséquences de diminuer le potentiel rédox d'environ 100 mV (*Durao et al. 2008*). Des substitutions au niveau de la cavité de fixation du substrat peuvent également avoir une influence sur le potentiel rédox : une mutation Glu→Thr augmente par exemple faiblement (+20 mV) le potentiel de la laccase de *M. albomyces* sans pour autant changer son activité catalytique vis-à-vis de l'ABTS (*Kallio et al. 2009*). Les phénomènes régissant la valeur du potentiel rédox du site T₁ restent pour le moment méconnus : en plus de la sphère de coordination de l'atome de cuivre, le potentiel dépend également de l'accessibilité aux solvants, des liaisons hydrogènes et de l'orientation des dipôles (*Palmer et al. 1999*). Pour ces raisons, modifier à façon le potentiel rédox du site T₁ via une conception rationnelle demeure une tâche compliquée.

Quelques exemples ont également démontré la possibilité de modifier la dépendance au pH, la spécificité ou d'augmenter l'activité catalytique en ciblant la cavité hydrophobe de fixation du substrat. Par exemple, une mutation Asp→Asn dans la poche de fixation du substrat de la laccase TvLac permet d'augmenter le pH optimal d'activité de 1,4 unités sans altérer l'activité catalytique (*Madzak et al. 2006*). D'autres travaux ont également montré la possibilité de modifier la dépendance au pH et de diminuer l'inhibition par les halogénures en effectuant de substitutions autour du centre T₁ (*Xu et al. 1998*).

Bien que la connaissance d'un nombre conséquent et grandissant de structures cristallographiques de laccases permette, à l'aide de simulations bioinformatiques, de cibler de plus en plus facilement les résidus potentiellement intéressants, seule une très faible part des stratégies reposant sur une ingénierie rationnelle aboutit à la création d'une laccase ayant les propriétés recherchées (*Rodgers et al 2009*).

2.3.2 L'évolution dirigée des protéines

L'évolution dirigée des protéines n'a été que peu utilisée pour la conception de catalyseurs pour biopile enzymatique. Quelques exemples sont tout de même présents dans la littérature, même si aucun des variants obtenus n'ait été, à notre connaissance, étudié en conditions réelles de fonctionnement, c'est-à-dire immobilisé à la surface d'une électrode.

L'évolution dirigée de la GOx d'*Aspergillus niger* exprimée dans *S. cerevisiae* a été décrite (*Zhu et al. 2006*) : une banque de gènes créée par mutagenèse aléatoire (PCR mutagène) a été criblée en utilisant

la méthode GODA (Glucose Oxidase Detection Assay) basée sur un kit de détection de l'acide *D*-gluconique. L'activité catalytique de la GOx vis-à-vis du β -*D*-glucose a ainsi pu être améliorée d'un facteur 1,5 avec le variant Ile94Val. Une variante de la méthode GODA utilisant le médiateur ferrocène-méthanol a également été utilisée pour améliorer la stabilité vis-à-vis du pH et de la température du variant Ile94Val (*Zhu et al. 2007*). Une pyranose oxydase a également été évoluée grâce à une stratégie semi-rationnelle pour donner un mutant ayant une activité catalytique 6 fois supérieure vis-à-vis des sucres et de 20 à 50 fois supérieure vis-à-vis d'accepteurs d'électrons (1,4-benzoquinone, ion ferricenium) par rapport à la protéine sauvage (*Spadiut et al. 2009*).

La recombinaison de trois gènes codant pour des NAD-glucose déshydrogénases (NADGDH) associée à de la mutagenèse aléatoire a permis d'augmenter considérablement la stabilité thermique de l'enzyme native (demi-vie à 66°C 415 fois plus importante) en introduisant deux substitutions Glu170Lys et Gln252Leu stabilisant la cavité hydrophobe de fixation du substrat (*Baik et al. 2003*).

Autre réussite concernant les enzymes cathodiques, des méthodes de recombinaison précédées d'ingénierie rationnelle ont permis d'augmenter 174 fois la stabilité thermique et 100 fois la résistances aux milieux oxydants de la peroxydase fongique de *C. cinereus* (*Cherry et al. 1999*).

Dans le cas précis des laccases, on ne dénombre que peu d'exemples d'évolution dirigée, aucun concernant des applications en tant que biocatalyseur pour cathode. Les exemples impliquent majoritairement des laccases à bas ou moyen potentiel rédox provenant d'ascomycète ou d'origine bactérienne plus simples à manipuler génétiquement. L'un des premiers travaux concerne l'expression hétérologue de la laccase fongique de *Myceliophthora thermophila* (MtLac) dans *S. cerevisiae*. Le variant sélectionné après 10 cycles d'évolution présente un taux d'expression 170 fois plus important et une meilleure thermostabilité (*Bulter et al. 2003*). Plus récemment, l'évolution dirigée a été utilisée pour améliorer l'activité catalytique et la stabilité des laccases. Un variant optimisé de MtLac (exprimée dans la levure) a émergé après deux cycles d'évolution et présente une résistance accrue à des solvants organiques connus pour dénaturer l'enzyme native (*Zumarraga et al. 2007*). L'expression hétérologue de la laccase de *Pleurotus ostreatus* dans *S. cerevisiae* a permis la sélection de variants avec de plus grandes activité catalytique et stabilité après deux cycles de mutagenèse aléatoire (*Festa et al. 2008*). Dans le cas de Cota, l'évolution dirigée a été utilisée pour améliorer la spécificité de l'enzyme vis-à-vis du substrat ABTS (*Gupta et al. 2010*). Une approche semi-rationnelle basée sur la structure cristallographique de Cota liée à l'ABTS a été utilisée en effectuant une mutagenèse saturante sur les 19 acides aminés présents à la surface de la cavité de fixation du substrat à une distance inférieure à 6 Å de la molécule d'ABTS fixée. Les quatre meilleurs clones ont ensuite été recombinaisonnés pour permettre l'identification d'un variant (Gly417Leu et Leu 386Trp) 132 fois plus spécifique que Cota vis-à-vis de l'ABTS. De manière surprenante, le mutant

présente également une plus forte thermostabilité avec une demi-vie d'inactivation à 80°C augmentée de 50 %.

Bien que peu employée pour créer de nouveaux biocatalyseurs pour biopiles enzymatiques comparé à la conception rationnelle, l'évolution dirigée semble pourtant être le moyen le plus prometteur pour améliorer une propriété particulière dans des conditions mimant celles de la biopile elle-même. L'altération ou l'amélioration non souhaitée de propriétés secondaires permettraient en plus d'enrichir nos connaissances au niveau des relations structure/activité des laccases.

2.3.3 Comment évoluer la laccase CotA pour des applications en biopile enzymatique ?

De manière générale, les propriétés à optimiser vont dépendre intrinsèquement de la biopile souhaitée, surtout dans le cas d'une biopile fonctionnant au sein d'un compartiment unique, auquel cas les conditions de fonctionnement seront imposées aux deux biocatalyseurs.

Tout d'abord, l'activité catalytique de CotA est bien évidemment l'un des points à optimiser pour améliorer ses compétences en tant que biocatalyseur pour la réduction de l'O₂ en H₂O. Son activité est en effet directement proportionnelle à la quantité de courant délivrée une fois immobilisée à la surface de la cathode. De plus, la température optimale pour l'activité catalytique de CotA est de 75°C. De telles températures de fonctionnement ne sont pas recherchées dans une biopile, en particulier si les deux électrodes sont associées dans le même compartiment. Il serait ainsi très intéressant d'évoluer la protéine en améliorant son activité catalytique à 20-30°C tout en essayant au moins de conserver sa stabilité.

Comme la plupart des laccases, CotA présente une activité maximale à pH4 avec seulement 30% d'activité résiduelle à pH7.0 (*Xu et al. 2001*). Un des points cruciaux pour l'évolution des laccases, dans le but de développer une biopile fonctionnant dans des conditions douces, idéalement physiologiques, serait de les faire évoluer pour fonctionner plus efficacement à pH7 environ.

Une autre caractéristique des laccases est qu'elles sont inhibées pour les halogénures, les sulphides, les carbonates et les métaux lourds suivant différents mécanismes d'inhibitions (*Rodgers et al. 2009*). L'inhibition de l'activité catalytique par les halogénures est notamment conséquente et augmente plus l'anion est petit et électronégatif ($F^- > Cl^- > Br^- > I^-$). Ces anions étant présents dans les fluides biologiques en quantité suffisamment élevées pour permettre l'inhibition ($[Cl^-] \approx 100mM$), un des objectifs dans le but de développer un système implantable serait d'augmenter la tolérance de CotA vis-à-vis des halogénures.

De plus, dans le cas d'une biopile enzymatique fonctionnant avec un unique compartiment, CotA sera exposée aux substrats et produits relatifs à la réaction anodique. Dans le cas d'une biopile glucose/O₂, l'activité de CotA ne devra donc pas être affectée par de fortes concentrations en D-

glucose ou acide *D*-gluconique. Autre exemple, dans le cas d'une pile EtOH/O₂, de hautes concentrations en éthanol, acétaldéhyde ou acide acétique devront être tolérées par la laccase.

Pour conclure, le potentiel rédox de CotA reste également une des caractéristiques à évoluer de manière à maximiser ce dernier. Il semble cependant très compliqué de développer une méthode permettant de sélectionner des variants en fonction de leurs potentiels rédox. Une augmentation du potentiel ne sera donc pas visée particulièrement mais résulterait plutôt d'une heureuse évolution secondaire.

2.4 Conclusion

Les objectifs du doctorat sont d'optimiser la laccase modèle CotA par évolution dirigée des protéines pour son utilisation en temps que biocatalyseur cathodique de la réduction de l'O₂ en H₂O. L'idée est de prendre comme modèle les caractéristiques correspondant à une biopile enzymatique universellement reconnu comme étant idéale, c'est à dire fonctionnant dans des conditions douces et si possible au sein d'un compartiment unique. L'objectif est ainsi d'améliorer l'activité catalytique de CotA dans des conditions de température et de pH correspondantes, c'est à dire 20-30°C et pH7, tout en conservant ou en améliorant la stabilité de la protéine.

Nous avons décidé pour cela d'utiliser la microfluidique digitale comme technique de criblage à haut débit afin de pouvoir développer une technique robuste et rapide de sélection de l'activité catalytique de CotA dans des conditions similaires à celles de la biopile enzymatique Glucose/O₂ souhaitée.

3 La microfluidique digitale

La microfluidique désigne globalement la science et la technologie des systèmes manipulant de faibles quantités de fluides (10^{-6} à 10^{-18} L) au sein de canaux dont au moins l'une des dimensions caractéristiques est de l'ordre du micromètre. Cette technologie émergente est en pleine expansion depuis les vingt dernières années : applicable à de nombreuses réactions chimiques et biologiques, elle permet de diminuer considérablement quantité de réactif (du μL au pL) et durée de réaction (min, s ou μs) (*Whitesides 2006*). La microfluidique digitale est une sous classe de la microfluidique et implique une compartimentation pour l'étude de volumes de fluides discrets et distincts, contrairement aux systèmes à phases continues. Dans ce document, le terme de microfluidique digitale fera uniquement référence à la microfluidique en gouttes qui vise à produire et manipuler des microgouttelettes d'une phase dispersée dans une phase continue au sein de microcanaux (*Teh et al. 2008*). Ces microgouttelettes, produites avec une très grande monodispersité de taille, font office de microréacteurs pouvant être manipulés individuellement. La technologie permet par conséquent de réaliser simultanément un nombre très élevé de réactions chimiques ou biologiques avec un minimum de réactifs et en un minimum de temps. Pour ces raisons, la microfluidique digitale possède d'énormes potentiels dans de nombreux domaines d'application.

La technologie repose sur la formation à très haut débits de microgouttelettes de phase dispersé dans une phase continue, les deux phases étant non miscibles. La formation des microgouttelettes a lieu de manière contrôlée et précise au sein de microcanaux microfluidiques en polydiméthylsiloxane (PDMS), en polyméthacrylate de méthyle (PMMA) ou encore en verre. Cette technologie offre la possibilité de contrôler précisément le contenu et le volume des microgouttelettes en contrôlant les vitesses des flux de liquide avant la formation de celles-ci, ce qui est particulièrement important dans de nombreuses réactions et applications (*Song et al. 2006 ; Huebner et al. 2008a*). Après leur formation, les microgouttelettes stabilisées par un tensioactif peuvent être manipulées à façon.

Dans la suite du document, nous aborderons tout d'abord les principes généraux relatifs à la microfluidique digitale, à la formation et à la stabilité des microgouttelettes. Nous verrons ensuite les différents modules microfluidiques existants permettant de manipuler les microgouttelettes puis nous présenterons des exemples d'application de la microfluidique digitale à la biologie.

3.1 Principes

3.1.1 Le régime laminaire

Puisque les gouttelettes produites dans les systèmes microfluidiques circulent dans une phase continue, il est nécessaire de considérer les caractéristiques des flux les transportant à travers les

microcanaux. Habituellement, les flux dans les canaux microfluidiques sont caractérisés par un faible nombre de Reynolds Re :

$$Re = \frac{\rho v l}{\mu}$$

où ρ est la densité (kg.m^{-3}), v la vitesse (m.s^{-1}), μ la viscosité dynamique (Pa.s) et l la dimension caractéristique du système (m).

Re , sans dimension, reflète la tendance d'une phase liquide en écoulement à générer des turbulences. La frontière entre régime laminaire et régime turbulent (Figure 25a et b) se situe généralement pour $Re = 2000$. Plus la vitesse du flux, la largeur du canal et la densité du liquide sont faibles, plus Re est faible. Dans les systèmes microfluidiques ayant des canaux dont la section est de l'ordre de $100 \mu\text{m}^2$, les nombres de Reynolds sont quasiment toujours inférieurs à 1. Les stresses visqueux et les gradients de pression prédominent tandis que les forces d'inertie et de gravité deviennent négligeables. L'écoulement est donc laminaire : il est stable et les lignes de courant sont bien dessinées (Figure 25a).

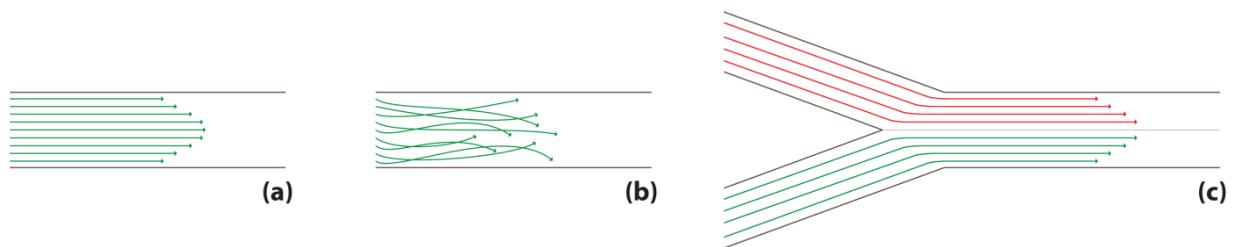


Figure 25 (a) Régime laminaire. (b) Régime turbulent. (c) Cas de la jonction de deux flux en régime laminaire : les liquides ne se mélangent que par diffusion à l'interface

Dans ce régime, le mélange par diffusion est lent comparé à la convection. Le nombre de Péclet Pe , également sans dimension, décrit le rapport entre le transfert par convection et le transfert par diffusion dans un flux :

$$Pe = \frac{Ul}{D}$$

où U est la vitesse moyenne du flux axial (m.s^{-1}), l la section du canal (m) et D la constante de diffusion ($\text{m}^2.\text{s}^{-1}$).

Dans les systèmes microfluidiques, ces paramètres ont généralement les valeurs suivantes : $U = 0,1 - 1 \text{ cm.s}^{-1}$; $l = 10^{-3} - 10^{-2} \text{ cm}$; $D = 10^{-7} - 10^{-5} \text{ cm}^2.\text{s}^{-1}$, ce qui correspond à : $10 < Pe < 10^5$. Cela se traduit par le fait que deux courants de fluides miscibles injectés dans un canal microfluidique circulent côte à côte en régime laminaire et ne se mélangent que par diffusion (Ismagilov et al. 2000) (Figure 25c). La distance sur laquelle diffusent les molécules entre les deux courants de fluide dépend de leur poids moléculaire, de la viscosité et de la vitesse des liquides ainsi que de la distance à la jonction des

canaux. Plus précisément, la diffusion transverse x de molécules dans un flux à plusieurs courants dans un système microfluidique peut être décrite par :

$$\langle x^2 \rangle = 2Dt \quad \text{avec : } D = \frac{k_b T}{6\pi\eta a} \quad \text{et : } t = \frac{L}{v}$$

où $\langle x^2 \rangle$ est la moyenne du carré de x , D le coefficient de diffusion ($\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$), k_b la constante de Boltzman ($\text{m} \cdot \text{K}^{-1}$), T la température (K), η la viscosité dynamique (Pa.s), a le rayon moléculaire de la molécule (m) et t le temps (s) nécessaire au fluide pour arriver à une distance L (m) de la jonction des deux fluides à la vitesse v ($\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$).

Une autre caractéristique d'un flux dans un canal microfluidique est la dispersion de Taylor-Aris liées aux forces de cisaillement (*Taylor 1953 ; Aris 1956*). Les parois du microcanal appliquent en effet une force de cisaillement sur le fluide se traduisant par un profil de vitesse parabolique : la vitesse du fluide est quasiment nulle le long des parois tandis qu'elle est maximale au centre du canal (Figure 26).

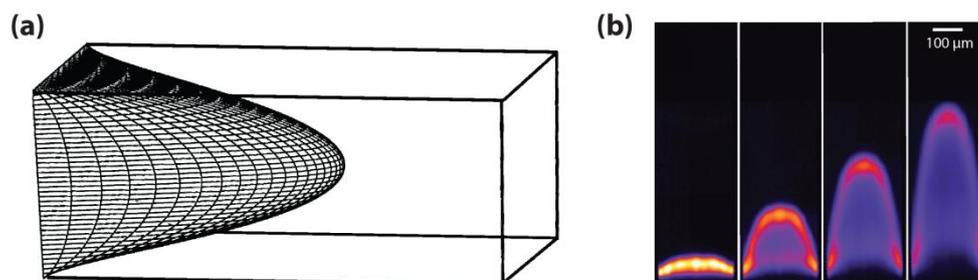


Figure 26 *Dispersion de Taylor-Aris : (a) Simulation tridimensionnelle du profil de vitesse dans un canal microfluidique carré de 40 µm de section (Jo et al. 2009). (b) Une goutte de dye fluorescente initialement uniforme est déformée de manière parabolique par le flux au sein du canal microfluidique (Datta al. 2009)*

Dans le cas de microgouttelettes regroupées et circulant au sein d'un canal microfluidique très large, cette dispersion peut induire des variations significatives dans la distribution des temps de séjour des microgouttelettes dans le canal microfluidique. En effet, les microgouttelettes circulant le long des parois avanceront plus lentement que les microgouttelettes situées au centre du canal. Il est toutefois possible de limiter ce biais en jouant sur la géométrie des canaux (la question sera abordée dans le paragraphe 3.2.3).

3.1.2 La production de microgouttelettes

La plupart des systèmes microfluidiques de production de microgouttelettes génèrent des microgouttelettes de diamètre allant de la dizaine de micromètres à plusieurs centaines de micromètres, soit en volume, de l'ordre de la centaine de femtolitre à la centaine de picolitre. Typiquement, la fréquence de production des microgouttelettes est comprise entre 0,1 et 10 kHz, la fréquence la plus haute jamais reportée étant 30 kHz, soit 10^8 microgouttelettes par heure (*Holtze et*

¹Le coefficient de variance (CV) du diamètre des microgouttelettes est défini par $CV = d/D_m \times 100 \%$, où d est la déviation standard et D_m le diamètre moyen des microgouttelettes.

al. 2008). Contrairement aux émulsions standard, les microgouttelettes sont produites avec une monodispersité en taille contrôlée et généralement très basse ($CV \sim 1\%$)¹, ce qui est particulièrement important pour les expériences d'évolution dirigée des protéines et la plupart des tests biologiques. Il est en effet crucial de contrôler la taille des microgouttelettes afin de contrôler précisément la distribution du matériel biologique utilisé au sein des microgouttelettes (voir 2.2).

Les systèmes microfluidiques de production de microgouttelettes utilisent deux flux : un flux continu (phase continue) et un flux aqueux composé de la phase devant être compartimentée (phase dispersée) (Figure 27). Les deux géométries principalement utilisées sont la jonction en T et la focalisation hydrodynamique.

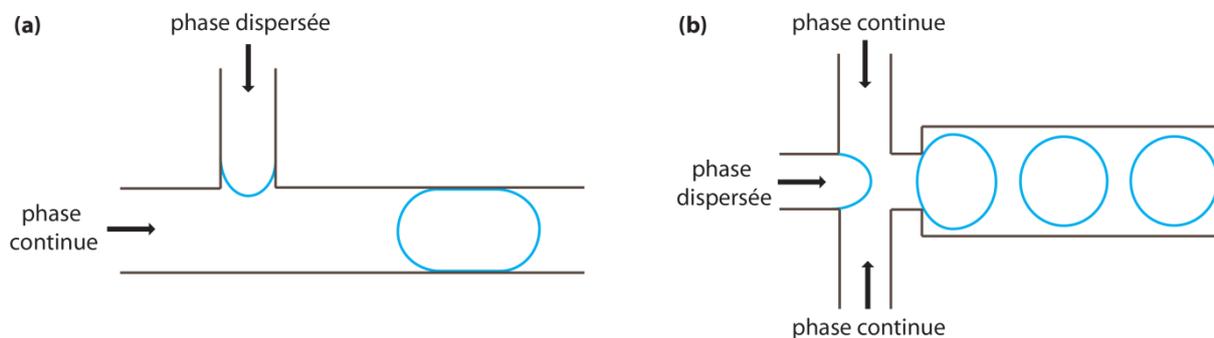


Figure 27 *Production de microgouttelettes : la phase à encapsuler est dispersée dans la phase continue. Deux géométries sont usuellement utilisées : la jonction en T (a) et la focalisation hydrodynamique (b)*

La formation des microgouttelettes est un phénomène complexe et dynamique dépendant de nombreux paramètres (le nombre capillaire, le rapport entre les vitesses de la phase continue et de la phase dispersée, la viscosité des liquides, la concentration en tensioactif et la géométrie du circuit). Il n'existe pas de modèle unique généralisant le processus de formation des microgouttelettes dans un système microfluidique. La plupart du temps, les modèles sont spécifiques à la géométrie considérée (Christopher et al. 2007). De manière générale, l'influence des forces de gravité et d'inertie sur le procédé de production des microgouttelettes est typiquement négligeable en raison de faibles nombre de Weber et de Bond (Günther et al. 2006). Dans la plupart des cas, il semblerait que le processus de formation des microgouttelettes soit régi par le cisaillement appliqué par la phase continue sur la phase dispersée. Le cisaillement déforme l'interface entre les deux fluides jusqu'à la création d'une microgouttelette. La taille des microgouttelettes peut être reliée à un nombre sans dimension, le nombre capillaire Ca , qui compare les forces de cisaillement aux forces interfaciales :

$$Ca = \frac{v\mu}{\gamma} \sim \frac{w}{d}$$

où v est la vitesse moyenne de la phase continue ($m \cdot s^{-1}$), μ la viscosité dynamique (Pa.s), γ la tension interfaciale ($N \cdot m^{-1}$), w la section du canal (m) et d le diamètre de la microgouttelette (m).

La formation des microgouttelettes est donc le résultat de la compensation entre les forces visqueuses (cisaillement) qui ont tendance à étirer la phase continue tout au long du canal et la tension de surface (forces capillaires) qui a tendance à former les microgouttelettes pour minimiser l'interface totale des fluides (Joanicot *et al.* 2005). Les huiles fluorées ont des tensions interfaciales avec l'eau plus élevées que les huiles silicones ou végétales. La production des microgouttelettes nécessitent donc dans leur cas de plus fortes forces de cisaillement, la plupart du temps apportées par les contraintes géométriques du circuit microfluidique. Comme mentionné plus haut, les deux géométries majoritairement utilisées pour produire des microgouttelettes sont la jonction en T et la focalisation hydrodynamique.

3.1.2.1 La jonction en T

La production de microgouttelettes dans un système microfluidique utilisant une jonction en T est schématisée dans la Figure 28 :

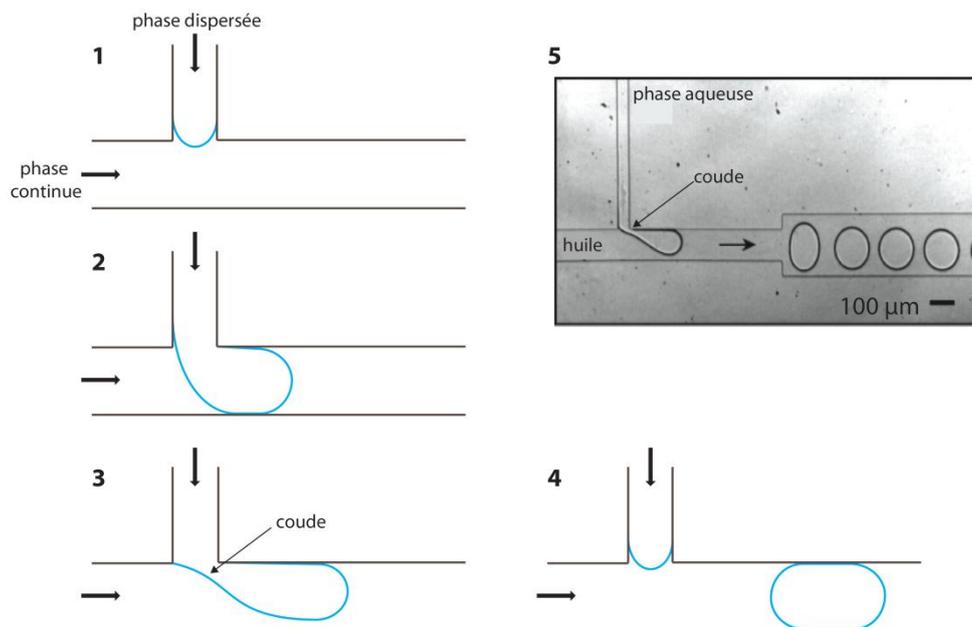


Figure 28 *Production de microgouttelettes avec une jonction en T : 1-4 : Schématisation du processus de création d'une microgouttelette de phase aqueuse dispersée au sein de la phase huile continue. 5 : Photo du système microfluidique en fonctionnement reproduite depuis Mazutis 2009c*

Cette géométrie a été utilisée pour la première fois par Thorsen *et al.* en 2001 (Thorsen *et al.* 2001). La phase continue circule directement dans le canal principal et la phase dispersée est amenée perpendiculairement par un canal secondaire. Le courant de phase dispersée pénètre dans le canal principal et occupe l'entière section du canal (Figure 28 (1 et 2)). Le film d'huile entre l'interface eau/huile et les parois du canal décroît et la pression dans la phase continue commence à augmenter. Le gradient de pression et le flux de la phase continue déforme la microgouttelette et l'interface se déplace dans le sens du courant (Figure 28 (2 et 3)). Un coude se forme et diminue à mesure que l'interface se rapproche de l'extrémité avale de l'entrée de phase dispersée pour finir

par se casser (Figure 28 (3)). La microgouttelette ainsi formée est entraînée en aval dans la phase continue tandis que le bout de la phase dispersée se retire à l'entrée du canal secondaire et le processus se répète (Garstecki et al. 2006) (Figure 28 (3 et 4)). Le processus de formation de la microgouttelette est ici régi par le gradient de pression ("squeezing regime").

Le volume des microgouttelettes peut être ajusté en variant les flux de phase dispersée et continue. La section du canal principal est également un paramètre important : lorsque le canal principal est sensiblement plus large que le canal secondaire (ratio > 4), les microgouttelettes ne remplissent plus assez rapidement la section entière du canal principal et sont directement formées dans un régime de goutte à goutte ("dripping regime") (Garstecki et al. 2006). Dans ce cas, la formation de la microgouttelette est contrôlée par les forces de cisaillement et peut être décrite par le nombre capillaire Ca (Nisisako et al. 2002 ; Christopher et al. 2008). Puisque les forces de cisaillement prédominent, la viscosité de la phase continue joue un grand rôle dans la production des microgouttelettes (Gupta et al. 2009) : plus sa viscosité augmente, plus les forces de cisaillement agissant à l'interface augmentent et facilitent le passage de la phase dispersée en microgouttelettes de faible volume. A l'inverse, la viscosité de la phase dispersée a l'effet contraire : plus sa viscosité augmente, plus Ca diminue et plus le volume des microgouttelettes produites est important. L'influence de la viscosité va dans le même sens dans le cas du "squeezing regime" : plus la phase dispersée est visqueuse, plus l'interface est stabilisée au niveau du coude et une plus grande quantité de liquide peut ainsi pénétrer dans le canal principal avant la formation de la microgouttelette. Un troisième régime est atteint lorsque les flux sont très élevés et que la tension interfaciale est faible (soit pour un Ca important) : on parle alors de "jetting regime". La phase aqueuse pénètre plus en aval dans le canal principal formant une "langue" et les microgouttelettes sont formées à l'extrémité de cette langue de manière irrégulière (distribution de taille plus polydisperse). Il a été démontré expérimentalement que, pour un flux de phase continue donné, les trois différents régimes étaient progressivement atteints en augmentant le flux de la phase dispersée (Guillot et al. 2005), ce qui confirme les modèles numériques établis (De Menech et al. 2008).

3.1.2.2 La focalisation hydrodynamique

La production de microgouttelettes par focalisation hydrodynamique dans un système microfluidique a été décrite par Anna et al. en 2003 (Anna et al. 2003). Dans ce cas, la phase dispersée est coupée de part et d'autre par deux entrées de phase continue (Figure 29). L'ensemble des trois courants est ensuite dirigé vers un rétrécissement : la vitesse augmente et les forces de cisaillement subies par la phase dispersée sont plus importantes. La phase continue applique des forces de pression et de cisaillement qui forcent la phase dispersée à passer à travers le rétrécissement : la phase dispersée forme un bras étroit qui casse à l'intérieur ou en sortie de l'orifice (Garstecki et al. 2005 ; Ward et al. 2005).

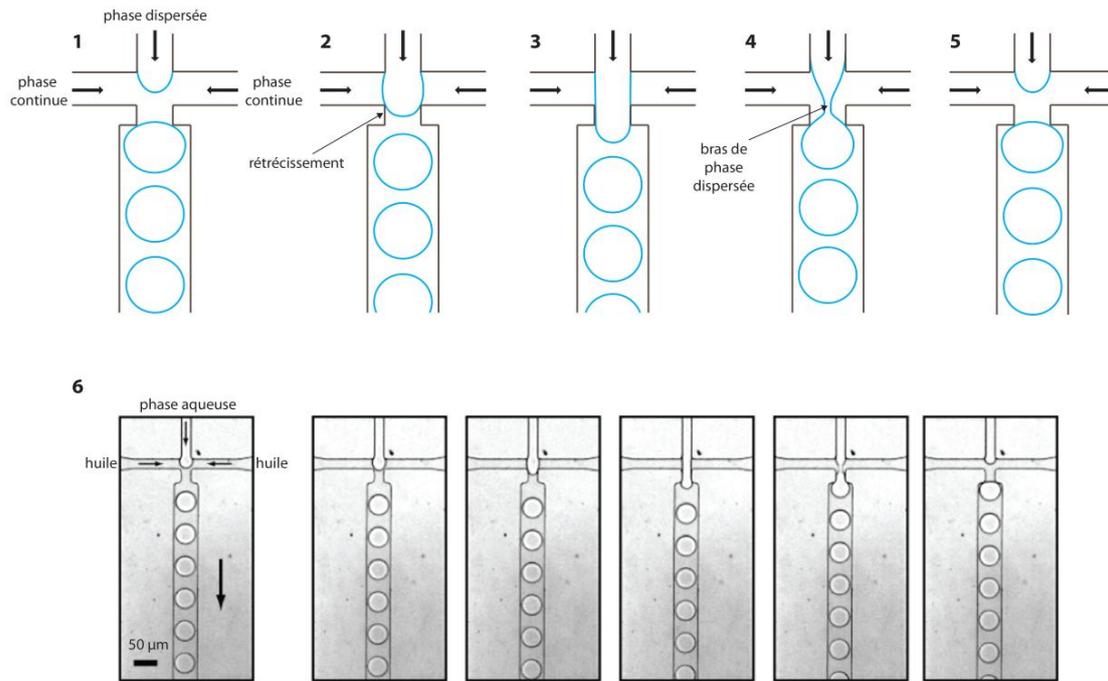


Figure 29 Production de microgouttelettes avec une jonction par focalisation hydrodynamique : 1-5 : Schématisation du processus de création d'une microgouttelette de phase aqueuse dispersée au sein de la phase huile continue. 6 : Photos du système microfluidique en fonctionnement. Une image toutes les 0.3 ms. (reproduit Mazutis 2009c)

La géométrie de la jonction et la vitesse des deux flux contribuent à déformer l'interface. En grossissant, la microgouttelette en formation obstrue l'orifice et bloque le flux de phase continue vers la sortie : la pression augmente brutalement en amont de la microgouttelette, ce qui conduit à la rupture du bras de phase dispersée. Le processus est lent par rapport au temps de relaxation de l'énergie interfaciale. Ainsi, la rupture du bras de phase dispersée se déroule en une suite d'états à l'équilibre. Le bras devient si fin et instable qu'il casse rapidement sans contribuer au volume finale de la microgouttelette (Garstecki et al. 2005). La rupture du bras ne semble pas être contrôlée par la tension de surface mais plutôt par l'apport constant de phase continue par le système d'injection. Lorsque le bras de liquide entre dans le rétrécissement, il limite le flux de phase continue à de simples films entre l'interface huile/eau et les parois du canal. La pression constante appliquée par le système d'injection sur le film d'huile pour maintenir le flux de phase continue constant déplace l'interface proportionnellement à la vitesse du flux de phase continue (Garstecki et al. 2005). Le mécanisme de rupture de la phase dispersée est similaire à celui dans le cas d'une jonction en T. La différence temporelle entre la lente progression de la rupture du bras de phase dispersée et le rapide retour à l'équilibre de l'interface donne lieu à des événements de rupture très reproductibles et donc à des émulsions hautement monodisperses dans leur distribution en taille de goutte.

Le volume des microgouttelettes dépend fortement de la géométrie du rétrécissement (Dollet et al. 2008) ainsi que du *ratio* entre les vitesses des flux des phases dispersée et continue. Par exemple, plus le rétrécissement est étroit, plus les microgouttelettes sont petites. Lorsque les vitesses des flux sont élevées (soit $Ca > 0,1$), la formation des microgouttelettes s'apparente à un robinet

fonctionnant au goutte à goutte (*Anna et al. 2003 ; Garstecki et al. 2005*). Dans ce "dripping regime", le bras de phase dispersée ne se rétracte pas après rupture mais reste à la même position au sein du rétrécissement pendant toute l'émulsification. La taille des gouttes décroît avec l'augmentation de Ca ou l'augmentation du *ratio* entre la vitesse de la phase continue et celle de la phase dispersée. Un "jetting regime" est atteint pour de très grandes vitesses de flux de phase dispersée : la pointe de la phase dispersée pénètre dans le canal principal en aval du rétrécissement pour former une langue et générer des microgouttelettes dont la distribution en taille est polydisperse (*Nie et al. 2008*).

Plusieurs études ont également montré que la concentration de tensioactif dans la phase continue contribue au mécanisme de formation des microgouttelettes (*Anna et al. 2006 ; Jin et al. 2006*). Plus la tension de surface est faible, plus la période de rupture est longue : une quantité plus importante de phase dispersée a le temps de pénétrer dans la microgouttelette en formation avant sa rupture. Le phénomène est également valable dans le cas d'une jonction en T (*Wang et al. 2009a*).

3.1.2.3 Comparaison entre jonction en T et focalisation hydrodynamique

Bien que les deux géométries soient utilisées pour produire des microgouttelettes, les régimes de fonctionnement pour lesquels l'émulsion créée possède une dispersion en taille monodisperse diffèrent dans les deux cas (*Abate et al. 2009 a*). Pour de bas Ca ($< 10^{-2}$), contrairement à la focalisation hydrodynamique, la jonction en T permet de former des microgouttelettes indépendamment de la viscosité des fluides ou de la tension interfaciale. Pour un Ca moyen, les deux géométries peuvent produire des microgouttelettes monodisperse en taille, la focalisation hydrodynamique produisant par contre des microgouttelettes sensiblement plus grosses. Lorsque les valeurs de Ca deviennent élevées ($\sim 0,1$), la jonction T ne permet plus la formation de microgouttelettes : la phase dispersée n'est plus cassée et les deux phases circulent alors parallèlement dans le canal principal. Au contraire, pour de telles valeurs de Ca , la focalisation hydrodynamique continue de former des émulsions hautement monodisperses en taille en étant sous le "dripping regime". Cette géométrie est ainsi particulièrement utile lorsqu'une émulsion monodisperse en taille doit être produite à de hautes fréquences de production ($> 10\text{kHz}$). Cependant, si de hautes fréquences de production ne sont pas obligatoires, la jonction en T peut s'avérer très intéressante, notamment pour produire alternativement deux types de microgouttelettes en couplant deux jonctions en T (*Zheng et al. 2004 ; Frenz et al. 2008*).

L'un des principaux inconvénients de la jonction en T réside dans le fait que la phase dispersée reste en contact avec la paroi en PDMS du canal principal pendant le processus de formation de la microgouttelette. Cette interaction peut changer les propriétés de la surface de PDMS et causer des problèmes de mouillage perturbant la production des microgouttelettes. Au contraire, dans le cas de la focalisation hydrodynamique, la phase dispersée reste entourée par la phase continue et ne rentre jamais en contact avec la surface de PDMS (sauf dans le cas où le ratio entre la vitesse de la phase

continue et celle de la phase dispersée est proche de 1). Dans le cas d'application biologique par exemple, *Liau et al.* ont constaté l'adsorption de protéines sur les parois des canaux dans le cas d'une jonction en T, alors qu'aucun problème n'a été constaté dans le cas de la focalisation hydrodynamique (*Liau et al. 2005*). De plus, de nombreuses études ont également montré que de petites microgouttelettes satellites sont formées pendant l'émulsification avec une jonction en T (*Tan et al. 2005 ; Husny et al. 2006 ; van der Graaf et al. 2006 ; Sang et al. 2009*).

Nous avons décidé d'utiliser la focalisation hydrodynamique pour la production des émulsions lors de ces travaux de doctorat. Il est en effet important pour nos applications d'éviter les phénomènes d'adsorption tout en travaillant avec de hautes fréquences de production pour permettre le criblage de grandes banques de gènes.

3.1.2.4 Autres méthodes de production de microgouttelettes

Les méthodes alternatives utilisées dans les systèmes microfluidiques pour la production de microgouttelettes ne reposent pas simplement sur la géométrie des canaux mais nécessitent une source externe d'énergie. Bien que la fréquence de production de ces méthodes soit limitée par rapport aux deux méthodes passives décrites ci-dessus, ces techniques peuvent offrir plus de flexibilité dans le volume des microgouttelettes formées. Par exemple, de grosses gouttelettes (> 100 pL) peuvent être créées en utilisant la déflexion d'une membrane associée à une jonction en T (*Willaime et al. 2006*). La déflexion de la membrane modifie la vitesse de la phase dispersée et modifie ainsi la taille des gouttelettes formées. Le volume des microgouttelettes peut également être contrôlé à l'aide de valves placées de part et d'autre du rétrécissement, contrôlant ainsi sa largeur (*Abate et al. 2009 b ; Zeng et al. 2009*).

L'utilisation d'un champ électrique permet aussi la production de microgouttelettes. L'application d'une forte tension sous la forme d'un pulse (900V ; 50 ms) autorise la formation de microgouttelettes de très faible volume (10 fL – 1 pL) à de faibles fréquences de production (< 100 Hz) (*He et al. 2005a*). L'application d'un champ électrique continue peut également se montrer utile pour produire des microgouttelettes de très faible taille sous différents régimes (*Kim et al. 2007a*).

3.1.2.5 Le type d'émulsion utilisé

Il convient pour la suite de préciser rapidement le type d'émulsion que nous avons choisi d'utiliser dans ce projet. Les émulsions manipulées sont des émulsions d'eau-dans-huile, les phases aqueuses étant dispersées dans une phase continue composée d'une huile perfluorée au sein de canaux microfluidiques en polydiméthylsiloxane (PDMS). Les huiles fluorées sont des phases continues très intéressantes en microfluidique digitale puisqu'elles sont à la fois hydrophobes et lipophobes et présentent donc de faibles solubilités envers les composés organiques. En outre, les huiles fluorées ne mouillent pas le PDMS et ont une bonne solubilité aux gaz, caractéristique importante pour les

échanges gazeux et la survie de cellules encapsulées (Lowe *et al.* 1998 et 2002 ; Clausell-Tormos *et al.* 2008). Les différentes notions abordées par la suite seront donc appliquée principalement au cas de microgouttelettes aqueuses dispersées dans d'une huile perfluorée.

3.1.3 Le mouillage

En physique, le mouillage de la surface des canaux peut être décrit en termes de tension interfaciale γ et d'angle de contact θ (de Gennes *et al.* 2003). La tension interfaciale traduit l'énergie par unité de surface attribuée à l'attraction entre les deux surfaces (huile et eau). Plus rigoureusement, la tension interfaciale est définie comme la différence des travaux W nécessaires pour étirer l'interface normalisée à la surface A de l'interface (ce qui correspond à l'amplitude de la force appliquée parallèlement à l'interface par unité de surface) (Barnes *et al.* 2005). L'angle de contact θ représente l'angle pour lequel l'interface de la gouttelette rentre en contact avec la surface d'un solide (verre, PDMS) (Figure 30). Si θ est faible ($< 90^\circ$), le mouillage de la surface a lieu et le fluide se répandra sur une large partie de la surface. Si θ est grand ($> 90^\circ$), le fluide minimisera alors la surface de contact avec le solide pour former une gouttelette. Le mouillage parfait correspond à $\theta = 0^\circ$ tandis que $\theta = 180^\circ$ correspondrait à une surface parfaitement non-mouillable. Ainsi, dans des conditions de mouillage ($\theta < 120^\circ$), la phase dispersée adhère à la surface des canaux microfluidiques et la production de microgouttelettes devient impossible (Dreyfus *et al.* 2003).

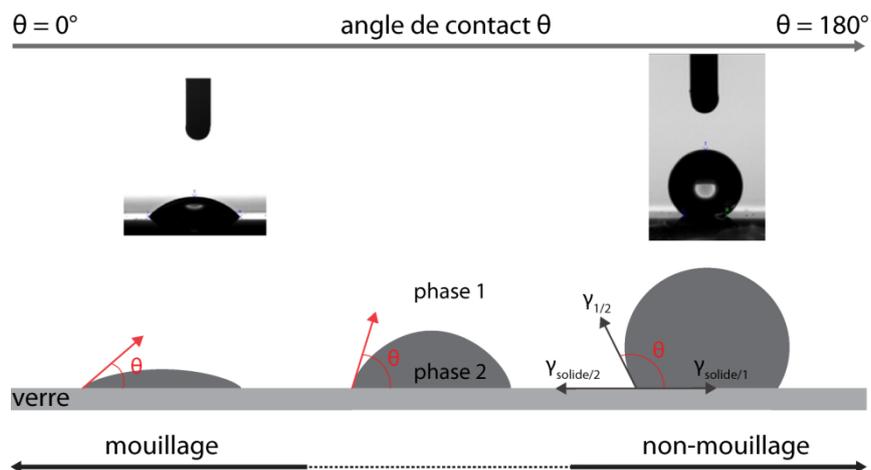


Figure 30 *Phénomène de mouillage et mesure d'angle de contact* : Schématisation de l'angle de contact θ d'une goutte de phase 1 au sein d'une phase 2 sur une surface de verre. Le mouillage parfait correspond à $\theta = 0^\circ$ tandis que $\theta = 180^\circ$ correspondrait à une surface parfaitement non-mouillable. γ représente la tension interfaciale entre la phase 1 et la phase 2 ($\gamma_{1/2}$), la phase 1 et la surface de verre ($\gamma_{solide/1}$), la phase 2 et la surface de verre ($\gamma_{solide/2}$). Photos de goutte (<http://www.nml.lhu.edu.tw>)

Indépendamment de la géométrie utilisée pour produire les microgouttelettes, le phénomène de mouillage demeure un paramètre primordial : afin d'obtenir une production régulière de microgouttelettes d'eau-dans-huile et un transport homogène des réactifs au sein des microgouttelettes, la phase continue doit mouiller préférablement les parois des canaux par rapport à la phase dispersée. Dans ce cas, la phase dispersée n'entre jamais en contact avec les parois des

canaux en étant constamment isolée par un fin film de phase huile continue (Günther *et al.* 2006). À l'inverse, des microgouttelettes d'huile-dans-eau ne seront produites que si la phase aqueuse continue possède une plus grande mouillabilité vis-à-vis des parois par rapport à la phase huile dispersée. Toutefois, la production des microgouttelettes dans les systèmes microfluidiques dépend principalement des propriétés de mouillage de la surface et est indépendante du tensioactif utilisé. Il est en effet possible, en utilisant un seul type de tensioactif, de produire des émulsions eau-dans-huile ou huile-dans-eau en changeant simplement les propriétés de mouillage de la surface des canaux (Shui *et al.* 2009). Cette caractéristique est une des différences majeures vis-à-vis des émulsions mécaniques dont la formation est lourdement affectée par la taille et la force des parties hydrophiles et hydrophobes du tensioactif (Duchin *et al.* 1995).

En raison d'un très faible angle de contact entre l'eau et le verre ($\theta \sim 8^\circ$), une microgouttelette aqueuse circulant dans la phase huile continue mouille préférentiellement la surface de verre. Afin d'éviter ce phénomène indésirable, les canaux microfluidiques sont traités avec un agent de surface avant utilisation. Dans le cas d'une huile perfluorée, ce traitement de surface est généralement effectué avec un silane perfluoré, tels que l'octadécyltrichlorosilane (OTS, $\text{Cl}_3\text{-Si-(CH}_2\text{)}_{17}\text{-CH}_3$), le tridécylfluoro-1,1,2,2-tetrahydrooctyl-1-trichlorosilane (FTS, $\text{Cl}_3\text{-Si-(CH}_2\text{)}_5\text{-CF}_3$) ou encore le 1H,1H,2H,2H-perfluorodécyltrichlorosilane ($(\text{CF}_2)_8\text{-(CH}_2\text{)}_2\text{-Si-Cl}_3$). Les silanes s'adsorbent irréversiblement sur la surface polaire via une liaison covalente (Sagiv 1980) (Figure 31a). La réaction repose sur l'hydrolyse du groupement SiCl_3 en silanole Si(OH)_3 en présence d'un film d'eau à la surface du substrat (le verre). Ces silanoles peuvent interagir avec les groupements Si-OH du substrat pour former des liaisons covalentes Si-O-Si . Les molécules de silanes s'organisent ainsi en SAM hydrophobe et lipophile sur la surface de verre. Cette SAM peut ensuite réticuler via les fonctions Si-OH libres et adjacentes (Sagiv 1980 ; Calhoun *et al.* 2008).

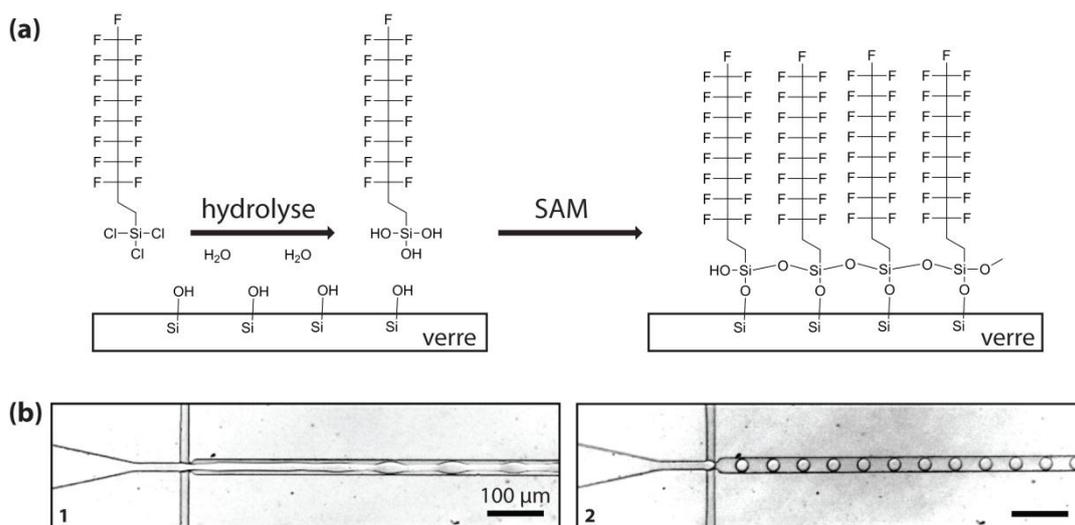


Figure 31 (a) Traitement d'une surface de verre par silanisation avec un silane perfluoré (1H,1H,2H,2H-perfluorodécyltrichlorosilane). (b) Production de microgouttelettes en absence (1) et présence (2) de tensioactif dans un système microfluidique silanisé (reproduit Mazutis 2009c)

Afin de réduire les interactions potentielles avec les parois des canaux microfluidiques, la phase huile continue (dans le cas de microgouttelettes aqueuses) contient du tensioactif à des concentrations proches ou plus élevées que leur concentration micellaire critique (Reiter *et al.* 2000 ; Tice *et al.* 2003). Dans ces conditions, l'angle de contact entre l'eau et le verre ou le PDMS atteint quasiment 180°, rendant la production de microgouttelettes possible (Dreyfus *et al.* 2003, Xu *et al.* 2006) (Figure 31b). Les molécules de tensioactif saturant l'interface eau/huile créant un film qui empêche les interactions entre les parois des canaux et le contenu des microgouttelettes. En présence de tensioactif, la transition entre le régime de mouillage et le régime stable de production de microgouttelettes est brutale, sans aucune situation intermédiaire (Dreyfus *et al.* 2003). La présence du tensioactif à l'interface entre la phase dispersée et la phase continue permet également de stabiliser les microgouttelettes et d'éviter leur coalescence en cas de contact physique en elles.

3.1.4 La stabilité des microgouttelettes

Dans le cas d'émulsions d'eau-dans-huile, les tensioactifs utilisés sont des molécules amphiphiles composées d'une longue queue hydrophobe (et lipophobe dans le cas d'huiles perfluorées) et d'une tête hydrophile (Figure 32a). Lorsqu'une microgouttelette est formée dans la phase huile contenant du tensioactif, les molécules de tensioactif diffusent de la solution vers l'interface et s'organisent de manière à présenter leur tête polaire face à la phase aqueuse dispersée et leur queue hydrophobe face à la phase huile continue (Figure 32b). Le tensioactif joue deux rôles importants une fois à l'interface : il permet de réduire la tension interfaciale et d'empêcher la coalescence des microgouttelettes en augmentant la pression de séparation dans le film formé par l'interaction de deux microgouttelettes proches l'une de l'autre (Sjöblom *et al.* 2006).

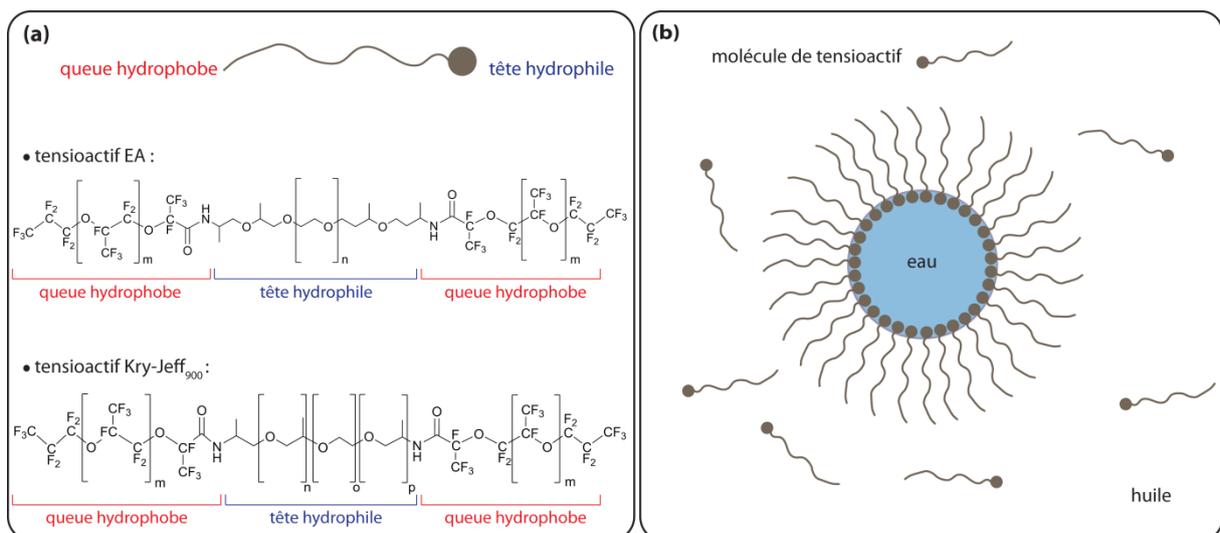


Figure 32 (a) Schématisation d'une molécule de tensioactif. Exemples de tensioactifs perfluorés. (b) Schématisation de l'organisation des molécules de tensioactifs à l'interface eau/huile d'une microgouttelette aqueuse

Les microgouttelettes produites dans un système microfluidique peuvent être collectées sous la forme d'une émulsion à la sortie du système. Au sein de cette émulsion, les microgouttelettes sont en contact direct les unes avec les autres et peuvent soit fusionner pour former de nouvelles gouttelettes plus volumineuses, soit rester stables en maintenant leur forme et leur distribution de taille jusqu'à plusieurs années (*Bibette et al. 1992*). La diminution de la monodispersité de taille d'une émulsion est liée à deux phénomènes : la diffusion de la phase dispersée dans la phase continue (Ostwald ripening) ou la rupture du film formé entre deux microgouttelettes (*Bibette et al. 1999*).

Dans le cas d'une huile perfluorée, la solubilité des composés organiques non fluorés étant très faible, la diffusion de la phase dispersée vers la phase huile continue est très lente et négligeable. L'intégrité de l'émulsion est principalement affectée par la présence ou non de tensioactif. Au dessus de la concentration micellaire critique (CMC), l'interface est saturée avec des molécules de tensioactif. Dans la phase huile continue, les molécules de tensioactif forment des micelles tandis que la concentration en molécules de tensioactif libres reste à des valeurs proches de la CMC. Dans les systèmes microfluidiques, une adsorption à l'interface eau/huile suffisamment rapide est atteinte avec des CMC de l'ordre de 10^{-4} mol.L⁻¹ (*Holtze et al. 2008*). Les émulsions sont toujours instables lorsque la concentration en tensioactif est maintenue en dessous de la CMC, qui dépend principalement de la structure de la molécule et de son potentiel chimique. Cependant, si la concentration de tensioactif passe au dessus de la CMC, les microgouttelettes deviennent résistantes à la coalescence et ce insensiblement à l'augmentation de la concentration de tensioactif. Dans ces conditions, la coalescence des microgouttelettes peut être provoquée par un changement de pression osmotique. Lorsque la pression devient supérieure à une valeur critique, le film situé entre les microgouttelettes en contact devient instable et entraîne de la coalescence. Ainsi, même pour des concentrations de tensioactif bien supérieures à la CMC, la stabilité des microgouttelettes ne pourra plus être améliorée et dépendra principalement de la pression osmotique (*Bibette et al. 1992 ; Mason et al. 1995*).

Les systèmes microfluidiques sont particulièrement bien adaptés à l'étude de la stabilisation des microgouttelettes par un tensioactif puisqu'ils permettent d'isoler dans le temps et l'espace les étapes de formation, stabilisation et coalescence. Il a ainsi été démontré qu'en plus de l'effet de stabilisation lié à l'augmentation de la concentration en tensioactif, la dynamique d'adsorption du tensioactif à l'interface eau/huile est un élément clef pour la stabilisation des microgouttelettes (*Baret et al. 2009*) (Figure 33). La transition entre la stabilité et l'instabilité des microgouttelettes dépend de la quantité de tensioactif dissous dans la phase huile continue et de la durée d'incubation avant qu'elles ne se rencontrent et se touchent. A partir de nombreux résultats expérimentaux, *Baret et al.* ont pu décrire la stabilité des microgouttelettes par l'approximation suivante : $LC^2 \sim k$, où L est la longueur du canal d'incubation et C la concentration de tensioactif. Le facteur k définit le régime

pour lequel les microgouttelettes sont stables ou instables. Ces résultats ont mis en évidence que l'incubation des microgouttelettes le long d'un canal permet au tensioactif d'avoir suffisamment de temps pour organiser l'interface et stabiliser les microgouttelettes (Baret *et al.* 2009).

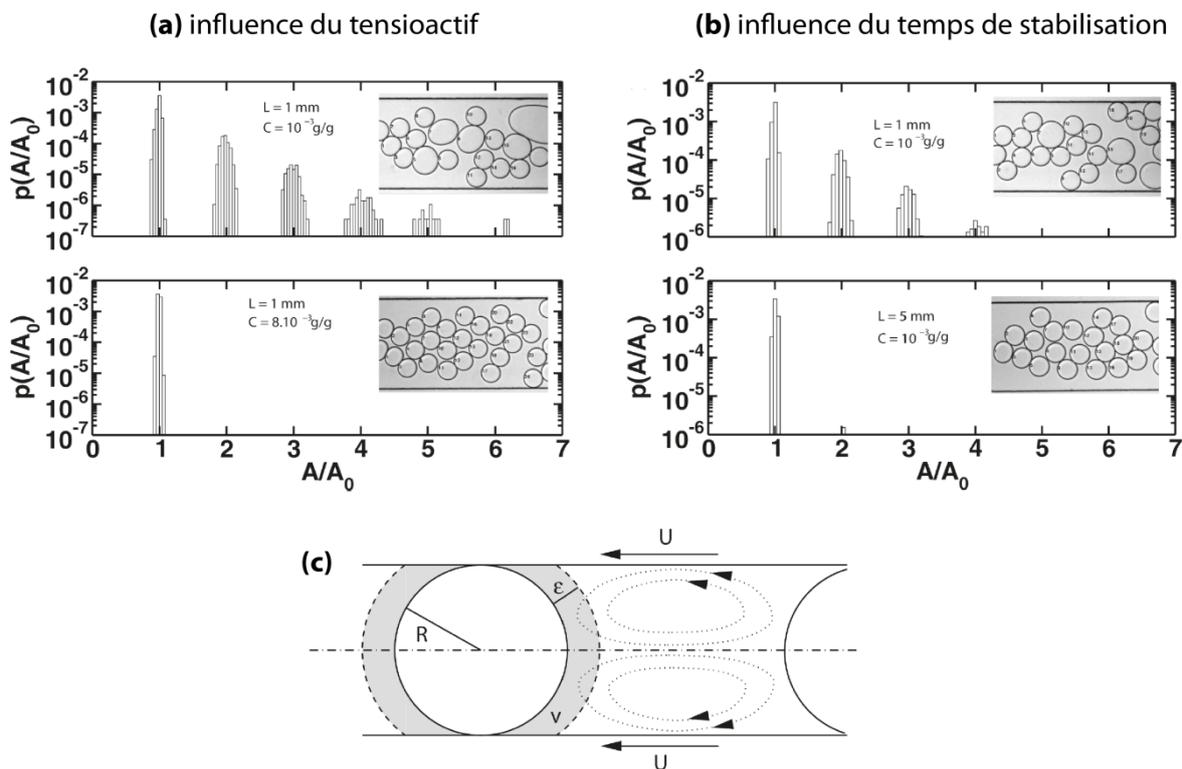


Figure 33 Stabilisation des microgouttelettes: les microgouttelettes sont formées puis incubées le long d'un canal de longueur L pendant un temps τ avant d'entrer en contact dans une chambre de coalescence **(a)** Influence du tensioactif: distribution de taille des microgouttelettes dans la chambre de coalescence pour une même longueur L (1 mm ; $\tau = 7.2$ ms) mais deux concentrations en tensioactif différentes. 10^{-3} g/g : bien que supérieure à la CMC, la concentration en tensioactif ne suffit pas à stabiliser les microgouttelettes. L'émulsion est instable et plusieurs populations apparaissent avec des volumes équivalents à des multiples entiers (2, 3, 4...) du volume des microgouttelettes intactes (correspondant à des événements multiples de coalescence). $8 \cdot 10^{-3}$ g/g : l'émulsion est stable (une seule population). Augmenter la concentration en tensioactif permet de stabiliser l'émulsion. **(b)** Influence du temps de stabilisation: distribution de taille des microgouttelettes dans la chambre de coalescence pour une même concentration en tensioactif (10^{-3} g/g) mais deux longueurs de canal différentes. $L = 1$ mm ($\tau = 7.2$ ms) : l'émulsion est instable. $L = 5$ mm ($\tau = 36$ ms) : l'émulsion est stable. Augmenter le temps d'incubation aide à stabiliser l'émulsion. **(c)** Schématisation d'une microgouttelette dans un canal microfluidique: le mouvement circulaire de l'huile dans le canal se traduit par un flux presque nul de tensioactif vers l'interface de la microgouttelette. La stabilisation de l'interface a lieu grâce à des phénomènes de diffusion : le nombre de molécules de tensioactif dans le volume v entourant la microgouttelette est suffisant pour stabiliser l'interface par simple diffusion des micelles sur la distance ε

Ces études ont été appuyées par d'autres travaux exploitant cette stabilisation dynamique par les tensioactifs pour développer une méthode passive de fusion par paires des microgouttelettes en synchronisant une microgouttelette stabilisée par un tensioactif avec une microgouttelette partiellement stabilisée et induisant un réarrangement de l'interface après fusion (Mazutis *et al.* 2009a).

Dans le cas d'applications biologiques, les tensioactifs utilisés doivent également, en plus de leur effet stabilisateur, ne pas dénaturer le contenu des microgouttelettes ou inhiber les réactions y

tenant place. A proprement parlé, le tensioactif doit se montrer compatible avec les systèmes biologiques utilisés.

3.1.5 La "biocompatibilité" des tensioactifs

Au sein des microgouttelettes, les molécules biologiques sont directement exposées à l'interface entre les phases aqueuse et continue. Ces interactions physicochimiques peuvent se traduire par une perte d'activité biologique. De nombreuses études ont démontré que l'interface de la microgouttelette joue un rôle significatif lors des réactions biologiques et qu'un *ratio* élevé entre surface et volume disponible entraîne l'adsorption d'enzymes à des interfaces huile perfluorée/eau, ce qui se traduit par une diminution de l'activité catalytique (Roach et al. 2005 ; Holtze et al. 2008). Puisque l'interface des microgouttelettes est stabilisée par les tensioactifs, la nature chimique et la biocompatibilité de ces molécules et de leur tête hydrophile sont à prendre en considération.

Il existe un grand nombre de traitement de surface permettant de limiter l'interaction de la surface avec une protéine (Chapman et al. 2000 ; Huber et al. 2003 ; Lahann et al. 2003). Cependant, l'un des groupements fonctionnels les plus communément utilisés pour empêcher l'adsorption non spécifique de protéines sur une surface solide (Prime et al. 1991 ; Harder et al. 1998 ; Popat et al. 2004) ou à une interface liquide-liquide (Roach et al. 2005 ; Holtze et al. 2008) demeure le poly(éthylène)glycol (PEG). De manière empirique, les groupements $\text{HO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n$ avec $n > 6$ empêchent l'adsorption des protéines par répulsion stérique. Les tensioactifs perfluorés contenant une tête hydrophile composée d'un PEG ont ainsi montré une très forte biocompatibilité avec des tests enzymatiques ou cellulaires (Roach et al. 2005 ; Holtze et al. 2008). Holtze et al. ont cependant mis en évidence la difficulté de trouver le bon équilibre entre la longueur de la chaîne fluorée et la taille du groupement PEG. Le ratio de poids moléculaire entre queue hydrophobe et tête hydrophile doit être ajusté de manière à ce que le tensioactif s'adsorbe suffisamment rapidement à l'interface (\sim ms) et assure la stabilité de l'émulsion lors de sa manipulation. Les auteurs rapportent le développement d'un tensioactif fluoré non ionique qui stabilise les microgouttelettes dans une phase d'huile fluorée et qui est compatible avec des systèmes biologiques en utilisant un ratio molaire 10:1 entre queue poly(perfluoropropylène)glycol et tête PEG (Holtze et al. 2008). D'autres têtes polaires ont également été utilisées pour créer des tensioactifs perfluorés biocompatibles, comme un dimorpholinophosphate (Courrier et al. 2003 ; Clausell-Tormos et al. 2008), un bromure de pyridinium (Vyas et al. 2006) ou des sucres (Riess et al. 2000 ; Li et al. 2008).

Pour les travaux réalisés lors de ce doctorat, deux tensioactifs perfluorés ont été utilisés pour la stabilisation des émulsions : il s'agit du tensioactif EA (RainDance Technologies) et du tensioactif Kry-Jeff₉₀₀ synthétisé au laboratoire par Jean-François Bartolo et Dr. Estelle Mayot (Figure 32a). Ces deux tensioactifs, ayant un motif de type PEG en guise de tête hydrophile, sont compatibles avec la plupart

des réactions biologiques et permettent notamment la survie et la croissance cellulaire au sein des microgouttelettes.

3.2 La manipulation des microgouttelettes

Comme nous l'avons mentionné auparavant, l'un des grands avantages de la microfluidique digitale par rapport à l'utilisation de processus d'émulsification mécaniques est la possibilité de manipuler individuellement au sein des canaux microfluidiques les microgouttelettes après leur formation. Bien qu'il existe aussi des moyens de manipuler de petites gouttelettes sur des surfaces planes par électro-mouillage, diélectrophorèse ou à l'aide de forces magnétiques (*Abdelgawad et al. 2009*), ces systèmes demeurent peu sélectifs et sensiblement limités en débit (*Faire 2007*).

La capacité de contrôler précisément les microgouttelettes combinée au fait de pouvoir réaliser des réactions chimiques ou biologiques au sein de ces micro-compartiments offre la possibilité de développer des plateformes de criblage à haut débits très performantes. Nous abordons plus en détails dans cette partie les différents modules microfluidiques permettant la manipulation des microgouttelettes en nous limitant à ceux qui sont importants pour l'application à l'évolution dirigée et qui ont été utilisées dans ce doctorat.

3.2.1 Pourquoi des puces en PDMS ?

L'utilisation de la microfluidique digitale pour des applications biologiques nécessite des méthodes de conception des puces microfluidiques simples, rapides et bon marché (notamment pour les phases de développement). Une technique de moulage utilisant un élastomère pour reproduire un circuit en relief a été décrite pour la première fois en 1974 (*Aumiller et al. 1974*) et utilisée pour des applications biologiques à la fin des années 1980 (*Masuda et al. 1989*). Le système a été complètement intégré à la biologie à la fin des années 1990 (*Xia et al 1998 a et b ; Quake et al. 2000 ; Whitesides et al. 2001*). Depuis, plusieurs matériaux ont été utilisés pour différentes applications. Toutefois, les propriétés du PDMS en font l'élastomère le plus utilisé pour la fabrication des systèmes microfluidiques.

Tout d'abord, les puces microfluidiques en PDMS sont beaucoup moins chères et plus simples à concevoir comparé aux autres matériaux comme le verre, le silicone ou les polymères plastiques. Même les circuits les plus sophistiqués peuvent être répliqués avec précision sur une pièce de PDMS à partir d'un moule réutilisable de nombreuses fois. Des microstructures très complexes peuvent ainsi être réalisées (*Anderson et al. 2000 ; Yun et al. 2008*). De plus, le PDMS est optiquement transparent et permet la détection optique des microgouttelettes au sein des canaux. Le PDMS est inerte chimiquement mais ses propriétés de surface peuvent être facilement modifiées via un traitement au plasma à oxygène suivie de la formation d'une SAM. Le PDMS est perméable aux gaz

non polaires, comme O_2 , N_2 ou CO_2 , ce qui permet de travailler avec des cellules vivantes. Enfin, les puces microfluidiques en PDMS peuvent être facilement combinées avec des valves pneumatiques (Unger et al. 2000), des électrodes (Klemic et al ; 2002 ; Priest et al. 2006), des lasers (Yang et al. 2000), des aimants (Siegel et al. 2006), des fibres optiques (Chabinyk et al. 2001), de la spectrométrie de masse (Chen et al. 2008) et de nombreuses autres outils permettant la manipulation et l'analyse précise des microgouttelettes (Ng et al. 2002 ; Psaltis et al. 2006 ; Fan et al. 2008 ; Teh et al. 2008). Tous ces avantages font du PDMS le matériau de choix pour les phases de développement de systèmes microfluidiques.

Le PDMS possède néanmoins quelques inconvénients, dont le principal est le gonflement de l'élastomère sous l'effet de nombreux solvants organiques (Lee et al. 2003). Le gonflement peut déformer les microstructures et dégrader la puce microfluidique. D'autres matériaux sont ainsi utilisés si des conditions drastiques sont nécessaires : le verre (Abate et al. 2008), le silicone (Yobas et al. 2006), PMMA et autres (voir les revues Xia et al. 1998 a et b).

Les puces microfluidiques en PDMS sont particulièrement bien adaptées à la production d'émulsions d'eau-dans-huile (Thorsen et al. 2001) tandis que les émulsions d'huile-dans-eau sont plus difficiles à produire et sont généralement produites en utilisant des puces en silicone (Xu et al. 2004 ; Yobas et al. 2006). Les propriétés de mouillage des canaux en PDMS peuvent être modifiées par traitement de surface ou bien en utilisant de très fortes concentrations en tensioactif, rendant ainsi la production de microgouttelettes aqueuses possible (Xia et al. 1998 a ; Lee et al. 2003 ; Xu et al. 2006).

3.2.2 Le mélange au sein des microgouttelettes

Le mélange des liquides au sein des microgouttelettes est un point important pour le suivi cinétique de réactions biologiques. Comme nous l'avons abordé auparavant, deux liquides circulant côte à côte dans un écoulement en régime laminaire ne se mélangent que par diffusion. Bien que les distances de diffusion soient relativement faibles, le processus demeure tout de même lent. Lorsqu'une microgouttelette circule dans une phase continue le long d'un canal microfluidique rectiligne, deux recirculations équivalentes sont induites au sein de la microgouttelette. Dans un modèle où les deux liquides sont dans des moitiés perpendiculaires au flux principal (Figure 34a), les deux recirculations permettent efficacement le mélange global du contenu de la microgouttelette sur de courtes distances : 85 % du contenu est mélangé sur une distance de trois fois le diamètre de la microgouttelette (Handique et al. 2001).

Dans la réalité cependant, les liquides sont répartis dans le sens du courant (Figure 34b). Dans ce cas, les recirculations permettent le mélange dans chaque moitié de la microgouttelette, mais les deux moitiés restent distinctes, les deux liquides ne se mélangeant que lentement par diffusion : le mélange est inefficace (Tice et al. 2003 ; Teh et al. 2008). Un mélange rapide du contenu de la

microgouttelette peut être induit lorsqu'un courant de liquide est introduit au milieu du courant contenant l'autre liquide (Figure 34c) ou, surtout, lorsqu'une advection chaotique est générée par la géométrie du canal (Figure 34d) (Song *et al.* 2003 *a et b*). Lors du passage de la microgouttelette dans un serpentin ou un zigzag, celle-ci est soumise à différentes vitesses en fonction des parois : les deux moitiés de la microgouttelette subissent des recirculations asymétriques qui mélangent le contenu de la microgouttelette en quelques millisecondes (Song *et al.* 2003c). Liau *et al.* ont également mis au point un système microfluidique composé d'un serpentin comprenant de nombreuses aspérités permettant le mélange de solutions biologiques concentrées ($> 200 \text{ mg/mL}^{-1}$ de BSA (Bovin Serum Albumin) (Liau *et al.* 2005).

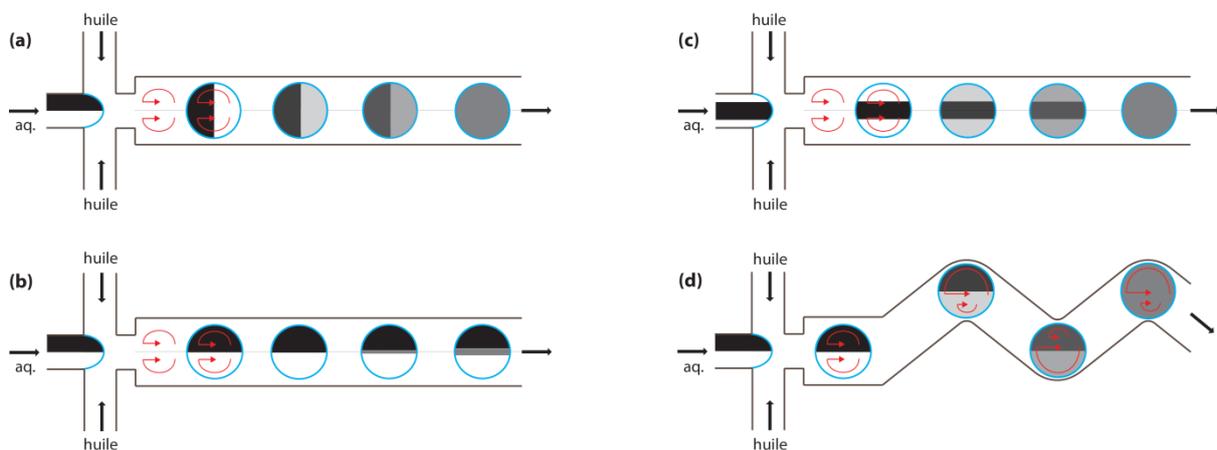


Figure 34 Mélange au sein des microgouttelettes : Deux phases aqueuses (noire et blanche) sont encapsulées en utilisant un co-courant et la focalisation hydrodynamique. **(a)** Modèle théorique : les deux liquides sont localisés dans les moitiés perpendiculaires au flux de phase continue : le mélange est rapide. **(b)** Les deux liquides sont répartis dans la microgouttelette dans le sens du courant : le mélange est inefficace. **(c)** La solution noire est au milieu de la microgouttelette tandis que la solution blanche est de part et d'autre : le mélange est rapide. **(d)** Passage dans un serpentin et advection chaotique : le mélange est rapide

Nous noterons également que d'autres techniques de mélange actif du contenu des microgouttelettes ont aussi été développées en utilisant un champ électrique (Paik *et al.* 2003).

3.2.3 L'incubation de microgouttelettes

Les réactions biologiques peuvent nécessiter des temps d'incubation allant de quelques minutes à plusieurs heures, pour permettre par exemple l'amplification de l'ADN, l'expression d'une protéine ou encore la reconnaissance d'une molécule. Afin de réaliser de telles réactions à l'aide de la microfluidique digitale, il est donc nécessaire de pouvoir incubier les microgouttelettes avant de les manipuler ou de les analyser. Un grand nombre de techniques ont été développées à cet effet durant les dix dernières années. On distingue deux catégories : les techniques d'incubation sur puce et les techniques d'incubation en dehors de la puce microfluidique.

Pour des temps de réaction très courts (ms à s), les microgouttelettes peuvent être incubées après leur formation dans d'étroits canaux microfluidiques (ligne de délai) dans lesquels elles circulent

l'une derrière l'autre (Song *et al.* 2003a) (Figure 35a). Ces systèmes ne sont cependant pas pratiques pour des réactions plus longues. En effet, le temps de résidence des microgouttelettes est régi par l'équation suivante :

$$t = \frac{lwh}{Q}$$

où t est le temps de résidence (s), w largeur du canal (m), l la longueur du canal (m), h la hauteur du canal (m) et Q le débit global ($L \cdot h^{-1}$).

On constate par exemple que pour un canal de $50 \mu\text{m}$ de large et de $20 \mu\text{m}$ de hauteur et un flux de $200 \mu\text{L} \cdot h^{-1}$, il faudrait un canal d'environ 3,4 m pour un temps d'incubation de seulement 60 s. De telles dimensions sont inenvisageables dans des systèmes microfluidiques. De plus, la pression à l'intérieur d'une telle ligne de délai serait beaucoup trop élevée. La pression au sein du système est décrite par l'équation :

$$P = c\eta \frac{l}{wh^3} Q$$

où P est la pression dans le système (Pa), c une constante dépendant du ratio (w/l), w largeur du canal (m), l la longueur du canal (m), h la hauteur du canal (m) et Q le débit global ($L \cdot h^{-1}$).

Elle est ainsi inversement proportionnelle au cube de la hauteur du canal : de long et peu profonds canaux peuvent facilement dépasser les conditions limites de travail des puces microfluidiques (à titre indicatif, la liaison PDMS-verre est rompue à 450 kPa (Bhattacharya *et al.* 2005)). La pression peut par contre être réduite en utilisant de larges et profonds canaux, mais le temps de résidence des microgouttelettes ne serait pas uniforme en raison de la dispersion de Taylor-Aris (voir 3.1.1 : les microgouttelettes proches des parois avancent en effet moins rapidement que celles au milieu du canal) (Frenz *et al.* 2009).

Pour réduire la dispersion dans les temps de résidence des microgouttelettes, celles-ci peuvent être mélangées aléatoirement en traversant des constriction tout le long de la ligne de délai (Frenz *et al.* 2009) (Figure 35b). Ces constriction réduisent la largeur de la ligne de délai à la dimension d'une ou deux microgouttelettes et induit une redistribution aléatoire des microgouttelettes sur la largeur du canal. De tels systèmes permettent d'atteindre des temps d'incubation sur puce compris entre 1 et 60 minutes.

Pour des temps d'incubation supérieurs (> 1 h), les microgouttelettes peuvent être incubés sur puce dans un réservoir (Köster *et al.* 2008 ; Courtois *et al.* 2009) ou dans des pièges immobilisant les microgouttelettes (Tan *et al.* 2007a ; Shi *et al.* 2008 ; Huebner *et al.* 2009 ; Schmitz *et al.* 2009). Le piégeage des microgouttelettes est particulièrement intéressant pour obtenir des mesures cinétiques de microgouttelettes individuelles puisque les microgouttelettes sont immobilisées à des positions

fixes (Figure 35c-e). Toutefois, le nombre de microgouttelettes pouvant être stockées dans de telles chambres est très limité (< 1000). De plus, de longues incubations peuvent entraîner la diffusion d'eau depuis les microgouttelettes vers le PDMS ou la phase continue, ce qui se traduit par une nette diminution du volume des microgouttelettes (Courtois et al. 2009 ; Huebner et al. 2009). L'utilisation d'huiles fluorées comme phase continue (Schmitz et al. 2009) ou l'immersion de la puce microfluidique dans un bain d'eau permet de limiter ce phénomène.

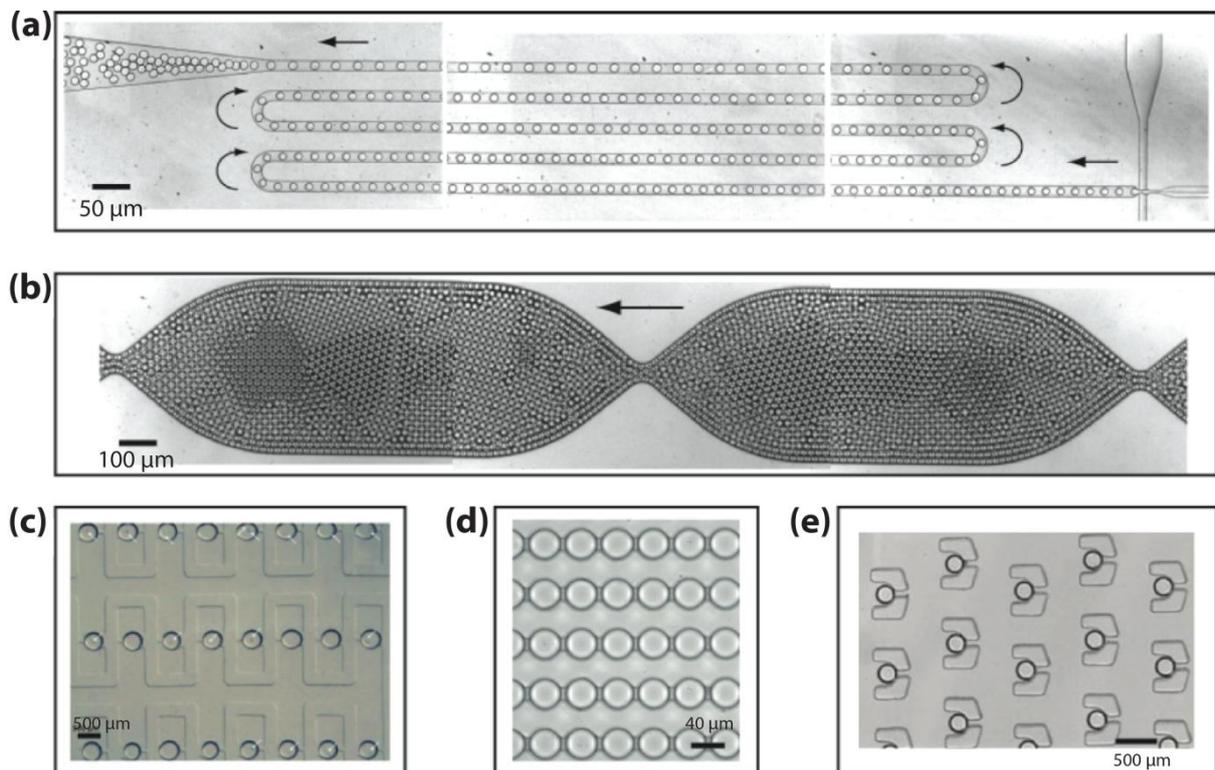


Figure 35 *Différentes techniques d'incubations* : (a) Incubation le long d'une ligne de délai rectiligne (reproduit Mazutis 2009c). (b) Incubation le long d'une large ligne de délai contenant des constrictions mélangeant aléatoirement les microgouttelettes. Seule une petite partie de la ligne d'incubation est visible (reproduit Mazutis 2009c). (c-e) Incubation statique ((c) : Shi et al. 2008 ; (d) : Schmitz et al. 2009 ; (e) : Huener et al. 2009)

La collecte et l'incubation sous forme d'émulsion en dehors de la puce microfluidique permet l'incubation d'un grand nombre de microgouttelettes ($> > 10^6$) pendant une durée indéterminée. Les microgouttelettes sont ensuite réinjectées dans la puce microfluidique pour manipulation ou analyse. La stabilité de l'émulsion doit être garantie pendant toute la durée de manipulation en dehors de la puce microfluidique pour ne pas altérer la monodispersité en taille des microgouttelettes. La stabilisation des microgouttelettes par un tensioactif joue ainsi un rôle crucial (voir C.1.4). Pour certaines applications, l'utilisation d'une incubation en dehors de la puce microfluidique sera préférable par rapport à une longue incubation sur puce qui pourrait réduire les débits et la flexibilité du système microfluidique.

3.2.4 La fusion de microgouttelettes

Les réactions biologiques nécessitent souvent plusieurs étapes pendant lesquelles un réactif est ajouté à un temps précis pour démarrer, modifier ou stopper une réaction. Nous avons vu précédemment (voir 2.2) que l'addition d'un réactif au sein des microgouttelettes est relativement compliquée dans le cas d'émulsions mécaniques, ce qui limite considérablement les techniques d'IVC. La microfluidique digitale peut quant à elle permettre ce type de manipulation, en autorisant notamment la fusion par paire de microgouttelettes. Il existe en effet plusieurs systèmes microfluidiques permettant la fusion deux à deux d'un très grand nombre ($> 10^7$) de microgouttelettes aqueuses circulant dans une phase huile continue à de hautes fréquences (> 1 kHz).

Ces techniques de fusion présentent toutefois deux principales contraintes : la stabilité des microgouttelettes doit être garantie tout au long du processus, mais ces microgouttelettes doivent pouvoir être déstabilisées le temps de la fusion. La coalescence spontanée de microgouttelettes dans des canaux microfluidiques a été démontrée pour des microgouttelettes non stabilisées par un tensioactif (*Song et al. 2003 ; Hung et al. 2006 ; Tan et al. 2007b ; Niu et al. 2008 ; Um et al. 2009*). Des microgouttelettes non stabilisées peuvent également coalescer en modifiant une partie des parois des canaux microfluidiques avec une surface hydrophile (*Fidalgo et al. 2007 ; Liu et al. 2009*). Néanmoins, la fusion spontanée de microgouttelettes non stabilisée requiert une synchronisation rigoureuse des microgouttelettes et génère souvent un taux élevé de fusions secondaires non désirées, ce qui pose problème dans le cas d'applications biologiques comme par exemple le criblage d'une banque de mutants. De plus, la manipulation de microgouttelettes en absence de tensioactif est relativement limitée en raison de l'instabilité des microgouttelettes en cas de contact.

Plusieurs techniques permettant la fusion de microgouttelettes stabilisées par un tensioactif ont été décrites récemment et peuvent se diviser en deux catégories : la fusion passive et la fusion active (Figure 36). La fusion passive des microgouttelettes peut être provoquée par des décompressions induites par des constriction le long du canal microfluidique (Figure 36b) (*Bremond et al. 2008*). Une autre technique développée récemment permet une fusion passive deux à deux à haut débit en synchronisant une microgouttelette stabilisée par un tensioactif avec une microgouttelette partiellement stabilisée et en induisant un réarrangement de l'interface après fusion (Figure 36a) (*Mazutis et al. 2009a*). Les microgouttelettes ainsi formées sont stables et peuvent subir d'autres manipulations. Les techniques de fusion passives souffrent néanmoins souvent d'un manque de flexibilité quant aux conditions permettant la fusion. Ces techniques ne sont en effet pas universelles puisque le contenu des microgouttelettes peut influencer l'efficacité de la fusion.

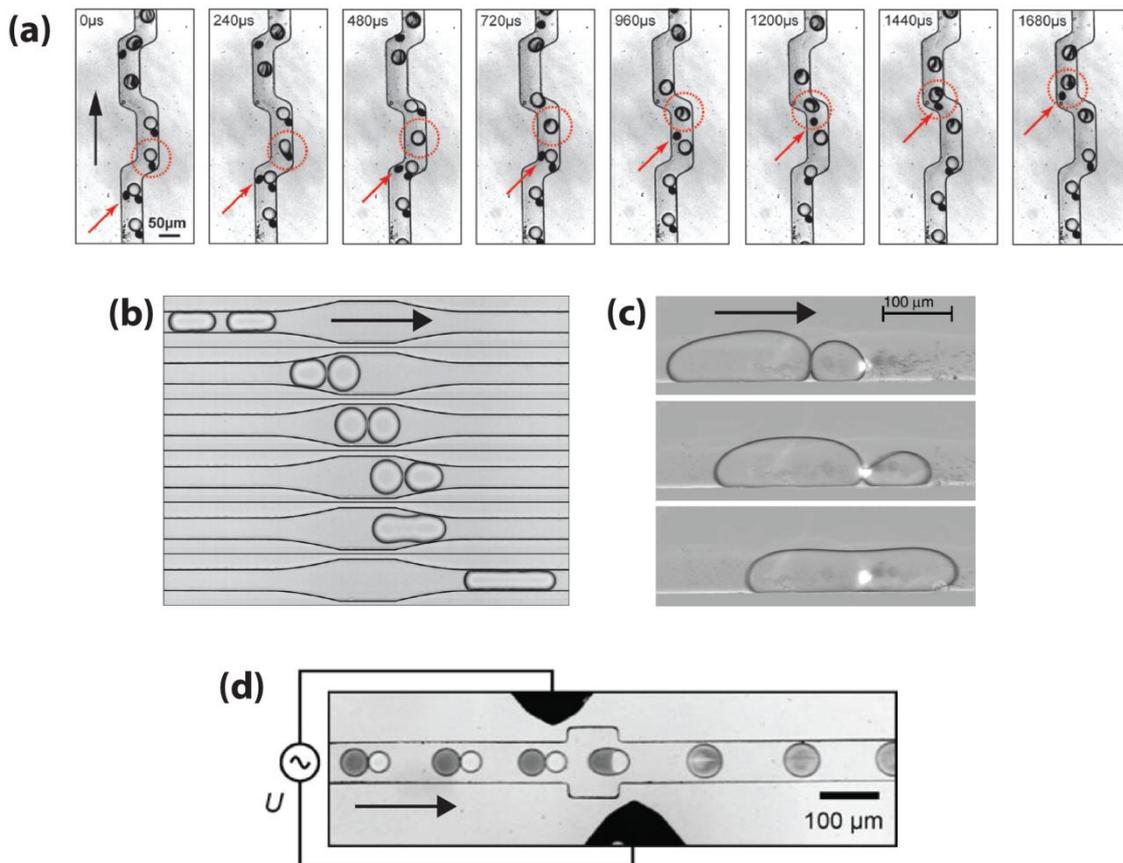


Figure 36 *Différentes techniques de fusion : (a) fusion passive deux à deux entre microgouttelettes stabilisée (noir) et partiellement stabilisée (blanche) (Mazutis et al. 2009a). (b) fusion passive à travers une chambre de coalescence (Bremond et al. 2008). (c) Fusion active induite au laser (Baroud et al. 2007). (d) fusion active induite par un champ électrique : les paires de microgouttelettes fusionnent au passage dans la zone d'électro-coalescence entre les deux électrodes (structures noires) (Frenz et al. 2008)*

Il existe plusieurs techniques de fusion active nécessitant l'apport d'une source externe d'énergie. Tout d'abord, la fusion peut être induite par un laser focalisé : l'échauffement provoqué chasse les molécules de tensioactif et le film d'huile compris entre les deux microgouttelettes en contact (Figure 36c) (Baroud et al. 2007). Cette technique n'est cependant que peu applicable dans le cas de réactions biologiques, le laser et la chaleur dégagée pouvant dégrader l'ADN ou les protéines. De plus, la fréquence de fusion demeure assez faible (10-100 Hz). Une autre possibilité est d'utiliser un champ électrique pour induire la fusion. Tout d'abord, des microgouttelettes de charges opposées peuvent être produites simultanément et fusionnées grâce à leurs charges (Link et al. 2006). La seconde approche vise à synchroniser deux à deux des microgouttelettes non chargées et de les faire coalescer électriquement en appliquant un champ électrique alternatif (Figure 36d) (Ahn et al. 2006a ; Priest et al. 2006 ; Frenz et al. 2008 ; Niu et al. 2009). Dans ce cas, la condition essentielle à la fusion est la présence des deux microgouttelettes entre les électrodes (Chabert et al. 2005). La coalescence a lieu lorsque la conductivité des microgouttelettes est largement supérieure à celle de la phase continue (Niels et al. 2006) et lorsque les microgouttelettes sont à proximité l'une de l'autre (Thiam et al. 2009). Quand deux microgouttelettes sont exposées à un champ électrique, leurs

dipôles induits s'alignent créant ainsi entre elles une force d'attraction proportionnelle au carré du champ électrique appliqué. A partir du moment où les microgouttelettes entrent en contact, la force dipolaire draine le film d'huile entre les deux interfaces ce qui provoque la coalescence. N'étant pas dépendantes du contenu des microgouttelettes, ces techniques d'électro-coalescence sont fiables et robustes.

