Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé

Thèse de doctorat d'Université

Mention Biochimie

Alexandre Ciaccafava

L'hydrogénase [Ni-Fe] multi-tolérante d'*Aquifex aeolicus* : de l'immobilisation fonctionnelle à la biopile H_2/O_2

Date de soutenance : 18 décembre 2012

Devant la commission d'examen formée par :

M. Lo Gorton	Professeur	Examinateur
Mme Petra Hellwig	Professeur	Rapporteur
Mme Elisabeth Lojou	Chargée de Recherche	Directrice de Thèse
M. Nicolas Mano	Chargé de Recherche	Examinateur
M. James Sturgis	Professeur	Président du jury
M. Alain Walcarius	Directeur de Recherche	Rapporteur

Laboratoire de Bioénergétique et Ingénierie des Protéines

Centre National de la Recherche Scientifique Marseille

Remerciements

Après ces trois années passées au sein d'une équipe formidable, il est grand temps de remercier toutes les personnes qui m'ont énormément apporté. Sans elles, je n'aurais certainement pas le sentiment d'avoir progressé et tant appris.

Je tiens particulièrement à remercier les membres de mon jury de soutenance, Petra Hellwig, Alain Walcarius, Nicolas Mano et Lo gorton, d'avoir accepté du juger mon travail, ainsi que James Sturgis.

Je tiens à remercier Elisabeth, ma directrice de thèse. Grâce à elle, l'électrochimie, une science obscure pour le biochimiste en herbe que j'étais, est devenue tout à fait acceptable et même recommandable ! Elle a su aiguiser ma curiosité scientifique dans le domaine passionnant des hydrogénases et de leur électrochimie. Elle m'a également permis de rencontrer la communauté scientifique impliquée dans ce domaine lors de plusieurs congrès. J'espère qu'elle ne regrettera pas le cimetière remplis d'électrodes, sacrifiées sur l'autel de la quête de l'anode ultime, laissé après mon passage. Elle est parvenue à me mettre sur de solides rails, et j'espère ne pas la décevoir ! Je la remercie pour le soutien sans faille et la confiance qu'elle m'a accordée, mais aussi pour son incroyable et implacable efficacité. Mon assiduité à lui fournir un cahier de laboratoire dument rempli restera mon plus grand regret…

Je tiens également à remercier notre directrice de laboratoire, Marie-Thérèse Giudici-Orticoni, tant sur le plan scientifique qu'humain. Son soutien m'a en effet permis d'accomplir l'intégralité de ma thèse sans me soucier des contraintes extra-scientifiques. Tous les étudiants expérimentant un passage à vide à la paillasse seront remotivés après une discussion avec Marie-Thé, le pragmatisme Corse opérant naturellement !

Comment aurais-je pu épuiser, martyriser, et estropier tant de milligrammes d'hydrogénases sans Pascale, notre ingénieur de recherche ? Impossible ! Les colonnes de chromatographie n'ont aucun secret pour elle, venue à bout des enzymes les plus récalcitrantes à se faire extirper de leur périplasme natal. Je remercie Pascale, pour sa bonne gaieté et sa disponibilité ainsi que pour toutes les discussions scientifiques ou non que nous avons pu partager.

Je remercie Marianne Guiral pour sa disponibilité et sa patience à m'initier aux méandres complexes du métabolisme d'*Aquifex*, et m'excuse sincèrement pour les cafés un peu trop corsés qu'il m'est arrivé de lui servir.

Je remercie Marianne Ilbert, loquace, prolixe et volubile, (une fois n'est pas coutume, ces synonymes sont cumulables), pour sa gentillesse et sa bonne humeur.

Je pense aussi à Cindy présente au début de ma thèse avec qui je partage une passion commune, éphémère mais récurrente: l'inénarrable Chuck Norris, acteur de série B dépassé, impassible héro incompris aux sermons taillés aux couteaux. A distiller avec parcimonie Bradock.

Je remercie Laurence pour tout ces repas partagés à la cantine, le face à face fut souvent difficile, elle qui avait tant de mal à guider sa fourchette. Elle reste l'émettrice d'un chèque en bois de 9 millions d'euros à mon nom, conséquence d'un pari qu'elle perdu en public. Les poursuites judiciaires sont en cours, les témoins étant si nombreux dans notre équipe, je garde bon espoir de recouvrir mon du.

La biochimie, c'est un peu de la cuisine mais sans le guide Michelin, percept adopté au pied de la lettre par Clément, fin cuisinier à la paillasse comme à la maison dont les recettes de cakes et de gels d'acrylamide figureront encore longtemps dans mon top 10.

Le bureau de la salle d'électrochimie s'est parfois transformé en véritable dancefloor, qui n'aurait pas été enflammé sans la présence de Saïda, Rayban vissées sur le visage, lors d'intense séance de craquage partagé.

Que serait l'équipe sans la bonne humeur et le dynamisme de Mag, autoproclamée en comité restreint, étoile montante du laboratoire. Ce n'est pas sa lecture mais plutôt sa réinterprétation très personnelle de l'horoscope quotidien qui a su égayer nos pauses cafés mais plus important encore, nous en a fait oublier le gout, souvent discutable !

Je remercie Anne pour sa gentillesse, nouvelle privilégiée, autorisée à martyriser l'hydrogénase par grammes. Son « Ah », caractéristique d'un étonnement subit, restera longtemps énigmatique tant il est invariablement identique. Digne héritière du projet que je laisse derrière moi, je lui souhaite le meilleur pour la continuation de ses travaux.

Ce travail de thèse n'aurait pas été possible sans l'aide précieuse de nombreux collaborateurs. Je tiens à tous les remercier, je pense notamment à Sophie Lecomte,

Christophe Innocent, Sophie Tingry, Vincent Techer, Antoine Ronda, Roger Gadiou et Sylvie Robert qui m'ont accompagné, encadré, et aidé dans l'accomplissement de mes travaux.

Je remercie également chaleureusement Audrey Lartigue et Chantal Abergel, qui m'ont encadré lors de mes stages de master I et II, et qui m'ont initié, non sans mal, à la biochimie structurale.

Je remercie toute ma famille, et mes parents qui m'ont soutenu depuis le début et qui ont cru en moi. Ils ont tout mis en œuvre pour que je puisse arriver jusque là, et je leur en serais éternellement reconnaissant. Ils ont également supporté sans sourciller mes humeurs très flottantes durant la rédaction de ce manuscrit. J'espère qu'ils seront fiers de moi.

Je remercie enfin tous ceux que j'ai pu oublier, afin qu'ils ne m'en tiennent pas rigueur.

SOMMAIRE

Symboles et abréviations XI
Introduction générale 1
Introduction Bibliographique 5
Chapitre I : De l'hydrogénase à la biopile H_2/O_2 : état de l'art 5
1. BIODIVERSITÉ DES HYDROGÉNASES 5
1.1 Classification des hydrogénases 5
1.1.1 Généralités 5
1.1.2 Les hydrogénases [Fe] 8
1.1.3 Les hydrogénases [Fe-Fe] 9
1.1.3.1 Organismes 9
1.1.3.2 Rôle physiologique 9
1.1.3.3 Architecture 10
1.1.3.4 Le site actif 11
1.1.3.5 Les inhibiteurs du site actif 11
1.1.3.6 Connexions au site actif 12
1.1.3.7 Partenaires physiologiques 14
1.1.4 Les hydrogénases [Ni-Fe] 15
1.1.4.1 Organismes 15
1.1.4.2 Rôle physiologique 15
1.1.4.3 Architecture 16
1.1.4.4 Le site actif 17
1.1.4.5 Les inhibiteurs du site actif 18
1.1.4.6 Connexions au site actif 19
1.1.4.7 Partenaires physiologiques 22
1.2 Les hydrogénases [Ni-Fe] O_2 et CO-tolérantes 25
1.2.1 Hydrogénase bidirectionnelle NAD^+ réductrice 25
1.2.2 Hydrogénase senseur 26
1.2.3 Une inspiration pour la création d'hydrogénases tolérantes 26
1.2.4 Les hydrogénases membranaires du groupe I 27
1.2.4.1 Généralités 27

1.2.4.2 Un motif de fixation du centre [Fe-S] proximal différent 28
1.2.4.3 Un centre [Fe-S] proximal aux propriétés atypiques 28
1.2.4.4 Mécanisme proposé de tolérance à l'oxygène 29
1.3 Aquifex aeolicus, une bactérie extrêmophile 31
1.3.1 Une bactérie hyperthermophile 31
1.3.2 Une diversité des métabolismes 32
1.3.3 Le métabolisme de l'hydrogène 34
1.3.3.1 Hydrogénase I (Mbh1) 34
1.3.3.2 Hydrogénase II 35
1.3.3.3 Hydrogénase III 35
1.4 MbH1 : une hydrogénase super-tolérante 36
1.4.1 Propriétés structurales 36
1.4.2 Mécanisme d'oxydation catalytique de l'hydrogène 36
1.4.3 Une hydrogénase active à haute température 39
1.4.4 Une hydrogénase tolérante au CO 39
1.4.5 Une hydrogénase tolérante à l'oxygène 40
1.5 Conclusion 44
2. L'ÉLECTRODE, PARTENAIRE PHYSIOLOGIQUE DE L'ENZYME 45
2.1 Historique et objectifs généraux de l'immobilisation d'une enzyme sur une interface électrochimique 45
2.2 Procédures d'immobilisation 47
2.2.1 Adsorption 50
2.2.2 Couplage covalent 54
2.2.3 Cross-linking 56
2.2.4 Encapsulation 57
2.2.5 Affinité 58
2.3 Augmentation de la concentration en enzymes immobilisées 60
2.3.1 Propriétés des CNTs 60
2.3.2 Utilisation des CNTs pour l'immobilisation d'enzymes et de protéines 61
2.4 L'électrode comme mime d'un environnement protéique 61
2.5 Reconstitution d'une chaîne de transfert d'électron 67
2.5.1 En solution 67
2.5.2 Immobilisée sur une électrode 68
2.6 Optimisation du transfert d'électron interfacial 72

2.6.1 Les limitations du transfert d'électron interfacial 72
2.6.2 Transfert d'électrons direct vs Transfert d'électrons médié 75
2.6.3 L'orientation 79
2.6.3.1 SAMs 80
2.6.3.2 Quelques exemples d'orientation spécifique de protéines 81
2.6.3.3 Conséquences de l'orientation des protéines en biotechnologie 87
3. BIOPILES ENZYMATIQUES : UNE PRODUCTION D'ÉNERGIE PROPRE 89
3.1 Pile à combustible : Généralités 89
3.2 Piles à combustible : Principe 92
3.3 Les enzymes en tant que biocatalyseurs d'une biopile à combustible 94
3.4 Biopiles à combustible : Bioélectrodes 99
3.4.1 Biocathodes 100
3.4.1.1 Biocathodes basées sur une connexion directe de l'enzyme 101
3.4.1.2 Biocathodes basées sur une connexion médiée de l'enzyme 103
3.4.1.3 D'autres couples comburant / enzyme pour la biocathode 106
3.4.2 Bioanodes 107
3.4.3 Biopile 110
3.4.3.1 Biopile implantable 110
3.4.3.2 Biopile H_2/O_2 114
Objectifs de la thèse 117
Résultats et discussions 119
Chapitre II : Orientation fonctionnelle de l'hydrogénase [Ni-Fe] d'*Aquifex aeolicus* sur électrode ... 119
1. IMMOBILISATION FONCTIONNELLE DE L'HYDROGÉNASE [Ni-Fe] D'*AQUIFEX AEOLICUS* SUR ÉLECTRODE DE GRAPHITE PYROLYTIQUE 119
1.1 Discrimination de l'orientation : méthodologie 119
1.2 Une électrode de graphite pyrolytique omnipotente 119
1.2.1 Connexion directe de l'hydrogénase [Ni-Fe] d'Aquifex aeolicus 119
1.2.2 Influence de l'addition d'un médiateur redox 121
1.2.3 Quels processus de transfert d'électrons ? 123
1.2.4 Les caractéristiques physico-chimiques de l'électrode de graphite pyrolytique contrôlent l'orientation de l'hydrogénase [Ni-Fe] d'Aquifex aeolicus 127
1.2.5 Conclusion 129
2. COMMENT CONTRÔLER L'ORIENTATION DE L'HYDROGÉNASE [Ni-Fe] D'*AQUIFEX AEOLICUS*130
2.1 Contrôle de la surface de l'électrode : Les mono couches auto assemblées ou SAMs... 130
2.1.1 Contrôle de la structure de la SAM 130