Toutefois, les techniques de fusion nécessitent une synchronisation précise des microgouttelettes qui n'est pas aisée, sauf lorsque les microgouttelettes sont produites sur la même puce simultanément (*Frenz et al. 2008*) ou lorsqu'elles sont piégées dans une structure en PDMS (*Niu et al. 2009*) ou par des forces électriques (*Wang et al. 2009b ; Zagnoni et al. 2009*). La synchronisation précise et la fusion de microgouttelettes réinjectées dans la puce avec des microgouttelettes produites sur puce est beaucoup plus compliquée à atteindre car la fréquence de réinjection n'est pas constante dans le temps. Par conséquent, la fusion d'émulsions réinjectées résultent en une population hétérogène en taille comprenant des microgouttelettes fusionnées et non fusionnées, rendant toute manipulation postérieure compliquée. Il est toutefois possible de "nettoyer" l'émulsion en plaçant un trieur de taille en aval du module de fusion pour ne garder que les microgouttelettes fusionnées (le système devient cependant plus compliqué à mettre en œuvre).

Une technique récente permet d'injecter une phase aqueuse au sein des microgouttelettes tout en évitant les problèmes liés aux méthodes de fusion. La piconjection permet en effet d'injecter un volume contrôlé au sein de chaque microgouttelette sous l'effet d'un champ électrique à des fréquences bien plus élevées que les techniques de fusion classiques (jusqu'à 10 kHz contre 1-2 kHz) (*Abate et al. 2010*) (Figure 37).

La technique repose une jonction en T, la phase aqueuse injectée circulant dans un très large canal qui se rétrécit brusquement à la jonction avec le canal principal dans lequel circulent les microgouttelettes aqueuses dans la phase huile continue (Figure 37a). Les microgouttelettes sont en contact avec les parois du canal principal et donc, pendant un court instant, avec l'interface de la phase aqueuse au niveau de la jonction. Sans champ électrique, les interfaces ne sont pas déstabilisées et la phase aqueuse n'est pas injectée. Sous l'effet d'un champ électrique, les deux interfaces coalescent et un certain volume de phase aqueuse est ainsi injecté au passage des microgouttelettes. Ce volume injecté peut être précisément contrôlé en jouant sur la pression exercée sur la phase aqueuse ou encore la fréquence et la vitesse de passage des microgouttelettes. Il faut également noter que l'application du champ électrique peut se faire sous la forme de pulse dont l'application dépend d'une mesure de fluorescence à l'aide d'un laser en amont dans le canal : l'injection peut ainsi être sélective (Figure 37b). Ces piconjecteurs peuvent aussi être placés en séries le long du canal microfluidique et activés indépendamment pour injecter différentes phases aqueuses (*Abate et al. 2010*).

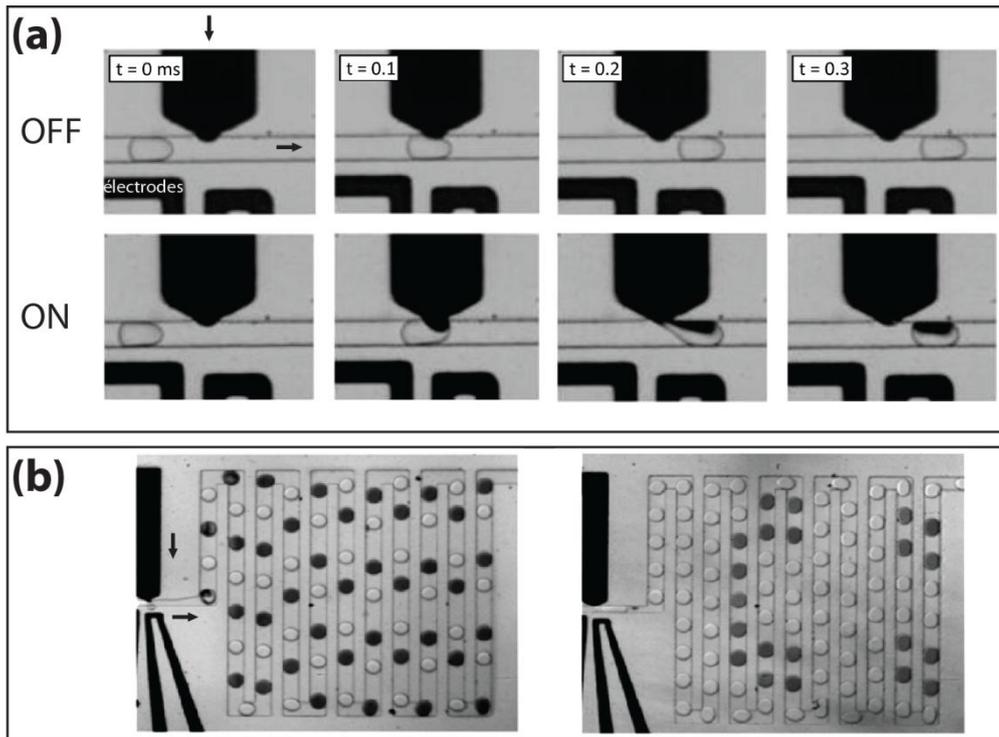


Figure 37 *Pico-injection*: **(a)** Images du système microfluidique en fonctionnement. Lorsque le champ électrique n'est pas appliqué (OFF), la stabilisation des interfaces par le tensioactif empêche la fusion au niveau du picoinjecteur. Lorsque le champ est appliqué (ON), un certain volume de phase aqueuse (noire) est injecté. **(b)** Images du système microfluidique fonctionnant de manière sélective : le champ électrique est déclenché sous la forme d'un pulse après détection de la microgouttelette visée. Pico-injection d'une microgouttelette sur deux (à gauche) ou suivant un schéma plus complexe (à droite). (Abate et al. 2010)

3.2.5 La détection de la fluorescence au sein des microgouttelettes

Les systèmes de détection utilisés en microfluidique digitale comprennent les mêmes composants que de nombreuses autres méthodes spectroscopiques, à savoir un microscope, une source d'excitation, un détecteur optique et bien sûr l'échantillon au sein de la puce microfluidique. La surface plane et transparente de l'ensemble verre/PDMS de la puce microfluidique est compatible avec différentes sources de lumière d'excitation et des systèmes sophistiqués de détection (Psaltis et al. 2006). En raison des très hautes fréquences de production des microgouttelettes, la détection des microgouttelettes en temps réel est un véritable challenge.

Presque tous les travaux décrits à notre connaissance reportent l'utilisation d'un microscope équipé de caméras rapides capables d'enregistrer plus de 10^6 images par seconde. Ces caméras rapides sont extrêmement utiles pour visualiser les microgouttelettes au sein des canaux microfluidiques. En ce qui concerne la détection de la fluorescence des microgouttelettes, une caméra à transfert de charge (CCD pour "charged-couple device") pourrait également faire office de détecteur. Toutefois, l'analyse quantitative de la fluorescence repose la plupart du temps sur des systèmes combinant un laser avec un détecteur optique très sensible (Lichtman et al. 2005). Les lasers sont utilisés comme sources

d'excitation en raison de leur lumière intense et cohérente spatialement et temporellement à une longueur d'onde bien définie. De plus, la taille réduite du spot d'excitation permet de détecter avec précision une seule microgouttelette au sein du canal microfluidique. Les détecteurs optiques les plus communément utilisés en microscopie de fluorescence sont les tubes photomultiplicateurs (PMT) et les détecteurs photodiodes à avalanche (APD). Les deux photodétecteurs présentent une forte sensibilité en étant capables de détecter un photon individuel et sont particulièrement bien adaptés pour des applications nécessitant une très forte sensibilité de détection couplé à un faible bruit de fond. Le signal en sortie du détecteur est généralement analysé avec une carte d'acquisition de données (DAQ) pilotée par un logiciel (LabView par exemple). Le programme permet l'identification des microgouttelettes en fonction de leur fluorescence et de leur largeur. Le dispositif optique de la station microfluidique utilisée lors de ces travaux est présenté dans la partie 7.1.4.

L'une des premières études d'un système biologique en microfluidique digitale s'est fait à l'aide d'une caméra CCD pour prendre des images de fluorescence à différents temps. Les données cinétiques ont ensuite été extraites de l'analyse des images et du profil de fluorescence ainsi créé (*Song et al. 2003*). Ces procédures sont en général laborieuses et limitées par une excitation non uniforme par la source lumineuse. Par conséquent, les postes microfluidiques se sont rapidement équipés de dispositifs optiques et d'outils informatiques assurant une analyse rapide et précise du signal. Un exemple notable est un poste microfluidique équipée d'un microscope confocal qui permet de réaliser de la spectroscopie de transfert d'énergie par résonance entre molécules fluorescentes (FRET) (*Srisa-Art et al. 2007 et 2008*). De tels systèmes de détection sont extrêmement sensibles et ont des temps de réponses très rapides permettant l'étude de réactions cinétiques à l'échelle de la milliseconde.

Les sondes fluorescentes pouvant être détectées dans un système microfluidique sont nombreuses : des molécules organiques fluorescentes (*Song et al. 2003*), des protéines fluorescentes (*Dittrich et al. 2005*) ou encore des microbilles fluorescentes (*Kumaresan et al. 2008*). La sonde fluorescente idéale doit être petite, biologiquement compatible et doit présenter un signal stable, fort et spectralement limité (*Lichtman et al. 2005 ; Walter et al. 2008*).

3.2.6 Le tri de microgouttelettes

Toutes les expériences d'évolution dirigées des protéines doivent comprendre une technique de sélection ou de criblage efficace afin de pouvoir, à chaque cycle d'évolution, isoler les mutants présentant l'amélioration recherchée. Pour être efficaces, ces étapes nécessitent des techniques permettant l'analyse d'un grand nombre de variant ($> 10^6$). Bien que beaucoup de progrès d'automatisation aient été effectués, les techniques de sélection pour une activité enzymatique reposent principalement sur le test de colonies bactériennes isolées sur des boîtes d'Agar ou dans

des microplaques (*Boersma et al. 2007*). Ces criblages sont souvent limités en sensibilité (boîte d'Agar) ou en débit (microplaques).

Comme nous l'avons mentionné dans la partie 2.2, une technique bien maîtrisée pour la sélection à haut débit est la cytométrie en flux, qui permet de compter et examiner une suspension de cellules ou de particules dans un flux de liquide. Le FACS permet ainsi de trier à très haut débit une cellule unique parmi une population hétérogène de cellules (*Yang et al. 2009*). Les performances d'un FACS sont typiquement caractérisées par trois facteurs : i) le débit (soit le nombre de cellules pouvant être détectées et triées par unité de temps), ii) l'enrichissement (qui quantifie l'augmentation du *ratio* cellules positives sur cellules négatives après sélection) et iii) la récupération (qui quantifie le taux de récupération des cellules après sélection). Les appareils de FACS modernes sont fiables et robustes et fonctionnent avec de très hauts débits (> 10000 tris par seconde). Le FACS a déjà été utilisé pour la sélection de protéines, le plus souvent des anticorps, avec de fortes propriétés de reconnaissance (*Chen et al. 2001 ; Feldhaus et al. 2003 ; Garcia-Rodriguez et al. 2007*) ou catalytiques (*Olsen et al. 2000*). Le FACS a également été utilisé en combinaison avec l'IVC pour l'amélioration de propriétés enzymatiques (*Griffiths et al. 2003 ; Aharoni et al. 2005 ; Mastrobattista et al. 2005*). Nous avons cependant vu dans la partie 2.2 que le nombre de tests enzymatiques pouvant être utilisés en FACS était limité principalement par la faible perméabilité de la membrane cellulaire aux composés fluorogéniques et la difficulté d'associer activité enzymatique et produits de réaction.

Le principe du FACS a souvent été adapté à des systèmes microfluidiques en flux continu laminaire ces dernières années (μ FACS). Plusieurs approches ont été démontrées, dont des systèmes permettant de trier des cellules par actuation électrocinétique (*Dittrich et al. 2003*) ou électroosmotique (*Fu et al. 1999*), par des forces optiques ou encore simplement des forces hydrodynamiques à l'aide de valves (*Fu et al. 2002 ; Wolff et al. 2003*). Bien que potentiellement applicables au criblage d'émulsion, ces techniques n'ont jamais été utilisées pour trier des microgouttelettes.

Une technique permettant le tri de microgouttelettes repose sur la diélectrophorèse (DEP) qui consiste à créer un mouvement sur une particule polarisable à l'aide d'un champ électrique non uniforme. Les microgouttelettes sont déviées au passage dans le champ électrique par la force résultant de l'interaction entre le dipôle induit et le champ électrique. La force électrique attire les microgouttelettes vers les régions de fort champ électrique (DEP positive) ou les rejette de ces régions (DEP négative) en fonction de la fréquence du champ électrique et de la polarisation des microgouttelettes. Puisque les microgouttelettes aqueuses ont une permittivité diélectrique bien plus importante ($\epsilon_{\text{eau}} \sim 80$) que la phase huile continue ($\epsilon \sim 2$ pour les huiles fluorées), une force diélectrophorique positive attire les microgouttelettes dans les régions de fort champ électrique.

Cette approche a tout d'abord été appliquée à la sélection de cellules marquées (Hu et al. 2005) ou pour enrichir ces cellules en fonction de leur taille (Kim et al. 2007b).

L'utilisation de cette technique pour le tri de microgouttelettes en système microfluidique à été démontrée pour la première fois en 2006 par le groupe du Prof. David Weitz (Harvard University ; USA) (Ahn et al. 2006b) (Figure 38). En absence de champ électrique, toutes les microgouttelettes se dirigent dans le canal de gauche qui possède une résistance hydrodynamique plus faible que le canal de collecte de droite. L'application d'un champ électrique (700 V, 10 kHz) dévie les microgouttelettes dans le canal de collecte en raison de la force diélectrophorique. En appliquant le champ électrique sous la forme de pulses, une seule microgouttelette peut être triée à une fréquence d'environ 1.6 kHz.

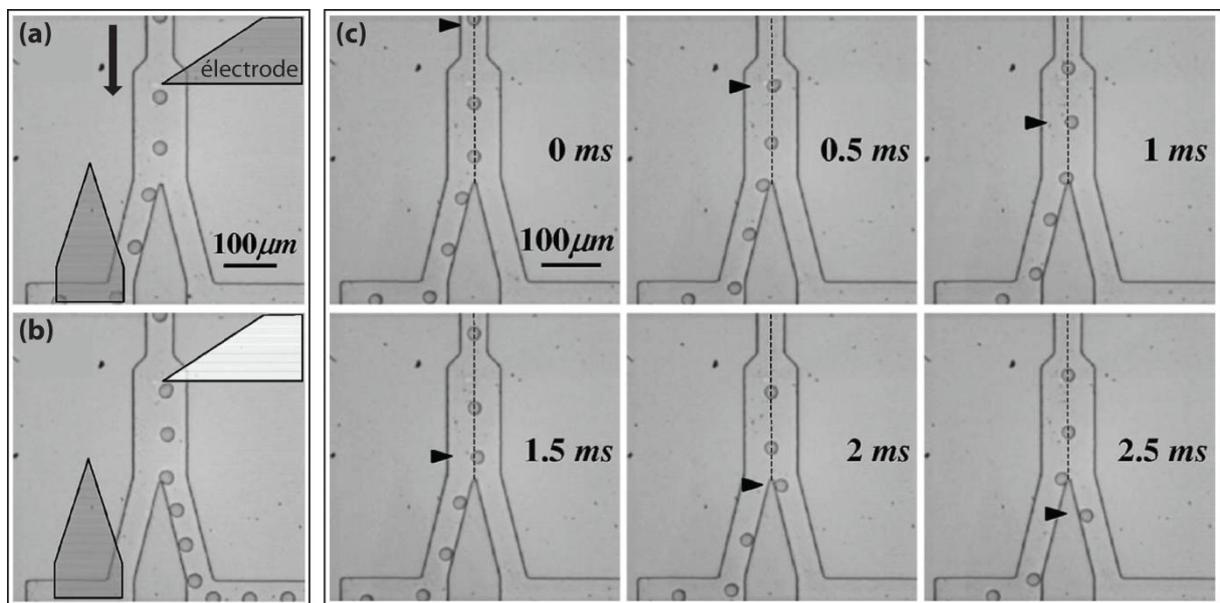


Figure 38 *Tri de microgouttelettes par diélectrophorèse* : (a) En l'absence de champ électrique, les microgouttelettes se dirigent systématiquement dans le canal de gauche possédant une résistance hydrodynamique plus faible que celui de droite. (b) En présence d'un champ électrique continu, les microgouttelettes sont déplacées vers l'électrode chargée (blanche, électrodes en ITO) et sont dirigées vers le canal de collecte à droite. (c) Tri d'une seule et unique microgouttelette parmi le flux de microgouttelettes par application d'un pulse électrique de 0,5 ms. L'emplacement des électrodes est similaire au panel (b). (Ahn et al. 2006)

Le tri d'une seule microgouttelette "positive" parmi un flux de microgouttelettes "négatives" est un point crucial pour développer des plateformes d'évolution dirigée. Ce type de méthode de tri peut potentiellement faire partie des outils nécessaires à la détection d'activité enzymatique en système microfluidique. La méthode a ainsi été récemment utilisée avec succès pour développer un système de sélection de microgouttelettes basée sur la détection d'activité enzymatique (FADS pour "Fluorescence Activated Droplet Sorting") (Baret et al. 2009). Le système, capable de trier les microgouttelettes jusqu'à des fréquences de 2000 Hz, a été validé en l'appliquant à la sélection de microgouttelettes exhibant l'activité β -galactosidase parmi des microgouttelettes "inactives" à une fréquence de 300 Hz et ce avec moins d'une erreur pour 10^4 microgouttelettes. Ce système sera

détaillé par la suite (voir 3.3.3), étant donné qu'il s'agit de la technique de tri que nous avons choisi d'utiliser dans ces travaux.

Il convient également de mentionner une autre technique de tri de microgouttelettes en système microfluidique en utilisant des ondes acoustiques de surface (SAW) (*Franke et al. 2009*). Cependant, les facteurs influençant l'efficacité du tri n'ont pas encore été caractérisés et la méthode ne permet pas encore de sélectionner une seule microgouttelette.

3.3 La microfluidique digitale : applications en biologie

Comme nous l'avons mentionné dans la partie 2.2, la technique d'IVC est une méthode puissante pour l'évolution dirigée. Néanmoins, la polydispersité en taille des émulsions standards et les difficultés pour manipuler individuellement les microgouttelettes limitent grandement ses applications. La compartimentation de réactions biologiques dans des microgouttelettes de l'ordre du picolitre via des systèmes microfluidiques offrent de nouvelles perspectives pour l'analyse et le criblage à très haut débit, le contenu et la taille des microgouttelettes étant précisément contrôlés (*Baret et al. 2009c*). Après production, les microgouttelettes, hautement monodisperses en taille, peuvent être incubées, fusionnées, divisées, triées et manipulées de différentes façons comme nous l'avons présenté dans la partie 3.2 précédente. La plupart des travaux de microfluidique digitale publiés ces quinze dernières années se sont focalisés sur des preuves de principe et des considérations purement physiques, sans exploiter concrètement le potentiel de cette technologie pour des applications en évolution dirigée ou, plus généralement, en biologie. Le développement d'opérations individuelles comme des incubations, fusions ou tris de microgouttelettes est particulièrement important. Toutefois, dans l'optique de la sélection d'une banque de variants par exemple, des systèmes intégrés combinant ces opérations seraient nécessaires pour permettre l'analyse et le criblage d'un très grand nombre de microgouttelettes en routine et à très haut débit.

Les premières applications biologiques de la microfluidique digitale ont été développées par le groupe du Prof. Rustem Ismagilov (University of Chicago ; USA) dans les années 2003 en utilisant des systèmes générant de larges gouttelettes pour la cristallisation de protéines (*Zheng et al. 2003 ; Li et al. 2006b*) ou la mesure de réactions cinétiques rapides (*Song et al. 2003*). Ces systèmes microfluidiques restent cependant peu exploitables pour des expériences d'évolution dirigée en raison de leur faible débit ($< 100\text{Hz}$), de l'instabilité des gouttelettes en cas de contact (aucun tensioactif n'est utilisé) et de la taille importante des gouttelettes ($> 1\text{ nL}$). Le tri de gouttelettes d'un volume de l'ordre de 100 pL basé sur la détection de fluorescence n'a pas encore été réalisé, les grosses gouttelettes ayant plus facilement tendance à se diviser sous l'effet d'un champ électrique ou à une jonction de canaux microfluidiques que les microgouttelettes de faible volume. Dans la littérature, un grand nombre d'exemples semblent indiquer que la taille optimale pour réaliser des opérations à très haut débit est de l'ordre de la dizaine de microns ($10 - 50\text{ }\mu\text{m}$), soit environ $0,5 - 70$

pL (*Chabert et al. 2008 ; Kiss et al. 2008 ; Srisa-Art et al. 2008*). Le débit pourrait encore être augmenté en utilisant des microgouttelettes de l'ordre du femtolitre mais la conception de systèmes microfluidiques à de telles résolutions ainsi que la production constante et la manipulation précise de microgouttelettes de cette taille demeurent ardues (*Chiu et al. 2009*). De plus, la plupart des systèmes microfluidiques développés et maîtrisés à ce jour utilisent des microgouttelettes d'un volume de l'ordre de 10 – 100 pL.

De nombreux exemples de réactions biologiques en microfluidique digitale sont régulièrement décrits dans la littérature ces dernières années et sont résumés dans les revues suivantes : *Huebner et al. 2008a ; Teh et al. 2008 ; Schaerli et al. 2009b ; Theberge et al. 2010*. Nous aborderons brièvement dans cette partie plusieurs exemples en mettant l'accent sur les applications en rapport direct avec l'évolution dirigée et les travaux de ce doctorat.

3.3.1 L'amplification de l'ADN

L'amplification de l'information génétique a été une véritable révolution et l'utilisation de la réaction en chaîne par polymérase (PCR) constitue aujourd'hui l'un des piliers des sciences liées à la biologie. Depuis la fin des années 1980, la PCR a transformé les techniques de séquençage de l'ADN en fournissant un outil puissant pour déchiffrer des gènes complets et même, plus tard, des génomes entiers. Cependant, l'utilisation de la PCR pour amplifier des banques d'ADN ou des mélanges complexes de gènes est souvent contrainte par deux facteurs. Premièrement, des fragments artificiels sont créés par recombinaison entre des séquences homologues d'ADN. Deuxièmement, les fragments plus courts d'ADN ont tendance à être préférentiellement amplifiés par rapport aux fragments plus longs. L'amplification de l'ADN par PCR après compartimentation dans des microgouttelettes aqueuses permet de limiter ces problèmes et la PCR en émulsion permet d'amplifier des banques complexes de gènes (*Williams et al. 2006*). Les intérêts de la microfluidique digitale à ce niveau sont multiples. La forte monodispersité en taille des microgouttelettes permet tout d'abord de contrôler la distribution des molécules d'ADN au sein des microgouttelettes. De plus, les systèmes microfluidiques permettent la manipulation de l'ADN après amplification. Enfin, une très haute fréquence de production des microgouttelettes est aussi nécessaire. En effet, pour minimiser le nombre de microgouttelettes contenant plus d'une molécule d'ADN, il est nécessaire de travailler à de basses concentrations d'ADN. Dans ces conditions, le nombre de microgouttelettes vides est bien supérieur au nombre de microgouttelettes contenant de l'ADN et il est donc nécessaire de produire une très grande quantité de microgouttelettes pour pouvoir encapsuler une banque entière. Comme nous l'avons mentionné auparavant, la microfluidique digitale permet de produire jusqu'à 30000 microgouttelettes par seconde. Le développement de surfactants et l'utilisation d'huiles résistant au thermocyclage ont permis de créer des systèmes microfluidiques à haut débit permettant de réaliser des PCR sur puce. De manière générale, l'amplification de gènes de

taille inférieure à 500 bp ne pose pas de problèmes tandis que l'amplification de fragments plus importants reste toujours délicate (Kiss *et al.* 2008 ; Schaerli *et al.* 2009 ; Pekin *et al.* 2011).

3.3.2 La transcription et la traduction *in vitro*

La synthèse de protéines par transcription/traduction *in vitro* constitue une étape importante dans les processus d'évolution dirigée des protéines *in vitro*. Les systèmes *in vitro* permettent la traduction de protéines toxiques pour la cellule ou sujettes à la protéolyse dans des systèmes *in vivo* (Griffiths *et al.* 2000). Les principaux systèmes de transcription/traduction *in vitro* (IVT) proviennent d'*Escherichia coli*, de germes de blé ou encore de réticulocytes de lapin et contiennent tous les composants nécessaires à la réaction d'IVT avec de faibles activités protéolytiques et nucléolytiques (Jermutus *et al.* 1998).

Il est possible de réaliser l'expression *in vitro* de protéines au sein de microgouttelettes aqueuses en utilisant des systèmes microfluidiques. La première preuve de principe présente dans la littérature concerne la protéine fluorescente verte (GFP pour "Green Fluorescent Protein") exprimée dans de petites microgouttelettes (65 fL) (Dittrich *et al.* 2005). Le système a ensuite été repris pour approfondir les analyses quantitatives : après encapsulation du plasmide codant pour la GFP avec un mélange d'IVT, les microgouttelettes ont été incubées dans des réservoirs au sein de la puce microfluidique (Courtois *et al.* 2008). Des analyses de fluorescence ont ainsi pu être réalisées sur puce pendant 6 heures pour quantifier l'expression *in vitro* de la GFP. Les résultats ont démontré que la quantité de GFP exprimée varie considérablement en fonction de la taille des microgouttelettes et de la quantité de molécules d'ADN encapsulées.

Une plateforme microfluidique a récemment été mise au point au laboratoire permettant l'expression *in vitro* de la laccase CotA en microgouttelettes aqueuses suivie de l'analyse cinétique de l'activité des laccases exprimées au sein des microgouttelettes (Mazutis *et al.* 2009b) (Figure 39). Cependant, afin d'avoir suffisamment de CotA exprimée pour permettre le test d'activité enzymatique, le système nécessite l'encapsulation d'environ 1000 gènes par microgouttelettes, ce qui empêche son utilisation pour des applications d'évolution dirigée. De plus, puisque la réaction d'IVT ne fonctionne que dans des conditions bien définies (pH, force ionique, tampon...), la flexibilité dans le choix des conditions de l'étape de sélection est très restreinte. Il faut alors séparer réaction IVT et test enzymatique pour la sélection en ajoutant une étape de fusion, ce qui alourdi néanmoins la plateforme microfluidique (Mazutis *et al.* 2009b). L'utilisation de cette plateforme pour l'évolution dirigée de CotA serait donc relativement compliquée : cela nécessiterait une étape préalable d'amplification du gène codant pour CotA en microgouttelettes suivie de deux étapes de fusion (une première pour introduire le mélange IVT puis une seconde pour introduire le substrat fluorogénique).

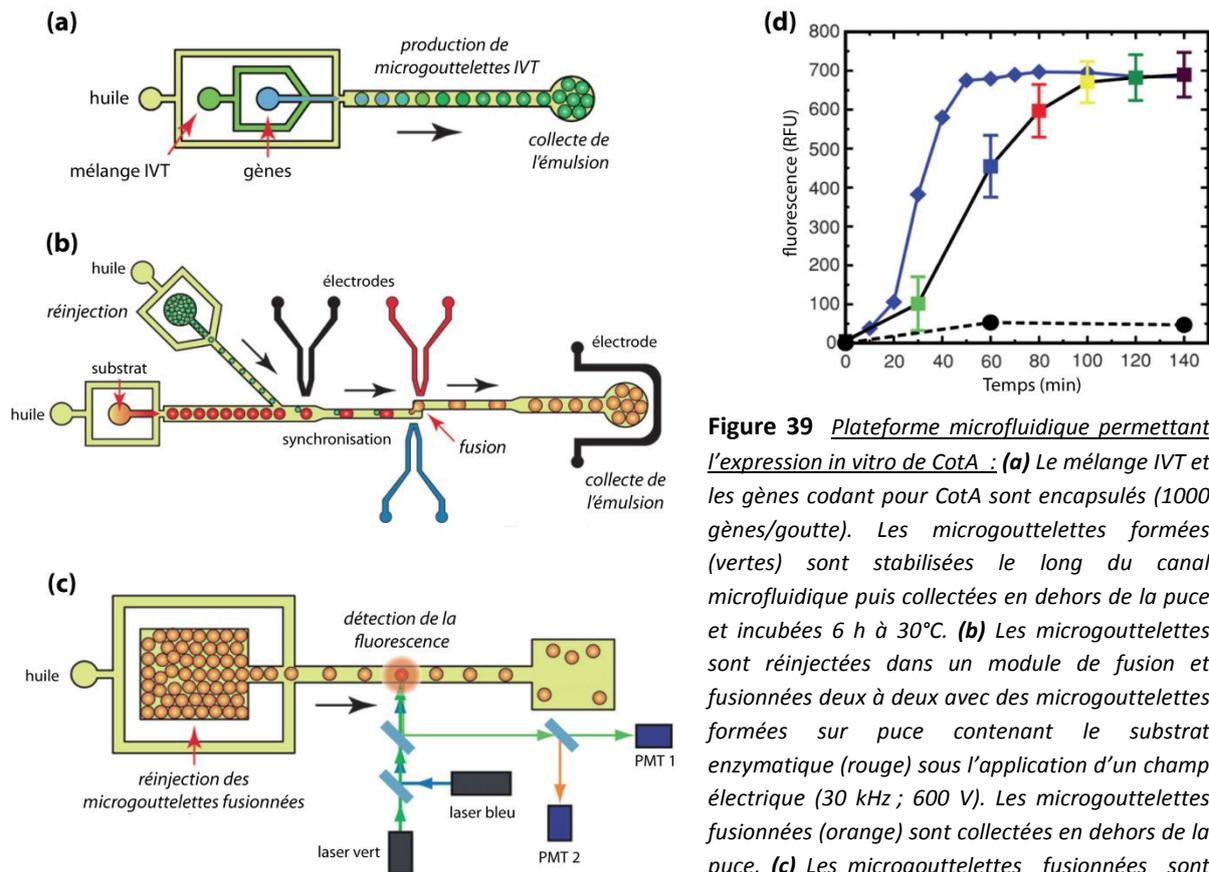


Figure 39 Plateforme microfluidique permettant l'expression in vitro de CotA : (a) Le mélange IVT et les gènes codant pour CotA sont encapsulés (1000 gènes/goutte). Les microgouttelettes formées (vertes) sont stabilisées le long du canal microfluidique puis collectées en dehors de la puce et incubées 6 h à 30°C. (b) Les microgouttelettes sont réinjectées dans un module de fusion et fusionnées deux à deux avec des microgouttelettes formées sur puce contenant le substrat enzymatique (rouge) sous l'application d'un champ électrique (30 kHz ; 600 V). Les microgouttelettes fusionnées (orange) sont collectées en dehors de la puce. (c) Les microgouttelettes fusionnées sont réinjectées à différents temps d'incubation et la

fluorescence est mesurée. (d) Activité enzymatique de CotA exprimé in vitro au sein des microgouttelettes. Noir : microgouttelettes IVT contenant des gènes CotA fusionnés avec le substrat. Pointillés : microgouttelettes IVT sans gènes CotA fusionnés avec le substrat. Bleu : réaction enzymatique équivalente effectuée en microplaque 96 puits. (Adapté à partir de Mazutis et al. 2009b)

Les systèmes *in vivo* sont une bonne alternative et peuvent s'avérer intéressant pour contourner les problèmes liés aux systèmes *in vitro* et simplifier une éventuelle plateforme microfluidique digitale d'évolution dirigée. En effet, les systèmes *in vivo* permettent de ne pas être limité par les conditions de fonctionnement de l'IVT et de réaliser la sélection dans diverses conditions (même dans des conditions incompatibles avec la survie cellulaire à l'intérieur de la microgouttelette).

3.3.3 La manipulation de cellules vivantes

Escherichia coli (*E. coli*) est un système *in vivo* de choix (rapidité de croissance, facilité de manipulation, faible coût) et a souvent été utilisé pour l'évolution dirigée d'enzymes lorsqu'une méthode de sélection adaptée est disponible (Firestine et al. 2000 ; Alexeeva et al. 2002 ; Yuan et al. 2005 ; Neuenschwander et al. 2007). L'encapsulation de cellules dans des doubles émulsions combinée au FACS a déjà été utilisée pour l'évolution dirigée de la paraoxonase PON1 (Aharoni et al. 2005). Les bactéries sont alors utilisées comme des fabriques miniatures de protéines tandis que leur confinement dans des microgouttelettes aqueuses assure le lien entre génotype et phénotype.

Plusieurs systèmes microfluidiques permettant la manipulation de cellules vivantes ont été reportés récemment et pourraient potentiellement être appliqués à des expériences d'évolution dirigée.

L'une des configurations les plus simples est d'utiliser des cellules exprimant une protéine de surface, une protéine directement sécrétée dans la microgouttelette ou bien encore une protéine périplasmique. Dans ces cas, l'enzyme est accessible au substrat, ce qui permet de réaliser facilement des analyses quantitatives. Des mesures cinétiques ont ainsi pu être réalisées sur une phosphatase alcaline sécrétée dans l'espace périplasmique de bactéries *E. coli* (Huebner et al. 2008b). Bien que la durée de la cinétique soit très courte (< 1 min), ce travail a toutefois prouvé la faisabilité et le potentiel de la manipulation de cellules vivantes en microfluidique digitale. Pour l'évaluation d'enzymes cytoplasmiques, il est possible d'utiliser des substrats dont la membrane cellulaire est perméable (Clasell-Tormos et al. 2008) ou d'induire la lyse des cellules à l'intérieur des microgouttelettes (He et al. 2005b).

L'expression des protéines peut soit être induite avant encapsulation ou bien après encapsulation au sein même des microgouttelettes. Il faut noter toutefois que le niveau d'expression de la protéine au sein des cellules encapsulées varie significativement (Huebner et al. 2007). Par conséquent, la sélection de variants par rapport à leur activité enzymatique peut être difficile à réaliser en utilisant des systèmes *in vivo*. Il est cependant possible de corrélérer le niveau d'expression d'une protéine avec son activité en utilisant des protéines de fusion : un gène rapporteur codant pour une protéine fluorescente (GFP) est fusionné au gène codant pour la protéine d'intérêt et permet de connaître le niveau d'expression de la protéine d'intérêt en fonction de son activité (Courtois et al. 2008).

Une des premières plateformes démontrant la possibilité de manipuler des cellules vivantes dans un système intégré de microfluidique digitale (production, mélange, fusion, incubation, détection) a été récemment mis au point (Brouzes et al. 2009). La plateforme permet le criblage à haut débit de molécules vis-à-vis de leur effet cytotoxique sur des cellules humaines U937. La plateforme a été appliquée au criblage d'une banque contenant différentes concentrations de mitomycin C. Un codage fluorescent a d'abord été réalisé en encapsulant chaque concentration différente de mitomycin C avec une concentration donnée de fluorophore. Ces microgouttelettes ont ensuite été fusionnées avec des microgouttelettes contenant au maximum une cellule U937. Après incubation en dehors de la puce microfluidique, l'émulsion est réinjectée et les microgouttelettes ont été fusionnées avec des microgouttelettes contenant un test de survie des cellules. Une mesure de fluorescence permet ensuite de distinguer les cellules U937 vivantes (fluorescence verte ; Calcein-AM) des cellules mortes (fluorescence rouge ; Sytox Orange) tout en connaissant la concentration en mitomycin C de chaque microgouttelette grâce au codage fluorescent.

La capacité à pouvoir détecter et sélectionner un mutant ayant des propriétés catalytiques optimisées est une étape cruciale dans le processus d'évolution dirigée. L'utilisation de la

microfluidique digitale pour développer des techniques de criblage à très haut débit reposent sur la détection du produit issu de la réaction enzymatique, produit qui doit être spectroscopiquement distinct du substrat correspondant. Les substrats sont donc généralement fluorogéniques et sont transformés après réaction enzymatique en un produit fluorescent. Comme nous l'avons mentionné auparavant (voir 3.2.6), une technique récente autorise le tri par diélectrophorèse de microgouttelettes basé sur la détection de fluorescence à de hauts débits : le FADS (Baret *et al.* 2009). Afin de démontrer l'utilité du système pour des applications biologiques, les auteurs l'ont appliqué à un système *in vivo* et ont encapsulé dans des microgouttelettes aqueuses de 12 pL des cellules *E. coli LacZ* (codant pour une β -galactosidase active) et *E. coli Δ LacZ* (codant pour un mutant inactif de la β -galactosidase) à raison d'au maximum une cellule par goutte. Après incubation de l'émulsion à 20°C pendant 14 heures, les cellules ont proliféré au sein des microgouttelettes et les enzymes actives ont hydrolysé le substrat fluorogénique (fluorescéine-di- β -D-galactopyranoside) au sein des microgouttelettes "positives" (Figure 40a). Après réinjection de l'émulsion dans une puce microfluidique de tri (Figure 40b), les microgouttelettes ont été triées en fonction de leur fluorescence par diélectrophorèse à 300 Hz (Figure 40c) et seules les bactéries *E. coli LacZ* ont été récupérées.

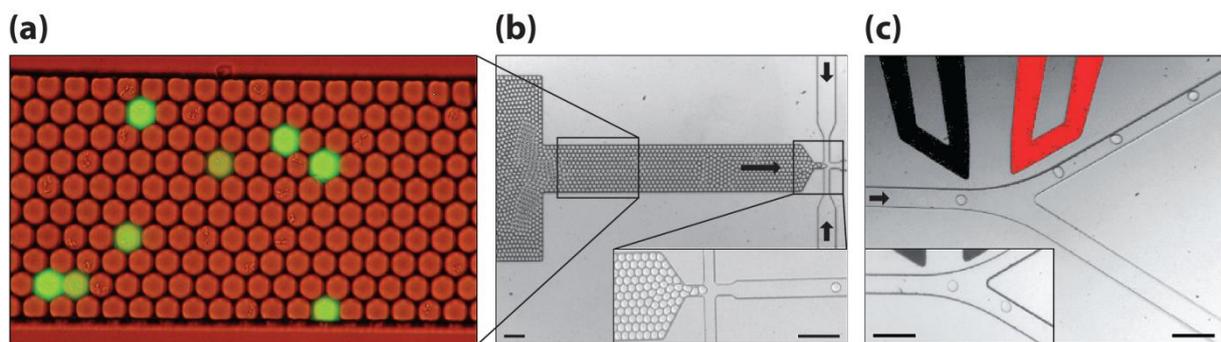


Figure 40 *Fluorescence Activated Droplet Sorting (FADS)* : **(a)** Image à fluorescence de l'émulsion réinjectée au sein du canal microfluidique. Chaque microgouttelette fonctionne comme un microréacteur indépendant : les microgouttelettes vertes contiennent des *E. coli LacZ* et le substrat fluorogénique hydrolysé en fluorophore vert ; les autres microgouttelettes sont soit vides, soit contiennent des bactéries *E. coli Δ LacZ* inactives. **(b)** Réinjection de l'émulsion dans le système microfluidique. L'insert présente l'espacement des microgouttelettes par une phase continue d'huile perfluorée. **(c)** Module de tri. Lorsque le champ électrique est appliqué entre les électrodes (~ 1500 V), les microgouttelettes sont déviées dans le canal positif de collecte (canal supérieur). En absence de champ, les microgouttelettes se dirigent dans le canal négatif inférieur possédant la plus faible résistance hydrodynamique (insert). Echelle : 100 μ m. (Baret *et al.* 2009)

L'influence de nombreux facteurs sur l'efficacité du tri a été étudiée en détail : les vitesses des flux de phase continue et d'émulsion, l'espacement entre les microgouttelettes, la durée et l'intensité du pulse électrique appliqué. Après avoir déterminé les conditions optimales de tri, les auteurs ont étudié l'enrichissement (η_{exp}) de la sélection en fonction du nombre moyen initial de cellules encapsulées par microgouttelette (λ) et le rapport de départ (ε_0) entre bactéries positives *E. coli LacZ* et bactéries négatives *E. coli Δ LacZ*. Différentes conditions ont été analysées (Figure 41b) et les enrichissements expérimentaux (η_{exp}) comparés à un enrichissement maximal théorique (η_{m}) basé

sur un modèle reposant sur une distribution de Poisson lors de l'encapsulation des bactéries (Figure 41c).

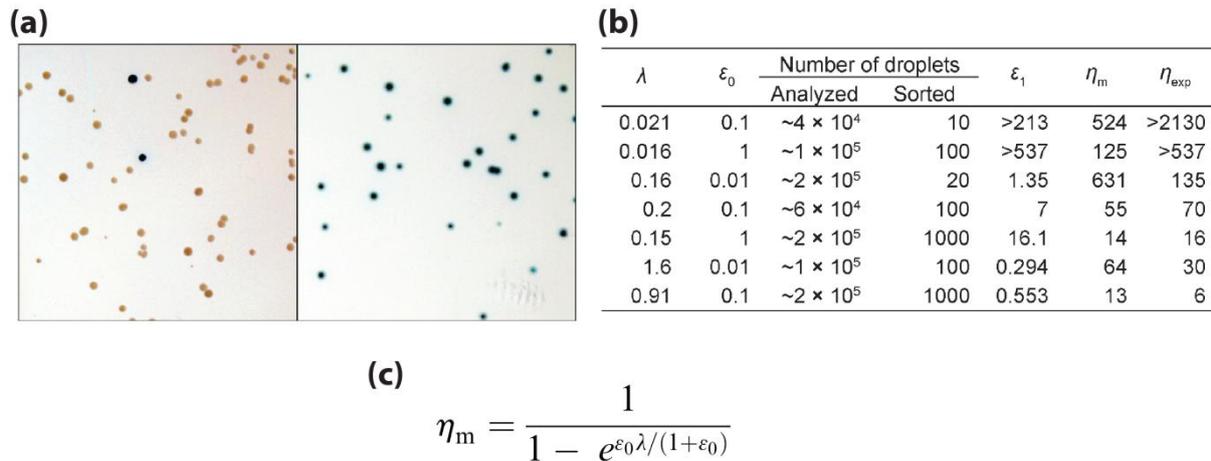


Figure 41 Analyse de la méthode de sélection par FADS : **(a)** Photo de colonies bactériennes sur boîte Agar avant (gauche) et après (droite) tri pour une émulsion ($\varepsilon_0 \sim 0,1$; $\lambda \sim 0,01$). Screening blanc ($\Delta LacZ$) / bleu ($LacZ$). **(b)** Enrichissements théoriques et expérimentaux en fonction de ε_0 et λ après un cycle de sélection basée sur la détection des microgouttelettes fluorescentes. ε_1 est le rapport (*E. coli LacZ*/*E. coli $\Delta LacZ$*) après tri. $\eta_{exp} = \varepsilon_1 / \varepsilon_0$. **(c)** Modèle pour l'enrichissement maximal théorique dépendant de ε_0 et λ . (Baret et al. 2009)

La répartition des cellules au sein des microgouttelettes au moment de l'encapsulation suit en effet la loi de Poisson et dépend de la concentration c en cellules avant encapsulation :

	$\lambda = 1$	$\lambda = 0,2$	$\lambda = 0,1$
$P_{(X=k)} = \frac{e^{-\lambda}}{k!} \lambda^{-k}$	$P_{(X=0)} = 0,37$	$P_{(X=0)} = 0,818$	$P_{(X=0)} = 0,909$
	$P_{(X=1)} = 0,37$	$P_{(X=1)} = 0,164$	$P_{(X=1)} = 0,090$
	$P_{(X>1)} = 0,26$	$P_{(X>1)} = 0,018$	$P_{(X>1)} < 0,01$

où λ est la concentration en cellules avant encapsulation (cellule/volume_{microgouttelette}), k le nombre de cellules par microgouttelette et $P_{(X=k)}$ la probabilité d'avoir k cellules par microgouttelette.

Plus la concentration en cellules est élevée avant encapsulation, plus la probabilité d'avoir des encapsulations multiples est élevée. On remarque qu'il est nécessaire de travailler à une concentration équivalente à 0,1 cellule/volume_{microgouttelette} pour avoir une faible probabilité d'encapsuler plus d'une cellule par goutte (< 1%). Dans ce cas, la majorité des gouttes sont vides (91 %) et environ 9 % ne contiennent qu'une seule cellule.

Le système développé permet de pouvoir trier une unique microgouttelette fluorescente parmi une grande quantité de microgouttelettes non fluorescentes. Les conditions d'utilisation miment les conditions d'une expérience d'évolution dirigée dans laquelle quelques mutants présentent une activité enzymatique plus importante (et donc un signal de fluorescence plus important) au sein d'un ensemble de mutants peu ou pas actifs.

Le FADS possède quelques avantages par rapport aux machines de FACS traditionnelles. Tout d'abord, le volume de réactifs et donc le prix global des expériences est plus faible avec le FADS. De plus, la compartimentation de cellules ou de matériel biologique dans des microgouttelettes aqueuses offre un large choix pour la sélection de banques. Par exemple, des cellules sécrétant une enzyme pourraient être triées en utilisant le FADS puisque tous les produits et réactifs resteraient idéalement confinés au sein des microgouttelettes. Même si le FADS n'atteint toujours pas des fréquences de tri comparables au FACS, le système fournit cependant un outil particulièrement intéressant pour développer une plateforme microfluidique digitale d'évolution dirigée.

Le système de FADS a été utilisé récemment pour des applications d'évolution dirigée des protéines. Ces travaux constituent l'une des avancées les plus significatives utilisant des cellules vivantes dans une plateforme intégrée de microfluidique digitale (production, incubation, détection activité et tri) (Agresti *et al.* 2010). La plateforme microfluidique a été appliquée au criblage à haut débit d'une banque de variant de la peroxydase de radis noir (HRP) exprimée à la surface de cellules de levure (Figure 42). La plateforme a permis le criblage d'environ 10^8 mutants en environ 10 h et en utilisant moins de 150 μL de réactifs. D'après les auteurs, la technique serait 10 millions de fois moins coûteuse et 1000 fois plus rapide qu'un criblage en microplaque. Bien que la HRP soit une enzyme déjà très active, plusieurs mutants ayant des activités 10 fois supérieures à celle de l'enzyme sauvage ont pu être isolés après deux générations. Pour la première génération, deux banques ont été créées par PCR mutagène ou mutagenèse dirigée. Une première étape de sélection a permis d'éliminer les mutants inactifs : environ 100 variants possédant une activité similaire à la HRP sauvage ont été isolés. Une seconde génération de variants a été créée à partir des 18 mutants les plus actifs de la première génération. La banque a été criblée avec des conditions de sélections plus strictes pour isoler les mutants les plus actifs.

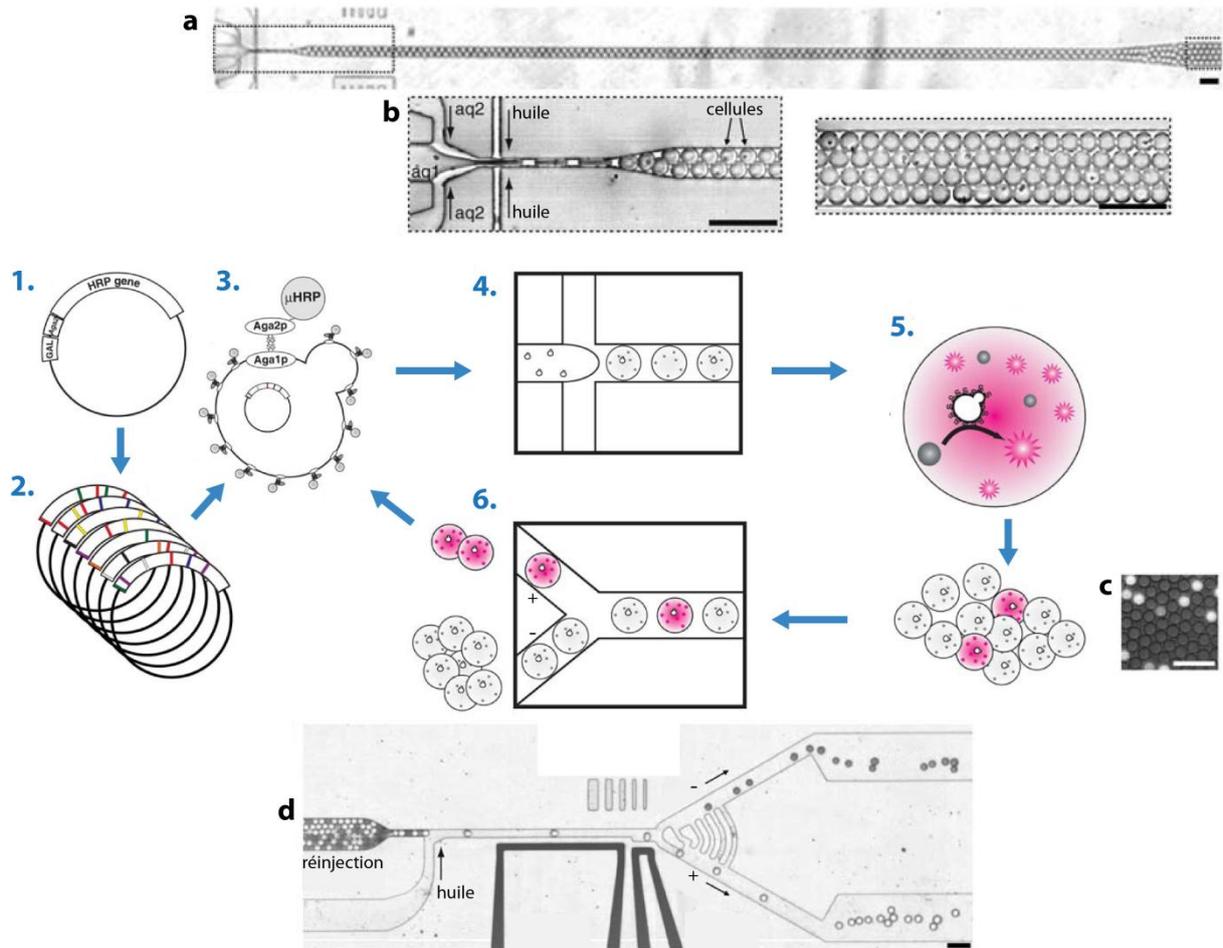


Figure 42 *Plateforme microfluidique in vivo pour l'évolution dirigée de la peroxydase de radis noir (HRP)*: 1. Le plasmide porte le gène sauvage codant pour la HRP sauvage fusionné en C-terminal au gène codant pour Aga2 pour permettre l'exposition sur cellule. 2. Des banques sont construites (10^7 variants). 3. Les banques sont transformées dans des cellules de levure EBY100. Après induction de l'expression des protéines, chaque cellule présente à sa surface environ 10 000 copies d'un seul mutant HRP (μ HRP). 4. Les cellules sont encapsulées avec le substrat fluorogénique dans des microgouttelettes aqueuses de 6 μ L. (a) Image du système de production. (b) La suspension de cellules (aq1) est combinée avec un second flux aqueux contenant le substrat fluorogénique (aq2). Les microgouttelettes sont formées par focalisation hydrodynamique dans une huile fluorée à 2000 Hz. 5. Les microgouttelettes circulent en dehors de la puce microfluidique dans un tubing qui agit comme une ligne d'incubation (5 min). La stabilité des microgouttelettes est assurée par la présence d'un tensioactif fluoré dans l'huile. Les mutants HRP actifs convertissent le substrat fluorogénique (gris) en molécule fluorescente (rose) au sein de leur compartiment. (c) Image d'une monocouche de microgouttelettes après incubation : les microgouttelettes contenant un mutant HRP actif sont fluorescentes. 6. Les microgouttelettes les plus fluorescentes sont triées. (d) Image du système de tri. L'émulsion est réinjectée et les microgouttelettes sont espacées par un flux d'huile. Les microgouttelettes fluorescentes sont déviées dans le canal du bas par diélectrophorèse. Les microgouttelettes "positives" sont collectées, puis cassées pour récupérer les cellules et le processus de sélection peut être répété

3.4 Conclusion

Les objectifs de ce doctorat sont d'utiliser les avantages de la compartimentation au sein de microgouttelettes aqueuses et de la microfluidique digitale afin de mettre en place une plateforme intégrée permettant l'évolution dirigée de CotA pour des applications biopiles. Nous avons porté notre choix sur un système in vivo en utilisant E. coli comme organisme hôte. Pour cela, différents modules microfluidiques (encapsulation, fusion, tri....) devront être associés afin de développer une plateforme permettant la manipulation de cellules vivantes exprimant CotA au sein de microgouttelettes aqueuses et le criblage des microgouttelettes en fonction de leur activité enzymatique dans des conditions similaires à celles de la biopile enzymatique souhaitée. La détection de l'activité enzymatique de CotA et le tri des microgouttelettes reposera sur une mesure de fluorescence au sein de chaque microgouttelette. La plateforme ainsi développée devra permettre le criblage à très haut débit des microgouttelettes en fonction de leur fluorescence.

Dans un premier temps, une plateforme microfluidique de sélection modèle sera développée visant à démontrer la faisabilité de la procédure en isolant des bactéries "positives" parmi un grand nombre de bactéries "négatives". Une fois la plateforme de sélection modèle validée, celle-ci sera appliquée au criblage de banques de variants de CotA.

Définition du sujet de thèse

La finalité de ces travaux de doctorat était d'optimiser par évolution dirigée la laccase bactérienne CotA de *Bacillus subtilis* pour des applications en biopile enzymatique. L'idée était d'optimiser l'enzyme pour une utilisation dans des conditions physiologiques, c'est-à-dire augmenter son activité à pH7.0 tout en conservant sa remarquable stabilité. Le projet avait pour ambition d'utiliser la technologie de microfluidique digitale comme technique de criblage à haut débit de l'activité enzymatique de CotA.

La laccase CotA n'avait auparavant jamais été utilisée en tant que catalyseur cathodique à biopile enzymatique. Des outils électrochimiques permettant son évaluation pour la réduction biocatalytique de l'O₂ devaient alors être développés afin de démontrer la possibilité d'utiliser cette laccase pour de telles applications. Le but était donc de mettre au point des techniques de création de biocathodes modifiées avec CotA. L'étude simple et rapide de ces biocathodes devait pouvoir se faire en tant qu'électrodes isolées, mais également dans des conditions réelles de fonctionnement en les associant avec une bioanode au sein d'une biopile enzymatique. Ces outils devaient être développés afin qu'ils puissent être par la suite appliqués à l'évaluation et la comparaison de mutants optimisés de CotA.

Une plateforme microfluidique directement applicable à l'évolution dirigée de la laccase CotA devait ensuite être mise au point. Cette plateforme devait permettre la détection et le tri à haut débit de l'activité enzymatique de CotA à partir de cellules exprimant la protéine, ainsi que la récupération de l'information génétique associée. Plusieurs opérations microfluidiques devaient ainsi être associées afin de permettre la manipulation des microgouttelettes tout en garantissant l'intégrité de l'émulsion. Une plateforme de criblage modèle devait être mise au point à partir de la laccase modèle CotA puis appliquée au criblage de banques de mutants de CotA dans les conditions de la biopile envisagée.

Pour résumer, le projet pouvait se décomposer en deux phases principales :

Développement : - développement des outils électrochimiques pour l'étude de CotA et de ses mutants optimisés
 - développement d'une plateforme de microfluidique digitale pour l'évolution dirigée *in vivo* de CotA

Application : - application de la plateforme microfluidique au criblage de banques de mutants de CotA
 - application des outils électrochimiques pour caractériser et comparer les différents mutants optimisés

Résultats et discussion

4 Développement d'une biocathode CotA avec médiateur en solution

Au départ de ce travail, la laccase CotA de *Bacillus subtilis* n'avait jamais été utilisée pour la fonctionnalisation de biocathodes à O₂. Cette enzyme possède cependant des propriétés thermophiles lui conférant une forte stabilité vis-à-vis de variations de température ou de pH. Son activité à température ambiante et sa stabilité font de CotA une enzyme pleine de potentiels pour des applications en biopile enzymatique. Les premiers objectifs de ce doctorat consistaient à mettre au point les outils électrochimiques nécessaires à l'évaluation de CotA en tant que biocatalyseur de la réduction de l'O₂ en H₂O. Après validation, ces outils doivent permettre l'étude et la comparaison des différents variants optimisés par évolution dirigée. De manière générale, les outils électrochimiques ont été en premier lieu validés avec la laccase de *Trametes versicolor* (TvLac), une laccase mésophile classiquement utilisées pour ce type d'application, puis dans un second temps appliqués à CotA.

Une technique d'immobilisation simple, fiable et reproductible a été développée en utilisant TvLac. La méthode a été appliquée avec succès à CotA, permettant de concevoir des biocathodes efficaces pour la réduction de l'O₂ avec un médiateur rédox en solution. La stabilité de ces biocathodes a été étudiée ainsi que la variation de leur activité en fonction de la température. Nous avons également démontré à travers l'immobilisation de mutants moins actifs de CotA une forte corrélation entre l'efficacité des biocathodes et les propriétés cinétiques de la laccase utilisée.

4.1 Matériel et méthodes

4.1.1 Réactifs

La *p*-phénylènediamine, le poly(éthylèneglycol) diglycidyléther (PEGDGE, ~ 525 g/mol), le 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS), le 3,3'-dithiodipropionic acid di(N-hydroxysuccinimide ester), l'ampicilline, l'hydroxyde de potassium, l'éthanol, l'acétone, le chlorure de cuivre (II), le nitrate de sodium, l'acide chlorhydrique, l'acide nitrique et l'acide sulfurique ont été achetés chez Sigma-Aldrich. La laccase de *Trametes versicolor* (TvLac) a été achetée chez Fluka (21 U/mg) (une unité U correspond à la quantité d'enzyme qui converti 1 µmol d'ABTS par minute à 25°C dans du tampon acétate (50 mM ; pH4.5)). L'isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) a été commandé chez Roth. L'O₂ et le N₂ ultrapure ont été achetés chez Air Liquide.

4.1.2 Electrochimie

Les mesures électrochimiques (cyclovoltammétrie, chronoampérométrie et voltammétrie linéaire) ont été effectuées avec un potentiostat AUTOLAB PGSTAT100 généreusement mis à notre disposition par le Prof. Thomas Ebbesen (ISIS, Université de Strasbourg). Les cellules électrochimiques, le kit de polissage et les électrodes utilisées ont été achetés chez CHI Instruments : électrode d'or (\varnothing 2mm), électrode de carbone vitreux (\varnothing 3mm), contre-électrode de platine et électrode de référence Ag|AgCl|KCl 1M.

4.1.3 Expression, extraction et purification de la laccase CotA et des mutants L386A, M502L, I494A et M502F

La souche *E. coli* C41(DE3) (Miroux *et al.* 1996) a été utilisée comme souche d'expression. Les plasmides codant pour chacune des laccases (pLOM10 pour CotA ; pLOM15 pour L386A ; pLOM13 pour M502L ; pLOM27 pour I494A ; pLOM52 pour M502F) nous ont été cordialement fournis par le Professeur L.O. Martins (Universidade Nova de Lisboa ; Portugal) (Martins *et al.* 2002). La carte du plasmide pLOM10 est présentée en 8.2.1. Les protocoles d'expression, d'extraction et de purification sont identiques pour les cinq protéines.

Les plasmides ont été transformés dans des cellules *E. coli* C41(DE3) compétentes chimiquement (protocole Sambrook *et al.* 2001). Les cellules ont été mises en culture (37°C ; 230 rpm) dans 100 mL de milieu SOC contenant de l'ampicilline (0,1 mg/mL) et 0,25 mM de CuCl₂ jusqu'à ce que la DO₆₀₀ atteigne 0,4 – 0,6 (début de phase exponentielle). L'expression des protéines a été induite par l'ajout d' 1 mM d'isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) et l'incubation poursuivie pendant 15 h (30°C ; 230 rpm). Les cellules ont été centrifugées (3000 g ; 20 min ; 4°C) puis resuspendues dans 5 mL de tampon Tris-HCl (20 mM ; pH7.5) contenant des inhibiteurs de protéases (Complete™, mini EDTA free protease inhibitor mixture tablets, Roche Biochemicals). Les cellules ont été lysées par sonication (2x5min ; Bendelin Sonoplus HD200, 25% par cycle, MS72/D) puis centrifugées (16000 g ; 1 h ; 4°C). Le surnageant a été chauffé à 65°C pendant une heure puis centrifugé (16000 g ; 1 h ; 25°C) pour éliminer les protéines dénaturées. Le surnageant a été chargé sur une colonne d'échange cationique (Pierce strong cation-exchange column) équilibrée avec du tampon Tris-HCl (20 mM ; pH7). Un gradient croissant de NaCl (0-2 M) a été élué par centrifugation. Les fractions actives ont été réunies et concentrées par ultrafiltration (cutoff 30 kDa). Lors des procédures de concentration, le tampon Tris-HCl a été remplacé par du tampon phosphate (50 mM ; pH7.6). Les quantités de protéines ont été déterminées grâce au test de Bradford (suivant les recommandations du fournisseur Sigma-Aldrich) et par mesure d'absorbance ($\epsilon_{\text{CotA}} = 84\,739\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) en utilisant un spectrophotomètre Nanodrop ND-100 (Thermo Scientific). La pureté a été contrôlée par migration sur gel de polyacrylamide contenant du dodécyl sulfate de sodium (SDS-PAGE) (Invitrogen NuPAGE® 10% Bis-Tris Gel) avec du tampon de migration MES-SDS NuPAGE® (Invitrogen) (avant migration, les protéines ont été chauffées à 99°C pendant 10min dans du tampon dénaturant contenant 10% de dithiothreitol (DTT)). Les enzymes purifiées ont été conservées à -80°C avec ou sans 15% de glycérol.

4.1.4 Etude enzymologique des laccases CotA, L386A, M502L, I494A et M502F

L'oxydation de l'ABTS à 25°C a été suivie à 420 nm au spectrophotomètre (Molecular Devices, Spectramax M5) dans des microplaques 384 puits dans du tampon acétate (50 mM ; pH4.5) contenant de l'ABTS (1 µM – 50 mM), du CuCl₂ (1 mM) et une quantité donnée de laccase (~ 1.10⁻⁷ M). Les paramètres cinétiques ont été déterminés par la méthode de Lineweaver-Burk (*Lineweaver et al. 1934*) à partir des vitesses initiales de réaction obtenues en considérant des cinétiques simples de Michaelis-Menten.

4.1.5 Immobilisation de TvLac sur une électrode d'or

L'électrode d'or lavée et séchée a été immergée dans 3 mL d'une solution d'éthanol anhydre et dégazé avec N₂ contenant 3 mM de 3,3'-dithiodipropionic acid di(N-hydroxysuccinimide ester). La solution a été agitée à température ambiante et sous N₂ pendant 12 h. L'électrode a ensuite été immergée dans de l'eau ultrapure pendant 2 h puis séchée avec N₂.

5 µL (60 µg ; 1,3 U) d'une solution de TvLac à 12 mg/mL dans du tampon phosphate (50 mM ; pH7.5) ont été déposés sur la surface de l'électrode modifiée. La réaction a eu lieu à température ambiante pendant 20 min puis à 4°C pendant 2 h. L'électrode a ensuite été immergée 1 h à 4°C dans du tampon acétate (50 mM ; pH4.5) avant utilisation.

Méthode de régénération : les SAM ont été éliminées par désorption réductrice : cyclovoltammétrie entre 0 et -1,2 V vs. Ag/AgCl à 100 mV.s⁻¹ dans KOH (0,5 M) dégazé avec N₂ jusqu'à ce que le pic caractéristique de réduction des thiolates disparaisse (entre -0,8 et -1,2 V). L'électrode d'or a ensuite été successivement immergée dans une solution de KOH 2 M dans l'éthanol (30 min), immergée dans HNO₃ 2 M (30 min), rincée à l'eau distillée, polie sur alumine (0,3 µm et 0,05 µm) et placée dans un bain à ultrasons (15 min). La propreté de la surface d'or a été contrôlée par cyclovoltammétrie entre 0 et 1,6 V vs. Ag/AgCl à 100 mV.s⁻¹ dans H₂SO₄ (0,5 M) dégazé avec N₂ jusqu'à ce que le cyclovoltammogramme n'évolue plus.

4.1.6 Immobilisation de TvLac ou CotA sur une électrode de carbone vitreux

L'électrode de carbone vitreux a été lavée puis séchée avec N₂. La cellule électrochimique a été purgée avec N₂. 5 mL d'une solution de HCl (0,5 M) dégazée avec N₂ contenant 10 mM de *p*-phénylènediamine ont été ajoutés. 600 µL d'une solution de NaNO₂ (1 M) dégazée avec N₂ ont été ajoutés à température ambiante, sous agitation dans le noir sous atmosphère de N₂. Après 5 min de réaction, cinq scans de +0,6 à -0,4 V vs. Ag/AgCl à 50 mV.s⁻¹ ont été réalisés. L'électrode a ensuite été placée dans un bain à ultrasons (30 s) puis rincée à l'eau ultrapure et séchée avec N₂.

8,5 µL d'une solution contenant un mélange composé de l'enzyme (TvLac ou CotA) et de poly(éthylèneglycol) diglycidyléther (PEGDGE) (1:2 massique) dans du tampon phosphate (50 mM ; pH7.5) ont été déposés sur la surface de l'électrode. La réticulation a eu lieu à température ambiante

pendant 15 h. Un tube eppendorf percé a été placé sur l'électrode pour protéger la surface pendant la réticulation. Les électrodes ont été plongées 3 h dans du tampon acétate (50 mM ; pH4.5) avant utilisation.

Méthode de régénération : l'électrode de carbone vitreux a été immergée 1 h dans une solution de KOH 2 M dans l'éthanol (30 min), immergée dans HNO₃ 2 M (30 min), rincée à l'eau distillée, polie sur alumine (0,3 μm et 0,05 μm) et placée dans un bain à ultrasons (15 min).

4.2 Résultats et discussion

4.2.1 Développement d'une technique d'immobilisation de la laccase TvLac

La technique d'immobilisation doit être rapide et simple à mettre en œuvre et permettre une évaluation robuste et reproductible de la réduction catalytique de l'O₂ par la laccase à la surface de l'électrode. Nous avons décidé d'explorer deux stratégies différentes utilisant chacune une technique bien connue pour la fonctionnalisation de surface : la formation de SAM de thiols sur une surface d'or et la réduction de sels d'aryldiazonium sur une surface de carbone.

4.2.1.1 Formation d'une SAM de thiols fonctionnalisée sur une surface d'or

La technique d'immobilisation suivie est schématisée dans la Figure 43a. L'auto-organisation de molécules de thiols en monocouche sur une surface d'or est la technique majoritairement utilisée dans les nanosciences et les nanotechnologies pour la fonctionnalisation de surface (*Ulman 1996 ; Love et al. 2005*). La technique a été de nombreuses fois utilisée pour introduire des interactions entre la surface d'une électrode d'or et une enzyme dans le but de mesurer des DET ou des MET (*Willner et al. 1996 ; Katz et al. 1999 ; Schuhmann et al. 2000*). Les sulfures possèdent en effet une très forte affinité pour l'or et se fixent sur celui-ci de manière semi-covalente (S-Au ~ 188 kJ/mol) et très stable, le processus restant réversible.

Une SAM de thiols activés par une fonction NHS a été formé à la surface d'une électrode d'or en immergeant l'électrode dans de l'éthanol anhydre contenant 3 mM de disulfure-NHS **1** sous N₂ (Figure 43a). La présence de la SAM sur la surface d'or a été contrôlée lors de sa désorption pour régénérer la surface (désorption réductrice). La réduction électrochimique des thiolates à un potentiel généralement compris entre -0,8 et -1,2 V vs. SHE permet en effet d'éliminer la SAM et de régénérer la surface d'or via une réduction à un électron (*Mulder et al. 2001*). La présence d'un pic de réduction à -0,92 V vs. SHE en milieu KOH a ainsi permis de confirmer la présence de la SAM de thiols-NHS mais également d'évaluer le taux de recouvrement de la surface d'or par intégration du pic de réduction (Figure 43b). La quantité de matière fixée dépend en effet de la loi de Faraday :

$$Q = \int idt = \Gamma nSF$$

où Q est la quantité de charge échangée (F), Γ le taux de recouvrement (mol.cm⁻²), S la surface de l'électrode utilisée (cm²) et F la constante de Faraday (96500C.mol⁻¹)

Les taux de recouvrement atteints ont été en moyenne aux alentours de $\Gamma = 1.10^{-10}$ mol.cm⁻², ce qui correspond aux ordres de grandeurs caractéristiques d'une SAM de thiols.

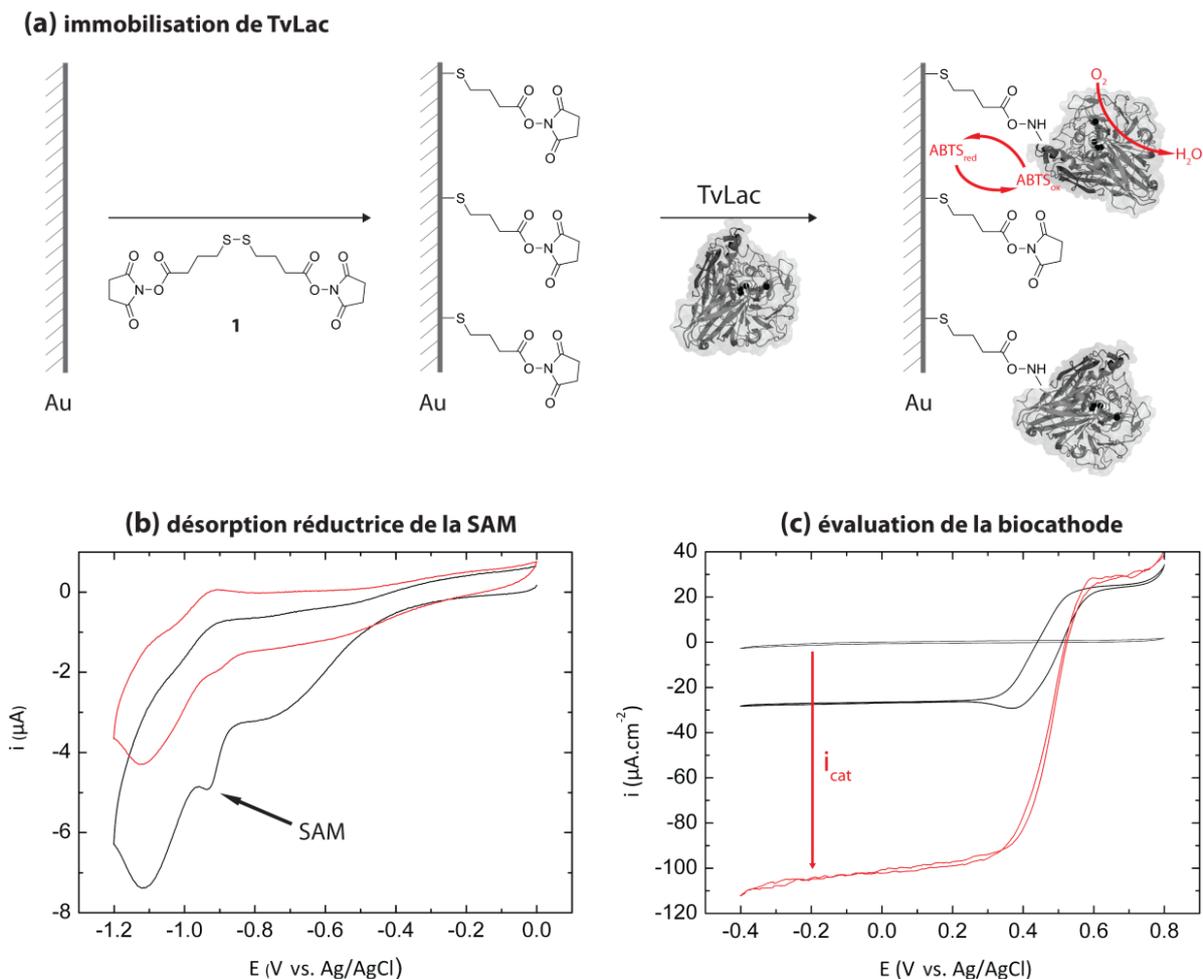


Figure 43 *Immobilisation de TvLac sur une électrode d'or: (a) Schématisation de la technique d'immobilisation utilisée : une SAM de thiols fonctionnalisés NHS est formée sur la surface d'or. Les esters activés réagissent avec les fonctions amines présentes à la surface de TvLac pour former des liaisons amides via un couplage peptidique. (b) Cyclovoltammogrammes d'une électrode d'or fonctionnalisée avec une SAM de disulfure **1** dans KOH 0,5 M dégazé avec N₂. Scans de 0 à -1,2 V à 100 mV.s⁻¹. Premier scan (noir) et onzième scan (rouge). (c) Cyclovoltammogrammes d'une électrode d'or fonctionnalisée avec TvLac (60 μg ; 1,3 U) dans du tampon acétate (50 mM ; pH4.5) contenant 100 mM de NaClO₄ : saturé en N₂ (noir), 2 mM d'ABTS et des traces d'O₂ (noir gras) et 2 mM d'ABTS et saturé en O₂ (rouge) à 20°C. Scans de +0,8 à -0,4 V à 10 mV.s⁻¹ (cinquième scan représenté)*

Les fonctions NHS ainsi introduites à la surface de l'électrode ont ensuite réagi avec les fonctions amines présentes à la surface de la laccase TvLac pour former une liaison covalente amide via un couplage peptidique et immobiliser l'enzyme à la surface de l'électrode (Figure 43a). L'électrode ainsi fonctionnalisée a été appliquée avec succès à la réduction catalytique de l'O₂ en H₂O en présence d'ABTS comme médiateur rédox dans du tampon acétate (50 mM ; pH4.5) (Figure 43c). La densité de courant de réduction i_{cat} est défini par $i_{\text{cat}} = i_{\text{red, ABTS, O}_2} - i_{\text{red, tampon}}$, chaque courant étant extrait à -0,2 V vs. Ag/AgCl sur les cyclovoltammogrammes. En absence d'O₂ (N₂ bullé dans le tampon), une faible densité de courant de réduction ($i_{\text{cat}} = -28 \mu\text{A.cm}^{-2}$) est constatée et est due à la présence d'une faible quantité d'O₂ dissout dans le tampon. Les pics d'oxydation et de réduction de l'ABTS sont bien définis. En présence d'O₂ dans des conditions saturantes (O₂ bullé dans la solution), l'électrode délivre une densité de courant de réduction significative de $i_{\text{cat}} = -102 \mu\text{A.cm}^{-2}$ correspondant à la

réduction catalytique de l'O₂ par TvLac. Le cyclovoltammogramme présente l'allure typique d'un processus électrochimique limité par les phénomènes de diffusion du substrat et/ou du médiateur (vers le site actif de l'enzyme et/ou la surface de l'électrode).

Malgré la création d'une biocathode performante et d'un lien covalent entre l'électrode et l'enzyme, cette technique d'immobilisation possède quelques inconvénients. La méthode est en effet assez contraignante à mettre en œuvre, la formation de la SAM devant se faire dans des conditions anhydres et dépourvues d'O₂. La géométrie des électrodes commerciales utilisées ne facilitent pas l'obtention de telles conditions et la formation de la SAM s'est avérée peu reproductible. De plus, le fait de ne pas disposer de moyen de s'assurer du dépôt de la SAM mis à part lors de sa destruction par désorption rend la méthode peu adaptée. Enfin, la méthode est également très sensible à la propreté et la rugosité de la surface d'or. Par conséquent, nous avons rapidement décidé de nous tourner vers la seconde technique envisagée utilisant la réduction de sels d'aryldiazonium sur une surface de carbone vitreux.

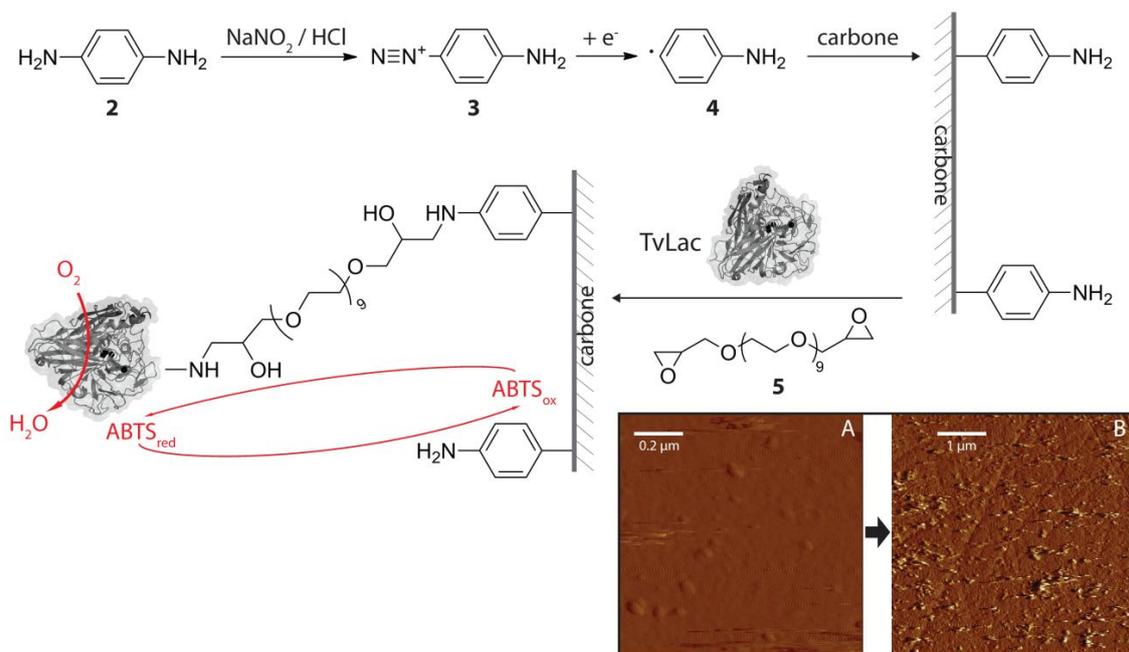
4.2.1.2 Réduction de sels d'aryldiazonium sur une surface de carbone vitreux

La technique d'immobilisation considérée est présentée dans la Figure 44a. Une couche d'aniline a été greffée électrochimiquement à la surface d'une électrode de carbone vitreux via la réduction du sel de diazonium de la *p*-phénylènediamine (Figure 44a). La réduction électrochimique de sels de diazonium d'arylamines est en effet communément utilisée pour fonctionnaliser des surfaces d'or ou de carbone (Allongue et al. 1997 ; Baranton et al. 2005 ; Lyskawa et al. 2006). La technique a d'ailleurs déjà été utilisée pour introduire des points d'ancrage pour l'immobilisation d'enzyme (Blandford et al. 2007 ; Pellissier et al. 2008 ; Vaz-Dominguez et al. 2008) ou de médiateur rédox à base de sels d'osmium (Boland et al. 2008).

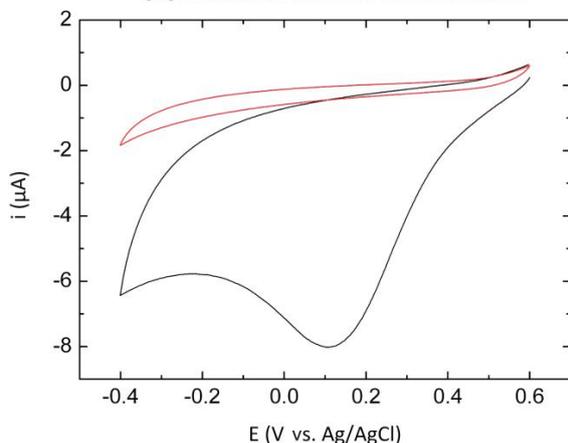
Le sel de diazonium **3** de la *p*-phénylènediamine **2** a été formé *in situ* par réaction de la fonction amine avec du nitrite de sodium (Figure 44a). Le sel de diazonium a ensuite été réduit électrochimiquement pour former un radical phényle **4** qui réagit instantanément avec la surface de carbone vitreux via la formation d'une liaison C-C. La réduction du sel de diazonium a été réalisée par voltammétrie cyclique en scannant de +0,6 V à -0,4 V vs. Ag/AgCl à 50 mV.s⁻¹ (Figure 44b). La fonctionnalisation de la surface de carbone vitreux a ainsi pu être contrôlée *in situ* : l'apparition d'un pic de réduction à environ 110 mV vs. Ag/AgCl lors du premier scan correspond à la formation du radical et donc au greffage sur la surface de carbone. Le pic de réduction disparaît ensuite lors des scans suivant, confirmant la présence de la couche greffée. L'intégration de ce pic de réduction a permis d'évaluer le taux de recouvrement de la surface de carbone vitreux. Les taux de recouvrement qui ont classiquement été obtenus sont de l'ordre de 5,0.10⁻¹⁰ mol.cm⁻², proche du taux de recouvrement estimé d'une surface par une monocouche de groupements aryles (1,35.10⁻⁹ mol.cm⁻² ; Boland et al. 2008). En outre, la surface de l'électrode de carbone vitreux étant

hétérogène à l'échelle microscopique, la formation de structures en multicouches semble plus probable que la formation d'une monocouche uniforme. Cette hypothèse a été en partie confirmée par des analyses en microscopie à force atomique (AFM) réalisées par Dr. Abdel El Abed (UMR5775, Université Paris-Descartes) : les structures d'anilines semblent se former en îlots sur la surface de carbone (Figure 44a B).

(a) immobilisation de TvLac



(b) réduction des sels de diazonium



(c) évaluation de la biocathode

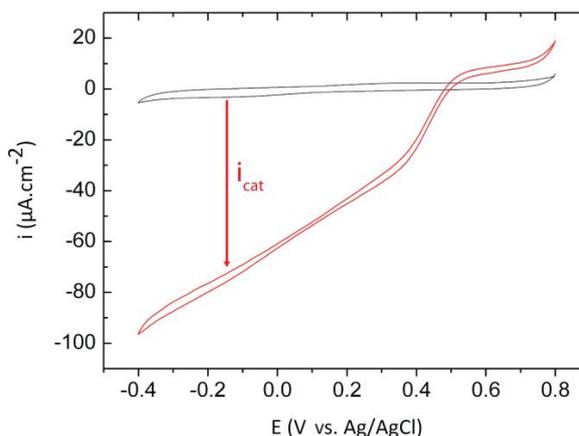


Figure 44 *Immobilisation de TvLac sur une électrode de carbone vitreux: (a) Schématisation de la technique d'immobilisation utilisée : le sel de diazonium 3 formé à partir de la p-phénylènediamine 2 est réduit électrochimiquement pour former le radical aryle 4 qui réagit avec la surface de carbone pour former une liaison C-C. L'enzyme est immobilisée dans un réseau réticulé en utilisant le crosslinker PEGDGE 5 : les fonctions époxydes réagissent avec les fonctions amines présentes à la surface de la protéine et à la surface de l'électrode. Images AFM de la surface de carbone vitreux avant (A) et après (B) modification électrochimique. (b) Cyclovoltammogrammes d'une électrode de carbone vitreux dans HCl 0.5 M contenant 10 mM de p-phénylènediamine 2 et 12 eq de NaNO₂. Après 5 min de réaction, 5 scans sont effectués de +0,6 à -0,4 V à 50 mV.s⁻¹. Premier scan (noir) et cinquième scan (rouge). (c) Cyclovoltammogrammes d'une électrode de carbone vitreux fonctionnalisée avec TvLac (120 μg ; 2,6 U) dans du tampon acétate (50 mM ; pH4.5) contenant 100 mM de NaClO₄ (noir) et en présence de 2 mM d'ABTS et d'O₂ bullé dans la solution (rouge) à 20°C. Scans de +0,8 à -0,4 V à 10 mV.s⁻¹ (cinquième scan représenté)*

La laccase TvLac a ensuite été immobilisée à la surface de carbone vitreux modifiée en utilisant le crosslinker poly(éthylèneglycol) diglycidyléther **5** (PEGDGE) : les fonctions époxydes du PEGDGE réagissent à la fois avec les fonctions amines introduites sur la surface de carbone et les fonctions amines présentes à la surface de l'enzyme (Figure 44a). Les fonctions époxydes ont statistiquement plus de chance de réagir avec les fonctions amines de la surface de carbone plus nombreuses que celles présentes à la surface de la protéine. L'enzyme se retrouve donc piégée au sein d'un réseau réticulé à la surface de l'électrode avec une fraction minoritaire de macromolécules liées de manière covalente à la surface. TvLac a été immobilisée avec succès à la surface de l'électrode en utilisant un ratio massique (PEGDGE:TvLac) (2:1) et en laissant ce mélange réticuler à la surface de l'électrode à température ambiante pendant un minimum de 12 h. L'électrode ainsi fonctionnalisée a été appliquée avec succès à la réduction catalytique de l'O₂ en H₂O (Figure 44c). En présence d'O₂ dans des conditions saturantes et d'ABTS dans du tampon acétate (50 mM ; pH4.5), l'électrode présente une densité de courant de réduction significative de $i_{cat} = -77 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ correspondant à la réduction catalytique de l'O₂ par TvLac.

Cette technique d'immobilisation a donc permis le développement d'une biocathode efficace pour la réduction de l'O₂ en H₂O. Le processus de fonctionnalisation est simple et rapide à mettre en œuvre et permet la création de biocathode de manière reproductible par rapport à la technique décrite dans la partie précédente. Les électrodes de carbone vitreux sont facilement régénérées en suivant un protocole de lavage bien défini. Les électrodes sont plongées respectivement dans KOH 2 M (EtOH) (30 min) et HNO₃ 2 M (30 min) puis polies avec de l'alumine (0,3 et 0,05 μm) et enfin placées au bain à ultrasons (20 min), lavées à l'eau ultrapure et séchées à l'N₂. Nous avons sélectionné cette méthode d'immobilisation pour poursuivre le développement des outils électrochimique et l'application à CotA et ses quatre mutants L386A, M502L, I494A et M502F.

4.2.2 Application de la technique d'immobilisation à la laccase CotA et ses mutants²

Une première partie du travail a consisté à exprimer, extraire et purifier les différentes laccases de manière à disposer de quantités suffisantes pour des caractérisations cinétiques et le développement des outils électrochimiques. Ensuite, la technique d'immobilisation développée avec TvLac a été appliquée avec succès à CotA et ses mutants. La reproductibilité et la stabilité du système ainsi que l'influence de la température ont été étudiés.

4.2.2.1 Expression, extraction et purification de la laccase CotA et de ses mutants

Le protocole d'expression, extraction et purification des laccases a tout d'abord été mis au point avec CotA. L'expression de CotA a été réalisée dans des cellules *E. coli* C41DE3 transformées avec le plasmide pLOM10 codant pour CotA. Après croissance des cellules et induction de l'expression de la

² une partie des ces travaux a été publiée : Beneyton et al. 2011 "Immobilization of CotA, an extremophilic laccase from *Bacillus subtilis*, on glassy electrodes for biofuel cell applications". *Electrochem. Commun.* 13, 24-27 (ANNEXES)

protéine, l'extraction de CotA a été effectuée en lysant les cellules par sonication. CotA étant thermophile et donc résistante à de hautes températures, l'extrait brut a été chauffé à 65°C et les protéines dénaturées éliminées. CotA a ensuite été purifiée sur colonne échangeuse cationique en éluant avec un gradient de NaCl. Les différentes fractions contenant la laccase ont été identifiées avec un test basé sur l'oxydation de l'ABTS (coloration verte) puis analysées sur gel (Figure 45). La signature caractéristique de CotA est composée d'une bande très intense à 65 kDa accompagnée de deux autres bandes beaucoup moins intenses centrées sur 45 kDa correspondant à des formes partiellement dénaturées de l'enzyme (Martins *et al.* 2002). Les fractions actives ont été regroupées puis concentrées. La protéine purifiée a été conservée à -80°C à différentes concentrations (de 1 à 12 mg/mL) dans du tampon phosphate (50 mM ; pH7.5) de manière à être directement disponible pour les tests cinétiques et électrochimiques. Le protocole d'expression, extraction et purification a été appliqué avec succès aux quatre mutants L386A, M502L, I494A et M502F et les laccases ont également été conservées à -80°C (~1 mg/mL).

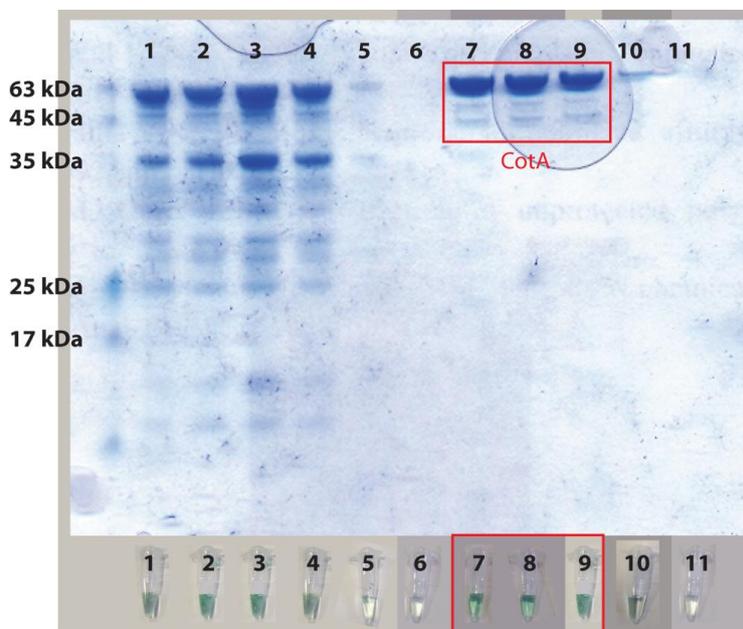


Figure 45 *Purification de la laccase CotA* : En haut : gel dénaturant de protéine correspondant aux différentes fractions obtenues avant (1) après passage sur colonne échangeuse d'ions : fractions non fixées (2 et 3), 0 M NaCl (4 et 5), 0,25 M NaCl (6 et 7), 0,5 M NaCl (8 et 9), 1 M NaCl (10 et 11). Les bandes caractéristiques de CotA apparaissent à 65 kDa et 45 kDa. En bas : tests d'activité ABTS correspondant à chaque fraction. La présence de CotA se traduit par une coloration verte

4.2.2.2 Etude cinétique de la laccase CotA et de ses mutants

Les paramètres cinétiques de CotA et des quatre mutants ont été décrits dans la littérature (Duroo *et al.* 2006 et 2008). Ces paramètres varient cependant significativement entre les deux publications. Une analyse des paramètres enzymatiques a ainsi été effectuée de manière à disposer de caractéristiques cinétiques fiables dans les conditions utilisées dans le cadre de ce doctorat. Les constantes cinétiques de CotA, L386A, M502L, I494A, M502F et TvLac vis-à-vis de l'ABTS ont été déterminées dans du tampon acétate (50 mM ; pH4.5) à 25°C et sont présentés dans le Tableau 4. On

remarque que les quatre mutants sont effectivement moins actifs que CotA, le mutant L386A étant le plus actif des quatre. La laccase CotA apparaît également être plus active que TvLac.

	CotA	L386A	M502L	I494A	M502F	TvLac
k_{cat} (s^{-1})	$2,82 \pm 0,12$	$1,5 \pm 0,37$	$5,81 \cdot 10^{-2} \pm 6,10^{-3}$	$0,63 \pm 0,04$	$4,10^{-2} \pm 0,23 \cdot 10^{-2}$	$1,46 \pm 0,4$
K_M (μM)	$52,4 \pm 15$	102 ± 21	158 ± 20	3650 ± 50	$76,8 \pm 18,5$	160 ± 19
k_{cat} / K_M ($\mu M^{-1} \cdot s^{-1}$)	$5,4 \cdot 10^{-2}$	$1,47 \cdot 10^{-2}$	$3,68 \cdot 10^{-4}$	$1,72 \cdot 10^{-4}$	$1,03 \cdot 10^{-4}$	$9,1 \cdot 10^{-3}$

Tableau 4 Paramètres cinétiques de CotA, L386A, M502L, I494A, M502F et TvLac : déterminés vis-à-vis du substrat ABTS dans du tampon acétate (50 mM ; pH4.5) à 25°C. Les expériences ont été répétées trois fois chacune. Les valeurs moyennes sont présentées.

4.2.2.3 Immobilisation de la laccase CotA

CotA a été immobilisée sur une électrode de carbone vitreux selon la méthode décrite en 4.2.1.2. La biocathode ainsi obtenue catalyse efficacement la réduction de l'O₂ en H₂O en présence d'ABTS comme médiateur et ses performances ont été évaluées par voltammétrie cyclique (Figure 46a). Dans des conditions aérobiques, un courant de réduction significatif apparaît au potentiel de réduction de l'ABTS pour atteindre une densité de courant $i_{cat} = -55 \mu A \cdot cm^{-2}$. A l'inverse, dans des conditions anaérobiques (saturées en N₂), aucun courant catalytique de réduction n'est observé. Il en est de même dans le cas d'une électrode de carbone vitreux contrôle non fonctionnalisée en présence d'ABTS et d'O₂ en conditions saturantes (données non présentées). Il s'agit de la première utilisation de CotA en temps que biocatalyseur pour cathode : l'enzyme catalyse bien la réduction de l'O₂ une fois immobilisée sur l'électrode.

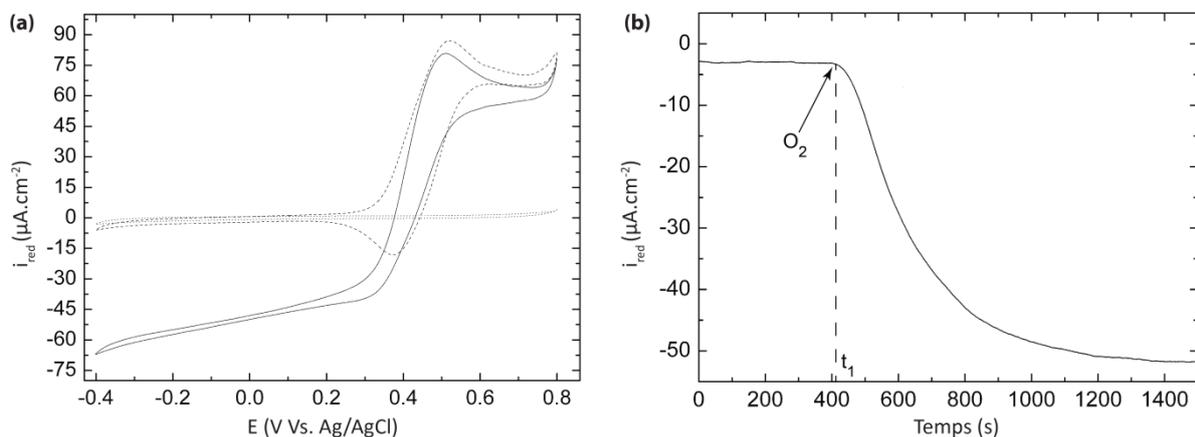


Figure 46 Immobilisation de la laccase CotA : (a) Cyclovoltammogrammes d'une électrode de carbone vitreux fonctionnalisée avec CotA (1,35 µg ; 3,5.10³ U) dans du tampon acétate (50 mM ; pH4.5) contenant 100 mM de NaClO₄ (points) et 2 mM d'ABTS en présence de N₂ (tirets) ou d'O₂ (trait plein) à 25°C. Scans de +0,8 à -0,4 V à 10 mV.s⁻¹ (cinquième scan représenté). (b) Chronoampérométrie d'une électrode de carbone vitreux fonctionnalisée avec CotA (1,35 µg ; 3,5.10³ U) dans du tampon acétate (50 mM ; pH4.5) saturé en N₂ contenant 100 mM de NaClO₄ et 2 mM d'ABTS à 20°C. O₂ est bullé dans l'électrolyte à partir du temps t_1 ($E_{fixe} = 100$ mV vs. Ag/AgCl)

La réaction électrocatalytique a également été caractérisée par chronoampérométrie (Figure 46b). L'électrode fonctionnalisée avec CotA n'exhibe pas de courant de réduction dans un milieu saturé en

N_2 en présence d'ABTS ($E_{\text{fixe}} = 100 \text{ mV vs. Ag/AgCl}$). A partir du temps t_1 , de l' O_2 a été bullé dans la solution tampon : une densité de courant catalytique de réduction apparaît jusqu'à se stabiliser à environ $i_{\text{cat}} = -50 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$.

Il faut remarquer que la fonctionnalisation de l'électrode n'est efficace que lorsque l'étape de réticulation a lieu à l'état solide à la surface de l'électrode : le mélange (Cota:PEGDGE) doit sécher complètement sur la surface de carbone. La présence de glycérol dans les échantillons de CotA conservés à -80°C a, dans un premier temps, rendu le procédé inefficace en empêchant l'évaporation complète du tampon de réticulation. A partir du moment où les enzymes destinées à la fonctionnalisation de surface ont été conservées sans glycérol, la méthode d'immobilisation de CotA s'est avérée efficace. Ces constatations rejoignent des résultats obtenus récemment démontrant que la réaction de réticulation était plus efficace à l'état solide (*Lehr et al. 2010*).

La quantité de CotA déposée à la surface de l'électrode est également importante à considérer. Les dépôts respectifs de $3,1\cdot 10^{-2} \text{ U}$ ($12 \mu\text{g}$), $1\cdot 10^{-2} \text{ U}$ ($4 \mu\text{g}$) et $3,5\cdot 10^{-3} \text{ U}$ ($1,35 \mu\text{g}$) fournissent des réponses catalytiques similaires. Lorsque l'enzyme est en excès et sature la surface, l'excès n'est pas immobilisée dans le réseau réticulé et est rapidement désorbée en solution.

4.2.2.4 Reproductibilité de la méthode de fonctionnalisation

Afin de permettre une analyse fiable de la réponse electrocatalytique de CotA et de différents variants optimisés, la technique d'immobilisation de l'enzyme doit impérativement être reproductible. La reproductibilité de la technique a été contrôlée en étudiant deux lots de trois électrodes de carbone vitreux fonctionnalisées avec CotA. Les trois électrodes de chaque lot ont été fonctionnalisées et caractérisées le même jour en utilisant des solutions réactionnelles identiques. Les deux lots ont été étudiés à deux semaines d'intervalle par voltammétrie cyclique (Figure 47).

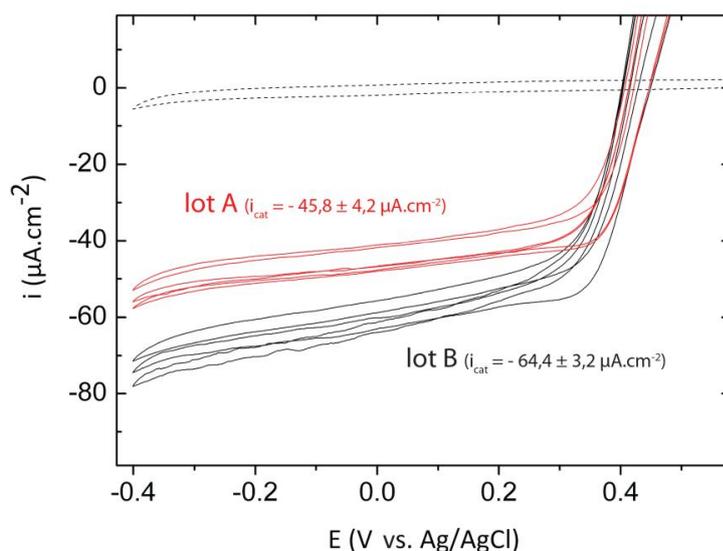


Figure 47 *Reproductibilité de la technique d'immobilisation*: cyclovoltammogrammes de deux lots de trois électrodes de carbone vitreux fonctionnalisées avec CotA ($1,35 \mu\text{g}$; $3,5\cdot 10^{-3} \text{ U}$) dans du tampon acétate (50 mM ; $\text{pH}4.5$) saturé en O_2 contenant 100 mM de NaClO_4 et 2 mM d'ABTS à 20°C . Scans de $+0,8$ à $-0,4 \text{ V}$ à $10 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ (cinquième scan représenté). Lot A (rouge). Lot B (noir). L'électrolyte est le même pour les trois électrodes d'un lot

On observe une bonne reproductibilité pour un même lot d'électrodes modifiées le même jour (lot A : $i_{\text{cat}} = -45,8 \pm 4,2 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ / lot B : $i_{\text{cat}} = -64,4 \pm 3,2 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$). Les densités de courants de réduction atteintes diffèrent par contre d'un lot à l'autre (les conditions de fonctionnalisation et d'analyse pouvant légèrement varier d'une semaine à l'autre). Ces variations ne sont toutefois pas importantes dans notre cas : seule la reproductibilité au sein d'un même lot est primordiale pour la caractérisation et surtout la comparaison de l'activité électrocatalytique de deux laccases entre elles.

4.2.2.5 Etude de stabilité des biocathodes CotA

Typiquement, deux types de stabilité des bioélectrodes dans le temps habituellement considérés : la stabilité en opération ponctuelle (en stockant de manière adéquate l'électrode entre plusieurs utilisations) et la stabilité de l'électrode en opération continue. Bien que la stabilité en opération continue soit la plus fondamentale, la stabilité en opération ponctuelle apporte également de premières informations intéressantes quant à la stabilité du biofilm à la surface de l'électrode.

Une électrode fonctionnalisée avec CotA a ainsi été étudiée sur une durée de 50 jours en la conservant entre chaque mesure à 4°C dans du tampon acétate (50 mM ; pH4.5) (Figure 48a). L'activité électrocatalytique de la biocathode chute classiquement pendant la première semaine puis reste stable à environ 35 % de sa valeur initiale pendant au moins 50 jours. La chute considérable de l'activité pendant les premiers jours peut s'expliquer par la désorption rapide d'une partie des macromolécules de CotA, celles simplement piégées au sein du réseau réticulé. L'autre partie minoritaire des macromolécules de CotA, liées de manière covalente à la surface de l'électrode, est sûrement responsable de l'activité conservée après 50 jours.

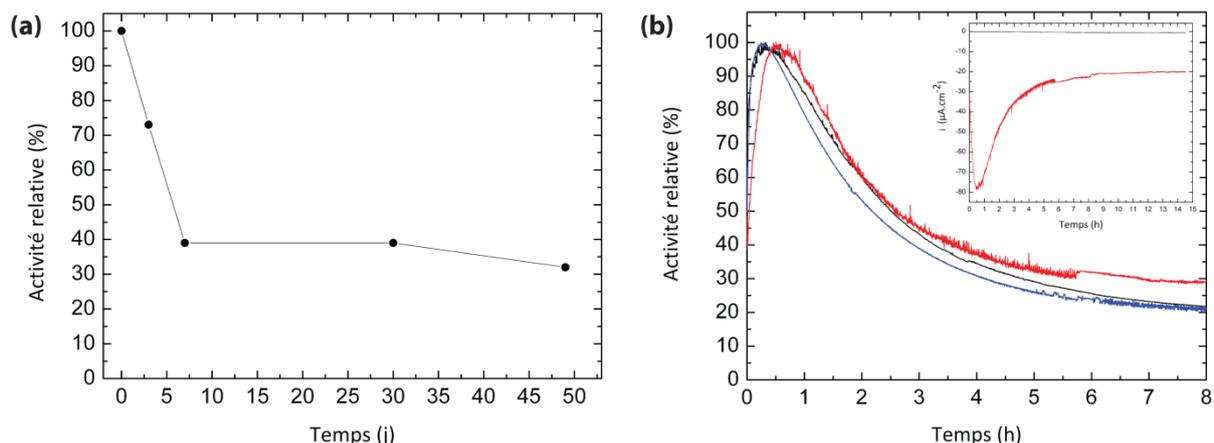


Figure 48 *Stabilité des biocathodes*: **(a) Stabilité en opération ponctuelle** : la biocathode est conservée à 4°C dans du tampon acétate (50 mM ; pH4.5) entre chaque mesure. L'activité catalytique est mesurée dans du tampon acétate (50 mM ; pH4.5) saturé en O_2 contenant 100 mM de NaClO_4 et 2 mM d'ABTS à 20°C. Le courant de réduction est extrait du cyclovoltammogramme ($10 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$) à $E = 0,2 \text{ V}$ vs Ag/AgCl et comparé au courant à t_0 . **(b) Stabilité en opération continue** : chronoampérogrammes de biocathodes (réticulation 15 h (noir), 39 h (bleu) et 48 h (rouge)) dans du tampon acétate (50 mM ; pH4.5) saturé en O_2 contenant 100 mM de NaClO_4 et 2 mM d'ABTS à 20°C. $E_{\text{fixe}} = 100 \text{ mV}$ vs Ag/AgCl. L'activité relative est définie à partir du courant de réduction maximal. Exemple en Insert : courant catalytique sur 15 h d'une biocathode (réticulation 48 h) et d'une électrode de contrôle de carbone vitreux nu (noir).

La stabilité en opération continue d'électrodes fonctionnalisées avec CotA a également été étudiée en considérant l'influence du temps de réticulation du mélange (CotA:PEGDGE) sur la surface de carbone vitreux (Figure 48b). Trois électrodes correspondant à trois temps de réticulation différents (15, 39 et 48 h) ont été évaluées. Aucune influence notable du temps de réticulation sur la stabilité des biocathodes n'a été constatée, ce qui corrobore globalement de récents travaux montrant que des temps de réticulation compris entre 20 et 72 h ont la même incidence sur stabilité de l'électrode (*Lehr et al. 2010*). Les trois biocathodes présentent une décroissance régulière de leur activité électrocatalytique jusqu'à conserver entre 20 et 30 % de leur activité initiale après 8 h de fonctionnement continu. La densité de courant catalytique demeure ensuite stable pendant au moins 15 h d'opération continue tandis qu'une électrode de contrôle (carbone vitreux nu) ne présente logiquement aucune activité (Figure 48b insert).

Ces relativement bonnes stabilités des biocathodes sont à mettre au crédit de la pré-fonctionnalisation de la surface de carbone vitreux avec des anilines et sont à mettre en adéquation avec les résultats de travaux discutant de l'importance de cette pré-fonctionnalisation sur la stabilité des électrodes (*Boland et al. 2009*).

4.2.2.6 Effet de la température sur les performances des biocathodes CotA

Puisque CotA est une enzyme thermophile possédant une température optimale de fonctionnement de 75°C et une demi-vie d'inactivation de 2h à 80°C, il paraissait logique d'étudier son comportement vis-à-vis de la température une fois immobilisée à la surface d'une électrode (Figure 49). Une étude préliminaire à 20, 50 et 80°C a été effectuée (Figure 49a). La biocathode est environ 2,5 fois plus active à 50°C ($i_{\text{cat}} = -174 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$) qu'à 20°C ($i_{\text{cat}} = -72 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$). La densité de courant de réduction chute par contre à 80°C ($i_{\text{cat}} = 89 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$) pour être équivalente à celle à 20°C. La tendance a, par la suite, été confirmée par une étude plus précise (Figure 49b et c).

L'activité électrocatalytique maximale d'une électrode fonctionnalisée avec CotA est atteinte pour une température de 45-50°C. Au dessus de cette température, l'activité décroît de manière constante. Ce profil de température diffère de celui de l'enzyme en solution à partir de 45-50°C (Figure 49c). En dessous de cette température, le comportement de CotA immobilisée est similaire à celui de l'enzyme en solution (l'activité double entre 20 et 40°C). Au dessus de 45-50°C, l'activité de l'enzyme immobilisée chute tandis que celle de l'enzyme en solution augmente régulièrement pour atteindre son maximum à 75°C. Cette différence peut s'expliquer par une désorption partielle de la couche réticulée à la surface de l'électrode à plus hautes températures, ce qui se traduit par une perte d'activité significative que ne peut compenser l'augmentation de l'activité de la fraction d'enzyme toujours présente à la surface. Cette désorption a d'ailleurs été confirmée par des mesures qualitatives d'activité enzymatique dans le tampon de mesure. De plus, les propriétés de l'enzyme immobilisée peuvent également être différentes de celles de l'enzyme sous sa forme native. Enfin,

d'autres facteurs sont également à prendre en compte et peuvent avoir un impact important sur l'évolution du courant catalytique avec l'augmentation de la température. Par exemple, la solubilité de l'O₂ diminue avec la température ($x_{O_2} = 2,76 \cdot 10^{-5}$ à 15°C et $x_{O_2} = 1,5 \cdot 10^{-5}$ à 75°C ; *CRC Handbook of Chemistry and Physics*) tandis que le coefficient de diffusion de l'O₂ augmente. Ces deux phénomènes doivent partiellement se compenser pour maintenir des conditions saturantes en O₂ dans le tampon de mesure, d'autant plus que l'affinité des laccases pour l'O₂ est apparemment haut ($K_M = 10 \mu M$; *Kuznetsov et al. 2001*).

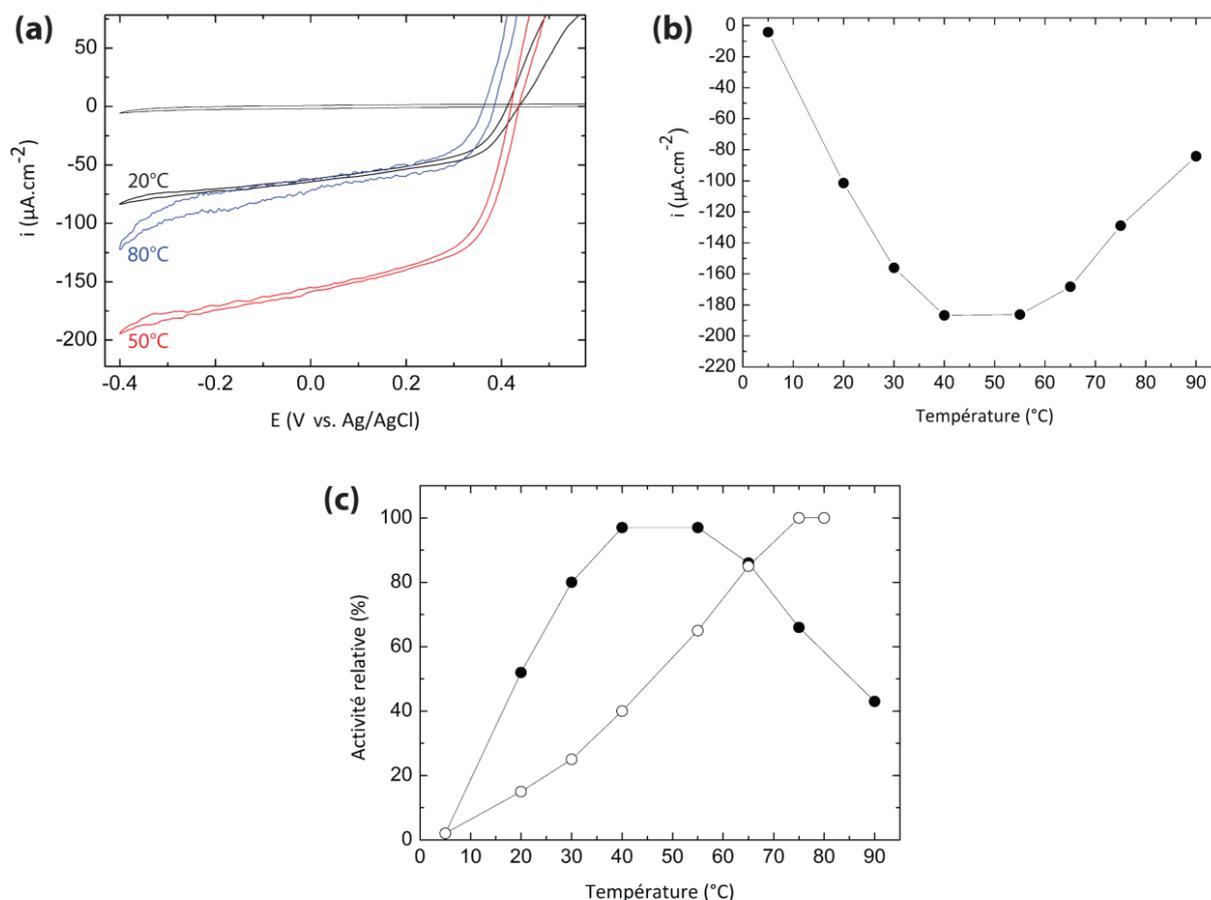


Figure 49 *Influence de la température: (a) Cyclovoltammogrammes d'une électrode de carbone vitreux fonctionnalisée avec CotA ($1,35 \mu g$; $3,5 \cdot 10^{-3} U$) dans du tampon acétate (50 mM ; pH4.5) contenant 100 mM de $NaClO_4$ (gris), 2 mM d'ABTS et O₂ à 20°C (noir), 50°C (rouge) et 80°C (bleu). Scans de +0,8 à -0,4 V à $10 mV \cdot s^{-1}$ (cinquième scan représenté). (b) Variation du courant catalytique d'une électrode fonctionnalisée avec CotA en fonction de la température. Les courants sont extraits des cyclovoltammogrammes correspondant à $E = -0,2$ V vs Ag/AgCl. (c) Comparaison de l'évolution de l'activité de CotA immobilisée sur une surface de carbone vitreux (noir) et de CotA en solution (blanc) en fonction de la température (les données en solution sont extraites de Martins et al. 2002)*

4.2.2.7 Comparaison CotA / TvLac

Une biocathode fonctionnalisée avec CotA a été comparées avec une biocathodes fonctionnalisée avec une quantité équivalente de TvLac. L'activité électrocatalytique des électrodes a été évaluée dans les mêmes conditions à pH4.5 et pH5.5 (Figure 50). On constate dans les deux cas une diminution de l'activité avec l'augmentation du pH : de $i_{cat} = -35 \mu A \cdot cm^{-2}$ (pH4.5) à $i_{cat} = -22 \mu A \cdot cm^{-2}$

(pH5.5) pour CotA et de $i_{\text{cat}} = -5 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ (pH4.5) à $i_{\text{cat}} = -3 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ (pH5.5) pour TvLac, soit 40 % de perte d'activité dans les deux cas. Ce comportement est en accord avec la dépendance des activités des deux laccases vis-à-vis du pH : les deux enzymes ont un pH optimal de fonctionnement de pH3 - pH4.5, leur activité diminuant plus le pH augmente selon un profil similaire. On remarque qu'au pH optimal de fonctionnement des deux enzymes, l'électrode fonctionnalisée avec CotA génère environ 7 fois plus de courant catalytique bien que la même masse de laccase ait été déposée à la surface de l'électrode. Il est à noter que même si TvLac possède une efficacité catalytique plus faible que CotA ($9,1\cdot 10^{-3}$ contre $5,4\cdot 10^{-2} \mu\text{M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$), le faible courant obtenu avec TvLac pourrait être également dû à l'immobilisation d'autres protéines à la surface de l'électrode (la laccase commerciale n'étant pas pure).

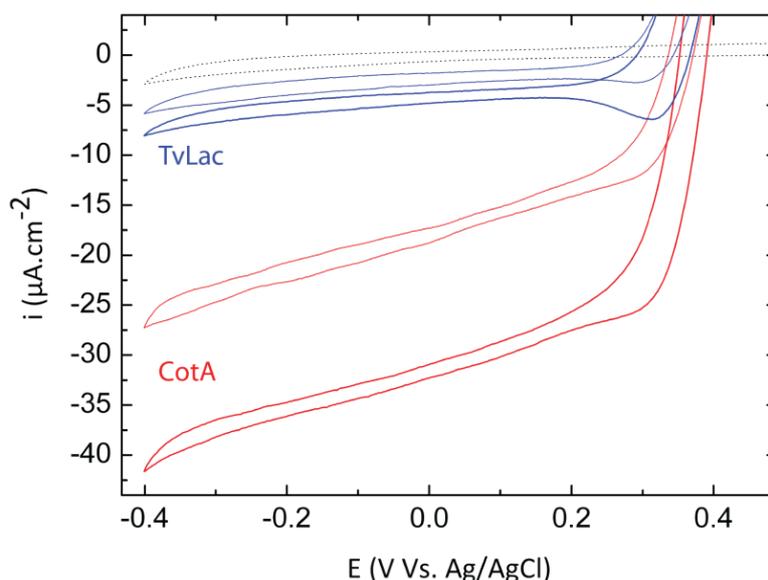
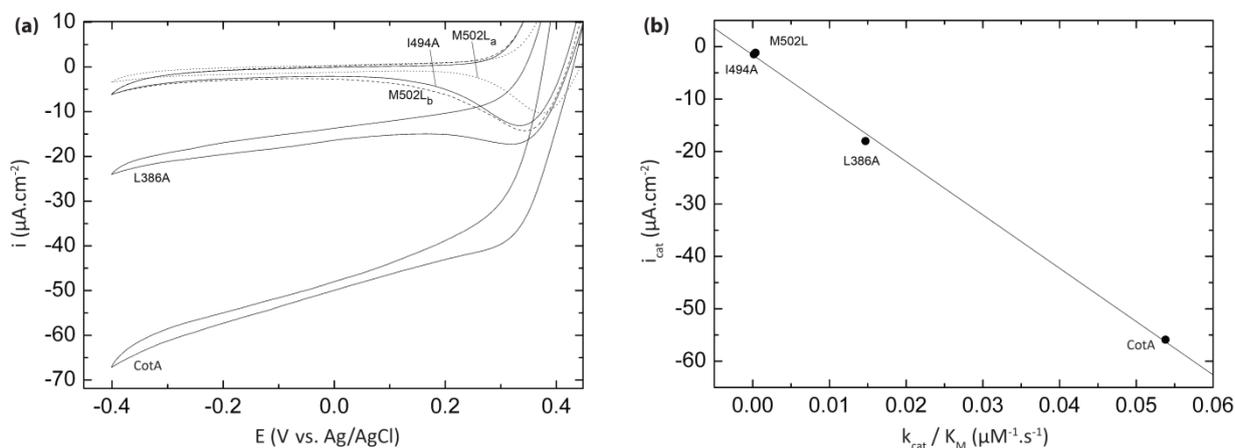


Figure 50 *Comparaison CotA / TvLac : Cyclovoltammogrammes d'électrodes de carbone vitreux fonctionnalisées avec CotA (1,35 μg ; $3,5\cdot 10^{-3}$ U) (rouge) ou TvLac (1,35 μg ; $2,9\cdot 10^{-2}$ U) (bleu) dans du tampon acétate (50 mM ; pH4.5) (gras) ou (50 mM ; pH5.5) (fin) saturé en O_2 contenant 100 mM de NaClO_4 et 2mM d'ABTS à 20°C. Scans de +0,8 à -0,4 V à $10 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ (cinquième scan représenté)*

4.2.2.8 Immobilisation des mutants L368A, M502L, I494A et M502F

Les quatre mutants L386A, M502L, I494A et M502F ont été immobilisés avec les outils développés. Les activités catalytiques des électrodes modifiées ont été comparées à celle de la laccase sauvage CotA. L'intérêt est ici de démontrer que des enzymes ayant des activités cinétiques différentes présentent effectivement des activités électrocatalytiques différentes une fois immobilisées. Pour cela, toutes les biocathodes ont été fonctionnalisées et évaluées le même jour dans le même électrolyte à 20°C en absence et présence d'ABTS et d' O_2 . Chaque électrode a été réalisée en dupliquât : la Figure 51a présente les moyennes des deux cyclovoltammogrammes obtenus pour chaque laccase. Les densités de courants de catalyse i_{cat} extraites de ces cyclovoltammogrammes à $E = 0,2 \text{ V vs. Ag/AgCl}$ sont présentés dans la Figure 51c avec les paramètres cinétiques de chaque enzyme (voir 4.2.2.2).

Comme attendu, la densité de courant de réduction la plus importante a été obtenue avec CotA, l'enzyme la plus active. Les électrodes modifiées avec le mutant L386A présentent une densité de courant catalytique 3 fois plus faible que CotA, ce qui est comparable à la différence entre les ratios k_{cat}/K_M des deux enzymes et donc directement à la différence d'activité cinétique entre les deux enzymes. Les électrodes modifiées avec le mutant M502L, qui possède un K_M du même ordre de grandeur mais un k_{cat} bien plus faible que CotA et L386A, ne montrent que très peu d'activité catalytique. Il en est de même avec les électrodes fonctionnalisées avec I494A qui possède à l'inverse un k_{cat} du même ordre de grandeur que CotA et L386A mais un K_M bien plus élevé. Le mutant M502F possédant des paramètres k_{cat} et K_M similaires à M502L n'est pas présenté dans la figure 41 mais montre également une très faible densité de courant de réduction une fois immobilisé. La corrélation observée entre l'activité cinétique de chaque enzyme (k_{cat}/K_M) et le courant de réduction (i_{cat}) mesuré pour l'électrode correspondante est forte ($r^2 = 0,998$). (Figure 51b). De toute évidence, la stratégie visant à optimiser l'activité cinétique de l'enzyme afin d'augmenter les performances électrocatalytiques de la bioélectrode correspondante est censée. De plus, les outils électrochimiques développés permettent une évaluation fiable de laccases ayant des activités cinétiques différentes en tant que catalyseurs pour la réduction de l' O_2 en H_2O . Ces outils pourront donc être appliqués à l'étude de variants de CotA optimisés par évolution dirigée des protéines.



(c)	CotA	L386A	M502L	I494A	M502F
k_{cat} (s^{-1})	$2,82 \pm 0,12$	$1,5 \pm 0,37$	$5,81 \cdot 10^{-2} \pm 6 \cdot 10^{-3}$	$0,63 \pm 0,04$	$4 \cdot 10^{-2} \pm 0,23 \cdot 10^{-2}$
K_M (μM)	$52,4 \pm 15$	102 ± 21	158 ± 20	3650 ± 50	$76,8 \pm 18,5$
k_{cat}/K_M ($\mu M^{-1} \cdot s^{-1}$)	$5,4 \cdot 10^{-2}$	$1,47 \cdot 10^{-2}$	$3,68 \cdot 10^{-4}$	$1,72 \cdot 10^{-4}$	$1,03 \cdot 10^{-4}$
i_{cat} ($\mu A \cdot cm^{-2}$)	$-55,9 \pm 5,21$	$-18 \pm 0,76$	$-1,16 \pm 0,268$	$-1,48 \pm 0$	$-0,204 \pm 0$

Figure 51 Immobilisation des mutants L386A, M502L, I494A et M502F : (a) Cyclovoltammogrammes d'électrodes de carbone vitreux fonctionnalisées ($1,35 \mu g$ de laccase) dans du tampon acétate (50 mM ; $pH 4.5$) contenant 100 mM de $NaClO_4$ et 2 mM d'ABTS en condition anaérobie (M502L_a) et aérobie (M502L, I494A, L386A et CotA) à $20^\circ C$. Scans de $+0,8$ à $-0,4 \text{ V}$ à $10 \text{ mV} \cdot s^{-1}$ (cinquième scan représenté). (b) Corrélation entre densité de courant catalytique i_{cat} et propriétés cinétiques (k_{cat}/K_M). (c) Paramètres cinétiques et densité de courants catalytiques de chaque laccase. Les densités de courant catalytiques i_{cat} sont extraites des cyclovoltammogramme à $E = +0,2 \text{ V vs. Ag/AgCl}$

4.3 Conclusion

Des outils électrochimiques fiables ont été mis en place pour l'étude de CotA en tant que biocatalyseur cathodique. CotA a été immobilisée pour la première fois à la surface d'une électrode de carbone vitreux et catalyse efficacement la réduction de l'O₂ en H₂O en présence du médiateur redox ABTS en solution. Les biocathodes délivrent 7 fois plus de courant catalytique que des biocathodes fonctionnalisées avec la laccase fongique TvLac. Les propriétés thermophiles de CotA confèrent à la biocathode une stabilité en opération continue intéressante (30 % d'activité résiduelle après 15 h d'opération) et une efficacité catalytique maximale à 45-50°C.

L'immobilisation de CotA et des mutants L386A, M502L, I494A et M502F a permis de démontrer une forte corrélation entre l'activité cinétique de chaque enzyme (k_{cat}/K_m) et le courant de réduction (i_{cat}) mesuré pour l'électrode correspondante. Ces résultats démontrent que les outils électrochimiques développés permettent une évaluation fiable de laccases ayant des activités cinétiques différentes et pourront être appliquées à l'étude de variants de CotA optimisés par évolution dirigée des protéines.

5 Etude électrochimique de la laccase CotA : cas d'un médiateur rédox immobilisé à la surface de l'électrode³

L'objectif était ici de compléter la toute première étude de CotA en tant que biocatalyseur de la réduction de l'O₂ en H₂O. En effet, les outils décrits dans la partie 4 permettent une évaluation fiable de l'activité électrocatalytique mais utilisent cependant un médiateur libre en solution. Ceci implique des problèmes de diffusion du médiateur vers le site actif de l'enzyme et la surface de l'électrode, ainsi que la nécessité de concevoir des biopiles fonctionnant dans deux compartiments séparés. Comme nous l'avons mentionné dans la partie 1.2.3, il est plus avantageux de ne pas utiliser de médiateur en solution, soit en exploitant le DET de l'enzyme (généralement insuffisant), soit en utilisant un médiateur immobilisé avec l'enzyme à la surface de l'électrode. Les médiateurs les plus fréquemment utilisés sont des polymères rédox à base de sels d'osmium dont le potentiel rédox peut être adapté au potentiel du site actif de l'enzyme considérée (voir 1.2.3.2).

Dans la plus part des cas, les complexes d'osmium sont incorporés dans des polymères rédox hydrosolubles de type (poly(vinylimidazole), poly(vinylpyridine) ou poly(allylamide)) (voir 1.2.3.2 et Figure 9). Ces polymères sont alors immobilisés avec l'enzyme par crosslinking ou électropolymérisation pour former un hydrogel rédox. Nous avons décidé dans ce doctorat de suivre une autre stratégie et d'utiliser des polymères à chaîne polyacrylate en exploitant les travaux réalisés depuis plusieurs années par le groupe du Prof. W. Schuhmann (Ruhr Universität ; Allemagne).

Ces chercheurs ont développé depuis plus de 5 ans un procédé de synthèse combinatoire donnant accès à des banques de polymères rédox de type polyacrylate à base de sels d'osmium ayant des caractéristiques différentes (Ngounou *et al.* 2004 et 2007 ; Guschin *et al.* 2009). Les propriétés des ces polymères peuvent en effet être adaptées en fonction des monomères et des ligands utilisés (Figure 52). L'hydrophilicité et la solubilité du polymère peuvent être modifiées en faisant varier les monomères. Des amorces de réticulation secondaire peuvent également être introduits. Le potentiel rédox du polymère peut, quant à lui, être modifié et même prédit en fonction des ligands utilisés pour la coordination de l'atome d'osmium (Guschin *et al.* 2010). Un polymère rédox cathodique de potentiel rédox $E^0 = 720$ mV vs. SHE a ainsi été récemment co-immobilisé avec succès avec la laccase fongique ThLac de *Trametes hirsuta* ($E^0 = 780$ mV vs. SHE) pour catalyser efficacement la réduction de l'O₂ en H₂O (Ackermann *et al.* 2010).

Les travaux présentés dans cette partie sont le fruit d'une collaboration avec le Prof. Schuhmann et ont été réalisés au cours d'un séjour dans le laboratoire "Analytische Chemie – Elektroanalytik & Sensorik" à l'Université de la Ruhr. Dans un premier temps, la capacité de CotA à communiquer via un DET avec une électrode de graphite a été démontrée et le potentiel rédox du site T₁ de la laccase a pu être évalué. Dans un second temps, plusieurs polymères rédox ont été testés en association à

³ Ces travaux ont été publiés : Beneyton *et al.* 2011 "The thermophilic CotA laccase from *Bacillus subtilis*: bioelectrocatalytic evaluation of O₂ reduction in the direct and mediated regime". *Electroanalysis* 23 (8), 1781-1789 (ANNEXES)

CotA pour la réduction catalytique de l'O₂ en H₂O. Deux polymères se sont avérés communiquer efficacement avec le site actif de CotA. Les biocathodes ainsi développées ont été évaluées en fonction de la température et du pH. L'intégration de CotA au sein de ces polymères rédox confère aux biocathodes une résistance à l'inhibition des ions chlorures.

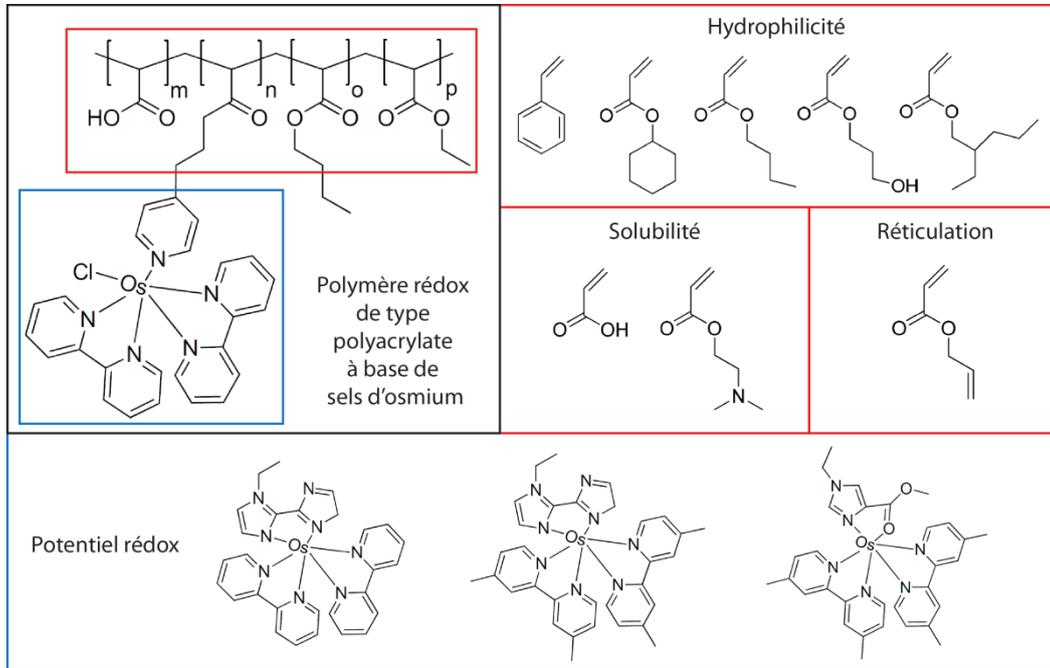


Figure 52 Exemples de structures de polymère rédox à chaîne polyacrylate à base de sels d'osmium : l'utilisation de différents monomères permet de moduler l'hydrophilicité, la solubilité et le taux de réticulation du polymère. L'utilisation de différents complexes d'osmium permet de moduler le potentiel rédox du polymère

5.1 Matériel et méthodes

5.1.1 Réactifs

Le 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) a été acheté chez Sigma-Aldrich. L'acide citrique et NaF ont été achetés chez J.T.Baker. KCl a été acheté chez VWR International. CotA a été exprimée, extraite et purifiée selon le protocole décrit en 4.1.3. Les complexes d'osmium ont été synthétisés selon les protocoles décrits dans *Habemüller et al. 2000b* et *Ackermann et al. 2010*. Les polymères rédox à base de sels d'osmium ont été synthétisés et caractérisés selon les protocoles décrits dans *Ackermann et al. 2010* et *Guschin et al. 2010*.

5.1.2 Electrochimie

Des tiges de graphite spectroscopique (type RW001, Ø3,05mm, Ringsdorff Werke) scellées dans des tubes de verre avec de la colle époxy ont servi d'électrodes de travail pour l'évaluation du courant catalytique de CotA adsorbée. Avant utilisation, les électrodes ont été polies sur du papier Eméri de différents grains (P300, P1500) pendant 5 min, rincées à l'eau ultrapure puis placées au bain à ultrasons pendant 15 min.

Des tiges de carbone vitreux ($\varnothing 4$ mm, HTW) scellées dans des tubes de Teflon ont servi d'électrode de travail pour l'évaluation des polymères rédox en tant que médiateur de CotA. Avant utilisation, les électrodes ont été polies avec une poudre d'oxyde d'aluminium (Corundum, 800 nm, Naxos-Schmirgelwerk Carl Wester) suspendue dans l'eau sur une plaque de verre, rincées à l'eau ultrapure puis placées au bain à ultrasons pendant 15 min.

Toutes les mesures électrochimiques ont été effectuées dans un système classique à trois électrodes avec un fil de platine en spirales comme contre-électrode et une électrode de référence Ag|AgCl|KCl 3 M (Metrohm). Les mesures ont été effectuées avec un potentiostat CHI à huit entrées (CHI Instruments).

5.1.3 Fonctionnalisation d'électrodes de graphite avec CotA adsorbée

5 μ L d'une solution de CotA (0.35 mg/mL ; 2.6 U/mg) dans du tampon phosphate (50 mM ; pH7.5) ont été déposés à la surface d'électrodes de graphite propres et adsorbés pendant 3 h à température ambiante. Les électrodes ont été rincées avec du tampon phosphate/citrate (100 mM ; pH4) avant utilisation. Les électrodes ont été directement utilisées pour des mesures par cyclovoltammétrie et chronoampérométrie.

5.1.4 Fonctionnalisation d'électrodes de carbone vitreux avec CotA piégée dans polymère rédox.

2 μ L d'une solution de CotA (0.6 mg/mL ; 2.6 U/mg) dans du tampon phosphate (50 mM ; pH7.5) ont été mélangés avec 2 μ L d'une suspension de polymère rédox à base de sels d'osmium dans l'eau. 4 μ L de ce mélange ont été déposés à la surface d'électrodes de carbone vitreux propres. Après 30 min de séchage à température ambiante, les électrodes ont été immergées pendant 40 s dans du tampon phosphate/citrate (100 mM ; pH2.5) pour diminuer la solubilité du polymère par protonation puis dans du tampon phosphate/citrate (100 mM ; pH4) pendant 30 s avant utilisation. Les électrodes ont été directement utilisées pour des mesures par cyclovoltammétrie et chronoampérométrie.

5.1.5 Mesure du potentiel rédox des polymères à base de sels d'osmium

4 μ L d'une suspension de polymère rédox à base de sels d'osmium ont été déposés à la surface d'électrodes de carbone vitreux propres. Après 30 min de séchage à température ambiante, les électrodes ont été immergées pendant 40 s dans du tampon phosphate/citrate (100 mM ; pH2.5) pour diminuer la solubilité du polymère par protonation puis dans du tampon phosphate/citrate (100 mM ; pH4) pendant 30 s avant utilisation. Les électrodes ont été directement utilisées pour des mesures par voltammétrie à impulsion différentielle (DPV pour "Differential Pulse Voltammetry") et par cyclovoltammétrie (+0.8 V à -0.1 ou 0 V vs. Ag/AgCl à 5 mV.s⁻¹).

5.1.6 Evaluation de l'activité électrocatalytique des électrodes modifiées avec CotA

Les électrodes modifiées (voir 5.1.3 et 5.1.4) ont été étudiées par cyclovoltammétrie (+0.8 V à -0.1 ou 0 V vs. Ag/AgCl à $5 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$) dans une cellule électrochimique contenant 15 mL de tampon phosphate/citrate (100 mM ; pH4) saturé en argon ou en O_2 à température ambiante.

5.1.7 Dépendance vis-à-vis de la température

Les électrodes modifiées (voir 5.1.3 et 5.1.4) ont été étudiées par cyclovoltammétrie (+0.8 V à -0.1 V vs. Ag/AgCl à $5 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$) dans une cellule électrochimique thermostatée contenant 15 mL de tampon phosphate/citrate (100 mM ; pH4) saturé en argon ou en O_2 à des températures allant de 20 à 80°C.

5.1.8 Inhibition de l'activité électrocatalytique par les halogénures Cl^- et F^-

Les électrodes modifiées (voir 5.1.3 et 5.1.4) ont été analysées par chronoampérométrie ($E_{\text{fixe}} = 100 \text{ mV}$) dans 30 mL de tampon phosphate/citrate (100 mM ; pH4) saturé en argon à 40°C. Après un temps d'équilibre, de l' O_2 a été bullé dans le tampon. Différentes quantités de Cl^- puis de F^- ont ensuite été ajoutées au tampon.

5.2 Résultats et discussion

5.2.1 Mise en évidence du transfert d'électrons direct de CotA adsorbée sur une électrode de graphite

CotA a été adsorbée à la surface d'une électrode de graphite. La réduction electrocatalytique de l' O_2 via un DET a été mesurée par cyclovoltammétrie et chronoampérométrie à des températures allant de 20 à 60°C. La Figure 53a présente les cyclovoltammogrammes obtenus à 40°C en absence et en présence d' O_2 .

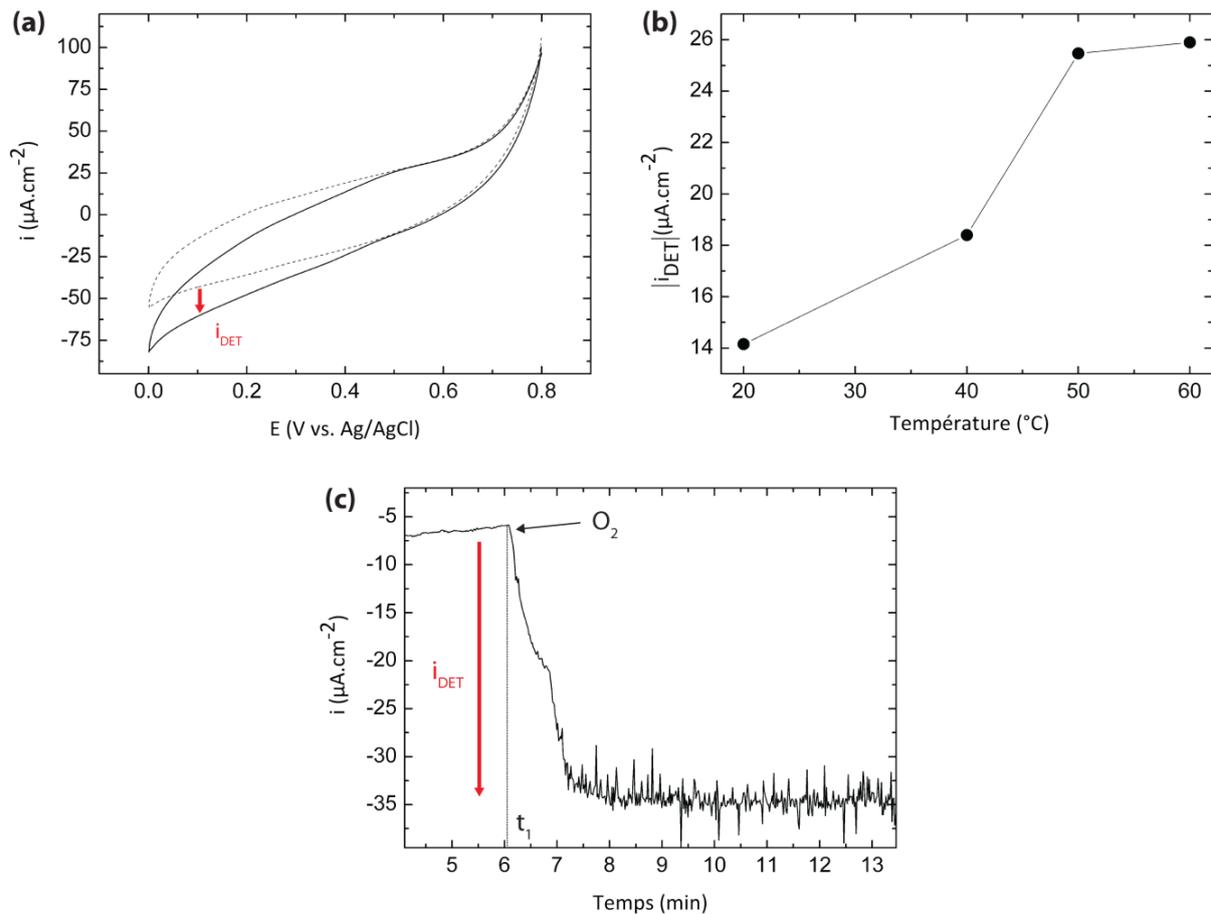


Figure 53 DET de CotA adsorbée à la surface d'une électrode de graphite: **(a)** Cyclovoltammogrammes de CotA adsorbée sur une électrode de graphite dans du tampon phosphate/citrate (100 mM ; pH4) à 40°C saturé en argon (trait pointillés) ou en O_2 (trait plein). Scans de +0,8 à 0 V vs. Ag/AgCl à $5 mV \cdot s^{-1}$ (second scan représenté). **(b)** Variation du DET en fonction de la température. Les densités de courants sont extraites des cyclovoltammogrammes correspondant à $E = 100 mV$ vs. Ag/AgCl. Des valeurs absolues sont présentées. **(c)** Chronoampérogramme de CotA adsorbée sur une électrode de graphite dans du tampon phosphate/citrate (100 mM ; pH4) à 40°C saturé en argon. O_2 est bullé dans la solution tampon au temps t_1 . $E_{fixe} = 100 mV$ vs. Ag/AgCl

En présence d' O_2 , une densité de courant de réduction significative i_{DET} apparaît indiquant que CotA, comme beaucoup d'autres laccases est capable de transférer directement des électrons de la surface de l'électrode vers son site actif. Le potentiel rédox du site T1 de CotA a ainsi pu être évalué à partir du cyclovoltammogramme obtenu comme valant $E_{CotA}^0 = 460 mV$ vs. Ag/AgCl soit 670 mV vs. SHE. Cette valeur est supérieure de 140 à 200 mV aux potentiels précédemment reportés dans la

littérature et déterminés par titration rédox par spectroscopie à pH7.5 (455 ou 525 mV vs. SHE ; *Durao et al. 2006 et 2008*). Une différence de potentiel peut s'expliquer par des différences de tampon, de pH et de température entre les différentes mesures. Cette différence significative semble cependant indiquer que le potentiel rédox de CotA pourrait être plus élevé que prévu. Ce résultat va dans le sens des résultats obtenus dans la partie 4 qui démontrent qu'une fois immobilisée, CotA se comporte de manière identique à TvLac, laccase fongique à haut potentiel (780 mV vs. Ag/AgCl), en présence d'ABTS en solution. CotA serait par conséquent l'une des premières laccases d'origine bactérienne à posséder un potentiel rédox proche de 700 mV vs. SHE. Ce résultat remet en question les valeurs déterminées par titration rédox par spectroscopie données dans la littérature et demande cependant à être confirmé par de plus amples études électrochimiques.

Le DET a également été caractérisé par chronoampérométrie (Figure 53c). L'étude de CotA adsorbée sur une électrode de graphite polarisée à $E_{\text{fixe}} = 100$ mV vs. Ag/AgCl a montré qu'un courant catalytique significatif apparaît après bullage d' O_2 dans la solution tampon, ce qui correspond à la réduction de l' O_2 en H_2O par la laccase via un DET. D'autres mesures chronoampérométriques ont montrés que cette densité de courant de réduction liée au DET est stable et correspond à environ 10% de la densité de courant catalytique obtenue par MET en présence d'ABTS en solution (Figure 56). Comme prévu, une électrode de graphite nue ne présente aucun courant catalytique de réduction dans les mêmes conditions (données non présentées).

La variation de ce DET en fonction de la température a été étudiée de 20 à 60°C (Figure 53b). Les densités de courant catalytique ont été extraites des cyclovoltammogrammes correspondant à $E = 100$ mV vs. Ag/AgCl. On constate que l'efficacité du DET augmente avec la température pour atteindre son maximum à environ 60°C. Le profil est encore une fois similaire à celui de l'évolution de l'activité de CotA en solution en fonction de la température.

5.2.2 Evaluation de polymères rédox à base de sels d'osmium en tant que médiateur rédox de CotA

Plusieurs polymères rédox à base de sel d'osmium ont été testés comme médiateur immobilisé avec CotA à la surface d'une électrode de carbone vitreux. Ces différents polymères à chaîne de type polyacrylate ont été synthétisés par Dimitrii Guschin au laboratoire "Analytische Chemie – Elektroanalytik & Sensorik". Le potentiel rédox de chacun des polymères a été déterminés et varie suivant la composition de la chaîne polyacrylate et la structure du complexe d'osmium utilisé. La composition des différents polymères testés et leur potentiel rédox respectif sont présentés dans le tableau de la Figure 54 et l'Annexe 2. Les groupements acides carboxyliques de la chaîne polymérique entraînent une forte variation de la solubilité du polymère en fonction du pH. La laccase CotA a ainsi été piégée au sein de chaque polymère rédox par modulation du pH à proximité de la surface de l'électrode : le polymère précipite et conduit à la formation d'un film à la surface de

l'électrode. Les biocathodes ont été évaluées pour la réduction de l' O_2 en H_2O : les densités de courant catalytique i_{cat} obtenues sont présentées dans le tableau de la Figure 54. Les densités de courant catalytique ont été extraites à 100 mV vs. Ag/AgCl des cyclovoltammogrammes en présence d'argon et d'oxygène ($i_{cat} = i_{O_2} - i_{Ar}$) comme présenté en Figure 54a et b. Dans un premier temps, des polymères à faible potentiel rédox (170-220 mV vs. Ag/AgCl) ont été testés sans résultats. Des polymères à plus haut potentiels ont alors été évalués (310-500 mV vs. Ag/AgCl). Les combinaisons avec les polymères G622 et G698 ont généré une réponse catalytique significative tandis que tous les autres polymères ne communiquent pas ou très faiblement avec la laccase CotA. Le fait que la laccase CotA communique seulement avec des polymères à potentiels compris entre 300 et 500 mV vs. Ag/AgCl est en bon accord avec le potentiel du site T_1 de CotA mesuré dans la partie 5.2.1 ($E^0_{CotA} = 460$ mV vs. Ag/AgCl).

Polymère	Composition	E^0 (mV)	i_{cat} ($\mu A.cm^{-2}$)
G373	DMAEA 25%/BA 60%/AcacA 15%/Os(BiPy) ₂	195	-0,18
G405	AA 22%/BA 71%/ImPyEA 7%/Os(BiPy) ₂ 10%	490	0
G429	AGEim 13%/MAA 37%/BA 37%/HOEMA 13%/Os(BiPy) ₂	160	-1,45
G620	PyPMA 8%/BA 63%/MMA 29%/EA 0%/Os(BiPy) ₂ Cl 3%	220	-0,16
G621	PyPMA 8%/BA 45%/MMA 29%/EA 18%/Os(BiPy) ₂ Cl 3%	220	-0,51
G622	PyPMA 8%/BA 27%/MMA 29%/EA 36%/Os(BiPy) ₂ Cl 3%	310	-39,5
G697	AA 30%/BA 44%/St 18%/ImPyEA 8%/Os(BiPy) ₂ 14%	500	-2,58
G698	MAA 28%/BA 64%/ImPyEA 8%/Os(BiPy) ₂ 15%	500	-14,7
G809	AA 28%/BA 40%/EA 20%/ImEMA 12%/Os(BiPy) ₂	150	-2,38
G810	AA 28%/ BA 26%/ EA 34%/ImEMA 12%/Os(BiPy) ₂	175	-1,1

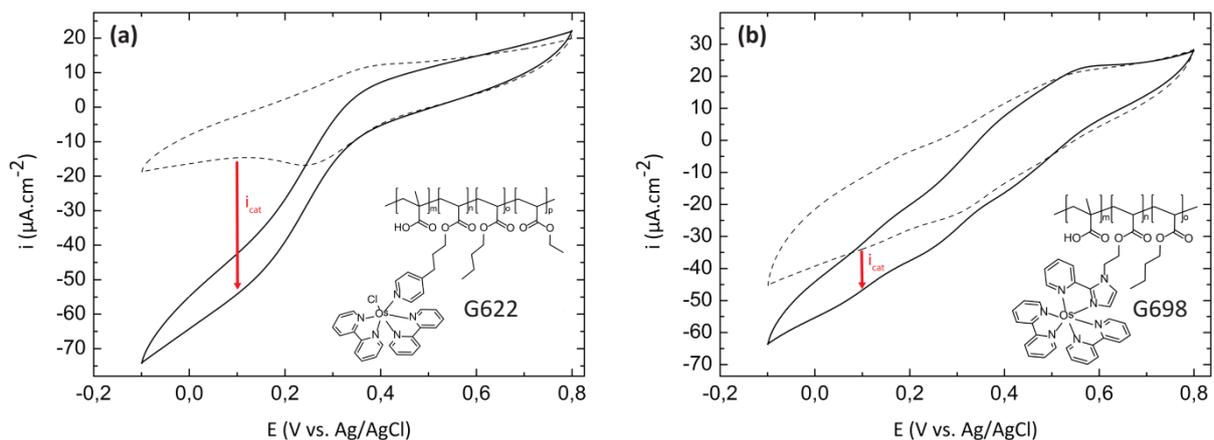


Figure 54 *Incorporation de CotA au sein de polymères rédox à base de sel d'osmium* : Tableau présentant les noms, compositions (voir Annexe 2 pour les structures détaillées) et potentiels rédox des polymères testés ainsi que la réponse catalytique des biocathodes CotA/polymère respectives. Potentiels vs. Ag/AgCl. Potentiels et courant catalytiques mesurés à 20°C. **(a)** Cyclovoltammogrammes d'une biocathode CotA/G622 dans du tampon phosphate/citrate (100 mM ; pH4) à 20°C saturé en argon (trait pointillés) ou en O_2 (trait plein). Scans de +0,8 à -0,1 V vs. Ag/AgCl à $5 mV.s^{-1}$ (second scan représenté). **(b)** Cyclovoltammogrammes d'une biocathode CotA/G698 dans du tampon phosphate/citrate (100 mM ; pH4) à 20°C saturé en argon (trait pointillés) ou en O_2 (trait plein). Scans de +0,8 à -0,1 V vs. Ag/AgCl à $5 mV.s^{-1}$ (second scan représenté).

Les cyclovoltammogrammes obtenus avec les biocathodes CotA/G622 et CotA/G698 ainsi que la structure détaillée des deux polymères sont présentés en Figure 54a et b. En absence d'oxygène, seuls les pics rédox de conversion du couple $Os^{2+/3+}$ sont visibles. En présence d'oxygène, un pic de réduction catalytique apparaît au potentiel rédox du polymère (310 mV pour CotA/G622 et 500 mV vs. Ag/AgCl pour CotA/G698). Les densités de courant catalytique obtenues, $-39,5 \mu A.cm^{-2}$ pour CotA/G622 et $-14,7 \mu A.cm^{-2}$ pour CotA/G698, correspondent à la réduction catalytique de l' O_2 par CotA. Cette différence de courant peut s'expliquer par la différence entre les potentiels rédox des polymères vis-à-vis du potentiel formel du site T_1 de CotA, résultant en différentes forces motrices pour le transfert d'électron entre le site T_1 de l'enzyme et les centres osmium du polymère. Visiblement, l'enzyme n'est pas dénaturée au sein des polymères G622 et G698 ainsi que durant le processus de déposition du film à pH2.5. Comme attendu, les électrodes de contrôle (polymère seul, CotA seule ou électrode nue) n'ont généré aucune réponse catalytique.

Ces biocathodes s'avèrent moins efficaces que les biocathodes fonctionnant avec le médiateur ABTS en solution mises au point dans la partie 4. Ces biocathodes présentent néanmoins l'avantage de fonctionner avec tout le matériel nécessaire immobilisé à la surface de l'électrode et sont potentiellement applicables dans une biopile à compartiment unique : la synthèse d'un polymère à potentiel anodique et le développement d'une bioanode similaire permettrait en effet d'associer bioanode et biocathode au sein d'un même compartiment. L'influence de la température sur l'efficacité de ces biocathodes a ensuite été étudiée.

5.2.3 Influence de la température et du pH sur les performances des biocathodes CotA/G622 et CotA/G698

L'activité catalytique des électrodes fonctionnalisées avec CotA/G622 et CotA/G698 a été étudiée à différentes températures (20, 30, 40, 50, 60, 70 et 80°C). Les densités de courant de réduction extraites des cyclovoltammogrammes correspondant à $E = 100 \text{ mV vs. Ag/AgCl}$ sont présentés en Figure 55a. Dans les deux cas, l'activité electrocatalytique augmente comme attendu avec l'augmentation de la température (les cyclovoltammogrammes des biocathodes CotA/G622 et CotA/G698 à leur température d'efficacité maximale respective sont présentés en Figure 55a₁ et a₂). Il est cependant très intéressant de noter que les profils obtenus sont différents en fonction des propriétés du polymère rédox utilisé. Les ronds blancs dans la Figure 55a correspondent à l'électrode CotA/G698. On remarque que le profil est sensiblement similaire au comportement de CotA vis-à-vis de la température en solution. La densité de courant catalytique augmente de manière continue pour atteindre un maximum à 70°C ($i_{cat} = -96 \mu A.cm^{-2}$) avec une augmentation d'environ 2,5 fois par rapport à 20°C ($i_{cat} = -40 \mu A.cm^{-2}$). La densité de courant reste ensuite stable jusqu'à 80°C. Apparemment, CotA n'est pas dénaturée en combinaison avec le polymère rédox G698 et son

activité catalytique native ne semble pas modifiée. Le profil de température est d'ailleurs très proche de celui de CotA en solution (Figure 55b).

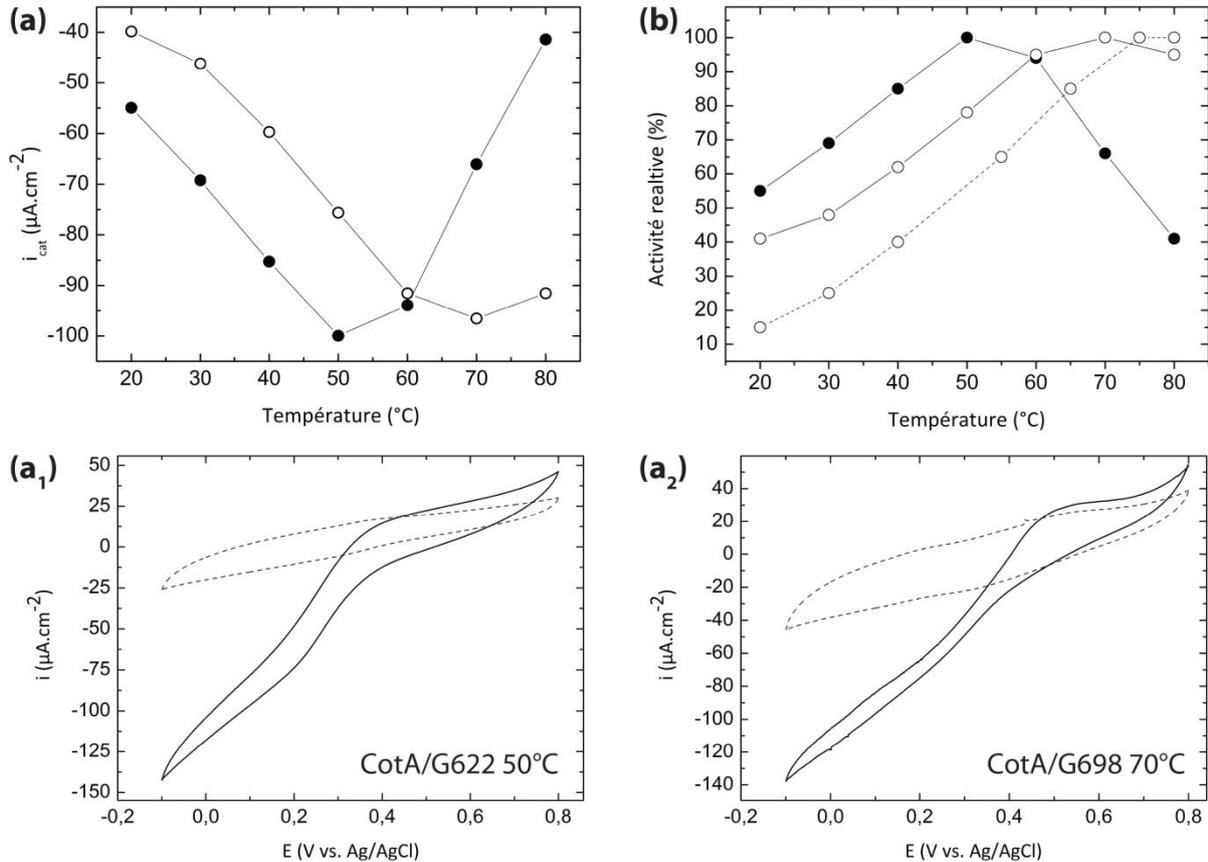


Figure 55 Influence de la température sur l'activité d'électrodes CotA/G622 et CotA/G698: **(a)** Variation de la densité de courant catalytique i_{cat} d'électrodes de carbone vitreux modifiée avec CotA/G622 (ronds noirs) et CotA/G698 (ronds blancs) en fonction de la température. Cyclovoltammogrammes d'une biocathodes CotA/G622 (**a1**) ou CotA/G698 (**a2**) dans du tampon phosphate/citrate (100 mM ; pH4) à 50°C (**a1**) ou 70°C (**a2**) saturé en argon (trait pointillés) ou en O_2 (trait plein). Scans de +0,8 à -0,1 V vs. Ag/AgCl à 5 $mV \cdot s^{-1}$ (second scan représenté). **(b)** Comparaison de l'évolution de l'activité de CotA immobilisée sur une surface de carbone vitreux avec G622 (ronds noirs) ou avec G698 (ronds blancs) et de CotA en solution (ronds blancs, traits pointillés) en fonction de la température (les données en solution sont extraites de Martins et al. 2002)

L'électrode CotA/G622 présente un profil différent (ronds noirs sur la Figure 55a et b). La densité de courant catalytique de réduction augmente régulièrement (en suivant le même profil que l'électrode CotA/G698) pour atteindre un maximum à 50°C ($i_{cat} = -100 \mu A \cdot cm^{-2}$), environ deux fois supérieures au courant à 20°C ($i_{cat} = -55 \mu A \cdot cm^{-2}$). Entre 60 et 80°C, la densité de courant catalytique diminue pour finalement être inférieure à celle à 20°C. Il semblerait qu'une augmentation de la température induise une modification structurale du complexe CotA/polymère G622 conduisant à une dénaturation de l'enzyme ou tout simplement du biofilm à la surface de l'électrode. Ces résultats ont été confortés par des mesures de potentiel zêta (données non présentées). Le potentiel zêta d'une dispersion CotA/G622 change brusquement entre 20 et 80°C pour passer de valeurs légèrement négatives (20-45°C) à des valeurs positives (45-80°C). Indiscutablement, la surface des particules CotA/G622 change brutalement ce qui peut conduire à une modification de l'interaction entre CotA et le polymère G622 à cause de changements structuraux imposés. A l'inverse, le potentiel zêta

d'une dispersion de CotA/G698 ne varie pas avec la température et reste négatif. Ces résultats complémentaires sont en adéquation avec les résultats présentés en Figure 55.

L'évolution de l'activité catalytique des électrodes fonctionnalisées avec CotA/G622 et CotA/G698 en fonction du pH (3 – 6.5) a été étudiée par cyclovoltammétrie. Dans les deux cas, la tendance est comparable au comportement de CotA en solution vis-à-vis de l'ABTS (*Durao et al. 2008*) : les activités maximales sont obtenues pour des pH compris entre 3 et 4.5 puis l'activité décroît au fur et à mesure que le pH augmente. Ces profils de pH coïncident typiquement avec les profils de pH des laccases fongiques lors de l'oxydation de substrat donneur d'électrons (et non de protons) comme l'ABTS (*Shleev et al. 2005b*). Ceci confirme que le polymère rédox agit bien comme un donneur d'électrons tandis que les protons nécessaires à la réduction de l'O₂ sont pris dans la solution tampon.

5.2.4 Inhibition de l'activité des biocathodes CotA/G622 et CotA/G698 par les ions chlorures et fluorures.

La plupart des laccases de différentes origines et plus particulièrement les laccases fongiques à haut potentiel sont inhibées par la présence d'halogénures (*Naki et al. 1980 ; Spira-Solomon et al. 1986 ; Xu et al. 1998 et 2001*). Ces inhibitions limitent considérablement l'utilisation de ces enzymes pour la conception de biopiles implantables et fonctionnant dans des conditions physiologiques (*Barton et al. 2004 ; Heller 2004*). Puisque CotA possède des propriétés structurales très proches des laccases fongiques, nous avons décidé d'étudier l'inhibition de CotA immobilisée à la surface d'une électrode. Pour cela, l'influence des ions chlorures ou fluorures sur la catalyse de la réduction de l'O₂ par CotA a été étudiée sous trois régimes différents : sans médiateur (DET), avec médiateur en solution (ABTS) ou avec médiateur immobilisé (G622 ou G698) (MET).

Dans un premier temps, l'activité catalytique d'électrodes de graphite modifiées avec CotA adsorbée a été étudiée par chronoampérométrie (Figure 56). Après bullage d'O₂ dans la solution tampon, un courant de catalyse par DET apparaît. L'ajout d'un médiateur en solution (ABTS) augmente l'activité catalytique de l'électrode en créant un courant de catalyse par MET. Les ajouts successifs de 65 puis 200 mM de Cl⁻ inhibent totalement la catalyse par MET tandis que le courant de réduction lié à la catalyse par DET n'est pas affecté. Par contre, l'ajout de F⁻ (10 puis 35 mM) inhibe complètement la catalyse de la réduction de l'O₂ par DET. Ces résultats sont comparables à ceux obtenus lors de l'étude de la laccase ThLac de *Trametes hirsuta* immobilisée de manière covalente à la surface d'une électrode de graphite (*Vaz-Dominguer et al. 2008*) et mettent en évidence les différents modes d'inhibition des laccases fongiques par les halogénures proposés dans la littérature. Il est en effet admis que l'ion F⁻ se fixe au niveau du site cuivreux T₂-T₃ et bloque le transfert d'électron intramoléculaire depuis le site T₁ (*Xu et al. 2008*), ce qui explique dans notre cas le fait que les ions fluorures inhibent à la fois les catalyses par DET et par MET. Au contraire, l'ion Cl⁻, plus volumineux,

n'est pas capable de venir se fixer au niveau du site T_2 - T_3 , l'accès au site se faisant par deux étroits canaux à solvant. Il est également connu que Cl^- est un inhibiteur compétitif tandis que F^- est un inhibiteur non-compétitif des laccases vis-à-vis du substrat donneur d'électrons (*Naqui et al. 1980*). Il est ainsi probable que, à l'inverse de F^- , Cl^- se fixe au niveau du site cuivreux T_1 et bloque l'accès au substrat donneur d'électrons (le médiateur rédox dans notre cas). Ceci explique le fait que seule la catalyse par MET soit affectée par l'ajout d'ions chlorures alors que la catalyse par DET demeure intacte.

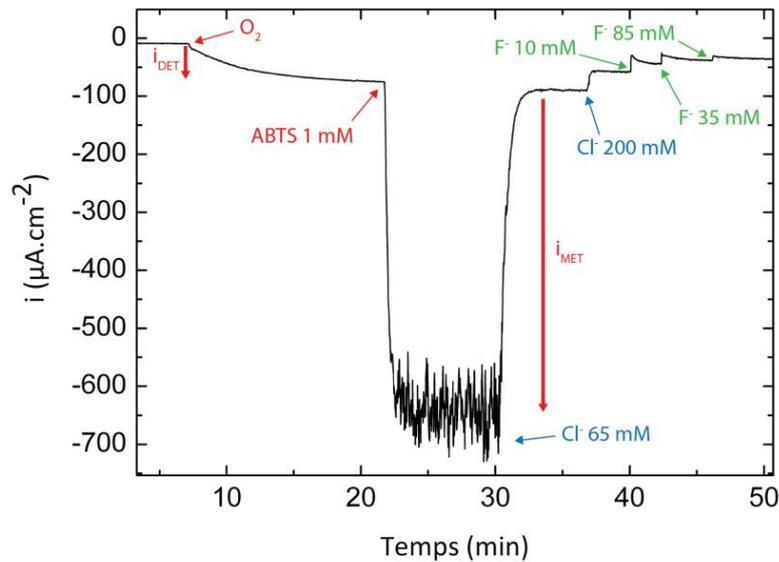


Figure 56 Inhibition de la catalyse DET et MET de CotA par les halogénures Cl^- et F^- : chronoampérogramme de CotA adsorbée sur une électrode de graphite dans du tampon phosphate/citrate (100 mM ; pH4) à 40°C saturé en argon. O_2 est bullé dans la solution tampon puis 1 mM d'ABTS est ajouté. Ajouts successifs de Cl^- (65 et 200 mM) puis de F^- (10, 35, 85 mM). $E_{fixe} = 100$ mV vs. Ag/AgCl

Ces différents modes d'inhibition de Cl^- et F^- ont été confortés par l'étude des électrodes modifiées avec CotA/G622 et CotA/G698. De la même manière, des mesures chronoampérométriques ont été effectuées dans du tampon phosphate/citrate (100 mM ; pH4) saturé en argon à 40°C (Figure 57a). Après bullage d' O_2 dans la solution tampon, un courant de catalyse par MET apparaît. On remarque ensuite avec l'ajout d'ions chlorures que les électrodes présentent une résistance à l'inhibition par les ions Cl^- , résistance différente en fonction du polymère utilisé. Dans le cas de l'électrode CotA/G622, les ajouts successifs de Cl^- (20, 40, 100, 250 et 500 mM) conduisent à une diminution continue du courant catalytique de réduction de l' O_2 . L'inhibition est cependant beaucoup moins importante que dans le cas d'une catalyse avec médiateur en solution (Figure 57b). Le site T_1 de CotA semble partiellement protégé par le polymère rédox et l'interaction entre les complexes d'osmium et le site T_1 empêche en partie la fixation de l'ion Cl^- . Cette résistance est accrue dans le cas de l'électrode CotA/G698 : les ajouts successifs de Cl^- n'affectent pas du tout l'électrocatalyse de la réduction d' O_2 . Ceci indique clairement que les complexes d'osmium du polymère rédox G698 sont étroitement liés au site cuivreux T_1 de CotA, bloquant ainsi l'accès aux ions Cl^- . Les variations observées dans la résistance aux chlorures entre les deux polymères rédox G622 et G698 sont

probablement dues à des différences dans la force des interactions entre les complexes d'osmium et le site T₁ de CotA. Le complexe d'osmium de G698 semble mieux s'incorporer à l'intérieur du site et bloque l'accès à d'autres ions encombrés comme Cl⁻. Le complexe d'osmium de G622 semble par contre être plus flexible et se présenter de manière périodique devant le site T₁: il peut manifestement être lentement remplacé par Cl⁻ au fur et à mesure de l'ajout d'ions chlorures dans la solution, expliquant alors la diminution de courant observée.

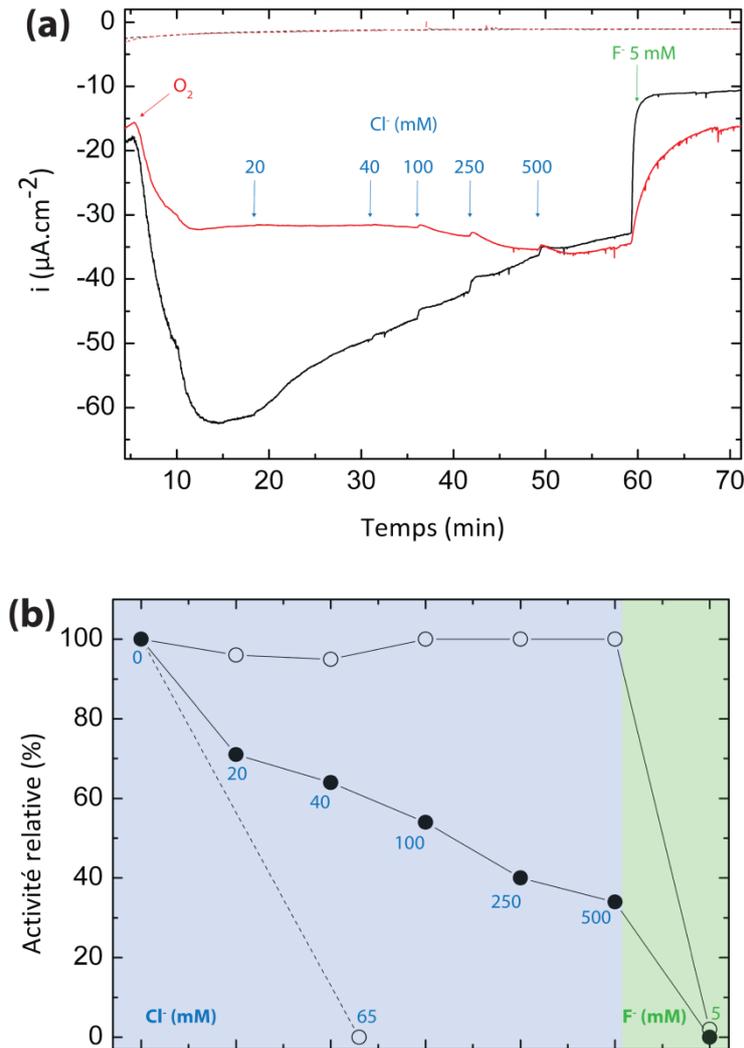


Figure 57 *Inhibition de la catalyse MET de CotA/G622 ou CotA/698 par les halogénures Cl⁻ et F⁻: (a) Chronoampérogrammes d'électrodes de carbone vitreux modifiées avec G622 (pointillés noirs), G698 (pointillés rouges), CotA/G622 (noir) et CotA/G698 (rouge) dans du tampon phosphate/citrate (100 mM ; pH4) à 40°C saturé en argon. O₂ est bullé dans la solution tampon. Ajouts successifs de Cl⁻ (20, 40, 100, 250 et 500 mM) puis de F⁻ (5 mM). E_{fixe} = 100 mV vs. Ag/AgCl. (b) Variation de l'activité des biocathodes en fonction de la présence des halogénures Cl⁻ et F⁻. Electrodes de carbone vitreux modifiées avec CotA/G622 (ronds noirs) et CotA/G698 (ronds blancs). Electrode de graphite avec CotA adsorbée en présence d'un médiateur en solution (1 mM ABTS) (blanc/pointillés)*

A l'inverse, l'ajout de 5 mM d'ions fluorures inhibe complètement l'activité catalytique des deux électrodes CotA/G622 et CotA/698 (Figure 57). Il s'agit d'une preuve évidente du mécanisme d'inhibition différent des ions fluorures, qui se fixent spécifiquement au site catalytique T₂-T₃ de CotA.

5.3 Conclusion

La capacité de CotA à catalyser la réduction de l'O₂ via un DET a été démontré pour la première fois. Il semblerait de plus que le potentiel rédox de son centre cuivreux T₁ soit plus élevé que prévu ($E^0_{cotA} \approx 670$ mV vs. SHE contre 455 - 525 mV attendu). Bien que d'origine bactérienne et même si son potentiel rédox reste encore inférieur, CotA semble ainsi posséder des caractéristiques proches de celles des laccases fongiques à haut potentiel ($E^0 \approx 780$ mV vs. SHE).

Parmi les dix polymères rédox à base de sels d'osmium testés, deux (G622 et G698) se sont avérés communiquer avec CotA pour catalyser efficacement la réduction de l'O₂ via un MET. L'activité de CotA au sein des hydrogels rédox réalisés ainsi que sa dépendance vis-à-vis de la température dépendent intimement des propriétés du polymère utilisé. Ces preuves de principe confirment la possibilité d'utiliser CotA pour développer des biocathodes efficaces utilisant un médiateur rédox co-immobilisé. L'optimisation d'un polymère à base de sels d'osmium adapté à CotA permettrait de développer des biocathodes pour des biopiles fonctionnant dans un compartiment unique.

Comme dans le cas des laccases fongiques à haut potentiel, la réduction de l'O₂ par CotA est inhibée par les halogénures Cl⁻ et F⁻. Tandis que les ions chlorures inhibent la catalyse liée au MET en se fixant au niveau du site T₁, les ions fluorures affectent à la fois MET et DET en bloquant le site T₂-T₃. Lorsque CotA est incorporé au sein des polymères G622 ou G698, le fait que les complexes d'osmium interagissent plus ou moins fortement avec le site T₁ de l'enzyme confère aux biocathodes une résistance à l'inhibition par les ions chlorures. L'activité électrocatalytique est toutefois complètement inhibée par les ions fluorures. Ces résultats soulignent de manière évidente les mécanismes différents d'inhibitions des ions Cl⁻ et F⁻. Cette résistance permet d'envisager l'emploi de CotA pour des biocathodes implantables dans des milieux riches en ions chlorures, comme par exemple le corps humain ([Cl⁻] ~ 100 mM).

Comparativement aux outils avec médiateur en solution développés en 4, cette technique avec médiateur immobilisé s'avère moins universelle puisqu'elle nécessite de disposer d'un polymère rédox adapté à l'enzyme immobilisée. Il semble donc peu envisageable de pouvoir comparer l'activité de différents mutants en utilisant de telles électrodes. Comme nous l'avons vu dans la partie précédente, la technique d'immobilisation avec médiateur en solution est adaptée pour l'étude de différents mutant de CotA. Elle peut en plus être également utilisée avec des enzymes anodiques, comme par exemple une glucose oxydase, et permettre le développement de biopile enzymatique Glucose/O₂.

6 Développement de biopiles enzymatiques Glucose/O₂

Après avoir développé des biocathodes CotA efficaces, des outils électrochimiques plus complexes ont été mis au point afin d'évaluer CotA puis ses potentiels mutants optimisés dans des conditions réelles d'opération. La laccase CotA a été associée à la glucose oxydase d'*Aspergillus niger* (GOx) pour développer deux prototypes de biopile enzymatique Glucose/O₂.

Dans un premier temps, un prototype de biopile enzymatique classique a été conçu en associant des biocathodes CotA avec des bioanodes GOx fonctionnalisées *via* la technique d'immobilisation développée dans la partie 4. Cette biopile enzymatique dite classique fonctionne dans deux compartiments en PDMS séparés par une membrane de Nafion®.

Dans un second temps, un prototype original de biopile microfluidique permettant l'immobilisation covalente de la laccase et de la GOx sur des électrodes de nanotubes de carbone a été mis au point. Ce prototype de biopile miniature permet d'éviter l'utilisation d'une membrane échangeuse d'ions entre les deux compartiments.

6.1 Matériel et méthodes

6.1.1 Réactifs

La *p*-phénylènediamine, le poly(éthylèneglycol) diglycidyléther (PEGDGE, ~ 525 g/mol), le 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS), le dodécylsulfate de sodium (SDS), le 1-(3-diméthylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide (EDC), le *N*-hydroxysuccinimide (NHS), l'hydroxyde de potassium, l'éthanol, le *D*-glucose, l'acétone, le nitrate de sodium, l'acide chlorhydrique, l'acide nitrique et l'acide sulfurique et la glucose oxydase d'*Aspergillus niger* (GOx ; 210 U.mg⁻¹ ; une unité correspond à la quantité d'enzyme qui converti 1 μmol de *D*-glucose par minute à pH7.0 et 25°C). ont été achetés chez Sigma-Aldrich. La laccase de *Trametes versicolor* (TvLac) a été achetée chez Fluka (21 U/mg) (une unité U correspond à la quantité de laccase transformant 1 mmol d'ABTS par minute à 25°C dans du tampon acétate (50 mM ; pH4.5). Le 3-aminopropyltriéthoxysilane (APTES) a été acheté chez ABCR. Les nanotubes de carbone monofeuillets COOH et NH₂ ont été achetés chez Cheap Tubes Inc. L'O₂ et le N₂ ultrapure ont été achetés chez Air Liquide.

6.1.2 Electrochimie

Les mesures électrochimiques (chronoampérométrie et voltammétrie linéaire) ont été effectuées avec un potentiostat AUTOLAB PGSTAT100 généreusement mis à notre disposition par le Prof. Thomas Ebbesen (ISIS, Université de Strasbourg). Le kit de polissage et les électrodes de carbone vitreux (Ø3mm) utilisées ont été achetés chez CHI Instruments.

6.1.3 Construction des biopiles "classiques"

6.1.3.1 Conception des bioélectrodes.

L'électrode de carbone vitreux a été modifiée chimiquement en suivant le protocole décrit en 4.1.6. 8,5 µL d'une solution contenant un mélange d'enzyme (CotA ($3,5 \cdot 10^{-3}$ U) ou GOx (13 U)) et de poly(éthylène glycol) diglycidyléther (PEGDGE) (1:2 massique) dans du tampon phosphate (50 mM ; pH7.5) ont été déposés sur la surface de l'électrode. La réticulation a eu lieu à température ambiante pendant 15 h. Un tube eppendorf percé a été placé sur l'électrode pour protéger la surface pendant la réticulation. Les électrodes ont été plongées 3 h dans du tampon acétate (50 mM ; pH4.5) (laccases) ou du tampon phosphate (50 mM ; pH7) (GOx) avant utilisation.

6.1.3.2 Construction des biopiles

Deux plaques de Plexiglas (80 x 80 x 10 mm) percées au centre et aux quatre coins ont été réalisées par l'atelier de mécanique de l'Université de Strasbourg. Les cellules électrochimiques ont été conçues en PDMS (PDMS/agent réticulant : 9/1) à l'aide de moules fabriqués au laboratoire. Les membranes de Nafion®117 (épaisseur : 0,07 in) ont été achetées chez Sigma-Aldrich. Le principe de la biopile est présenté en Figure 58.

6.1.4 Construction des biopiles microfluidiques

6.1.4.1 Fonctionnalisation d'une lame de verre avec des nanotubes de carbone

La lame de verre a été nettoyée à l'eau et à l'EtOH puis séchée avec N₂. 2 mL de résine photosensible positive AZ9260 (Microchemicals GmbH) ont été déposés sur la lame de verre en utilisant un spin coater (WS-400-6NPP-LITE ; Laurell Tech. Corp.). La lame de verre a été placée sur une plaque chauffante à 110°C (4 min) puis dans une chambre saturée en vapeur d'eau (1 min). La lame de verre a ensuite été exposée 5 min à l'UV à travers le masque adéquat (voir Annexe 3) en utilisant un aligneur de masque (MJB3 ; SUSS MicroTech). La lame de verre a été immergée dans 50 mL d'une solution (AZ 400 K developer (AZ Electronic Materials)/eau ultrapure (1:4)) pendant 3 min puis séchée avec N₂. L'immersion a été répétée 1 min jusqu'à ce que la structure soit entièrement révélée. La surface à fonctionnaliser a été recouverte d'une solution contenant 1% de 3-aminopropyltriéthoxysilane (APTES) (m/m) dans l'eau ultrapure et incubée 5 min. L'opération a été répétée une seconde fois puis la lame de verre a été séchée à l'N₂. Une solution de nanotube de carbone (1 mg/mL) dans l'eau ultrapure contenant 1% de SDS (m/m) a été préalablement placée au sonicateur (12 x 10 min ; Bendelin Sonoplus HD200, 75% par cycle, MS72/D). La lame de verre a été chauffée à 100°C et environ 20 µL de la solution de nanotubes de carbone ont été déposés de manière à recouvrir la surface à fonctionnaliser. Le processus a été répété jusqu'à obtenir une surface homogène après évaporation. La lame de verre a ensuite été immergée dans un bain d'acétone pendant 2 h sous agitation. La structure de nanotubes de carbone a été délicatement révélée en appliquant un léger flux d'acétone avec une pipette pasteur. La lame de verre a été lavée à l'eau ultrapure puis à séchée avec N₂.