2.1.2 Contrôle de la stabilité de la SAM 131
2.1.3 Comportement électrochimique du bleu de méthylène sur les SAMs 134
2.2 Exemples d'orientation d'hydrogénases 138
2.3 Immobilisation contrôlée de l'hydrogénase [Ni-Fe] d'Aquifex aeolicus sur SAMs 140
2.3.1 Modélisation de la structure de l'hydrogénase [Ni-Fe] d'Aquifex aeolicus 140
2.3.2 Caractérisation de l'hélice transmembranaire de l'hydrogénase [Ni-Fe] d'Aquifex aeolicus 143
2.3.3 Influence de la charge de surface 145
2.3.3.1 Oxydation de l'hydrogène sur SAMs chargées positives et négatives 145
2.3.3.2 Mise en relation avec les caractéristiques physico-chimiques de l'hydrogénase [Ni-Fe] 149
2.3.3.3 Mise en évidence du patch négatif dans les liquides ioniques 150
2.3.4 Influence de l'hydrophobicité de surface 152
2.3.4.1 Oxydation de l'hydrogène sur SAMs hydrophobes 152
2.3.4.2 Influence de la longueur de la SAM 155
2.3.4.3 Oxydation de l'hydrogène sur SAMs hydrophiles 157
2.4 Bilan de l'immobilisation de l'hydrogénase sur SAMs 158
3. PARTICULARITÉS DES PROTÉINES MEMBRANAIRES ET DU TRANSFERT D'ÉLECTRONS SUR SAMs HYDROPHOBES/ RÔLE DU DÉTERGENT 161
3.1 Généralités sur la solubilisation des protéines 161
3.2 Mise au point du protocole de quantification du détergent DDM 163
3.2.1 Solution calibrée de DDM 163
3.2.2 Quantification du DDM dans les échantillons d'hydrogénase d'Aquifex aeolicus .. 164
3.3 Localisation du détergent sur l'enzyme 166
3.4 Interaction DDM/SAM 167
3.5 Influence du DDM sur l'électrochimie du Bleu de méthylène sur SAM 169
3.6 Influence du DDM sur la catalyse de l'oxydation de l'hydrogène 170
3.7 Affinités relatives du DDM et de l'Hydrogénase MbH1 pour les SAMs hydrophobes 173
3.8 Conclusion 174
4. PEUT-ON LIER LA SPÉCIFICITE DU TRANSFERT D'ÉLECTRON À UNE ORIENTATION SPÉCIFIQUE ? 174
4.1 Visualisation de la couche d'enzyme sur SAMs 174
4.2 Mise en évidence d'une orientation spécifique 177
4.2.1 Structure secondaire de l'hydrogénase [Ni-Fe] d'Aquifex aeolicus 177
4.2.2 Influence du caractère physico-chimique de la SAM sur l'orientation 177

4.3 Conclusion 180
5. MODÈLE PROPOSÉ 180
Résultats et discussions 184
Chapitre III : Vers une Biopile H_2/O_2 184
1. INTRODUCTION GÉNÉRALE 184
2. STABILITÉ DE L'HYDROGÉNASE : INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN DÉTERGENT 186
2.1 Isotherme d'adsorption de l'hydrogénase d'*Aquifex aeolicus* sur électrode de graphite pyrolytique 186
2.2 Restauration de l'activité catalytique par l'addition de DDM exogène 187
2.3 Conclusion 190
3. RECHERCHE DE MATRICES POUVANT AUGMENTER LES DENSITÉS DE COURANT CATALYTIQUE 190
3.1 Immobilisation sur des réseaux de nanotubes de carbone 191
3.1.1 Généralités sur l'immobilisation des hydrogénases sur nanotubes de carbone 191
3.1.2 Immobilisation de l'hydrogénase d'Aquifex aeolicus sur nanotubes de carbone .. 192
3.2 Intérêt de l'utilisation de polymère redox pour l'hydrogénase d'*Aquifex aeolicus* 194
3.3.1 Electropolymérisation du Toluidine Blue O : TBO 195
3.3.2 Encapsulation de l'hydrogénase d'Aquifex aeolicus dans le polymère de TBO 196
3.3.3 Adsorption de l'hydrogénase d'Aquifex aeolicus sur le polymère de TBO 198
3.3.3.1 Influence de l'épaisseur du polymère de TBO 198
3.3.3.2 Adsorption de l'hydrogénase d'Aquifex aeolicus sur une matrice mixte polymère TBO/ nanotube de carbone 200
4. STABILITÉ DU SIGNAL ÉLECTROCATALYTIQUE 201
4.1 Une simple perte de film ? 202
4.2 … Rôles des phénothiazines 203
4.3 Influence des processus de transfert électronique sur la stabilité 204
5. SÉLECTION DES ÉLÉMENTS CONSTITUTIFS DE LA BIOPILE H_2/O_2 207
5.1 Stabilisation du signal électrocatalytique sur les films de nanotubes de carbone 207
5.2 Premier prototype de biopile H_2/O_2 211
5.2.1 Bioanode sélectionnée 211
5.2.2 Biocathode sélectionnée 212
5.2.3 Architecture de la biopile H_2/O_2 216
5.3 Analyse du mode de fonctionnement de la biopile 217
5.3.1 Transposition des bioélectrodes vers la biopile (Collaboration avec les Dr C. Innocent et S. Tingry, IEM, Montpellier) 217

5.3.2 Mise en évidence d'un phénomène limitant 218
5.3.3 La bioanode limite les performances 221
5.3.4 Définition des domaines de fonctionnement 224
5.4 Une Biopile H_2/O_2 fonctionnant à haute température 225
5.4.1 Performances du système optimisé 225
5.4.2 Influence de la température 227
5.4.3 Stabilité 229
5.5 Conclusion 230
Conclusion générale 231
Matériel et méthodes 239
1. CULTURE BACTÉRIENNE 239
2. BIOCHIMIE 239
2.1 Purification de l'hydrogénase 239
2.2 Dosage protéique 240
2.3 Electrophorèse sur gel d'acrylamide 240
2.3.1 Condition dénaturante 240
2.3.2 Condition native 241
2.3.3 Révélation des gels 241
2.4 Test d'activité hydrogénase 241
2.4.1 En cuve 241
2.4.2 Sur gel en condition native 241
2.4.3 Par électrochimie 242
2.5 Spectrométrie de masse (Trappes à ions) 242
2.6 Quantification du détergent DDM 242
2.7 Adsorption du détergent par le traitement Bio-Beads 243
3. ÉLECTROCHIMIE 243
3.1 Appareillage 243
3.2 Electrodes 243
3.2.1 Préparation des électrodes de graphite pyrolytique(PG) 243
3.2.2 Modification des électrodes de PG 244
3.2.2.1 Adsorption du TBO 244
3.2.2.2 Electropolymérisation du TBO 244
3.2.2.3 Adsorption de DDM 244
3.2.2.4 SWCNT-COOH 244

3.2.2.5 Couplage covalent de l'enzyme sur l'électrode modifiée par les SWCNT-COOH 245

3.2.3 Caractérisation des électrodes de PG (Collaboration avec Roger Gadiou IS2M, Mulhouse) 245

3.2.3.1 Microscopie confocale, AFM et électronique à balayage 245

3.2.3.2 Mesure d'angle de contact 245

3.2.3.3 Désorption programmée en température couplée à la spectrométrie de masse (TPD-MS) 245

3.2.4 Préparations des électrodes d'or 246

3.2.4.1 Modification des électrodes par les monocouches auto assemblées : SAMs 246

3.3 Cellule électrochimique de la biopile 247

3.4 Méthodes de calcul des constantes de vitesse catalytiques et de l'épaisseur du film de polymère pTBO 247

3.4.1 Calcul de la vitesse du second ordre entre l'hydrogénase et le médiateur redox (M) 247

3.4.2 Calcul de la constante catalytique de l'oxydation directe de l'hydrogène 248

3.4.3 Calcul de l'épaisseur du film polymère pTBO 249

4. SPECTROSCOPIE INFRA-ROUGE (Collaboration avec Sophie Lecomte CBMN, Bordeaux) 249

4.1 PM-IRRAS 249

4.2 ATR FT-IR 250

5. MESURE AFM SUR LES MONOCOUCHES AUTO ASSEMBLÉES (Collaboration avec Antoine Ronda IM2NP, Marseille) 250

6. BIOINFORMATIQUE 250

Références 251

ANNEXES 267

Symboles et abréviations

[Fe] : site actif fer

[Fe-Fe]: site actif fer fer

[Ni-Fe] : site actif nickel fer

[xFe-xS] cluster x atomes de Fer, x atoms de Soufre

AFM :Atomic Force Microscopy

ATP : Adenosine Triphosphate

ATR-FTIR : Attenuated Total Reflectance- Fourrier Transformed InfraRed

BM : Bleu de Méthylène

BOD : Bilirubine oxydase

CCM : Chromatographie en Couche Mince

Cco : Cytochrome *c* oxydase

Ccp: Cytochrome *c* peroxydase

CMC : Concentration Micellaire Critique

CNT : Carbon nanotube

Ct : Catalase

CV : Voltamétrie cyclique

Cyst : Cyteamine

DDM : Dodecyl-β-D-maltoside

f.e.m. : Force électromotrice

FAD : Flavine adénine dinucléotide

FTIR : Fourrier Transformed InfraRed

Hepes: acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique

HRP : la Horseradish Peroxidase

Mb : myoglobine

MbH1 : Hydrogénase [Ni-Fe] membranaire d'*Aquifex aeolicus*

Mev : méthylviologène

MPA : Mercapto-Propionic Acid

MWCNT : Multi walled carbon nanotube

NADH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide

NiR : Cytochrome cd_1 nitrite réductase

NoR : Oxyde nitrique réductase

NR: Neutral Red

PAC : Pile à Combustible

Paz : Pseudo Azurine

PEGDGE : Poly(éthylène glycol) diglycidyl ether

PG : Graphite pyrolytique

PM-IRRAS : Polarization Modulated-InfraRed Reflection Absorption Spectroscopy

RPE : Résonance paramagnétique Electronique

SAM : Self-Assembled-Monolayer

SEIRAS : Surface-Enhanced InfraRed reflection Absorption Spectroscopy

STM : Scanning transmission Microscopy

SWCNT : Single walled carbon nanotube

TBO : Toluidine Blue O

TED : Transfert d'Electrons Direct

TEM : Transfert d'Electrons Médié

Introduction générale

Introduction générale

La découverte dans la biodiversité d'enzymes redox présentant des propriétés exceptionnelles de résistance à des inhibiteurs classiques des biomolécules ouvre la voie, non seulement à la compréhension fondamentale de l'adaptation des microorganismes au cours de l'évolution, mais aussi au développement de procédés biotechnologiques originaux. C'est le cas de la bactérie *Aquifex aeolicus*, la plus ancienne des bactéries et la plus hyperthermophile connue à ce jour. Les recherches biochimiques sur cette bactérie ont permis d'identifier une hydrogénase membranaire aux propriétés remarquables. Les hydrogénases catalysent la réaction de transformation de l'hydrogène en protons dans de nombreux microorganismes, avec de très fortes efficacités catalytiques. La synergie entre de nombreuses méthodes physico-chimiques a révélé récemment que l'hydrogénase extraite de la bactérie *Aquifex aeolicus* possède la propriété d'oxyder l'hydrogène sur une large gamme de température, et surtout est tolérante à l'oxygène et au monoxyde de carbone, deux propriétés uniques parmi les hydrogénases. Par ailleurs, l'hydrogène, substrat des hydrogénases, apparaît comme un vecteur d'énergie de substitution aux énergies fossiles. Son utilisation à large échelle, en particulier pour la génération d'électricité au sein de piles à combustible, nécessite cependant le recours à des catalyseurs chimiques, souvent basés sur des métaux nobles, et donc onéreux, qui en limite le développement à large échelle. Ainsi l'hydrogénase tolérante à l'oxygène, apparaît comme un biocatalyseur de choix pour fonctionner à l'anode de procédés type biopile à combustible.

Une particularité commune à la plupart des enzymes redox réside cependant dans un site actif enfoui au sein de la structure protéique. Cet isolement protège le centre actif de l'environnement extérieur, mais limite dans de nombreux cas le transfert d'électrons direct entre l'enzyme et l'interface électrochimique, rendant nécessaire l'utilisation de médiateurs redox. Dans le cas des hydrogénases à [Ni-Fe], classe à laquelle appartient l'hydrogénase membranaire d'*Aquifex aeolicus*, le site actif où a lieu le clivage hétérolytique de l'hydrogène est enfoui dans la grande sous unité. Les électrons générés lors de l'oxydation de l'hydrogène, sont transférés vers la surface de la protéine *via* les trois centres [Fe-S] de la petite sous unité, créant un véritable fil conducteur. L'aptitude d'une enzyme à échanger des électrons directement avec l'interface électrochimique peut ainsi être prédite en considérant le transfert

d'électrons *in vivo*. Si l'on considère que l'électrode doit mimer le partenaire redox qui se lie à l'enzyme pour optimiser le transfert d'électrons, l'orientation de l'enzyme sur l'interface électrochimique prend un sens physiologique. La connaissance de l'environnement du centre [Fe-S], dernier relais électronique, apparaît donc essentielle pour élaborer des interfaces électrochimiques propres à un contrôle de l'orientation de l'hydrogénase, garant d'un transfert d'électrons direct entre l'enzyme et l'électrode. Mais si l'orientation de protéines de petites tailles est aujourd'hui assez bien maîtrisée (c'est en particulier vrai pour les petites protéines hémiques), la notion d'orientation des enzymes n'est encore que très peu exploitée.

L'utilisation de l'hydrogénase dans des procédés biotechnologiques impose de plus une réflexion sur la conception des matériaux d'électrodes propres à lui conférer stabilité et efficacité catalytique maximales. L'immobilisation de l'enzyme doit ainsi répondre au triple objectif : i) assurer un transfert d'électrons efficace entre l'enzyme et l'électrode, ii) atteindre de fortes concentrations surfaciques, voire volumiques, d'enzymes électriquement connectées, iii) prévenir dégradation et désorption de l'enzyme immobilisée. Ce dernier aspect plus appliqué a des retombées au niveau plus fondamental. Les connaissances acquises doivent permettre d'avancer dans la compréhension du fonctionnement d'une enzyme en milieu contraint, en particulier membranaire. Ces études s'inscrivent parfaitement dans les objectifs de l'équipe « Métabolisme Energétique des Bactéries Extrémophiles » au sein de laquelle j'ai effectué mon doctorat.