6.1.4.2 Fonctionnalisation des électrodes de nanotubes de carbone COOH

Les électrodes de nanotube de carbone COOH ont été lavées à l'eau ultrapure et séchées avec N₂. 20 µL d'une solution contenant 30mM de 1-(3-diméthylaminopropyl)-3-éthylcarbodiimide (EDC) et 90mM de *N*-hydroxysuccinimide (NHS) dans du tampon phosphate (50 mM ; pH7.5) ont été déposés à la surface des électrodes. La réaction a eu lieu à température ambiante pendant 1 h puis les électrodes ont été séchées avec N₂. 3 µL d'une solution contenant TvLac (0,3 - 0,5 U), CotA (1,5 - 3,9.10⁻³ U) ou GOx (3,1 - 5,2 U) dans du tampon phosphate (50 mM ; pH7.5) ont été déposés sur la surface des électrodes et les électrodes ont été incubées pendant 15 h.

6.1.4.3 Fonctionnalisation des électrodes de nanotubes de carbone NH₂

Les électrodes de nanotube de carbone NH₂ ont été lavées à l'eau ultrapure et séchées avec N₂. 3 µL d'un mélange enzyme (TvLac ou CotA ou GOx) : poly(éthylèneglycol) diglycidyléther (PEGDGE) (1 : 2 massique) dans du tampon phosphate (50 mM ; pH7.5) ont été déposés sur la surface des électrodes. Les électrodes ont été incubées 15 h pour réticulation.

6.1.4.4 Constitution des biopiles

Les pièces de PDMS contenant le circuit microfluidique ont été collées sur les lames de verre après activation des deux surfaces au plasma O₂ (Plasma system FEMTO ; Diener Electronic). Les surfaces contenant les protéines ont été protégées durant l'exposition.

6.2 Résultats et discussion

6.2.1 Création d'une bioanode : immobilisation de la glucose oxydase d'*Aspergillus niger* (GOx)

La technique d'immobilisation développée dans la partie 4 a été appliquée avec succès à une enzyme anodique, la glucose oxydase d'*Aspergillus niger* (GOx) dans le but de concevoir une bioanode de référence pouvant ensuite être associée à une biocathode CotA pour constituer une biopile Glucose/O₂. La bioanode obtenue catalyse efficacement l'oxydation du *D*-glucose en présence d'un médiateur rédox en solution, le ferrocène-méthanol (Figure 58a).

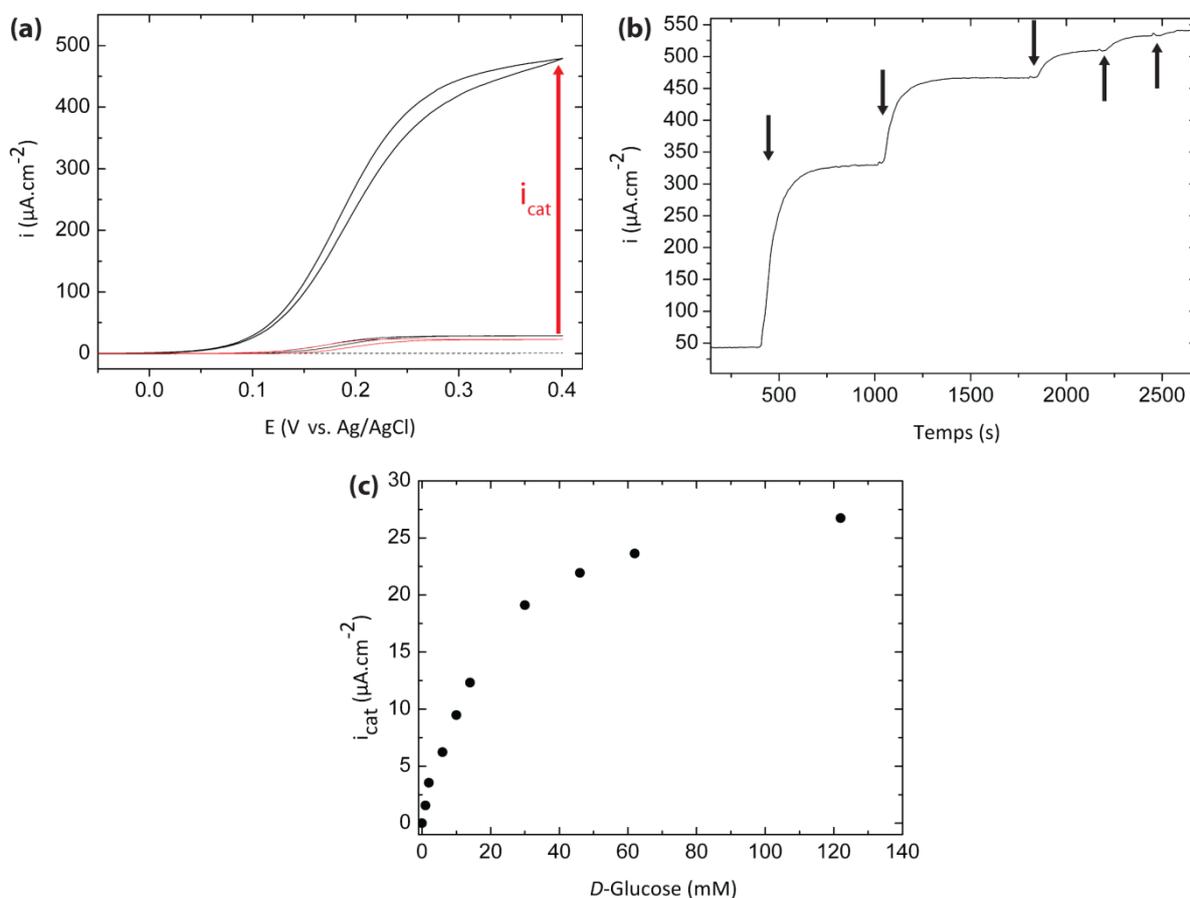


Figure 58 Immobilisation d'une enzyme anodique : la glucose oxydase d'*Aspergillus niger*: **(a)** Cyclovoltammogrammes d'une électrode de carbone vitreux fonctionnalisée avec GOx (60 μg ; 13 U) dans du tampon phosphate (50 mM ; pH7) contenant 100 mM de NaClO_4 (pointillés), 1 mM de ferrocène-méthanol (rouge) et 100 mM de *D*-glucose (noir gras) à 20°C. Cyclovoltammogramme d'une électrode de carbone vitreux nue dans du tampon phosphate (50 mM ; pH7) contenant 100 mM de NaClO_4 , 1 mM de ferrocène-méthanol et 100 mM de *D*-glucose (noir fin) à 20°C. Scans de -0,1 à +0,4 V à 10 $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ (cinquième scan représenté). **(b)** Chronoampérogramme d'une électrode de carbone vitreux fonctionnalisée avec GOx (60 μg ; 13 U) dans du tampon phosphate (50 mM ; pH7) contenant 100 mM de NaClO_4 et 1 mM de ferrocène-méthanol à 20°C. Chaque flèche correspond à l'ajout de 10 mM de *D*-glucose. $E_{\text{fixe}} = 500$ mV vs. Ag/AgCl. **(c)** Evolution de la densité de courant catalytique d'oxydation i_{cat} en fonction de la concentration en *D*-glucose présent dans le milieu

Dans du tampon phosphate (50 mM ; pH7) contenant 1 mM de ferrocène-méthanol et 100 mM de β -*D*-glucose, l'électrode présente une densité de courant d'oxydation $i_{\text{cat}} = 456 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ extrait à $E = +$

0,4 V vs.Ag/AgCl (dans ce cas, la densité de courant catalytique d'oxydation est définie par $i_{cat} = i_{ox}(\text{ferrocèneméthanol, glucose}) - i_{ox}(\text{ferrocèneméthanol})$, soit la différence entre la densité de courant d'oxydation en présence de ferrocèneméthanol/glucose et celle en absence de glucose). A l'inverse, l'électrode ne présente aucune activité en absence de *D*-glucose : seule la réaction d'oxydoréduction réversible du ferrocèneméthanol est visible sur le cyclovoltammogramme. Il en est évidemment de même pour une électrode de carbone vitreux nue en présence de ferrocèneméthanol et de 100 mM de *D*-glucose (Figure 58a).

Cette bioanode a également été caractérisée par chronoampérométrie : la densité de courant d'oxydation est mesurée en réponse à des ajouts dosés de *D*-glucose (10 mM) dans le tampon en présence de ferrocèneméthanol (Figure 58b). A chaque ajout de *D*-glucose dans le milieu correspond une augmentation de la densité de courant catalytique d'oxydation. En faisant des ajouts dosés plus précis de *D*-glucose, il est possible de tracer l'évolution de la densité de courant catalytique en fonction de la concentration en *D*-glucose dans le milieu (Figure 58c). Cette courbe d'évolution de l'activité catalytique de la bioanode en fonction de la concentration en substrat permet d'évaluer le K_M de la GOx immobilisée vis-à-vis du *D*-glucose : $K_M(\text{GOx immo}) \sim 20$ mM. Cette valeur est dans le même ordre de grandeur que le K_M vis-à-vis du *D*-glucose de la GOx en solution (compris entre 30 et 100 mM ; Swoboda et al. 1965).

La bioanode à GOx fonctionne efficacement et de manière reproductible : une bioanode de référence est ainsi disponible pour assembler une biopile Glucose/O₂.

6.2.2 Conception de biopiles enzymatiques "classiques" Glucose/O₂

L'objectif n'est pas ici de développer la biopile la plus performante possible mais plutôt de réaliser les toutes premières biopiles utilisant la CotA comme catalyseur cathodique et surtout d'apporter les preuves quant à la possibilité d'utiliser cette laccase thermophile pour de telles applications. Ces biopiles pourront également permettre l'étude des variants optimisés dans des conditions réelles de fonctionnement. Un prototype de biopile dite "classique" à deux compartiments a ainsi été développé en associant les bioanode et biocathode décrites dans la partie précédente.

Le principe de la biopile développée est schématisé dans la Figure 59. Il s'agit d'un prototype de type "sandwich" : deux plaques de Plexiglas (80 x 80 x 10 mm) viennent écraser les cellules anodique et cathodique avec entre les deux, une membrane séparatrice échangeuse d'ions de Nafion®117. Le tout est maintenu par quatre vis situées aux quatre coins des plaques de Plexiglas. L'originalité réside dans l'utilisation de PDMS pour former les deux compartiments de la biopile. Le PDMS présente en effet l'intérêt d'offrir une grande flexibilité dans la géométrie de la cellule souhaitée. Les possibilités de géométrie sont en effet très variées et ne sont seulement limitées que par la disponibilité d'un moule adéquate. Le PDMS peut de plus être facilement percé à l'aide d'un poinçon pour créer les emplacements des électrodes ainsi que les entrées/sorties d'électrolyte ou de gaz, le tout en étant

parfaitement étanche. L'étanchéité globale du système est garantie par la flexibilité du PDMS : en utilisant du PDMS suffisamment mou (mais tout de même rigide), l'étanchéité est assurée par la simple pression des cellules l'une sur l'autre par les plaques de Plexiglas. Enfin, le PDMS présente le précieux avantage d'être inerte chimiquement mais également d'être transparent, ce qui offre un confort non négligeable pendant l'utilisation de la biopile.

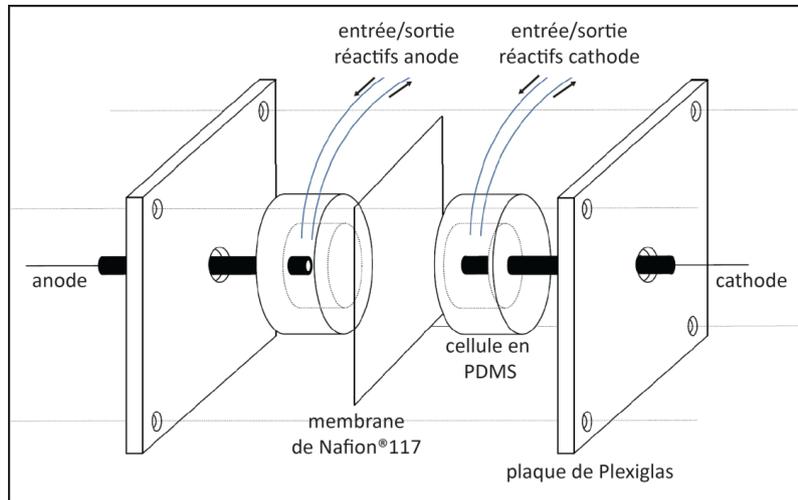


Figure 59 *Schéma du prototype de biopile "classique" : deux plaques de Plexiglas prennent en sandwich les deux compartiments anodique et cathodique constitués de PDMS. Une membrane échangeuse d'ions de Nafion®117 sépare les deux compartiments. Les entrées d'électrodes et de réactifs sont percées dans les parois de PDMS*

6.2.2.1 Biopile enzymatique de première génération

Une première génération de biopile a tout d'abord été développée avec des cellules d'un volume d'environ 20 mL chacune. Le système est présenté dans la Figure 60.

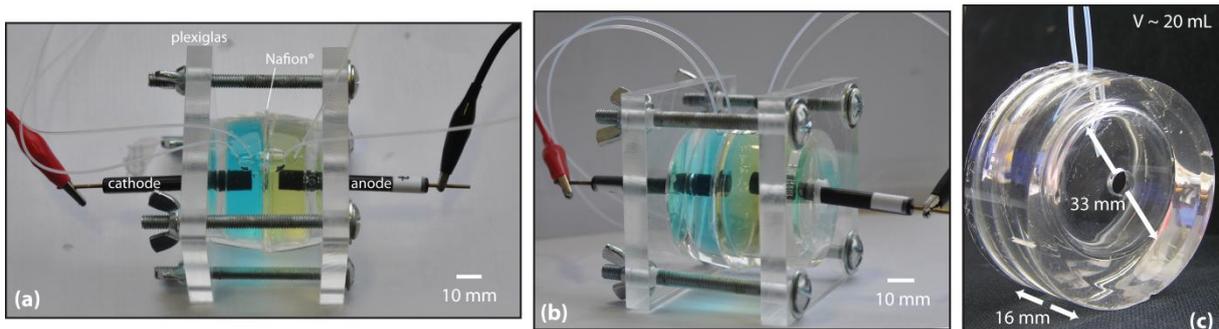


Figure 60 *Biopile "classique" Glucose/O₂ de 1^{ère} génération : (a) et (b) Photos de la biopile. Les solutions colorées mettent en évidence les deux compartiments séparés par la membrane de Nafion®117. (c) Photo d'une cellule en PDMS de 20 mL*

Avant d'être associées pour constituer la biopile, les deux électrodes ont été caractérisées individuellement par cyclovoltammétrie (Figure 61a et b). Dans les conditions utilisées dans la biopile, la biocathode fournit $i_{cat} = -58 \mu A \cdot cm^{-2}$ à $E = -0,2 V$ vs. Ag/AgCl tandis que la bioanode fournit $i_{ox} = 219 \mu A \cdot cm^{-2}$ à $E = +0,4 V$ vs. Ag/AgCl. Les cyclovoltammogrammes cathodique et anodique sont

réunis en Figure 61c afin de mieux visualiser le couple anode/cathode utilisé et les courants de réduction et d'oxydation mis en jeu. La f.e.m maximale théorique de la biopile est imposée par les potentiel rédox des deux médiateurs utilisés (voir 1.2.4), soit avec $E^0 = 620$ mV vs. SHE (pH4.5) pour l'ABTS et $E^0 = 150$ mV vs. SHE (pH7) pour le ferrocène-méthanol, $\Delta E_{\text{théo}} = 470$ mV. Cette f.e.m théorique est retrouvée sur la Figure 61c avec un ΔE mesuré d'environ 470 mV.

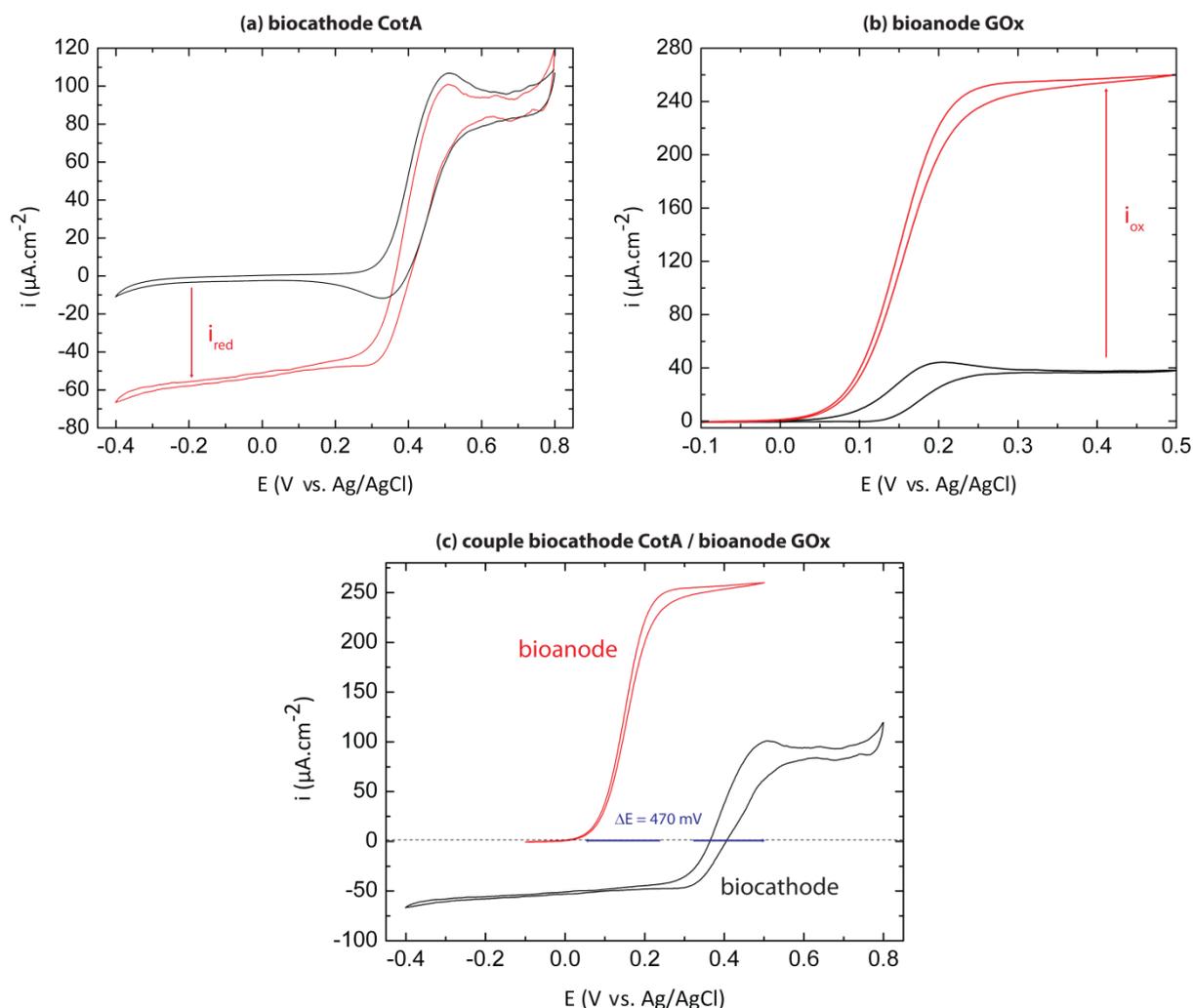


Figure 61 *Biopile "classique" Glucose/O₂ de 1^{ère} génération : étude des deux électrodes. (a) Cyclovoltammogrammes de la biocathode (CotA, 1,35 µg ; 3,5.10⁻³ U) dans du tampon acétate (50 mM ; pH4.5) contenant 100 mM de NaClO₄ et 2mM d'ABTS avec N₂ (noir) ou O₂ (rouge) bullé en solution à 20°C. Scans de +0,8 à -0,4 V à 10 mV.s⁻¹ (cinquième scan représenté). (b) Cyclovoltammogrammes de la bioanode (GOx, 60 µg ; 13 U) dans du tampon phosphate (50 mM ; pH7) contenant 100 mM de NaClO₄, 1 mM de ferrocène-méthanol (noir) et 200 mM de D-glucose (rouge) à 20°C. Scans de -0,1 à +0,4 V à 10 mV.s⁻¹ (cinquième scan représenté). (c) Superposition des cyclovoltammogrammes du couple cathode/anode*

La biopile a été constituée en associant les deux électrodes. Le compartiment anodique est rempli de tampon phosphate (50 mM ; pH7) contenant 100 mM de NaClO₄, 1 mM de ferrocène-méthanol et 200 mM de D-glucose. Le compartiment cathodique est rempli de tampon acétate (50 mM ; pH4.5) contenant 100 mM de NaClO₄ et 2 mM d'ABTS. De l'O₂ est directement bullé dans le compartiment. Un barreau magnétique agite difficilement les solutions dans chacun des compartiments. A l'équilibre, la f.e.m mesurée expérimentalement entre les deux électrodes est $\Delta E_{\text{biopile}} = 360$ mV.

La biopile a été étudiée par voltammétrie linéaire en balayant de 0 à +0,4 V à 10mV.s⁻¹ et ses performances sont présentées dans la Figure 62. La courbe de polarisation (Figure 62a) présente une allure caractéristique : la densité de courant délivrée par la biopile décroît à mesure que le potentiel appliqué entre les deux électrodes augmente jusqu'à devenir nul à partir d'un certain potentiel. Une biopile de contrôle constituée de deux électrodes de carbone vitreux non fonctionnalisées a également été étudiée : aucun courant n'est mesuré quelque soit le potentiel imposé. La courbe de puissance $P = E.i$ peut être extraite de la courbe de polarisation (Figure 62b). La biopile délivre une puissance maximale $P_{\text{max}} = 3,84 \mu\text{W.cm}^{-2}$ à un potentiel $E = 149 \text{ mV}$. Encore une fois, la puissance délivrée par la biopile de contrôle est nulle sur toute la plage de potentiel.

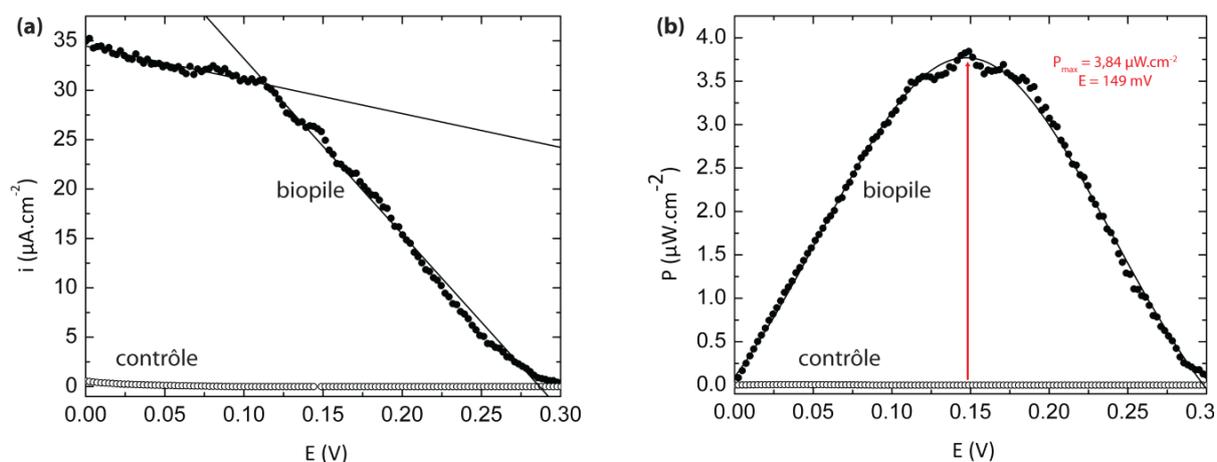


Figure 62 *Biopile "classique" Glucose/O₂ de 1^{ère} génération: performances de la biopile.* Le carburant anodique est constitué de tampon phosphate (50 mM ; pH7) contenant 100 mM de NaClO₄, 1 mM de ferrocène-méthanol et 200 mM de D-glucose à 20°C. Le fuel cathodique est constitué de tampon acétate (50 mM ; pH4.5) contenant 100 mM de NaClO₄ et 2 mM d'ABTS à 20°C. De l'O₂ est directement bullé dans le compartiment cathodique. **(a)** courbe de polarisation de la biopile (noir) et d'une biopile de contrôle constituée d'électrodes non fonctionnalisées (blanc). Scan de 0 à +0,4 V à 10mV.s⁻¹. **(b)** courbes de puissances correspondantes

Cette biopile de première génération fonctionne mais souffre de certaines limitations comme en témoigne la f.e.m plus faible que celle théoriquement attendue. L'une des principales raisons demeure l'agitation magnétique difficile au sein des compartiments, ce qui restreint l'apport en substrat et en médiateurs à la surface des électrodes. Un prototype de seconde génération a été développé pour y remédier.

6.2.2.2 Biopile enzymatique de seconde génération

Le prototype de biopile de seconde génération développée est constituée de cellules en PDMS de plus faible volume (~ 4 mL) ce qui limite la quantité de substrat nécessaire. De plus, l'approvisionnement en substrat se fait de manière continue par circulation de flux en sens contraire (Figure 63). Le carburant cathodique circule en circuit fermé à l'aide d'une pompe péristaltique, de l'O₂ étant constamment bullé dans le réservoir. Le carburant anodique circule quant à lui en circuit ouvert à l'aide d'une pompe à seringue (PHD 22/2000, Harvard Apparatus).

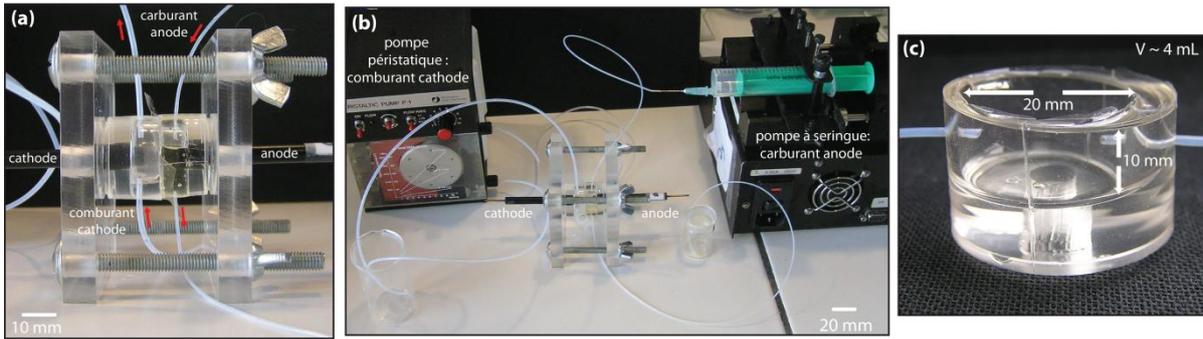


Figure 63 *Biopile "classique" Glucose/O₂ de 2^{ème} génération : (a) et (b) Photos de la biopile. Les fuels circulent en flux continu dans chacun des deux compartiments : le comburant en circuit fermé à l'aide d'une pompe péristaltique, le carburant en circuit ouvert à l'aide d'une pompe à seringue. (c) Photo d'une cellule en PDMS de 4 mL*

De nouveau, anode et cathode ont été caractérisées individuellement par cyclovoltammétrie (Figure 64a et b). Dans les conditions utilisées dans la biopile, la biocathode fournit $i_{\text{cat}} = -131 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ à $E = -0,2 \text{ V vs. Ag/AgCl}$ tandis que la bioanode fournit $i_{\text{ox}} = 256 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ à $E = +0,4 \text{ V vs. Ag/AgCl}$. La superposition des deux cyclovoltammogrammes est présentée en Figure 64c ($\Delta E_{\text{théo}} = 470 \text{ mV}$).

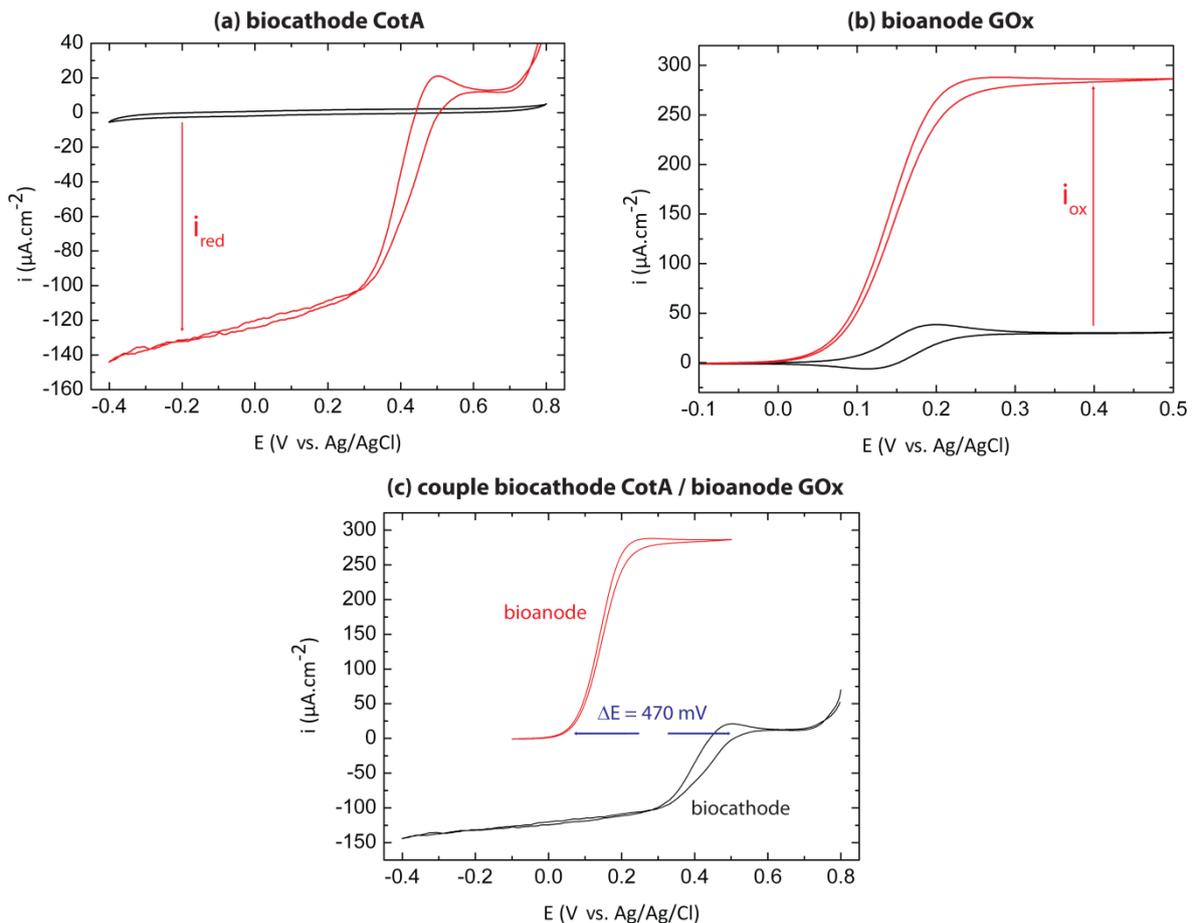


Figure 64 *Biopile "classique" Glucose/O₂ de 2^{ème} génération : étude des deux électrodes. (a) Cyclovoltammogrammes de la biocathode (CotA, 1,35 μg ; $3,5\cdot 10^{-3} \text{ U}$) dans du tampon acétate (50 mM ; pH4.5) contenant 100 mM de NaClO_4 (noir) et 2mM d'ABTS avec O_2 bullé en solution (rouge) à 20°C. Scans de +0,8 à -0,4 V à $10 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ (cinquième scan représenté). (b) Cyclovoltammogrammes de la bioanode (GOx, 60 μg ; 13 U) dans du tampon phosphate (50 mM ; pH7) contenant 100 mM de NaClO_4 , 1 mM de ferrocèneméthanol (noir) et 40 mM de D-glucose (rouge) à 20°C. Scans de -0,1 à +0,4 V à $10 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ (cinquième scan représenté). (c) Superposition des cyclovoltammogrammes du couple cathode/anode*

Les performances de la biopile sont présentées dans la Figure 65. La f.e.m mesurée expérimentalement à l'équilibre est de $\Delta E_{\text{biopile}} = 420 \text{ mV}$, ce qui est plus proche de la valeur attendue théoriquement. L'utilisation de flux continu pour l'approvisionnement en substrats semble être efficace pour limiter les problèmes de diffusions des substrats et des médiateurs vers la surface des électrodes. Ceci est confirmé par une amélioration des performances de la biopile : la biopile délivre plus de courant sur une plus grande de potentiels et génère une puissance maximale $P_{\text{max}} = 5 \mu\text{W.cm}^{-2}$ pour une différence de potentiel de $E = 202 \text{ mV}$ (Figure 65b).

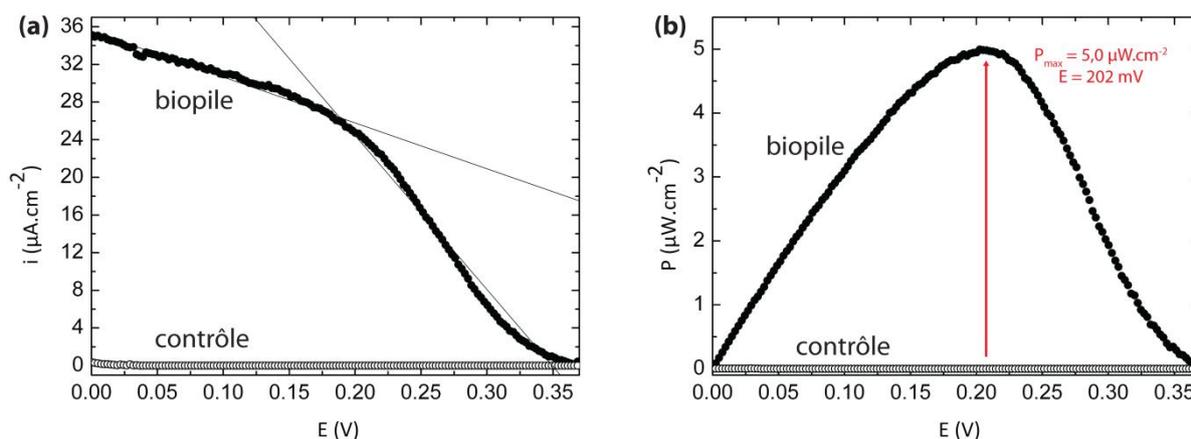


Figure 65 *Biopile "classique" Glucose/O₂ de 2^{ème} génération : performances de la biopile.* Le fuel anodique est constitué de tampon phosphate (50 mM ; pH7) contenant 100 mM de NaClO₄, 1 mM de ferrocène-méthanol et 40 mM de D-glucose à 20°C. Le fuel cathodique est constitué de tampon acétate (50 mM ; pH4.5) contenant 100 mM de NaClO₄ et 2 mM d'ABTS à 20°C. De l'O₂ est bullé dans le réservoir de fuel cathodique. Les fuels circulent à $Q = 5 \text{ mL.h}^{-1}$. **(a)** Courbe de polarisation de la biopile (noir) et d'une biopile de contrôle constituée d'électrodes non fonctionnalisées (blanc). Scan de 0 à +0,4 V à 10 mV.s^{-1} . **(b)** Courbes de puissance correspondantes

L'influence de la température du compartiment cathodique sur la puissance délivrée par la biopile a été étudiée. Le fuel cathodique a été chauffé à différentes températures avant d'être envoyé vers la biopile. Les performances de la biopiles aux différentes températures (20, 35, 43, 50, 60, 70 et 78°C) ont été étudiées par voltammétrie linéaire pour donner les courbes de polarisation et les courbes de puissances correspondantes présentées en Figure 66a et b.

On constate que la puissance maximale délivrée par la biopile augmente en fonction de la température pour atteindre un maximum à environ 50 - 60°C. La puissance passe en effet de $P_{\text{max}, 20^\circ\text{C}} = 5 \mu\text{W.cm}^{-2}$ à 20°C à $P_{\text{max}, 50^\circ\text{C}} = 7,85 \mu\text{W.cm}^{-2}$ à 50°C. Au-delà de 50 - 60°C, la puissance diminue pour devenir quasiment équivalente à 80°C ($P_{\text{max}, 80^\circ\text{C}} = 5,57 \mu\text{W.cm}^{-2}$) et à 20°C. L'évolution des performances de la biopile en fonction de la température est comparée à l'évolution de l'activité catalytique de la biocathode elle-même (Figure 66c). Les profils de température sont logiquement similaires : les performances maximales sont atteintes vers 50°C et la possible désorption du biofilm catalytique à plus haute température entraîne une chute d'activité (voir 4.2.2.6).

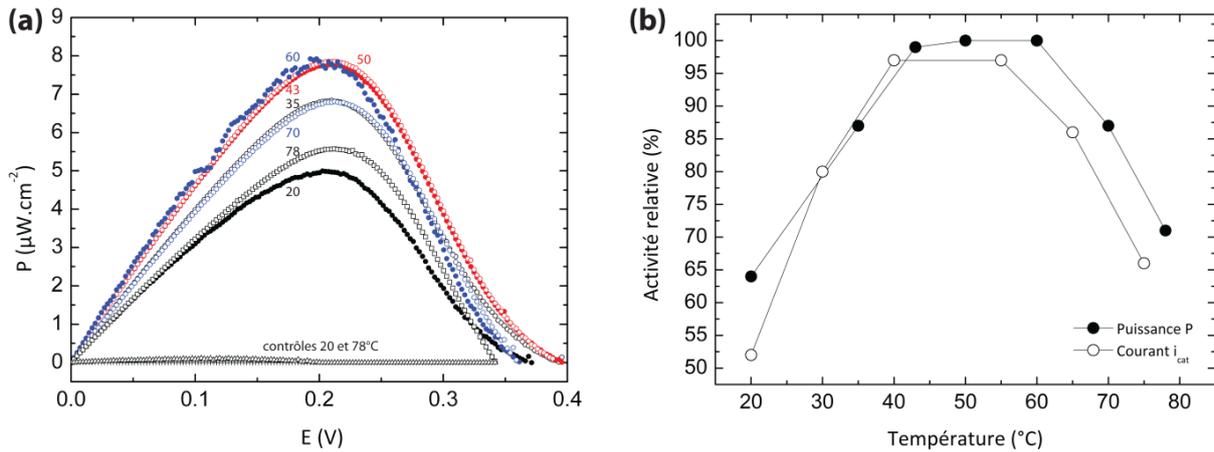


Figure 66 *Biopile "classique" de 2^{nde} génération : influence de la température : (a) Courbes de puissance d'une biopile pour différentes température dans le compartiment cathodique. La biocathode (CotA, 1,35 µg ; 3,5.10⁻³ U) est dans du tampon acétate (50 mM ; pH4.5) saturé en O₂ contenant 100 mM de NaClO₄ et 2mM d'ABTS à 20, 35, 43, 50, 60, 70 ou 78°C. La bianode (GOx, 60 µg ; 13 U) est dans du tampon phosphate (50 mM ; pH7) contenant 100 mM de NaClO₄, 1 mM de ferrocène-méthanol et 40 mM de D-glucose. Scan de 0 à +0,4 V à 10mV.s⁻¹. Les fuels circulent à Q = 5 mL.h⁻¹. Une biopile de contrôle constituée d'électrodes de carbone vitreux nues a été étudiée à 20 et 78°C. (b) Evolution des activités relative de la biopile (noir, puissance P) et de la biocathode individuellement (blanc, courant catalytique i_{cat}) en fonction de la température*

Ce prototype de biopile "classique" de 2^{nde} génération fonctionne de manière satisfaisante et permet l'étude de la laccase CotA et de ses potentiels mutants optimisés dans des conditions réelles d'opération au sein d'une biopile enzymatique. La présence de la membrane de Nafion® limite toutefois les possibilités de miniaturisation de la biopile et les volumes de carburant et comburant mis en jeu pour l'étude d'une seule laccase demeurent encore relativement important (environ 20 mL pour chaque compartiment). La création d'un prototype de biopile intégré dans un système microfluidique a permis la suppression de la membrane séparatrice et la miniaturisation de la biopile tout en travaillant toujours avec des médiateurs en solution.

6.2.3 Conception de biopiles microfluidiques Glucose/O₂

La demande croissante en petites sources d'énergie pour des applications en électronique portable ou la création de systèmes implantables a considérablement encouragé la miniaturisation des piles à combustible. Pour cela, les chercheurs ont été amenés à intégrer les technologies de pile à combustibles dans des systèmes microfluidiques. La toute première pile à combustible microfluidique a ainsi vu le jour en 2002 (Ferrigno et al. 2002). Le terme désigne toute pile à combustible dont l'approvisionnement en fluides, les sites de réaction et les structures des électrodes sont confinés au sein d'un canal microfluidique. Ces systèmes exploitent les caractéristiques du flux laminaire des fluides dans un canal microfluidique (voir 3.1.1) afin de pouvoir séparer les flux anodiques et cathodique sans avoir recours à une barrière physique comme une membrane. Depuis 2002, les piles à combustibles microfluidiques non biologiques ont généré de nombreuses publications scientifiques dont la majeure partie sont citées dans la revue Kjeang et al. 2009.

Très peu de biopiles enzymatiques microfluidiques ont été décrites à ce jour, principalement en raison du processus de microfabrication de la puce microfluidique. En effet, le matériel biologique est très rarement utilisé dans l'industrie des semi-conducteurs et n'est typiquement pas compatible avec les manipulations réalisées en salle blanche. Ainsi, les techniques d'immobilisation de protéines applicables au développement de biopile microfluidique sont encore peu nombreuses. La première électrode utilisant un enzyme immobilisée à l'intérieur d'un canal microfluidique a été conçue par *Moore et al.* en 2004, soit deux ans après la description de la première pile à combustibles microfluidique (*Moore et al. 2004b*). La biopile microfluidique, constituée d'une ADH NAD-dépendante piégée dans une membrane de Nafion traitée avec du bromure de tetrabutylammonium, a été associée à une cathode externe de platine pour constituer une biopile "semi-microfluidique" générant une densité de courant de 53 $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ et une f.e.m de 0.34 V. *Togo et al.* ont par la suite développés une biopile microfluidique Glucose/O₂ utilisant une GDH NAD-dépendante et une bilirubine oxydase adsorbées avec du noir de carbone sur des électrodes d'or (*Togo et al. 2007 et 2008*). Aucune biopile microfluidique n'a cependant été développée avec des enzymes immobilisées de manière covalente sur la surface des électrodes.

Le peu d'autres biopiles microfluidiques reportées utilisent des biocatalyseurs en solution dans les flux anodique et cathodique avec une géométrie des canaux microfluidique en Y. Par exemple, la biopile microfluidique Glucose/O₂ développée par *Zebda et al.* utilise un flux anodique composé de GOx d'*Aspergillus niger* (0.5 mg.mL⁻¹) avec 10 mM de Fe(CN)₆³⁻ et 10 mM de D-glucose (tampon phosphate (200 mM ; pH7)) et un flux cathodique composé de TvLac (0.5 mg.ml⁻¹) et de 5 mM d'ABTS (tampon citrate (200 mM ; pH3)) (*Zebda et al. 2009a et b*). La biopile génère 110 $\mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$ et possède une f.e.m de 0.3 V. Les avancées et les perspectives dans le domaine des biopiles microfluidiques sont présentées dans la récente revue *Lee et al. 2010*.

Nous avons décidé de tirer profit de l'expertise du laboratoire en microfluidique afin de développer une technique originale permettant la conception d'une biopile microfluidique Glucose/O₂ utilisant des enzymes immobilisées de manière covalente sur des électrodes de nanotubes de carbone monofeuillets.

6.2.3.1 Principe de la biopile microfluidique

Le principe de fonctionnement de la biopile microfluidique Glucose/O₂ est schématisé dans la Figure 67a. La lame de verre est fonctionnalisée avec deux structures de nanotubes de carbone servant d'électrodes. Ces électrodes se font face au sein du canal microfluidique imprimé dans une plaque de PDMS. Le système microfluidique est en forme de Y avec deux entrées en amont des électrodes (l'une pour le fluide anodique et l'autre pour le fluide cathodique) et une sortie en aval des électrodes. A la jonction en Y des deux canaux d'entrée, les fluides anodique et cathodique ne se mélangent pas et circulent ainsi tout le long du canal microfluidique. En effet, les phénomènes de

convection sont limités en régime laminaire et les deux courants de fluides circulent côte à côte en ne se mélangeant que lentement par diffusion (voir 3.1.1). L'interface entre les deux fluides se situe au centre du canal et marque la frontière entre les compartiments anodique et cathodique de la biopile. Les échanges de protons ont alors lieu à travers une interface liquide/liquide et non plus à travers une membrane échangeuse d'ions ce qui diminue considérablement les pertes ohmiques dans le système. Le courant généré à la surface des électrodes au sein du canal microfluidique est collecté en dehors du système par des connections électriques reliées aux extrémités des électrodes. Une section du canal microfluidique est schématisée en Figure 67b. Les enzymes anodique et cathodique sont immobilisées de manière covalente à la surface de leur électrode respective à l'intérieur du canal microfluidique. La réaction de réduction de l'O₂ a lieu au sein du flux cathodique et la réaction d'oxydation du *D*-glucose a lieu au sein du flux anodique, chaque flux contenant le médiateur rédox nécessaire. Les protons sont échangés à travers l'interface liquide/liquide.

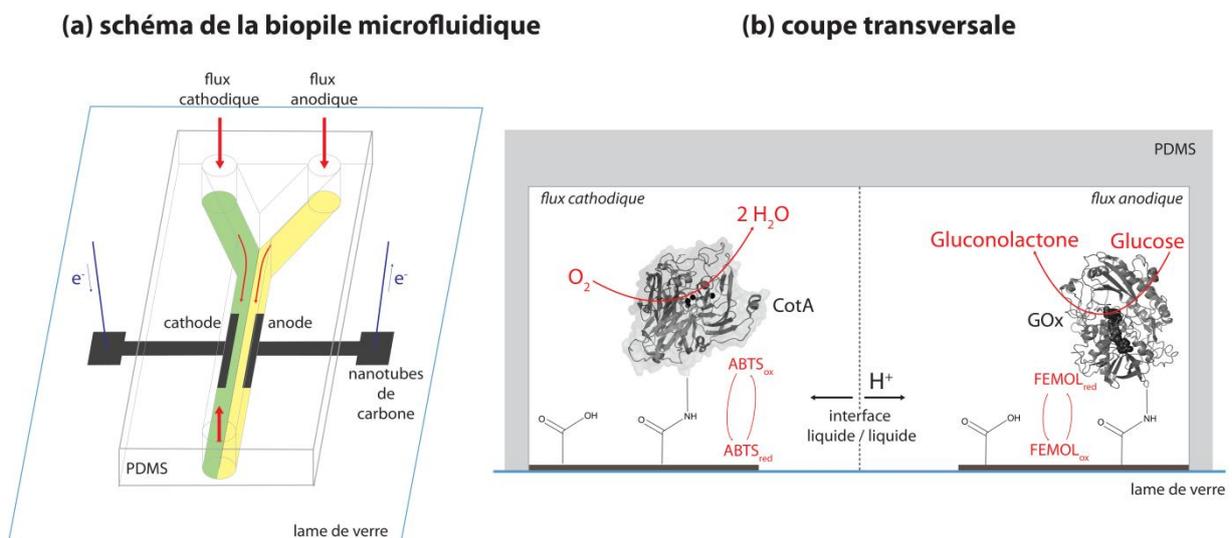


Figure 67 Schémas du prototype de biopile microfluidique : **(a)** Schéma du fonctionnement du dispositif entier. Les deux flux anodique (vert) et cathodique (jaune) ne se mélangent pas au sein du système. **(b)** Coupe transversale du canal microfluidique au niveau des électrodes : schéma du fonctionnement à l'intérieur du système microfluidique. La réaction de réduction de l'O₂ a lieu au sein du flux cathodique et la réaction d'oxydation du *D*-glucose a lieu au sein du flux anodique, chaque flux contenant le médiateur rédox nécessaire (ABTS ou ferrocène-méthanol (FEMOL)). Les protons sont échangés à travers l'interface liquide/liquide

6.2.3.2 Formation des électrodes de nanotubes de carbone

Les nanotubes de carbone ont été déposés sur une lame de verre selon un procédé de lithographie "Lift-off" présenté dans la Figure 68. Le protocole a été adapté et modifié avec l'aide du Dr. I. Putu Mahendra Wijaya à partir des travaux de *Hu et al.* décrivant un processus de fabrication d'électrodes transparentes en nanotubes de carbone pour la conception de systèmes microfluidiques d'électromouillage (*Hu et al. 2007*). Ce processus de lithographie "Lift-off" utilise une résine photosensible dite positive en opposition aux résines négatives utilisées par exemple pour la fabrication de moules pour la conception de puces microfluidiques en PDMS. Dans le cas des résines négatives, le

rayonnement ultraviolet entraîne une polymérisation des zones exposées, conférant à ces zones une tenue particulière au solvant de révélation alors que les parties non insolées disparaissent sélectivement. Par contre, dans le cas des résines positives, le rayonnement UV produit une transformation chimique des macromolécules, entraînant une solubilité accrue des zones exposées dans le révélateur : ces zones insolées disparaissent sélectivement.

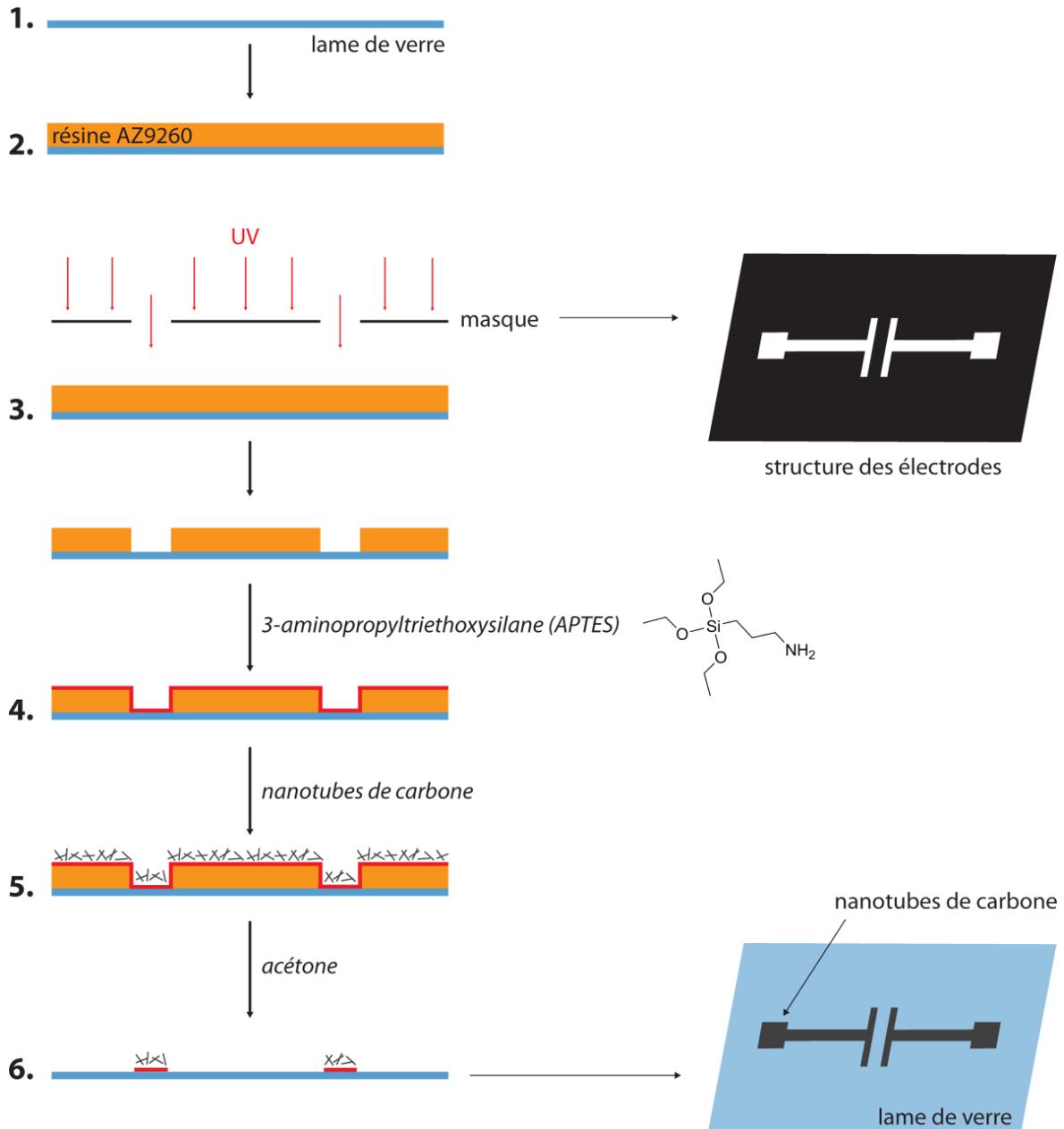


Figure 68 *Lithographie "Lift-off" : schématisation du procédé de fabrication des électrodes de nanotubes de carbone sur une lame de verre : 1 et 2. Une couche mince de résine photosensible positive AZ9260 est déposée sur la lame de verre. 3. La lame de verre est exposée aux rayonnements UV à travers un masque opaque contenant en transparence la structure des électrodes. Les parties exposées sont solubilisées dans un solvant révélateur. 4. La surface de la lame de verre est traitée avec le 3-aminopropyltriéthoxysilane (APTES). 5. Les nanotubes de carbone monofeuillets sont déposés et se lient à la surface de la lame de verre via des interactions hydrophobes. 6. La structure en nanotubes de carbone est révélée après dissolution de la résine photosensible dans l'acétone*

Une couche mince de résine photosensible positive AZ9260 a été déposée sur une lame de verre. Cette lame de verre a été exposée à des rayonnements UV à travers un masque contenant la structure des électrodes. Après immersion dans un solvant révélateur, les zones exposées correspondant à la structure des électrodes sont dissoutes. Il a été remarqué que ces étapes ne fonctionnent de manière optimale que lorsque la couche mince de résine est préalablement chauffée à 110°C pour éliminer toutes traces de solvants puis placée dans une chambre humide avant exposition aux rayonnements UV (la présence d'eau est en effet nécessaire pour la modification de la résine exposée) (Hu et al. 2007).

La surface de la lame de verre a ensuite été traitée avec du 3-aminopropyltriéthoxysilane (APTES) afin de permettre le dépôt d'une couche de nanotubes de carbone monofeuillets stabilisée par des interactions hydrophobes avec la couche d'APTES. La structure en nanotubes de carbone a ensuite été révélée en plongeant la lame de verre dans un bain d'acétone : la résine AZ9260 est dissoute et seuls les nanotubes de carbone en contact direct avec la lame de verre sont conservés.

Le procédé a permis de générer des surfaces de nanotubes de carbone ayant une conductivité comprise entre 20 et 30 kΩ. Bien que les surfaces manquent de régularité, les conductivités obtenues sont suffisantes et permettent l'utilisation de ces surfaces en temps que bioélectrodes. L'homogénéité de la couche de nanotubes de carbone pourrait être améliorée en utilisant un spray pour la déposition. Une technique alternative est également en cours d'évaluation et permet l'obtention de couches très homogènes en déposant alternativement une couche de nanotubes de carbone chargés négativement (COO⁻) et une couche de polylysine chargée positivement (NH₃⁺).

6.2.3.3 Immobilisation des enzymes sur les nanotubes de carbone et étude des bioélectrodes

Les enzymes ont été immobilisées sur les électrodes de nanotubes de carbone selon deux stratégies différentes en fonction de la nature des nanotubes de carbone utilisés (Figure 69). La première stratégie consiste à utiliser des nanotubes de carbone fonctionnalisés avec des groupements acides carboxyliques (Figure 69a). Ces groupements ont été ensuite activés en ester *N*-hydroxysuccinate et ont réagi avec les fonctions amines présentes à la surface de CotA pour former une liaison covalente amide via un couplage peptidique. La seconde stratégie consiste à utiliser des nanotubes de carbone fonctionnalisés avec des groupements amines (Figure 69b). CotA a été immobilisée suivant le principe décrit en 4.2.1.2 au sein d'un réseau réticulé se formant à la surface de l'électrode : les fonctions époxydes du PEGDGE réagissent principalement avec les fonctions amines des nanotubes de carbone mais également avec les fonctions amines présentes à la surface de CotA.

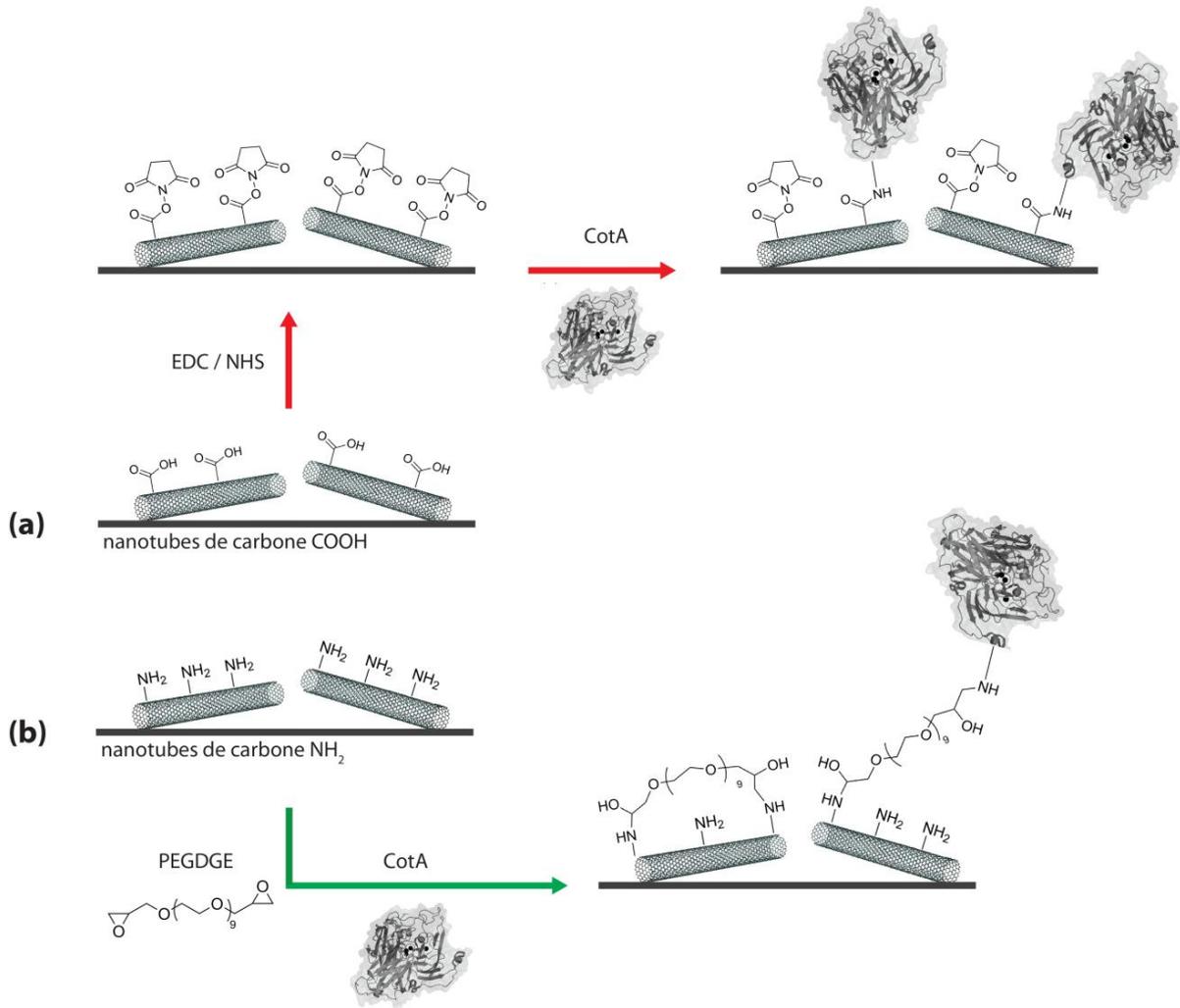


Figure 69 *Schéma des techniques d'immobilisation de CotA sur la surface de nanotube de carbone : (a) Cas de nanotubes de carbone COOH : les groupements COOH sont activés avec EDC/NHS pour former des esters-NHS. Ces groupements réagissent ensuite avec les fonctions amines présentes à la surface de CotA pour former une liaison covalente amide via un couplage peptidique. (b) Cas de nanotubes de carbone NH₂ : un mélange CotA/PEGDGE est déposé à la surface de l'électrode. Les fonctions époxydes du PEGDGE réagissent principalement avec les fonctions amines des nanotubes de carbone mais également avec les fonctions amines présentes à la surface de CotA. CotA est piégée au sein d'un réseau réticulé, une fraction minoritaire étant liée de manière covalente à la surface de nanotubes de carbone*

Ces techniques ont été appliquées avec succès pour l'immobilisation de TvLac, CotA et GOx. Des biocathodes et des bioanodes ont été conçues et étudiées individuellement afin de juger de l'efficacité des deux techniques d'immobilisation. Des lames de verre ont pour cela été fonctionnalisées avec une seule électrode (Figure 70). Un bout de PDMS est collé sur l'électrode afin de délimiter la surface à fonctionnaliser et de contrôler la surface active de l'électrode une fois en solution. La surface active de l'électrode est alors similaire à celle au sein du canal microfluidique dans le cas de la biopile.

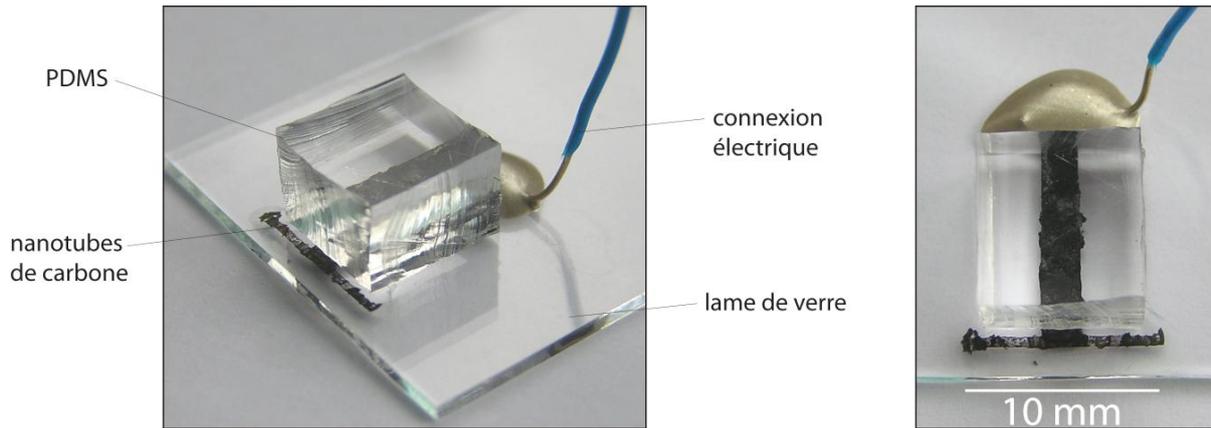


Figure 70 *Images d'une bioélectrode en nanotubes de carbone*

Dans un premier temps, la biocathode fonctionnalisée avec TvLac a été évaluée par cyclovoltammétrie pour la réduction catalytique de l'O₂ en H₂O en présence d'ABTS comme médiateur rédox dans du tampon acétate (50 mM ; pH4.5) (Figure 71a). En présence d'O₂, une densité de courant catalytique de réduction apparaît avec les deux techniques d'immobilisation ($i_{\text{red}/\text{COOH}} = -204 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$; $i_{\text{red}/\text{NH}_2} = -401 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$). Des densités de courants bioélectrocatalytiques ont également été mesurées avec les biocathodes fonctionnalisées avec CotA ($i_{\text{red}/\text{COOH}} = -115 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$; $i_{\text{red}/\text{NH}_2} = -161 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$) (Figure 71b).

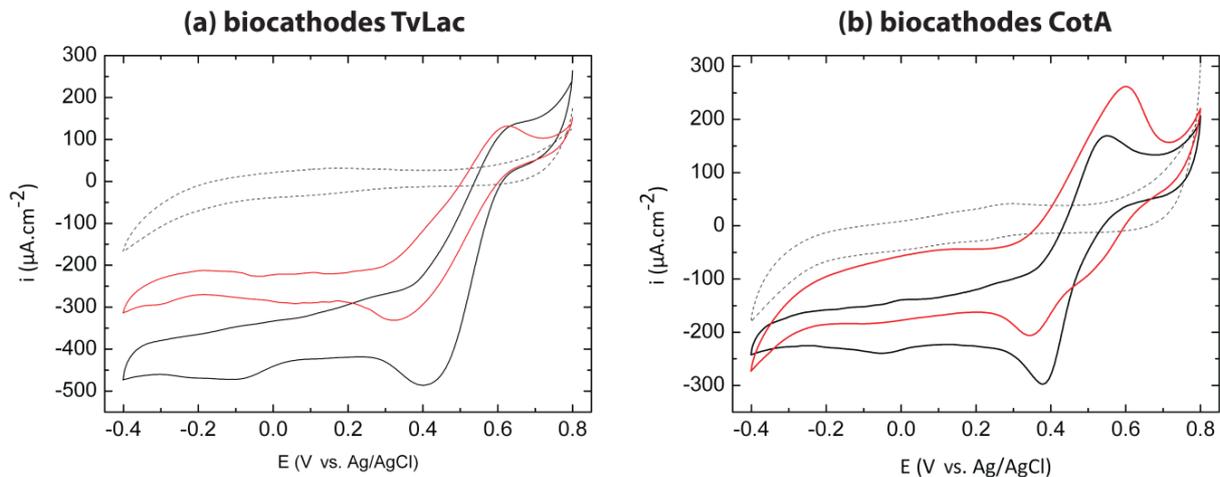


Figure 71 *Biocathodes en nanotubes de carbone*: Cyclovoltammogrammes d'électrodes de nanotubes de carbone COOH (rouge) ou NH₂ (noir) fonctionnalisées avec TvLac (a) (25 μg ; 0,5 U) ou CotA (b) (1,3 μg ; 3,9.10⁻³ U) dans du tampon acétate (50 mM ; pH4.5) saturé en O₂ contenant 100 mM de NaClO₄ (pointillés) et 2 mM d'ABTS à 20°C. Scans de +0,8 à -0,4 V à 10 mV.s⁻¹ (cinquième scan représenté)

Les bioanode fonctionnalisées avec GOx catalysent efficacement dans les deux cas l'oxydation du D-glucose en présence de ferrocène-méthanol comme médiateur rédox (Figure 72). On constate en effet que l'ajout de 10 mM de D-glucose dans la solution tampon s'accompagne de l'apparition d'une densité de courant catalytique d'oxydation ($i_{\text{ox}/\text{COOH}} = 40 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$; $i_{\text{ox}/\text{NH}_2} = 136 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$). L'ajout de 0.1

M de *D*-glucose s'accompagne d'une augmentation de cette densité de courant catalytique ($i_{\text{ox/COOH}} = 187 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$) (Figure 72a).

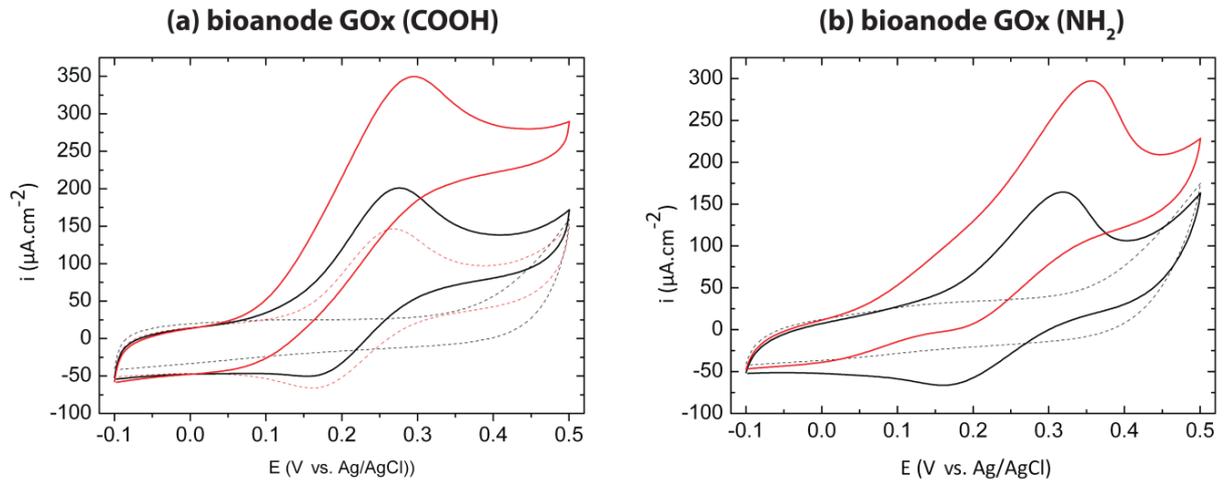


Figure 72 *Bioanodes en nanotubes de carbone: (a)* Cyclovoltammogrammes d'une électrode de nanotubes de carbone COOH fonctionnalisée avec GOx (25 μg ; 5,2 U) dans du tampon phosphate (50 mM ; pH7) contenant 100 mM de NaClO₄ (pointillés noirs), 1 mM de ferrocène-méthanol (pointillés rouges) et 10 mM (noir) ou 100 mM (rouge) de *D*-glucose à 20°C. Scans de -0,1 à +0,4 V à 10 $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ (cinquième scan représenté). *(b)* Cyclovoltammogrammes d'une électrode de nanotubes de carbone NH₂ fonctionnalisée avec GOx (25 μg ; 5,2 U) dans du tampon phosphate (50 mM ; pH7) contenant 100 mM de NaClO₄ (pointillés), 1 mM de ferrocène-méthanol (noir) et 10 mM de *D*-glucose (rouge) à 20°C. Scans de -0,1 à +0,4 V à 10 $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ (cinquième scan représenté)

Pour chacun des cas étudiés, une électrode de contrôle sans enzyme n'a généré aucun courant catalytique dans les conditions utilisées (données non présentées). Les deux techniques d'immobilisation permettent la construction de bioélectrodes efficaces pouvant être assemblées pour créer une biopile microfluidique.

6.2.3.4 Assemblage et étude des biopiles microfluidiques

Les biopiles microfluidiques ont été construites en utilisant les deux techniques d'immobilisation développées. Les structures de deux électrodes en nanotubes de carbone COOH ou NH₂ ont été disposées sur une lame de verre à 1 mm de distance l'une de l'autre (Figure 73).

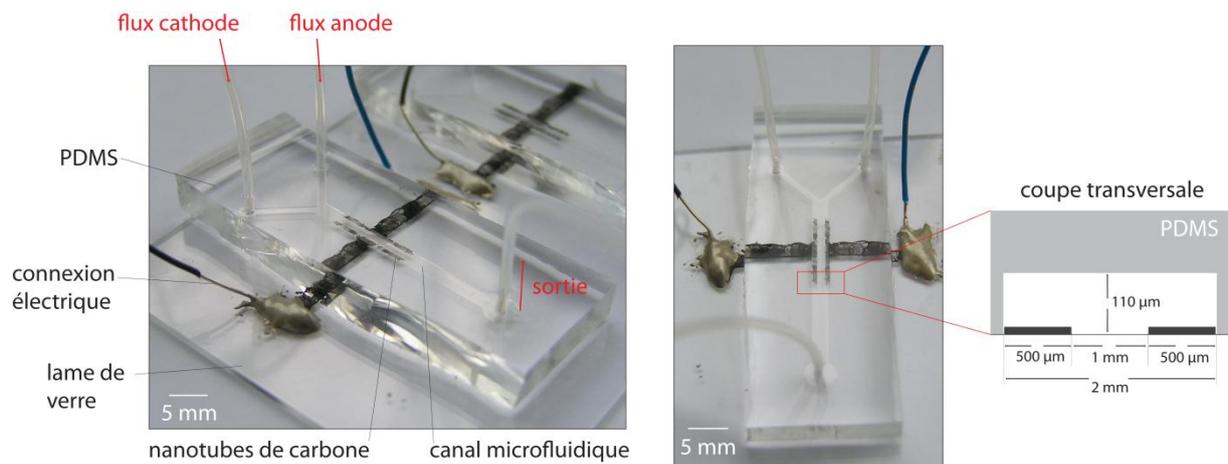


Figure 73 *Images d'une biopile microfluidique Glucose/O₂*: le circuit microfluidique en PDMS est collé sur une lame de verre contenant les électrodes de nanotubes de carbone. Au sein du canal, chaque électrode mesure 1 cm de longueur pour 500 µm de largeur. Les deux électrodes sont séparées par une distance de 1 mm. Le canal microfluidique principal mesure 2 mm de largeur pour 110 µm de hauteur (les dimensions du système sont détaillées en Annexe 3)

Les enzymes cathodique (TvLac ou CotA) et anodique (GOx) ont été immobilisées sur leurs électrodes respectives puis le circuit de canaux microfluidiques en Y imprimé dans du PDMS a été collé sur chaque lame de verre après activation des deux surfaces au plasma à O₂. Bien que des tests aient démontré que l'exposition au plasma à O₂ de la laccase TvLac n'induisait pas de perte d'activité de l'enzyme (données non montrées), les parties des électrodes fonctionnalisées (et qui seront au sein du canal microfluidique) ont été protégées pendant la durée de l'exposition.

Les biopiles microfluidiques ont directement été étudiées par cyclovoltammétrie linéaire, les flux anodique et cathodique étant égaux et imposés hydrodynamiquement par une pompe à seringue (PHD 22/2000, Harvard Apparatus). Le flux anodique est composé de tampon phosphate (50 mM ; pH7) contenant 100 mM de NaClO₄, 1 mM de ferrocène-méthanol et 100 mM de D-glucose. Le flux cathodique est composé de tampon acétate (50 mM ; pH4.5) saturé en O₂ contenant 100 mM de NaClO₄ et 2 mM d'ABTS. Les courbes de puissance obtenues sont présentées dans la Figure 74a et b.

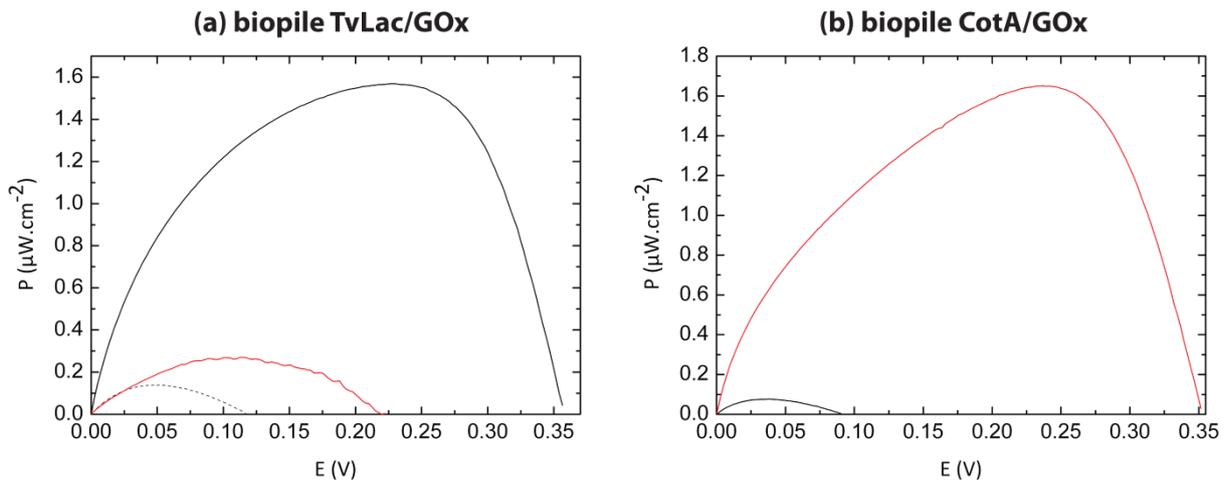


Figure 74 *Biopile microfluidique Glucose/O₂*: **(a)** Performances de biopiles microfluidiques TvLac/GOx. Les électrodes de nanotubes de carbone COOH (noir) ou NH₂ (rouge) sont modifiées avec TvLac (15 µg ; 0,3 U) et GOx (15 µg ; 3,1 U). Le flux anodique est constitué de tampon phosphate (50 mM ; pH7) contenant 100 mM de NaClO₄, 1 mM de ferrocène-méthanol et 100 mM de D-glucose à 20°C (Q = 1000 µL.h⁻¹). Le flux cathodique est constitué de tampon acétate (50 mM ; pH4.5) saturé en O₂ contenant 100 mM de NaClO₄ et 2 mM d'ABTS à 20°C (Q = 1000 µL.h⁻¹). Courbes de puissance réalisées à partir des courbes de polarisation obtenues par voltammétrie linéaire (Scan de 0 à +0,4 V à 1mV.s⁻¹). Electrodes de nanotubes de carbone COOH non fonctionnalisées (pointillés). **(b)** Performances d'une biopile microfluidique CotA/GOx. Les électrodes de nanotubes de carbone COOH sont soit non modifiées (noir), soit modifiées avec CotA (0,6 µg ; 1,5.10⁻³ U) et GOx (15 µg ; 3,1 U). Le flux anodique est constitué de tampon phosphate (50 mM ; pH7) contenant 100 mM de NaClO₄, 1 mM de ferrocène-méthanol et 100 mM de D-glucose à 20°C (Q = 1000 µL.h⁻¹). Le flux cathodique est constitué de tampon acétate (50 mM ; pH4.5) saturé en O₂ contenant 100 mM de NaClO₄ et 2 mM d'ABTS à 20°C (Q = 1000 µL.h⁻¹). Courbes de puissance réalisées à partir des courbes de polarisation obtenues par voltammétrie linéaire (Scan de 0 à +0,4 V à 1mV.s⁻¹)

Dans le cas des biopiles microfluidiques TvLac/GOx (Figure 74a), on constate que seule la biopile possédant des électrodes en nanotubes de carbone COOH fonctionne : elle délivre une puissance

maximale $P_{\max} = 1,57 \mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$ (pour une différence de potentiel de $E = 225 \text{ mV}$) et une f.e.m en circuit ouvert de $\Delta E_{\text{biopile}} = 430 \text{ mV}$ proche de la valeur théorique de 470 mV . La vitesse des flux n'a, a priori, que peu d'incidence sur les performances de la biopile ($Q = 500, 1000 \text{ et } 2000 \mu\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$). A l'inverse, la biopile microfluidique possédant des électrodes en nanotubes de carbone NH₂ ne délivre qu'une puissance maximale $P_{\max} = 0,27 \mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$ (pour une différence de potentiel de $E = 113 \text{ mV}$) et surtout une f.e.m en circuit ouvert de seulement $\Delta E_{\text{biopile}} = 150 \text{ mV}$. Les films enzymatiques à la surface des électrodes sont clairement dégradés au passage des flux anodique et cathodique, et ce quelque soit la vitesse utilisée ($2000, 1000 \text{ ou } 500 \mu\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$). Il semblerait donc que le réseau réticulé piégeant les enzymes sur les électrodes ne soit pas suffisamment stable pour résister à la pression exercée par les flux de liquides. La fraction restante d'enzymes liées de manière covalente est trop insuffisante pour assurer une catalyse efficace à chaque électrode. Au contraire, le biofilm formé de manière covalente dans le cas des nanotubes de carbone COOH est plus stable et résiste aux flux au sein du canal microfluidique. Des biopiles de contrôle constituées d'électrodes de nanotubes de carbone COOH ou NH₂ non fonctionnalisées ne produisent, comme attendu, aucun courant.

Une biopile microfluidique CotA/GOx a été assemblée avec succès en utilisant des électrodes de nanotubes de carbone COOH : elle délivre une puissance maximale $P_{\max} = 1,51 \mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$ (pour une différence de potentiel de $E = 230 \text{ mV}$) avec une f.e.m en circuit ouvert de $\Delta E_{\text{biopile}} = 440 \text{ mV}$ (Figure 74b).

Les résultats de ces études préliminaires sont encourageants et constituent le tout premier exemple de biopile microfluidique utilisant des biocatalyseurs immobilisés de manière covalente sur les électrodes au sein du canal microfluidiques. Plusieurs améliorations pourraient être apportées à partir de ces prototypes. L'influence de la taille des électrodes et de la distance les séparant serait intéressante à étudier. Il a en effet été démontré que les performances des biopiles microfluidiques étaient principalement limitées par les zones de déplétion se formant à la surface des électrodes. La diminution de la taille des électrodes ainsi que de la distance les séparant permettrait d'améliorer les performances de la biopile (*Zebda et al. 2010*). De plus, pour de mêmes surfaces actives développées, l'utilisation de plusieurs petites électrodes en série devrait maximiser le courant généré par rapport à une électrode constituée d'un seul tenant (*Lim et al. 2007*).

6.3 Conclusion

Cette partie décrit la toute première utilisation de la laccase CotA au sein de biopiles enzymatiques. Des biopiles Glucose/O₂ ont été conçues en associant des biocathodes CotA avec des bioanodes constituées d'une GOx catalysant l'oxydation de D-glucose en présence du médiateur redox ferrocène-méthanol en solution.

Tout d'abord, des biopiles dites "classiques" ont été mises au point en utilisant des bioélectrodes modifiées suivant la technique décrite dans la partie 4. Fonctionnant dans deux compartiments en PDMS facilement modulables et séparés par une membrane de Nafion[®], ces biopiles délivrent jusqu'à 5 $\mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$ à 20°C et jusqu'à 7,85 $\mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$ à 50°C pour E = 202 mV.

Afin de miniaturiser la biopile et d'éliminer la membrane, des biopiles intégrées dans un système microfluidique ont été développées en immobilisant de manière covalente les enzymes CotA et GOx sur des électrodes de nanotubes de carbone fonctionnalisés COOH. La biopile microfluidique délivre jusqu'à 1,51 $\mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$ pour E = 230 mV. Il s'agit de la première biopile enzymatique microfluidique utilisant des enzymes immobilisées de manière covalente à la surface des électrodes. Le procédé mis au point pourrait être d'une grande aide dans le domaine des biopiles microfluidiques : il est applicable à n'importe quelle protéine et pourrait être combiné à des médiateurs redox également immobilisés à la surface des électrodes, comme par exemple des polymères redox à base de sels d'osmiums (notamment à chaîne aminée).

Ces biopiles enzymatique CotA/GOx viennent compléter les outils électrochimiques développés dans la partie 4. Tout un panel d'outils électrochimiques sont ainsi disponibles pour l'étude et l'évaluation approfondie de potentiels mutant de CotA optimisés par évolution dirigée des protéines. La partie suivantes décrit le développement d'une plateforme de criblage à très haut débit dédiée à l'évolution dirigée in vivo de CotA en utilisant la technologie de microfluidique digitale.

7 Développement d'une plateforme microfluidique pour l'évolution dirigée de la laccase CotA

L'objectif est de mettre au point une plateforme de microfluidique digitale pour l'évolution dirigée de la laccase CotA pour des applications en biopile enzymatique. La technique doit ainsi permettre le criblage à haut débit de l'activité de l'enzyme dans les conditions d'opérations de la futur biopile. Idéalement, la technique doit également permettre d'avoir un degré de liberté maximal dans le choix des conditions de criblage. Comme nous l'avons mentionné auparavant, une plateforme microfluidique a récemment été mise au point au laboratoire permettant l'expression *in vitro* de la laccase CotA au sein de microgouttelettes aqueuses et l'analyse cinétique de l'activité des microgouttelettes (*Mazutis et al. 2009b*) (voir 3.3.2). Même si cette plateforme est potentiellement exploitable pour l'évolution dirigée *in vitro* de CotA, son utilisation serait relativement compliquée. En effet, cela nécessiterait une étape préalable d'amplification du gène codant pour CotA en microgouttelettes suivie de deux étapes de fusion (une première pour introduire le mélange IVT puis une seconde pour introduire le substrat fluorogénique) et d'une étape de tri des microgouttelettes. Nous avons également vu que les systèmes *in vivo* sont une bonne alternative aux systèmes *in vitro* en n'étant pas, notamment, limités par les conditions de fonctionnement de l'IVT (voir 3.3.2 et 3.3.3). Pour ces raisons, nous avons choisi de suivre une stratégie *in vivo* et de manipuler des cellules *E. coli* exprimant la laccase CotA.

Deux stratégies différentes ont été menées. Dans un premier temps, nous avons tenté de développer une plateforme microfluidique complète intégrant encapsulation des cellules (après induction de l'expression de CotA) avec le substrat fluorogénique, incubation, mesure d'activité et sélection des microgouttelettes le tout sur la même puce microfluidique. Dans un second temps, une plateforme permettant l'induction de l'expression de CotA après encapsulation, l'injection du substrat fluorogénique au sein de chaque microgouttelette puis le tri des microgouttelettes (par FADS) a été développé. Cette plateforme microfluidique a été appliquée avec succès pour développer un criblage modèle pouvant être utilisé pour le criblage de banques de variants de la laccase CotA.

7.1 Matériel et méthodes

7.1.1 Réactifs

Le 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS), l'ampicilline, le *D*-glucose, le "droplet breaker", le Trypan blue, l'acide éthylène diamine tétracétique (EDTA) et le chlorure de cuivre (II) ont été achetés chez Sigma-Aldrich. L'isopropyl β -*D*-1-thiogalactopyranoside (IPTG), le milieu LB et LB Agar ont été commandés chez Roth. Le Dextran Texas Red (10000 MW), la Dextran Fluorescéine (10000 MW) et la fluorescéine ont été achetés chez Invitrogen. Les enzymes de restriction, la T4 DNA Ligase et la L'ADN polymérase ont été commandés chez New England BioLabs Inc. Le plasmide

pivex-GFP (codant pour la Green Fluorescent Protein (GFP)) a été construit et généreusement fourni par le Dr. Agathe Urvoas-Cisse (IBBMC ; Université de Paris-Sud 11).

7.1.2 Fabrication des puces microfluidiques

Les puces microfluidiques ont été fabriquées en modelant les canaux microfluidiques et les canaux des électrodes dans du PDMS en utilisant des procédés classiques de lithographie douce. La méthode générale est présentée en Figure 75. Typiquement, de la résine photosensible négative SU8-2015 (MicroChem Corp.) a été déposée à l'aide d'un spin coater (WS-400-6NPP-LITE ; Laurell Tech. Corp.) sur un wafer de silicium (Siltronix). La wafer a été exposé aux UV (aligneur de masque MJB3 ; SUSS MicroTech) à travers un masque de photolithographie. La structure a ensuite été révélée avec un solvant développeur (SU-8 developer ; MicroChem Corp.). Un mélange 9:1 (m/m) de PDMS (Sylgard 184 silicon elastomer) et d'agent réticulant (Dow Corning Corp.) dégazé sous vide a été coulé sur le wafer puis cuit à 65°C pendant au moins 2 h. La couche de PDMS réticulé a ensuite été démoulée et les entrées et sorties de fluide ont été percées avec un poinçon de diamètre 0,75 ou 0,5 mm. Après exposition des deux surfaces au plasma à O₂ (Plasma system FEMTO ; Diener Electronic), la couche de PDMS a été collée sur une lame de verre d'1 mm d'épaisseur. Les circuits contenant des électrodes ont été collés sur des lames de verres recouvertes d'une couche conductrice d'oxyde d'indium et d'étain (ITO) (Delta Technologies).

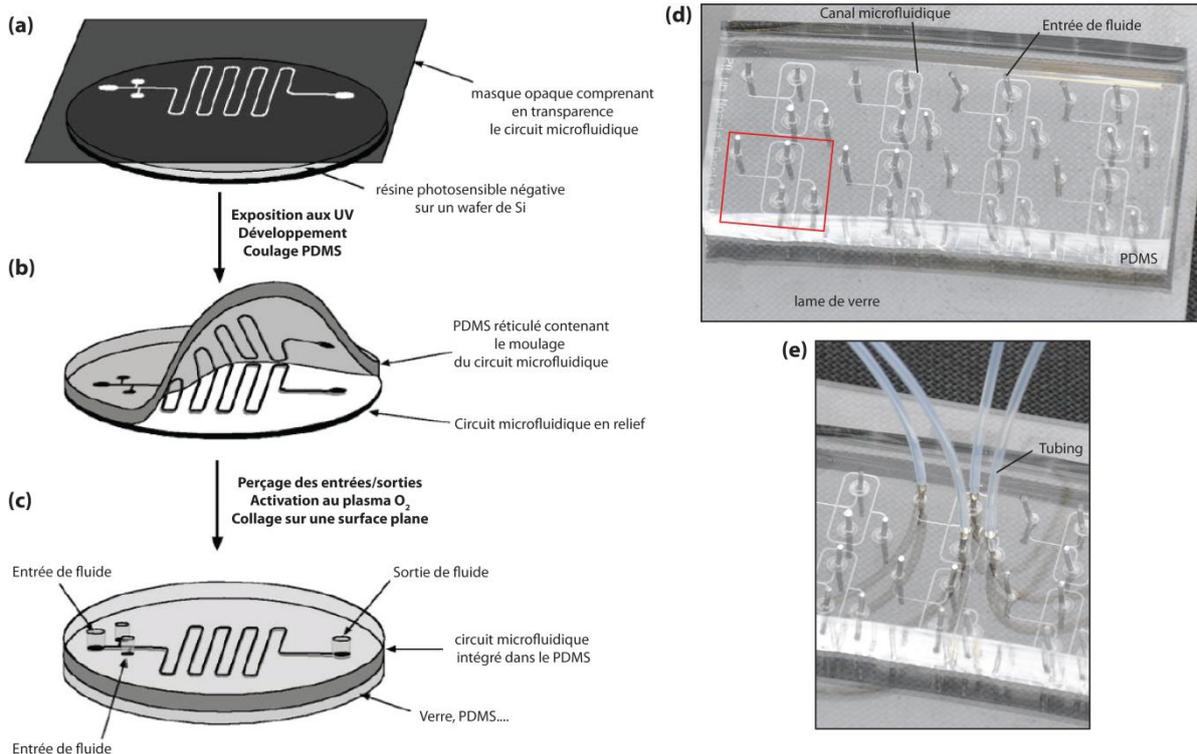


Figure 75 *Fabrication de puce microfluidique en PDMS par lithographie douce : (a-c) Les différentes étapes de fabrication sont indiquées. Adapté depuis le site internet du groupe du Prof. George Whitesides (<http://qmwgroup.harvard.edu>). (d) Photo d'une puce microfluidique : la couche de PDMS est collée sur une lame de verre et contient dans cet exemple huit circuits microfluidiques (un circuit est encadré en rouge). (e) Photo d'une puce microfluidique connectée aux tubing d'entrée et sortie des fluides*

Avant utilisation, les canaux microfluidiques ont été traités avec du 1H,1H,2H,2H-perfluorodécyltrichlorosilane (97%, ABCR) à 1 % dans de l'huile HFE7100 (Methoxy-nonafluorobutane) (3M) puis séchées avec N₂. Les canaux des électrodes ont été remplis avec du métal fondu : la puce microfluidique a été chauffée à 85°C et une soudure basse température (51In/32,5Bi/16,5Sn ; Indium Corp.) a été fondue à l'intérieur des canaux. Les connexions électriques dans les électrodes fondues ont été faites avec de petits fils électriques (Radiospares). La puce microfluidique a ensuite été refroidie puis exposée au plasma à O₂. Les connexions électriques ont été consolidées avec de la colle photoréticulable (Loctite 3526).

7.1.3 Utilisation des puces microfluidiques

Typiquement, chaque phase liquide a été injectée dans les canaux microfluidiques via un tubing en PTFE (∅0,56mm ou ∅0,3mm) connecté à une seringue de 1 mL, 2 mL ou 5 mL (Omnifix-F®, BBRAUN) munie d'une aiguille (∅0,6mm ou ∅0,4mm ; Terumo). La vitesse des flux de liquides ont été contrôlées par des pompes à seringue (PHD 22/2000, Harvard Apparatus) : de manière générale, 25-150 µL.h⁻¹ pour les phases aqueuses, 150-800 µL.h⁻¹ pour l'huile et 25-150 µL.h⁻¹ pour une émulsion réinjectée. La phase aqueuse comprenait soit du tampon, soit du milieu de culture comme indiqué dans la partie résultat 7.2. L'huile perfluorée qui a été utilisée est de l'HFE7500 (3-ethoxy-1,1,1,2,3,4,4,5,5,6,6,6-dodecafluoro-2-(trifluorométhyl)hexane) (3M) contenant soit 2 % de tensioactif EA (RainDance Technologies) soit 1 % de tensioactif Kry-Jeff₉₀₀ (Figure 76).

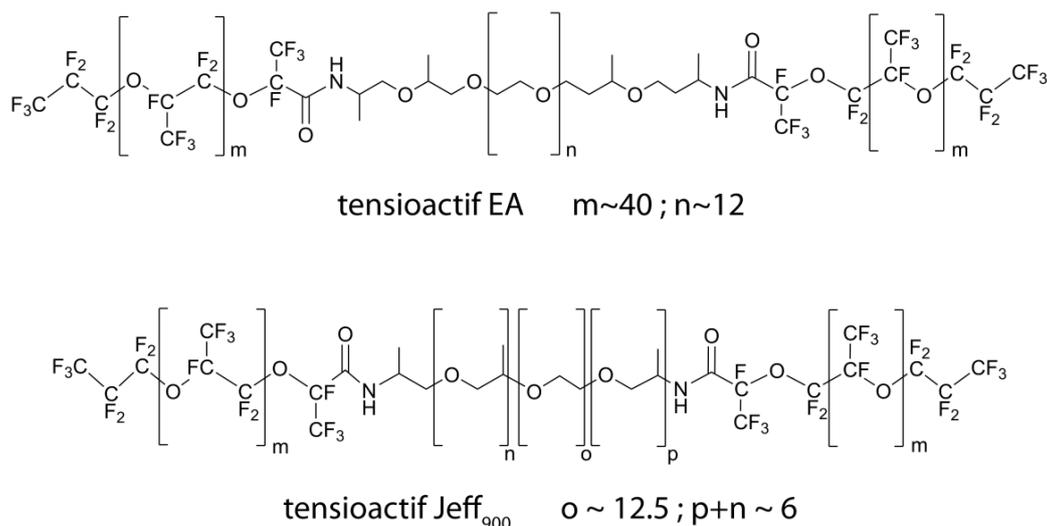


Figure 76 Structures des deux tensioactifs fluorés à base de PEG utilisés : le tensioactif EA (RainDance Technologies) est composé de deux queues poly(perfluoropropylène)glycol et d'une tête poly(éthylène)glycol (PEG). Le tensioactif Kry-Jeff₉₀₀ est composé de deux queues poly(perfluoropropylène)glycol et d'une tête poly(éthylène)glycol/poly(propylène)glycol. Le tensioactif Kry-Jeff₉₀₀ a été synthétisé au laboratoire par Jean-François Bartolo et Dr Estelle Mayot

Pour les modules comprenant des électrodes, les tensions continues ont été appliquées avec un générateur (TG315 ; TTI) connecté à un amplificateur (Mode 623B, Trek) amplifiant 1000 fois la tension appliquée. L'application de pulses électriques a été effectuée en couplant une carte FPGA délivrant la tension en fonction du signal de fluorescence avec l'amplificateur.

7.1.4 Détection des microgouttelettes et analyse de la fluorescence sur puce

La fluorescence des microgouttelettes a été mesurée au milieu du canal microfluidique de mesure en utilisant le montage optique décrit en Figure 77.

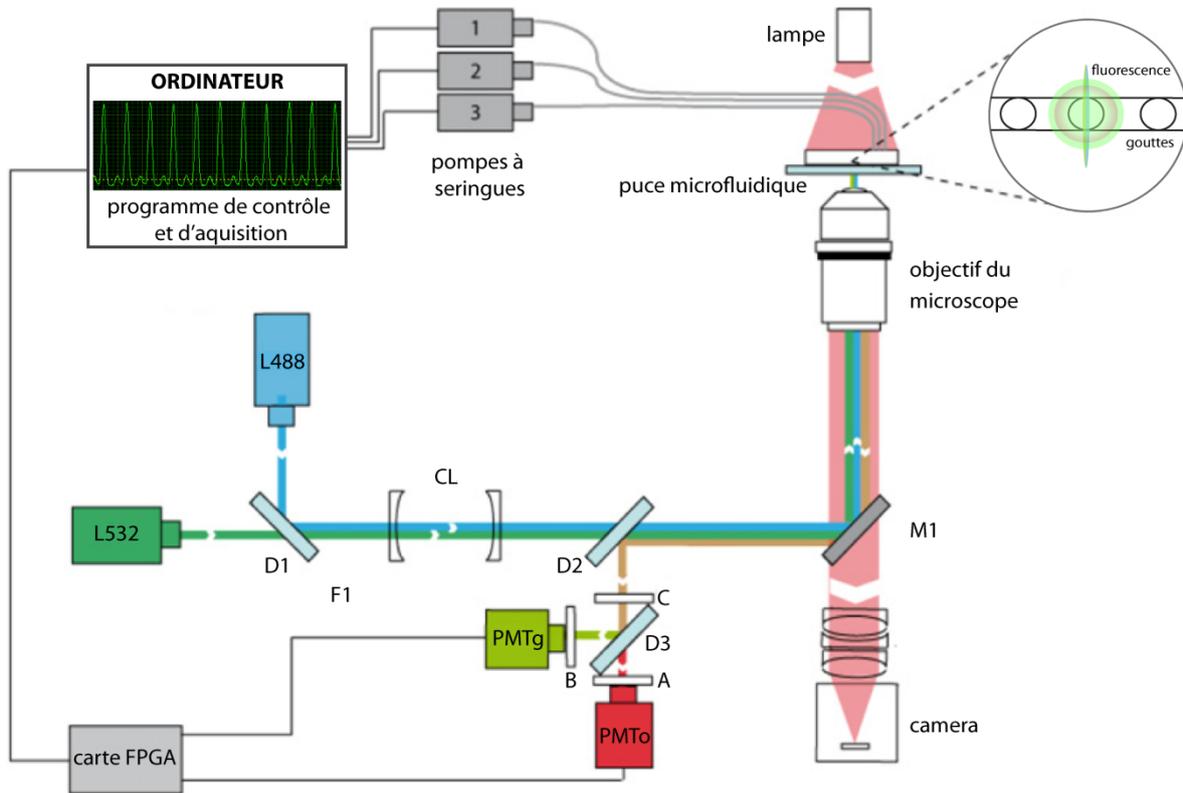


Figure 77 Montage optique du poste microfluidique utilisé. Adapté depuis Baret et al. 2010

Le système optique est composé d'un microscope inversé (Leica) monté sur une table optique (Thorlabs GmbH). Un laser solide 488 nm (20 mW ; Spectra-Physics Cyan ; L488) et un laser solide 532 nm (50 mW ; CrystaLaser CL2000 ; L532) ont été combinés avec un miroir dichroïque D1 (Di01-R488-25x36 ; Semrock) et un jeu de miroirs M1 (BB1-E02 ; Thorlabs GmbH). Les faisceaux laser ont été profilés en une ligne d'environ $10 \times 150 \mu\text{m}$ via la combinaison de lentilles cylindriques de diamètre 25 mm CL (LJ1878L2-A + LJ1653L1-A ; Thorlabs GmbH). À l'intérieur du microscope, la ligne laser a été réfléchiée vers le haut vers un objectif plan LD Neofluar 40 x/0,55 et focalisée en travers du canal microfluidique dans la puce microfluidique. Une caméra Guppy (Allied Vision) a été montée sur le port caméra supérieur du microscope pour prendre des images digitales des microgouttelettes au sein du canal microfluidique. La lumière émise par les microgouttelettes fluorescentes a été captée par l'objectif et acheminée en retour le long du trajet optique du laser. La lumière émise a été séparée du faisceau laser par un diviseur dichroïque 488/532/638 nm D2 (Di01-T488/532/638-25x36x5.0 ; Semrock) et dirigée à travers un filtre coupe-bande 488 et 532 nm C (NF01-488U-25 + NF01-532U ; Semrock). La lumière émise a ensuite été décomposée en deux composantes verte et orange par un miroir dichroïque D3 (FF562-Di02-25x36 ; Semrock). Chaque composante a été filtrée à travers un jeu de filtres et de lentilles B (FF01-626/26 ; Semrock + AC254-030-A1 ; Thorlabs GmbH) et A (FF01-514/30 ; Semrock + AC254-030-A1 ; Thorlabs GmbH) puis collectée dans deux tubes

photomultiplicateurs PMTg et PMTo (H5784-20 ; Hamamatsu Photonics). Les gains sur les tubes photomultiplicateurs (PMT) ont été optimisés pour pouvoir détecter la fluorescence sur une échelle dynamique de 3 log. L'acquisition des données et le contrôle ont été effectués par une carte d'acquisition de donnée multifonctions FPGA (PCI-7831R ; National Instruments) contrôlée par un programme écrit avec LabView 8.2 (National Instruments) par Dr. Jean-Christophe Baret et Dr. Lucas Frenz. La fréquence d'acquisition des données du système était de 100 kHz. La fluorescence verte et orange de chaque microgouttelette a été mesurée et enregistrée, ainsi que la largeur des microgouttelettes (relative à leur temps de passage). Le traitement des données a été effectué à l'aide du logiciel OriginPro 8.0. Les PMT transmettent un signal U en volts dépendant du gain appliqué sur la PMT. Afin de normaliser la valeur de U obtenue pour différents gains, nous avons défini une unité de fluorescence RFU comme telle : $RFU = U/G^{7,2}$ avec U et G en volts. L'exposant 7,2 a été fourni par le fabricant des PMT et vérifié expérimentalement.

7.1.5 Collecte et incubation hors puce des émulsions

Deux systèmes de collecte des émulsions hors puce ont été utilisés et sont schématisés en Annexe 4.

Technique 1 : une seringue d'1 mL (Omnifix-F®, BBRAUN) munie d'une aiguille ($\varnothing 0,6\text{mm}$; Terumo) a été connectée à un tubing en PTFE ($\varnothing 0,56\text{mm}$) en sortie du canal microfluidique de collecte. La seringue, contenant de l'huile HFE7500 avec du tensioactif, a été placée tête vers le bas sans piston. En fin de collecte, le piston a été replacé puis la seringue retournée et incubée sans aiguille (Figure 78a). L'émulsion a été réinjectée dans une autre puce microfluidique en poussant simplement la phase huile située sous l'émulsion après avoir muni la seringue d'une aiguille ($\varnothing 0,6\text{mm}$; Terumo) connectée à un tubing en PTFE ($\varnothing 0,56\text{mm}$) relié au canal d'entrée du module de réinjection.

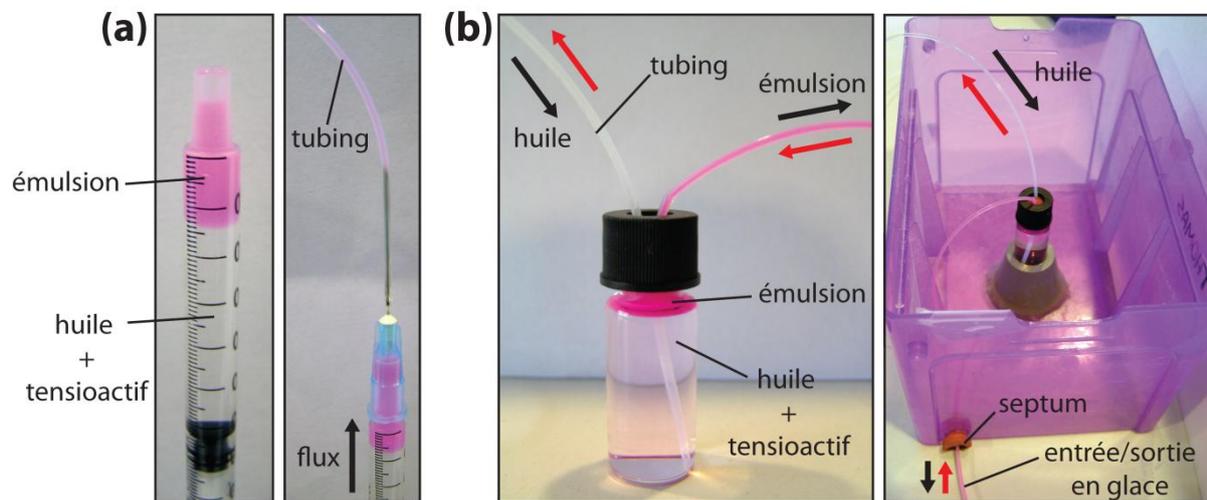


Figure 78 *Techniques de collecte et incubation hors puce des émulsions* : (a) *Technique 1*: images du système. Après collecte, la seringue est incubée sans aiguille pour favoriser l'oxygénation des bactéries. L'émulsion est réinjectée en poussant la phase huile située sous l'émulsion. (b) *Technique 2*: images du système. L'émulsion est collectée dans un vial hermétiquement fermé et fonctionne un sens (flèche rouge, collecte) comme dans l'autre (flèche noire, réinjection). Le vial est immergé dans un récipient complètement rempli de glace. L'émulsion pénètre dans le récipient à travers un septum

Technique 2 : le septum d'un vial a été percé de deux trous avec un poinçon ($\varnothing 0,5\text{ mm}$). Deux tubing en PTFE ($\varnothing 0,56\text{mm}$) ont été connectés au vial, l'un au fond et connecté à une seringue remplie d'huile HFE7500 contenant du tensioactif et l'autre au sommet du vial et destiné à être connecté à la

sortie du canal microfluidique de collecte. Avant d'être connecté en sortie de la puce microfluidique, le système a complètement été rempli avec de l'huile HFE7500 contenant du tensioactif. Après connexion, les microgouttelettes remplissent le vial en chassant l'huile. Le vial et les tubing ont été entièrement immergés dans la glace. L'émulsion a été réinjectée en connectant une seringue au tubing de sortie du vial : les flux sont inversés et l'huile chasse les microgouttelettes vers le canal d'entrée du module de réinjection. Pendant la réinjection, le système a été maintenu immergé dans la glace, permettant ainsi la collecte et la réinjection de l'émulsion à 0°C (Figure 78b).

7.1.6 Construction du plasmide pLOMP3 codant pour Δ CotA

Le plasmide pLOM10 codant pour CotA nous ont été cordialement fournis par le Professeur L.O. Martins (Universidade Nova de Lisboa ; Portugal) (Martins *et al.* 2002). Le plasmide codant pour le mutant inactif déphasé Δ CotA a été construit à partir du plasmide pLOM10 : un mélange contenant 44 μ L de plasmide pLOM10 (35 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$), 5 μ L de tampon NEB4 (10x) et 1 μ L d'enzyme de restriction aatII (20 $\text{U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) a été incubé 15 h à 37°C. 3 U d'ADN polymérase T4 et 200 μ M de dNTP ont été ajouté et le mélange incubé à 12°C pendant 15 min. La réaction a été quenchée avec 10 mM d'EDTA et le mélange incubé à 75°C pendant 20 min. L'ADN a été purifié sur kit de purification PCR (Qiagen) pour donner 50 μ L à 18 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$. Un mélange contenant 10 μ L de cet ADN (18 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$), 2 μ L de tampon ADN Ligase T4 (10x), 1 μ L d'ADN ligase T4 (400 $\text{U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) et 7 μ L d'eau ultrapure a été incubé à 25°C pendant 3h. Le plasmide obtenu a été transformé dans des cellules compétentes XI10 gold (Stratagene ; protocole Sambrook *et al.* 2001). 12 colonies ont été repiquées et analysées par séquençage: le plasmide pLOMP3 codant pour Δ CotA contient 4 délétions et a été conservé à -20 °C à une concentration d'environ 100 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$.



Figure 79 Construction du plasmide pLOMP3 : (a) Alignement des séquences de pLOM10 et pLOMP3. (b) Site de restriction de l'enzyme aatII

7.1.7 Mesure de l'activité CotA sur cellules

La souche *E. coli* C41(DE3) (Miroux *et al.* 1996) a été utilisée comme souche d'expression. Les plasmides ont été transformés dans des cellules *E. coli* C41(DE3) compétentes chimiquement (protocole Sambrook *et al.* 2001). Les cellules *E. coli* CotA et *E. coli* Δ CotA ont été mises en culture (37°C ; 230 rpm) dans 50 mL de milieu LB contenant de 0,1 mg/mL d'ampicilline et 0,25 mM de CuCl_2 jusqu'à ce que la densité optique à 600 nm (DO_{600}) atteigne 0,4 – 0,6 (début de phase exponentielle). L'expression des protéines a été induite par l'ajout d' 1 mM d'isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) et l'incubation poursuivie pendant 15 h (30°C ; 230 rpm). 5 ml des cultures ont été centrifugés (10 min ; 2000g) puis les cellules ont été lavées avec 5 mL de milieu LB contenant 0,1 mg/mL d'ampicilline. L'opération a été répétée trois fois puis la DO_{600} a été mesurée et ajustée pour avoir le bon nombre de cellule par volume ($\text{DO}_{600} = 1 \leftrightarrow 5 \cdot 10^8$ cellules/mL). L'activité des cellules *E. coli* CotA et *E. coli* Δ CotA a été mesurée au spectrofluorimètre (Molecular Devices, Spectramax M5) (545 nm ; 590 nm ; cutoff 570 nm) en mélangeant 50 μ L de cellules et 50 μ L de DYE (2x) (AUR 1 mM ; CuCl_2 2 mM dans du milieu LB). L'activité laccase a également été détectée en suivant l'oxydation de l'ABTS à 420 nm au spectrophotomètre (Molecular Devices, Spectramax M5).

7.1.8 Mesure de l'activité CotA en goutte

Les cellules *E. coli CotA* et *E. coli ΔCotA* ont été préparées en suivant le protocole décrit en 7.1.7. Un mélange *E. coli CotA*:*E. coli ΔCotA* (1:9) à 0,2 cellules/15 pL a été encapsulé dans des microgouttelettes de 15 pL avec 0,5 mM d'AUR et 1 mM de CuCl₂ en utilisant un module de co-flux (Annexe 7) et une phase huile HFE7500 contenant 2 % de tensioactif EA ($Q_{\text{huile}} = 450 \mu\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$; $Q_{\text{cellules}} = 40 \mu\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$; $Q_{\text{DYE}(x2)} = 40 \mu\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$). L'émulsion a été collectée dans une seringue (voir 7.1.5) puis incubée à température ambiante. L'émulsion a été réinjectée après différents temps d'incubation et la fluorescence orange mesurée dans un module de réinjection (voir 7.1.5).

7.1.9 Première plateforme microfluidique

Les cellules *E. coli CotA* et *E. coli ΔCotA* ont été préparées en suivant le protocole décrit en 7.1.7. Un mélange *E. coli CotA*:*E. coli ΔCotA* (1:9) à 0,2 cellules/15 pL a été encapsulé dans des microgouttelettes de 15 pL avec 0,5 mM d'AUR et 1 mM de CuCl₂ en utilisant le système décrit en Annexe 10 et une phase huile HFE7500 contenant 2 % de tensioactif EA ($Q_{\text{huile}} = 400 \mu\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$; $Q_{\text{cellules}} = 50 \mu\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$; $Q_{\text{DYE}(x2)} = 50 \mu\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$). La fluorescence à t_0 a été mesurée après formation des microgouttelettes puis l'émulsion a été densifiée avant son entrée dans la ligne de délai avec un extracteur d'huile ($Q_{\text{extraction}} = 100 \mu\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$). Les microgouttelettes ont été espacées en sortie de ligne de délai avec un flux d'huile HFE7500 ($Q_{\text{espaceur}} = 1000 \mu\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$) puis la fluorescence mesurée avant le tri des microgouttelettes.

7.1.10 Seconde plateforme microfluidique

7.1.10.1 Encapsulation des cellules

Les plasmides ont été transformés dans des cellules *E. coli* C41(DE3) compétentes chimiquement. Les cellules *E. coli CotA* et *E. coli ΔCotA* ont été mises en culture (37°C ; 230 rpm) dans 50 mL de milieu LB contenant de 0,1 mg/mL d'ampicilline et 0,25 mM de CuCl₂ jusqu'à ce que la DO₆₀₀ atteigne 0,4 – 0,6. 5 ml des cultures a été centrifugés (10 min ; 2000g) puis les cellules ont été lavées avec 5 mL de milieu LB inducteur contenant 0,1 mg/mL d'ampicilline, 0,25 mM de CuCl₂ et 1 mM d'IPTG. Un mélange *E. coli CotA*:*E. coli ΔCotA* (1:9) à 0,1 cellules/15 pL dans ce milieu inducteur a été encapsulé dans des microgouttelettes de 14 pL en utilisant un module de simple flux (Annexe 5) et une phase huile HFE7500 contenant 1 % de tensioactif Kry-Jeff₉₀₀ ($Q_{\text{huile}} = 190 \mu\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$; $Q_{\text{cellules}} = 80 \mu\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$). L'émulsion a été collectée dans une seringue (voir 7.1.5) puis incubée 15 h à 30°C.

7.1.10.2 Picoinjection du substrat AUR

L'émulsion a été réinjectée dans un module de picoinjection (Annexe 11) en utilisant une phase huile HFE7500 contenant 1 % de tensioactif Kry-Jeff₉₀₀ et une phase injectée contenant 0,5 μM d'AUR dans du milieu LB ($Q_{\text{huile}} = 200\text{-}600 \mu\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$; $Q_{\text{émulsion}} = 70\text{-}160 \mu\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$; $Q_{\text{injectée}} = 20\text{-}100 \mu\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$). Un champ électrique continu (20 kHz ; 200 V) a été appliqué pour induire la picoinjection. L'émulsion a été collectée après picoinjection dans un vial plongé dans la glace (voir Figure 78 et Annexe 4).

7.1.10.3 Tri des microgouttelettes

L'émulsion a été réinjectée dans un module de tri (Annexe 12) en utilisant une phase huile HFE7500 ($Q_{\text{huile}} = 500-1000 \mu\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$; $Q_{\text{émulsion}} = 20-70 \mu\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$) le vial étant toujours émergé dans la glace. Le temps d'incubation correspond alors au temps de séjour dans le tubing en dehors de la glace, soit environ 10 min avec les flux utilisés. Les microgouttelettes ont été triées en fonction de leur fluorescence en appliquant des pulses électriques (30 kHz ; 1000-1400 V ; 0,5 ms).

7.1.10.4 Récupération et identification des bactéries

Les microgouttelettes sélectionnées ont été collectées dans un tube eppendorf de collecte (Axygen). Une fois le tri fini, le tubing de collecte a été coupé à la base et le reste des microgouttelettes qu'il contenait a été dirigé vers le tube eppendorf de collecte par gravité. Le tubing a ensuite été rincé avec 200 μL de milieu LB. La totalité du contenu du tube eppendorf a été placé dans 10 ml de milieu LB contenant 0,1 mg/mL d'ampicilline à 37°C pendant 15 h. Une partie de l'émulsion non réinjectée dans le module de tri a également été placée dans 10 ml de milieu LB contenant 0,1 mg/mL d'ampicilline à 37°C pendant 15 h pour avoir un référence avant tri.

Les bactéries ont ensuite été identifiées suivant deux techniques différentes reposant sur un test ABTS :

Technique 1 : le protocole a été effectué avec les cultures "avant tri" et "après tri". Les bactéries ont été étalées sur boîte LB Agar contenant 0,1 mg/mL d'ampicilline. Les boîtes ont été incubées 15 h à 37°C. Une centaine de colonies ont été repiquées dans une microplaque 96 puits (Nunc) dans 1 mL de milieu LB contenant 0,1 mg/mL d'ampicilline, 0,25 mM de CuCl_2 et 20 mM de glucose. Des contrôles positifs contenant *E. coli CotA* (3 puits) et des contrôles négatifs contenant *E. coli ΔCotA* (3 puits) ou nonensemencés (3 puits) ont été effectués. La microplaque a été recouverte d'un film perméable aux gaz (ThermoFisher) et incubée 15 h à 37°C sous agitation (250 rpm). La microplaque a ensuite été centrifugée (10 min ; 1000 g) puis le milieu de culture a été remplacé par du milieu inducteur comprenant du milieu LB contenant 0,1 mg/mL d'ampicilline, 0,25 mM de CuCl_2 et 1 mM d'IPTG. La microplaque a été recouverte d'un film perméable aux gaz (ThermoFisher) et incubée 15 h à 30°C sous agitation (250 rpm). L'activité de chaque puit a été testée dans une microplaque 96 puits en mélangeant 50 μL de cellules avec 50 μL de tampon acétate (50mM ; pH4.5) contenant 0,5 mM d'ABTS. Les puits contenant *E. coli CotA* se colorent en vert.

Technique 2 : le protocole a été effectué avec les cultures "avant tri" et "après tri". Les bactéries ont été étalées sur boîte LB Agar contenant 0,1 mg/mL d'ampicilline, 0,25 mM de CuCl_2 , 1 mM d'IPTG et 5 mM d'ABTS. Les boîtes ont été incubées 15 h à 30°C puis placées 48 h à 4°C. Les colonies *E. coli CotA* se colorent en marron (Figure 80).

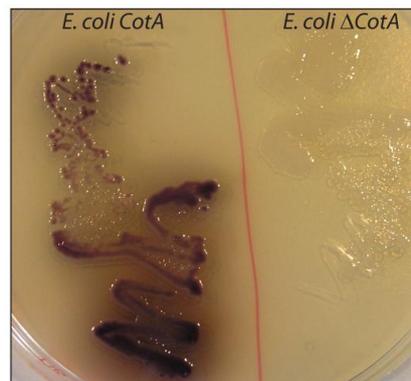


Figure 80 *Test CotA/ABTS sur boîte LB Agar* : Image d'une boîte de LB Agar contenant 0,1 mg/mL d'ampicilline, 0,25 mM de CuCl_2 , 1 mM d'IPTG et 5 mM d'ABTS sur laquelle des colonies *E. coli CotA* (gauche) et *E. coli ΔCotA* (droite) ont poussé 15 h à 30°C. La boîte a ensuite été placée 48 h à 4°C.

7.2 Résultats

7.2.1 Production des microgouttelettes aqueuses

Les microgouttelettes ont été produites en utilisant la focalisation hydrodynamique (voir 3.1.2.2). Deux types de géométrie ont été utilisées : simple flux (une seule phase aqueuse) ou co-flux (deux phases aqueuses). La géométrie en simple flux est présentée en Figure 81 . Le circuit a été testé en utilisant l'huile fluorée HFE7500 contenant 1 % de tensioactif Kry-Jeff₉₀₀ comme phase continue et du milieu LB contenant 2,5 μM de fluorescéine comme phase dispersée. Dans ces conditions, des flux $Q_{\text{huile}} = 190 \mu\text{L.h}^{-1}$ et $Q_{\text{aq}} = 80 \mu\text{L.h}^{-1}$ ont permis de produire des microgouttelettes aqueuses d'environ 14 pL à une fréquence de 1600 Hz. La mesure de la fluorescence des microgouttelettes permet de connaître la largeur de celles-ci au sein du canal microfluidique. L'histogramme en Figure 81b présente la distribution en taille des microgouttelettes formées : l'émulsion produite est hautement monodisperse. Le circuit permet la production stable sur plusieurs heures de microgouttelettes de volume allant de 10 à 25 pL à des fréquences comprises entre 1500 et 2000 Hz.

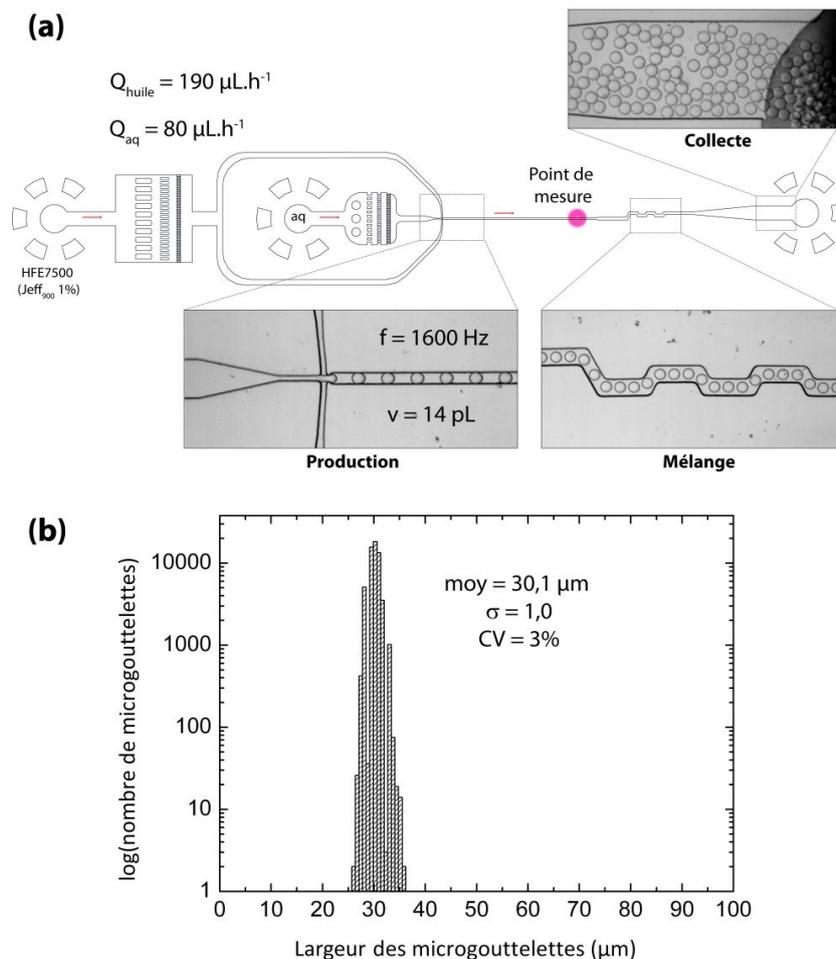


Figure 81 Production de microgouttelettes en simple flux : **(a)** Schéma du circuit microfluidique. La phase continue est composée de HFE7500 contenant 1% de Kry-Jeff₉₀₀ et la phase aq est composée de milieu LB contenant 2,5 μM de fluorescéine. La fluorescence ainsi que la largeur de chaque microgouttelette dans le canal microfluidique sont mesurées. **(b)** Histogramme représentant la distribution en taille des microgouttelettes produites par le système décrit en (a). Environ 50 000 microgouttelettes ont été analysées.

Cette géométrie simple flux peut être utilisée pour la production de deux types de microgouttelettes simultanément. Deux simples flux ont ainsi été associés sur la même puce microfluidique et permettent la production de deux populations de microgouttelettes (Figure 82).

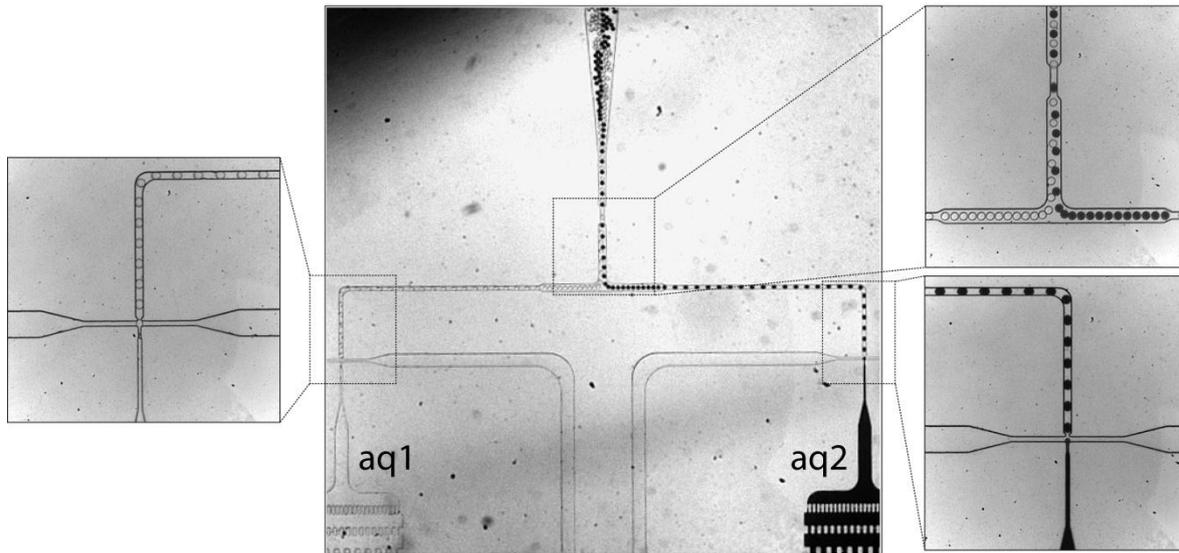


Figure 82 *Production de deux populations de microgouttelettes : une phase aqueuse 1 (blanche) est encapsulée à gauche tandis qu'une phase aqueuse 2 (noire) est encapsulée à droite. Les deux types de microgouttelettes sont réunis puis collectés pour fournir une émulsion hautement monodisperse en taille contenant deux populations de microgouttelettes : aq1 : milieu LB ; aq2 : milieu LB contenant du Trypan Blue (0,4%)*

Deux phases aqueuses peuvent aussi être co-encapsulées en utilisant une géométrie de co-flux (Figure 83).

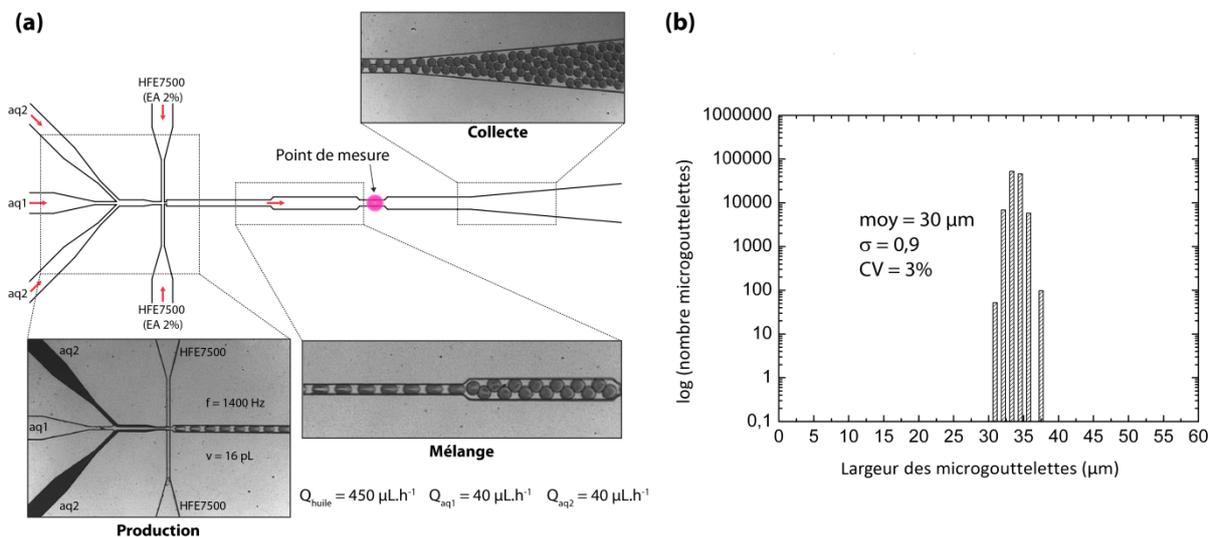


Figure 83 *Production de microgouttelettes en co-flux : (a) Schéma du circuit microfluidique. Les deux phases aqueuses aq1 (blanche) et aq2 (noire) sont co-encapsulées. La phase continue est composée de HFE7500 contenant 2% de tensioactif EA. aq1 : milieu LB et 5 µM de fluorescéine ; aq2 : milieu LB contenant du Trypan Blue (0,4%) (b) Histogramme représentant la distribution en taille des microgouttelettes produites par le système décrit en (a). Environ 200 000 microgouttelettes ont été analysées*

Le circuit a été testé en utilisant l'huile fluorée HFE7500 contenant 2 % de tensioactif EA comme phase continue et deux phases aqueuses en guise de phase dispersée, l'une contenant du milieu LB,

l'autre du milieu LB contenant 2,5 μM de fluorescéine. Dans ces conditions, des flux $Q_{\text{huile}} = 450 \mu\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$, $Q_{\text{aq1}} = 40 \mu\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$ et $Q_{\text{aq2}} = 40 \mu\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$ ont permis de produire des microgouttelettes aqueuses d'environ 16 μL à une fréquence de 1400 Hz. De manière générale, le circuit a permis la formation de microgouttelettes hautement monodisperse en taille (Figure 83b) d'un volume allant de 10 à 30 μL à des fréquences comprises entre 1000 et 2000 Hz.

Plusieurs systèmes microfluidiques ont donc été calibrés et utilisés pour la production d'émulsion hautement monodisperse en taille. Le volume des microgouttelettes peut être adapté en modifiant les différents flux et la formation des microgouttelettes est stable sur plusieurs heures. Ces dispositifs d'émulsification ont pu être appliqués à l'encapsulation précise de bactéries *E. coli* au sein de microgouttelettes aqueuses.

7.2.2 Encapsulation de bactéries

La répartition des bactéries au sein des microgouttelettes au moment de l'encapsulation suit une loi de Poisson et dépend de la concentration c en cellules avant encapsulation (voir 3.3.3) :

$$P_{(X=k)} = \frac{e^{-\lambda}}{k!} \lambda^k$$

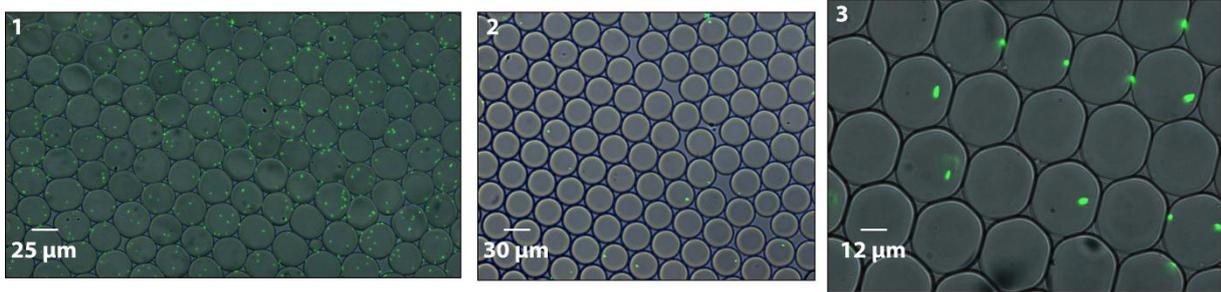
$\lambda = 1$	$\lambda = 0,2$	$\lambda = 0,1$
$P_{(X=0)} = 0,37$	$P_{(X=0)} = 0,818$	$P_{(X=0)} = 0,909$
$P_{(X=1)} = 0,37$	$P_{(X=1)} = 0,164$	$P_{(X=1)} = 0,090$
$P_{(X>1)} = 0,26$	$P_{(X>1)} = 0,018$	$P_{(X>1)} < 0,01$

où λ est la concentration en cellules avant encapsulation (cellule/volume_{microgouttelette}), k le nombre de cellules par microgouttelette et $P_{(X=k)}$ la probabilité d'avoir k cellules par microgouttelette.

Plus la concentration en cellules est élevée dans la phase aqueuse avant encapsulation, plus la probabilité d'avoir des encapsulations multiples est élevée. Il est primordial de s'assurer que les bactéries soient encapsulées à raison d'au maximum une bactérie par microgouttelette (voir 2.2). Afin de minimiser les risques de co-encapsulation, nous avons travaillé à une concentration en bactérie équivalente à 0,1 cellule par volume de microgouttelette. Dans ces conditions, d'après la distribution de Poisson, on attend théoriquement 91 % de microgouttelettes vides, 9 % de microgouttelettes contenant une seule et unique bactérie et moins de 1 % d'encapsulations multiples. Ces caractéristiques d'encapsulation ont été contrôlées expérimentalement en encapsulant des bactéries *E. coli GFP* (transformées avec le plasmide pivex-GFP) dans des microgouttelettes de 15 μL . Après culture des bactéries et induction de l'expression des protéines GFP, la concentration en bactérie a été ajustée à 0,1 cellule/15 μL après mesure de la densité optique à 600 nm (DO_{600} ; $\text{DO}_{600} = 1 \leftrightarrow 5 \cdot 10^8$ cellules/mL) puis les bactéries encapsulées. Après collecte, l'émulsion a pu être réinjectée dans un réservoir et observée au microscope à fluorescence (Figure 84a). La fluorescence verte des bactéries *E. coli GFP* a permis d'évaluer facilement les événements d'encapsulation. Lorsque le volume des microgouttelettes est correctement ajusté, les valeurs

théoriquement attendues ont été retrouvées avec environ 1 % des microgouttelettes contenant plus d'une seule bactérie.

(a)



(b)

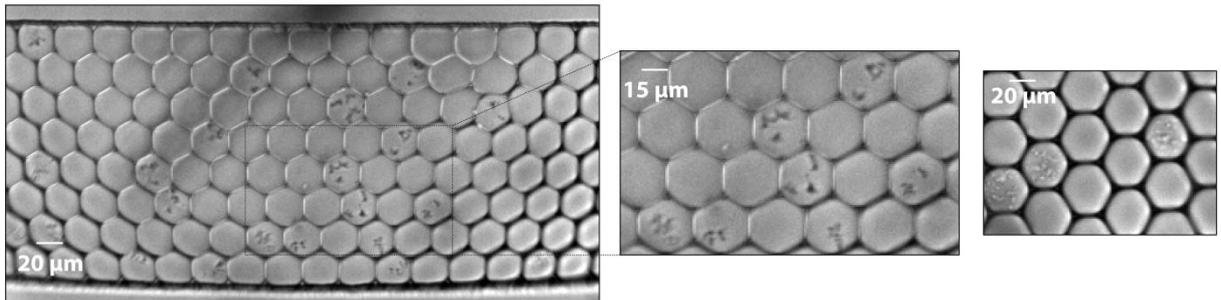


Figure 84 *Contrôle des caractéristiques d'encapsulation de bactéries :* (a) Images de bactéries *E. coli* GFP encapsulées dans des microgouttelettes aqueuses de 15 pL. (1) $c = 3$ cellules / 15 pL. (2 et 3) $c = 0,1$ cellule / 15 pL. Les microgouttelettes contiennent du milieu LB. La phase continue est HFE7500 contenant 2% de tensioactif EA. (b) Images de bactéries *E. coli* encapsulées dans des microgouttelettes aqueuses de 15 pL. L'émulsion est réinjectée et observée après 15 h d'incubation à 30°C

Le taux d'occupation des microgouttelettes a également été contrôlé en encapsulant des bactéries *E. coli* dans des microgouttelettes de 15 pL et en observant l'émulsion après 15 h d'incubation à 30°C (Figure 84b). Les bactéries survivent et se sont multipliées au sein des microgouttelettes. Le dénombrement des microgouttelettes vides et occupées est alors possible.

7.2.3 Incubation hors puce et la réinjection des microgouttelettes

Les deux techniques utilisées pour la collecte, l'incubation hors puce et la réinjection des émulsions sont détaillées en Annexe 4 et dans la partie 7.1.5. La collecte en seringue permet l'incubation des émulsions sur de longues durée avec survie et prolifération des bactéries. La collecte en vial permet la collecte, l'incubation et la réinjection d'émulsions à 0°C. Pour évaluer la stabilité de l'émulsion pendant ces manipulations, des microgouttelettes de milieu LB contenant 2,5 μM de fluorescéine ont été produites dans l'huile HFE7500 contenant 1 % de Kry-Jeff₉₀₀. Les émulsions ont été collectées, incubées hors puce puis réinjectées et analysées dans le circuit microfluidique décrit en Figure 85a. Les histogrammes de distribution de taille des microgouttelettes sont présentés en Figure 85b et c. Dans les deux cas, l'émulsion réinjectée est toujours monodisperse. La collecte et l'incubation 15h en seringue génère quelques événements de coalescence négligeables (1,8%). L'émulsion est intacte après collecte et incubation 1h en vial avec une coalescence inférieure à 0,5%.

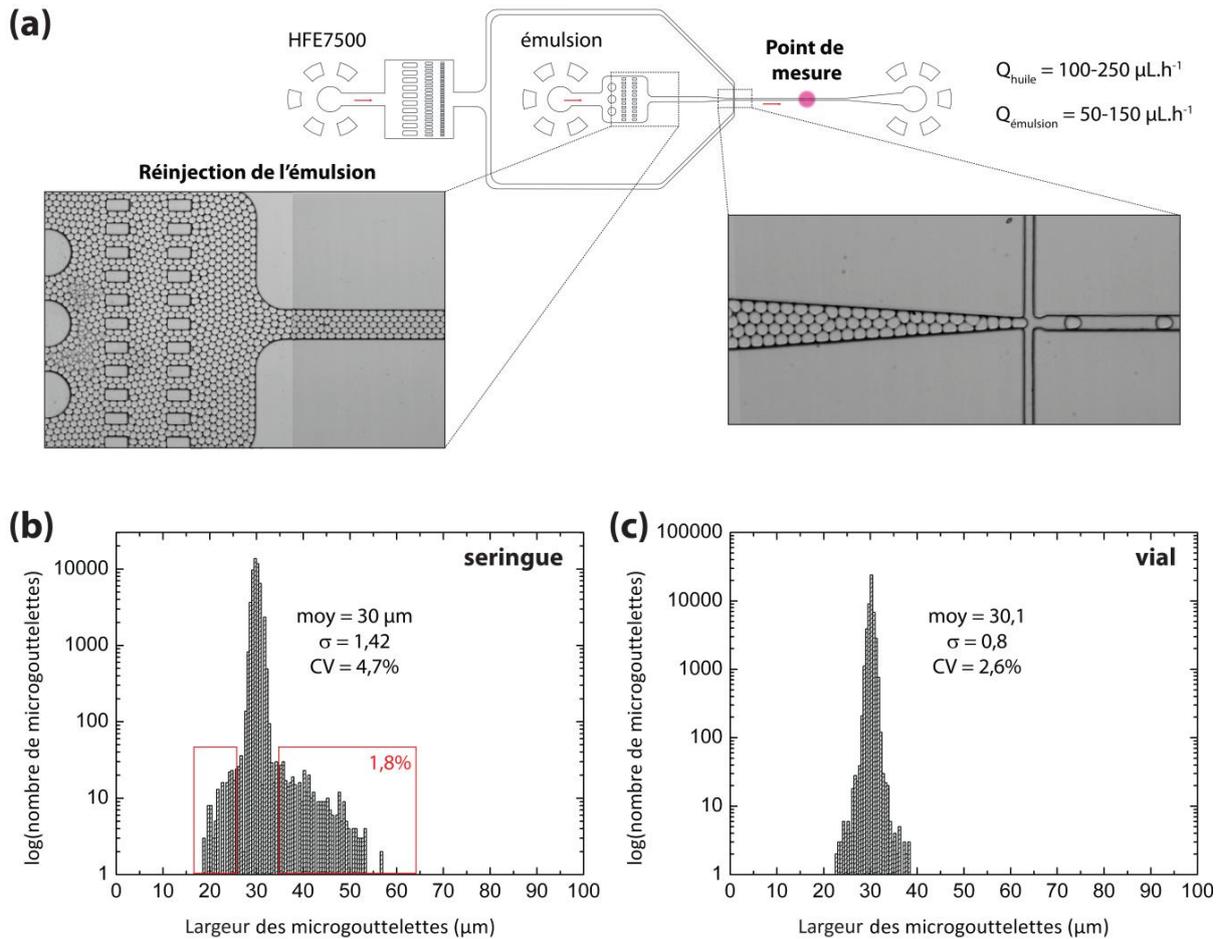


Figure 85 Méthodes de réinjection des microgouttelettes : (a) Schéma du circuit microfluidique. L'émulsion est réinjectée à $25-70 \mu\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$. Les microgouttelettes sont espacées par un flux d'huile HFE7500 ($150-200 \mu\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$) avant la mesure de fluorescence. Images de la réinjection après incubation en seringue 15 h à 30°C . (b) Histogramme représentant la distribution en taille des microgouttelettes réinjectées dans le système décrit en (a) après incubation en seringue 15 h à 30°C . Sur les 50 000 microgouttelettes analysées, environ 900 (1,8%) sont considérées comme étant des événements de coalescence (à l'extérieur de $30 \pm \sigma$). (c) Histogramme représentant la distribution en taille des microgouttelettes réinjectées dans le système décrit en (a) après incubation en vial 1h dans la glace. 50 000 microgouttelettes ont été analysées

Les expériences ont été répétées de nombreuses fois : les deux techniques permettent la réinjection des émulsions tout en garantissant la stabilité des microgouttelettes. Les techniques ont ainsi été appliquées avec succès dans ces travaux en fonction des nécessités. La collecte en seringue a permis l'incubation d'émulsion contenant des bactéries à 30°C en permettant leur survie grâce à une oxygénation suffisante. Au contraire, l'herméticité du vial a permis la collecte d'émulsion à 0°C en permettant l'immersion complète du système de collecte dans la glace, ceci pendant les processus de collecte, d'incubation et de réinjection.

7.2.4 Détection de l'activité enzymatique de CotA

La détection de l'activité enzymatique de CotA repose sur le test fluorogénique décrit dans la Figure 86a. Le substrat fluorogénique commercial Amplex® Ultra Red n'est pas fluorescent et est transformé en un fluorophore analogue de la résorufine dont le spectre de fluorescence est présenté en Figure

86b. La structure exacte de l'AUR n'est pas connue puisque la molécule est encore protégée par le fournisseur. Comme nous l'avons vu auparavant, l'oxydation à un électron de quatre molécules de substrat AUR s'accompagne de la réduction concomitante à 4 électrons de l'O₂ en H₂O (voir 1.2.5.1).

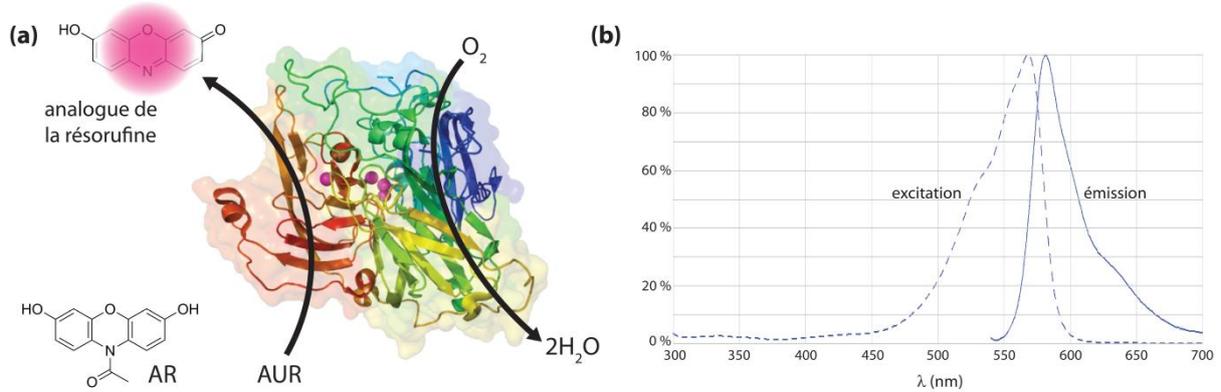


Figure 86 *Test fluorescent de l'activité CotA* : (a) Le substrat fluorogénique Amplex® Ultra Red (AUR), analogue de l'Amplex® Red (AR), est transformé en un fluorophore analogue de la résorufine. Dans le même temps, l'oxygène est réduit en eau. (b) Spectre de fluorescence (excitation/émission) du produit d'oxydation de l'AUR à pH 7.5 ($\lambda_{max_{exc}} = 568 \text{ nm}$; $\lambda_{max_{ém}} = 581 \text{ nm}$)

Le test fluorogénique a été évalué en utilisant des cellules *E. coli* CotA (transformées avec le plasmide codant pour CotA) dans des conditions proches de celles envisagées pour les systèmes microfluidiques (soit 0,1 cellule/15 pL et 0,5 mM d'AUR) et ce après induction de l'expression des protéines (Figure 87a).

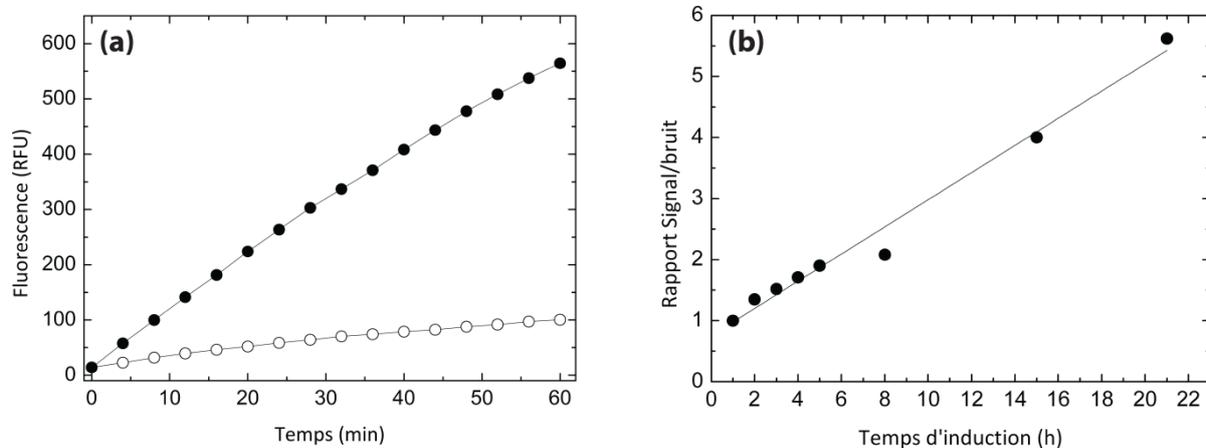


Figure 87 *Test fluorescent de l'activité CotA sur cellules E. coli CotA induites* : (a) Evolution du signal de fluorescence en fonction du temps : d'un mélange contenant 50 μL de cellules *E. coli* CotA (ronds noirs) ou *E. coli* ΔCotA (ronds blancs) et 50 μL de DYE (2x) (AUR 1 mM ; CuCl₂ 2 mM) dans du milieu LB. Les cellules ont été induites pendant 15 h, lavées puis diluées. (b) Influence du temps d'induction des cellules sur l'intensité du signal de fluorescence. Pour chacun des temps d'induction, les cellules ont été lavées puis diluées et la cinétique décrite en (a) a été effectuée. A chaque fois, le signal de fluorescence après 30 minutes de réaction a été pris comme référence

On constate que l'activité enzymatique de la laccase est nettement détectable par rapport au bruit de fond, avec un signal sur bruit d'environ 4 après 30 min de réaction (le témoin négatif est constitué de cellules *E. coli* ΔCotA produisant le mutant inactif déphasé ΔCotA). De manière logique, l'intensité du signal de fluorescence dépend du temps d'induction des cellules et le rapport signal/bruit ne

devient significatif qu'après au moins 15 h d'induction (Figure 87b). On considère en effet qu'un rapport signal/bruit d'au moins 4 ou 5 est nécessaire pour pouvoir raisonnablement trier les microgouttelettes par la suite.

Des tests de mesures de l'activité enzymatique en goutte ont ensuite été effectués. Un mélange de cellules *E. coli CotA* et *E. coli ΔCotA* (1:9) induites pendant 15 h ont été encapsulées avec le substrat AUR dans des microgouttelettes de 15 pL (0,1 cellule/goutte). L'émulsion a été incubée à 25°C puis réinjectée à différents temps de réaction pour mesurer la fluorescence des microgouttelettes. La Figure 88a présente l'évolution des fluorescences moyennes des deux populations de microgouttelettes (goutte vide ou *E. coli ΔCotA* dite "négative" / goutte *E. coli CotA* dite "positive") en fonction du temps. On constate que la réaction enzymatique a lieu au sein des microgouttelettes : le signal lié à la population positive augmente régulièrement pendant les deux premières heures puis atteint un plateau. Toutefois, le signal lié à la population négative augmente lui aussi régulièrement, bien que moins rapidement, et tend à rejoindre le signal positif : ceci est dû à la fuite du fluorophore analogue de la résorufine, produit de la réaction enzymatique. Il a en effet été démontré au laboratoire que la résorufine fuyait rapidement des microgouttelettes (Figure 88b) (*Mazutis 2009c*).

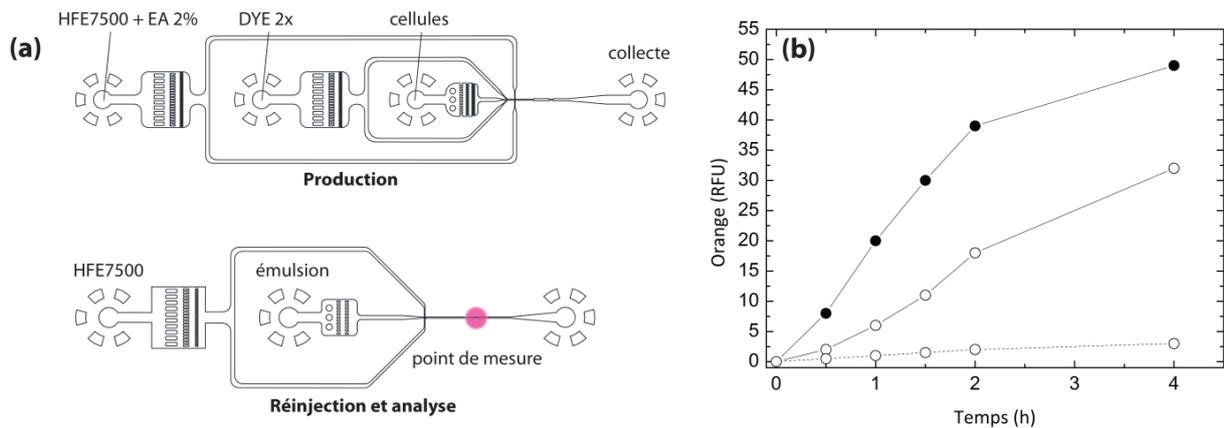


Figure 88 *Activité enzymatique de cellules E. coli CotA en goutte* : (a) Schématisation du dispositif de mesure de l'activité de CotA en goutte. Un mélange de cellules *E. coli CotA*:*E. coli ΔCotA* (1:9) induites pendant 15 h et lavées a été encapsulé avec le substrat AUR dans des microgouttelettes de 15 pL à 0,1 cellule/goutte dans une phase huile HFE7500 contenant 2 % de tensioactif EA en utilisant un module de co-flux. L'émulsion a été incubée hors puce puis réinjectée à différents temps pour mesure de fluorescence (b) Evolution du signal moyen de fluorescence des populations "positive" (*E. coli CotA* ; ronds noirs) et "négatives" (*E. coli ΔCotA* ; ronds blancs et trait plein) en fonction du temps d'incubation de l'émulsion. L'expérience a été répétée en utilisant uniquement des cellules *E. coli ΔCotA* (rond blancs et trait pointillé)

La fuite de résorufine est vraisemblablement due à deux phénomènes simultanés : la solubilisation d'une fraction de résorufine dans l'huile perfluorée et le transport micellaire au sein de la phase continue permettant aux molécules peu hydrophiles de diffuser d'une microgouttelette à une autre (*Mazutis 2009c* ; *Shkiri 2011* ; *Baret 2012*). Il existe plusieurs solutions pour limiter la fuite de la résorufine. La plus efficace consiste à changer ou modifier le substrat afin d'augmenter l'hydrophilicité du produit fluorescent. Il a par exemple été démontré que l'introduction d'un

groupement sulfonate était particulièrement efficace (*Woronoff et al. 2011*). Dans notre cas cependant, aucun autre test fluorescent de détection de l'activité laccase n'est disponible et la modification du substrat fluorogénique est délicate. La fuite de résorufine peut cependant être limitée en changeant d'huile perfluorée. En effet, l'huile HFE7500 est partiellement hydrogénée et les composées peu hydrophiles y sont partiellement solubles. L'utilisation de l'huile totalement fluorée FC-40 permet de diminuer la fuite (*Mazutis et al. 2009c*). La stabilité des microgouttelettes est cependant moindre dans cette huile, ce qui nécessite de travailler à de fortes concentrations en tensioactif pour maintenir l'intégrité de l'émulsion. La manipulation des microgouttelettes demeure tout de même beaucoup plus compliquée qu'avec l'huile HFE7500. De plus, le fait d'augmenter la concentration en tensioactif augmente également les échanges par transport micellaires et donc la fuite de résorufine. Bien que la fuite du produit d'oxydation de l'AUR semble moins rapide que celle de la résorufine, celle-ci demeure significative et doit être limitée. Deux possibilités sont pour cela envisageables : l'incubation des microgouttelettes au sein d'une ligne de délai (les échanges entre microgouttelettes en mouvement étant réduits) ou l'augmentation du signal de fluorescence, c'est-à-dire faire en sorte que la cinétique enzymatique de production du fluorophore soit significativement supérieure à la cinétique de fuite et permette en plus de réduire le temps d'incubation.

La première stratégie suivie visait à développer une plateforme microfluidique complètement intégrée afin de réaliser l'encapsulation, l'incubation et le tri des microgouttelettes au sein d'un unique circuit microfluidique. Ce système impliquait l'encapsulation de cellules induites avant encapsulation avec le substrat AUR dans des microgouttelettes de 15 pL (à raison d'une cellule par goutte), l'incubation au sein d'une ligne de délai d'environ 40 min, puis la détection de fluorescence et le tri en sortie de la puce microfluidique. Cette stratégie a cependant été abandonnée à cause d'un signal de fluorescence en sortie de ligne de délai trop faible (la réaction enzymatique étant en partie limitée par la diffusion du substrat à l'intérieur des cellules) et d'un protocole stressant pour les bactéries se soldant par un taux de survie cellulaire quasiment nul. Pour plus de détails, la plateforme est décrite en Annexe 9.

La plateforme microfluidique finalement mise au point repose sur l'induction et la croissance cellulaires en microgouttelettes avec incubation de l'émulsion en dehors de la puce microfluidique. Après incubation, le substrat fluorogénique est injecté dans chaque microgouttelette avant la détection de l'activité et le tri.

7.2.5 Mise au point d'une plateforme microfluidique pour l'évolution dirigée in vivo de CotA

La plateforme développée est décrite dans la Figure 89. De manière générale, un mélange de bactéries *E. coli CotA/E. coli ΔCotA* a été encapsulé dans des microgouttelettes de 14 pL contenant du milieu LB inducteur (1 mM d'IPTG). Les microgouttelettes ont été collectées en seringue (Figure 89a). Après incubation 15 h à 30°C pour expression des protéines, l'émulsion a été réinjectée dans un module de piconjection. Le substrat AUR a été injecté au sein de chaque microgouttelette et l'émulsion collectée en vial dans la glace (Figure 89b). L'émulsion a ensuite été réinjectée dans un module de tri, les microgouttelettes fluorescentes ont été triées et collectées puis les bactéries correspondantes recultivées et identifiées (Figure 89c).

Cette stratégie permet potentiellement de contourner certaines limitations rencontrées lors du développement de la première plateforme microfluidique :

- Eviter l'encapsulation de bactéries mortes en encapsulant des bactéries en plein phase de croissance dans du milieu inducteur.
- Faciliter la récupération des bactéries après tri en augmentant le nombre de bactéries au sein de chaque microgouttelette.
- Faciliter la réaction enzymatique en augmentant le nombre de bactéries au sein de chaque microgouttelette. Il a de plus été démontré que la croissance de bactéries dans un volume confiné entraîne la lyse d'une fraction des cellules (*Baret et al. 2009*). La laccase CotA serait alors libérée au sein de la microgouttelette et le substrat AUR n'aurait plus besoin de franchir la paroi cellulaire. La réaction enzymatique serait alors considérablement plus rapide et le temps d'incubation sensiblement réduit. La fuite du produit fluorophore serait alors limitée.

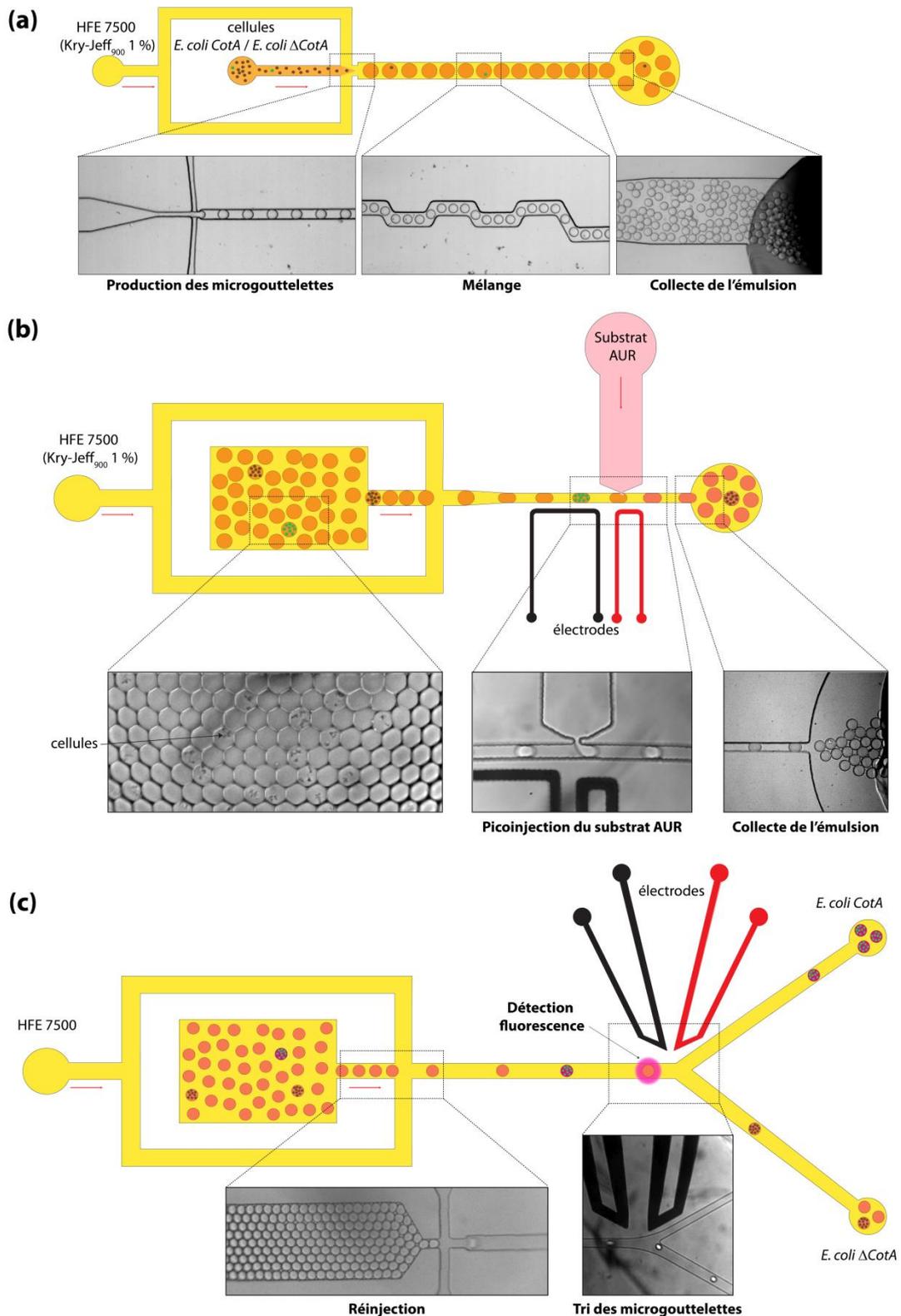


Figure 89 Seconde plateforme microfluidique : **(a)** Encapsulation des bactéries *E. coli* CotA et *E. coli* ΔCotA dans des microgouttelettes de 14 pL contenant du milieu LB avec 1 mM d'IPTG et 0,1 mg/mL d'ampicilline. La phase continue est composée de HFE7500 avec 1 % de Kry-Jeff₉₀₀. L'émulsion est collectée en seringue et incubée 15 h à 30°C. **(b)** Picoinjection : le substrat AUR est injecté au passage de chaque microgouttelette sous l'application d'un champ électrique continu. La phase continue est composée de HFE7500 avec 1 % de Kry-Jeff₉₀₀. L'émulsion est collectée en vial dans la glace. **(c)** FADS : l'émulsion, toujours dans la glace, est réinjectée dans un module de tri. Les microgouttelettes contenant les bactéries *E. coli* CotA sont sélectionnées sous l'application de pulses électriques. La phase continue est composée de HFE7500. Les bactéries sont ensuite récupérées, recultivées puis identifiées

7.2.5.1 Induction de l'expression des protéines en microgouttelettes

Cette plateforme microfluidique implique l'expression des protéines au sein des microgouttelettes. Plusieurs tests ont montré que les bactéries survivent et se reproduisent au sein des microgouttelettes après incubation pendant 15 h à 30°C (voir 7.2.2). D'autres tests ont été effectués pour s'assurer de l'expression des protéines lorsque les bactéries sont confinées au sein de ces microcompartiments (Figure 90). Dans un premier temps, le mélange *E. coli CotA/E. coli ΔCotA* a été encapsulé avec le substrat AUR et 1 mM d'IPTG pour induire l'expression des protéines. L'émulsion a été incubée à 30°C puis réinjectée à différents temps pour mesurer l'activité enzymatique au sein des microgouttelettes (Figure 90a). On constate que la fluorescence moyenne de la population "positive" (microgouttelettes contenant *E. coli CotA*) augmente de manière significative à partir de 6 h d'incubation à 30°C : l'expression des protéines est induite au sein des microgouttelettes à partir d'au moins 6 h d'incubation à 30°C. La fluorescence moyenne de la population "négative" ne varie quant à elle pas ou peu pendant 8 h. Ensuite, l'expression des protéines étant induite, le signal positif augmente considérablement tandis que la fuite du produit de la réaction enzymatique entraîne l'augmentation parallèle du signal négatif. Une émulsion similaire ne contenant pas d'inducteur IPTG ne fournit logiquement aucune fluorescence après incubation.

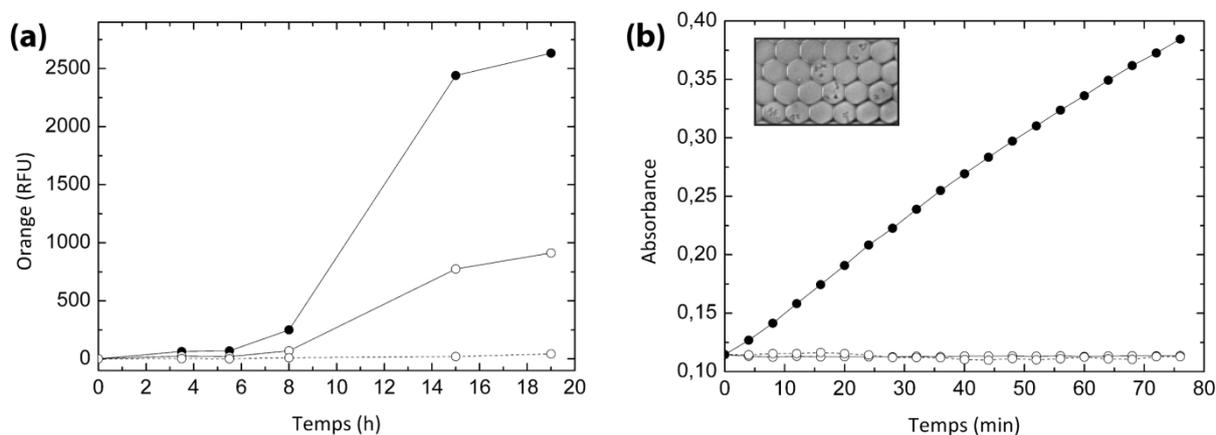


Figure 90 *Expression des protéines au sein des microgouttelettes* : (a) Evolution de la fluorescence moyenne des microgouttelettes en fonction du temps : un mélange *E. coli CotA/E. coli ΔCotA* (1/9) a été encapsulé dans des microgouttelettes de 14 pL contenant du milieu LB avec 0,1 mg/mL d'ampicilline, 0,25 mM de CuCl_2 et 1 mM d'IPTG et 0,5 mM d'AUR. L'émulsion a été incubée à 30°C puis réinjectée à différents temps pour mesurer la fluorescence moyenne de la population "positive" (ronds noirs) et de la population "négative" (ronds blancs, trait plein). L'expérience a été répétée sans IPTG dans la phase aqueuse et la fluorescence moyenne globale a été mesurée (ronds blancs, traits pointillés) (b) Mesure de l'activité CotA après cassage des microgouttelettes. Après incubation 0 h (ronds blancs, trait plein) ou 15 h (ronds noirs) à 30°C, l'émulsion contenant un mélange *E. coli CotA/E. coli ΔCotA* (1/9) dans du milieu inducteur a été cassée et 0,5 mM de substrat ABTS ont été ajoutés dans la phase aqueuse récupérée. Contrôle contenant uniquement le substrat ABTS (ronds blancs, traits pointillés). Insert : image de bactéries au sein des microgouttelettes après incubation 12 h à 30°C

Dans un second temps, une simple mesure de l'activité CotA globale a été effectuée après cassage des microgouttelettes en utilisant l'ABTS comme substrat (Figure 90b). Le mélange *E. coli CotA/E. coli ΔCotA* a été encapsulé avec 1 mM d'IPTG. Une partie de l'émulsion a été incubée 15 h à 30°C, l'autre partie a été cassée et analysée (0 h). Une activité CotA est détectée après 15 h d'incubation à 30°C

confirmant l'expression de protéines au sein des microgouttelettes. Ces résultats démontrent que l'expression des protéines peut effectivement être induite en microgouttelettes. Des cinétiques d'induction plus précises pourraient être effectuées en injectant le substrat AUR après différents temps d'incubation en microgouttelettes.

7.2.5.2 La piconjection du substrat AUR

La piconjection est une technique récemment développée permettant d'injecter un volume contrôlé au sein de chaque microgouttelette sous l'effet d'un champ à des fréquences de plusieurs kHz électrique (Abate *et al.* 2010) (voir 3.2.4). Le circuit microfluidique a été reproduit et mis au point au laboratoire avec l'aide du Dr. Faith Coldren pour aboutir au design décrit en Annexe 11. L'efficacité et la régularité de l'injection ont tout d'abord été contrôlés (Figure 91). Des microgouttelettes de 14 pL contenant du milieu LB, 0,1 mg/mL d'ampicilline et 2,5 μ M de fluorescéine ont été réinjectées dans un module de piconjection. Une phase aqueuse contenant du milieu LB et 20 μ M de Dextran Texas Red a été injectée dans les microgouttelettes et la fluorescence orange mesurée directement après l'injection (Figure 91a).

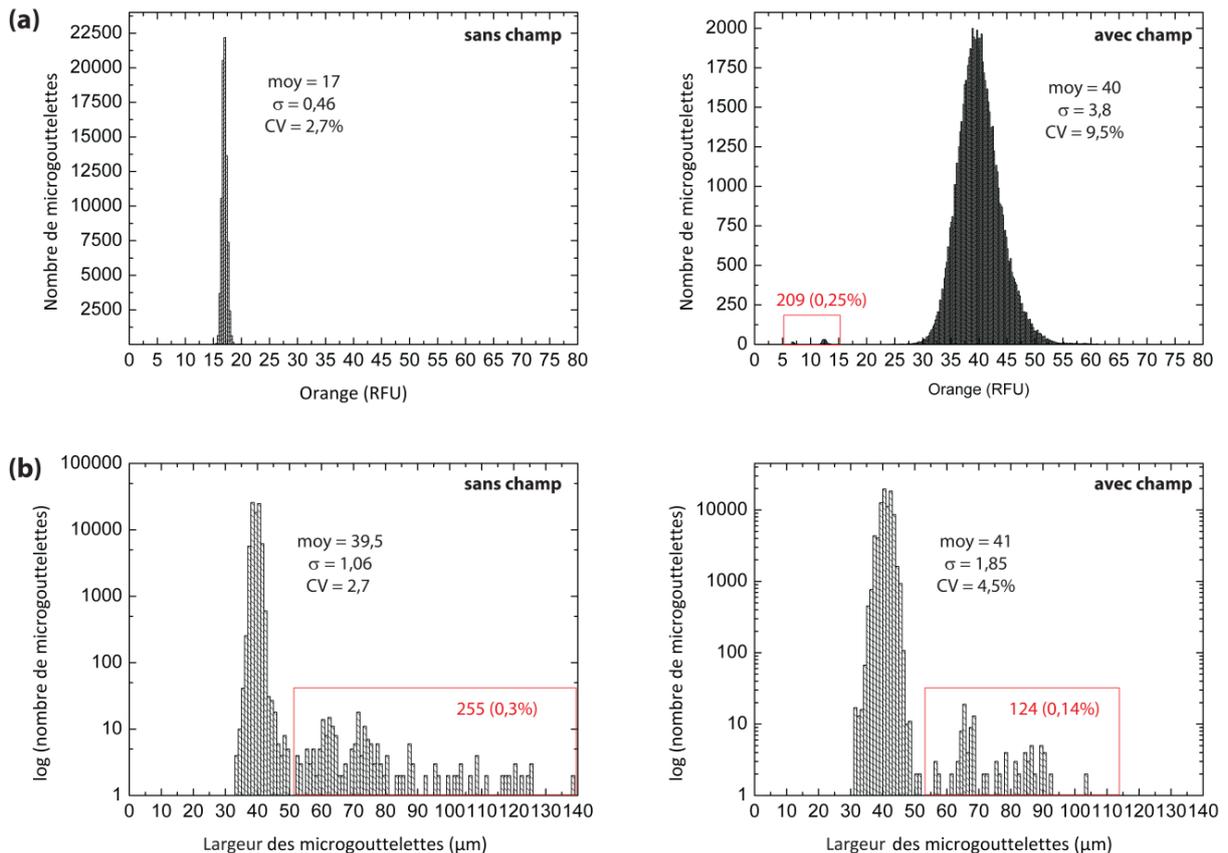


Figure 91 Contrôle de la piconjection : des microgouttelettes de 14 pL contenant du milieu LB avec 0,1 mg/mL d'ampicilline et 2,5 μ M de fluorescéine ont été réinjectées dans un module de piconjection (émulsion : 40 μ L.h⁻¹ ; HFE7500 Kry-Jeff₉₀₀ 1 % : 200 μ L.h⁻¹). Une phase aqueuse contenant du milieu LB avec 20 μ M de Dextran Texas Red est injectée (50 μ L.h⁻¹) ; Un champ électrique continu est appliqué (20 kHz ; 200 V) **(a)** Histogrammes représentant la distribution en fluorescence des microgouttelettes sans et avec champ électrique. La piconjection de Dextran Texas Red en présence de champ se traduit par l'apparition d'une nouvelle population de microgouttelettes. **(b)** Histogrammes représentant la distribution en taille des microgouttelettes sans et avec champ électrique

Lorsqu' aucun champ électrique n'est appliqué, l'injection de phase aqueuse n'a pas lieu (une seule population orange). Sous l'effet d'un champ électrique continu (20 kHz ; 200 V), la phase aqueuse est injectée et une nouvelle population de microgouttelettes apparaît. La picoinjection a bien lieu et la phase aqueuse est, dans le cas présenté, injectée dans 99,7 % des microgouttelettes à une fréquence de 500 Hz. La distribution en taille des microgouttelettes est toutefois moins monodisperse après injection (CV 9,5% contre CV 2,7% sans injection). Cette variabilité observée pourrait être due au temps de mélange quasiment inexistant entre le moment où la phase aqueuse est injectée et celui où la fluorescence est mesurée. La taille des microgouttelettes a également été mesurée sans et avec picoinjection en mesurant la fluorescence verte (Figure 91b). On constate dans ce cas que la distribution en taille des microgouttelettes varie peu (CV 4,5% contre CV 2,7% avant injection). La variation dans le volume injecté est négligeable. La phase aqueuse est poussée par une pompe à seringue (PHD 22/2000, Harvard Apparatus) rempli d'huile fluorée HFE7500. Le fait que le système ne soit pas régulé en pression explique cette légère variation dans le volume injecté. L'utilisation d'une pompe régulée en pression ou encore d'un flux contrôlé d'air comprimé pour pousser la phase aqueuse permettrait d'éliminer cette variabilité (Abate *et al.* 2010).

Le volume injecté peut être estimé en évaluant la variation de la taille de la microgouttelette avant et après injection. Dans nos conditions d'utilisation, le volume injecté est compris entre 0,5 et 1,5 pL suivant les conditions de manipulation.

Le volume injecté peut également être contrôlé en modifiant la vitesse et la fréquence de passage des microgouttelettes : plus les microgouttelettes passent vite et de manière rapprochée au niveau du picoinjecteur, plus le volume injecté sera faible et régulier. De façon plus générale, la picoinjection a permis d'injecter la phase aqueuse dans 97 - 99,9 % des microgouttelettes à des fréquences pouvant aller au moins jusqu'à 3200 Hz, les fréquences usuellement utilisées étant comprises entre 2000 et 2500 Hz. La variabilité du volume injecté est négligeable pour le développement d'une méthode de criblage modèle. Un système d'air comprimé régulé plus précisément en pression est en train d'être mis en place et permettra d'injecter de manière plus stable le substrat fluorogénique pour la sélection des banques de variants de CotA.

Le système a été appliqué à un système biologique : des bactéries *E. coli CotA* ont été encapsulées et l'expression de la laccase CotA a été induite au sein des microgouttelettes. Après 12 h d'incubation à 30°C, le substrat fluorogénique AUR a été injecté au sein de chaque microgouttelette, l'émulsion collectée en vial puis réinjectée dans un module de réinjection pour la mesure de fluorescence (Figure 92). Avant l'injection du substrat AUR, une seule population bien définie de microgouttelettes ne présentant pas de signal de fluorescence est visible (Figure 92a). La réinjection de l'émulsion après picoinjection montre l'apparition de signaux de fluorescence formant une population étirée correspondant aux microgouttelettes contenant des bactéries *E. coli CotA* (Figure 92b). La taille de

cette population dite "positive" est proche de la valeur théoriquement attendue (7,5 % de la population totale, contre 10 % théorique). L'activité enzymatique n'est pas identique dans chaque microgouttelette en raison de différences dans le niveau d'expression de la laccase et dans le taux de croissance des bactéries au sein de chacun des compartiments. Après picoinjection, les microgouttelettes ont été collectées en vial dans la glace puis réinjectée en maintenant l'émulsion dans la glace. La réaction enzymatique démarre donc au moment de l'injection du substrat, a lieu durant le trajet des microgouttelettes dans la courte partie du tubing en dehors de la glace, est stoppée à 0°C puis reprend au moment de la réinjection dans la partie du tubing en dehors de la glace. Avec les flux et les longueurs de tubing utilisés, le temps d'incubation total des microgouttelettes à température ambiante est estimé à environ 10 min.

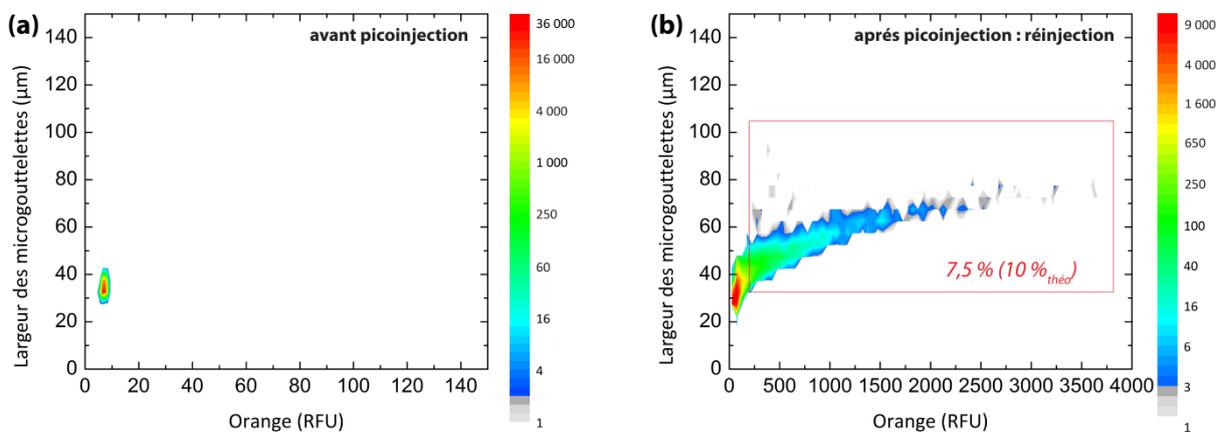


Figure 92 *Mesure de l'activité CotA après picoinjection* : (a) Histogramme 2D représentant la population de microgouttelettes de 14 pL après encapsulation et avant picoinjection. Les microgouttelettes contiennent des bactéries *E. coli* CotA (0,1 cellule/goutte) dans du milieu LB contenant 1 mM d'IPTG et 0,1 mg/mL d'ampicilline. Environ 100 000 microgouttelettes analysées (b) Histogramme 2D représentant les populations de microgouttelettes de 15 pL après picoinjection. L'émulsion a été collectée en vial dans la glace après injection du substrat AUR puis réinjectée dans un module de réinjection pour analyse de la fluorescence. Apparition d'un signal de fluorescence orange dans 7,5 % des microgouttelettes. Environ 100 000 microgouttelettes analysées

Afin de s'assurer que le signal de fluorescence provient bien des microgouttelettes contenant les bactéries *E. coli* CotA, deux populations de microgouttelettes ont été produites simultanément en utilisant un circuit possédant un double simple flux (voir Figure 82). D'un côté, des bactéries *E. coli* CotA ont été encapsulées dans des microgouttelettes marquées avec 1 µM de Dextran fluorescéine (population 1), de l'autre, des bactéries *E. coli* Δ CotA ont été encapsulées dans des microgouttelettes aqueuses marquées avec 5 µM de Dextran fluorescéine (population 2) (Figure 93a). Les deux populations de microgouttelettes ont été réunies et collectées en seringue. Après incubation 15 h à 30°C (expression des protéines et prolifération des cellules), le substrat AUR a été injecté et l'activité enzymatique mesurée comme décrit précédemment (Figure 93b). On remarque l'apparition du signal de fluorescence simplement au niveau de la population 1 contenant des microgouttelettes CotA. A l'inverse, la population 2 ne présente aucune évolution de son signal de fluorescence. Le

signal de fluorescence mesuré correspond bien à l'activité enzymatique de la laccase CotA au sein des microgouttelettes contenant des bactéries *E. coli CotA*.