Mon objectif au cours de ce travail de doctorat a été de contribuer à l'étude de l'immobilisation fonctionnelle de l'hydrogénase d'*Aquifex aeolicus*. En effet, si de nombreuses études au cours de la dernière décennie ont concerné le mécanisme catalytique d'oxydation de l'hydrogène par les hydrogénases solubles, et les phénomènes associés d'inhibition en particulier par l'oxygène, très peu de travaux ont concerné la compréhension des paramètres qui contrôlent l'immobilisation de ces enzymes sur des interfaces électrochimiques. Un point fondamental a été de mettre en évidence une orientation contrôlée de l'hydrogénase d'*Aquifex aeolicus*, qui permette de favoriser un transfert direct d'électrons à l'interface. Une des questions que j'ai abordée de façon originale, est la conséquence du caractère membranaire de l'enzyme sur le transfert d'électrons interfacial. Cette problématique inclut la prise de conscience de la présence de détergent autour de l'enzyme, fait très souvent ignoré dans les quelques travaux qui traitent de l'électrochimie des protéines membranaires.

Le premier chapitre de ce manuscrit, consacré à l'état de l'art, se décline en trois sections, permettant de relier une approche moléculaire à l'applicatif.

La première section fait le bilan des connaissances actuelles sur les hydrogénases. La relation entre la structure des différentes classes d'enzyme et leur fonction dans la transformation de l'hydrogène sera explicitée. L'accent sera mis sur le cas particulier des hydrogénases multi-tolérantes dont fait partie l'hydrogénase membranaire d'*Aquifex aeolicus*, en intégrant les données toutes récentes concernant les bases moléculaires qui expliquent ces tolérances. Enfin, les données biochimiques et physico-chimiques dont on dispose sur la bactérie *Aquifex aeolicus*, son métabolisme et l'hydrogénase qui en est extraite seront analysées.

Dans une seconde partie, les études bioélectrochimiques réalisées avec l'idée maîtresse que l'interface électrochimique puisse mimer un partenaire physiologique sont décrites. Les techniques d'immobilisation des enzymes sur électrodes, seront abordées au cours de cet exposé bibliographique. Je montrerai ensuite comment il est possible de reconstituer une chaîne de transfert d'électrons physiologique à l'électrode. Enfin la problématique de l'incidence de l'orientation d'une enzyme sur une interface électrochimique sera discutée, en s'appuyant sur les exemples pertinents de la littérature.

La troisième partie de cet examen bibliographique sera consacrée à l'état de l'art sur les biopiles. Après avoir posé la question de l'hydrogène comme vecteur énergétique du futur, en particulier comme fluide alimentant les piles à combustible, je ferai une analogie entre les chaînes de transferts d'électrons physiologiques génératrices d'ATP, énergie du microorganisme, et les procédés type biopiles enzymatiques. Quelques exemples récents qui utilisent l'oxygène comme oxydant et le glucose comme carburant, et qui permettent d'illustrer les avancées dans ce domaine, seront plus particulièrement décrits. Je finirai cet exposé bibliographique en décrivant les travaux préliminaires qui concernent le développement original d'une biopile H_2/O_2, basée sur l'hydrogénase comme biocatalyseur à l'anode.

Dans un second chapitre, j'exposerai les résultats que j'ai obtenus concernant le contrôle de l'orientation de l'hydrogénase d'*Aquifex aeolicus* sur interface électrochimique. Des électrodes de graphite, mais surtout des électrodes d'or modifiées par des monocouches de thiol seront utilisées à cette fin. J'analyserai le processus de transfert d'électrons direct ou médié par différents médiateurs redox en fonction de la nature de l'interface électrochimique.

Je montrerai comment par une approche couplée électrochimie/microscopie à force atomique/spectroscopie PM-IRRAS, il peut être démontré une orientation spécifique de l'hydrogénase en fonction de l'hydrophobicité de l'électrode, orientation qui contrôle le processus de transfert d'électrons pour l'oxydation de l'hydrogène. J'insisterai sur la nécessaire connaissance des propriétés structurales de l'enzyme, mais aussi du comportement du détergent, pour permettre une vue globale des paramètres qui contrôlent l'immobilisation de l'hydrogénase membranaire.

Le dernier chapitre sera consacré au développement d'un prototype de biopile H_2/O_2 utilisant l'hydrogénase d'*Aquifex aeolicus*. En préalable, les paramètres qui permettent l'augmentation de la stabilité de l'enzyme et du film protéique, ainsi que l'obtention de fortes densités de courant seront exposés. Après avoir décrit la configuration de la biopile que j'ai mise au point, j'analyserai le fonctionnement de ce bioprocédé en fonction des paramètres de piles. Les performances de la biopile H_2/O_2 seront finalement discutées. Son optimisation en fonction des données physico-chimiques accumulées sur l'hydrogénase multi-tolérante d'*Aquifex aeolicus* m'ont permis de mettre au point la biopile H_2/O_2 la plus performante connue à ce jour.

Introduction Bibliographique

Chapitre I : De l'hydrogénase à la biopile H_2/O_2 : état de l'art

Introduction Bibliographique

Chapitre I : De l'hydrogénase à la biopile H_2/O_2 : état de l'art

Les hydrogénases, enzymes clé de la conversion de l'hydrogène chez de nombreux microorganismes, font l'objet de nombreux travaux de recherche, notamment depuis une vingtaine d'années. Même si le nombre de laboratoires impliqués reste encore restreint, l'engouement pour le bioH_2 énergétique a considérablement incité des recherches allant du fondamental (criblage, ingénierie moléculaire, mécanismes catalytiques…) à l'appliqué (production biologique d'hydrogène, oxydation de l'H_2…). Au cours de ce chapitre, après avoir rappelé les caractéristiques des hydrogénases, je proposerai un examen détaillé des hydrogénases tolérantes à divers inhibiteurs, en mettant l'accent sur l'hydrogénase extraite de la bactérie hyperthermophile *Aquifex aeolicu*s. Ses propriétés intrinsèques en font un excellent candidat comme catalyseur dans des procédés biotechnologiques, procédés qui supposent l'immobilisation de l'enzyme sur support conducteur. Dans une deuxième partie, je montrerai comment, grâce à des modifications adéquates des interfaces électrochimiques, il est possible de mimer, voire reconstituer des chaînes biologiques de transfert d'électrons, et donc d'augmenter les cinétiques de transfert d'électrons interfacial. Les bases de l'immobilisation fonctionnelle des enzymes étant posées, je décrirai l'état de l'art dans le domaine des biopiles, et plus particulièrement dans celui impliquant l'hydrogène comme carburant.

1. BIODIVERSITÉ DES HYDROGÉNASES

1.1 Classification des hydrogénases

1.1.1 Généralités

C'est à la fin du XVIII^{ème} siècle que Felix Hoppe-Seyler, biochimiste, découvre que certains microorganismes sont capables de produire de l'hydrogène et du dioxyde de carbone à partir de la décomposition de l'acide formique (Hoppe-Seyler, 1887).

$$HCOOH \rightarrow H_2 + CO_2$$

Un peu plus tard, en 1931, Stephenson et Stickland mènent des travaux sur plusieurs bactéries capables de réduire l'oxygène moléculaire, le fumarate, le nitrate ainsi que le bleu de méthylène en présence de dihydrogène (Stephenson et al., 1931). Ils proposent alors pour la première fois le nom d'hydrogénases pour les enzymes responsables de l'oxydation réversible de l'hydrogène en protons selon la réaction :

$$H_2 \leftrightarrow 2H^+ + 2e^-$$

Contrairement aux catalyseurs chimiques, où l'oxydation de l'hydrogène se fait par coupure homolytique, la réaction enzymatique basée sur l'hydrogénase implique un clivage hétérolytique de l'hydrogène.

Depuis, de nombreux microorganismes utilisant l'hydrogène comme source d'énergie ont été identifiés. La plupart sont des procaryotes appartenant aux domaines des Bactéries et des Archées. Des organismes aussi variés que des organismes fermenteurs, photosynthétiques, aérobies, anaérobies, autotrophes, hétérotrophes sont concernés (Vignais et al., 2007).

La première classification des hydrogénases se basait sur l'identification d'accepteurs et de donneurs spécifiques d'électrons : NAD, cytochromes, coenzymes F420 ou ferrédoxines. Actuellement, grâce à l'augmentation du nombre de séquences disponibles, les hydrogénases sont classées par analyse phylogénétique, en se basant sur l'alignement de séquence des sous unités catalytiques. Il en résulte trois classes phylogénétiquement distinctes, qui diffèrent par la composition en métal du site actif (Figure 1) (Vignais et al., 2007),(Kim et al., 2011) :

- La première famille est celle des hydrogénases à fer, aussi appelées hydrogénases sans centre [Fe-S] ou encore Hmd pour « H_2-forming methylenetetrahydromethanopterin dehydrogenase ». Cette famille d'hydrogénase est présente chez quelques archées méthanogènes et a la particularité de ne disposer que d'un seul atome de fer porté par un cofacteur organique.
- La seconde famille est constituée des hydrogénases dont le site actif contient deux atomes de fer. Ce dernier est lié par une cystéine à un centre [4Fe-4S]. Elles sont présentes chez les micro-organismes procaryotes anaérobies et sont également les seules à avoir été mises en évidence chez les eucaryotes.
- Enfin, la troisième famille des hydrogénases, majoritaire, comporte un site héterobimétallique alliant un atome de nickel à un atome de fer. C'est la classe

d'hydrogénase la plus étudiée et aussi la plus répandue car présente chez les protéobactéries, cyanobactéries et archées méthanogènes.

Cette dernière classe d'hydrogénase peut être subdivisée selon des critères structuraux, de séquences en acides aminées et de fonctions physiologiques.

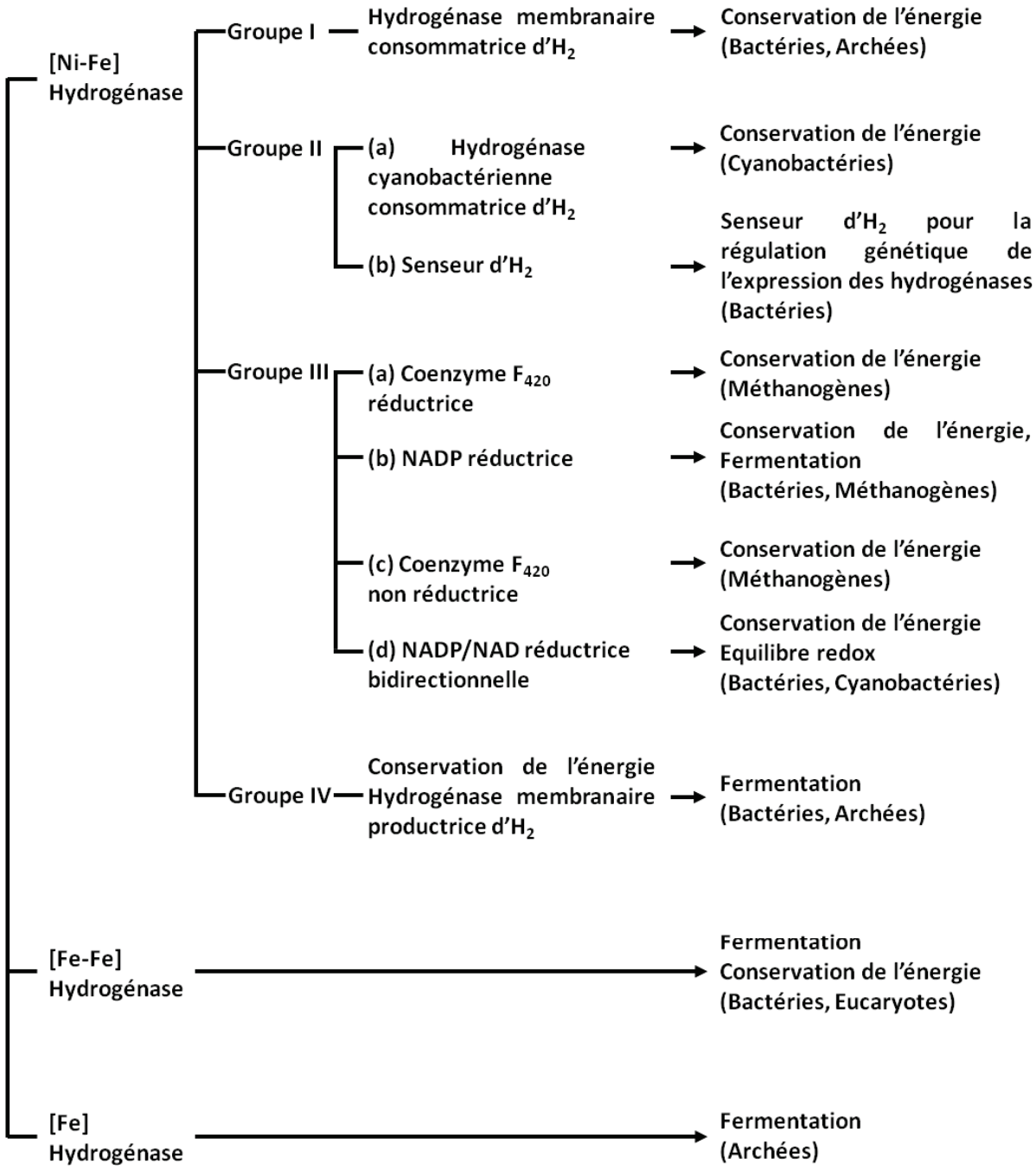


Figure 1: Classification des hydrogénases (reproduit de (Kim et al., 2011))

1.1.2 Les hydrogénases [Fe]

La première hydrogénase à fer sans centre [Fe-S] a été découverte chez *Methanothermobacter marburgensis*. Une douzaine d'hydrogénase de ce type ont ensuite été mises en évidence chez d'autres archées méthanogènes utilisant le dioxyde de carbone et l'hydrogène comme source d'énergie. Cette protéine s'assemble en homo-dimère (Figure 2), chaque sous unité de 38kDa portant un atome de fer.