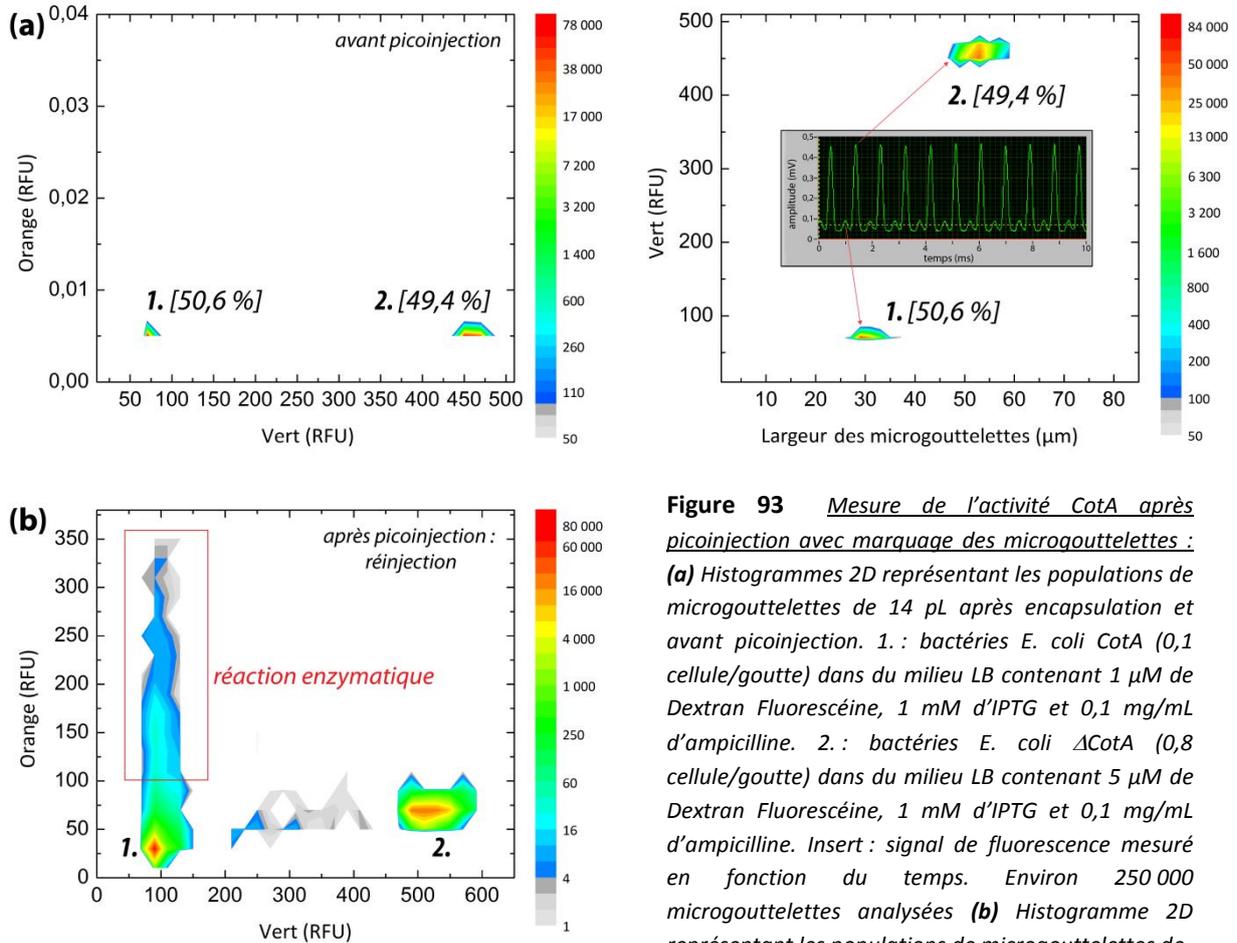


Figure 93 Mesure de l'activité CotA après

picoinjection avec marquage des microgouttelettes :

(a) Histogrammes 2D représentant les populations de microgouttelettes de 14 pL après encapsulation et avant picoinjection. 1. : bactéries *E. coli CotA* (0,1 cellule/goutte) dans du milieu LB contenant 1 μM de Dextran Fluorescéine, 1 mM d'IPTG et 0,1 mg/mL d'ampicilline. 2. : bactéries *E. coli ΔCotA* (0,8 cellule/goutte) dans du milieu LB contenant 5 μM de Dextran Fluorescéine, 1 mM d'IPTG et 0,1 mg/mL d'ampicilline. Insert : signal de fluorescence mesuré en fonction du temps. Environ 250 000 microgouttelettes analysées (b) Histogramme 2D représentant les populations de microgouttelettes de

15 pL après picoinjection et réaction enzymatique. Apparition d'un signal de fluorescence orange au niveau de la population 1 contenant *E. coli CotA*. Le signal de fluorescence de la population 2 contenant *E. coli ΔCotA* n'évolue pas. Environ 200 000 microgouttelettes analysées

Le système a enfin été appliqué aux conditions choisies pour le développement de la méthode de criblage modèle : un mélange (9/1) de bactéries *E. coli ΔCotA* et *E. coli CotA* à 0,1 cellule/goutte a été encapsulé dans du milieu LB contenant 0,1 mg/mL d'ampicilline et 1 mM d'IPTG (ainsi, 90 % des microgouttelettes sont vides, 9 % contiennent une bactérie *E. coli ΔCotA* et 1 % une bactérie *E. coli CotA*). L'émulsion a été incubée 15 h à 30°C puis soumise au même processus d'injection du substrat et de détection d'activité (Figure 94a). Le profil de fluorescence montre l'apparition d'une population positive correspondant à 0,9 % de la population totale (contre 1 % théorique). Le signal fluorescent se démarque nettement du signal fluorescent moyen de la population de microgouttelettes dites "négatives" avec un rapport signal sur bruit de 8. Ce signal de fluorescence est très satisfaisant et suffisant pour pouvoir trier les microgouttelettes positives en utilisant le FADS.

L'émulsion a ensuite été incubée à température ambiante et réinjectée à 40 et 90 min d'incubation. Les signaux de fluorescence mesurés ont permis de tracer une ébauche de la cinétique enzymatique

au sein des microgouttelettes (Figure 94b). Le signal de fluorescence de la population "positive" (ronds noirs) augmente significativement au cours du temps. On constate que le signal de fluorescence de la population "négative" augmente également en raison de la fuite de la résorufine, produit de la réaction enzymatique. Le signal est cependant suffisamment élevé après 10 min de réaction tandis que la cinétique de fuite de résorufine est suffisamment lente pour ne pas avoir d'incidence significative sur la valeur du rapport signal sur bruit (environ 8). Ensuite, l'augmentation du signal positif est compensé par la fuite rapide du produit de réaction et le rapport signal sur bruit diminue et stagne à environ 3. Afin de réaliser des mesures cinétiques plus précises et complètes, il serait nécessaire de placer une ligne de délai en sortie du picoinjecteur (par exemple une ligne de délai de 60 min avec des points de mesure de fluorescence toutes les 5 min).

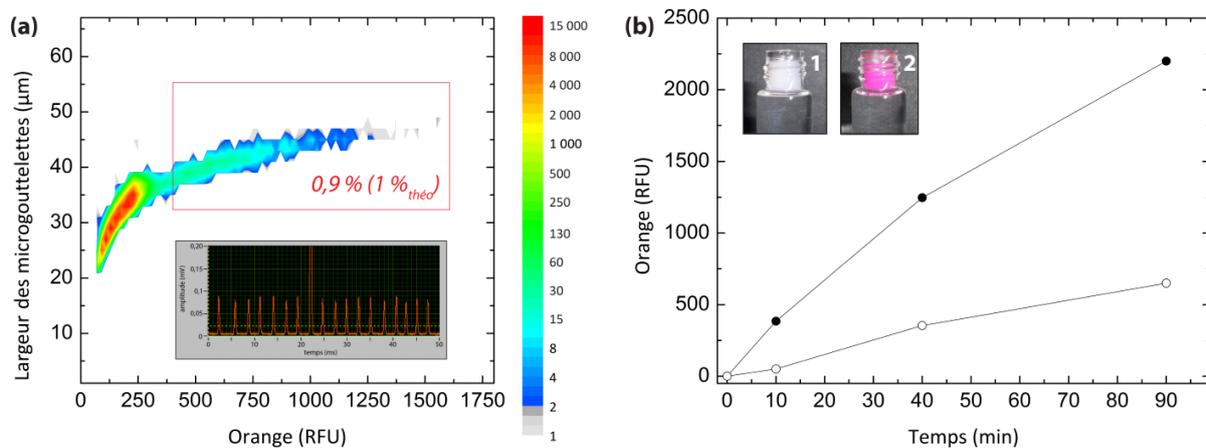


Figure 94 *Mesure de l'activité CotA au sein d'un mélange E. coli CotA/E. coli ΔCotA : (a) Histogramme 2D représentant les populations de microgouttelettes de 14 pL après encapsulation d'un mélange E. coli CotA/E. coli ΔCotA (1/9 ; 0,1 cellule/goutte) dans du milieu LB contenant 1 mM d'IPTG et 0,1 mg/mL d'ampicilline, incubation 15 h à 30°C, picoinjection du substrat AUR et réaction enzymatique. Apparition d'un signal de fluorescence orange dans 0,9 % des microgouttelettes. Insert : signal de fluorescence mesuré en fonction du temps. Environ 150 000 microgouttelettes analysées (b) Cinétique réactionnelle : évolution du signal de fluorescence moyen de la population "négative" (ronds blancs) et de la population "positive" (ronds noirs) en fonction du temps. Insert : images de l'émulsion collectée dans un vial après picoinjection à t = 0 min (1) et t = 120 min (2)*

Le système de picoinjection a ainsi été validé avec le système *in vivo* envisagé. Les microgouttelettes collectées après injection du substrat ont ensuite été triées en réinjectant l'émulsion dans un module de FADS.

7.2.5.3 Le tri et la récupération des bactéries

Le système de FADS a été utilisé pour trier les microgouttelettes après injection du substrat. Un protocole de récupération et d'analyse des bactéries sélectionnées a dans un premier temps été mis au point (Figure 95). Deux populations de microgouttelettes (14 pL) de milieu LB contenant 0,1 mg/mL d'ampicilline et 1 mM d'IPTG ont pour cela été produites simultanément : une population 1 contenant des bactéries *E. coli ΔCotA* (0,8 cellule/goutte) et marquée avec 5 µM de Dextran Texas Red et une population 2 contenant des bactéries *E. coli CotA* (0,1 cellule/goutte) et marquée avec 30 µM de Dextran Texas Red (Figure 95a gauche). Les deux populations de microgouttelettes ont été

réunies sur puce et collectées en seringue. Après incubation 15 h à 30°C pour expression, l'émulsion a été réinjectée dans un module de FADS et la population 2 (présentant une fluorescence orange six fois supérieure) a été sélectionnée (Figure 95a droite).

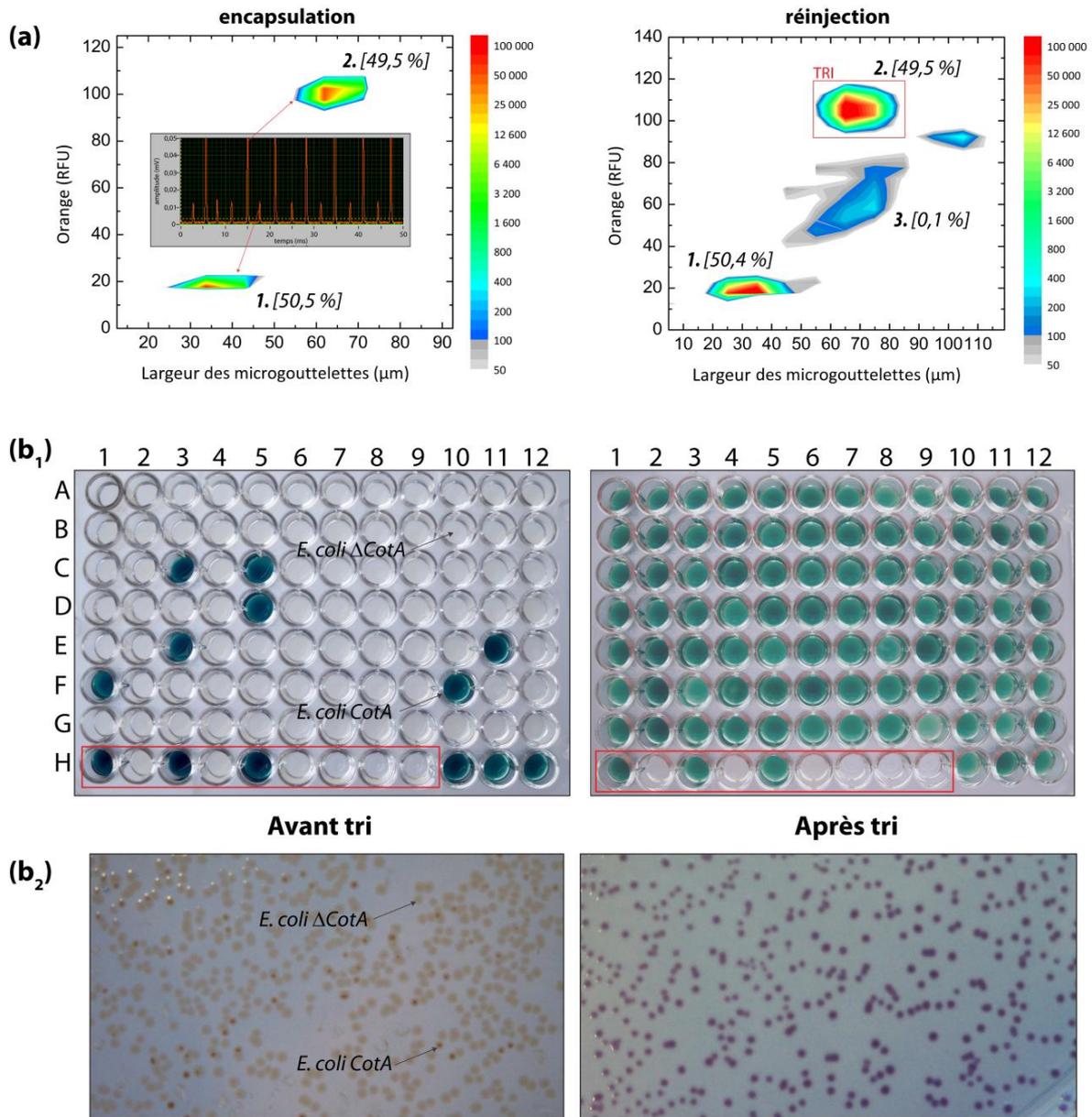


Figure 95 *Tri des microgouttelettes / récupération et analyse des bactéries triées*: (a) Histogrammes 2D représentant les populations de microgouttelettes de 14 μ L après encapsulation et après réinjection dans un module de FADS. 1.: bactéries *E. coli* Δ CotA (0,8 cellule/goutte) dans du milieu LB contenant 5 μ M de Dextran Texas Red, 1 mM d'IPTG et 0,1 mg/mL d'ampicilline. 2.: bactéries *E. coli* CotA (0,1 cellule/goutte) dans du milieu LB contenant 30 μ M de Dextran Texas Red, 1 mM d'IPTG et 0,1 mg/mL d'ampicilline. Insert: signal de fluorescence mesuré en fonction du temps. L'émulsion a été réinjectée dans le module de tri à 30 μ L.h⁻¹ (huile: 700 μ L.h⁻¹; fréquence de tri: 200 Hz). 3.: coalescence. La population 2 est sélectionnée (champ électrique: 30 kHz; 1200 V). Environ 10⁶ microgouttelettes analysées (b) Méthodes d'identification des bactéries avant et après tri. Les microgouttelettes sélectionnées ont été collectées dans 200 μ L de LB puis mises en culture (15 h; 37°C) dans 10 mL de milieu LB contenant 0,1 mg/mL d'ampicilline. (b₁) Les bactéries ont été étalées sur boîte LB Agar puis cultivée séparément en microplaque 96 puits. Un test ABTS révèle l'activité de CotA (coloration verte). Les puits dans le rectangle rouge sont des contrôles (3 *E. coli* CotA et 3 *E. coli* Δ CotA alternés puis 3 puits sans bactéries). (b₂) Les bactéries ont été étalées sur boîte LB Agar contenant 1 mM d'IPTG et 5 mM d'ABTS. Après incubation, les bactéries *E. coli* CotA se colorent en bordeaux. Le processus a été appliqué à l'émulsion avant tri

Les microgouttelettes sélectionnées (60 000) ont été collectées dans un tube eppendorf. Le tout a été mis en culture (15 h ; 37°C) dans 10 mL de milieu LB contenant 0,1 mg/mL d'ampicilline. Les bactéries ont ensuite été soit étalées sur boîte de LB Agar ampicilline puis identifiées après culture en microplaque via un test colorimétrique ABTS (coloration verte en présence de CotA) (Figure 95b₁), soit directement étalées sur boîte LB Agar ampicilline contenant 1 mM d'IPTG et 5 mM d'ABTS (coloration bordeaux en présence de CotA) (Figure 95b₂). Les bactéries ont ainsi pu être identifiées avec succès avant et après tri (Figure 95b). Avant tri, l'émulsion contient théoriquement un mélange (*E. coli CotA*:*E. coli ΔCotA*) de (1:8), ce qui est confirmé par les deux techniques d'identification. Après tri, l'émulsion est enrichie en population 2 et ne contient que des bactéries *E. coli CotA*. Ce système de tri et de récupération des bactéries a été associé au protocole de picoinjection décrit dans la partie précédente et utilisé pour trier des mélanges (*E. coli CotA*:*E. coli ΔCotA*) et développer une méthode de criblage modèle pour l'évolution dirigée de CotA.

7.2.5.4 Développement d'une méthode de criblage modèle

Une méthode de criblage modèle pour l'évolution dirigée de CotA a été développée en appliquant la technique de criblage décrite précédemment (7.2.5.2 et 7.2.5.3) sur des mélanges (*E. coli CotA*:*E. coli ΔCotA*). Plusieurs conditions de criblage ont été testées en faisant varier le seuil de tri (défini comme étant le rapport entre le niveau de fluorescence minimum pour lequel une microgouttelette est triée et le signal moyen de fluorescence de la population "négative"), le rapport (*E. coli CotA*:*E. coli ΔCotA*) de départ (ε_0), le nombre de gouttes triées ou encore la fréquence de tri. A chaque fois, la composition de d'émulsion avant et après tri a été analysée avec les techniques décrites en 7.2.5.3 (Figure 96).

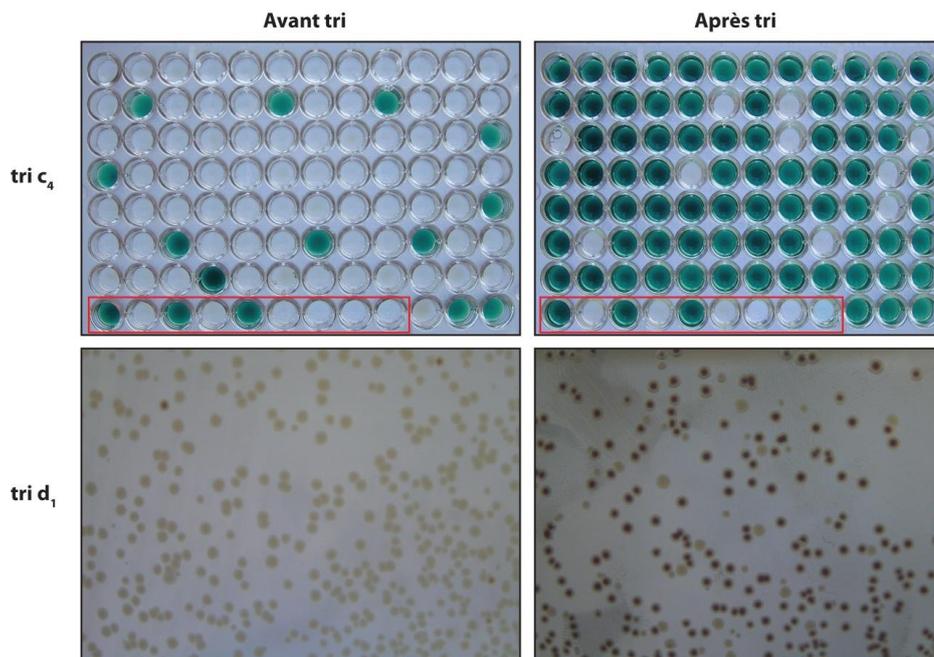


Figure 96 Sélection modèle : analyse des tris : tri c_4 : avant tri ($\varepsilon_0 = 0,16$ (théoriquement 0,11)) et après tri ($\varepsilon_1 = 7,7$). Les puits dans le rectangle rouge sont des contrôles (3 *E. coli CotA* et 3 *E. coli ΔCotA* alternés puis 3 puits sans bactéries). Tri d_1 : avant tri ($\varepsilon_0 = 0,009$ (théoriquement 0,01)) et après tri ($\varepsilon_1 = 3,83$)

Le rapport (*E. coli* CotA:*E. coli* Δ CotA) avant tri (ε_0) ainsi que le rapport (*E. coli* CotA:*E. coli* Δ CotA) après tri (ε_1) ont ainsi été déterminés pour chacun des tris effectués. Les différentes conditions de criblages et les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau 5. L'enrichissement η est défini comme étant le rapport $\varepsilon_1/\varepsilon_0$. Pour chaque criblage, un enrichissement maximal théorique ($\eta_{\text{théo}}$) peut être déterminé à partir de ε_0 et du nombre moyen de cellules encapsulées par microgouttelette (λ) en se basant sur une distribution de Poisson lors de l'encapsulation des bactéries (voir 3.3.3 ; Baret et al. 2009) :

$$\eta_{\text{théo}} = \frac{1}{1 - e^{-\varepsilon_0 \lambda / (1 + \varepsilon_0)}}$$

Le nombre moyen de cellules encapsulées par microgouttelette λ a été contrôlé à chaque criblage en analysant des images de l'émulsion après incubation et avant picoinjection (voir Figure 84). La valeur de λ a été déterminée avec l'équation suivante :

$$\lambda = -\ln(1 - k) \quad \text{où } k \text{ est la fraction de microgouttelettes occupées par des cellules}$$

	λ	ε_0	Nombre de gouttes triées	Seuil de tri	F (Hz)	η	$\eta_{\text{théo}}$
tri a ₁	0,10	0,117 (0,11)	1000	1,5	150	33	95
tri a ₂	0,10	0,117	1000	1,5	200	16	95
tri a ₃	0,10	0,117	2000	2	150	13	95
tri b ₁	0,186	0,074 (0,11)	500	4	200-250	19	77
tri b ₂	0,186	0,074	500	3	200-250	24	77
tri c ₁	0,170	0,16 (0,11)	300	2	250	1	42
tri c ₂	0,170	0,16	450	4	250	7	42
tri c ₃	0,170	0,16	500	4,5	250	11	42
tri c ₄	0,170	0,16	150	14,5	300	48	42
tri d ₁	0,135	0,009 (0,01)	150	2	350-400	437	830
tri e ₁	0,071	0,082 (0,11)	50	2	350	2	185
tri e ₂	0,071	0,082	50	2,7	350-400	-	185
tri e ₃	0,071	0,082	150	4	350	64	185
tri e ₄	0,071	0,082	200	12	300	89	185
tri e ₅	0,071	0,082	160	16	350	191	185
tri e ₆	0,071	0,082	250	17	800	13	185
tri e ₇	0,071	0,082	700	3,5	800	3	185
tri e ₈	0,071	0,082	400	7,5	700	-	185

Tableau 5 Développement d'une méthode de criblage modèle : conditions des différents tris effectués et résultats obtenus. Les tris x_i ont été réalisés le même jour à partir de la même émulsion en faisant varier les paramètres de sélection

Les tris x_i ont été réalisés à partir de la même émulsion en faisant varier les paramètres de sélection. Le système a dans un premier temps été validé à une fréquence de tri allant jusqu'à 400 Hz. L'efficacité du tri dépend de plusieurs facteurs. On remarque tout d'abord que, pour une fréquence de tri constante, l'enrichissement atteint dépend intimement du seuil de tri. En effet, plus la sélection se fait à un signal de fluorescence supérieur à celui de la population "négative", plus l'enrichissement augmente (Figure 97). On constate que l'enrichissement augmente linéairement en fonction de l'augmentation du seuil de tri (Figure 97a). Dans les cas du tri c ou e, l'enrichissement augmente jusqu'à atteindre l'enrichissement théorique maximal pour des seuils de tri supérieur à environ 15. Les images de boîte LB Agar en Figure 97 montrent l'évolution du mélange de bactéries après tri dans le cas du tri e. La tendance est également valable dans le cas de l'ensemble des tris effectués et est indépendante de la fréquence de tri (Figure 97b).

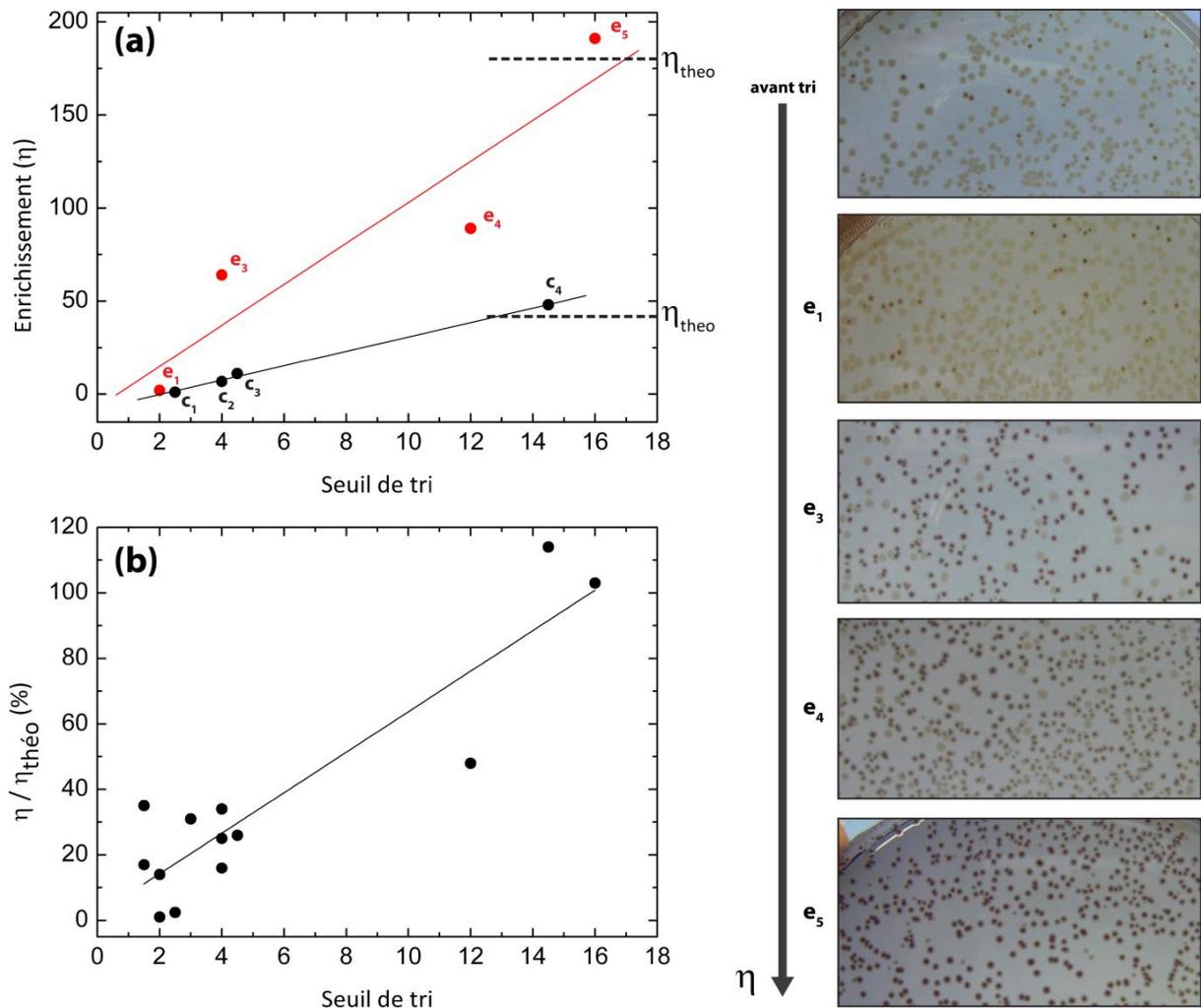


Figure 97 *Enrichissement vs. Seuil de tri: (a) Variation de l'enrichissement η en fonction du seuil de tri à fréquence constante pour les tris c (noir) et e (rouge). Les images de boîte LB Agar montrent l'évolution du mélange de bactéries après tri dans le cas de tris e. Plus le seuil de tri augmente, plus le mélange s'enrichit en *E. coli* CotA (b) Variation de l'enrichissement η en fonction du seuil de tri pour des fréquences inférieures à 400 Hz*

On constate de plus que l'enrichissement η augmente lorsque le rapport ε_0 diminue. En effet, on remarque dans le cas du tri d_1 que, malgré un faible seuil de tri de 2, l'enrichissement atteint 49 % de $\eta_{\text{théo}}$ pour $\varepsilon_0 = 0,01$ contre seulement 1 % pour $\varepsilon_0 = 0,11$. Ces résultats sont en accord avec le modèle établi : plus la valeur de ε_0 est faible, plus $\eta_{\text{théo}}$ est élevé. Il en est de même avec la valeur de λ . L'augmentation de l'enrichissement avec la diminution de λ a été également vérifiée expérimentalement dans les travaux réalisés par *Baret et al.* (*Baret et al.* 2009).

La technique de tri a été validée à une fréquence de 400 Hz. Les performances du FADS décrites dans la littérature devraient permettre l'utilisation de cette technique à des fréquences de tri d'au moins 1500 Hz (*Baret et al.* 2009). Deux essais préliminaires ont été réalisés à 800 Hz entraînant une nette diminution de l'enrichissement : 100 % de $\eta_{\text{théo}}$ à 400 Hz contre seulement 7 % à 800 Hz pour un seuil de tri de 16 et 34 % de $\eta_{\text{théo}}$ à 400 Hz contre seulement 1,5 % à 800 Hz pour un seuil de tri de 4. Un des facteurs à prendre en compte et limitant considérablement l'efficacité du tri est la distance séparant les microgouttelettes. Ce facteur n'ayant pas été pris en considération lors de ces deux essais (la fréquence de 800 Hz a été atteinte en augmentant le flux de réinjection des microgouttelettes sans pour autant augmenter le flux d'huile pour espacer suffisamment les microgouttelettes), ces résultats sont donc à relativiser et de prochains tests devraient logiquement confirmer la faisabilité du tri à 1500 Hz.

Cette plateforme microfluidique permet un criblage efficace de l'activité enzymatique CotA à 400 Hz. Dans ces conditions, les enrichissements théoriques sont atteints et l'efficacité du tri n'est plus limitée que par les événements de co-encapsulation entraînant la sélection de faux positifs. La diminution de ε_0 ou de λ permet de diminuer ces phénomènes de co-encapsulation et d'ainsi augmenter l'efficacité du tri en augmentant en contre partie la taille de l'émulsion à cribler. Il est également important de noter que les erreurs de tri peuvent être éliminées lors d'un criblage secondaire sur boîte LB Agar contenant le substrat ABTS.

La plateforme est directement applicable au criblage de banque de mutants de CotA. En considérant l'exemple d'une banque de 10^6 clones, les propriétés du module de tri en fonction de la valeur de λ utilisée sont présentées dans le Tableau 6.

	Microgouttelettes vides	Encapsulations uniques	Encapsulations multiples	Taille de l'émulsion	Durée du tri	
					400 Hz	1500 Hz
$\lambda = 0,1$	90%	9%	<1%	10^7	7 h	2 h
$\lambda = 0,2$	82%	16%	2%	$6 \cdot 10^6$	4 h	1 h
$\lambda = 0,5$	61%	30%	9%	$3 \cdot 10^6$	2 h	0,5 h

Tableau 6 *Propriétés du module de tri de la plateforme de criblage : exemple d'une banque de 10^6 clones*

Il est raisonnable d'envisager de travailler en augmentant légèrement le taux d'occupation des microgouttelettes ($\lambda = 0,2$) afin de diminuer la taille de l'émulsion à cribler. Dans ce cas, seulement 2% des microgouttelettes contiennent plus d'une seule bactérie. De plus, la probabilité d'encapsuler une bactérie positive avec une bactérie négative est relativement faible par rapport à la probabilité d'encapsuler deux bactéries négatives. Dans ces conditions, la plateforme permettrait de trier une banque de 10^6 clones en seulement 4 h à 400 Hz et seulement 1 h à 1500 Hz. En travaillant à des valeurs de λ supérieures, comme par exemple $\lambda = 0,5$, les phénomènes de co-encapsulation ne sont plus négligeables. La plateforme peut cependant être utilisée pour effectuer un criblage primaire et diminuer rapidement la taille de la banque. Les erreurs de tri peuvent ensuite être éliminées par un criblage secondaire plus rigoureux.

7.3 Conclusion

Une plateforme microfluidique a été développée pour permettre l'évolution dirigée de la laccase CotA pour des applications en biopile enzymatique. La plateforme permet le criblage de l'activité de CotA dans des conditions proches des conditions physiologiques ($\text{pH}7.0$; $25^\circ\text{C} < T < 37^\circ\text{C}$) et est directement applicable au criblage de banques de mutants de CotA.

Dans des conditions minimisant les erreurs de tri, la technique de criblage permet le tri d'environ 60 clones par seconde (contre au maximum 1 clone par seconde pour les techniques en microplaque) avec une très faible quantité de réactifs. La plateforme microfluidique a néanmoins pour ambition de fonctionner à des fréquences de tri d'au moins 200 clones par seconde, ce qui devrait être confirmé dans un futur proche. Les propriétés de la plateforme en fonction de la taille de la banque sont résumées dans le tableau suivant :

Taille de la banque	Taille de l'émulsion	Temps de criblage (Picoinjection + Tri)	Quantité de réactifs (huile + aqueux)
10^5	$6 \cdot 10^5$	4 + 25 ~ 30 min	800 μL + 15 μL
10^6	$6 \cdot 10^6$	40 + 250 ~ 5 h	8 mL + 150 μL
10^7	$6 \cdot 10^7$	7 h + 41 h ~ 50 h	80 mL + 1,5 mL

Le système permet un criblage rapide de banques de 10^5 à 10^6 gènes. Le criblage de banques plus importantes paraît par contre difficilement réalisable. Il est toutefois possible de fractionner la banque et d'en cribler la totalité en plusieurs fois. Il faut également noter que la plateforme peut aussi fonctionner en mode "enrichissement" dans un premier temps, c'est-à-dire en acceptant des phénomènes de co-encapsulation et des erreurs de tri lors d'un premier crible afin d'enrichir grossièrement une banque de grande taille avant des tours de criblage plus stricts.

Il est intéressant de noter qu'il est aussi possible d'utiliser la plateforme dans des conditions qui ne soient pas forcément compatibles avec la survie des bactéries. Dans ce cas, l'information génétique serait récupérée après tri par PCR. Cette perspective augmente la flexibilité du système et permettrait le criblage de l'activité de CotA dans diverses conditions de température et pH mais également en présence du réactif ou du produit issus de la réaction anodique de la biopile envisagée.

Enfin, l'activité d'une banque peut être très rapidement analysée en ne réalisant que le test enzymatique. Dans ces conditions, la plateforme peut analyser jusqu'à 1000 clones par seconde et permet ainsi l'analyse de 10^7 variants en seulement 3 heures. Cette technique offre ainsi l'avantage de pouvoir étudier rapidement l'effet de différentes conditions de mutagenèse (technique de mutagenèse, taux de mutations...) sur l'activité d'une banque et donne rapidement accès à des informations précieuses dans le but de comparer et discuter plusieurs stratégies d'évolution.

8 Conception de banques de mutants de CotA

Cette courte dernière partie décrit la construction des banques de mutants de la laccase CotA. La diversité génétique a été générée à partir du gène *cotA* par PCR mutagène et quatre banques ont été construites en utilisant différentes fréquences de mutation.

La conception des banques a notamment impliqué la création d'un vecteur accepteur, la réalisation de PCR mutagènes, la purification des produits de PCR sur billes magnétiques et des étapes de clonage et de transformation.

8.1 Matériel et méthodes

8.1.1 Réactifs

Les enzymes de restriction *NotI*, *BglII*, *EcoRI* et *PstI*, la T4 ADN ligase, la phosphatase alcaline CIP et les marqueurs de poids moléculaire (2-Log 10kb DNA ladder) ont été commandés chez NEB. Les oligonucléotides TB1_{prom}, TB2_{term}, K7₁ et K7₂ ont été achetés chez Sigma-Aldrich. Le kit GeneMorph® II Random mutagenesis kit a été commandé chez Stratagene. Le vecteur pET-21a(+) a été acheté chez Novagen. La Taq ADN polymérase a été achetée chez MP Biomedicals. Les billes magnétiques Dynabeads® M-280 ont été achetées chez Invitrogen (kilobaseBINDER™ kit). L'agarose, l'ampicilline, le *D*-glucose et le glycérol ont été achetés chez Sigma-Aldrich. Le bromure d'éthidium (BET) et les milieux LB et LB Agar ont été commandés chez Roth. Le tampon Tris Borate EDTA (TBE) a été acheté chez Euromedex. Les cellules électrocompétentes 10-β *E. coli* ont été commandées chez NEB. Les cellules ultracompetentes XI₁₀-gold ont été achetées chez Stratagene. L'eau stérile, autoclavée et traitée au diéthylcarbonate (DEPC) (notée ADNase/ARNase-free) a été achetée chez Roth.

8.1.2 Construction de l'insert

8.1.2.1 PCR

50 µL contenant 0,33 µL de plasmide pLOM10 (35,5 ng.µL⁻¹), 5 µL de tampon (10x), 2,5 µL d'amorce TB1_{prom} (10 µM) et d'amorce TB2_{term} (10 µM), 1 µL de dNTP (5 mM) et 0,2 µL de Taq polymérase (MP Biomedicals) (5U.µL⁻¹) et 38,5 µL d'eau RNase/DNase-free ont été soumis, à l'intérieur d'un thermocycleur (DNA Engine TETRAD2 ; MT Research) à une étape initiale de dénaturation de 4 min à 94°C puis à 30 cycles (94°C, 30s ; 55°C, 30s ; 75°C, 2 min) et à une étape finale de 7 min à 72°C. Le produit de PCR a été purifié en utilisant un kit de purification PCR (Qiagen). L'ADN a été quantifié à l'aide d'un Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific) puis analysé sur gel d'agarose 1% (m/m) dans du tampon TBE 1x (migration à 80 mV (Biorad PowerPac Basic). Après migration, le gel a été immergé 20 min dans du tampon TBE 1x contenant 2 µg.mL⁻¹ de BET puis visualisé avec le système Gene Logic 200 de chez Kodak.

8.1.2.2 PCR mutagène

Conditions A (théoriquement 0-4,5 mutations/kb) : 50 μL contenant 5 μL de plasmide pLOM10 (100 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$), 5 μL de tampon (10x), 2,5 μL d'amorce TB1_{prom} (10 μM) et d'amorce TB2_{term} (10 μM), 1 μL de dNTP (5 mM) et 1 μL de Mutazyme® II (2,5U. μL^{-1}) et 33 μL d'eau ARNase/ADNase-free.

Conditions B (théoriquement 4,5-9 mutations/kb) : 50 μL contenant 1 μL de plasmide pLOM10 (100 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$), 5 μL de tampon (10x), 2,5 μL d'amorce TB1_{prom} (10 μM) et d'amorce TB2_{term} (10 μM), 1 μL de dNTP (5 mM) et 1 μL de Mutazyme® II (2,5U. μL^{-1}) et 37 μL d'eau ARNase/ADNase-free.

Conditions C (théoriquement 9-16 mutations/kb) : 50 μL contenant 0,5 μL de plasmide pLOM10 (1 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$), 5 μL de tampon (10x), 2,5 μL d'amorce TB1_{prom} (10 μM) et d'amorce TB2_{term} (10 μM), 1 μL de dNTP (5 mM) et 1 μL de Mutazyme® II (2,5U. μL^{-1}) et 37,5 μL d'eau ARNase/ADNase-free.

Les mélanges ont été soumis, à l'intérieur d'un thermocycleur (DNA Engine TETRAD2 ; MT Research), à une étape initiale de dénaturation de 4 min à 94°C puis à 30 cycles (94°C, 30s ; 55°C, 30s ; 75°C, 2 min) et à une étape finale de 7 min à 72°C. Le produit de PCR a été purifié en utilisant un kit de purification PCR (Qiagen) et élués dans 100 μL de tampon TrisHCl (5 mM, pH8.5). Une partie du produit PCR a été quantifié à l'aide d'un Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific) (insert A : 144 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$; insert B : 133 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$; insert C : 86 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) puis analysé sur gel d'agarose 1% (m/m) dans du tampon TBE 1x (migration à 80 mV (Biorad PowerPac Basic). Après migration, le gel a été immergé 20 min dans du tampon TBE 1x contenant 2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de BET puis visualisé avec le système Gene Logic 200 de chez Kodak.

8.1.2.3 Purification de l'insert

Les billes magnétiques Dynabeads® M-280 sont en suspension à 10 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$. 1 mg de billes est nécessaire pour immobiliser 10 μg d'ADN. A partir de ce ratio, un excès de billes d'environ 4 a été utilisé, la taille des fragments d'ADN à immobiliser étant importante. 400 μL de billes (10 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) ont été lavées avec 400 μL de tampon de lavage 1x, puis placées 2 min sur banc magnétique. Le lavage a été répété 3 fois puis les billes ont été resuspendues dans 300 μL de tampon d'immobilisation 1x et 300 μL d'une solution contenant l'ADN ($\sim 50 \text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) a été ajouté. Le mélange a été incubé à température ambiante pendant 45 min sous agitation suffisante pour éviter aux billes de décanter. Le mélange a ensuite été placé 10 min sur banc magnétique puis la solution a été remplacée par 300 μL de tampon NEB3 1x contenant 3 μL de *BglIII* (10 U. μL^{-1}). Le mélange a été incubé à 37°C pendant 5 h sous agitation suffisante pour éviter aux billes de décanter. Le mélange a ensuite été placé 10 min sur banc magnétique puis la solution a été remplacée par 300 μL de tampon NEB3 1x contenant 3 μL de *NotI* (10 U. μL^{-1}). Le mélange a été incubé à 37°C pendant 5 h sous agitation suffisante pour éviter aux billes de décanter. Le mélange a ensuite été placé 10 min sur banc magnétique et la solution a été prélevée et purifiée sur kit de purification PCR (Qiagen) pour donner, après élution dans du tampon TrisHCl (5 mM, pH8.5), 60 μL d'insert ($\sim 60 \text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$). L'insert a été conservé à -20°C avant ligation. Une petite quantité d'ADN a été analysée sur gel d'agarose 1% (m/m) dans du tampon TBE 1x (migration à 80 mV (Biorad PowerPac Basic). Après migration, le gel a été immergé 20 min dans du tampon TBE 1x contenant 2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de BET puis visualisé avec le système Gene Logic 200 de chez Kodak.

8.1.3 Construction du vecteur pET-TB

Ouverture du vecteur pET-21a(+) : un mélange contenant 100 μL de pET-21a(+) ($71 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$), 11 μL de tampon NEB3, 0,5 μL de *BglIII* ($10 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) et 0,5 μL de *NotI* ($10 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) a été incubé pendant 15 h à 37°C . 1 μL de phosphatase alcaline CIP ($10 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) ont été ajoutés et le mélange a été incubé 2 h à 37°C . L'ADN a été purifié sur kit de purification PCR (Qiagen) pour donner après élution dans du tampon TrisHCl (5 mM, pH8.5), 50 μL de vecteur pET-21a(+) ouvert ($92 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$).

Insertion de la cassette : 16 μL contenant 2,6 μL d'oligonucléotide KB7₁ (1,14 ng ; $2,6 \cdot 10^{-13} \text{ mol}$) et 2,6 μL d'oligonucléotide KB7₂ (1,15 ng ; $2,6 \cdot 10^{-13} \text{ mol}$) et 10,8 μL d'eau ultrapure ont été incubés 3 min à 95°C puis refroidis jusqu'à 25°C ($1^\circ\text{C}/\text{min}$). 1 μL de vecteur pET-21a(+) ouvert ($92,6 \text{ ng}$; $2,6 \cdot 10^{-14} \text{ mol}$), 2 μL de tampon ligase 10x et 1 μL de T4 ADN ligase ($400000 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) ont été ajoutés au mélange. Le mélange a été incubé 3 h à 25°C . Le mélange de ligation a été purifié sur kit de purification PCR (Qiagen) puis transformé dans des cellules compétentes XI10 gold (protocole *Sambrook et al. 2001*). 12 colonies ont été repiquées dans 2 ml de milieu LB contenant 0,1mg/mL d'ampicilline et incubées 15 h à 37°C . L'ADN a été extrait des cellules en utilisant un kit MiniPrep (Qiagen) pour donner 50 μL à environ $50 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$. Chaque ADN a été digéré avec *EcoRI* et *PstI* (20 μL : 2 μL d'ADN, 1 μL d'*EcoRI* ($10 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$), 1 μL de *PstI* ($10 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$), 2 μL de tampon NEB3 et 14 μL d'eau. Incubation 2 h à 37°C) puis analysé sur gel d'agarose 1% (m/m) dans du tampon TBE 1x (migration à 80 mV (Biorad PowerPac Basic). Après migration, le gel a été immergé 20 min dans du tampon TBE 1x contenant $2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ de BET puis visualisé avec le système Gene Logic 200 de chez Kodak. Les ADN semblant correspondre à pET-TB ont été séquencés pour confirmation. Le vecteur pET-TB a été conservé à -20°C ($200 \mu\text{L}$ à $50 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$).

8.1.4 Clonage

8.1.4.1 Ouverture du vecteur pET-TB

Un mélange contenant 200 μL de vecteur pET-TB ($50 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$), 22 μL de tampon NEB3 10x, 1 μL de *BglIII* ($10 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) et 1 μL de *NotI* ($10 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) a été incubé à 37°C pendant 15 h. 2 μL de phosphatase alcaline CIP ($10 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) ont été ajoutés et le mélange a été incubé à 37°C pendant 2 h. L'ADN a été purifié sur kit de purification PCR (Qiagen) pour donner 50 μL à $70 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$.

8.1.4.2 Contrôle des inserts et du vecteur pET-TB ouvert

20 μL contenant 2 μL d'ADN (pET-TB $70 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ou insert $\sim 100 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$), 2 μL de tampon ligase 10x, 1 μL de T4 ADN ligase ($400000 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) et 15 μL d'eau ont été incubés pendant 15 h à 16°C . L'ADN a été purifié sur kit de purification PCR (Qiagen) puis analysé sur gel d'agarose 1% (m/m) dans du tampon TBE 1x (migration à 80 mV (Biorad PowerPac Basic). Après migration, le gel a été immergé 20 min dans du tampon TBE 1x contenant $2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ de BET puis visualisé avec le système Gene Logic 200 de chez Kodak.

8.1.4.3 Ligations et transformations

Les ligations ont été effectuées avec 3 excès molaires d'insert par rapport au vecteur accepteur sur une masse totale d'environ $1 \mu\text{g}$ de pET-TB.

Un mélange contenant 16 μL d'insert ($\sim 60 \text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$), 12 μL de pET-TB ($\sim 90 \text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$), 3,2 μL de tampon ligase 10x et 1 μL de T4 ADN ligase ($400000\text{U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) a été incubé à 16°C pendant 15 h. L'ADN a été purifié sur kit de purification PCR (Qiagen) et élué dans 50 μL de tampon TrisHCl (5 mM, pH8.5).

Transformation test : 2 μL d'ADN (le reste a été conservé 24 h à -20°C) ont été transformés par électroporation dans 100 μL de cellules compétentes 10- β E. coli puis resuspendues dans 898 μL de milieu LB contenant 20 mM de glucose à 37°C . Les cellules ont été incubées 35 min à 37°C puis des dilutions (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6}) ont été étalées sur des boîtes LB Agar contenant 20 mM de glucose et 0,1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ d'ampicilline. Les boîtes ont été incubées à 37°C pendant 15 h puis la diversité génétique de la banque a été évaluée.

Transformation : 4 x (de 2 à 5 μL) d'ADN ont été transformés par électroporation dans 4x100 μL de cellules compétentes 10- β E. coli puis resuspendues dans 898 μL de milieu LB contenant 20 mM de glucose à 37°C . Les cellules ont été incubées 35 min à 37°C puis les quatre transformations ont été réunies (4 mL). 100 μL ont été mis de côté pour titration en étalant des dilutions (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6}) sur des boîtes LB Agar contenant 20 mM de glucose et 0,1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ d'ampicilline. Les 3,9 mL restants ont été étalés sur quatre grandes boîtes LBA (500 cm^2) contenant 20 mM de glucose et 0,1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ d'ampicilline. Les boîtes ont été incubées à 37°C pendant 15 h. La diversité génétique a été évaluée à l'aide des boîtes de titration. Les colonies ayant poussées sur les quatre grandes boîtes sont récupérées dans 30 mL de milieu LB contenant 20 % de glycérol. La DO_{600} de l'échantillon a été mesuré pour déterminer le nombre de cellules par volume, puis l'échantillon a été réparti en plusieurs aliquots de 1 mL de manière à avoir entre 300 et 500 fois la diversité génétique dans chaque aliquot.

8.1.5 Séquençage

Les séquençages ont été réalisés par la compagnie GATC Biotech. Les séquences et chromatogrammes obtenues ont été analysés au laboratoire en utilisant le logiciel "A Plasmid Editor" (<http://biologylabs.utah.edu/jorgensen/wayned/ape/>).

8.2 Résultats

8.2.1 Construction de l'insert

Le plasmide pLOM10 codant pour la laccase CotA a été construit par le Professeur L.O. Martins (Universidade Nova de Lisboa ; Portugal) (*Martins et al. 2002*) en insérant le gène *cotA* entre les sites *BamHI* et *NheI* du vecteur pET-21a(+) (carte en Annexe 13). La carte du plasmide pLOM10 est présentée en Figure 98. Le vecteur pET-21a(+) permet l'expression dans *E. coli* et confère une résistance à l'ampicilline. Il contient également des séquences T7 promoteur et T7 terminateur ainsi qu'un site de fixation du ribosome (RBS). L'expression du gène *cotA* est régulé par l'opéron lactose. Les sites de clonages utilisés pour la construction des banques sont les sites *NotI* et *BglII*.

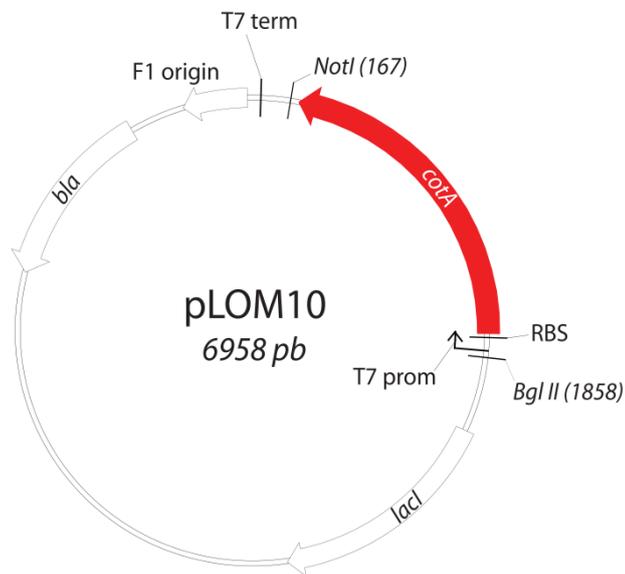


Figure 98 Carte du plasmide pLOM10: le plasmide pLOM10 (6958 pb) permet l'expression du gène *cotA* (204 – 1746) régulé par l'opéron lactose. La plasmide contient entre autre un gène de résistance à l'ampicilline (*bla* ; 5500 – 6360), le gène du répresseur *LacI* (2220 – 3311), une origine F1 (6624 – 6930), un site de fixation du ribosome (RBS ; 1763 – 1769), deux sites T7 promoteur (T7 prom ; 1826 – 1842) et T7 terminateur (T7 term ; 26 – 74). Les deux sites de clonages sont *NotI* (167) et *BglII* (1858)

L'amplification du gène *cotA* par PCR a été réalisée en utilisant les amorces TB1_{prom} (TGTGACTCAGATCTCGATCCCGCGAAATTAATAC) et TB2_{term} (GGTTATGCTAGTTATTGCTCAGCGG). L'amorce TB2_{term} est biotinylé en position 5' afin de faciliter les étapes de purifications de l'insert avant clonage. Le fragment de 1808 pb amplifié après hybridation des deux amorces est présenté en Figure 99. Les conditions de PCR ont tout d'abord été optimisées avec un système classique utilisant une Taq polymérase (MP Biomedicals) afin de déterminer une température optimale d'hybridation des amorces (Figure 99a). Un programme PCR avec hybridation à 55°C a été retenu et utilisé pour les PCR mutagènes (Figure 99b). L'ADN polymérase utilisée pour introduire aléatoirement des mutations est la Mutazyme® II. Plus le nombre de cycles de PCR est élevé et plus la concentration en ADN cible est faible, plus la fréquence de mutation sera importante. A l'inverse, plus le nombre de cycle est

faible et plus la concentration en ADN cible est élevée, plus la fréquence de mutation sera moindre. Les quatre banques ont ainsi été créées en utilisant différentes concentrations de plasmide pLOM10 : A (500 ng) ; B (100 ng) et C (0.1 ng), les fréquences de mutation théoriques étant respectivement, dans ces conditions, 0-4.5, 4.5-9 et 9-16 mutations/1kb (Figure 99c).

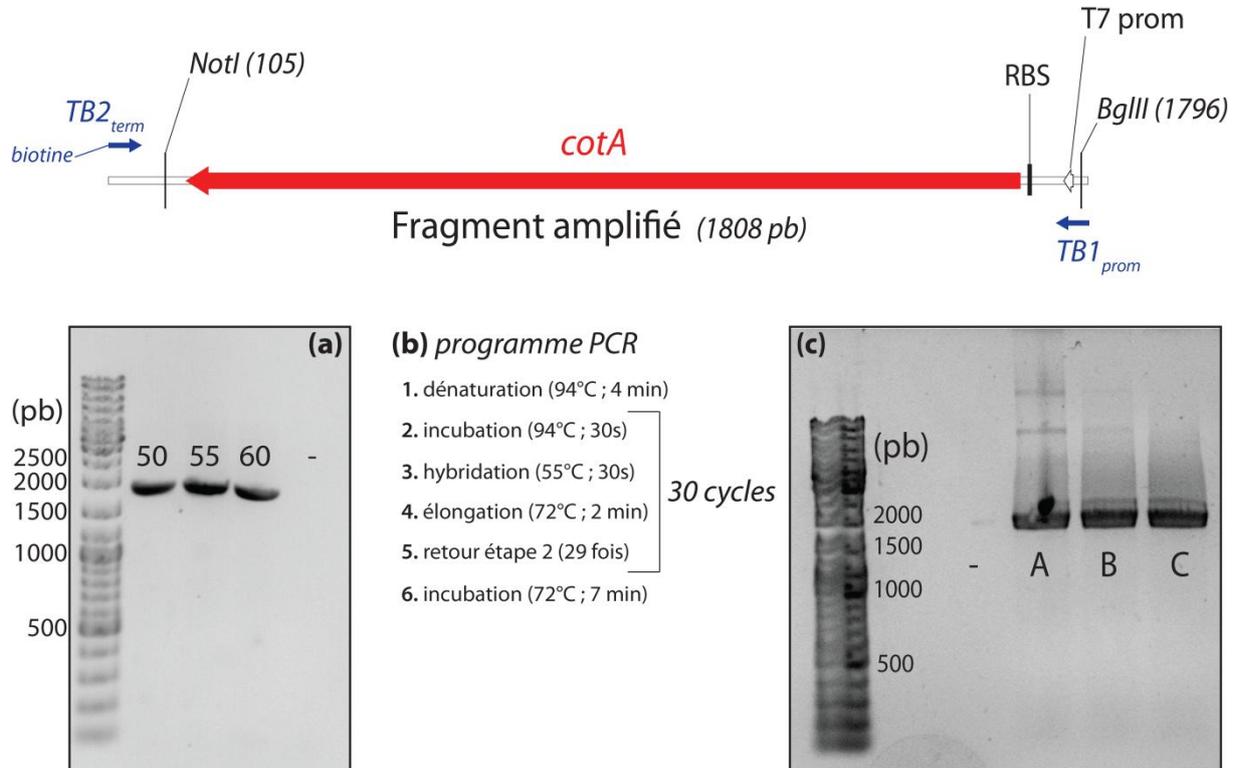


Figure 99 Amplification du gène *cotA* : le fragment amplifié par PCR suite à l'hybridation des amorces TB1_{prom} et TB2_{term} sur le plasmide pLOM10 fait 1808 pb et contient le gène *cotA* ainsi que les deux sites de clonage NotI et BglIII. **(a)** Gel d'agarose des produits de PCR avec une Taq polymérase (MP Biomedicals) pour des températures d'hybridation de 50, 55 et 60°C. Contrôle négatif (-) **(b)** Programme PCR optimisé et utilisé pour les PCR mutagènes. **(c)** Gel d'agarose des produits de PCR avec la Mutazymell® comme ADN polymérase et 500 ng (A), 100 ng (B) et 0,1 ng (C) de plasmide pLOM10. Contrôle négatif (-)

Les fragments amplifiés ont ensuite été purifiés puis coupés selon les sites *NotI* et *BglIII* selon la stratégie présentée en Figure 100. Après purification, les fragments amplifiés ont été accrochés sur des billes magnétiques recouvertes de streptavidine via l'interaction biotine/streptavidine, connue comme étant l'une des plus fortes interactions biologiques non covalente connue à ce jour (constante de dissociation $K_D \sim 4 \times 10^{-14}$ M ; Holmberg et al. 2005). Les billes magnétiques portant l'ADN peuvent alors facilement être isolées de la solution à l'aide d'un banc magnétique. La digestion *BglIII* a été effectuée pour éliminer un court fragment de 13 pb, l'autre partie de l'insert restant lié à la bille magnétique. Dans un second temps, la digestion *NotI* permet de récupérer l'insert en clivant la liaison avec la bille magnétique, l'autre partie non souhaitée du gène étant éliminée avec la bille magnétique.

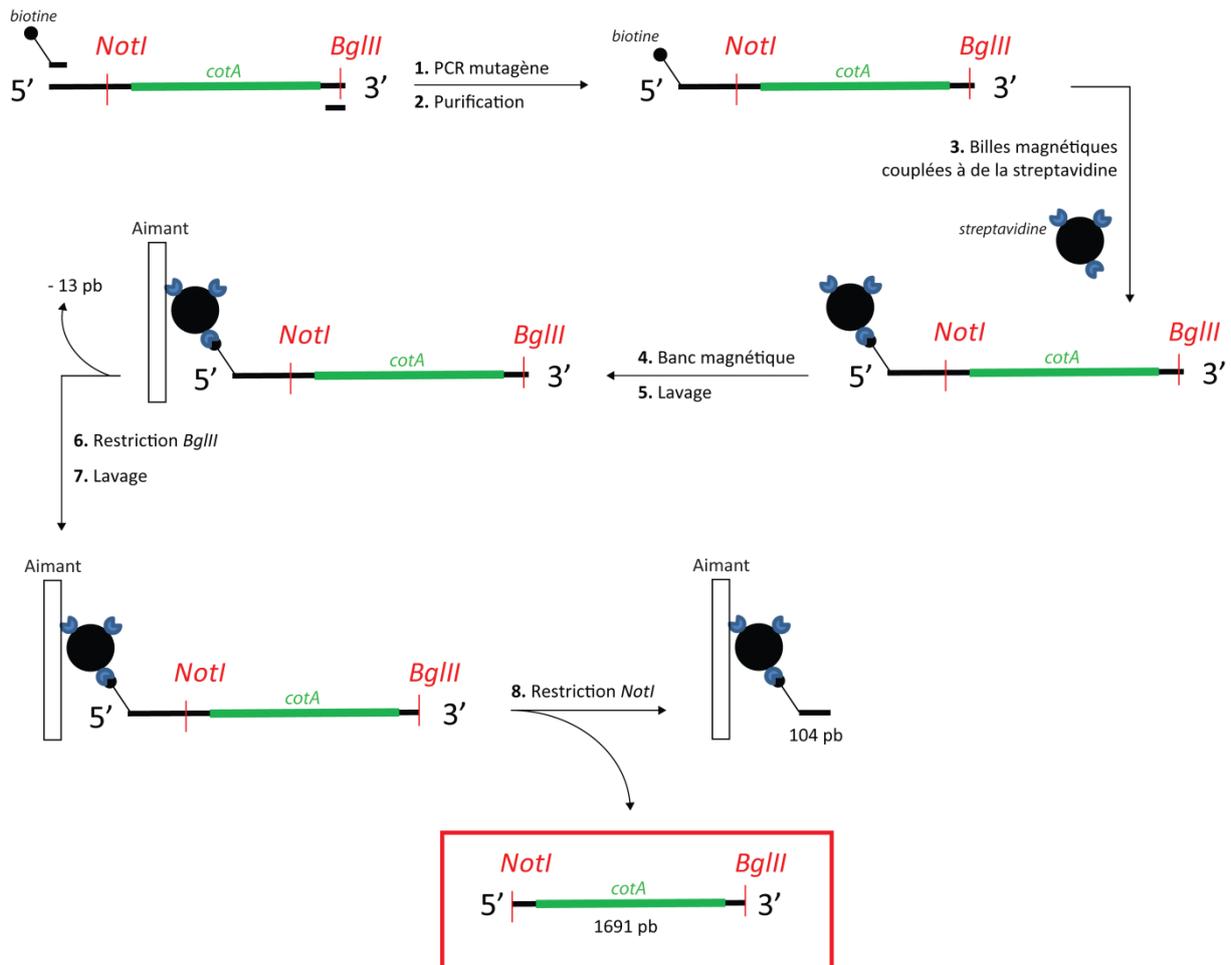


Figure 100 *Stratégie de purification de l'insert* : l'utilisation de l'amorce TB2_{term} biotinylée permet, après PCR mutagène (1 et 2), d'accrocher le fragment amplifié sur des billes magnétiques couplées à de la streptavidine (3). Les billes portant l'ADN peuvent être lavées puis immobilisées sur un banc magnétique afin d'éliminer l'excès de plasmide pLOM10 (4 et 5). L'ADN est digéré avec BglIII puis purifié sur banc magnétique (6 et 7). Enfin, l'ADN est digéré avec NotI, permettant d'éliminer la liaison avec la bille magnétique. L'insert est isolé dans la solution immobilisant les billes sur un banc magnétique

Cette technique a permis de purifier simplement et rapidement l'insert en éliminant efficacement la fraction de plasmide pLOM10 non amplifié pendant la PCR (notamment pour les PCR A et B contenant les plus fortes quantités de plasmide) et les fragments résultants des restrictions aux sites de clonage.

8.2.2 Construction d'un vecteur accepteur

L'ouverture du vecteur pET-21a(+) (carte en Annexe 13) par les enzymes de restriction NotI et BglIII entraîne la formation d'un fragment indésirable d'une taille de 177 pb contraignant à éliminer. Afin d'éviter d'avoir à purifier le vecteur ouvert sur gel avant chaque clonage, un vecteur accepteur dérivé de pET-21a(+) a été construit (Figure 101a). Une cassette de 14 nucléotides a été insérée entre les sites NotI et BglIII du vecteur pET-21a(+) de manière à conserver les deux sites de clonages NotI et BglIII en utilisant les oligonucléotides K7₁ (GGCCGCAAGCTTCA) et K7₂ (GATCTGAAGCTTGC) phosphorylés en 5'. Le vecteur accepteur pET-TB ainsi créé est très facilement purifiable sur kit de

purification PCR après ouverture avec les sites de clonages. L'insertion de la cassette a tout d'abord été vérifiée sur gel d'agarose après double digestion avec les enzymes de restriction *EcoRI* et *PstI*, le vecteur pET-TB ne comportant plus de site *EcoRI* (Figure 101b). La présence de la cassette a également été confirmée via le séquençage de plusieurs vecteurs. Un stock de vecteur pET-TB a été constitué à partir d'un des clones séquencés.

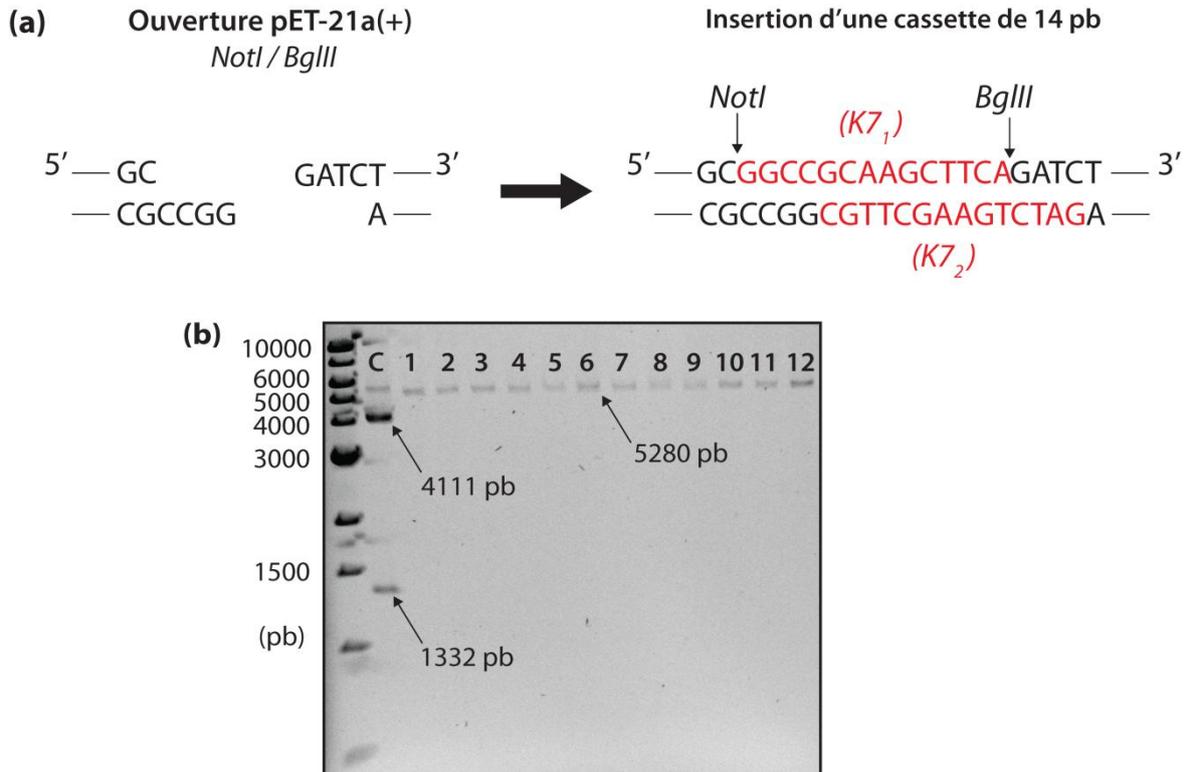


Figure 101 *Construction du vecteur accepteur* : **(a)** Le vecteur pET-21a(+) a été ouvert entre les sites *NotI* et *BglII*. Une cassette de 14 pb a été insérée après hybridation des oligonucléotides K7₁ et K7₂ pour donner le vecteur pET-TB. Les sites de clonage *NotI* et *BglII* sont conservés au sein du nouveau vecteur accepteur. **(b)** Analyse du vecteur accepteur : la digestion par les enzymes de restrictions *EcoRI* et *PstI* linéarise pET-TB (5280 pb) (contrôle négatif C) et coupe pET-21a(+) en deux fragments (4111 et 1332 pb) (1 à 12)

8.2.3 Clonage et analyse des banques

Après ouverture par les enzymes de restriction *NotI* et *BglII*, pET-TB a été déphosphorylé. La Figure 102a présente un gel d'agarose du vecteur pET-TB ouvert et des inserts A, B et C utilisés (correspondant aux trois PCR mutagènes A, B et C, voir 8.2.1). La disponibilité des sites de clonage a été vérifiée en faisant des tests de ligation de l'insert et du vecteur pET-TB sur eux mêmes. Les inserts polymérisent pour donner des fragments de tailles multiples d'entiers. Il est de même pour le vecteur pET-TB même s'il reste une petite quantité de vecteur non ouvert.

Le clonage a été réalisé en utilisant 3 excès molaire d'insert par rapport au vecteur pET-TB ouvert. Les ligations ont été purifiées puis une petite quantité a été transformée dans des cellules *E. coli* (10-

β ; NEB). La Figure 102b présente le gel d'agarose des ADN des quatre banques réalisées. Les banques I, II et III ont été construites à partir des inserts A, B et C. La banque IV a été construite à partir d'un insert D (PCR mutagène dans des conditions B). Le clonage a bien fonctionné et il ne reste qu'entre 2 et 6% de vecteur pET-TB résiduel selon les banques (quantifié sur gel puis confirmé statistiquement sur une vingtaine de clones).

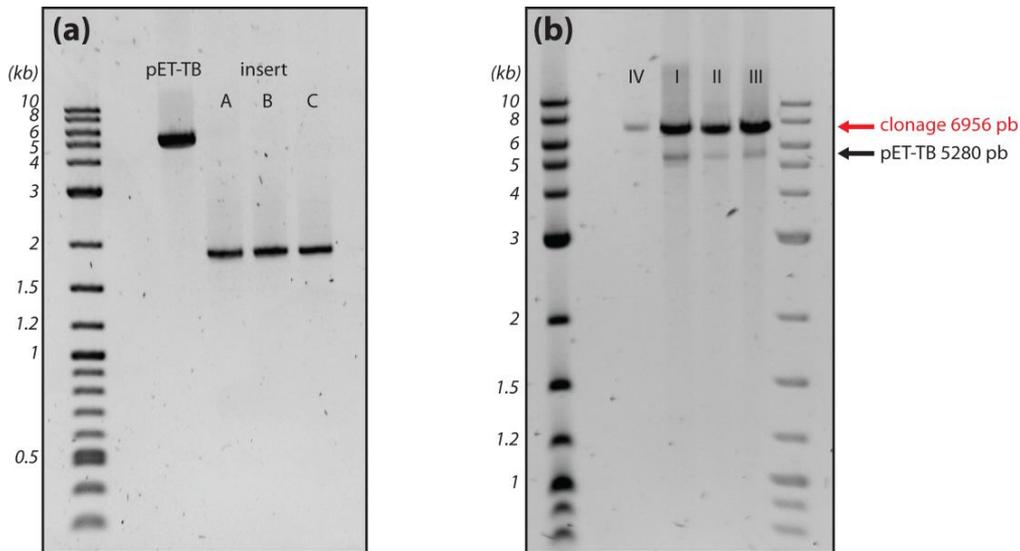


Figure 102 *Clonage : (a) Gel d'agarose des inserts A, B et C (1691 pb) ainsi que du vecteur pET-TB (5266 pb) ouvert. (b) Gel d'agarose des ADN des banques I, II, III et IV linéarisés avec l'enzyme de restriction BglIII : vecteur cloné à 6956 pb et vecteur accepteur pET-TB à 5280 pb. Les banques contiennent entre 2 et 5 % de pET-TB résiduel*

Le reste des ligations a été totalement transformée dans des cellules *E. coli* (10- β ; NEB) et la diversité génétique évaluée. Des échantillons contenant entre 300 et 500 fois la diversité génétique de chacune des banques ont été conservés à -80°C

Pour chacune des banques, une vingtaine de mutant ont été analysés sur gel d'agarose puis une douzaine par séquençage. Les caractéristiques de chacune des banques ont été évaluées et sont présentées dans le Tableau 7. Théoriquement, la banque I devrait présenter entre 0 et 7 mutations/gène *cotA*, les banques II et IV entre 7 et 14 et la banque III entre 14 et 25 mutations/gène *cotA*. On constate que les banques II, III et IV présentent les taux de mutation attendus et des biais relativement similaires, la banque III présentant un taux de délétions et d'insertions plus important. A l'inverse, la banque I possède un taux de mutation bien plus important qu'attendu avec également un biais important, favorisant grandement les transitions par rapport aux transversions. Il faut cependant relativiser la portée de ces statistiques, puisqu'elles ne concernent qu'une douzaine de clones sur un total de 10^6 - 10^7 .

	Banque I	Banque II	Banque III	Banque IV
Taille	6.10 ⁶ gènes	1.10 ⁷ gènes	1.10 ⁷ gènes	5.10 ⁵ gènes
Mutations/gène <i>cotA</i> (nucléotides)	15,2	9,7	13,4	10,5
Mutations/gène <i>cotA</i> (acides aminés)	5,1	3,2	4,5	3,5
Ts/Tv	2	0,9	1,36	1,29
A,T→G,C / G,C→A,T	1,48	1,14	1,15	1,19
Transitions				
A →G, T→C	19 %	24 %	17 %	29 %
G →A, C→T	27 %	28 %	25 %	27 %
Transversions				
A→T, T→A	26 %	19 %	27 %	18 %
A→C, T→G	5 %	7 %	5,5 %	6 %
G→C, C→G	4 %	3 %	5 %	3 %
G→T, C→A	15 %	18 %	15 %	15 %
Délétions	3 %	1 %	3,5 %	1 %
Insertions	1 %	0	2 %	0

Tableau 7 *Caractéristiques des banques I, II, III et IV*

L'activité de ces banques est en cours d'évaluation en utilisant la plateforme microfluidique développée en 6, ce qui permettra de connaître la tolérance aux mutations du gène *cotA* et d'envisager d'utiliser des taux de mutations plus faibles ou plus élevés.

8.3 Conclusion

Quatre banques de mutant de CotA ont été construites par PCR mutagène. Les quatre banques possèdent des taux de mutation différents bien que relativement proches (entre 3 et 5 mutations d'acides aminés sur le gène cotA). Ces banques sont actuellement en cours de criblage en utilisant la plateforme microfluidique développée en dans la partie 7. En cas d'activité, les mutants les plus actifs seront sélectionnés. Ces mutants seront soit caractérisés et comparés à l'aide des outils électrochimiques développés dans la première partie de ces travaux, soit engagés dans de nouveaux cycles de sélection après de nouvelles phases de mutagenèse ou de recombinaison.

Conclusion et perspectives

Les travaux de thèse présentés ici visaient à optimiser par évolution dirigée la laccase bactérienne CotA de *Bacillus subtilis* pour des applications en biopile enzymatique.

Les biopiles enzymatiques permettent la création de sources d'électricité miniatures et peu coûteuses fonctionnant dans des conditions douces. Cette technologie est en plein essor et suscite un intérêt grandissant, comme en témoigne l'augmentation exponentielle du nombre de publications dans le domaine ces dix dernières années. Le développement de biopiles enzymatiques portables ou implantables plus performantes est toutefois primordial pour asseoir cette technologie et envisager une exploitation industrielle. Les stratégies d'optimisation se sont principalement construites autour de l'optimisation de l'environnement de la protéine à la surface de l'électrode et la stratégie visant à optimiser directement les biocatalyseurs n'a été que peu utilisée. Il apparaît pourtant aujourd'hui que le développement de la future biopile enzymatique passera par la combinaison des trois stratégies suivantes : optimisation de l'environnement de la protéine, optimisation de la géométrie de la biopile et optimisation de l'enzyme elle-même. La biopile la plus performante mise au point dans des conditions physiologiques, citée en Figure 6, est un exemple criant. La laccase de *Trametes versicolor* (TvLac) utilisée à la cathode ne fonctionne qu'avec 20 % d'activité résiduelle à pH7.0 et est un des facteurs limitant les performance du système. Le développement de techniques d'immobilisation performantes combinées à l'optimisation des biocatalyseurs pourrait permettre de maximiser puissance et durée de vie des biopiles enzymatiques.

La laccase bactérienne CotA de *Bacillus subtilis* présente des propriétés extrêmophiles intéressantes ; elle a donc choisie dans ce projet comme enzyme modèle. Ces travaux de doctorat avaient pour but de développer tout d'abord les outils électrochimiques permettant l'étude de CotA en tant que biocatalyseur cathodique ainsi que la comparaison de potentiels mutants optimisés par évolution dirigée. Dans un second temps, l'ambition de ce projet était de développer une plateforme de microfluidique digitale dédiée à l'évolution dirigée *in vivo* de la laccase CotA et d'appliquer cette plateforme à l'optimisation de CotA pour son utilisation au sein d'une biopile enzymatique.

Nous avons démontré pour la première fois que la laccase CotA pouvait être utilisée en tant que biocatalyseur cathodique pour la réduction de l'O₂ en H₂O. La biocatalyse de l'enzyme à la surface d'une électrode a été observée sous trois régimes différents :

- Transfert d'électrons direct (DET) : adsorbée sur une électrode de graphite. Le potentiel rédox du site cuivre T₁ de CotA a ainsi pu être évalué ($E_{\text{cotA}}^0 \approx 670 \text{ mV vs. SHE}$) et semble bien supérieur à l'unique valeur disponible dans la littérature (455 ou 525 mV vs. SHE ; *Durao et al. 2006 et 2008*).

- Transfert d'électrons indirect avec médiateur en solution : crosslinking sur une électrode de carbone vitreux modifiée avec une monocouche d'aniline. Comme la laccase TvLac, la laccase CotA catalyse efficacement la réduction de l'O₂ en présence d'un médiateur rédox en solution (ABTS). De plus, les biocathodes CotA délivrent 7 fois plus de courant catalytique que les biocathodes TvLac.
- Transfert d'électrons indirect avec médiateur immobilisé : piégeage au sein d'un polymère rédox à base de sel d'osmium sur une électrode de carbone vitreux. La laccase CotA communique efficacement avec deux polymères rédox G622 (520 mV vs. SHE) et G698 (~710 mV vs. SHE) utilisés comme médiateurs immobilisés à la surface de l'électrode pour la réduction biocatalytique de l'O₂.

Ces résultats montrent que l'utilisation de la laccase CotA au sein d'une biopile enzymatique est envisageable et que CotA tend à se comporter comme une laccase fongique à haut potentiel ($E^0 \approx 780$ mV vs. SHE). Cette laccase présente ainsi l'avantage d'être d'origine bactérienne, et donc d'être plus facilement manipulable génétiquement que les laccases fongiques, tout en possédant un potentiel rédox relativement élevé malgré son origine ; elle constitue donc un modèle de choix pour le développement de laccases optimisées par évolution dirigée.

Des outils électrochimiques robustes permettant l'évaluation reproductible de l'activité bioélectrocatalytique de CotA avec médiateur ABTS en solution ont été mis au point au cours de ces travaux. L'immobilisation de CotA et de mutants moins actifs a permis de démontrer une forte corrélation entre l'activité cinétique de chaque enzyme (k_{cat}/K_M) et la densité de courant de réduction (i_{cat}) mesurée pour l'électrode correspondante. Ces résultats montrent que les outils électrochimiques développés fournissent une méthode fiable d'évaluation de laccases ayant des activités cinétiques différentes et pourront être appliqués à l'étude de variants de CotA optimisés par évolution dirigée des protéines.

Deux prototypes de biopile enzymatique Glucose/O₂ ont également été développés afin d'évaluer CotA et ses potentiels mutants optimisés dans des conditions réelles d'opération. CotA a été associée à une glucose oxydase pour constituer une biopile à deux compartiments séparés par une membrane de Nafion®. Parallèlement, un prototype original de biopile microfluidique impliquant l'immobilisation covalente des enzymes sur des électrodes de nanotubes de carbone a été mis au point.

Une plateforme de criblage à très haut débit dédiée à l'évolution dirigée *in vivo* de CotA a été par la suite développée en utilisant la technologie de microfluidique digitale. Cette technologie offre la possibilité de compartimenter les réactions dans de très faibles volumes (de l'ordre du picolitre) et de manipuler ces micro-compartiments. Couplée à des systèmes de détection très sensibles, elle ouvre ainsi de nouveaux horizons dans de nombreux domaines de la biologie et de la chimie. Cette

technologie naissante est toutefois encore en cours de développement. L'intégration de différentes opérations individuelles au sein d'un système microfluidique complet et performant est encore peu commune, notamment pour des expériences d'évolution dirigée. Ces travaux de doctorat contribuent à l'essor de cette technologie dans ce domaine et fournissent une plateforme intégrée de criblage à très haut débit applicable à l'évolution dirigée de protéines au sein de microorganismes.

La plateforme microfluidique pour l'évolution dirigée de CotA a été mise au point et validée en développant un criblage *in vivo* modèle à partir d'une enzyme active CotA et d'un mutant inactif Δ CotA. La technique de criblage à très haut débit est efficace et permet d'enrichir considérablement la population de cellules en bactéries produisant la laccase CotA active. La plateforme est directement applicable au criblage de banques de mutants de CotA et est schématisée en Figure 103.

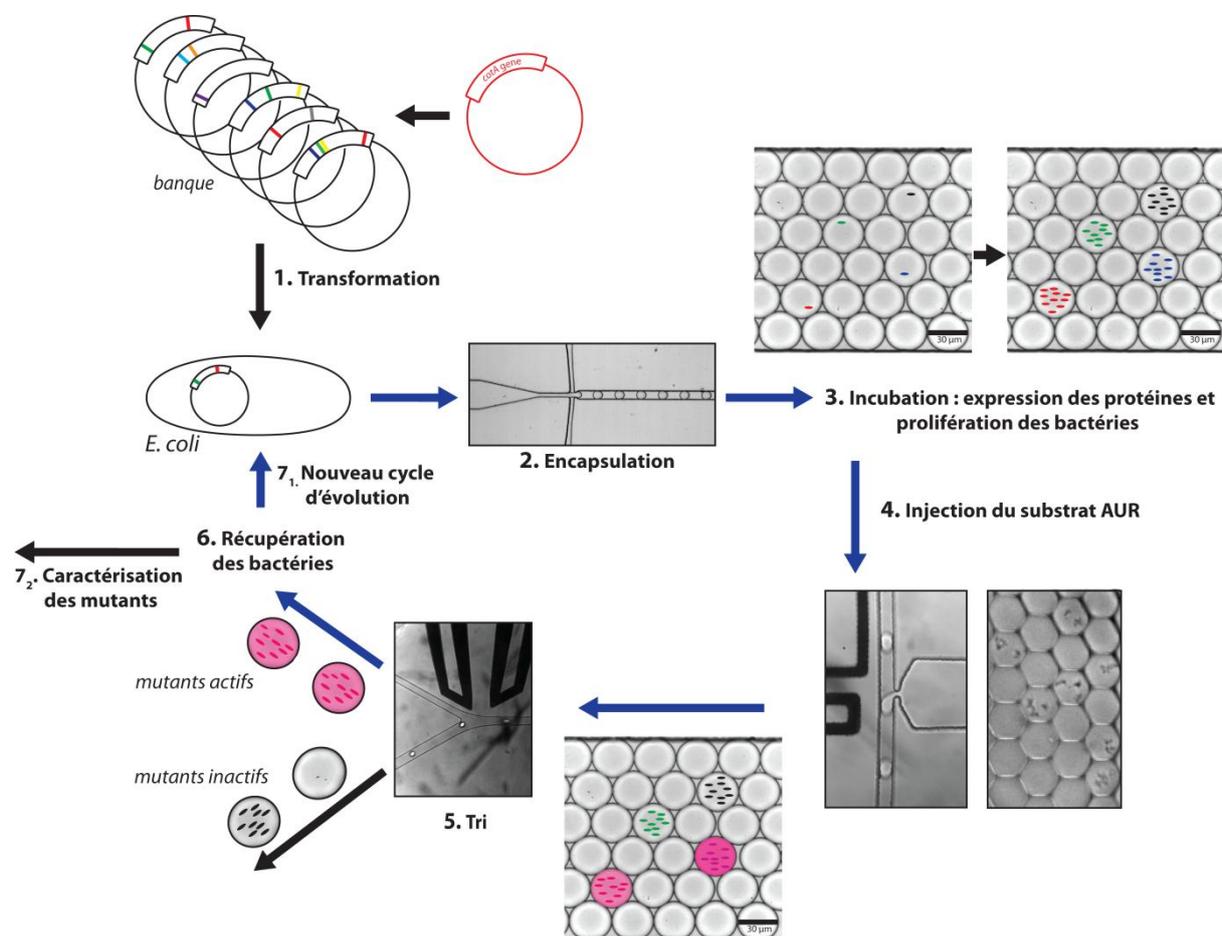


Figure 103 Schématisation de la plateforme de criblage mis au point : **1.** La banque de gènes est transformée dans *E. coli*. **2.** Les cellules sont encapsulées dans des microgouttelettes de 14 pL contenant du milieu inducteur. **3.** L'émulsion est incubée pour permettre l'expression de chaque mutant au sein de sa propre microgouttelette, ainsi que la prolifération des cellules. **4.** Le substrat fluorogénique AUR est injecté au sein de chaque microgouttelette. **5.** Les microgouttelettes contenant les mutants les plus actifs sont détectées et triées. **6.** Les bactéries contenues dans les microgouttelettes triées sont récupérées puis soit engagées dans un nouveau cycle d'évolution ou criblage (**7₁**), soit isolées pour caractérisation (**7₂**)

Développée dans notre cas pour cribler l'activité CotA à pH7.0 à une température pouvant atteindre 37°C, la plateforme peut également être utilisée dans des conditions de criblage non compatibles

avec la survie des bactéries (température ou pH extrêmes, présence de produit chimique...). Il faudra néanmoins dans cette optique ajouter une étape supplémentaire d'amplification des gènes par PCR pour récupérer l'information génétique contenue dans les microgouttelettes triées.

Cette plateforme de criblage fournit un outil extrêmement puissant pour trois types d'applications. Tout d'abord, la plateforme peut être utilisée en mode "analyse" : l'activité d'une banque peut être très rapidement analysée en ne réalisant que le test enzymatique. Dans ces conditions, la plateforme peut analyser jusqu'à 1000 clones par seconde et permet ainsi l'analyse de 10^7 variants en seulement 3 heures. Cette technique de criblage offre ainsi l'avantage de pouvoir étudier rapidement l'effet de différentes conditions de mutagenèse (technique de mutagenèse, taux de mutations...) sur l'activité d'une banque et de choisir la banque la plus intéressante à cribler par la suite. Il peut être particulièrement intéressant de suivre l'évolution du nuage d'activité entre chaque cycle de mutagenèse en fonction du taux de mutations introduites. Faut-il travailler directement avec de fortes fréquences de mutations pour cibler les meilleurs variants possibles ? Une évolution plus lente en diminuant le nombre de mutations à chaque cycle de mutagenèse tout en augmentant le nombre de cycles n'est-elle pas préférable pour atteindre des gains d'activité plus importants ? La plateforme de criblage développée donne rapidement accès à des informations précieuses dans le but de comparer et discuter plusieurs stratégies d'évolution. L'utilisation de cette plateforme à ces fins s'annonce passionnante.

L'utilité première de la plateforme reste toutefois son fonctionnement en mode "tri" afin d'isoler les mutants à partir d'un certain gain d'activité. Bien que le module de tri demeure l'élément limitant le débit du système complet, la plateforme permet, dans ces conditions, de cribler et trier à une fréquence d'au moins 60 mutants par seconde, ce qui correspond à environ 10^6 mutants en seulement 4 h. Ce débit de criblage est très intéressant, étant donné, pour comparaison, que les techniques de criblage d'activité enzymatique en microplaque atteignent des débits d'au maximum 1 clone par seconde. Il est en plus raisonnablement envisageable d'utiliser cette plateforme jusqu'à des fréquences d'environ 200 clones par seconde, soit de cribler 10^6 mutants en environ une heure.

Il faut enfin prendre en considération que ces débits sont valables dans des conditions minimisant les phénomènes de co-encapsulation, soit avec plus de 80% de microgouttelettes vides. La plateforme peut néanmoins servir également de criblage primaire en fonctionnant dans un mode "enrichissement". En augmentant le taux d'occupation des microgouttelettes et en autorisant les co-encapsulations, de grandes banques pourront être criblées à une vitesse de plus de 1000 clones par seconde pour, dans un premier temps, en diminuer la taille.

Quatre banques de mutants de CotA (10^6 - 10^7 clones chacune) ont été construites par PCR mutagène. L'activité enzymatique de chaque banque sera par la suite analysée à pH 7.0 à l'aide de la plateforme de criblage mise au point. Différentes conditions de mutagenèse pourront être testées en

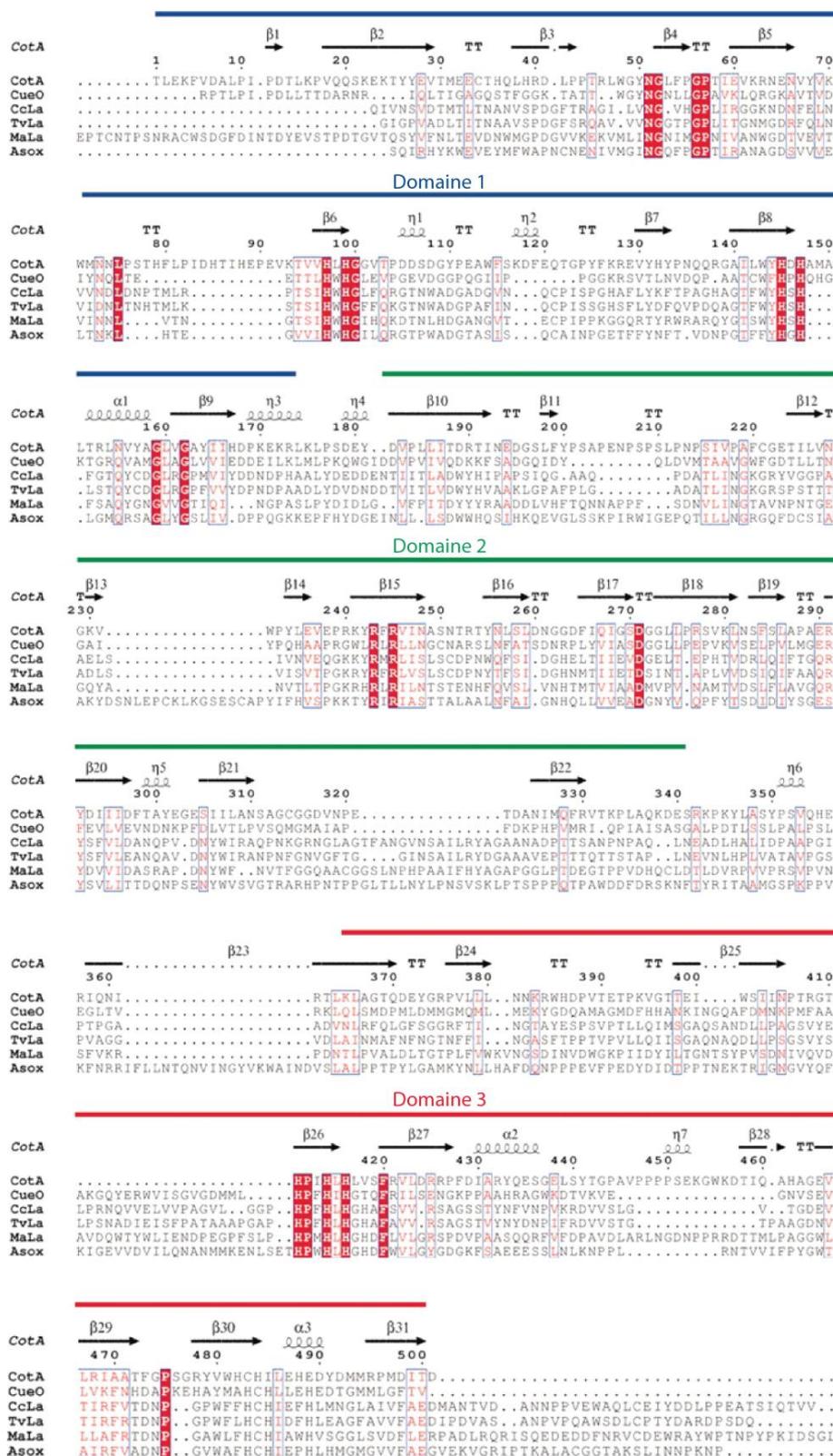
fonction des activités mesurées. Les banques seront ensuite triées afin d'isoler les mutants les plus actifs après plusieurs cycles de criblage entrecoupés de possibles nouvelles phases de mutagenèse/recombinaison. Les mutants sélectionnés seront ensuite caractérisés individuellement en microplaque puis évalués et comparés à l'aide des outils électrochimiques développés de ces travaux de doctorat.

Dans l'hypothèse où une laccase optimisée et électrocatalytiquement active à pH7.0 était développée, il serait intéressant de l'intégrer dans un prototype de biopile enzymatique performant *via* une collaboration avec une équipe possédant un savoir faire le domaine. Le système développé par *Zebda et al.* et décrit en Figure 6 serait, par exemple, particulièrement intéressant (*Zebda et al. 2011*).

Enfin, la plateforme de criblage mise au point pourra, de part son caractère universel et sa flexibilité, être appliquée à l'évolution dirigée d'autres protéines dans l'optique d'augmenter leur activité catalytique. Elle peut en effet être potentiellement appliquée à toute protéine dont l'activité est détectable par fluorescence. La méthode sera d'autant plus efficace pour une protéine sécrétée ou de surface. Elle fonctionnerait néanmoins également pour des protéines périplasmiques ou même cytoplasmiques comme nous avons pu le démontrer.

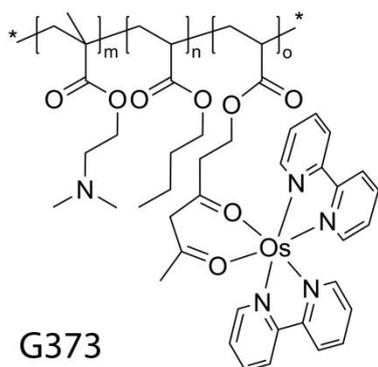
L'un des points clefs pour améliorer cette plateforme de criblage serait de travailler avec un substrat et un produit de réaction enzymatique qui soient hautement hydrophiles et ne fuient pas des microgouttelettes. Un brevet récent semble montrer que des voies de synthèse d'analogues fluorogéniques de l'Amplex® Ultra Red soient dorénavant accessibles (*US 2011/0086341 A1*). L'introduction d'un groupement sulfonate ou carboxylate limiterait considérablement la fuite du produit de réaction enzymatique correspondant. Il serait donc également très intéressant d'orienter à l'avenir les recherches dans cette direction.

Annexe 1. Sequence de CotA et alignement avec celle de TvLac



Alignement de la séquence ce CotA avec celles d'autres "mutlicopper oxidase" dont TvLac : les régions hautement conservées sont encadrées : les résidus invariants sont présentés sur fond rouge, les résidus conservés sont eux présentés sur fond blanc. La structure secondaire de CotA est représentée au dessus de l'alignement. Les trois domaines de CotA sont également indiqués en couleur au dessus de la structure secondaire. Reproduit depuis Enguita et al. 2003

Annexe 2. Structures des polymères rédox à base de sel d'osmium étudiés



DMAMEA 25%/BA 60%/AcacEA 15%/Os(BiPy)₂

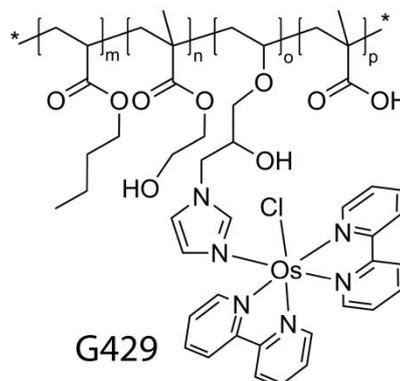
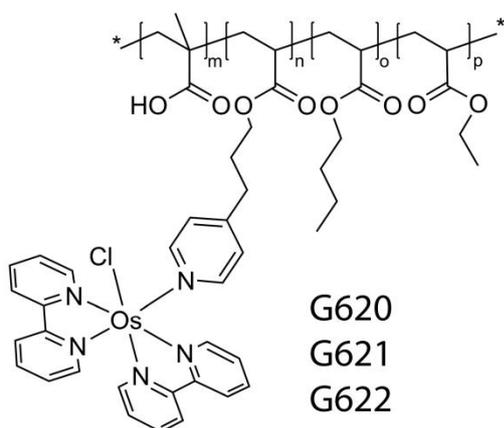
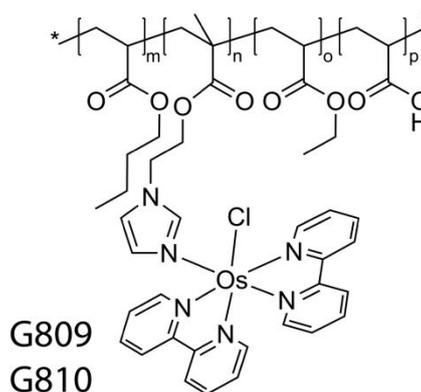


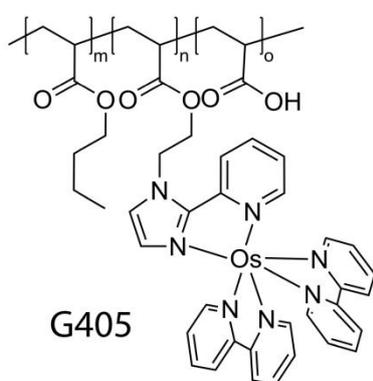
ImAGE 13%/MAA 37%/BA 37%/HOEMA 13%/Os(BiPy)₂



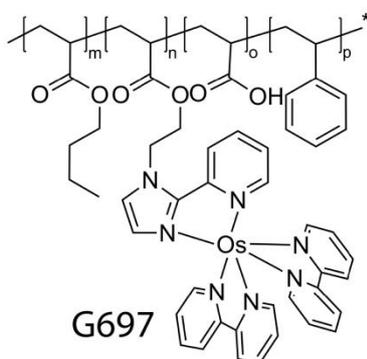
G620 : PyPMA 8%/BA 63%/MMA 29%/EA 0%/Os(BiPy)₂Cl
G621 : PyPMA 8%/BA 45%/MMA 29%/EA 18%/Os(BiPy)₂Cl
G622 : PyPMA 8%/BA 27%/MMA 29%/EA 36%/Os(BiPy)₂Cl



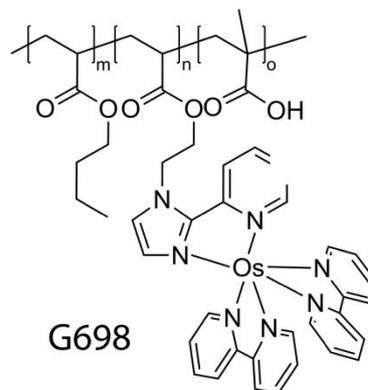
G809 : AA 28%/BA 40%/EA 20%/ImEMA 12%/Os(BiPy)₂Cl
G810 : AA 28%/ BA 26%/ EA 34%/ImEMA 12%/Os(BiPy)₂Cl



AA 22%/BA 71%/ImPyEA 7%/Os(BiPy)₂

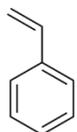


AA 30%/BA 44%/St 18%/ImPyEA 8%/Os(BiPy)₂

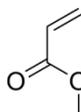


MAA 28%/BA 64%/ImPyEA 8%/Os(BiPy)₂

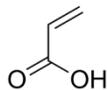
Annexe 2 (suite). Noms et structures des monomères



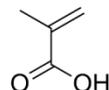
St



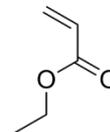
MA



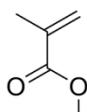
AA



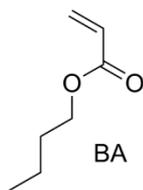
MMA



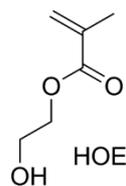
EA



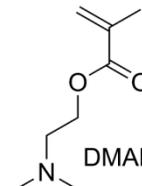
MMA



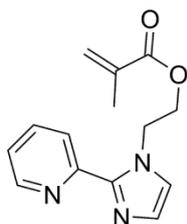
BA



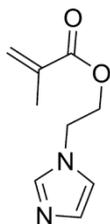
HOEMA



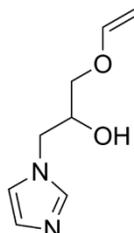
DMAMEA



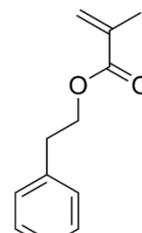
ImPyEA



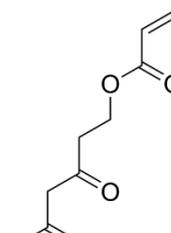
ImEMA



ImAGE



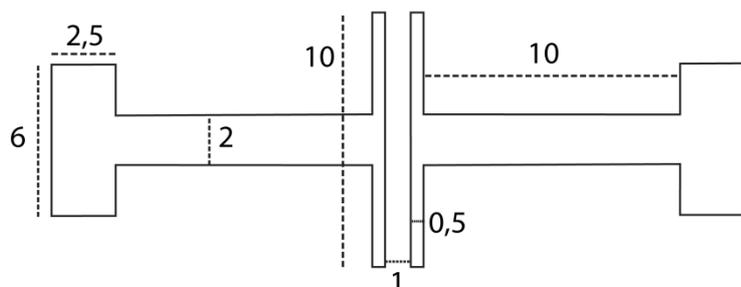
PyPMA



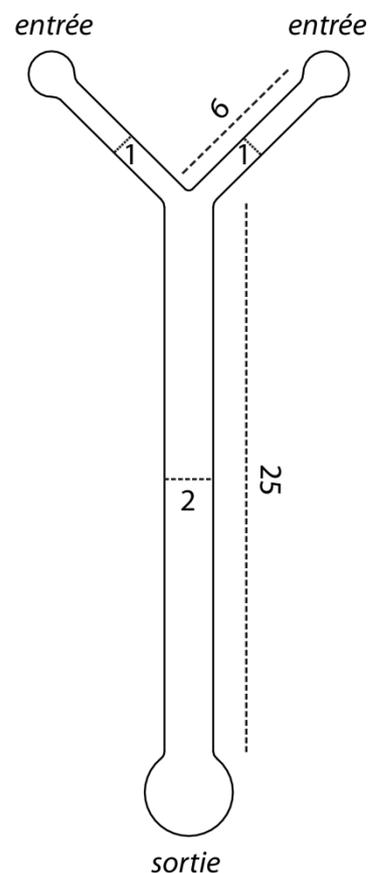
AcacEA

Annexe 3. Dimensions du système de biopile microfluidique

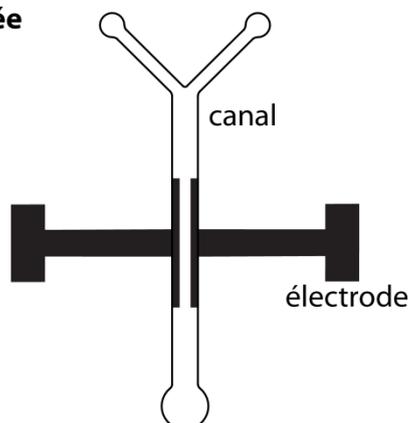
(a) électrodes



(b) canaux microfluidiques



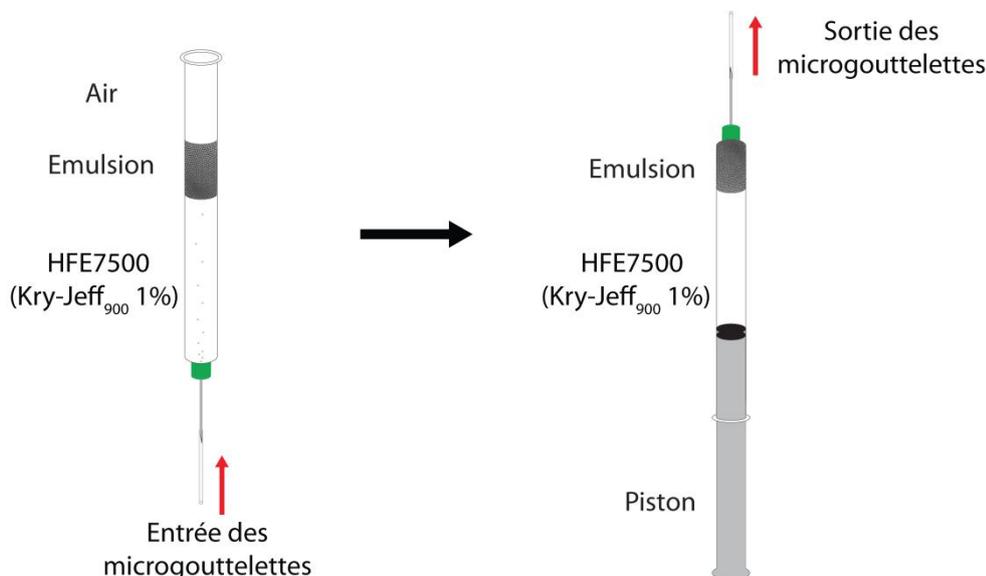
(c) biopile assemblée



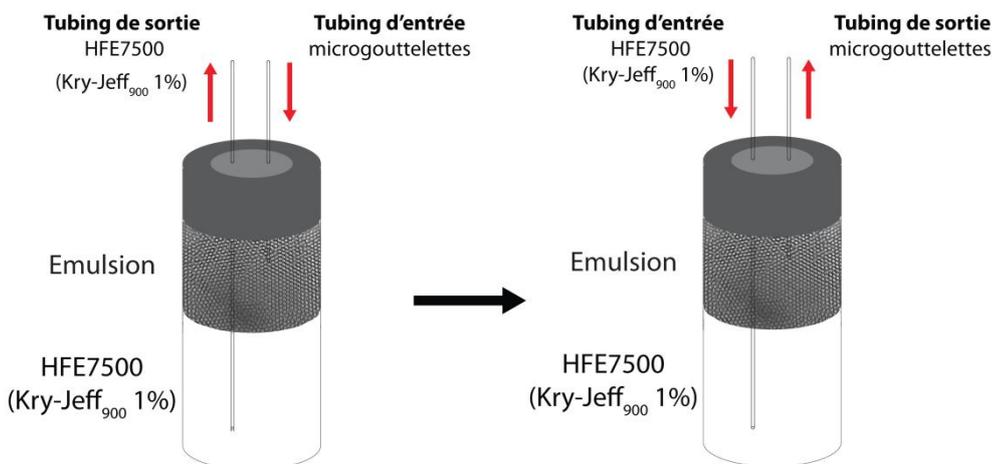
Dimensions et fonctionnement de la biopile microfluidique : **(a)** dimensions de la structure des électrodes. La surface active d'une électrode (c'est-à-dire la surface à l'intérieur du canal microfluidique) est de 10 mm sur 0,5 mm. Les deux électrodes sont séparées par 1 mm. Les mesures sont données en mm. Cette structure est ensuite reproduite sur une lame de verre puis recouverte de nanotubes de carbone. **(b)** dimension des canaux microfluidiques. Le module comprend deux entrées de phase aqueuse (anode et cathode). Les deux flux se rejoignent via une jonction en Y. La profondeur des canaux est de 120 μm . Les mesures sont donnée en mm. **(c)** assemblage de la biopile. La puce microfluidique en PDMS est collée sur la lame de verre contenant les électrodes, le canal principal de 2 mm de large se superposant parfaitement sur les deux électrodes de 0,5 mm séparées l'une de l'autre par 1 mm

Annexe 4. Systèmes de collecte, incubation et réinjection des émulsions

(a)

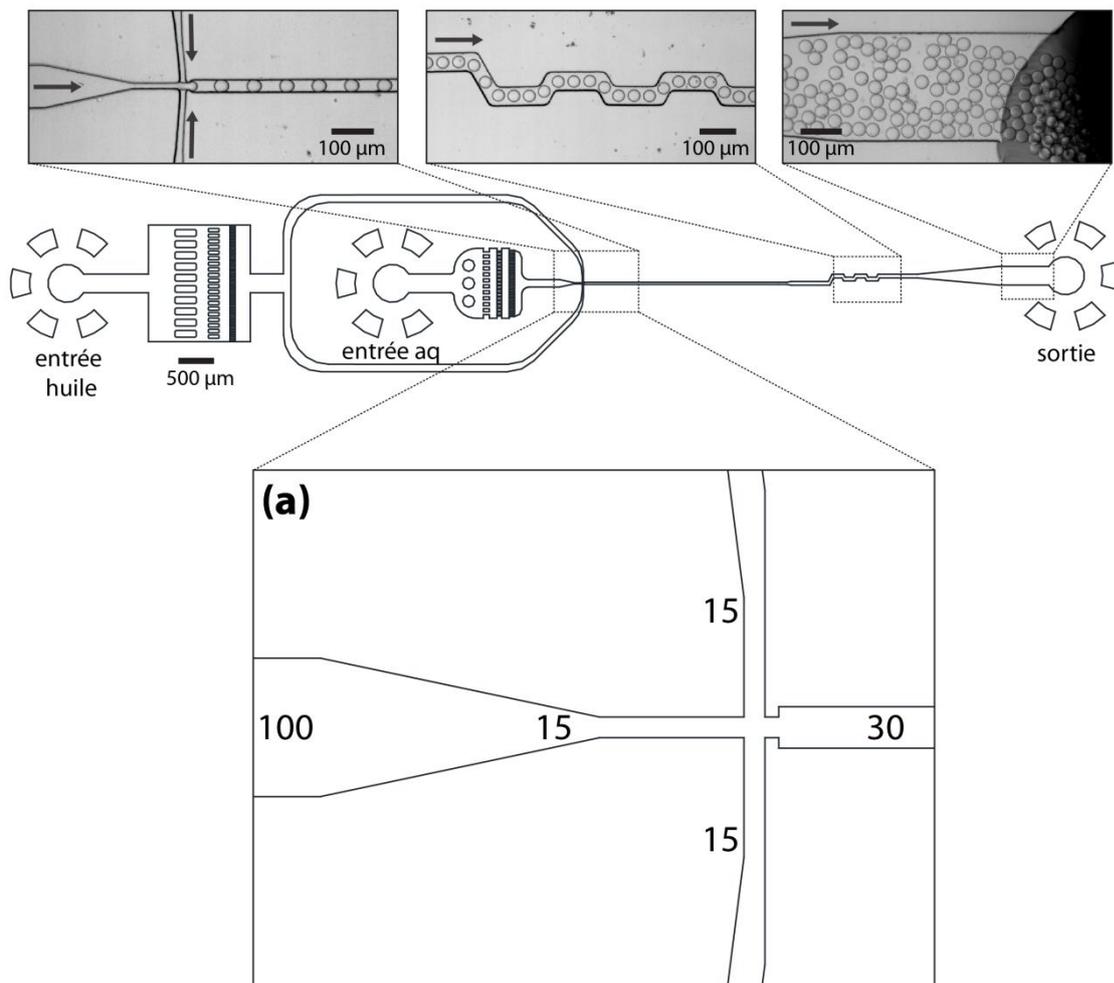


(b)



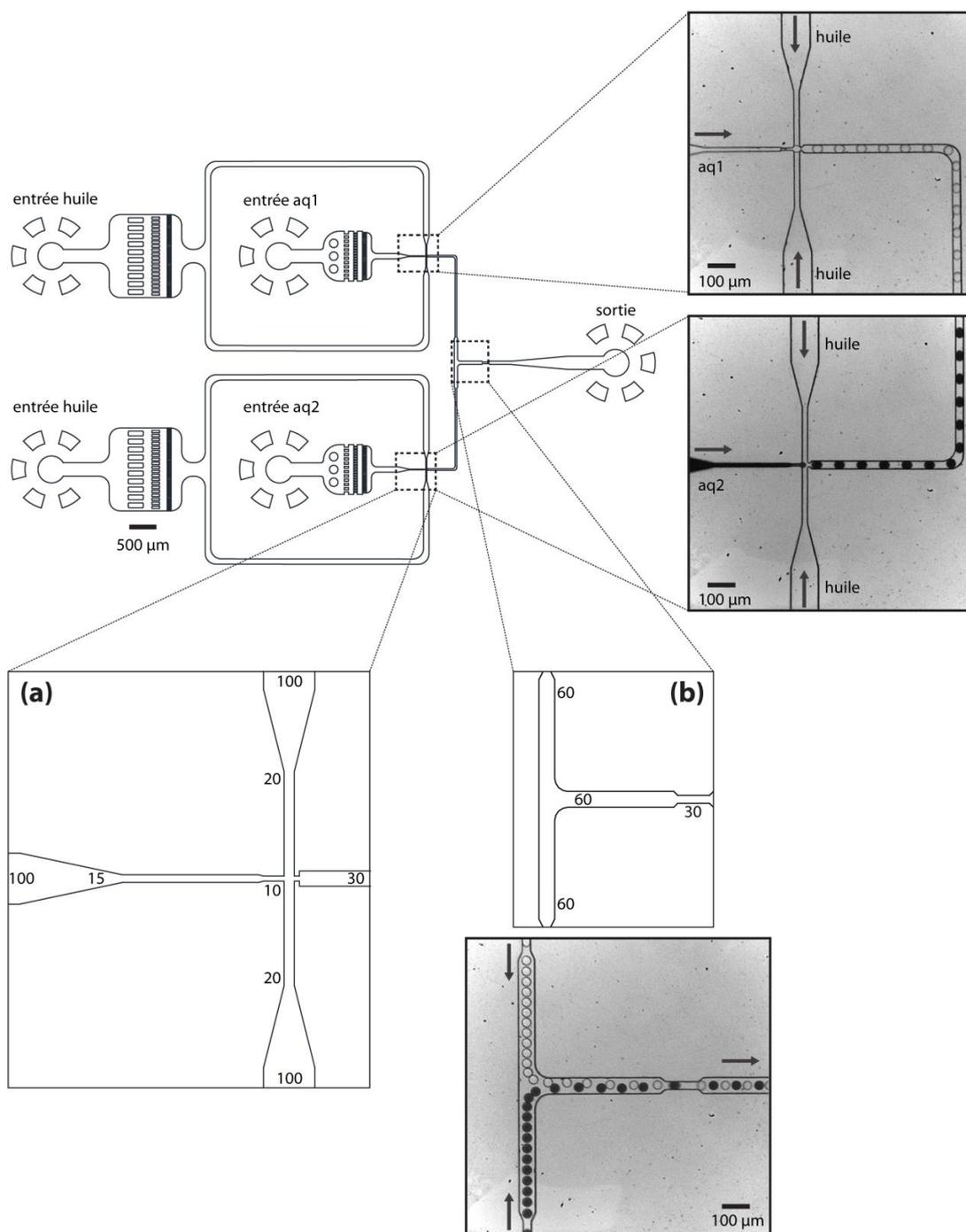
Principes des techniques de collecte, incubation et réinjection des émulsions : **(a) Collecte en seringue :** une seringue est connectée à un tubing en PTFE en sortie du canal microfluidique de collecte. La seringue, contenant de l'huile HFE7500 avec 1% de Kry-Jeff₉₀₀, est placée tête vers le bas sans piston. Les microgouttelettes remontent à l'interface avec l'air en raison de la différence de densité entre l'eau et l'huile perfluorée (1 pour 1,8). En fin de collecte, le piston est replacé puis la seringue retournée et incubée sans aiguille, permettant l'oxygénation des bactéries encapsulées. L'émulsion est réinjectée dans une puce microfluidique en poussant la phase huile située sous l'émulsion après avoir connecté la seringue à un tubing en PTFE relié au canal d'entrée de la puce microfluidique. **(b) Collecte en vial :** le septum d'un vial est percé de deux trous avec un poinçon. Deux tubing en PTFE sont connectés au vial, l'un au fond et connecté à une seringue remplie d'huile HFE7500 avec 1% de Kry-Jeff₉₀₀ et l'autre au sommet destiné à être connecté à la sortie du canal microfluidique de collecte. Avant d'être connecté en sortie de la puce microfluidique, le système est complètement rempli d'huile HFE7500 contenant 1% de Kry-Jeff₉₀₀. Après connexion, les microgouttelettes remplissent le vial en chassant l'huile. Le vial et les tubing sont entièrement immergés dans la glace. L'émulsion est réinjectée en connectant une seringue d'huile au tubing de sortie du vial : les flux sont inversés et l'huile chasse les microgouttelettes vers le canal d'entrée du module de réinjection. Pendant la réinjection, le système est maintenu immergé dans la glace, permettant ainsi la collecte et la réinjection de l'émulsion à 0°C

Annexe 5. Dimensions et fonctionnement du module de simple flux



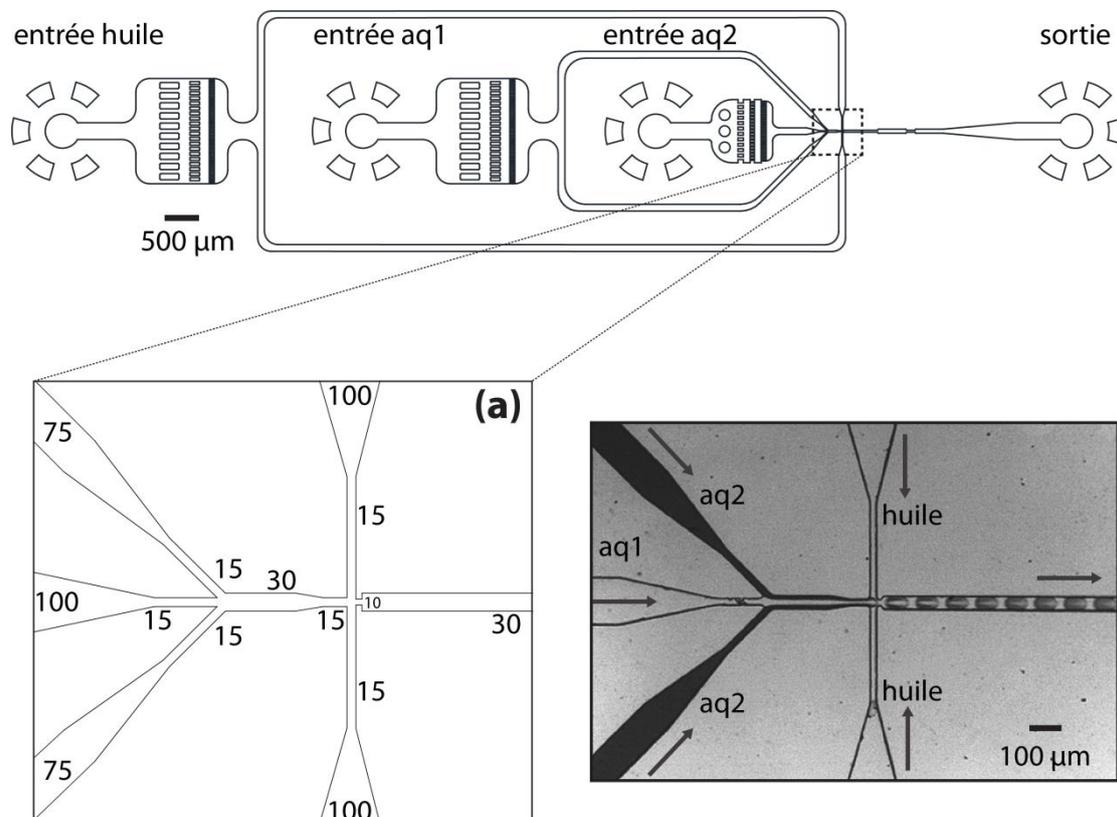
Dimensions et fonctionnement du module de simple flux : le module est constitué d'une entrée de phase huile continue et d'une entrée de phase aqueuse (aq) dispersée. Des piliers jouent le rôle de filtres et permettent également de soutenir la structure de PDMS. Les microgouttelettes sont formées par focalisation hydrodynamique dans l'huile fluorée contenant du tensioactif. Les microgouttelettes sont stabilisées par le tensioactif avant collecte le long d'un canal de 3000 μm de long et de 30 μm de largeur puis lors du passage au sein d'un canal en zig zag de 50 μm de largeur. La profondeur des canaux est de 25 μm . **(a)** Dimensions du nozzle (rétrécissement) de production. Les largeurs des canaux sont données en μm

Annexe 6. Dimensions et fonctionnement du module de double simple flux



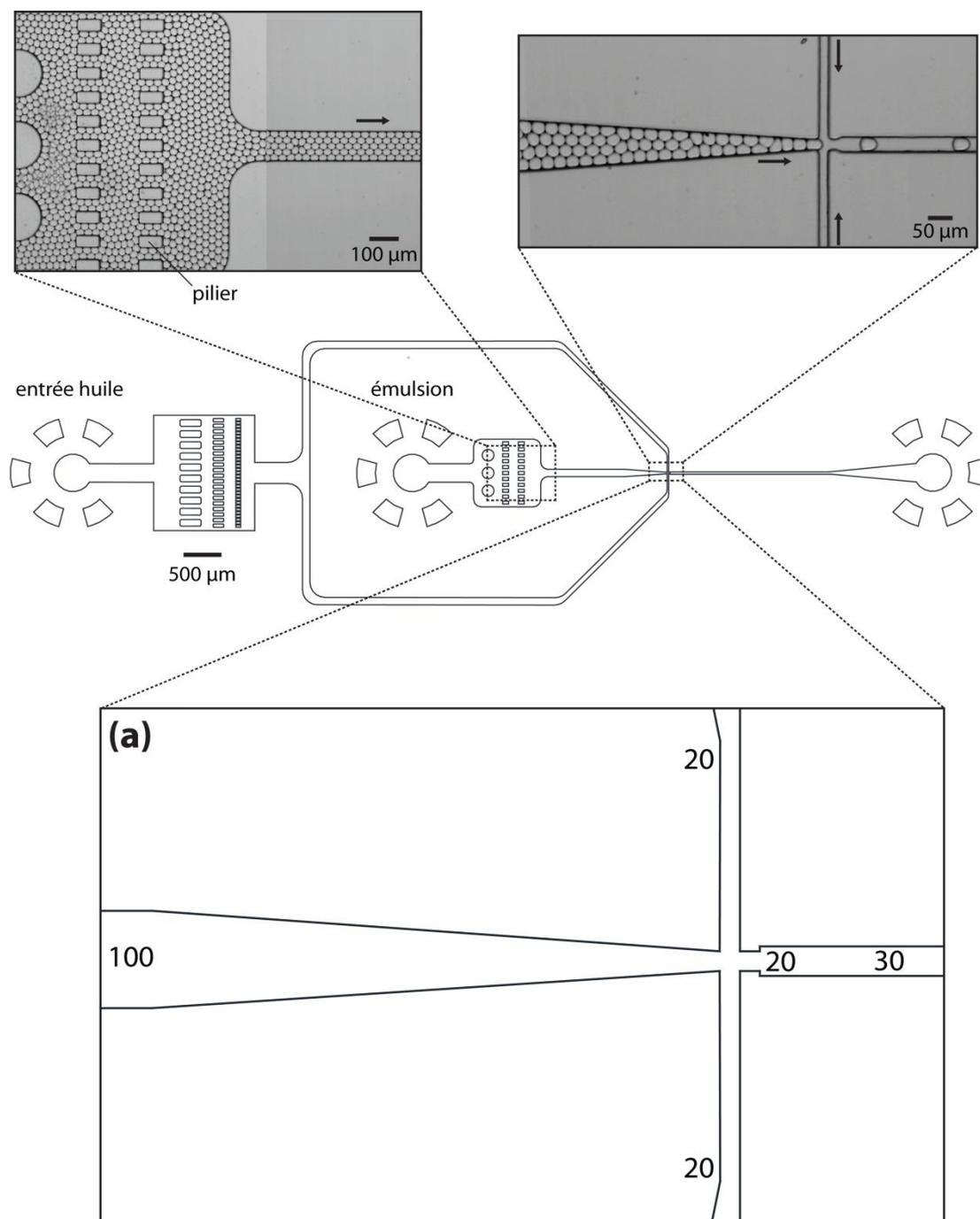
Dimensions et fonctionnement du module de double simple flux: le module est constitué de deux modules de simple flux associés en parallèle et comprend deux entrées de phase huile continue et deux entrées de phase aqueuse (aq1 et aq2) dispersées. Des piliers jouent le rôle de filtres et permettent également de soutenir la structure de PDMS. Les deux types de microgouttelettes sont formés par focalisation hydrodynamique dans l'huile fluorée contenant du tensioactif. Les microgouttelettes sont stabilisées par le tensioactif avant collecte le long d'un canal de 60 µm de largeur permettant la réunion des deux types de microgouttelettes via une jonction en T. Avant la sortie, les microgouttelettes passent dans un rétrécissement de 30 µm de largeur constituant un point de mesure de fluorescence. La profondeur des canaux est de 25 µm. **(a)** Dimensions du nozzle de production. Le second nozzle est identique. Les largeurs des canaux microfluidiques sont données en µm. **(b)** Dimensions de la jonction en T permettant la réunion des deux types de microgouttelettes. Les largeurs des canaux microfluidiques sont données en µm

Annexe 7. Dimensions et fonctionnement du module de co-flux



Dimensions et fonctionnement du module de co-flux: le module est constitué d'une entrée de phase huile continue et de deux entrées de phase aqueuse (aq1 et aq2) dispersées. Les microgouttelettes sont formées par focalisation hydrodynamique dans l'huile fluorée contenant du tensioactif. L'introduction de la phase aq1 au milieu de la phase aq2 favorise le mélange du contenu des microgouttelettes après formations. Des piliers jouent le rôle de filtres et permettent également de soutenir la structure de PDMS. Les microgouttelettes sont stabilisées par le tensioactif avant collecte le long d'un canal de 30 µm puis 60 µm de largeur. Avant la sortie, les microgouttelettes passe dans un rétrécissement de 30 µm de largeur constituant un point de mesure de fluorescence. La profondeur des canaux est de 25 µm. **(a)** Dimensions du nozzle de production. Les largeurs des canaux microfluidiques sont données en µm

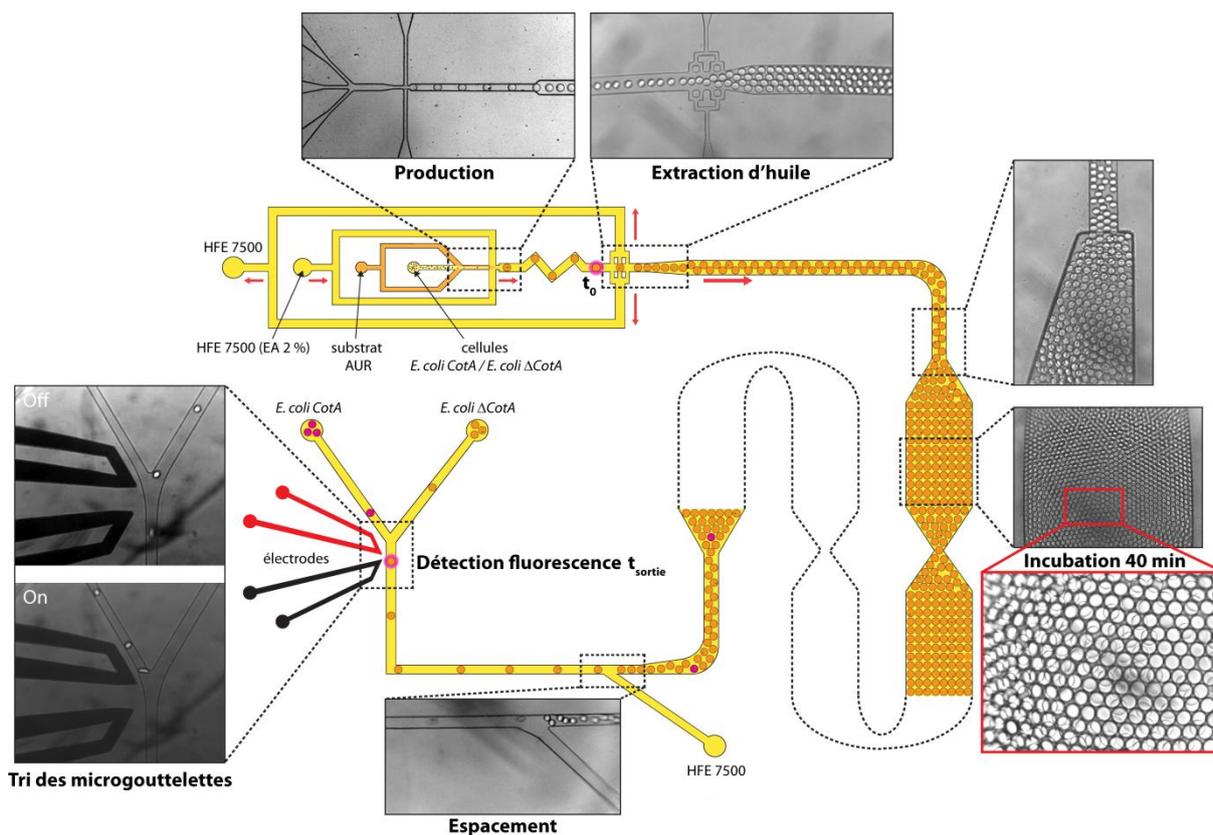
Annexe 8. Dimensions et fonctionnement du module de réinjection



Dimensions et fonctionnement du module de réinjection : le module est constitué d'une entrée de phase huile continue et d'une entrée d'émulsion. Le flux d'huile sans tensioactif ($100-250 \mu\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$) permet d'espacer les microgouttelettes après réinjection de l'émulsion ($50-150 \mu\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$) pour la mesure de fluorescence. Des piliers jouent le rôle de filtres et permettent également de soutenir la structure de PDMS. La profondeur des canaux est de $25 \mu\text{m}$. **(a)** Dimensions du nozzle de réinjection. Les largeurs des canaux microfluidiques sont données en μm

Annexe 9 : Première stratégie microfluidique envisagée pour l'évolution dirigée *in vivo* de CotA

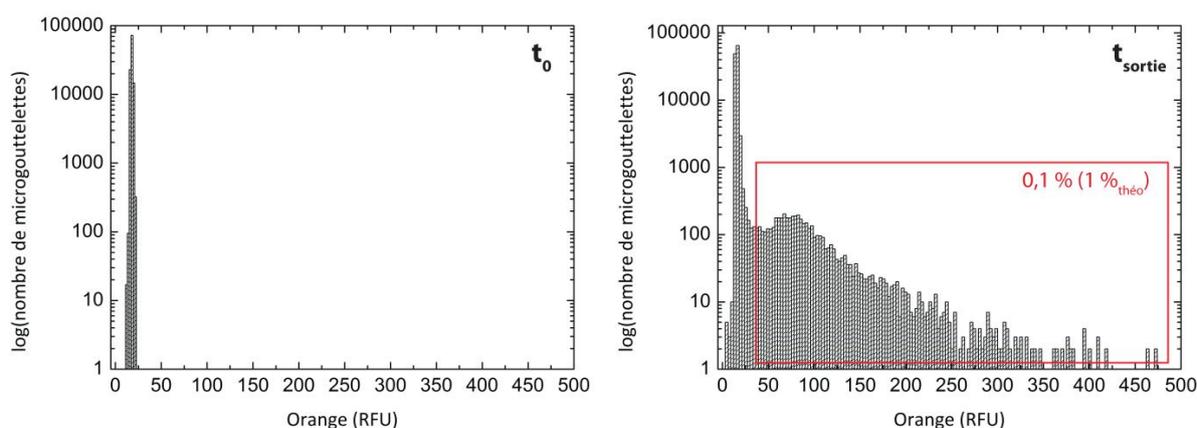
Après induction de l'expression des protéines, le mélange de cellules *E. coli CotA*:*E. coli ΔCotA* (1 :9) est encapsulé avec le substrat AUR dans des microgouttelettes de 15 pL en utilisant un co-flux. Un extracteur d'huile permet de densifier l'émulsion afin d'augmenter au maximum le temps de séjour des microgouttelettes au sein de la ligne de délai et surtout d'assurer un brassage efficace des microgouttelettes au passage de chaque rétrécissement. En effet, dans le cas où l'émulsion n'est pas assez dense, les microgouttelettes ne sont pas redistribuées aléatoirement au sein de la ligne de délai et le temps de séjour de chaque microgouttelette n'est plus uniforme. Les microgouttelettes incubent le long de la ligne de délai pendant environ 40 min : elles circulent en double couche, la ligne de délai étant deux fois plus profonde que les autres canaux (50μm pour 25μm). En sortie de ligne de délai, un flux d'huile permet d'espacer suffisamment les microgouttelettes pour leur arrivée dans le trieur. Après mesure de la fluorescence, les microgouttelettes sont triées.



Principe de la plateforme 1 pour l'évolution dirigée de CotA : un mélange de cellules *E. coli CotA*:*E. coli ΔCotA* (1:9) induites 15 h est encapsulé dans des microgouttelettes de 15 pL contenant 0,5 mM d'AUR et 20 mM de $CuCl_2$. Phase huile : HFE7500 contient 2% de tensioactif EA ($400 \mu L.h^{-1}$). Phase aqueuse 1 : cellules à 0,2 cellule/15 pL ($50 \mu L.h^{-1}$). Phase aqueuse 2 : DYE ($2x (50 \mu L.h^{-1})$). La fluorescence est mesurée après mélange du contenu des microgouttelettes à t_0 . Un extracteur d'huile (pompe $100 \mu L.h^{-1}$) densifie l'émulsion avant l'entrée dans la ligne de délai pour incubation. Les microgouttelettes circulent en double couche au sein de la ligne de délai (environ 40 min) puis sont espacées par un flux d'huile sans tensioactif ($1000 \mu L.h^{-1}$). La fluorescence est de nouveau mesurée à t_{sortie} puis les microgouttelettes sont triées

Annexe 9 (suite)

Des mesures d'activité ont été effectuées afin de s'assurer que le signal de fluorescence était suffisamment élevé en sortie de ligne de délai pour espérer pouvoir discriminer et trier les microgouttelettes *E. coli CotA*. A t_0 , toutes les microgouttelettes émettent un signal de fluorescence identique formant une population homogène. En sortie de la ligne de délai (t_{sortie}), une seconde population apparaît correspondant aux microgouttelettes *E. coli CotA*. Le signal est cependant dispersé avec une fluorescence moyenne environ seulement 2 fois supérieure à celle de la population négative, ce qui paraît difficile à sélectionner. De plus, cette population ne représente que 0,1 % des microgouttelettes, soit 10 fois moins que théoriquement attendu.



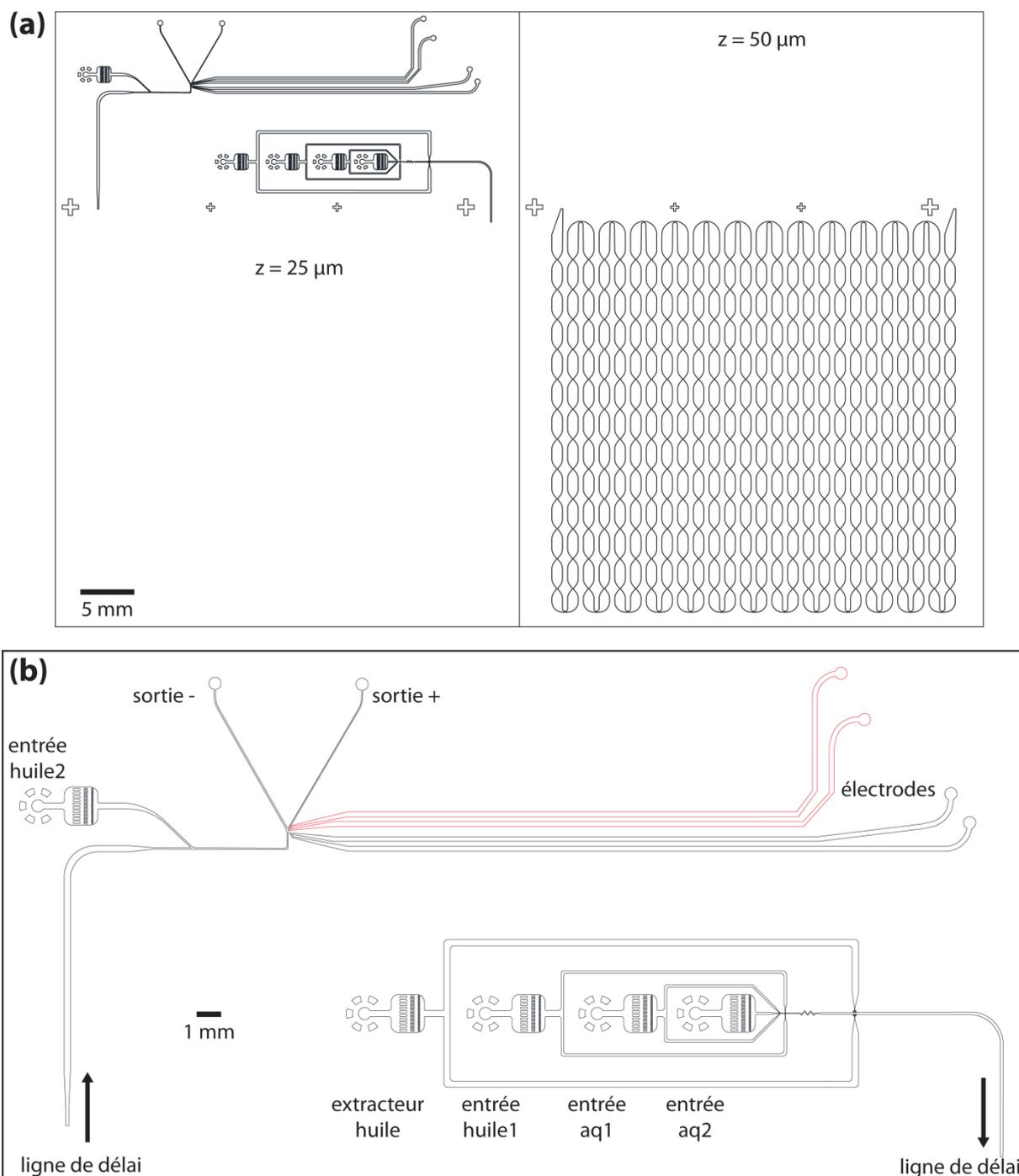
Mesure de l'activité CotA : histogrammes représentant la distribution en intensité de fluorescence orange des microgouttelettes à l'entrée (t_0) et à la sortie (t_{sortie}) de la ligne de délai

Plusieurs tests de récupération des bactéries après passage dans la puce microfluidique ont été effectués et se sont montrés infructueux. Après collecte d'une quantité définie de microgouttelettes dans du milieu LB, l'émulsion a été cassée par l'ajout de "droplet breaker" puis la phase aqueuse étalée sur boîte LB Agar. Seulement environ 1 % des bactéries ont pu être récupérées.

Cette stratégie a été rapidement abandonnée en particulier à cause :

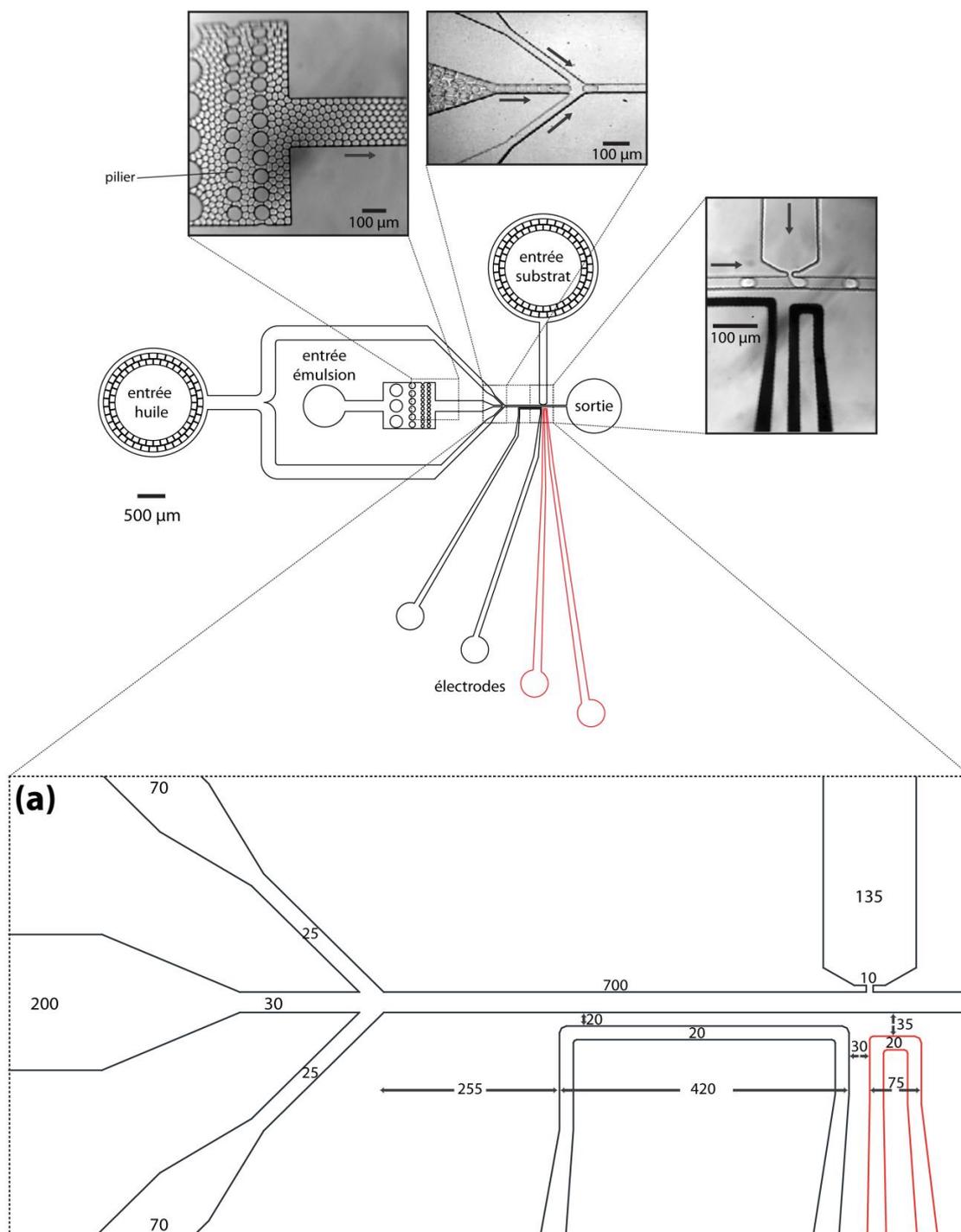
- Signal de fluorescence trop faible par rapport au bruit de fond (limité en partie par la diffusion du substrat à l'intérieur des cellules)
- Protocole trop stressant pour les bactéries se soldant par un taux de survie quasiment nul (le fait d'induire les cellules et de les laver avant encapsulation paraît peu approprié et entraîne vraisemblablement l'encapsulation d'une fraction de bactéries mortes)
- Système de tri à optimiser. Le système de FADS ne fonctionne en effet pas efficacement ainsi intégré à la sortie d'une ligne de délai, principalement en raison des fortes pressions mises en jeu dans les canaux microfluidiques. Des travaux d'optimisation sont encore nécessaires pour faire fonctionner le tri de manière optimale.

Annexe 10. Dimensions et fonctionnement du module de la plateforme



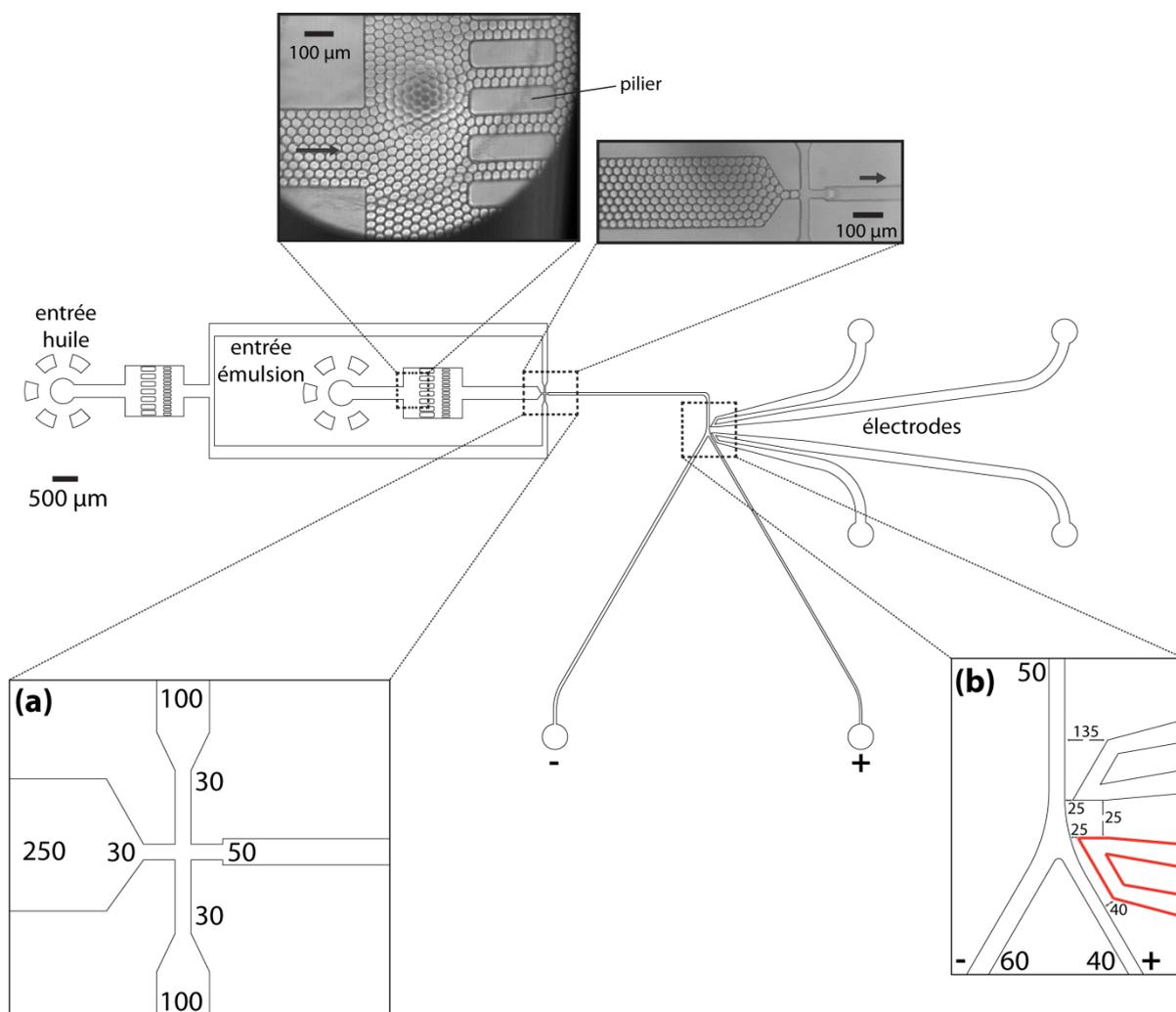
Dimensions et fonctionnement du module de la plateforme 1: (a) Le module est constitué de deux parties pour constituer un moule en double couche : les canaux de la partie de gauche ont pour profondeur $25 \mu\text{m}$ tandis que ceux de la partie de droite (ligne de délai) ont une profondeur de $50 \mu\text{m}$. (b) Le module est constitué d'un module de co-flux (annexe 1 ; même dimensions) agrémenté d'un extracteur d'huile et d'un module de FADS (annexe 1 ; même dimensions) muni d'une entrée d'huile2 supplémentaire. Les microgouttelettes sont formées par focalisation hydrodynamique dans l'huile fluorée contenant du tensioactif. L'introduction de la phase aq1 au milieu de la phase aq2 favorise un mélange rapide du contenu des microgouttelettes après formations. Des piliers jouent le rôle de filtres et permettent également de soutenir la structure de PDMS. Les microgouttelettes sont densifiées par un extracteur d'huile avant leur entrée dans la ligne de délai sous la forme de deux couches compactes. Une entrée huile2 permet d'espacer les microgouttelettes en sortie de ligne de délai avant l'arrivée dans le module de FADS

Annexe 11. Dimensions et fonctionnement du module de picoinjection



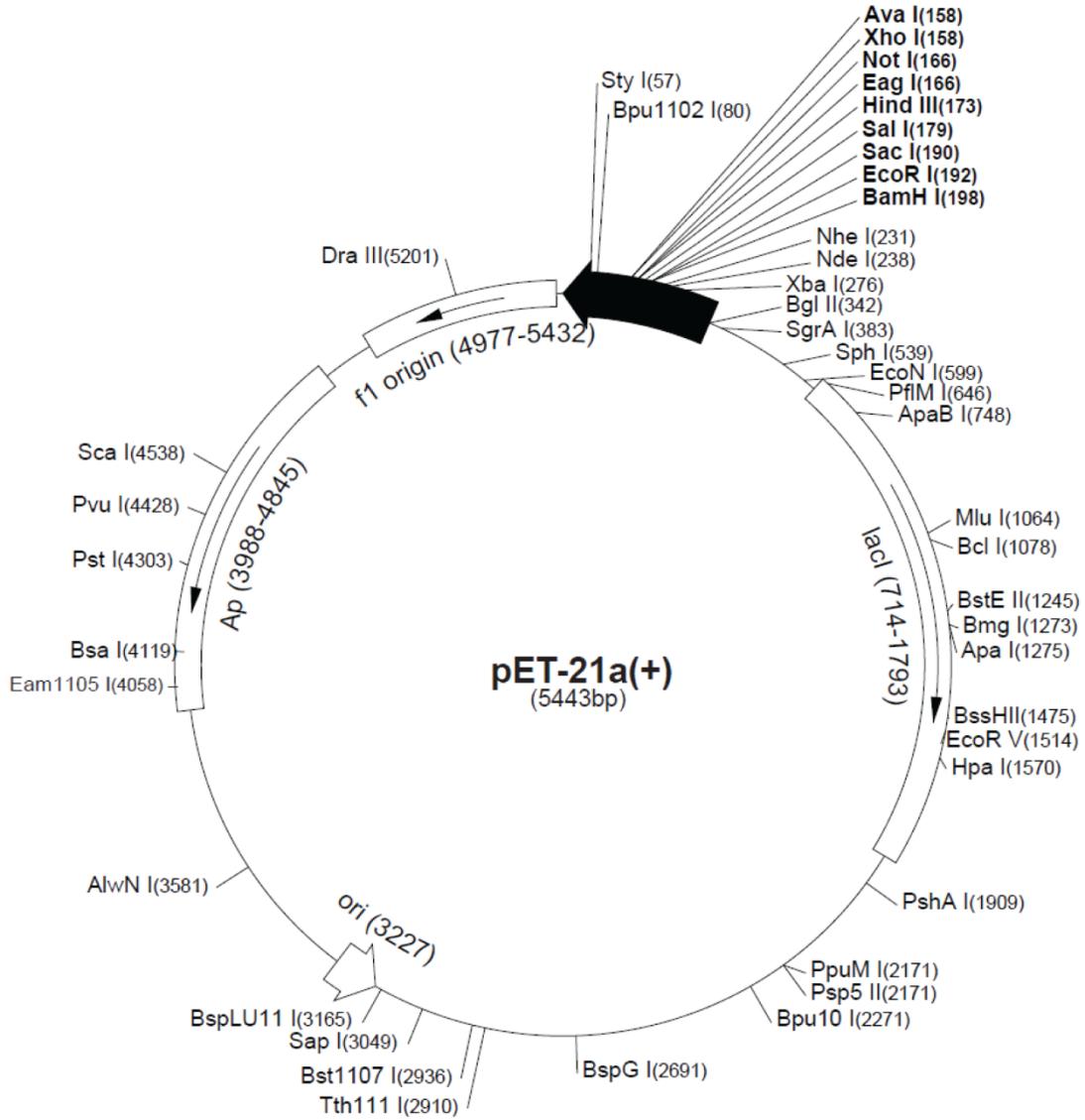
Dimensions et fonctionnement du module de picoinjection: le module est constitué d'une entrée de phase huile continue, d'une entrée d'émulsion et d'une entrée de phase aqueuse à injecter. Le flux d'huile avec tensioactif ($200-600 \mu\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$) permet d'espacer les microgouttelettes après réinjection de l'émulsion ($70-160 \mu\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$). Des piliers jouent le rôle de filtres et permettent également de soutenir la structure de PDMS. La phase aqueuse est injectée à $20-100 \mu\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$. En absence de champ électrique, la picoinjection n'a pas lieu. La picoinjection a lieu lors de l'application d'un champ électrique continu (20 kHz ; 200 V). Le volume injecté est principalement contrôlé par la vitesse et la fréquence de passage des microgouttelettes au niveau de l'injecteur. La fréquence d'injection au sein des microgouttelettes est comprise entre 1500 Hz pour les flux les plus bas et 3200 Hz pour les flux les plus élevés. La profondeur des canaux est de 25 μm . **(a)** Dimensions du système. Les mesures sont données en μm

Annexe 12. Dimensions et fonctionnement du module de FADS



Dimensions et fonctionnement du module de FADS: le module est constitué d'une entrée de phase huile continue et d'une entrée d'émulsion. Le flux d'huile sans tensioactif ($500-1000 \mu\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$) permet d'espacer les microgouttelettes après réinjection de l'émulsion ($20-70 \mu\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$). Des piliers rectangulaires jouent le rôle de filtres et permettent également de soutenir la structure de PDMS. La profondeur des canaux est de $25 \mu\text{m}$. **(a)** Dimensions du nozzle de réinjection. Les largeurs des canaux microfluidiques sont données en μm . **(b)** Dimensions de l'embranchement de tri. Les mesures sont données en μm . Le bras "positif" (+), plus proche des électrodes, fait $40 \mu\text{m}$ tandis que le bras "négatif" (-), plus éloigné des électrodes, est plus large ($60 \mu\text{m}$). La différence de résistance hydraulique favorise la circulation du flux dans le canal le plus large : en absence de champ électrique, les microgouttelettes sont toutes dirigées dans le bras (-). Les microgouttelettes sont déviées (une à la fois) dans le bras (+) par diélectrophorèse en appliquant un pulse électrique (30kHz ; $1000-1400\text{V}$; $0,5 \text{ms}$) déclenché à la détection de fluorescence

Annexe 13. Carte du vecteur pET-21a(+)



Références

- Abate, A.R.; Lee, D.; Do, T.; Holtze, C.; Weitz, D.A. (2008). "Glass coating for PDMS microfluidic channels by sol-gel methods". *Lab on a Chip* 8 (4), 516-518
- Abate, A.R.; Poitzsch, A.; Hwang, Y.; Lee, J.; Czerwinska, J.; Weitz, D.A. (2009 (a)). "Impact of inlet channel geometry on microfluidic drop formation". *Phys. Rev. E* 80 (2), 026310
- Abate, A.R.; Romanowsky, M.B.; Agresti, J.J.; Weitz, D.A. (2009 (b)). "Valve-based flow focusing for drop formation". *Appl. Phys. Lett.* 94, 023503
- Abate, A.R.; Hung, T.; Mary, P.; Agresti, J.J.; Weitz, D.A. (2010). "High-throughput injection with microfluidics using picoinjectors". *Proc. Natl. Acad. Sci.* 17 (45), 19163-19166
- Abdelgawad, M.; Wheeler, A.R. (2009). "The digital revolution : a new paradigm for microfluidics". *Adv. Mat.* 21 (8), 920-925
- Abécassis, V; Pompon, D.; Truan, G. (2000). "High efficiency family shuffling based on multi-step PCR and in vivo DNA recombinaison in yeast: statistical and functional analysis of a combinatorial library between human cytochrome P450 1A1 and 1A2". *Nucleic Acids Research* 28 (20), e88
- Ackermann, Y.; Guschin, D.A.; Eckhard, K.; Shleev, S.; Schuhmann, W. (2010). "Design of a bioelectrocatalytic electrode interface fo oxygen reduction in biofuel cells based on a specifically adapted Os-complex containing redox polymer with entrapped *Trametes hirsute laccase*". *Electrochem. Commun.* 12, 640-643
- Agresti, J.J.; Kelly, B.T.; Jäschke, A.; Griffiths, A.D. (2005). "Selection of ribozymes that catalyze multiple-turnover Diels-Alder cycloadditions by using in vitro compartmentalization". *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102 (45), 16170-16175
- Agresti, J.J.; Antipov, E.; Abate, A.R.; Ahn, K.; Rowat, A.C.; Baret, J-C.; Marquez, M.; Klibanov, A.M.; Griffiths, A.D.; Weitz, D.A. (2010). "Ultrahigh-throughput screening in drop-based microfluidics for directed evolution". *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107 (9), 4004-4009
- Aharoni, A.; Gaidukov, L.; Khersonsky, O.; McQ Gould, S.; Roodveldt, C.; Tawfik, D.S. (2005). "The evolvability of promiscuous protein functions". *Nat. Genet.* 37 (1), 73-76
- Aharoni, A.; Amitai, G.; Bernath, K.; Magdassi, S. ; Tawfik, D.S. (2005 (b)). "High-throughput screening of enzyme libraries: thiolactonases evolved by fluorescence-activated sorting of single cells in emulsion compartments". *Chem. Biol.* 12 (12), 1281-1289
- Aharoni, A.; Griffiths, A.D.; Tawfik, D.S. (2005 (c)). "High-throughput screens and selections of enzyme-encoding genes". *Curr. Opin. Chem. Biol.* 9 (2), 210-216
- Aharoni, A.; Thieme, K.; Chiu, C.P.C.; Buchini, S.; Lairson, L.L. ; Chen, H. ; Strynadka, , N.C.J.; Wakarchuk, W.W.; Withers, S.G. (2006). "High-throughput screening methodology for the directed evolution of glycosyltransferases". *Nat. Methods* 3 (8), 609-614
- Ahn, K.; Agresti, J.; Chong, H.; Marquez, M.; Weitz, D.A. (2006 (a)). "Electrocoalescence of drops synchronized by size-dependent flow in microfluidic channels". *Appl. Phys. Lett.* 88 (26), 264105
- Ahn, K.; Hunt, T.P.; Westervelt, R.M.; Link, D.R.; Weitz, D.A. (2006 (b)). "Dielectrophoretic manipulation of drops for high-speed microfluidic sorting devices". *Appl. Phys. Lett.* 88 (2), 024104
- Ahuja, T.; Mir, I.A.; Kumar, D.; Rajesh (2007). "Biomolecular immobilization on conducting polymer for biosensin applications". *Biomaterials* 28, 791-805

- Akers, N.L.; Moore, C.M.; Minteer, S.D. (2005). "Development of alcohol/O₂ biofuel cells using salt-extracted tetrabutylammonium bromide/Nafion membranes to immobilize dehydrogenase enzymes". *Electrochimica Acta* 50, 2521-2525
- Alexeeva, M.A.; Enright, A.; Dawson, M.J.; Mahmoudian, M.; Turner, N.J. (2002). "Deracemization of α -methylbenzylamine using an enzyme obtained by in vitro evolution". *Angew. Chem. Int. Ed.* 41 (17), 3177-3180
- Allongue, P.; Delamar, M.; Desbat, B.; Fagebaume, O.; Hitmi, R.; Pinson, J.; Savéant, J-M. (1997). "Covalent modification of carbon surfaces by aryl radicals generated from the electrochemical reduction of diazonium salts". *J. Am. Chem. Soc.* 119, 201-207
- Anderson, J.R.; Chiu, D.T.; Jackman, R.J.; Cherniavskaya, O.; McDonald, J.C.; Wu, H.; Whitesides, S.H.; Whitesides, G.M. (2000). "Fabrication of topologically complex three-dimensional microfluidic systems in PDMS by rapid prototyping". *Anal. Chem.* 72 (14), 3158-3164
- Anna, S.L.; Bontoux, N.; Stone, H.A. (2003). "Formation of dispersions using "flow focusing" in microchannels". *Appl. Phys. Lett.* 82 (3), 364-366
- Anna, S.L.; Mayer, H.C. (2006). "Microscale tipstreaming in a microfluidic flow focusing device". *Physics of Fluids* 18 (12), 121512
- Antipov, E.; Cho, A.E.; Wittrup, K.D.; Klibanov, A.M. (2008). "Highly L and D enantioselective variants of horseradish peroxidase discovered by an ultrahigh-throughput selection method". *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105 (46), 17694-17699
- Aris, R. (1956). "On the dispersion of a soluble in a fluid flowing through a tube". *Proceedings of the Royal Society of London. Series A. Mathematical and Physical Sciences* 235 (1200), 67-77
- Armstrong, F.A.; Hill, H.A.O.; Walton, N.J. (1985). "Reaction of electron-transfer proteins at electrodes". *N.J., Q. Rev. Biophys.* 18, 261
- Armstrong, F.A.; Hill, H.A.O. (1988). "Direct electrochemistry of redox proteins". *Acc. Rem. Res.* 21, 407-413
- Atanassov, P.; Apblett, C.; Banta, S.; Brozik, S.; Barton, S.C.; Cooney, M.; Lia, B.Y.; Mukerjee, S.; Minteer, S.D. (2007). "Enzymatic biofuel cells". *Electrochem. Soc. Interface* 16 (2), 28-31
- Aumiller, G.D.; Chandross, E.A.; Tomlinson, W.J.; Weber, H.P. (1974). "Submicrometer resolution replication of relief patterns for integrated optics". *J. Appl. Phys.* 45 (10), 4557-4562
- Baker, K.; Bleczynski, C.; Lin, H.; Salazar-Jimenez, G.; Sengupta, D.; Krane, S.; Cornish, V.W. (2002). "Chemical complementation: a reaction-independent genetic assay for enzyme catalysis". *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99 (26), 16537-16542
- Baik, S-H.; Ide, T.; Yoshida, H.; Kagami, O.; Harayama, S. (2003). "Significantly enhanced stability of glucose dehydrogenase by directed evolution". *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 61 (4), 329-335
- Baranton, S.; Bélanger, D. (2005). "Electrochemical derivatization of carbon surface by reduction of in situ generated diazonium cations". *J. Phys. Chem. B* 109, 24401-24410
- Baret, J-C.; Kleinschmidt, F.; El Harrak, A.; Griffiths, A.D. (2009 (a)). "Kinetic aspects of emulsion stabilization by surfactants: a microfluidic analysis". *Langmuir* 25 (11), 6088-6093
- Baret, J-C.; Miller, O.J.; Taly, V.; Ryckelynck, M.; El Harrak, A.; Frenz, L.; Rick, C.; Samuels, M.L.; Hutchison, J.B.; Agresti, J.J.; Link, D.R.; Weitz, D.A.; Griffiths, A.D. (2009 (b)). "Fluorescence-activated droplet sorting (FADS): efficient microfluidic cell sorting based on enzymatic activity". *Lab on a Chip* 9, 1850-1858
- Baret, J-C.; Taly, V.; Ryckelynck, M.; Merten, C.A.; Griffiths, A.D. (2009 (c)). "Gouttes et emulsions. Criblage à très haut débit en biologie". *Médecine/Sciences* 37, 627-632

- Baret, J.-C.; Beck, Y.; Bliias-Massobrio, I.; Moras, D.; Griffiths, A.D. (2010). "Quantitative cell-based reporter gene assays using droplet-based microfluidics". *Chemistry&Biology* 17, 528-536
- Baret, J.-C. (2012). "Surfactants in droplet-based microfluidics". *Lab on a Chip* (Advance article) DOI: 10.1039/c1lc20582j
- Barnes, G.; Gentle, I. (2005). "Interfacial science: an introduction". Oxford, Oxford University Press
- Baroud, C.N.; de Saint Vincent, M.R.; Delville, J.-P. (2007). "An optical toolbox for total control of droplet microfluidics". *Lab on a Chip* 7 (8), 1029-1033
- Barrière, F.; Ferry, Y.; Rochefort, D.; Leech, D. (2004). "Targetting redox polymer as mediators for laccase oxygen reduction in a membrane-less biofuel cell". *Electrochem. Commun.* 6, 237-241
- Barrière, F.; Kavanagh, P.; Leech, D. (2006). "A laccase-glucose oxidase biofuel cell prototype operating in a physiological buffer". *Electrochimica Acta* 51, 5187-5192
- Barton, S.C.; Kim, H.-H.; Binyamin, G.; Zhang, Y.; Heller, A. (2001). "Electroreduction of O₂ to water on the wired laccase cathode". *J. Phys. Chem B* 105, 11197-11921
- Barton, S.C.; Kim, H.-H.; Binyamin, G.; Zhang, Y.; Heller, A. (2001(b)). "The wired laccase cathode : high current density electroreduction of O₂ to water at +0.7V (NHE) at pH 5". *J. Am. Chem. Soc.* 123, 58022-5803
- Barton, S.C.; Pickard, M.; Vazquez-Duhalt, R.; Heller, A. (2002). "Electroreduction of O₂ to water at 0.6V (SHE) at pH 7 on the wired *Pleurotus ostreatus* laccase cathode". *Biosensors and Bioelectronics* 17, 1071-1074
- Barton, S.C.; Gallaway, J.; Atanassov, P. (2004). "Enzymatic biofuel cells for implantable and microscales devices" *Chem. Rev.* 104, 4867-4886
- Barton, S.C. (2009). "Enzyme catalysis in biological fuel cells, Handbook of Fuel Cell – Fundamentals, Technology and Applications, Volume 5 : Advances in Electrocatalysis, Materials, Diagnostics and Durability". Vielstich, W.; Yokokawa, H.; Gasteiger, H.A.; Ed. John Wiley & Sons Ltd.: Chichester, England, chapitre 8, pages 1-18
- Beneyton, T.; El Harrak, A.; Griffiths, A.D.; Hellwig, P.; Taly, V. (2011). "Immobilization of CotA, an extremophilic laccase from *Bacillus subtilis*, on glassy electrodes for biofuel cell applications". *Electrochem. Commun.* 13, 24-27
- Beneyton, T.; Beyl, Y.; Guschin, D.A.; Griffiths, A.D.; Taly, V.; Schuhmann, W. (2011). "The thermophilic cotA laccase from *Bacillus subtilis*: bioelectrocatalytic evaluation of O₂ reduction in the direct and mediated electron transfer regime". *Electroanalysis* 23 (8), 1781-1789
- Bernath, K.; Magdassi, S.; Tawfik, D.S. (2005). "Directed evolution of protein inhibitors of DNA-nucleases by in vitro compartmentalization (IVC) and nano-droplet delivery". *J. Mol. Biol.* 345 (5), 1015-1026
- Bershtein, S.; Segal, M.; Bekerman, R.; Tokuriki, N.; Tawfik, D.S. (2006). "Robustness-epistasis link shapes the fitness landscape of a randomly drifting protein". *Nature* 444, 929-932
- Bershtein, S.; Goldin, K.; Tawfik, D.S. (2008). "Intense neutral drifts yield robust and evolvable consensus proteins". *J. Mol. Biol.* 379, 1029-1044
- Bershtein, S.; Tawfik, D.S. (2008 (b)). "Advances in laboratory evolution of enzymes". *Curr. Opin. Chem. Biol.* 12 (2), 151-158
- Bhattacharya, S.; Datta, A.; Berg, J.M.; Gangopadhyay, S. (2005). "Studies on surface wettability of poly(dimethyl)siloxane (PDMS) and glass under oxygen-plasma treatment and correlation with bond strength". *J. Microelectromechanical Systems*. 14 (3), 590-597
- Bibette, J.; Morse, D.C.; Witten, T.A.; Weitz, D.A. (1992). "Stability criteria for emulsions". *Phys. Rev. Lett.* 69 (16), 2439-2442

- Bibette, J.; Calderon, F.L.; Poulin, P. (1999). "Emulsions: basic principles". *Rep. Prog. Phys.* 62 (6), 969-1033
- Blanford, C.F.; Heath, R.S.; Armstrong, F.A. (2007). "A stable electrode for high-potential, electrocatalytic O₂ reduction based on rational attachment of a blue copper oxidase to a graphite surface". *Chem. Commun.* 17, 1710-1712
- Blauch, D.N.; Saveant, J-M. (1992). "Dynamics of electron hopping in assemblies of redox centers. Percolation and diffusion". *J. Am. Chem. Soc.* 114, 3323-3332
- Bloom, J.D.; Labthavikul, S.T.; Otey, C.R.; Arnold, F.H. (2006). "Protein stability promotes evolvability". *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103 (15), 5869-5874
- Bloom, J.D.; Arnold, F.H. (2009). "In the light of directed evolution: pathways of adaptive protein evolution". *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106 (1), 9995-10000
- Bockris, J.O.M; Srinivasan, S (1969). "Fuel cells: their electrochemistry". McGraw-Hill, New York
- Boersma, Y.L.; Dröge, M.L.; Quax, W.J. (2007). "Selection strategies for improved biocatalysts". *FEBS J.* 274 (9), 2181-2195
- Boland, S.; Barrière, F.; Leech, D. (2008). "Designing stable redox-active surfaces: chemical attachment of an osmium complex to glassy carbon electrodes prefunctionalized by electrochemical reduction of an in situ-generated aryldiazonium cation". *Langmuir* 24, 6351-6358
- Bond, D.R.; Lovely, D.R. (2005). "Evidence for involvement of an electron shuttle in electricity generation by *Geothrix fermentans*". *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 2186-2189
- Bornscheuer, U.T.; Bessler, C.; Srinivas, R.; Krishna, S.H. (2002). "Optimizing lipases and related enzymes for efficient application". *Trends in Biotechnology* 20 (10), 433-437
- Bremond, N.; Thiam, A.R.; Bibette, J. (2008). "Decompressing emulsion droplets favors coalescence". *Phys. Rev. Lett.* 1 (2), 024501
- Brouzes, E.; Medkova, M.; Savenelli, N.; Marran, D.; Twardowski, M.; Hutchison, J.B.; Rothberg, J.M.; Link, D.R.; Perrimon, N.; Samuels, M.L. (2009). "Drplet microfluidic technology for single-cell high-throughput screening". *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106 (34), 14195-14200
- Brunel, L.; Denele, J.; Servat, K.; Kokoh, K.B.; Jolival, C.; Innocent, C.; Cretin, M.; Rolland, M.; Tingry, S. (2007). "Oxygen transport through laccase biocathodes for a membrane-less glucose/O₂ biofuel cell". *Electrochem. Commun.* 9, 331-336
- Buchholtz, F.; Stewart, A.F. (2001). "Alteration of Cre recombinase site specificity by substrate-linked protein evolution". *Nat. Biotechnol.* 19 (11), 1047-1052
- Bullen, R.A.; Arnot, T.C.; Lakeman, J.B.; Walsh, F.C. (2005). "Biofuel cells and their development". *Biosensors and Bioelectronics* 21, 2015-2045
- Bulter, T.; Alcalde, M.; Sieber, V.; Meinhold, P.; Schlachtbauer, C.; Arnold, F.H. (2003). "Functional expression of a fungal laccase in *Saccharomyces cerevisiae* by directed evolution". *Appl. Environ. Microbiol.* 69 (2), 987-995
- Calhoun, M.F.; Sanchez, J.; Olaya, D.; Gershenson, M.E.; Podzorov, V. (2008). "Electronic functionalization of the surface of organic semiconductors with self-assembled monolayers". *Nat. Materials* 7 (1), 84-89
- Call, H.P.; Mücke, I. (1997). "History, overview and applications of mediated lignolytic systems, especially laccase-mediator-systems (Lignozym®-process)". *J. Biotechnology* 53, 163-202
- Carrete, L.; Friedrich, K. A.; Stimming, U. (2001). "Fuel cells-Fundamentals and applications". *Fuel cells* 1, (1), 5-39

- Cesaro-Tadic, S.; Lagos, D.; Honegger, A.; Rickard, J.H.; Partridge, L.J.; Blackburn, G.M.; Plückthun, A. (2003). "Turnover-based *in vitro* selection and evolution of biocatalysts from a fully synthetic antibody library". *Nat. Biotechnol.* 21 (6), 679-685
- Chabert, M.; Dorfman, K.D.; Viovy, J-L. (2005). "Droplet fusion by alternating current (AC) field electrocoalescence in microchannels". *Electrophoresis* 26 (19), 3706-3715
- Chabert, M.; Viovy, J-L. (2008). "Microfluidic high-throughput encapsulation and hydrodynamic self-sorting of single cells". *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105 (9), 3191-3196
- Chabinyk, M.L.; Chiu, D.T.; McDonald, J.C.; Stroock, A.D.; Christian, J.F.; Karger, A.M.; Whitesides, G.M. (2001). "An integrated fluorescence detection system in poly(dimethylsiloxane) for microfluidic applications". *Anal. Chem.* 73 (18), 4491-4498
- Chapman, R.G.; Ostuni, E.; Takayama, S.; Holmlin, R.E.; Yan, L.; Whitesides, G.M. (2000). "Surveying for surfaces that resist the adsorption of proteins". *J. Am. Chem. Soc.* 122 (34), 8303-8304
- Chen, T.; Barton, S.C.; Binyamin, G.; Gao, Z.; Zhang, Y.; Kim, H-H.; Heller, A. (2001). "A miniature biofuel cell". *J. Am. Chem. Soc.* 123, 8630-8631
- Chen, G.; Hayhurst, A.; Thomas, J.G.; Harvey, B.R.; Iverson, B.L.; Georgiou, G. (2001 (b)). "Isolation of high-affinity ligand-binding proteins by periplasmic expression with cytometric screening (PECS)". *Nat. Biotechnol.* 19 (6), 537-542
- Chen, D.; Du, W.; Liu, Y.; Kuznetsov, A.; Mendez, F.E.; Philipson, L.H.; Ismagilov, R.F. (2008). "The chemistode: a droplet-based microfluidic device for stimulation and recording with high temporal, spatial, and chemical resolution". *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105 (44), 16843-16848
- Chen-Goodspeed, M.; Sogorb, M.A.; Wu, F.; Hong, S-B.; Raushel, F.M. (2001). "Structural determinants of the substrate and stereochemical specificity of phosphotriesterase". *Biochemistry* 40, 1325-1331
- Cherry, J.R.; Lamsa, M.H.; Schneider, P.; Vind, J.; Svendsen, A.; Jones, A.; Pedersen, A.H. (1999). "Directed evolution of a fungal peroxidase". *Nat. Biotechnol.* 17, 379-384
- Chiu, D.T.; Lorenz, R.M.; Jeffries, G.D.M. (2009). "Droplets for ultrasmall-volume analysis". *Anal. Chem.* 81 (13), 5111-5118
- Christenson, A.; Dimcheva, N.; Ferapontova, E.E.; Gorton, L.; Ruzgas, T.; Stoica, L.; Shleev, S.; Yaropolov, A.I.; Haltrich, D.; Thorneley, R.N.F.; Aust, S.D. (2004). "Direct electron transfer between ligninolytic redox enzymes and electrodes". *Electroanalysis* 16, 1074-1092
- Christopher, G.F.; Anna, S.L. (2007). "Microfluidic methods for generating continuous droplet streams". *J. Phys. D: Appl. Phys.* 40 (19), R319-R336
- Christopher, G.F.; Noharuddin, N.N.; Taylor, J.A.; Anna, S.L. (2008). "Experimental observations of the squeezing-to-dripping transition in T-shaped microfluidic junctions". *Phys. Rev. E* 78 (3), 036317
- Cinquin, P.; Gondran, C.; Giroud, F.; Mazabrard, S.; Pellissier, A.; Boucher, F.; Alcaraz, J-P.; Gorgy, K.; Lenouvel, F.; Mathé, S.; Porcu, P.; Cosnier, S. (2010). "A glucose biofuel cell implanted in rats" *PlosOne* 5, 5,
- Claus, H. (2004). "Laccases: structure, reaction, distribution". *Micron* 35, 93-96
- Clausell-Tormos, J.; Lieber, D.; Baret, J-C.; El Harrak, A.; Miller, O.J.; Frenz, L.; Blouwolff, J.; Humphry, K.J.; Köster, S.; Duan, H.; Holtze, C.; Weitz, D.A.; Griffiths, A.D.; Merten, C.A. (2008). "Droplet-based microfluidic platforms for the encapsulation and screening of mammalian cells and multicellular organisms". *Chem. Biol.* 15 (5), 427-437

- Coco, W.M.; Levinson, W.E.; Crist, M.J.; Hektor, H.J.; Darzins, A.; Pienkos, P.T.; Squires, C.H.; Monticello, D.J. (2001). "DNA shuffling method for generating highly recombined genes and evolved enzymes". *Nat. Biotechnol.* 19, 354-359
- Coche-Guerente, L.; Cosnier, S.; Labbe, P. (1997). "Sol-gel derived composite materials for the construction of oxidase/peroxidase mediatorless biosensors". *Chem. Mater.* 9, 1348-1352
- Cohen, H.M.; Tawfik, Griffiths, A.D. (2004). "Altering the sequence specificity of *HaeIII* methyltransferase by directed evolution using in vitro compartmentalization". *Pro? Eng. Des. Sel.* 17 (1), 3-11
- Collinson, M.; Bowden, E.F.; Tarlov, M.J. (1992). "Voltammetry of covalently immobilized cytochrome *c* on self-assembled monolayer electrodes". *Langmuir* 8, 1247-1250
- Coman, V.; Vaz-Dominguez, C.; Ludwig, R.; Harreither, W.; Haltrich, D.; De Lacey, A.L.; Ruzgas, T.; Gorton, L.; Shleev, S. (2008). "A membrane-, mediator-, cofactor-less glucose/oxygen biofuel cell". *Phys. Chem. Chem. Phys.* 10, 6093-6096
- Cooney, M.J., Svoboda, V.; Lau, C.; Minter, S.D. (2008). "Enzyme catalysed biofuel cells". *Energy Environ. Sci.* 1, 320-337
- Cosnier, S.; Shan, D.; Ding, S-N. (2010). "An easy compartment-less biofuel cell construction based on the physical co-inclusion of enzyme and mediator redox within pressed graphite discs". *Electrochem. Commun.* 12, 266-269
- Courrier, H.M.; Krafft, M.P.; Butz, N.; Porté, C.; Frossard, N.; Rémy-Kristensen, A.; Mély, Y.; Pons, F.; Vandamme, Th.F. (2003). "Evaluation of cytotoxicity of new semi-fluorinated amphiphiles derived from dimorpholinophosphate". *Biomaterials* 24 (4), 439-446
- Courtois, F.; Olguin, L.F.; Whyte, G.; Bratton, D.; Huck, W.T.S.; Abell, C.; Hollfelder, F. (2008). "An integrated device for monitoring time-dependent in vitro expression from single genes in picolitre droplets". *ChemBioChem* 9 (3), 439-446
- Courtois, F.; Olguin, L.F.; Whyte, G.; Theberge, A.B.; Huck, W.T.S.; Hollfelder, F.; Abell, C. (2009). "Controlling the retention of small molecules in emulsion microdroplets for use in cell-based assays". *Anal. Chem.* 81 (8), 3008-3016
- Cracknell, J.A.; Vincent, K.A.; Armstrong, F.A. (2008). "Enzymes as working or inspirational electrocatalysts for fuel cells and electrolysis". *Nat. Biotechnol.* 14, 315-319
- Cramer, A.; Raillard, S-A.; Bermudez, E.; Stemmer, W.P.C. (1998). "DNA shuffling of a family of genes from diverse species accelerates directed evolution". *Nature* 391, 288-291
- Davis, F.; Higson, S.P.J. (2007). "Biofuel cells-Recent advances and applications". *Biosensors and Bioelectronics* 22 (7), 1224-1235
- de Gennes, P-G; Brochard-Wyart, F.; Quéré, D. (2003). "Capillarity and wetting phenomena: drops, bubbles, pearls, waves". *Springer*
- de Lumley-Woodyear, T.; Rocca, P.; Lindsay, J.; Dror, Y.; Freeman, A.; Heller, A. (1995). "Polyacrylamide-based redox polymer for connecting redox centers of enzymes to electrodes". *Anal. Chem.* 67, 1332-1338
- De Menech, M.; Garstecki, P.; Jousse, F.; Stone, H.A. (2008). "Transition from squeezing to dripping in a microfluidic T-shaped junction". *J. Fluid. Mech.* 595, 141-161
- Dean, A.M.; Thornton, J.W. (2007). "Mechanistic approaches to the study of evolution: the functional synthesis". *Nat. Rev. Genet.* 8 (9), 675-688
- Degani, Y. Heller, A. (1986). "Direct electrical communication between chemically modified enzymes and metal electrodes. 1. Electron transfer from glucose oxidase to metal electrodes via electron relays, bound covalently to the enzyme". *J. Phys. Chem.* 91 (3), 1285-1289