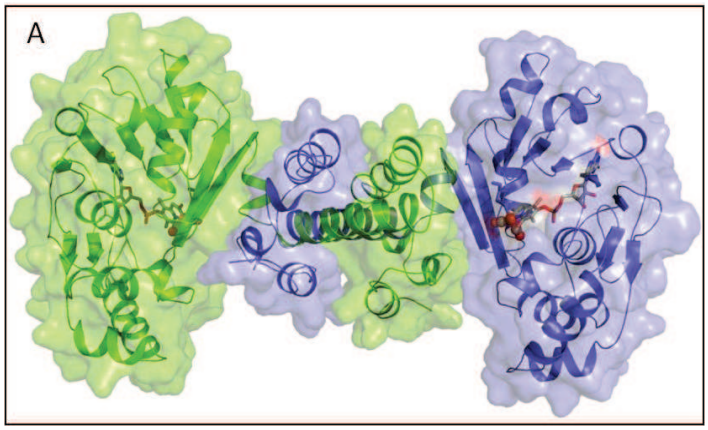


Figure 2: Représentation de l'homo-dimère de l'hydrogénase de *Methanocaldococcus jannaschii.* Chaque monomère est représenté d'une couleur différente (vert ou bleu). Le site actif est représenté en sphère et le cofacteur 5'-O-[(S)-hydroxy[2-hydroxy-3,5-dimethyl-6-(2-oxoethyl)pyridin-4-yl]oxyphosphoryl]guanosine en bâtonnet. (Pdb ID: 3F47)

Cet atome de fer, qui a la particularité de ne pas changer d'état redox lors de la catalyse (Lyon et al., 2004), est coordiné par un ligand protéique *via* l'atome de soufre d'une cystéine, deux ligands non protéiques CO, une molécule de solvant, et un groupement prosthétique de type pyridinol (Figure 3) (Hiromoto et al., 2009).

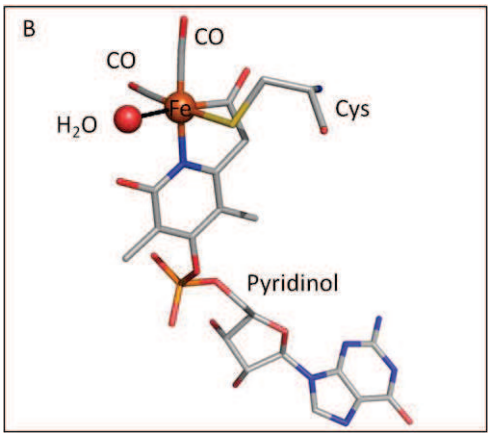


Figure 3: Représentation du site actif de l'hydrogénase de *Methanocaldococcus jannaschii.* (Pdb ID: 3F47)

Les atomes de fer sont représentés en sphères. Les bâtonnets représentent les atomes de carbone en gris, les atomes de soufre en orange, les atomes d'oxygène en rouge et les atomes d'azote en bleu.

Ces enzymes catalysent réversiblement la réaction de réduction du *N*5,*N*10-méthènyltétrahydrométhanopterine (méthènyl-H4MPT) en *N*5,*N*10-méthylènetétrahydrométhanopterine (méthylène-H4MPT) en présence d'hydrogène selon la réaction suivante (Figure 4)(Wright et al., 2010) :

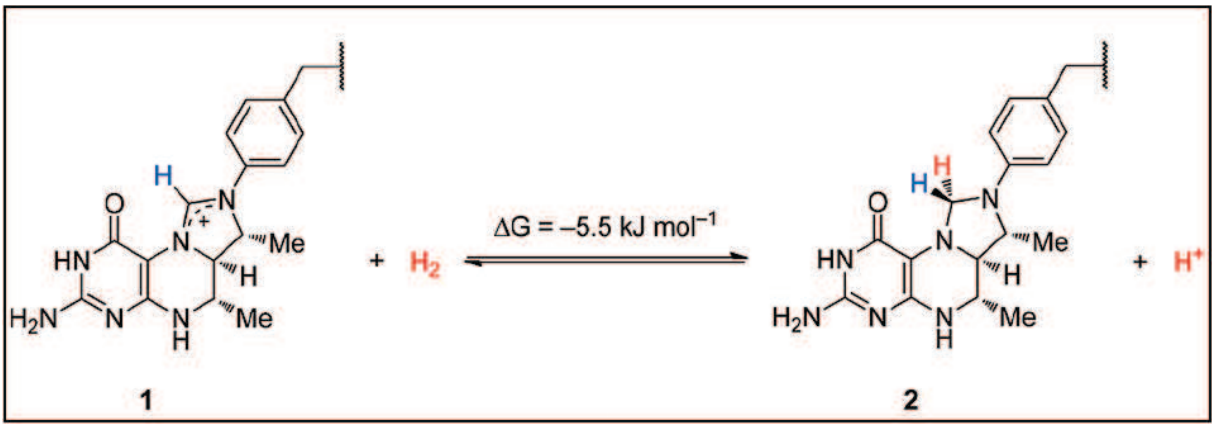


Figure 4: Transfert stéréospécifique d'hydrure au méthènyl-H4MPT catalysé par l'hydrogénase à fer (reproduit de (Wright et al., 2010)).

Cette réaction, qui intervient lors d'une étape intermédiaire dans la réduction du CO_2 en méthane par l'hydrogène, correspond à un transfert d'hydrure au substrat et à la libération d'un proton en solution. Les hydrogénases sans centre [Fe-S] sont incapables de catalyser la réduction réversible du methylviologène par l'H_2 ou les échanges isotopiques D^+/H^+, en absence de leur substrat, le méthènyl-H4MPT$^+$.

1.1.3 Les hydrogénases [Fe-Fe]

1.1.3.1 Organismes

Les hydrogénases à centre catalytique bimétallique [Fe-Fe] sont présentes chez les procaryotes anaérobies tels que les bactéries sulfato-réductrices ainsi que les clostridies, mais également chez certaines microalgues. Certaines de ces hydrogénases ont été identifiées chez les eucaryotes localisées spécifiquement dans un organelle appelé hydrogénosome.

1.1.3.2 Rôle physiologique

Les hydrogénases [Fe-Fe] sont habituellement impliquées dans la production d'hydrogène. Cependant il a été montré que l'hydrogénase périplasmique de *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough consomme l'hydrogène et est impliquée dans le métabolisme énergétique de la bactérie *via* la réduction du « pool » de cytochromes multihémiques de bas potentiel d'oxydoréduction. L'expression du gène codant pour cette hydrogénase [Fe-Fe] est plus importante en condition oxydante. De plus, les souches délétantes de cette hydrogénase, exposées à des conditions oxydantes, montrent une viabilité moindre. Il a donc été proposé que cette hydrogénase [Fe-Fe] pourrait également avoir un rôle dans la protection contre le stress oxydant par sa participation à la diminution du potentiel d'oxydoréduction du milieu (Fournier et al., 2004).

1.1.3.3 Architecture

Ces enzymes sont organisées en domaines modulaires. La sous unité catalytique conservée de 350 résidus acides aminés, contient le centre catalytique appelé cluster H. Elle est parfaitement représentée par la plus petite hydrogénase [Fe-Fe] productrice d'hydrogène connue à ce jour mise en évidence chez *Chlamydomonas reinhardtii*, une algue verte (Figure 5 A) (Stripp et al., 2009, Mulder et al., 2010). Elle est souvent accompagnée par des domaines accessoires comprenant des centres [Fe-S] permettant un relais électronique intra et intermoléculaire (Figure 5 B) (Fontecilla-Camps et al., 2007). Dans le cas d'une organisation dimérique, la deuxième sous-unité ne comporte aucun centre d'oxydoréduction et un rôle de régulation de l'activité a été proposé.

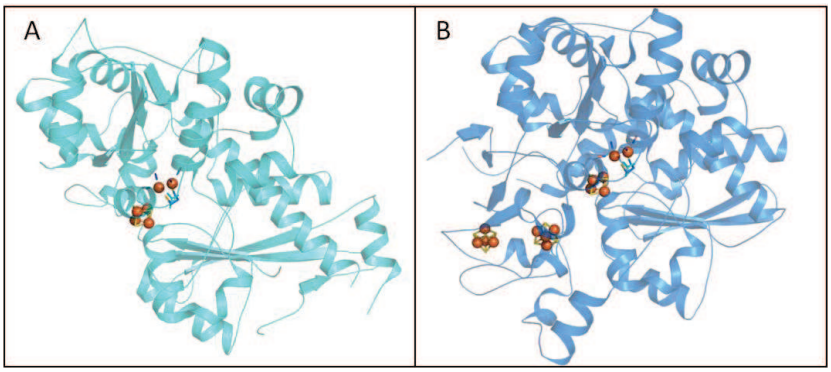


Figure 5: (A) Représentation de l'hydrogénase [Fe-Fe] de *Chlamydomonas reinhardtii* et du centre actif cluster H. (Pdb ID: 3LX4). (B) Représentation de l'hydrogénase [Fe-Fe] de *Desulfovibrio desulfuricans* et du centre actif cluster H ainsi que d'un domaine accessoire portant deux centres [Fe-S] supplémentaires. (Pdb ID: 1HFE). Les deux hydrogénases sont représentées dans la même orientation. Les atomes de fer sont représentés en sphères au sein des centres [Fe-S] et du site actif.

1.1.3.4 *Le site actif*

Le cluster H comprend le centre bimétallique [Fe-Fe] relié à un centre [4Fe-4S] par une cystéine pontante. Les deux atomes de fer sont pontés par un ligand CO tandis que chacun des deux atomes de fer sont reliés à deux ligands non protéiques CO et CN. Un ligand dithiolate ponte les deux atomes de fer. Cette petite molécule organique fut initialement modélisée en tant que 1, 3-propanedithiolate. Cependant des études mécanistiques (Nicolet et al., 2001) et plus récemment une étude RPE (Silakov et al., 2009) suggèrent qu'il s'agirait plutôt d'un groupement di(thiométhyl)amine (Figure 6).

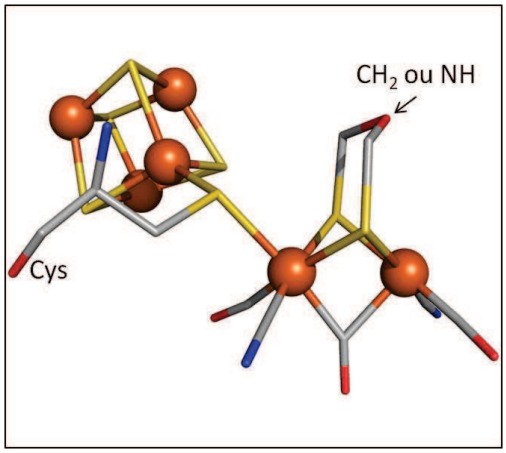


Figure 4: Représentation du centre actif cluster H de l'hydrogénase [Fe-Fe] de *Desulfovibrio desulfuricans.* (Pdb ID: 1HFE). Les atomes de fer sont représentés en sphères. Les bâtonnets représentent les atomes de carbone en gris, les atomes de soufre en orange, les atomes d'oxygène en rouge et les atomes d'azote en bleu.

1.1.3.5 *Les inhibiteurs du site actif*

Le site actif des hydrogénases présente plusieurs états, dépendant à la fois du potentiel et des petites molécules pouvant s'y lier (Figure 7) (Vincent et al., 2007). Les hydrogénases [Fe-Fe] sont extrêmement sensibles à l'oxygène. Leur forme inactive est appelée H_{ox}^{inact} qui constitue l'unique forme insensible à l'oxygène et au CO. Elle est activée par l'application d'un potentiel réducteur en forme active appelée H_{ox}. Cette forme active devient alors sensible à l'oxygène, qui l'inactive irréversiblement. La forme H_{ox} peut être également inactivée par oxydation anaérobie en H_{ox}^{inact}. Une autre forme inactive appelée H_{ox}-CO est induite en présence de CO. Cette dernière peut être réactivée par photolyse du CO en présence d'hydrogène à la lumière. En revanche, en absence d'hydrogène la forme H_{ox}-CO est stable.

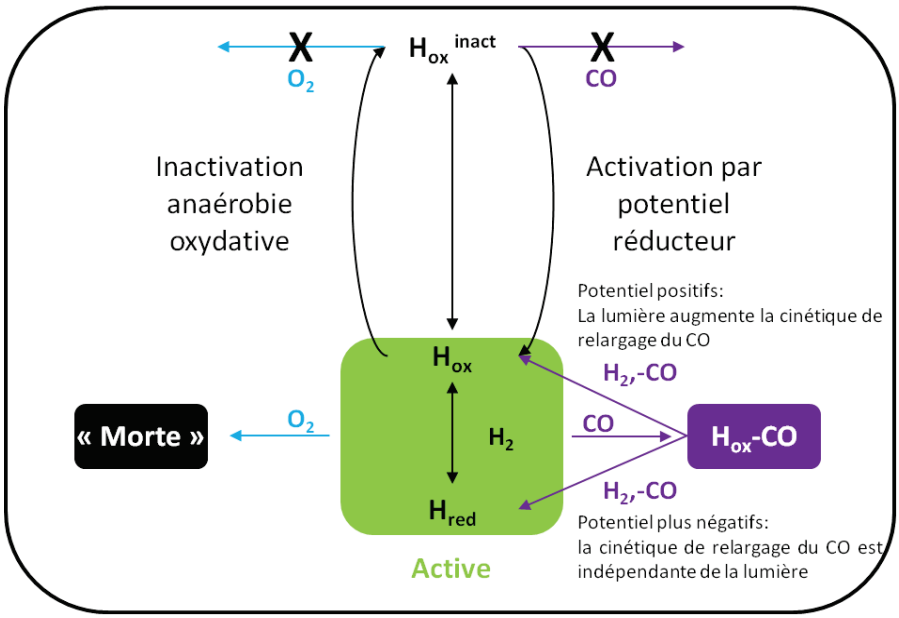


Figure7: Les différents états actifs et inactifs des hydrogénases [Fe-Fe] (adapté de (Vincent et al., 2007))

1.1.3.6 Connexions au site actif

Un unique canal hydrophobe conduisant l'hydrogène depuis la surface de la protéine jusqu'au site actif a tout d'abord été modélisé chez les hydrogénases de *Desulfovibrio desulfuricans* et de *Clostridium pasteuranium* (Nicolet et al., 2002). L'étude de la fixation de gaz, tel que le xénon, au sein des cristaux d'hydrogénases a révélé un site occupé par le gaz dans le canal hydrophobe, précédemment modélisé (Fontecilla-Camps et al., 2007). Plus tard, une étude par dynamique moléculaire menée sur l'hydrogénase de *Clostridium pasteuranium* a mis en évidence la présence de deux chemins d'accès au site actif pouvant servir à la diffusion de l'hydrogène et également de l'oxygène. Ces deux voies ne pouvaient pas être découvertes par les expériences de diffusion de gaz dans des cristaux d'hydrogénase, par définition statique, car elles se forment de manière transitoire selon l'équilibre dynamique naturel de la protéine (Cohen et al., 2005). Ces deux voies A et B (Figure 8) sont disponibles entre 5 et 8 % du temps pour l'oxygène et entre 30 et 35 % du temps pour l'hydrogène (% de temps par rapport à la durée totale de la simulation). La cavité centrale commune est quant à elle ouverte 2% du temps pour l'oxygène contre 20% du temps pour l'hydrogène.

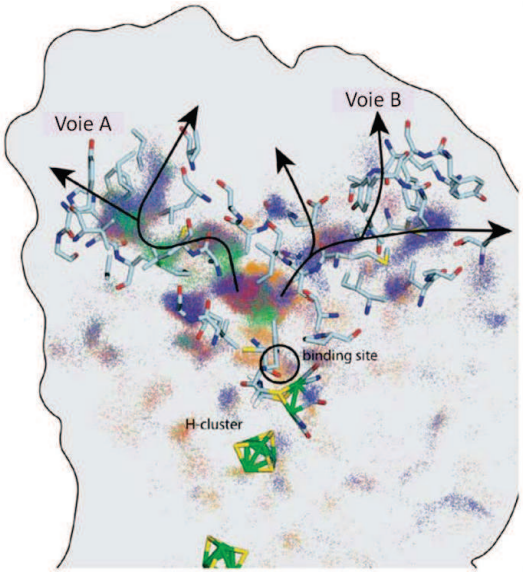


Figure 8: Les canaux hydrophobes permettent la diffusion des gaz depuis/vers le site actif de l'hydrogénase [Fe-Fe] de *Clostridium pasteuranium* (reproduit de (Cohen et al., 2005)).

Le centre [Fe-S] du cluster H, et ceux des domaines accessoires si présents, connectent le site actif enfoui dans la protéine à la surface. Les électrons sont ainsi transférés depuis ou vers le site actif grâce au(x) centre(s) [Fe-S]. Dans le cas de l'hydrogénase de *Clostridium pasteuranium,* la partie N-terminale est constituée d'un module accessoire de type ferrédoxine contenant un centre [2Fe-2S] ainsi qu'un centre [4Fe-4S]. L'hydrogénase de *Desulfovibrio desulfuricans* arbore quant à elle un domaine ferrédoxine supplémentaire contenant deux centres [4Fe-4S] (Figure 5 B). Ces centres [Fe-S] sont distants centre à centre d'une douzaine d'Å.

La voix de transfert des protons chez l'hydrogénase de *Clostridium pasteuranium* a été caractérisée par mutagenèse dirigée (Cornish et al., 2011). Quatre acides aminés et une molécule d'eau sont impliqués dans le transfert des protons depuis le cluster H vers la surface de la protéine et vice versa. En partant du cluster H, la cystéine 299, une molécule d'eau, l'acide glutamique 279, la sérine 319 et enfin l'acide glutamique 282 participent à cette voie (Figure 9). La mutation de ces derniers en acides aminés à chaine latérale incapables d'échanger des protons, résulte en une perte drastique de l'activité de réduction ou d'oxydation de l'hydrogène. La validité de cette voie de transfert de protons est fortement renforcée par l'alignement multiple de 63 séquences d'hydrogénase [Fe-Fe], où ces 4 acides aminés sont strictement conservés.

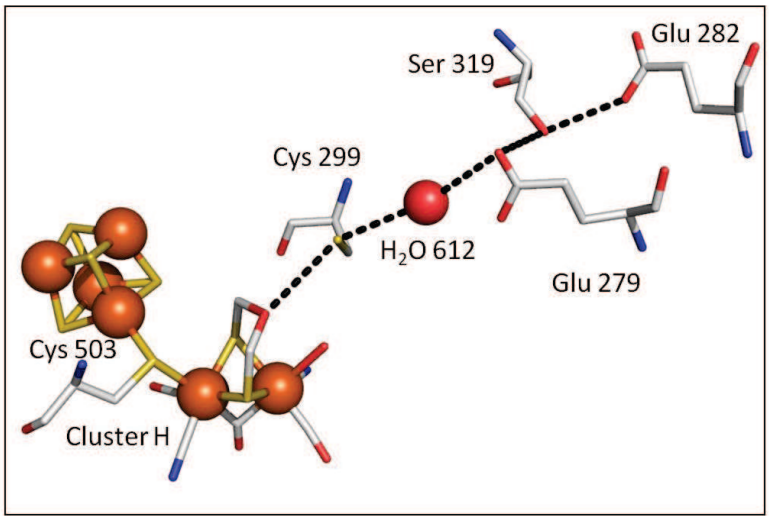


Figure 9: La voie de transfert des protons depuis/vers le site actif de l'hydrogénase [Fe-Fe] de *Clostridium pasteuranium* (reproduit de (Cornish et al., 2011)). (Pdb ID: 3C8Y). Les atomes de fer sont représentés en sphères orange la molécule d'eau en sphère rouge. Les bâtonnets représentent les atomes de carbone en gris, les atomes de soufre en orange, les atomes d'oxygène en rouge et les atomes d'azote en bleu.

1.1.3.7 Partenaires physiologiques

Lorsque l'enzyme catalyse l'oxydation de l'H_2 ou la réduction des H^+, les électrons doivent être soit conduits du cluster H vers la surface de la protéine, soit amenés depuis la surface de la protéine jusqu'au cluster H. Les partenaires physiologiques échangeant des électrons avec les hydrogénases [Fe-Fe] sont de plusieurs types : cytochromes c solubles, ferrédoxines et flavodoxines.

Un modèle d'interaction entre l'hydrogénase [Fe-Fe] ne contenant que le cluster H de *Chlorella fusca* et sa ferrédoxine partenaire a été proposé, mettant en évidence un transfert électronique optimisé grâce aux interactions électrostatiques et à la complémentarité structurale entre les deux protéines (Winkler et al., 2002).

Un autre modèle d'interaction entre l'hydrogénase [Fe-Fe] de *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough contenant un domaine accessoire portant deux centres [Fe-S] et son partenaire physiologique, le cytochrome c_3 polyhémique a été déterminé par une approche combinée de RMN et de docking (Figure 10 A) (ElAntak et al., 2003). Cette étude démontre une importante complémentarité de surface électrostatique entre les deux protéines et une distance de transfert d'électrons intermoléculaire faible (8.8Å) entre l'hème IV du cytochrome c_3 et le centre [Fe-S] distal (Figure 10 B).

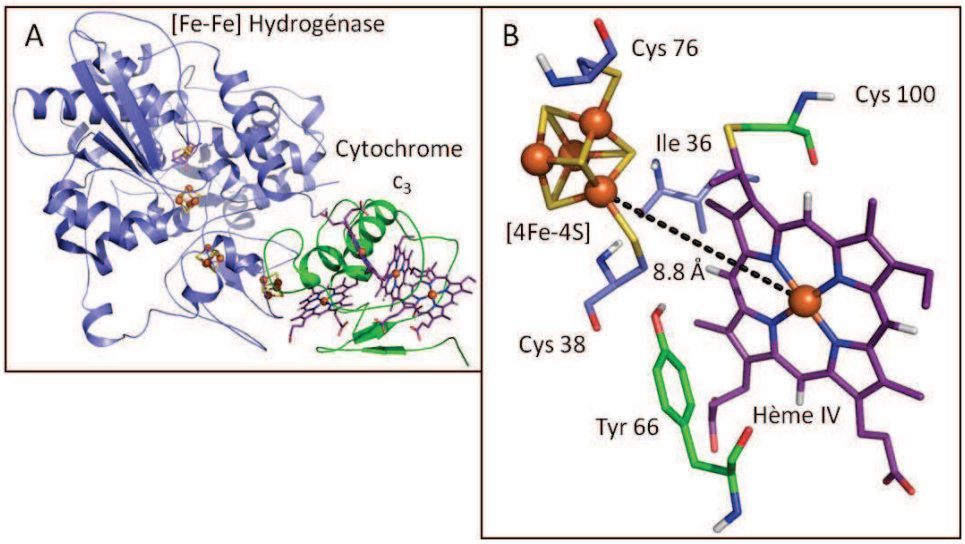


Figure 10: (A) Modèle d'interaction entre l'hydrogénase [Fe-Fe] et le cytochrome c_3 de *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough. (B) Représentation détaillée de la zone d'interaction. (adapté de (ElAntak et al., 2003)). (Pdb ID: 1GX7). Les atomes de fer sont représentés en sphères orange. Les bâtonnets représentent les atomes de carbone en vert pour le cytochrome c_3, bleu clair pour l'hydrogénase [Fe-Fe], mauve pour l'hème IV, les atomes de soufre en orange, les atomes d'oxygène en rouge et les atomes d'azote en bleu.

1.1.4 *Les hydrogénases [Ni-Fe]*

1.1.4.1 *Organismes*

Les Hydrogénases [Ni-Fe] sont les plus répandues et les plus étudiées. Elles ont été identifiées chez les protéobactéries, les cyanobactéries et les archées méthanogènes. On citera les hydrogénases [Ni-Fe] des bactéries sulfato réductrices du genre *Desulfovibrio*, mais aussi celle de la bactérie aérobie *Ralstonia eutropha* comme étant parmi les plus étudiées depuis plus de 20 ans.

1.1.4.2 *Rôle physiologique*

Ces hydrogénases catalysent, dans la majorité des cas, l'oxydation de l'hydrogène. On les retrouve dans le cytoplasme, le périplasme et également associées à la membrane.

Les hydrogénases du groupe I sont membranaires et catalysent l'oxydation de l'hydrogène couplée à la réduction d'accepteurs d'électrons tels que le nitrate, le sulfate, le fumarate, le CO_2 (lors de la respiration anaérobie) ou l'O_2 (lors de la respiration aérobie). Il en résulte un gradient de protons transmembranaire, générateur d'énergie.

Le groupe II se subdivise en deux: Le groupe II(a) composé par les hydrogénases des cyanobactéries, localisées du côté cytoplasmique de la membrane et qui catalysent l'oxydation de l'hydrogène. Leur expression est induite lors de la fixation de l'azote chez les cyanobactéries. Le groupe II(b) composé par les hydrogénases senseurs d'H_2 qui sont localisées dans le cytoplasme. Elles ont pour rôle de détecter la présence d'hydrogène dans l'environnement, déclenchant alors une cascade de réactions cellulaires contrôlant la synthèse d'hydrogénases (Kleihues et al., 2000). Les hydrogénases senseurs ont la particularité d'être insensibles à l'oxygène contrairement à la majorité des hydrogénases [Ni-Fe].

Le groupe III est composé des hydrogénases héteromultimériques cytoplasmiques bidirectionnelles. Ces enzymes bidirectionnelles peuvent réoxyder des cofacteurs tels que le cofacteur F_{420} (8-hydroxy-5-déazaflavine), le NAD ou le NADP. L'héterodimère d'hydrogénase est accompagné d'autres sous unités spécifiques de la fixation des cofacteurs.

Le groupe IV est constitué des hydrogénases productrices d'hydrogène. Les hydrogénases de ce groupe sont membranaires, composées de six sous unités ou plus. Elles sont principalement présentes chez les archées où elles produisent l'hydrogène *via* des ferrédoxines en oxydant un groupement carbonyle de l'acétate en CO_2. Egalement présentes chez *E.coli* et *R.rubrum*, elles y réduisent les protons afin de compenser l'oxydation anaérobie de composés organiques de bas potentiel tels que le CO ou le formiate.