- DeLano, W.J. (2002). "PyMol". DeLano Scientific, San Carlos, CA
- Deng, L.; Shang, L.; Wang, Y.; Wang, T.; Chen, H.; Dong, S. (2008). "Multilayer structured carbon nanotubes/poly-L-lysine/laccase composite cathode for glucose/O₂ biofuel cell". Electrochem. Commun. 10, 1012-1015
- DePristo, M.A.; Weinreich, D.M.; Hartl, D.L. (2009). "Missense meanderings in sequence space: a biophysical view of protein evolution". Nature 6, 678-687
- Dittrich, P.S.; Schwille, P. (2003). "An integrated microfluidic system for reaction, high-sensitivity detection, and sorting of fluorescent cells and particules". Anal. Chem. 75 (21), 5767-5774
- Dittrich, P.S.; Jahnz, M.; Schwille, P. (2005). "A new embedded process for compartmentalized cell-free protein expression and on-line detection in microfluidic devices". ChemBioChem 6 (5), 811-814
- Doi, N.; Kumadaki, S.; Oishi, Y.; Matsumura, N.; Yanagawa, H. (2004). "In vitro selection of restriction endonucleases by in vitro compartmentalization". Nucleic Acids Research 23 (12), e95
- Dollet, B.; van Hoeve, W.; Raven, J-P.; Marmottant, P.; Versluis, M. (2008). "Role of the channel geometry on the bubble pinch-off in flow-focusing devices". Phys. Rev. Lett. 100 (3), 034504
- Dreyfus, R.; Tabeling, P.; Willaime, H. (2003). "Ordered and disordered patterns in two-phase flows in microchannels". Phys. Rev. Lett. 90 (14), 144505
- Driks, A. (1999). "Bacillus subtilis spore coat". Microbiol. Mol. Biol. Rev. 63, 1-20
- Du, Z.; Li, H.; Gu, T. (2007). "A state of the art review on microbial fuel cells : a promising technology for wastewater treatment and bioenergy". Biotechnology Advances 25, 464-482
- Duchin, S.S.; Kretschmar, G.; Miller, R. (1995). "Dynamics of adsorption at liquid interfaces – Theory, experiment, application". Studies in Interface Science 1, 1-581
- Duma, R.; Minter, S.D. (2006). "Development of bilirubin oxidase cathodes for ethanol/oxygen biofuel cells". Polym. Mat. Sci. Eng. 94, 592-593
- Duran, N.; Rosa, M.A.; D'Annibale, A.; Gianfreda, L. (2002). "Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review". Enzym. Microbiol. Technol. 31, 907-931
- Durand, F.; Stines-Chaumiel, C.; Flexer, V.; André, I.; Mano, N. (2010). "Designing a highly active soluble PQQ-glucose dehydrogenase for efficient glucose biosensors and biofuel cells". Biochem. Biophys. Res. Commun. 402, 750-754
- Durao, P.; Bento, I.; Fernandes, A.T.; Melo, E.P.; Lindley, P.F.; Martins, L.O. (2006). "Perturbations of the T1 copper site in the CotA laccase from Bacillus subtilis: structural, biochemical, enzymatic and stability studies". J. Biol. Inorg. Chem. 11, 514-526
- Durao, P.; Chen, Z.; Silva, C.S.; Soares, C.M.; Pereira, M.M.; Todorovic, S.; Hildebrandt, P.; Bento, I.; Lindley, P.F.; Martins, L.O. (2008). "Proximal mutations at the type 1 copper site of CotA laccase: spectroscopic, redox, kinetic and structural characterization of I494A and L386A mutants". Biochem. J. 412, 339-346
- Eggert, C.; La Fayette P.R.; Temp, U.; Eriksson, K-E.L.; Dean, J.F.D. (1998). "Molecular analysis of a laccase gene from the white rot fungus pycnoporus cinnabarinus". Appl. Environ. Microbiol. 64, 1766-1772
- Enguita, F.J.; Martins, L.O.; Henriques, A.O.; Carrondo, M.A. (2003). "Crystal structure of a bacterial endospore coat component. A laccase with enhanced thermostability properties". J. Biol. Chem. 278 (21), 19416-19425
- Elena, S.F.; Lenski, R.E. (2003). "Evolution experiments with microorganisms: the dynamics and genetic bases of adaptation". Nat. Rev. Genet. 4 (6), 457-469

- Fa, M.; Radeghieri, A.; Henry, A.A.; Romesberg, F.E. (2004). "Expanding the substrate repertoire of *e* DNA polymerase by directed evolution". *J. Am. Chem. Soc.* 126 (6), 1748-1754
- Fair, R.B. (2007). "Digital microfluidics: is a true lab-on-a-chip possible?". *Microfluid. Nanofluid.* 3 (3), 245-281
- Fan, R.; Vermesh, O.; Srivastava, A.; Yen, B.K.H.; Qin, L.; Ahmad, H.; Kwong, G.A.; Liu, C-C.; Gould, J.; Hood, L.; Heath, J.R. (2008). "Integrated barcode chips for rapid, multiplexed analysis of proteins in microliter quantities of blood". *Nat. Biotechnol.* 26 (12), 1373-1378
- Fasan, R.; Chen, M.M.; Crook, N.C.; Arnold, F.H. (2007). "Engineered alkane-hydroxylating cytochrome P450_{BM3} exhibiting natively like catalytic properties". *Angew. Chem. Int. Ed.* 46, 8414-8418
- Feldhaus, M.J.; Siegel, R.W.; Opresko, L.K.; Coleman, J.R.; Weaver Feldhaus, J.M.; Yeung, Y.A.; Cochran, J.R.; Heinzelman, P.; Colby, D.; Swers, J.; Graff, C.; Wiley, H.S.; Wittrup, K.D. (2003). "Flow-cytometric isolation of human antibodies from a nonimmune *Saccharomyces cerevisiae* surface display library". *Nat. Biotechnol.* 21, 163-170
- Ferapontova, E.; Gorton, L. (2002). "Effect on pH on direct electron transfer in the system gold electrode-recombinant horseradish peroxidase". *Bioelectrochemistry* 55, 83-87
- Ferapontova, E.; Schmengler, K.; Borchers, T.; Ruzgas, T.; Gorton, L. (2002 (b)). "Effect of cysteine mutations on direct electron transfer of horseradish peroxidase on gold". *Biosensors and Bioelectronics* 17, 953-963
- Ferrigno, R.; Stroock, A.D.; Clark, T.D.; Mayer, M.; Whitesides, G.M. (2002). "Membraneless vanadium redox fuel cell using laminar flow". *J. Am. Chem. Soc.* 124, 12930-12931
- Festa, G.; Autore, F.; Fraternali, F.; Giardina, P.; Sannia, G. (2008). "Development of new laccases by directed evolution: functional and computational analyses". *Prot. Struct. Funct. Bioinformat.* 72, 25-34
- Fidalgo, L.M.; Abell, C.; Huck, W.T.S. (2007). "Surface-induced droplet fusion in microfluidic devices". *Lab on a Chip* 7 (8), 984-986
- Firestine, S.M.; Salinas, F.; Nixon, A.E.; Baker, S.J.; Benkovic, S.J. (2000). "Using an AraC-based three-hybrid system to detect biocatalysts in vivo". *Nat. Biotechnol.* 18 (5), 544-547
- Fox, R.J.; Davis, S.C.; Mundorff, E.C.; Newman, L.M.; Gavrilovic, V.; Ma, S.K.; Chung, L.M.; Ching, C.; Tam, S.; Muley, S.; Grate, J.; Gruber, J.; Whitman, J.C.; Sheldon, R.A.; Huisman, G.W. (2007). "Improving catalytic function by ProSAR-driven enzyme evolution". *Nat. Biotechnol.* 25 (3), 338-344
- Frasconi, M.; Favero, G.; Boer, H.; Koivula, A.; Mazzei, F. (2010). "Kinetic and biochemical properties of high and low redox potential laccases from fungal and plant origin". *Biochim. Biophys. Acta* 1804, 899-908
- Frenz, L.; El Harrak, A.; Pauly, M.; Béguin-Colin, S.; Griffiths, A.D.; Baret, J-C. (2008). "Droplet-based microreactors for the synthesis of magnetic iron oxide nanoparticles". *Angew. Chem. Int. Ed.* 47 (36), 6817-6820
- Frenz, L.; Blank, K.; Brouzes, E.; Griffiths, A.D. (2009). "Reliable microfluidic on-chip incubation of droplets in delay-lines". *Lab on a Chip* 9 (10), 1344-1348
- Frew, J.E.; Hill, A.O. (1988). "Direct and indirect electron transfer between electrodes and redox proteins". *Eur. J. Biochem.* 172, 261-269
- Fu, A.Y.; Spence, C.; Scherer, A.; Arnold, F.H.; Quake, S.R. (1999). "A microfabricated fluorescence-activated cell sorter". *Nat. Biotechnol.* 17 (1), 1109-1111

- Fu, A.Y.; Chou, H-P.; Spence, C.; Arnold, F.H.; Quake, S.R. (2002). "An integrated microfabricated cell sorter". *Anal. Chem.* 74 (11), 2451-2457
- Gallaway, J.W.; Barton, S.A.C. (2008). "Kinetics of redox polymer-mediated enzyme electrodes". *J. Am. Chem. Soc.* 130, 8527-8536
- Gao, Z.; Binyamin, G.; Kim, H-H.; Barton, S.C.; Zhnag, Y.; Heller, A. (2002). "Electrodeposition of redox polymers and co-electrodeposition of enzymes by coordinative crosslinking". *Angew. Cheml. Int. Ed.* 41 (5), 810-813
- Gao, F.; Yan, Y.; Su, L.; Wang, L.; Mao, L. (2007). "An enzymatic glucose/O₂ biofuel cell: Preparation, characterization and performance in serum". *Electro. Commun.* 9, 989-996
- Gao, F.; Viry, L.; Maugey, M.; Poulin, P.; Mano, N. (2010). "Engineering hybrid nanotubes wires for high-power biofuel cells". *Nat. Commun.* 1, 2
- Garcia-Rodriguez, C.; Levy, R.; Arndt, J.W.; Forsyth, C.M.; Razai, A.; Lou, J.; Geren, I.; Stevens, R.C.; Marks, J.D. (2007). "Molecular evolution of antibody cross-reactivity for two subtypes of type A botulinum neutotoxin". *Nat. Biotechnol.* 25 (1), 107-116
- Garstecki, P.; Stone, H.A.; Whitesides, G.M. (2005). "Mechanism for flow-rate controlled breakup in confined geometries: a route to monodisperse emulsions". *Phys. Rev. Lett.* 94 (16), 164501
- Garstecki, P.; Fuerstman, M.J.; Stone, H.A.; Whitesides, G.M. (2006). "Formation of droplets and bubbles in a microfluidic T-junction-scaling and mechanism of break-up". *Lab on a Chip* 6 (3), 437-446
- Gelo-Pujic, M.; Kim, H-H.; Butlin, N.G.; Palmore, T.R. (1999). "Electrochemical studies of a truncated laccase produced in *Pichia pastoris*". *Appl. Environ. Microbiol.* 65 (12), 5515-5521
- Georgiou, G.; Stathopoulos, C.; Daugherty, P.S.; Nayak, A.R.; Iverson, B.L.; Curtiss III, R. (1997). "Display of heterologues proteins on the surface of microorganisms: from the screening of combinatorial libraries to live recombinant vaccines". *Nat. Biotechnol.* 15 (1), 29-34
- Ghadessy, F.J.; Ong, J.L.; Holliger, P. (2001). "Directed evolution of polymerase function by compartmentalized self-replication". *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98 (8), 4552-4557
- Ghadessy, F.J.; Ramsay, N.; Boudsocq, F.; Loakes, D.; Brown, A.; Iwai, S.; Vaisman, A.; Woodgate, R.; Holliger, P. (2004). "Generic expansion of the substrate spectrum of a DNA polymerase by directed evolution". *Nat. Biotechnol.* 22 (6), 755-759
- Ghindilis, A.L.; Atanasov, P.; Wilkins, E. (1997). "Enzyme-catalysed direct electron transfer. Fundamentals and analytical applications". *Electroanalysis* 9, (9), 661-674
- Gorton, L.; Lindgren, A.; Larsson, T.; Munteanu, F.D.; Ruzgas, T.; Gazaryan, I. (1999). "Direct electron transfer between heme-containing enzymes and electrodes as basis for third generation biosensors". *Anal. Chim. Acta* 400, 91-108
- Govil, G.; Saran, A. (1982). "Biochemical fuel cells". *J Indian Chem Soc* 59, 1226-1228
- Gregg, B.A.; Heller, A. (1991). "Redox polymer films containing enzymes. 1. A redox-conducting epoxy cement: synthesis, characterization, and electrocatalytic oxidation of hydroquinone". *J. Phys. Chem.* 95, 5970-5975
- Griffiths, A.D.; Tawfik, D.S. (2000). "Man-made enzymes – from design to in vitro compartmentalisation". *Curr. Opin. Biotechnol.* 11, 338-353
- Griffiths, A.D.; Tawfik, D.S. (2003). "Directed evolution of an extremely fast phosphotriesterase by in vitro compartmentalization". *EMBO J.* 22 (1), 24-35
- Griffiths, A.D.; Tawfik, D.S. (2006). "Miniaturising the laboratory in emulsion droplets". *Trends Biotechnol.* 24 (9), 395-402

- Giver, L.; Gershenson, A.; Freskagard, P-O.; Arnold, F.H. (1998). "Directed evolution of a thermostable esterase". *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95, 12809-12813
- Guillot, P.; Colin, A. (2005). "Stability of parallel flows in a microchannel after a T junction". *Phys. Rev. E* 72 (6), 066301
- Guisseppi-Elie, A.; Lei, C.; Baughman, R.H. (2002). "Direct electron transfer of glucose oxidase on carbon nanotubes". *Nanotechnology* 13, 559-564
- Günther, A.; Jensen, K.F. (2006). "Multiphase microfluidics: from flow characteristics to chemical and materials synthesis". *Lab on a Chip* 6 (12), 1487-1503
- Gupta, G.; Rajendran, V.; Atanassov, P. (2004). "Bioelectrocatalysis of oxygen reduction by laccase on gold electrodes". *Electroanalysis* 16, 1182-1185
- Gupta, R.D.; Tawfik, D.S. (2008). "Directed enzyme evolution via small and effective neutral drift libraries". *Nat. Methods* 5 (11), 939-942
- Gupta, A.; Murshed, S.M.S.; Kumar, R. (2009). "Droplet formation and stability of flows in a microfluidic T-junction". *Appl. Phys. Lett.* 94 (16), 164107
- Gupta, N.; Lee, F.S.; Farinas, E.T. (2010). "Laboratory evolution of laccase for substrate specificity". *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* 62, 230-234
- Guschin, D.A.; Shkil, H.; Schuhmann, W. (2009). "Electrodeposition polymers as immobilization matrices in amperometric biosensors: improved polymer synthesis and biosensor fabrication". *Anal. Bioanal. Chem.* 395, 1693-1706
- Guschin, D.A.; Castillo, J.; Dimcheva, N.; Schuhmann, W. (2010). "Redox electrodeposition polymers: adaptation of the redox potential of polymer-bound Os complexes for bioanalytical applications". *Anal. Bioanal. Chem.* 398, 1661-1673
- Gutiérrez, A.; del Rio, J.C.; Martinez, A.T. (2009). "Microbial and enzymatic control of pitch in the pulp and paper industry". *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 82, 1005-1018
- Gutiérrez-Sanchez, C.; Olea, D.; Marques, M.; Fernandez, V.M.; Pereira, I.A.C.; Vélez, M.; De Lacey, A.L. (2011). "Oriented immobilization of a membrane-bound hydrogenase onto a electrode for direct electron transfer". *Langmuir* 27, 6449-6457
- Güven; G.; Prodanovic, R.; Schwaneberg, U. (2010). "Protein engineering – an option for enzymatic biofuel cell design". *Electroanalysis* 22, 765-775
- Habermüller, K.; Mosbach, M.; Schuhmann, W. (2000). "Electron-transfer mechanisms in amperometric biosensors". *Fresenius J. Anal. Chem.* 366, 560-568
- Habermüller, K.; Ramanavicius, A.; Laurinavicius, V.; Schuhmann, W. (2000 (b)). "An oxygen-insensitive reagentless glucose biosensor based on osmium-complex modified polypyrrole". *Electroanalysis* 12 (17), 1383-1389
- Habrioux, A.; Merle, G.; Servat, K.; Kokoh, K.B.; Innocent, C.; Cretin, M.; Tingry, S. (2008). "Concentric glucose/O₂ biofuel cell". *J. Electroanal. Chem.* 622, 97-102
- Hanes, J.; Plückthun, A. (1997). "In vitro selection and evolution of functional proteins by using ribosome display". *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94 (10), 4937-4942
- Hakulinen, N.; Kiiskinen, L-L.; Kruus, K.; Saloheimo, M.; Paananen, A.; Koivula, A.; Rouvinen, J. (2002). "Crystal structure of a laccase from *Melanocarpus albomyces* with an intact trinuclear copper site". *Nature Structural Biology* 9 (8), 601-605
- Halliwell, C.M.; Simon, E.; Toh, C.S.; Cass, A.E.G.; Bartlett, P.N. (2002). "The design of dehydrogenase enzymes for use in a biofuel cell: the role of genetically introduced peptide tags in enzyme immobilization on electrodes". *Bioelectrochemistry* 55, 21-23

- Handique, K.; Burns, M.A. (2001). "Mathematical modeling of drop mixing in a slit-type microchannel". *J. Micromech. Microeng.* 11 (5), 548-554
- Harder, P.; Grunze, M.; Dahint, R.; Whitesides, G.M.; Laibinis, P.E. (1998). "Molecular conformation in oligo(ethylene glycol)-terminated self-assembled monolayers on gold and silver surfaces determines their ability to resist protein adsorption". *J. Phys. Chem. B* 102, (2), 426-436
- He, M.; Kuo, J.S.; Chiu, D.T. (2005 (a)). "Electro-generation of single femtoliter- and picoliter-volume aqueous droplets in microfluidic systems". *Appl. Phys. Lett.* 87 (3), 031916
- He, M.; Edgar, J.S.; Jeffries, G.D.M.; Lorenz, R.M.; Shelby, J.P.; Chiu, D.T. (2005 (b)). "Selective encapsulation of single cells and subcellular organelles into picoliter- and femtoliter-volume droplets". *Anal. Chem.* 77 (6), 1539-1544
- Hecht, H.J.; Kalisz, H.M.; Hendle, J.; Schnmid, R.D.; Schomburg, D. (1993). "Crystal structure of glucose oxidase from *Aspergillus niger* refined at 2.3 Å resolution". *J. Mol. Biol.* 229 (1), 153-172
- Heller, A. (2004). "Miniature biofuel cells". *Phys. Chem. Chem. Phys.* 6, 209-216
- Henriques, A.O.; Moran Jr., C.P. (2000). "Structure and assembly of the bacterial endospore coat". *Methods* 20, 95-110
- Hill, H.A.O. (1987). "Bio-electrochemistry". *Pure Appl. Chem* 59, 743
- Hilden, K.; Hakala, T.K.; Lundell, T. (2009). "Thermotolerant and thermostable laccases". *Biotechnol. Lett.* 31, 1117-1128
- Hilvert, (2000). "Critical analysis of antibody catalysis". *Annu. Rev. Biochem.* 69, 751-793
- Holmberg, A.; Blomstergren, A.; Nord, O.; Lukacs, M.; Lunderberg, J.; Uhlén, M. (2005). "The biotin-streptavidin interaction can be reversibly broken using water at elevated temperatures". *Electrophoresis* 26, 501-510
- Holtze, C.; Rowat, A.C.; Agresti, J.J.; Hutchison, J.B.; Angliè, F.E.; Schmitz, C.H.J.; Köster, S.; Duan, H.; Humphry, K.J.; Scanga, R.A.; Johnson, J.S.; Pisignano, D.; Weitz, D.A. (2008). "Biocompatible surfactants for water-in-fluorocarbon emulsions". *Lab on a Chip* 8 (10), 1632-1639
- Hu, X.; Bessette, P.H.; Qian, J.; Meinhart, C.D.; Daugherty, P.S.; Soh, H.T. (2005). "Marker-specific sorting of rare cells using dielectrophoresis". *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102 (44), 15757-15761
- Hu, L.; Gruner, G.; Gong, J.; Kim, C.-J.; Hornbostel, B. (2007). "Electrowetting devices with transparent single-walled carbon nanotube electrodes". *Appl. Phys. Lett.* 90, 093124
- Huber, D.L.; Manginell, R.P.; Samara, M.A.; Kim, B.-I.; Bunker, B.C. (2003). "Programmed adsorption and release of proteins in a microfluidic device". *Science* 301 (5631), 352-354
- Huebner, A.; Srisa-Art, M.; Holt, D.; Abell, C.; Hollfelder, F.; deMello, A.J.; Edel, J.B. (2007). "Quantitative detection of protein expression in single cells using droplet microfluidics". *Chem. Commun.* 12, 1218-1220
- Huebner, A.; Sharma, S.; Srisa-Art, M.; Hollfelder, F.; Edel, J.B.; deMello, A.J. (2008 (a)). "Microdroplets: a sea of application?". *Lab on a Chip* 8 (8), 1244-1254
- Huebner, A.; Olguin, L.F.; Bratton, D.; Whyte, G.; Huck, W.T.S.; de Mello, A.J.; Edel, J.B.; Abell, C.; Hollfelder, F. (2008 (b)). "Development of quantitative cell-based enzyme assays in microdroplets". *Anal. Chem.* 80 (10), 3890-3896
- Huebner, A.; Bratton, D.; Whyte, G.; Yang, M.; deMello, A.J.; Abell, C.; Hollfelder, F. (2009). "Static microdroplets arrays: a microfluidic device for droplet trapping, incubation and release for enzymatic and cell-based assays". *Lab on a Chip* 9 (5), 692-698
- Hullo, M-F.; Moszer, I.; Danchin, A.; Martin-Verstraete, I. (2001). "CotA of *Bacillus subtilis* is a copper-dependent laccase". *J. Bacteriol.* 183 (18), 5426-5430

- Hung, L-H.; Choi, K.M.; Tseng, W-Y.; Tan, Y-C.; Shea, K.J.; Lee, A.P. (2005). "Alternating droplet generation and controlled dynamic droplet fusion in microfluidic device for CdS nanoparticle synthesis". *Lab on a Chip* 6 (2), 174-178
- Husny, J.; Cooper-White, J.J. (2005). "The effect of elasticity on drop creation in T-shaped microchannels". *J. Non-Newtonian Fluid Mech.* 137, 121-136
- Igarashi, S.; Sode, K. (2003). "Stabilization of quaternary structure of water-soluble quinoprotein glucose dehydrogenase". *Mol. Biotechnol.* 24 (2), 97-103
- Ikeda, T.; Kano, K., J. (2001). "An electrochemical approach to the studies of biological redox reactions and their application to biosensors, bioreactors, and biofuel cells". *Biosci. Bioeng.* 92 (1), 9-18
- Ismagilov, R.F.; Stroock, A.D.; Kenis, P.J.A.; Whitesides, G.; Stone, H.A. (2000). "Experimental and theoretical scaling laws for transverse diffusive broadening in two-phase laminar flows in microchannels". *Appl. Phys. Lett.* 76 (17), 2376-2378
- Ivnitski, D.; Branch, B.; Atanassov, P.; Apblett, C. (2006). "Glucose oxidase anode for biofuel cell based on direct electron transfert". *Electrochem. Commun.* 8, 1204-1210
- Ivnitski, D.; Atanassov, P. (2007). "Electrochemical studies of intramolecular electron transfert in laccase from *Trametes versicolor*". *Electroanalysis* 19, 2307-2313
- Ivnitski, D.; Artyushkova, K.; Atanassov, P. (2008). "Surface characterization and direct electrochemistry of redox copper centers of bilirubin oxidase from fungi *Myrothecium verrucaria*". *Bioelectrochemistry* 74, 101-110
- Jäckel, C.; Kast, P.; Hilvert, D. (2008). "Protein design by directed evolution". *Annu. Rev. Biophys.* 37, 153-173
- Jarosz-Wilkolazka, A.; Ruzgas, T.; Gorton, L. (2005). "Amperometric detection of mono- and diphenols at *Cerrena unicolor* laccase-modified graphite electrode: correlation between sensitivity and substrate structure". *Talanta* 66, 1219-1224
- Jenkins, P.A.; Boland, S.; Kavanagh, P.; Leech, D. (2009). "Evaluation of performance and stability of biocatalytic redox films constructed with different copper oxygenases and osmium-based redox polymers ». *Bioelectrochemistry* 76, 162-168
- Jermutus, L.; Ryabova, L.A.; Plückthun, A. (1998). "Recent advances in producing and selecting functional proteins by using cell-free translation". *Curr. Opin. Biotechnol.* 9 (5), 534-548
- Jiang, L.; Althoff, E.A.; Clemente, F.R.; Doyle, L.; Röthlisberger, D.; Zanghellini, A.; Gallaher, J.L.; Betker, J.L.; Tanaka, F.; Barbas III, C.F.; Hilvert, D.; Houk, K.N.; Stoddard, B.L.; Baker, D. (2008). "De Novo computational design of retro-aldol enzymes". *Science* 319, 1387-1391
- Jin, F.; Gupta, N.R.; Stebe, K.J. (2006). "The detachment of a viscous drop in a viscous solution in the presence of a soluble surfactant". *Physics of Fluids* 18 (2), 022103
- Jo, K.; Chen, Y-L.; de Pablo, J.J.; Schwartz, D.C. (2009). "Elongation and migration of single DNA molecules in microchannels using oscillatory shear flows". *Lab on a Chip* 9 (16), 2348-2355
- Joanicot, M.; Ajdari, A. (2007). "Droplet control for microfluidics". *Science* 309 (5736), 887-888
- Jones, A.K.; Sillery, E.; Albracht, S.P.J.; Armstrong, F.A. (2002). "Direct comparison of the electrocatalytic oxidation of hydrogen by an enzyme and a platinum catalyst». *Chem. Commun.* 866-867
- Kallio, J.P.; Auer, S.; Jänis, J.; Andberg, M.; Kruus, K.; Rouvinen, J.; Koivula, A.; Hakulinen, N. (2009). "Structure-function studies of a *Melanocarpus albomyces* laccase suggest a pathway for oxidation of phenolic compounds". *J. Mol. Biol.* 395, 895-909

- Kamitaka, Y.; Tsujimura, S.; Kataoka, K.; Sakurai, T.; Ikeda, T.; Kano, K. (2007). "Effects of axial ligand mutation of the type I copper site in bilirubin oxidase on direct electron transfer-type bioelectrocatalytic reduction of dioxygen". *J. Electroanal. Chem.* 601, 119-124
- Katz, E.; Willner, I.; Kotlyar, A.B. (1999). "A non-compartmentalized glucose/O₂ biofuel cell by bioengineered electrode surfaces". *J. Electroanal. Chem.* 479, 64-68
- Katz, E.; Sheenez-Haj-Ichia, L.; Willner, I. (2002). "Magneto-switchable electrocatalytic and bioelectrocatalytic transformations". *Chem. Eur. J.* 8 (18), 4138-4148
- Katz, E.; Shipway, A.N.; Willner, I. (2003). "Biochemical fuel cells, *Handbook of Fuel Cell – Fundamentals, Technology and Applications, Volume 1 : Fundamentals and Survey of Systems*". Vielstich, W.; Gasteiger, H.A.; Lamm, A.; Ed. John Wiley & Sons Ltd.: Chichester, England, chapitre 21, pages 355-381
- Karyakin, A.A.; Morozov, S.V.; Voronin, O.G.; Zorin, N.A.; Karyakina, E.E.; Fateyer, V.N.; Cosnier, S. (2007). "The limiting performance characteristics in bioelectrocatalysis of hydrogenase enzymes". *Angew. Chem. Int. Ed.* 46, 7244-7246
- Kavanagh, P.; Boland, S.; Jenkins, P.; Leech, D. (2009). "Performance of a glucose/O₂ enzymatic biofuel cell containing a mediated melanocarpus albomyces laccase cathode in a physiological buffer". *Fuel Cells* 1, 79-84
- Kazlauskas, R.J.; Bornscheuer, U.T. (2009). "Finding better protein engineering strategies". *Nat. Chem. Bio.* 5 (8), 526-529
- Kehoe, J.W.; Kay, B.K. (2005). "Filamentous phage display in the new millennium". *Che. Rev.* 105 (11), 4056-4072
- Kelly, B.T.; Griffiths, A.D. (2007). "Selective gene amplification". *Prot. Eng. Des. Sel.* 20 (12), 577-581
- Kenausis, G.; Taylor, C.; Katakis, I.; Heller, A. (1996). "Wiring of glucose oxidase and lactate oxidase within a hydrogel made with poly(vinylpyridine) complexed with [Os(4,4'-dimethoxy-2,2'-bipyridine)₂Cl]⁺²". *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 92, 4131
- Kim, H.-H.; Mano, N.; Zhang, X.C.; Heller, A. (2003). "A miniature membraneless biofuel cell operating under physiological conditions at 0.5V". *J. Electrochem. Soc.* 2003, 150, A209
- Kim, J.; Jia, H.; Wang, P. (2006). "Challenges in biocatalysis for enzyme-based biofuel cells". *Biotechnology Advances* 24, 296-308
- Kim, J.; Grate, J.W.; Wang, P. (2008). "Nanobiocatalysis and its potential applications". *Trends in Biotechnology* 26 (11), 639-646
- Kim, H.; Luo, D.; Link, D.; Weitz, D.A.; Marquez, M.; Cheng, Z. (2007 (a)). "Controlled production of emulsion drops using an electric field in a flow-focusing microfluidic device". *Appl. Phys. Lett.* 91 (13), 133106
- Kim, H.; Shu, C.-W.; Dane, K.Y.; Daugherty, P.S.; Wang, J.Y.L.; Soh, H.T. (2007 (b)). "Selection of mammalian cells based on their cell-cycle phase using dielectrophoresis". *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104 (52), 20708-20712
- Kirk, O.; Borchert, T.V.; Fuglsang, C.C. (2002). "Industrial enzyme applications". *Curr. Opin. Biotechnol.* 13, 345-351
- Kiss, M.M.; Ortoleva-Donnelly, L.; Beer, N.R.; Warner, J.; Bailey, C.G.; Colston, B.W.; Rothberg, J.M.; Link, D.R.; Leamon, J.H. (2008). "High-throughput quantitative polymerase chain reaction in picoliter droplets". *Anal. Chem.* 80 (23), 8975-8981
- Kjeang, E.; Djilali, N.; Sinton, D. (2009). "Microfluidic fuel cells: a review". *J. Power Sources* 186, 353-369

- Klemic, K.G.; Klemic, J.F.; Reed, M.A.; Sigworth, F.J. (2002). "Micromolded PDMS planar electrode allows patch clamp electrical recordings from cells". *Biosensors and Bioelectronics* 17 (6-7), 597-604
- Klotzbach, T.; Watt, M.; Ansari, Y.; Minter, S.D. (2006). "Effects of hydrophobic modification of chitosan and Nafion on transport properties, ion-exchange capacities, and enzyme immobilization". *J. Membr. Sci.* 282, 276-283
- Köster, S.; Angilè, F.E.; Duan, H.; Agresti, J.J.; Wintner, A.; Schmitz, C.; Rowat, A.C.; Merten, C.A.; Pisignano, D.; Griffiths, A.D.; Weitz, D.A. (2008). "Drop-based microfluidic devices for encapsulation of single cells". *Lab on a Chip* 8 (7), 1110-1115
- Kumar, S.V.S.; Phale, P.S.; Durani, S.; Wangikar, P.P. (2003). "Combined sequence and structure analysis of the fungal laccase family". *Biotechnol. Bioeng.* 83, 386-394
- Kumaresan, P.; Yang, C.J.; Cronier, S.A.; Blazej, R.G.; Mathies, R.A. (2008). "High-throughput single copy DNA amplification and cell analysis in engineered nanoliter droplets". *Anal. Chem.* 80 (10), 3522-3529
- Kuwahara, T.; Ohta, H.; Fondo, M.; Shimomura, M. (2006). "Immobilization of glucose oxidase on carbon paper electrodes modified with conducting polymer and its application to a glucose biofuel cell". *Bioelectrochemistry* 74, 66-72
- Kuznetsov, B.A.; Shumakovich, G.P.; Koroleva, O.V.; Yaropolov, A.I. (2001). "On applicability of laccase as label in the mediated and mediatorless electroimmunoassay: effect of distance on the direct electron transfer between laccase and electrode". *Biosensors and Bioelectronics* 16, 73-84
- Lahann, J.; Mitragotri, S.; Tran, T.-N.; Kaido, H.; Sundaram, J.; Choi, I.S.; Hoffer, S.; Somorjai, G.A.; Langer, R. (2003). "A reversibly switching surface". *Science* 299 (5605), 371-374
- Laurinavicius, V.; Razumiene, J.; Kurtinaitiene, B.; Lapenaite, I.; Bachmatova, I.; Marcinkeviciene, L.; Meskys, R.; Ramanavicius. (2002). "Bioelectrochemical application of some PQQ-dependent enzymes". *Bioelectrochemistry* 55, 29-32
- Lee, J.N.; Park, C.; Whitesides, G.M. (2003). "Solvent compatibility of poly(dimethylsiloxane)-based microfluidic devices". *Anal. Chem.* 75 (23), 6544-6554
- Lee, J.Y.; Shin, H.Y.; Lee, J.H.; Song, Y.S.; Kang, S.W.; Park, C.; Kim, J.B.; Kim, S.W. (2008). "A novel enzyme-immobilization method for a biofuel cell". *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 59, 274-278
- Lee, J.W.; Kjeang, E. (2010). "A perspective on microfluidic biofuel cells". *Biomicrofluidics* 4, 041301
- Lehr, J.; Williamson, B.E.; Barrière, F.; Downard, A.J. (2010). "Dependence of catalytic activity and long-term stability of enzyme hydrogel films on curing time". *Bioelectrochemistry* 79, 142-146
- Lever, A.B.P. (1990). "Electrochemical parametrization of metal complex redox potentials, using the ruthenium(III)/ruthenium(II) couple to generate a ligand electrochemical series". *Inorg. Chem.* 29, 1271-1285
- Liedberg, B.; Yang, Z.; Engquist, I.; Wirde, M.; Gelius, U.; Götz, G.; Bäuerle, P.; Rummel, R.-M.; Ziegler, Ch.; Göpel, W. (1997). "Self-assembly of α -functionalized terthiophenes on gold". *J. Phys. Chem. B* 101, 5951-5962
- Li, X.; Zhou, H.; Yu, P.; Su, L.; Ohsaka, T.; Mao, L. (2008). "A miniature glucose/O₂ biofuel cell with single-walled carbon nanotubes-modified carbon fiber microelectrodes as the substrate". *Electrochem. Commun.* 10, 851-854
- Li, L.; Mustafi, D.; Fu, Q.; Tereshko, V.; Chen, D.L.; Tice, J.D.; Ismagilov, R.F. (2006). "Nanoliter microfluidic hybrid method for simultaneous screening and optimization validated with crystallization of membrane proteins". *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103 (51), 19243-19248

- Li, X.; Turanek, J.; Knötigova, P.; Kudlackova, H.; Masek, J.; Pennington, D.B.; Rankin, S.E.; Knutson, B.L.; Lehmler, H.-J. (2008). "Synthesis and biocompatibility evaluation of fluorinated, single-tailed glucopyranoside surfactants". *New. J. Chem.* 32 (12), 2169-2179
- Liang, J.; Edelsbrunner, H.; Woodward, C. (1998). "Anatomy of protein pockets and cavities: measurement of binding site geometry and implications of ligand design". *Protein Sci.* 7, 1884-1887
- Liau, A.; Karnik, R.; Majumdar, A.; Doudna Cate, J.H. (2005). "Mixing crowded biological solutions in milliseconds". *Anal. Chem.* 77 (23), 7618-7625
- Lichtman, J.W.; Conchello, J.-A. (2005). "Fluorescence microscopy". *Nat. Methods* 2 (12), 910-919
- Lim, K.G.; Palmore, G.T.R. (2007). "Microfluidic biofuel cells: the influence of electrode diffusion layer on performance". *Biosensors and Bioelectronics* 22, 941-947
- Lin, H.; Cornish, V.W. (2002). "Screening and selection methods for large-scale analysis of protein function". *Angew. Chem. Int. Ed.* 41, 4402-4425
- Lin, Y.; Taylor, S.; Li, H.; Shiral Fernando, K.A.; Qu, L.; Wang, W.; Gu, L.; Zhou, B.; Sun, Y.-P. (2004). "Advances toward bioapplications of carbon nanotubes". *J. Mater. Chem.* 14 (4), 527-541
- Lineweaver, H.; Burk, D. (1934). "The determination of enzyme dissociation constants". *J. Am. Chem. Soc.* 56, 658-666
- Link, D.R.; Grasland-Mongrain, R.; Duri, A.; Sarrazin, F.; Cheng, Z.; Cristobal, G.; Marquez, M.; Weitz, D.A. (2006). "Electric control of droplets in microfluidic devices". *Ang. Chem. Int. Ed.* 45 (16), 2556-2560
- Lion, N.; Rossier, J.R.; Girault, H.H. (2006). "Microfluidic applications in biology: from technologies to systems biology". *Wiley-VCH*
- Liu, Y.; Wang, M.; Zhao, F.; Liu, B.; Dong, S. (2005). "A low-cost biofuel cell with pH-dependent power output based on porous carbon as matrix". *Chem. Eur. J.* 11, 4970-4974
- Liu, Y.; Wang, M.; Zhao, F.; Xu, Z.; Dong, S. (2005 (b)). "The direct electron transfer of glucose oxidase and glucose biosensor based on carbon nanotubes/chitosan matrix". *Biosensors and Bioelectronics* 21, 984-988
- Liu, Y.; Dong, S. (2007). "A biofuel cell harvesting energy from glucose-air and fruit juice-air". *Biosensors and Bioelectronics* 23, 593-597
- Liu, Y.; Dong, S. (2007 (b)). "A biofuel cell harvesting with enhanced power output by grape juice". *Electrochem. Commun.* 9, 1423-1427
- Liu, Y.; Ismagilov, R.F. (2009). "Dynamics of coalescence of plugs with hydrophilic wetting layer induced by flow in a microfluidic chemistode". *Langmuir* 25 (5), 2854-2859
- Love, J.C.; Estroff, L.A.; Kriebel, J.K.; Nuzzo, R.G.; Whitesides, G.M. (2005). "Self-assembled monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology". *Chem. Rev.* 105, 1103-1169
- Lowe, K.C.; Davey, M.R.; Power, J.B. (1998). "Perfluorochemicals: their applications and benefits to cell culture". *Trends in Biotechnol.* 16 (6), 272-277
- Lowe, K.C. (2002). "Perfluorochemical respiratory gas carriers: benefits to cell culture systems". *J. Flu. Chem.* 118, 19-26
- Lyskawa, J.; Bélanger, D. (2006). "Direct modification of a gold electrode with aminophenyl groups by electrochemical reduction of in situ generated aminophenyl monodiazonium cations". *Chem. Mater.* 18, 4755-4763
- Madzak, C.; Mimmi, M.C.; Caminade, E.; Brault, A.; Baumberger, S.; Briozzo, P.; Mouglin, C.; Jolival, C. (2006). "Shifting the optimal pH of activity for laccase from the fungus *Trametes versicolor* by structure-based mutagenesis". *Prot. Eng. Des. Sel.* 19 (2), 77-84

- Magnusson, A.; Hult, K.; Holmquist, M. (2001). "Creation of an enantioselective hydrolase by engineered substrate-assisted catalysis". *J. Am. Chem. Soc.* 123, 4354-4355
- Mano, N.; Kim, H-H.; Zhang, Y.; Heller, A. (2002). "An oxygen cathode operating in a physiological solution". *J. Am. Chem. Soc.* 124, 6480-6486
- Mano, N.; Heller, A. (2003). "A miniature membraneless biofuel cell operating at 0.36V under physiological conditions". *J. Electrochem. Soc.* 125, A1136
- Mano, N.; Mao, F.; Shin, W.; Chen, T.; Heller, A. (2003 (b)). "A miniature biofuel cell operating at 0.78V". *Chem. Commun.* 518-519
- Mano, N.; Fernandez, J.L.; Kim, Y.; Shin, W.; Bard, A.J.; Heller, A. (2003 (c)). "Oxygen is electroreduced to water on a wired enzyme electrode at a lesser overpotential than on platinum". *J. Am. Chem. Soc.* 125, 15290-15291
- Mano, N.; Mao, F.; Heller, A. (2003 (d)). "Characteristics of a miniature compartment-less glucose-O₂ biofuel cell and its operation in a living plant". *J. Am. Chem. Soc.* 125, 6588-6594
- Mano, N.; Mao, F.; Heller, A. (2004). "A miniature membrane-less biofuel cell operating at +0.60V under physiological conditions". *Chem. Biochem.* 5, 1703-1705
- Mano, N.; Soukharev, V.; Heller, A. (2006). "A laccase-wiring redox hydrogel for efficient catalysis of O₂ electroreduction". *J. Phys. Chem. B* 110, 11180-11187
- Mano, N. (2008). "A 280 μ W.cm⁻² biofuel cell operating at low glucose concentration". *Chem. Commun.* 2221-2223
- Mao, F.; Mano, N.; Heller, A. (2003). "Long tethers binding redox centers to polymer backbones enhance electron transport in enzyme wiring hydrogels". *J. Am. Chem. Soc.* 125, 4951-4957
- Marcus, R.A. (1993). "Electron transfer reactions in chemistry: theory and experiment (Nobel Lecture)". *Angew Chem Int Ed* 32, 1111-1121
- Martins, L.O.; Soares, C.M.; Pereira, M.M.; Teixeira, M.; Costa, T.; Jones, G.H.; Henriques, A.O. (2002). "Molecular and biochemical characterization of a highly stable bacterial laccase that occurs as a structural component of the bacillus subtilis endospore coat". *J. Biol. Chem.* 277 (21), 18849-18859
- Mason, T.G.; Bibette, J.; Weitz, D.A. (1995). "Elasticity of compressed emulsions". *Phys. Rev. Lett.* 75 (10), 2051-2054
- Mastrobattista, E.; Taly, V.; Chanudet, E.; Treacy, P.; Kelly, B.T.; Griffiths, A.D. (2005). "High-throughput screening of enzyme libraries: in vitro evolution of a β -galactosidase by fluorescence-activated sorting of double emulsions". *Chem. Biol.* 12 (12), 1291-1300
- Masuda, S.; Washizu, M.; Nanba, T. (1989). "Novel method of cell fusion in field constriction area in fluid integrated circuit". *IEEE Trans. Ind. Appl.* 25 (4), 732-737
- Matsuura, T.; Plückthun, A. (2003). "Selection based on the folding properties of proteins with ribosome display". *FEBS Lett.* 539, 24-28
- Mattheakis, L.C.; Bhatt, R.R.; Dower, W.J. (1994). "An in vitro polysome display system for identifying ligands from very large peptide libraries". *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91 (19), 9022-9026
- Mayer, A.M.; Staples, R.C. (2002). "Laccase: new functions for an old enzyme". *Phytochemistry* 60, 551-565
- Mazutis, L.; Baret, J-C.; Griffiths, A.D. (2009 (a)). "A fast and efficient microfluidic system for highly selective one-to-one droplet fusion". *Lab on a Chip* 9 (18), 2665-2672
- Mazutis, L.; Baret, J-C.; Treacy, P.; Skhiri, Y.; Fallah Araghi, A.; Ryckelynck, M.; Taly, V.; Griffiths, A.D. (2009 (b)). "Multi-step microfluidic droplet processing: kinetic analysis of an in vitro translated enzyme". *Lab on a Chip* 9 (20), 2902-2908

- Mazutis, L. (2009 (c)). *"Droplet-based microfluidics for protein evolution"*. Université de Strasbourg
- McCarthy, A. (2003). *"Metobolix, Inc. and Tepha, Inc. Bioplastics for industry and medical devices"*. Chem. Biol. 10, 893-894
- Merle, G.; Brunel, L.; Tingry, S.; Cretin, M.; Rolland, M.; Servat, K.; Jolival, C.; Innocent, C.; Seta, P. (2008). *"Electrode biomaterials based on immobilized laccase. Application for enzymatic reduction of dioxygen"*. Mater. Sci. Eng. C 28, 932-938
- Mikolasch, A.; Schauer, F. (2009). *"Fungal laccases as tool for the synthesis of new hybrid molecules and biomaterials"*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 82, 605-624
- Min, B.; Kim, J.; Oh, S.; Regan, J.M.; Logan, B.E. (2005). *"Electricity generation from swine wastewater using microbial fuel cell"*. Water Research 39, 4961-4968
- Minteer, S.D.; Liaw, B.Y.; Cooney, M.J. (2007). *"Enzyme-based biofuel cells"*. Current Opinion in Biotechnology 18, 228-234
- Miroux, B.; Walker, J.E. (1996). *"Over-production of proteins in Escherichia coli: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels"*. J. Mol. Biol. 260, 289-298
- Moehlenbrock, M.J.; Minteer, S.D. (2008). *"Extended lifetime biofuel cells"*. Chemical Society Reviews 37 (6), 1188-1196
- Moon, H.; Chang, I.S.; Kim, B.H. (2005). *"Continuous electricity production from artificial wastewater using a mediator-less microbial fuel cell"*. Bioresource Tech. 97, 621-627
- Moore, C.M.; Akers, N.L.; Hill, A.D.; Johnson, Z.C.; Minteer, S.D. (2004). *"Improving the environment for immobilized dehydrogenase enzymes by modifying Nfion with tetraalkylammonium bromides"*. Biomacromolecules 4, 1241-1247
- Moore, C.M.; Minteer, S.D.; Martin, R.S. (2004 (b)). *"Microchip-based ethanol/oxygen biofuel cell"*. Lab on a Chip 5, 218-225
- Morley, K.L.; Kazlauskas, R.J. (2005). *"Improving enzyme properties: when are closer mutations better?"*. Bioelectrochemistry 71 (8), 8-14
- Mulder, W.H.; Calvente, J.J.; Andreu, R. (2001). *"A kinetic model for the reductive desorption of self-assembled thiol monolayers"*. Langmuir 17, 3273-3280
- Naqui, A.; Varfolomeev, S.D. (1980). *"Inhibition mechanism of Polyporus laccase by fluoride ion"*. FEBS Lett. 113 (2), 157-160
- Nazaruk, E.; Bilewicz, R. (2007). *"Catalytic activity of oxidases hosted in lipidic cubic phases on electrodes"*. Bioelectrochemistry 71 (8), 8-14
- Neuenschwander, M.; Butz, M.; Heintz, C.; Kast, P.; Hilvert, D. (2007). *"A simple selection strategy for evolving highly efficient enzymes"*. Nat. Biotechnol. 25 (10), 1145-1147
- Neylon, C. (2004). *"Chemical and biochemical strategies for the randomization of protein encoding DNA sequences: library construction methods for directed evolution"*. Nuc. Acids Res. 32 (4), 1448-1459
- Ng, J.M.K.; Gitlin, I.; Stroock, A.D.; Whitesides, G.M. (2002). *"Components for integrated poly(dimethylsiloxane) microfluidic systems"*. Electrophoresis 23 (20), 3461-3473
- Ngounou, B.; Neugebauer, S.; Frodl, A.; Reiter, S.; Schuhmann, W. (2004). *"Combinatorial synthesis of a library of acrylic acid-based polymers and their evaluation as immobilization matrix for amperometric biosensors"*. Electrochimica Acta 49, 3855-3863
- Ngounou, B.; Aliyev, E.H.; Guschin, D.A.; Sultanov, Y.M.; Efendiev, A.A.; Schuhmann, W. (2007). *"Parallel synthesis of libraries of anodic and cathodic functionalized electrodeposition paints as immobilization matrix for amperometric biosensors"*. Bioelectrochemistry 71, 81-90

- Nie, Z.; Seo, M.; Xu, S.; Lewis, P.C.; Mok, M.; Kumacheva, E.; Whitesides, G.M.; Garstecki, P.; Stone, H.A. (2008). "Emulsification in a microfluidic flow-focusing device: effect of the viscosities of the liquids". *Microfluid. Nanofluid.* 5 (5), 585-594
- Nisisako, T.; Torii, T.; Higuchi, T. (2002). "Droplet formation in a microchannel network". *Lab on a Chip* 2 (1), 24-26
- Niu, X.; Gulati, S.; Edel, J.B.; deMello, A.J. (2008). "Pillar-induced droplet merging in microfluidic circuits". *Lab on a Chip* 8 (11), 1837-1841
- Niu, X.; Gielen, F.; deMello, A.J.; Edel, J.B. (2009). "Electro-coalescence of digitally controlled droplets". *Anal. Chem.* 81 (17), 7321-7325
- Olsen, M.J.; Stephens, D.; Griffiths, D.; Daugherty, P.; Georgiou, G.; Iverson, B.L. (2000). "Function-based isolation of novel enzymes from a large library". *Nat. Biotechnol.* 18, 1071-1074
- Paik, P.; Pamula, V.K.; Fair, R.B. (2003). "Rapid droplet mixers for digital microfluidic systems". *Lab on a Chip* 3 (4), 253-259
- Palmer, A.E.; Randall, D.W.; Xu, F.; Solomon, E.I. (1999). "Spectroscopic studies and electronic structure description of the high potential type 1 copper site in fungal laccase: insight into the effect of the axial ligand". *J. Am. Chem. Soc.* 121, 7138-7149
- Palmer, A.E.; Lee, S.K.; Solomon, E.I. (2001). "Decay of the peroxide intermediate in laccase: reductive cleavage of the O-O bond". *J. Am. Chem. Soc.* 123, 6591-6599
- Palmore, G.T.R.; Whitesides, G.M. (1994). "Microbial and Enzymatic biofuel cells". *ACS Symp. Ser.* 566, 271-290
- Palmore, G.T.R.; Bertschy, H.; Bergens, S.H.; Whitesides, G.M. (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". *J. Electroanal. Chem* 443, 155-161
- Palmore, G.T.R.; Kim, H-H. (1999). "Electro-enzymatic reduction of dioxygen to water in the cathode compartment of a biofuel cell". *J. Electroanal. Chem* 464, 110-117
- Palmore, G.T.R. (2008). "Biofuel Cells in bioelectrochemistry. Fundamentals, Experimental Techniques and Applications". Bartlett, P., Ed. John Wiley & Sons Ltd.: Chichester, England, pages 359-375
- Park, S.; Morley, K.L.; Horsman, G.P.; Holmquist, M.; Hult, K.; Kazlauskas, J.; (2005). "Focusing mutations into the *P.fluorescens* esterase binding site increases enantioselectivity more effectively than distant mutations". *Chem. Biol.* 12, 45-54
- Park, H-S.; Nam, S-H.; Lee, J.K.; Yoon, C.N.; Mannervik, B.; Benkovic, S.J.; Kim, H-S. (2006). "Design and evolution of new catalytic activity with an existing protein scaffold". *Science* 311 (5760), 535-538
- Patten, P.A.; Howard, R.J.; Stemmer, W.P.C. (1997). "Applications of DNA shuffling to pharmaceuticals and vaccines". *Curr. Opin. Biotechnol.* 8, 724-733
- Peisajovich, S.G.; Tawfik, D.S. (2007). "Protein engineers turned evolutionists". *Nat. Methodes* 4 (12), 991-994
- Pekin, D.; Skhiri, Y.; Baret, J-C.; Le Corre, D.; Mazutis, L.; Ben Salem, C.; Millot, F.; El Harrak, A.; Hutchison, J.B.; Larson, J.W.; Link, D.R.; Laurent-Puig, P.; Griffiths, A.D.; Taly, V. (2011). "Quantitative and selective detection of rare mutations using droplet-based microfluidics". *Lab On a Chip* 11, 2156-2166
- Pellissier, M.; Barrière, F.; Downard, A.J.; Leech, D. (2008). "Improved stability of redox enzyme layers on glassy carbon electrodes via covalent grafting". *Electrochem. Commun.* 10, 835-838

- Perroud, T.D.; Kaiser, J.N.; Sy, J.C.; Lane, T.W.; Branda, C.S.; Singh, A.K.; Patel, K.D. (2008). "Microfluidic-based cell sorting of *Francisella tularensis* infected macrophages using optical forces". *Ana. Chem.* 80 (16), 6365-6372
- Piontek, K.; Antorini, M.; Choinowski, T. (2002). "Crystal structure of a laccase from the fungus *Trametes versicolor* at 1.90Å resolution containing a full complement of coppers". *J. Biol. Chem.* 277 (40), 37663-37669
- Pita, M.; Shleev, S.; Ruzgas, T.; Fernandez, V.M.; Yaropolov, A.I.; Gorton, L. (2006). "Direct heterogeneous electron transfer of fungal laccases at bare and thiol-modified gold electrodes". *Electrochem. Commun.* 8, 747-753
- Pizzariello, A.; Stred'ansky, M.; Miertus, S. (2002). "A glucose/hydrogen peroxide biofuel cell that use oxidase and peroxidase as catalysts by composite bulk-modified bioelectrodes based on a solid binding matrix". *Bioelectrochemistry* 56, 99-105
- Polyakov, K.M.; Fedorova, T.V.; Stepanova, E.V.; Cherkashin, E.A.; Kurzeev, S.A.; Strokopytov, B.V.; Lamzin, V.S.; Koroleva, O.V. (2009). "Structure of native laccase from *Trametes hirsute* at 1.8Å resolution". *Acta Cryst.* D65, 611-617
- Popat, K.C.; Desai, T.A. (2003). "Poly(ethylene glycol) interfaces: an approach for enhanced performance of microfluidic systems". *Biosensors and Bioelectronics* 19 (9), 1037-1044
- Potter, M.C. (1911). "Electrical effects accompanying the decomposition of organic compounds". *Proceedings of The Royal Society B. Biological Sciences* 84, 260-276
- PrévotEAU, A.; Courjean, O.; Mano, N. (2010). "Deglycosylation of glucose oxidase to improve biosensors and biofuel cells". *Electrochem. Commun.* 213-215
- Priest, C.; Herminghaus, S.; Seeman, R. (2006). "Controlled electrocoalescence in microfluidics: targeting a single lamella". *Appl. Phys. Lett.* 89 (13), 134101
- Prime, K.L.; Whitesides, G.M. (1991). "Self-assembled organic monolayers: model systems for studying adsorption of proteins at surfaces". *Science* 252 (5009), 1164-1167
- Psaltis, D.; Quake, S.R.; Yang, C. (2006). "Developing optofluidic technology through the fusion of microfluidics and optics". *Nature* 442 (7101), 381-386
- Quake, S.R.; Scherer, A. (2000). "From micro- to nanofabrication with soft materials". *Science* 290 (5496), 1536-1540
- Quintanar, L.; Stoj, C.; Taylor, A.B.; Hart, P.J.; Kosman, D.J.; Solomon, E.I. (2007). "Sahll we dance? How a multicopper oxidase chooses its electron transfer partner". *Acc. Chem. Res.* 40, 445-452
- Ramanavicius, R.; Habermüller, K.; Csoeregi, E.; Lauranavicius, V.; Schuhmann, W. (1999). "Polypyrrole-entrapped quinoxaline alcohol dehydrogenase. Evidence for direct electron transfer via conducting-polymer chains". *Anal. Chem.* 71, 3581-3586
- Ramanavicius, A.; Kausaite, A.; Ramanaviciene, A. (2005). "Biofuel cell based on direct bioelectrocatalysis". *Biosensors and Bioelectronics* 20, 1962-1967
- Ramanavicius, A.; Kausaite, A.; Ramanaviciene, A. (2008). "Enzymatic biofuel cell based on anode and cathode powered by ethanol". *Biosensors and Bioelectronics* 24, 761-766
- Ramanavicius, A.; Ramanaviciene, A. (2009). "Hemoproteins in design of biofuel cells". *Fuel Cells* 9 (1), 25-36
- Razumiene, J.; Niculescu, M.; Ramanavicius, A.; Laurinavicius, V.; Csöregi, E. (2001). "Direct bioelectrocatalysis at carbon electrodes modified with quinoxaline alcohol dehydrogenase from *Gluconobacter sp.* 33". *Electroanalysis* 14 (1), 43-49

- Reetz, M.T.; Kahakeaw, D.; Lohmer, R. (2008). "Addressing the numbers problem in directed evolution". *ChemBiochem* 9, 1797-1804
- Reiss, J.G.; Greiner, J. (2000). "Carbohydrate- and related polyol-derived fluorosurfactants: an update". *Carbohydrate Research* 327, 147-168
- Reiter, G.; Khanna, R. (2000). "Enhanced instability in thin liquid films by improved compatibility". *Phys. Rev. Lett.* 85 (7), 1432-1435
- Riesenman, P.J.; Nicholson, W.L. (2000). "Role of the spore coat layers in *Bacillus subtilis* spore. Resistance to Hydrogen peroxide, artificial UV-C, UV-B, and solar UV radiation". *Appl. Environ. Microbiol.* 66 (2), 620-626
- Roach, L.S.; Song, H.; Ismagilov, R.F. (2005). "Controlling nonspecific protein adsorption in a plug-based microfluidic system by controlling interfacial chemistry using fluorosurfactants". *Anal. Chem.* 77 (3), 785-796
- Roberts, R.W.; Szostak, J.W. (1997). "RNA-peptide fusions for the in vitro selection of peptides and proteins". *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94(23), 12297-12302
- Rocherfort, D.; Leech, D.; Bourdonnais, R. (2004). "Electron transfer mediator systems for bleaching of paper pulp". *Green Chem.* 6, 14-24
- Rodgers, C.J.; Blanford, C.F.; Giddens, S.R.; Skamnioti, P.; Armstrong, F.A.; Gurr, S.J. (2009). "Designer laccases: a vogue for high-potential fungal enzymes". *Trends in Biotechnol.* 28 (2), 63-72
- Romero, P.A.; Arnold, F.H. (2009). "Exploring protein fitness landscapes by directed evolution". *Nature* 10, 866-876
- Röthlisberger, D.; Khersonsky, O.; Wollacott, A.M.; Jiang, L.; DeChancie, J.; Betker, J.; Gallaher, J.L.; Althoff, E.A.; Zanghellini, A.; Dym, O.; Albeck, S.; Houk, K.N.; Tawfik, D.C.; Baker, D. (2008). "Kemp elimination catalysts by computational enzyme design". *Nature* 453 (7192), 190-195
- Sagiv, J. (1980). "Organized monolayers by adsorption. 1. Formation and structure of oleophobic mixed monolayers on solid surfaces". *J. Am. Chem. Soc.* 102 (1), 92-98
- Sakai, H.; Nakagawa, T.; Tokita, Y.; Hatazawa, T.; Ikeda, T.; Tsujimura, S.; Kano, K. (2009). "A high-power glucose/oxygen biofuel cell operating under quiescent conditions". *Energy and Environmental Science* 2, 133-138
- Sakurai, T.; Kataoka, K. (2007). "Structure and function of type 1 copper in multicopper oxidases". *Cell. Mol. Life Sci.* 64, 2642-2656
- Sambrook, J.; Russell, D. (2001). "Molecular cloning: a laboratory manual (Third Edition)". *CSHL Press*
- Sang, L.; Hong, Y.; Wang, F. (2009). "Investigation of viscosity effect on droplet formation in T-shaped microchannels by numerical and analytical methods". *Microfluid. Nanofluid.* 6 (5), 621-635
- Schaerli, Y.; Wootton, R.C.; Robinson, T.; Stein, V.; Dunsby, C.; Neil, M.A.A.; French, P.M.W.; deMello, A.J.; Abell, C.; Hollfelder, F. (2009). "Continuous-flow polymerase chain reaction of single-copy DNA in microfluidic microdroplets". *Anal. Chem.* 81 (1), 302-306
- Schaerli, Y.; Hollfelder, F. (2009 (b)). "The potential of microfluidic water-in-oil droplets in experimental biology". *Mol. BioSyst.* 5, 1392-1404
- Schmitz, C.H.J.; Rowat, A.C.; Köster, S.; Weitz, D.A. (2009). "Dropspots: a picolitre array in a microfluidic device". *Lab on a Chip* 9 (1), 44-49
- Schuhmann, W.; Ohara, T.J.; Schmidt, H.-L.; Heller, A. (1991). "Electron transfer between glucose oxidase and electrodes via redox mediators bound with flexible chains to the enzyme surface". *J. Am. Chem. Soc.* 113, 1394-1397

- Schuhmann, W.; Zimmermann, H.; Habermüller, K.; Laurinavicius, V. (2000). "Electron-transfer pathways between redox enzymes and electrode surfaces: reagentless biosensors based on thiol-monolayer-bound and polypyrrole-entrapped enzymes". *Faraday Discuss* 116, 245-255
- Seelig, B.; Szostak, J.W. (2007). "Selection and evolution of enzymes from a partially randomized non-catalytic scaffold". *Nature* 448 (7155), 828-831
- Sen, S.; Venkata Dasu, V.; Mandal, B. (2007). "Developments in directed evolution for improving enzyme functions". *Appl. Biochem. Biotechnol.* 143 (3), 212-223
- Servat, K.; Tingry, S.; Brunel, L.; Querelle, S.; Cretin, M.; Innocent, C.; Jolival, C.; Rolland, M. (2007). "Modification of porous carbon tubes with enzymes: application for biofuel cells". *J. Appl. Electrochem.* 37, 121-127
- Shi, W.; Qin, J.; Ye, N.; Lin, B. (2009). "Droplet-based microfluidic system for individual *Caenorhabditis elegans* assay". *Lab on a Chip* 8 (9), 1432-1435
- Shim, J-U.; Olguin, L.F.; Whyte, G.; Scott, D.; Babbie, A.; Abell, C.; Huck, W.T.S.; Hollfelder, F. (2009). "Simultaneous determination of gene expression and enzymatic activity in individual bacterial cells in microdroplet compartments". *J. Am. Chem. Soc.* 131, 15251-15256
- Shkiri, Y. (2011). "Plateforme microfluidique d'optimisation de biocatalyseurs pour des biopiles à combustible". *Université de Strasbourg*
- Shleev, S.; El Kami, A.; Ruzgas, T.; Gorton, L. (2004). "Direct heterogeneous electron transfer reactions of bilirubin oxidase at a spectrographic graphite electrode". *Electrochem. Commun.* 6, 934-939
- Shleev, S.; Tkac, J.; Christenson, A.; Ruzgas, T.; Yaropolov, A.I.; Whittaker, J.W.; Gorton, L. (2005). "Direct electron transfer between copper-containing proteins and electrodes". *Biosensors and Bioelectronics* 20, 2517-2554
- Shleev, S.; Jarosz-Wilkolazka, A.; Khalunina, A.; Morozova, O.; Yaropolov, A.; Ruzgas, T.; Gorton, L. (2005 (b)). "Direct electron transfer reactions of laccases from different origins on carbon electrodes". *Bioelectrochemistry* 67, 115-124
- Shui, L.; van den Berg, A.; Eijkel, J.C.T. (2009). "Interfacial tension controlled W/O and O/W 2-phase flows in microchannel". *Lab on a Chip* 9 (6), 795-801
- Shulka, A.K.; Suresh, P.; Berchmans, S.; Rajendran, A., (2004). "Biological fuel cells and their applications". *Curr. Sci.* 87 (4), 455-468
- Sidhu, S.S. (2000). "Phage display in pharmaceutical biotechnology". *Curr. Opin. Biotechnol.* 11 (6), 610-616
- Siegel, A.C.; Shevkoplyas, S.S.; Weibel, D.B.; Bruzewicz, D.A.; Martinez, A.W.; Whitesides, G.M. (2006). "Cofabrication of electromagnets and microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane)". *Angew. Chem. Int. Ed.* 45 (41), 6877-68820
- Sjöblom, (2006). "Emulsions and emulsion stability". *Taylor & Francis Group, LLC*, Second edition, CRC Press
- Smith, G.P. (1985). "Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface". *Science* 228 (4705), 1315-1317
- Sokic-Lazic, D.; Rodrigues de Andrade, A.; Minter, S.D. (2011). "Utilization of enzyme cascades for complete oxidation of lactate in an enzymatic biofuel cell". *Electrochimica Acta*
- Solomon, E.I.; Sundaram, U.M.; Machonkin, T.E. (1996). "Multicopper oxidases and oxygenases". *Chem. Rev.* 96, 2563-2605
- Solomon, E.I.; Chen, P.; Metz, M.; Lee, S-K.; Palmer, A.E. (2001). "Oxygen binding, activation, and reduction to water by copper proteins". *Angew. Chem. Int. Ed.* 40, 4570-1590

- Solomon, E.I.; Augustine, A.J.; Yoon, J. (2008). "*O₂ reduction to H₂O by the multicopper oxidases*". Dalton Trans. 3921-3932
- Song, H.; Ismagilov, R.F. (2003 (a)). "*Millisecond kinetics on a microfluidic chip using nanoliters of reagents*". J. Am. Chem. Soc. 125 (47), 14613-14619
- Song, H.; Bringer, M.R.; Tice, J.D.; Gerds, C.J.; Ismagilov, R.F. (2003 (b)). "*Experimental test of scaling of mixing by chaotic advection in droplets moving through microfluidic channels*". Appl. Phys. Lett. 83 (22), 4664-4666
- Song, H.; Tice, J.D.; Ismagilov, R.F. (2003 (c)). "*A microfluidic system for controlling reaction networks in time*". Angew. Chem. Int. Ed. 42 (7), 768-772
- Song, H.; Chen, D.L.; Ismagilov, R.F. (2006). "*Reactions in droplets in microfluidic channels*". Angew. Chem. Int. Ed. 45 (44), 7336-7356
- Soukharev, V.; Mano, N.; Heller, A. (2004). "*A four-electron O-electroreduction biocatalyst superior to platinum and a biofuel cell operating at 0.88V*". J. Am. Chem. Soc. 126, 8368-8369
- Soumillion, P.; Jespers, L.; Bouchet, M.; Marchand-Brynaert, J.; Winter, G.; Fastrez, J. (1994). "*Selection of b-lactamase on filamentous bacteriophage by catalytic activity*". J. Mol. Biol. 237 (4), 415-422
- Spadiut, O.; Pisanelli, I.; Maischberger, T.; Peterbauer, C.; Gorton, L.; Chaiyen, P.; Haltrich, D. (2009). "*Engineering of pyranose 2-oxidase: improvement for biofuel cell and food applications through semi-rational protein design*". J. Biotechnol. 139, 250-257
- Spira-Solomon, D.J.; Allendorf, M.D.; Solomon, E.I. (1986). "*Low-temperature magnetic circular dichroism studies of native laccase: confirmation of a trinuclear copper active site*". J. Am. Chem. Soc. 108, 5318-5328
- Srisa-Art, M.; deMello, A.J.; Edel, J.B. (2007). "*High-throughput DNA droplet assays using picolitre reactor volumes*". Anal. Chem. 79 (17), 6682-6689
- Srisa-Art, M.; Dyson, E.C.; deMello, A.J.; Edel, J.B. (2008). "*Monitoring of real-time streptavidin-biotin binding kinetics using droplet microfluidics*". Anal. Chem. 80 (18), 7063-7067
- Stemmer, W.P.C. (1994). "*Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling*". Nature 24, 370 (6488), 389-391
- Swoboda, B.E.P.; Massey, V. (1965). "*Purification and properties of glucose oxidase from Aspergillus niger*". J. Biol. Chem. 240, 2209-2215
- Taly, V.; Kelly, B.T.; Griffiths, A.D. (2007). "*Droplets as microreactors for high-throughput biology*". ChemBioChem 8, 263-272
- Tan, Y.-C.; Lee, A.P. (2005). "*Microfluidic separation of satellite droplets as the basis of a monodispersed micron and submicron emulsification system*". Lab on a Chip 5 (10), 1178-1183
- Tan, W.-H.; Takeuchi, S. (2007 (a)). "*A trap-and-release integrated microfluidic system for dynamic microarray applications*". Proc. Natl. Acad. Sci. 104 (4), 1146-1151
- Tan, Y.-C.; Ho, Y.L.; Lee, A.P. (2007 (b)). "*Droplet coalescence by geometrically mediated flow in microfluidic channels*". Microfluid. Nanofluid. 3 (4), 495-499
- Tan, Y.; Deng, W.; Ge, B.; Xie, Q.; Huang, J.; Yao, S. (2009). "*Biofuel cell and phenolic biosensor based on acid-resistant laccase-glutaraldehyde functionalized chitosan-multiwalled carbon nanotubes nanocomposite film*". Biosensors and Bioelectronics 24, 2225-2231
- Tawfik, D.S.; Griffiths, A.D. (1998). "*Man-made cell-like compartments for molecular evolution*". Nat. Biotechnol. 16 (7), 652-656

- Tawfik, D.S. (2006). "Biochemistry. Loop grafting and the origins of enzyme species". Science 311 (5760), 475-476
- Taylor, G. (1953). "Dispersion of soluble matter in solvent flowing slowly through a tube". Proceedings of the Royal Society of London. Series A. Mathematical and Physical Sciences 219 (1137), 186-203
- Taylor, S.V.; Kast, P.; Hilvert, D. (2001). "Investigating and engineering enzymes by genetic selection". Angew. Chem. Int. Ed. 40, 3310-3335
- Teh, S-Y.; Lin, R.; Hung, L-H.; Lee, A.P. (2008). "Droplet microfluidics". Lab on a Chip 8 (2), 198-220
- Theberge, A.B.; Courtois, F.; Schaerli, Y.; Fischlechner, M.; Abell, C.; Hollfelder, F.; Huck, W.T.S. (2010). "Microdroplets in microfluidics: an evolving platform for discoveries in chemistry and biology". Angew. Chem. Int. Ed. 49, 5846-5868
- Thiam, A.R.; Bremond, N.; Bibette, J. (2009). "Breaking of an emulsion under an ac electric field". Phys. Rev. Lett. 102 (18), 188304
- Thorsen, T.; Roberts, R.W.; Arnold, F.H.; Quake, S.R. (2001). "Dynamic pattern formation in a vesicle-generating microfluidic device". Phys. Rev. Lett. 86 (18), 4163-4166
- Thurston, C.F. (1994). "The structure and function of fungal laccases". Microbiology 140, 19-26
- Tice, J.D.; Song, H.; Lyon, A.D.; Ismagilov, R.F. (2003). "Formation of droplets and mixing in multiphase microfluidics at low values of the Reynolds and the capillary numbers". Langmuir 19 (22), 9127-9133
- Togo, M.; Takamura, A.; Asai, T.; Kaji, H.; Nishizawa, M. (2007). "An enzyme-based microfluidic biofuel cell using vitamin K₃-mediated glucose oxidation". Electrochimica Acta 52, 4669-4674
- Togo, M.; Takamura, A.; Asai, T.; Kaji, H.; Nishizawa, M. (2008). "Structural studies of enzyme-based microfluidic biofuel cells". J. Power Sources 178, 53-58
- Topcagic, S.; Minteer, S.D. (2006). "Development of a membraneless ethanol/oxygen biofuel cell". Electrochimica Acta 51, 2168-2172
- Torstensson, A.; Gorton, L. (1981). "Catalytic oxidation of NADH by surface-modified graphite electrodes". J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem. 130, 199-207
- Tokuriki, N.; Tawfik, D.S. (2009). "Chaperonin overexpression promotes genetic variation and enzyme evolution". Nature 459, 668-673
- Tracewell, C.A.; Arnold, F.H. (2009). "Directed enzyme evolution: climbing fitness peaks one amino acid at a time". Curr Opin. Chem. Biol. 13, 3-9
- Treu, B.L.; Minteer, S.D. (2008). "Isolation and purification of PQQ-dependent lactate dehydrogenase from *Gluconobacter* and use for direct electron transfer at carbon and gold electrodes". Bioelectrochemistry 74 (1), 73-77
- Tsujimura, S.; Tatsumi, H.; Ogawa, J.; Shimizu, S.; Kano, K.; Ikeda, T. (2001). "Bioelectrocatalytic reduction of dioxygen to water at neutr pH using bilirubin oxidase as an enzyme and 2,2'-azinonis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulonate) as an electron transfer mediator". J. Electroanal. Chem. 496, 69-75
- Tsujimura, S.; Kano, K.; Ikeda, T. (2002). "Glucose/O₂ biofuel cell operating physiological conditions". Electrochemistry 70, 940-943
- Turner, N.J. (2009). "Directed evolution drives the next generation of biocatalysts". Nat. Chem. Biol. 5 (8), 567-573
- Ulman, A. (1996). "Formation and structure of self-assembled monolayers". Chem. Rev. 96, 1533-1554

- Um, E.; Park, J-K. (2009). "A microfluidic abacus channel for controlling the addition of droplets". *Lab on a Chip* 9 (2), 207-212
- Unger, M.A.; Chou, H-P.; Thorsen, T.; Scherer, A.; Quake, S.R. (2000). "Monolithic microfabricated valves and pumps by multilayer soft lithography". *Science* 288 (5463), 113-116
- Van der Graaf, S.; Nisisako, T.; Schroën, C.G.P.H.; van der Sman, R.G.M.; Boom, R.M. (2006). "Lattice Boltzmann simulations of droplet formation in a T-shaped microchannel". *Langmuir* 22 (9), 4144-4152
- Varfolomeev, S.D.; Kurochkin, I.N.; Yaropolov, A.I. (1996). "Direct electron transfer effect biosensors". *Biosensors and Bioelectronics* 11, 863-871
- Vaz-Dominguez, C.; Campuzano, S.; Rüdiger, O.; Pita, M.; Gorbacheva, M.; Shleev, S.; Fernandez, V.M.; De Lacey, A.L. (2008). "Laccase electrode for direct electrocatalytic reduction of O₂ to H₂O with high-operational stability and resistance to chloride inhibition". *Biosensors and Bioelectronics* 24, 531-537
- Vincent, K.A.; Cracknell, J.A.; Lenz, O.; Zebger, I.; Friedrich, B.; Armstrong, F.A. (2005). "Electrocatalytic hydrogen oxidation by an enzyme at high carbon monoxide or oxygen levels". *Pro. Natl. Acad. Sci.* 102 (47), 16951-16954
- Vincent, K.A.; Cracknell, J.A.; Clark, J.R.; Ludwig, M.; Lenz, O.; Friedrich, B.; Armstrong, F.A. (2006). "Electricity from low-level H₂ in still air-an ultimate test for an oxygen tolerant hydrogenase". *Chem. Commun.* 5033-5035
- Vyas, S.M.; Turanek, J.; Knötigova, P.; Kasna, A.; Kvardova, V.; Koganti, V.; Rankin, S.E.; Knutson, B.L.; Lehmler, H-J. (2006). "Synthesis and biocompatibility evaluation of partially fluorinated pyridinium bromides". *New J. Chem.* 30 (6), 944-951
- Walter, N.G.; Huang, C-Y.; Manzo, A.J.; Sobhy, M.A. (2008) "Do-it-yourself guide: how to use the modern single-molecule toolkit". *Nat. Methods* 5 (6), 475-489
- Wang, J.; Musameh, M. (2005). "Carbon-nanotubes doped polypyrrole glucose biosensor". *Anal. Chim. Acta* 539, 209-213
- Wang, M.M.; Tu, E.; Raymond, D.E.; Yang, J.M.; Zhang, H.; Hagen, N.; Dees, B.; Mercer, E.M.; Forster, A.H.; Kariv, I.; Marchand, P.J.; Butler, W.F. (2005) "Microfluidic sorting of mammalian cells by optical force switching". *Nat. Biotechnol.* 23 (1), 83-87
- Wang, K.; Lu, Y.C.; Xu, J.H.; Luo, G.S. (2009 (a)). "Determination of dynamic interfacial tension and its effect on droplet formation in the T-shaped microdispersion process". *Langmuir* 25 (4), 2153-2158
- Wang, W.; Yang, C.; Li, C.M. (2009 (b)). "On-demand microfluidic droplet trapping and fusion for on-chip static droplet assays". *Lab on a Chip* 9 (11), 1504-1506
- Ward, T.; Faivre, M.; Abkarian, M.; Stone, H.A. (2005). "Microfluidic flow focusing : drop size and scaling pressure versus flow-rate-driven pumping". *Electrophoresis* 36 (19), 3716-3724
- Weinreich, D.M.; Watson, R.A.; Chao, L. (2005). "Perspective: sign epistasis and genetic constraint on evolutionary trajectories". *Evolution* 59 (6), 1165-1174
- Weinreich, D.M.; Delaney, N.F.; DePristo, M.A.; Hartl, D.L. (2006). "Darwinian evolution can follow only very few mutational paths to fitter proteins". *Science* 312, 111-114
- Whitesides, G.M.; Ostuni, E.; Takayama, S.; Jiang, X.; Ingber, D.E. (2001). "Soft lithography in biology and biochemistry". *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 3, 335-373
- Willaime, H.V.; Barbier, V.; Kloul, L.; Maine, S.; Tabeling, P. (2006). "Arnold tongues in a microfluidic drop emitter". *Phys. Rev. Lett.* 96 (5), 054501

- Williams, R.; Peisajovich, S.G.; Miller, O.J.; Magdassi, S.; Tawfik, D.S.; Griffiths, A.D. (2006). "Amplification of complex gene libraries by emulsion PCR". *Nat. Methods* 3 (7), 545-550
- Willner, I.; Heleg-Shabtai, V.; Blonder, R.; Katz, E.; Tao, G.; Bückmann, A.F.; Heller, A. (1996). "Electrical wiring of glucose oxidase by reconstitution of FAD-modified monolayers assembled onto Au-electrodes". *J. Am. Chem. Soc.* 118, 10321-10322
- Willner, I.; Yan, Y.M.; Willner, B.; Tel-Vered, R. (2009). "Integrated enzyme-based biofuel cells-A review". *Fuel Cells* 9 (1), 7-24
- Wolff, A.; Perch-Nielsen, I.R.; Larsen, U.D.; Friis, P.; Goranovic, G.; Poulsen, C.R.; Kutter, J.P.; Telleman, P. (2003). "Integrating advanced functionality in a microfabricated high-throughput fluorescence-activated cell sorter". *Lab on a Chip* 3 (1), 22-27
- Wong, T.S.; Roccatano, D.; Zacharias, M.; Schwaneberg, U. (2006). "A statistical analysis of random mutagenesis methods used for directed protein evolution". *J. Mol. Biol.* 355, 858-871
- Woronoff, G.; El Harrak, A.; Mayot, E.; Schicke, O.; Miller, O.J.; Soumillion, P.; Griffiths, A.D.; Ryckelynck, M. (2011). "New generation of amino coumarin methyl sulfonate-based fluorogenic substrates for amidase assays in droplet-based microfluidic applications". *Anal. Chem.* 83, 2852-2857
- Xia, Y.; Whitesides, G.M. (1998 (a)). "Soft lithography". *Angew. Chem. Int. Ed.* 37 (5), 551-575
- Xia, Y.; Whitesides, G.M. (1998 (b)). "Soft lithography". *Annu. Rev. Mater. Sci.* 28, 153-184
- Xiao, Y.; Patolsky, F.; Katz, E.; Hainfeld, J.F.; Willner, I. (2003). "Plugging into enzymes: nonawiring of redox enzymes by a gold nanoparticule". *Science* 299, 1877-1881
- Xu, F.; Shin, W.; Brown, S.H.; Wahleithner, J.A.; Sundaram, U.A.; Solomon, E.I. (1996). "A study of a series of recombinant fungal laccases and bilirubin oxidase that exhibit significant differences in redox potential, substrate specificity, and stability". *Biochim. Biophys. Acta* 1292, 303-311
- Xu, F.; Berka, R.M.; Wahleithner, J.A.; Nelson, B.A.; Shuster, J.R.; Brown, S.H.; Palmer, A.E.; Solomon, E.I. (1998). "Site-directed mutations in fungal laccase: effect on redox potential, activity and pH profile". *Biochem. J.* 334, 63-70
- Xu, F. (2001). "Dioxygen reactivity of laccase. Dependence on laccase source, pH, and anion inhibition". *Appl. Biochem. Biotechnol.* 95, 125-133
- Xu, Q.; Nakajima, M. (2004). "The generation of highly monodisperse droplets through the breakup of hydrodynamically focused microthread in a microfluidic device". *Appl. Phys. Lett.* 85 (17), 3726-3728
- Xu, J.H.; Luo, G.S.; Li, S.W.; Chen, G.G. (2006). "Shear force induced monodisperse droplet formation in a microfluidic device by controlling wetting properties". *Lab on a Chip* 6 (1), 131-136
- Yahiro, A.T.; Lee, S.M.; Kimbe, D.O., (1964). "Bioelectrochemistry. I. Enzyme utilizing biofuel cell studies". *Biochim. Biophys. Acta* 88, 375-383
- Yamanaka, S.; Okawa, H.; Motoda, K-i.; Yonemura, M.; Fenton, D.E.; Ebadi, M.; Lever, A.B.P. (1999). "Tetracopper assembly complexes comprised of one dimetallic core and two monometallic auxiliaries: Intramolecular electron-transfer relevant to multicopper oxidases". *Inorg. Chem.* 38, 1825-1830
- Yan, Y.; Zheng, W.; Su, L.; Mao, L. (2006). "Carbon-nanotube-based glucose/O₂ biofuel cells". *Adv. Mater.* 18, 2638-2643
- Yang, P.; Wirnsberger, G.; Huang, H.C.; Cordero, S.R.; McGehee, M.D.; Scott, B.; Deng, T.; Whitesides, G.M.; Chmelka, B.F.; Buratto, S.K.; Stucky, G.D. (2000). "Mirrorless lasing from mesostructured waveguides patterned by soft lithography". *Science* 287 (5452), 465-467

- Yang, G.; Withers, S.G. (2009). "Ultrahigh-throughput FACS-based screening for directed enzyme evolution". *ChemBioChem* 10, 2704-2715
- Yobas, L.; Martens, S.; Ong, W-L.; Ranganathan, N. (2006). "High-performance flow-focusing geometry for spontaneous generation of monodispersed droplets". *Lab on a Chip* 6 (8), 1073-1079
- Yoshikuni, Y.; Ferrin, T.E.; Keasling, J.D. (2006). "Designed divergent evolution of enzyme function". *Nature* 440 (7087), 1078-1082
- You, L.; Arnold, F.H. (1994). "Directed evolution of subtilisin E in *Bacillus subtilis* to enhance total activity in aqueous dimethylformamide". *Protein Eng.* 9 (1), 77-83
- Yuan, L.; Kurek, I.; English, J.; Keenan, R. (2005). "Laboratory-directed protein evolution". *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 69 (3), 373-392
- Yuhashi, N.; Tomiyama, M.; Okuda, J.; Igarashi, S.; Ikebukuro, K. ; Sode, K. (2005). "Development of a novel glucose enzyme fuel cell system employing protein engineered PQQ glucose dehydrogenase". *Biosensors and Bioelectronics.* 20, 2145-2150
- Yun, K-S.; Yoon, E. (2008). "Fabrication of complex multilevel microchannels in PDMS by using three-dimensional photoresist masters". *Lab on a Chip* 8 (2), 245-250
- Zagnoni, M.; Cooper, J.M. (2009). "On-chip electrocoalescence of microdroplets as a function of voltage, frequency and droplet size". *Lab on a Chip* 9 (18), 2652-2658
- Zayats, M.; Willner, B.; Willner, I. (2007). "Design of amperometric biosensors and biofuel cells by the reconstitution of electrically contacted enzyme electrodes". *Electroanalysis* 20 (6), 583-601
- Zebda, A.; Renaud, L.; Cretin, M.; Pichot, F.; Innocent, C.; Ferrigno, R.; Tingry, S. (2009 (a)). "A microfluidic glucose biofuel cell to generate micropower from enzymes at ambient temperature". *Electrochem. Commun.* 11, 592-595
- Zebda, A.; Renaud, L.; Cretin, M.; Pichot, F.; Innocent, C.; Ferrigno, R.; Tingry, S. (2009 (b)). "Electrochemical performance of a glucose/oxygen microfluidic biofuel cell". *J. Power Sources* 193, 602-606
- Zebda, A.; Renaud, L.; Cretin, M.; Innocent, C.; Ferrigno, R.; Tingry, S. (2010). "Membraneless microchannel glucose biofuel cell with improved electrical performances". *Sensors and Actuators B* 149, 44-50
- Zebda, A.; Gondran, C.; Le Goff, A.; Holzinger, M.; Cinquin, P.; Cosnier, S. (2011). "Mediatorless high-power glucose biofuel cells based on compressed carbon nanotube-enzyme electrodes". *Nat. Commun.* 2:370
- Zheng, B.; Roach, L.S.; Ismagilov, R.F. (2003). "Screening of protein crystallization conditions on a microfluidic chip using nanoliter-size droplets". *J. Am. Chem. Soc.* 125 (37), 11170-11171
- Zheng, B.; Tice, J.D.; Ismagilov, R.F. (2004). "Formation of droplets of alternating composition in microfluidic channels and applications to indexing of concentrations in droplet-based assays". *Anal. Chem.* 76 (17), 4977-4982
- Zheng, S.; Li, B.; Su, X.; Qin, J.; Lin, J. (2009). "Microvalve-actuated precise control of individual droplets in microfluidic devices". *Lab on a Chip* 9 (10), 1340-1343
- Zheng, W.; Li, Q.; Su, L.; Yan, Y.; Zhang, J.; Mao, L. (2006). "Direct electrochemistry of multi-copper oxidases at carbon nanotubes noncovalently functionalized with cellulose derivatives". *Electroanalysis* 18, 587-594
- Zhu, Z.; Momeu, C.; Zakhartsev, M.; Schwaneberg, U. (2006). "Making glucose oxidase fit for biofuel cell applications by directed protein evolution". *Biosensors and Bioelectronics* 21, 2046-2051

- Zhu, Z.; Wang, M.; Gautam, A.; Nator, J.; Momeu, C.; Prodanovic, R.; Schwaneberg, U. (2007). "Directed evolution of glucose oxidase from *Aspergillus niger* for ferrocène-methanol-mediated electron transfer" Biotechnol. J. 2, 241-248
- Zumarraga, M.; Bulter, T.; Shleev, S.; Polaina, J.; Martinez-Arias, A.; Plou, F.J.; Ballesteros, A.; Alcalde, M. (2007). "In vitro evolution of a fungal laccase in high concentrations of organic cosolvents" Chem. Biol. 14, 1052-1064

English Summary

Fuel cells are one of the most promising green technologies to produce punctually renewable electricity. Enzymatic biofuel cells, using enzymes as catalysts instead of inorganic ones, have emerged to develop cheaper miniature fuel cells working in friendly conditions, potentially physiological. However, this new technology is still not competitive with classical fuel cell technology because of small power and lifetime. Therefore, enzymatic biofuel cells are nowadays considered for specific applications as miniature and portable electricity sources (portable electronics or medical implants). Improving enzymatic biofuel cells performances (power and lifetime) is a major challenge. While the optimization of the catalytic or stability properties of the enzymes could intrinsically increase enzymatic biofuel cells performances, this strategy has been clearly less used than the techniques aiming to optimize the enzyme environment at the electrode surface. Few examples are present in the literature, using only rational or semi-rational design of the biocatalysts. While it could be very powerful, directed evolution of proteins has never been used for such applications.

The thermophilic bacterial laccase CotA from *Bacillus subtilis* has very interesting stability properties for biofuel cells applications. The work described here aims to use for the first time this enzyme as a cathodic biocatalyst for O₂ reduction into H₂O and to optimize its performances by directed evolution using droplet-based microfluidic as a high throughput screening technique.

CotA laccase has never been used before as a biofuel cells cathodic catalyst. Electrochemical tools allowing its evaluation for O₂ reduction have been developed to demonstrate the possibility of using this enzyme for such application. Different CotA-modified biocathodes have been developed using different electron transfer regimes. The immobilization of CotA and four less active mutants allowed to demonstrate a strong linear correlation between the enzymatic activity (k_{cat}/K_M) of each enzyme and the reduction current (i_{cat}) given by the corresponding electrode. Two Glucose/O₂ biofuel cells prototypes have been developed to study CotA in real conditions of operation. CotA has been associated to a glucose oxidase from *Aspergillus niger* to create a biofuel cell working in two compartments separated by a Nafion® membrane. At the same time, an original microfluidic Glucose/O₂ biofuel cell prototype has been developed using covalently bound enzymes on single-walled carbon nanotubes electrodes. This microfluidic biofuel cell takes advantage of laminar flows within microchannels and avoids the use of a separative membrane. Different electrochemical tools have been developed and are directly usable for the evaluation and the comparison of different mutant of CotA, optimized using directed evolution.

Droplet-based microfluidic allows the creation and the manipulation of aqueous droplets having highly homogeneous sizes. This rising technology offers a powerful microcompartmentalization tool to link genotype and phenotype during directed evolution experiments. The work described here contributes to the development of this technology and presents a droplet-based microfluidic high throughput screening platform for the directed evolution of CotA in microorganisms. Droplet-based microfluidic operations have been associated to allow the manipulation of aqueous droplets while maintaining the emulsion integrity. Thus, a model droplet-based microfluidic platform has been developed and allows, starting from *E. coli* cells expressing CotA, the detection and the high throughput sorting (60 mutants per second) of CotA enzymatic activity and the recuperation of the corresponding genetic information. This high throughput screening technique is directly usable for the screening of CotA variants libraries, and so under the conditions of the desired biofuel cell. Four CotA mutants libraries (10^6 - 10^7 clones each) have been constructed using error-prone PCR and will be screened soon.

KEY WORDS

Droplet-based microfluidic - Directed evolution - Glucose/O₂ enzymatic biofuel cell - CotA Laccase