1.1.4.3 Architecture

La première structure cristallographique d'hydrogénase [Ni-Fe] est rapportée en 1995 (Volbeda et al., 1995). Il s'agit de l'hydrogénase *Desulfovibrio gigas* dont la structure a été résolue à 2.85 Å (Figure 11). Par la suite, les structures des hydrogénases [Ni-Fe] de *Desulfovibrio vulgaris* Mizazaki (Higuchi et al., 1997), *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774 (Matias et al., 2001) et *Desulfovibrio fructosovorans* (Montet et al., 1997) ont été déterminées. Les hydrogénases [Ni-Fe] ont des structures très similaires (Fontecilla-Camps et al., 2007). Elles sont constituées de deux sous unités qui partagent une large surface de contact de 3500 $Å^2$. La grande sous unité catalytique portant le site actif bimétallique [Ni-Fe] est composée d'hélices α. La petite sous unité portant trois centres [Fe-S] et permettant le transfert des électrons entre le site actif et les partenaires physiologiques à la surface de la protéine est quant à elle composée de feuillets ß.

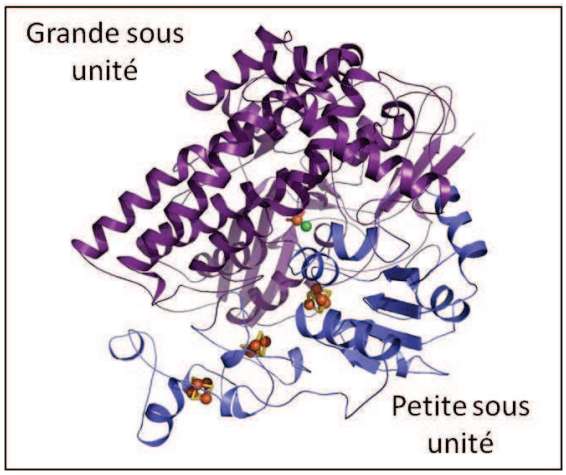


Figure 11: Structure cristallographique de l'hydrogénase [Ni-Fe] de *Desulfovibrio gigas* (Pdb ID: 1FRV). Les atomes de fer et nickel sont représentés respectivement en sphères orange et vertes. La grande sous unité est représentée en mauve et la petite sous unité en bleu.

1.1.4.4 Le site actif

Le site actif des hydrogénases [Ni-Fe] (Figure 12) comporte un atome de fer lié à deux ligands cyanures et un groupement carbonyle. Ces ligands non protéiques atypiques dans le monde biologique ont été identifiés par des expériences de marquage isotopique ^{13}C ^{15}N (Happe et al., 1997), ainsi que par FTIR (Pierik et al., 1999). L'atome de nickel est coordonné par les atomes de soufre de deux cystéines du squelette protéique. Ces deux atomes métalliques sont reliés entre eux par deux ponts thiolate formés par deux cystéines.

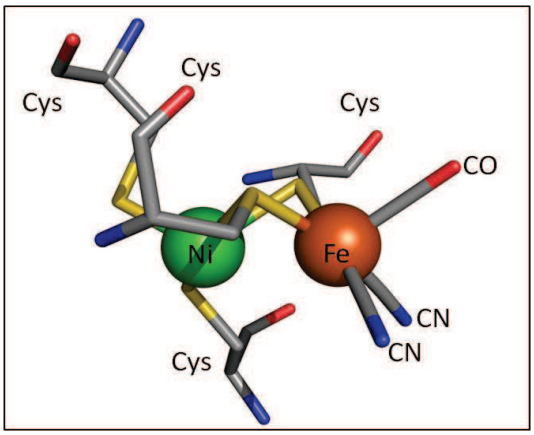


Figure 10: Structure du site de l'hydrogénase [Ni-Fe] de *Desulfovibrio gigas*. (Pdb ID: 1YQ9). Les atomes de fer et nickel sont représentés respectivement en sphères orange et vertes. Les bâtonnets représentent les atomes de carbone en gris, les atomes de soufre en orange, les atomes d'oxygène en rouge et les atomes d'azote en bleu.

1.1.4.5 *Les inhibiteurs du site actif*

Tout comme les hydrogénases [Fe-Fe], le site actif des hydrogénases [Ni-Fe] est identifié sous divers états. Ces états sont nombreux, et leur dénomination est complexe : des noms différents sont en effet retrouvés dans la littérature pour désigner un même état (Figure 13) (Vincent et al., 2007).

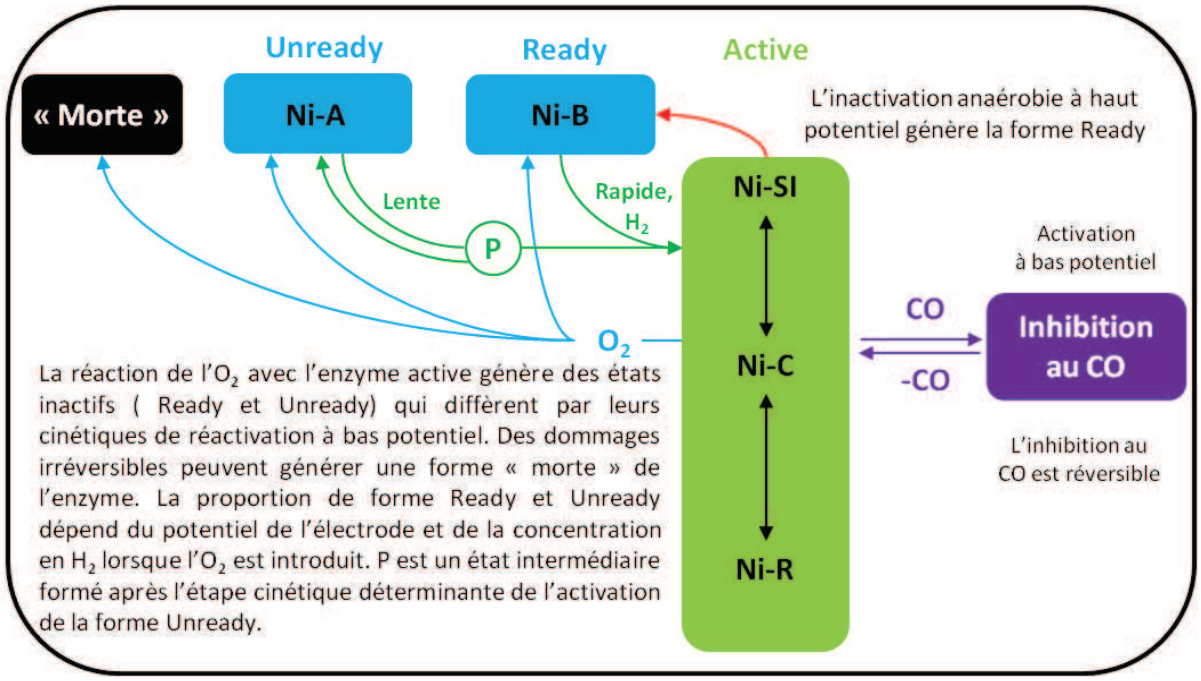


Figure 13: Les différents états actifs et inactifs des hydrogénases [Ni-Fe] (adapté de (Vincent et al., 2007))

Les hydrogénases [Ni-Fe] sont sensibles à l'oxygène. Il en résulte, après exposition à l'oxygène, deux états oxydés du site actif, Ni-A (Unready) et Ni-B (Ready), qui diffèrent par leur cinétique de réactivation. Tandis que le Ni-B est rapidement réactivé (typiquement quelques minutes), la cinétique de réactivation du Ni-A est plus lente (plusieurs heures). Il est proposé que le nombre d'électrons au site actif contrôle le ratio Ni-A/Ni-B. La forme Ni-B, identifiée par spectroscopie et cristallographie, porte un ligand hydroxyle OH^- sur l'atome de nickel. Un scénario est proposé pour la formation de l'état Ni-B: la réduction à $4e^-$ de la molécule d'O_2 en présence d'H_2 par le site actif (riche en électrons) en deux molécules d'eau, dont une pourrait restée sous forme OH^- sur l'atome de nickel (Figure 14 droite). La forme Ni-A porterait quant à elle un ligand peroxyde OOH^- formé en absence d'hydrogène par la réduction incomplète à $2e^-$ de l'O_2 par un site actif pauvre en électron (Figure 14 gauche). Le CO est quant à lui un inhibiteur compétitif de l'oxydation de l'H_2. Son effet inhibiteur disparaît après l'exposition de l'enzyme au CO.

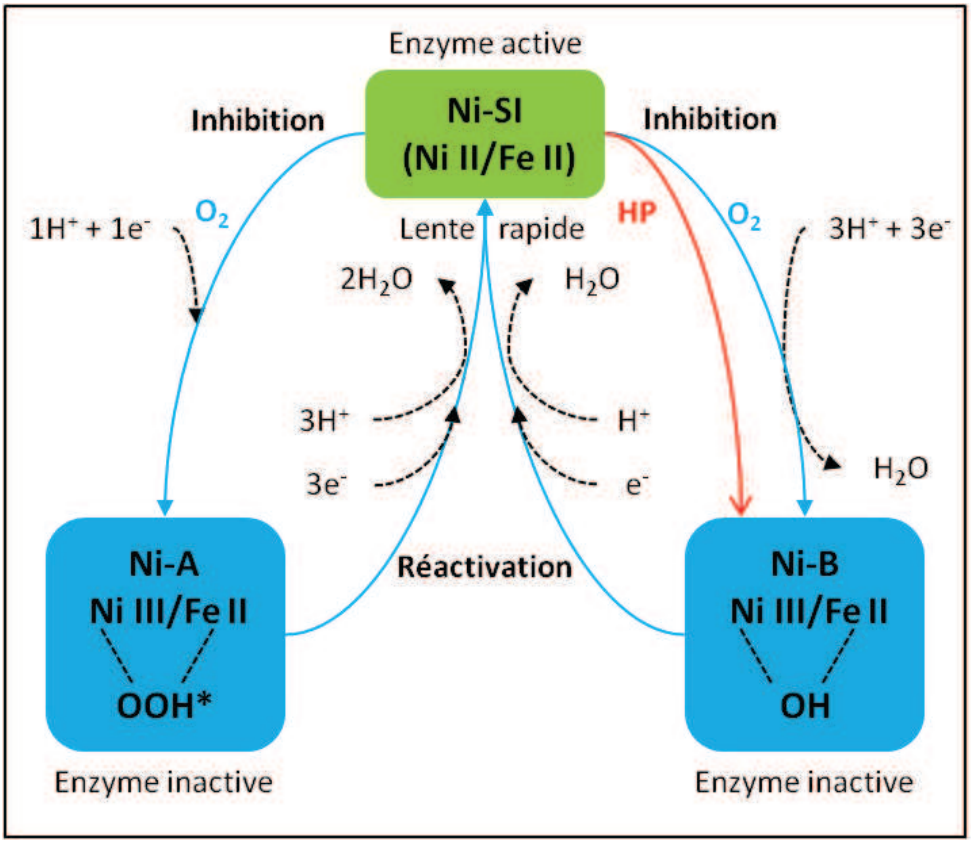


Figure 14: Mécanismes réactionnels d'inhibition et de réactivation des hydrogénases proposés dans la littérature (adapté de (Cracknell et al., 2009) (Fontecilla-Camps et al., 2007)). HP: Inhibition à haut potentiel. * : la nature du ligand de l'espèce Ni-A est toujours discutée.

1.1.4.6 *Connexions au site actif*

Les hydrogénases [Ni-Fe] disposent de canaux hydrophobes qui permettent l'accès de l'hydrogène au site actif. Ces canaux ont tout d'abord été mis en évidence par analyse des structures cristallographiques des hydrogénases de *Desulfovibrio fructosovorans* et *Desulfovibrio gigas* (Montet et al., 1997). L'existence de ces canaux a ensuite été prouvée expérimentalement, en faisant diffuser du gaz Xe dans des cristaux d'hydrogénase, et en déterminant la position de ces molécules de gaz au sein de la protéine. Au final, 4 canaux hydrophobes peuvent être distingués dans les hydrogénases [Ni-Fe] (Figure 15) (Fontecilla-Camps et al., 2007).

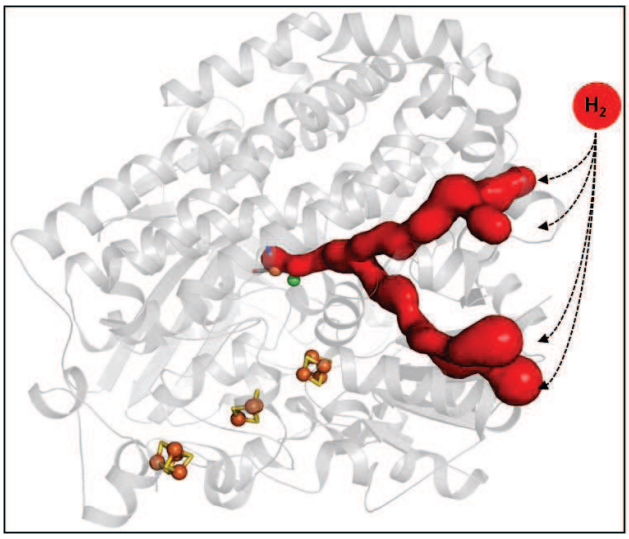


Figure 15: Canaux hydrophobes permettant la diffusion de l'hydrogène dans l'hydrogénase [Ni-Fe] *Desulfovibrio gigas*. (Pdb ID: 1YQ9). Les canaux hydrophobes sont représentés en rouge, les structures secondaires de la protéine en gris. Les atomes de fer sont représentés en sphères orange, celui de nickel en vert. Les bâtonnets représentent les atomes de carbone en gris, les atomes de soufre en orange, les atomes d'oxygène en rouge et les atomes d'azote en bleu.

Les électrons sont transférés depuis le site actif [Ni-Fe] au partenaire physiologique, ou au médiateur redox artificiel par le biais de trois centres [Fe-S] (Figure 16). Ces centres sont nommés centre proximal (le plus proche du site actif), médian (position intermédiaire) et enfin distal (le plus loin du site actif, mais le plus proche de la surface de la protéine). Ces centres [Fe-S] redox sont séparés par une dizaine d'Å, distance compatible avec un transfert d'électrons. Le centre proximal est coordiné par 4 cystéines, le médian par 3 cystéines et une proline et enfin le centre distal a la particularité d'être coordiné par 3 cystéines et une histidine. Cette dernière est essentielle pour l'activité catalytique de la protéine car il a été montré que sa substitution par une glycine ou même une cystéine réduit drastiquement la capacité de l'enzyme à oxyder l'hydrogène (Dementin et al., 2006). Les potentiels de ces centres [Fe-S] sont différents : les potentiels des centres proximal et distal ont été titrés par Résonance Paramagnétique Electronique (RPE) à -290 et -340 mV vs NHE, tandis que le potentiel du centre médian a été titré à -70 et +65 mV pour les hydrogénases de *Desulfovibrio gigas* et *Desulfovibrio fructosovorans* respectivement (Pandelia et al., 2011). Le centre médian de haut potentiel est thermodynamiquement défavorable au transfert d'électrons. En remplaçant la proline par une cystéine, ce centre [3Fe-4S] a été converti en centre [4Fe-4S] de plus bas potentiel (-250mV) (Rousset et al., 1998). L'activité de l'enzyme n'est que très peu affectée, indiquant que si ce centre intervient effectivement dans le transfert interne d'électrons, il n'en est pas le facteur limitant. Ce résultat expérimental suggère que la

constante d'activité catalytique de l'enzyme peut être limitée par d'autres facteurs comme : i) l'accessibilité du substrat au site actif, ii) le clivage hétérolytique de l'hydrogène, iii) le transfert des protons vers le solvant ou enfin iv) le transfert des électrons vers l'extérieur de la protéine.

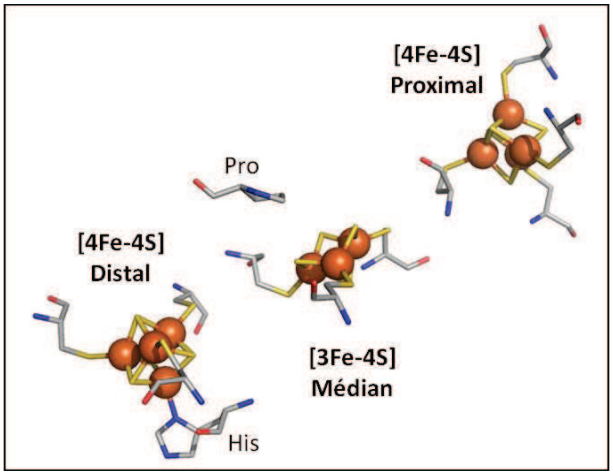


Figure 16: Centre [Fe-S] permettant le transfert des électrons dans l'hydrogénase [Ni-Fe] *Desulfovibrio gigas*. (Pdb ID: 1YQ9). Les résidus non annotés sont des cystéines. Les atomes de fer sont représentés en sphères orange. Les bâtonnets représentent les atomes de carbone en gris, les atomes de soufre en orange, les atomes d'oxygène en rouge et les atomes d'azote en bleu.

Le mécanisme de transfert des protons entre le site actif [Ni-Fe] et la surface de la protéine n'est pas encore complètement élucidé, comme en témoignent deux publications récentes sur les hydrogénases de *Desulfovibrio gigas* et *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki. Il fait intervenir des acides aminés protonables appartenant à la fois à la grande et à la petite sous unité de l'enzyme. Il a tout d'abord été montré qu'un groupement carboxylique appartenant à l'acide glutamique 25, à proximité de l'atome de nickel, chez *Desulfovibrio fructosovorans*, était nécessaire afin d'initier le transfert des protons du/vers le site actif (Dementin et al., 2004). La voie complète de transfert des protons a été étudiée de manière statique par analyse des réseaux de liaisons hydrogène au sein des structures cristallographiques entre acides aminés et molécules d'eau (Fontecilla-Camps et al., 2007). Afin d'analyser de manière dynamique le transfert des protons, des études par dynamique moléculaire ont été menées sur les hydrogénases de *Desulfovibrio gigas* et *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki. La première étude présente l'acide glutamique 25 de la grande sous unité comme premier relais depuis le site actif. Ce sont ensuite le résidu histidine 27 dans la grande sous unité, et dans la petite sous unités les résidus thréonine 18, acide glutamique 16, 75, histidine 13, acide glutamique 46, tyrosine 44 et enfin les acides glutamiques 57 puis 54 qui

sont impliqués (Figure 17 A) (Baltazar et al., 2012). La seconde étude rapporte la présence de 3 voies de transfert des protons dont une préférentielle. Celle-ci est composée en premier lieu de l'acide glutamique 34 (équivalent de l'acide glutamique 25 chez *D.gigas* et *D. fructosovorans*), puis l'histidine 36, dans la grande sous unité. Ensuite les acides aminés, thréonines 18, acide glutamique 16 et 75, histidine 13, acide glutamique 46, 57 et 61 de la petite sous unité constituent la voie de transfert des protons chez *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki (Figure 17 B) (Sumner et al., 2012). Les résidus acide glutamique 16, thréonine 18 et acide glutamique 75 sont conservés chez toutes les hydrogénases de l'espèce *Desulfovibrio*. De plus, ces deux études récentes présentent un grand nombre d'acide aminés communs dans la voie de transfert des protons.

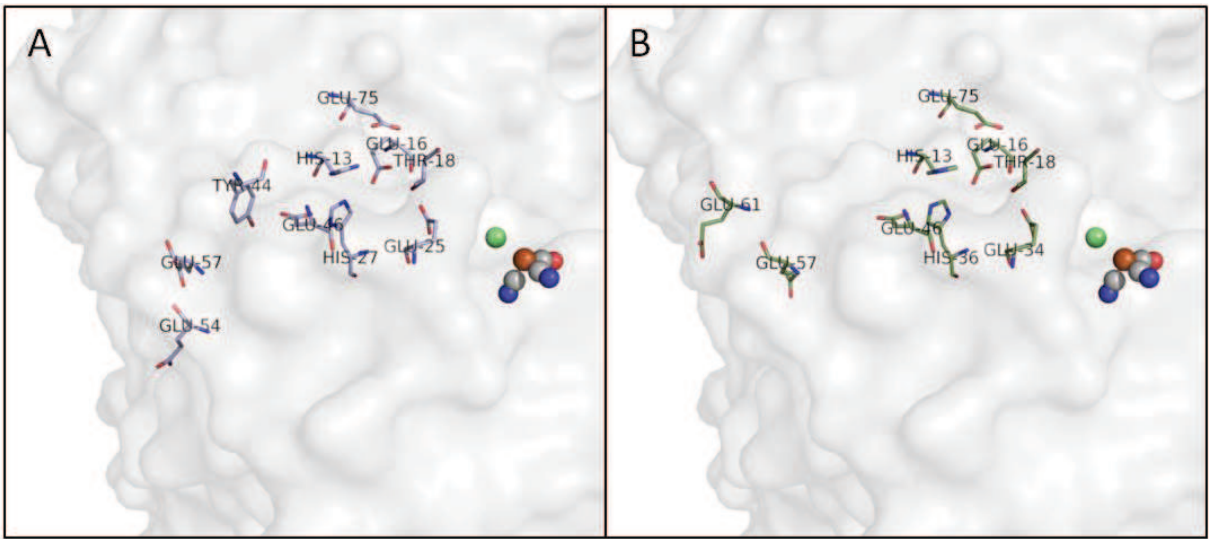


Figure 17: Voie de transfert des protons de deux hydrogénases [Ni-Fe] (A) *Desulfovibrio gigas* (Pdb ID: 1YQ9). *(B) Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki (Pdb ID: 1H2R). La surface de la protéine est représentée en gris. Les atomes de fer sont représentés en sphères orange, les atomes de nickel en vert, les atomes de carbone en gris, les atomes d'oxygène en rouge et les atomes d'azote en bleu.

1.1.4.7 Partenaires physiologiques

Les hydrogénases [Ni-Fe] de l'espèce *Desulfovibrio* portent une couronne d'acides aminés chargés négativement autour du centre [Fe-S] distal, créant ainsi un site de reconnaissance spécifique pour le partenaire physiologique, le cytochrome tetrahémique de type c_3 portant des charges positives autour de l'hème IV (Volbeda et al., 1995). Un premier modèle d'interaction transitoire a été construit entre l'hydrogénase [Ni-Fe] et le cyt c_3 de *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774 (Matias et al., 2001). Basé sur la modélisation moléculaire, ce premier modèle a été construit en plusieurs étapes : une première étape de

docking avec des protéines rigides, afin de rechercher les solutions d'interaction de plus faibles énergies. La majorité des solutions trouvées impliquent l'hème IV du cyt c_3 et le centre [Fe-S] distal de l'hydrogénase. Les meilleures solutions sont ensuite raffinées par dynamique moléculaire, ce qui permet d'optimiser l'orientation des acides aminés des deux protéines impliquées dans l'interaction. Celle-ci s'avère être de nature exclusivement électrostatique, la majeure partie des résidus acides se trouvant sur l'hydrogénase et les résidus basiques sur le cyt c_3. Les résidus acides présents à la surface de l'hydrogénase qui participent à l'interaction avec le cyt c_3 varient en fonction des solutions trouvées par le docking. En revanche, les résidus Lys 58, Lys 59, Lys 94 et Lys 95 sont quasiment constamment retrouvés chez le cyt c_3. Enfin, afin de fournir un modèle d'interaction compatible en termes de reconnaissance physiologique et fonctionnel, la constante de couplage électronique entre les centres redox des deux partenaires a été calculée. La meilleure solution présente un transfert électronique entre l'atome S3 du centre [4Fe-4S] distal de l'hydrogénase *via* la Phe 192 et l'hème IV du cyt c_3 (Figure 18).

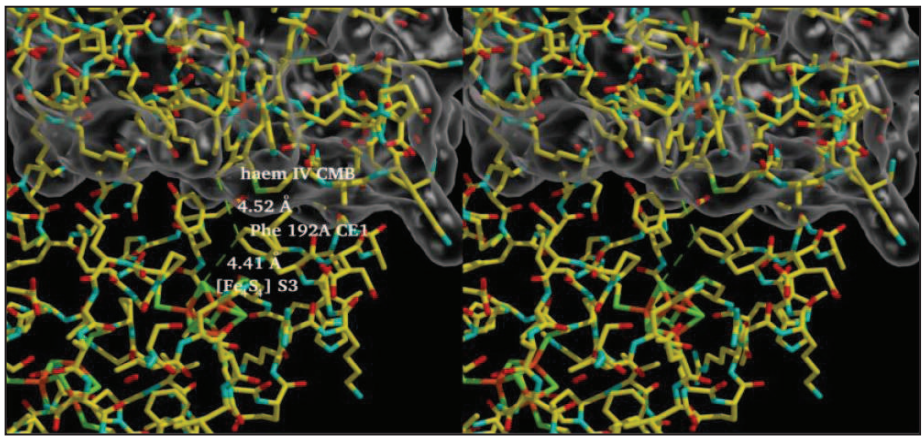


Figure 18: Interaction entre l'hydrogénase [Ni-Fe] et le cytochrome c_3 de *Desulfovibrio desulfuricans* (reproduit de (Matias et al., 2001))

Plus tard, une approche expérimentale par RMN et mutagenèse dirigée combinée au docking a été mise en place pour étudier l'interaction du couple hydrogénase/cyt c_3 de *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki (Yahata et al., 2006). La mesure par RMN des déplacements chimiques du cyt c_3 mis en présence de l'hydrogénase permet d'identifier les acides aminés du cyt c_3 (principalement des lysines) participant à l'interaction transitoire. L'implémentation de ces données expérimentales dans le calcul de docking entre les deux protéines permet de trouver deux configurations dans lesquelles l'hème IV du cyt c_3 et le centre [4Fe-4S] distal sont inter-distants de 14 Å. Les rôles des acides aminés du cyt c_3 impliqués dans l'interaction

ont été déterminés par mutagenèse dirigée : 10 lysines (Lys 10, 15, 26, 57, 58, 60, 72, 94, 95, 101), des méthionines et deux tyrosines (65, 66) ont été substituées par une alanine et une leucine respectivement. La constante catalytique de réduction du cyt c_3, mesurée par spectrophotométrie, en présence d'H_2 par l'hydrogénase demeure inchangée pour tous les mutants, tandis que la constante d'affinité entre les deux partenaires augmente. L'histidine 188 et la phénylalanine 197 (identique à la Phe 192 chez *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774) qui sont conservées chez les hydrogénases [Ni-Fe] feraient partie de la voie de transfert des électrons entre les deux protéines, tandis que les lysines (Lys 60, Lys 72, Lys 94, Lys 95) encerclant l'hème IV assurent l'interaction avec l'environnement acide du centre distal (Figure 19).

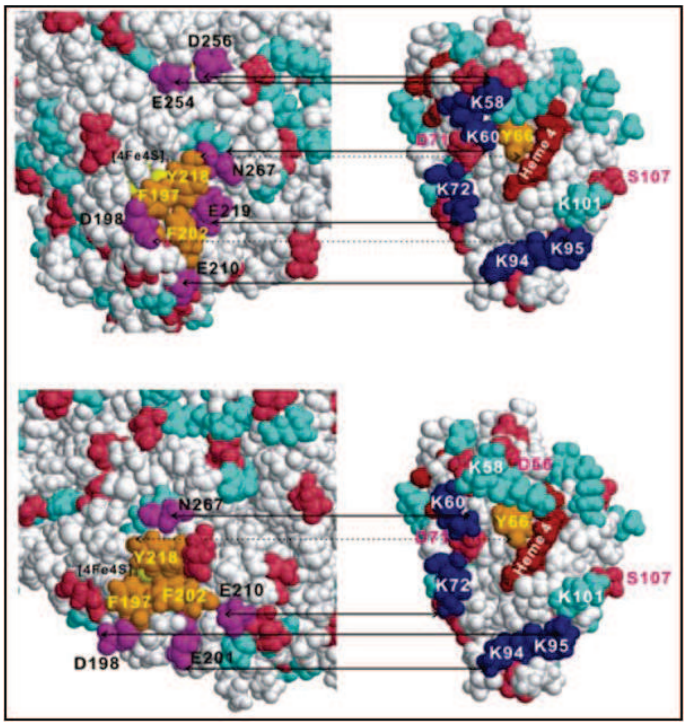


Figure 19: Interaction entre l'hydrogénase [Ni-Fe] et le cytochrome c_3 de *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki (reproduit de (Yahata et al., 2006)). L'hydrogénase et le cytochrome sont représentés à gauche et à droite respectivement. Deux modèles sont présentés haut et bas. Les hèmes et les centres [Fe-S] sont représentés en rouge et jaune respectivement. Les résidus chargés positivement (Lys, Arg) et négativement (Glu, Asp) sont représentés en cyan et rose respectivement. Les résidus de contact qui ont été mutés sont représentés en bleu et magenta. Les résidus aromatiques impliqués dans le transfert d'électrons sont en orange. Les flèches noires en gras et pointillé, connectent les résidus par des ponts salins ou des liaisons hydrogène respectivement.

1.2 Les hydrogénases [Ni-Fe] O_2 et CO-tolérantes

Cette première partie de description des hydrogénases, à la fois biochimique et structurale, a mis l'accent sur le fait que les hydrogénases [Ni-Fe] présentent une grande sensibilité à l'oxygène. Il existe cependant dans la biodiversité, des hydrogénases [Ni-Fe] naturellement tolérantes à l'oxygène qui peuvent métaboliser l'hydrogène en conditions aérobies ou microaérobies. La bactérie Ralstonia eutropha est à ce titre exemplaire puisqu'elle est pourvue, de plusieurs hydrogénases [Ni-Fe] tolérantes aux inhibiteurs comme l'oxygène.

1.2.1 Hydrogénase bidirectionnelle NAD^+ réductrice

L'hydrogénase [Ni-Fe] de classe 3 de *Ralstonia eutropha* est une enzyme cytoplasmique soluble capable de réduire le NAD^+ grâce à l'H_2. Il a tout d'abord été montré par spectroscopie, que le site actif de cette enzyme présentait une signature différente des autres hydrogénases [Ni-Fe]. Cette différence a été attribuée à la présence de deux ligands inorganiques supplémentaires dans le site actif. Un ligand cyanure est présent sur l'atome de nickel et un autre sur l'atome de fer, portant à cinq le nombre total de ligands inorganiques du site actif : trois groupements CN et un groupement CO sur le fer, un groupement CN sur le nickel (Figure 20) (Happe et al., 2000).

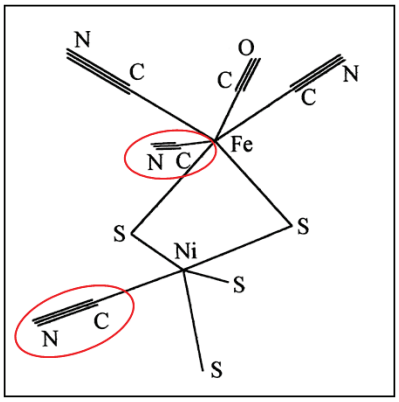


Figure 20: Schéma représentant le site actif de l'hydrogénase de classe 3 de *Ralstonia eutropha* (reproduit de (Happe et al., 2000)). Les deux ligands cyanures supplémentaires sont entourés en rouge.

Plus tard, la même équipe a démontré le rôle clé du ligand CN porté par l'atome de nickel dans la tolérance à l'oxygène. Par traitement réducteur, les auteurs ont été capables de retirer irréversiblement et sélectivement le CN lié à l'atome de nickel. L'enzyme ainsi traitée subit une forte perte d'activité de réduction du NAD par l'H_2 en condition aérobie. Les auteurs

concluent que le groupement CN du nickel protège le site actif d'une attaque par l'oxygène moléculaire (Van der Linden et al., 2004).

Néanmoins, une étude récente menée par RPE et FTIR sur cellule entière n'exprimant que cette hydrogénase, montre que ces ligands CN supplémentaires ne sont pas présents (Horch et al.). Ce résultat remet en question le rôle des ligands CN sur la tolérance à l'oxygène constatée chez cette hydrogénase.

1.2.2 Hydrogénase senseur

Une autre hydrogénase de la bactérie *Ralstonia eutropha* présente une tolérance à l'oxygène (Kleihues et al., 2000). Il s'agit d'une hydrogénase de classe 2, senseur d'hydrogène, induisant l'expression génétique des hydrogénases. Le site actif de celle-ci ne présente pas de ligands inorganiques supplémentaires comme décrit précédemment, indiquant qu'un autre mécanisme de tolérance à l'oxygène a du être mis en place. La diffusion de l'H_2 jusqu'au site actif des hydrogénases [Ni-Fe] est un processus contrôlé par des canaux hydrophobes, qui se rassemblent en un unique canal à l'approche du site actif. Ce goulot d'étranglement, est constitué de deux résidus hydrophobes fortement conservés chez les hydrogénases [Ni-Fe], une valine et une leucine. Cependant, dans la classe des hydrogénases [Ni-Fe] senseurs, ces deux résidus sont substitués par des acides aminés hydrophobes plus encombrants, une isoleucine et une phénylalanine. Ces deux résidus ont été soupçonnés de limiter l'accessibilité aux molécules plus grosses que l'H_2 telle que l'O_2. Afin de valider cette hypothèse, l'isoleucine et la phénylalanine ont été substitués par mutagénèse dirigée par des résidus de plus petite taille, une valine et une leucine respectivement. Le double mutant devient effectivement totalement inactif pour l'oxydation de l'hydrogène en présence d'oxygène, mais peut être réactivé par traitement réducteur, telle une hydrogénase [Ni-Fe] sensible à l'oxygène classique (Buhrke et al., 2005).

1.2.3 Une inspiration pour la création d'hydrogénases tolérantes

L'observation des stratégies mises en œuvre dans la nature par les hydrogénases tolérantes à l'oxygène offre l'opportunité de mimer ces tolérances sur des hydrogénases sensibles, grâce à la mutagénèse dirigée. Ainsi le résidu valine 74 conservé chez les hydrogénases sensibles à l'oxygène a été muté dans la grande sous unité de l'hydrogénase de *Desulfovibrio fructosovorans* de manière à mimer le phénotype de l'hydrogénase senseur

tolérante à l'oxygène. Sa position charnière entre le site actif et la fin du canal d'accès au gaz, en fait un résidu idéal pour moduler l'accession au site actif de plus grosses molécules comme l'oxygène. Très récemment plusieurs mutations ont concerné ce résidu, qui ouvrent des perspectives intéressantes. La valine et la leucine bordant le site actif ont été mutées par une isoleucine et une phénylalanine présentes dans l'hydrogénase senseur tolérante à l'oxygène. Si la diffusion de l'O_2 dans ce mutant est ralentie par rapport à l'enzyme sauvage, aucune tolérance à l'O_2 n'est observée (Liebgott et al., 2010). Lorsque la valine est mutée par une méthionine dont l'atome de soufre est affin pour l'oxygène, la cinétique d'inactivation de l'enzyme est réduite (Liebgott et al., 2010). Sa mutation par une cystéine lui confère un phénotype proche des hydrogénases tolérantes à l'oxygène : après exposition à l'oxygène, seule l'espèce Ni-B est formée, son activité réductrice des protons est affectée, et son affinité pour le CO est diminuée. Ce mutant a été démontré comme étant capable d'oxyder l'hydrogène en présence d'oxygène pendant plusieurs minutes (Liebgott et al., 2011).

1.2.4 Les hydrogénases membranaires du groupe I

1.2.4.1 Généralités

Les hydrogénases membranaires du groupe I couplent l'oxydation de l'hydrogène à la réduction d'un pool de quinones membranaires. Ces hydrogénases sont exposées au périplasme, et sont par conséquent fortement affectées par les variations du milieu extérieur. Il existe au sein du groupe I, une sous classe d'hydrogénases appelée, hydrogénase [Ni-Fe] membranaire tolérante à l'oxygène. Cette tolérance à l'oxygène est nécessaire chez les organismes dont le métabolisme énergétique couple l'oxydation de l'hydrogène à la réduction de l'oxygène. Une récente étude phylogénétique des hydrogénases du groupe I démontre de manière inattendue qu'en plus des organismes microaérophiles, des organismes anaérobies stricts, portent des gènes codant pour des hydrogénases tolérantes à l'oxygène. Ces hydrogénases tolérantes à l'oxygène sont retrouvées dans le groupe des α-, β-, γ-protéobactéries, mais également chez les δ-protéobactéries, les Bactéroidetes, les Aquificales, les Chlorobiacées, et les Firmicutes. Ces mêmes travaux permettent de proposer que l'acquisition de la tolérance à l'oxygène soit concomitante avec l'apparition de l'oxygène moléculaire dans l'atmosphère (Pandelia et al., 2012).

Les hydrogénases tolérantes à l'oxygène les plus étudiées sont celles de *Ralstonia eutropha* (Frielingsdorf et al., 2011) et *Escherichia coli* (Lukey et al., 2010). Il n'existe aucune différence entre le site actif [Ni-Fe] d'une hydrogénase tolérante ou d'une hydrogénase sensible à l'oxygène, bien que ce site soit le siège de la réaction d'inhibition à l'oxygène. De part sa structure chimique et configuration électronique, l'oxygène comme l'hydrogène et le CO, doit pouvoir accéder lui aussi au site actif. Néanmoins, les hydrogénases tolérantes à l'oxygène partagent des caractéristiques communes qui les différencient des hydrogénases [Ni-Fe] sensibles à l'oxygène. Ainsi, « as prep », ces hydrogénases n'existent pas sous la forme NiA, forme inactive des hydrogénases sensibles à l'O_2. D'un point de vu activité catalytique, ces hydrogénases ne réduisent pas les protons et présentent une surtension en regard de l'oxydation électrocatalytique de l'hydrogène. En présence d'oxygène, ces hydrogénases ne génèrent que la forme Ni-B du site actif, rapidement réactivable. Le potentiel des centres [Fe-S] ainsi que de l'espèce Ni-B sont environ 200 mV plus positifs. Pour finir, ces hydrogénases sont également tolérantes au CO.

1.2.4.2 *Un motif de fixation du centre [Fe-S] proximal différent*

L'analyse des séquences protéiques de ces hydrogénases met en relief un motif de fixation du centre [Fe-S] proximal diffèrent de celui porté par les hydrogénases sensibles à l'oxygène. Ces dernières disposent d'un motif de fixation de type [**C**XG**C** X_{94} **C**X_{32-35}**C**] contenant quatre cystéines coordinant le centre [4Fe-4S] proximal. Les hydrogénases tolérantes à l'oxygène portent un motif de fixation contenant six cystéines de type [**C**X**C**C X_{93-94} **C**X_4 **C**X_{28-30}**C**]. La présence de ces deux cystéines supplémentaires dans la séquence de la petite sous unité est cruciale dans la tolérance à l'oxygène. En effet, la substitution de ces cystéines par des résidus glycine confère un phénotype sensible à l'oxygène chez les hydrogénases [Ni-Fe] de *Ralstonia eutropha* et *Escherichia coli* (Goris et al., 2011, Lukey et al., 2011).

1.2.4.3 *Un centre [Fe-S] proximal aux propriétés atypiques*

Très récemment, les structures de trois hydrogénases [Ni-Fe] membranaires tolérantes à l'oxygène ont été résolues, *Ralstonia eutropha, Hydrogenovibrio marinus* et *Escherichia coli* (Shomura et al., 2011), (Fritsch et al., 2011), (Volbeda et al., 2012). Ces structures révèlent à la fois la fonction de ces cystéines supplémentaires et une explication des bases moléculaires de la tolérance à l'oxygène de ces hydrogénases. Le centre proximal diffère de

celui des hydrogénases sensibles à l'oxygène. Au lieu d'un centre [4Fe-4S], un centre [4Fe-3S] proximal est identifié chez les hydrogénases tolérantes à l'oxygène. Sa structure est inhabituelle, bien que déjà rencontrée chez la nitrogénase (Peters et al., 1997). Le groupement thiol d'une des cystéines supplémentaires aide à stabiliser le centre [Fe-S] dans trois états d'oxydation, contre deux pour celui des hydrogénases sensibles à l'oxygène. Ce nouvel état d'oxydation de plus haut potentiel est permis grâce à l'atome d'azote du groupement amide deprotoné de la chaîne principale de la cystéine supplémentaire (Cys 25 chez *Hydrogenovibrio marinus*). Ce dernier devient ligand du fer 2, déplaçant le soufre inorganique 3 (Figure 21). Ainsi le centre [Fe-S] prend une conformation ouverte réduisant les répulsions électrostatiques qui normalement interdisent cet état d'oxydation supplémentaire (Shomura et al., 2011), (Fritsch et al., 2011), (Goris et al., 2011).

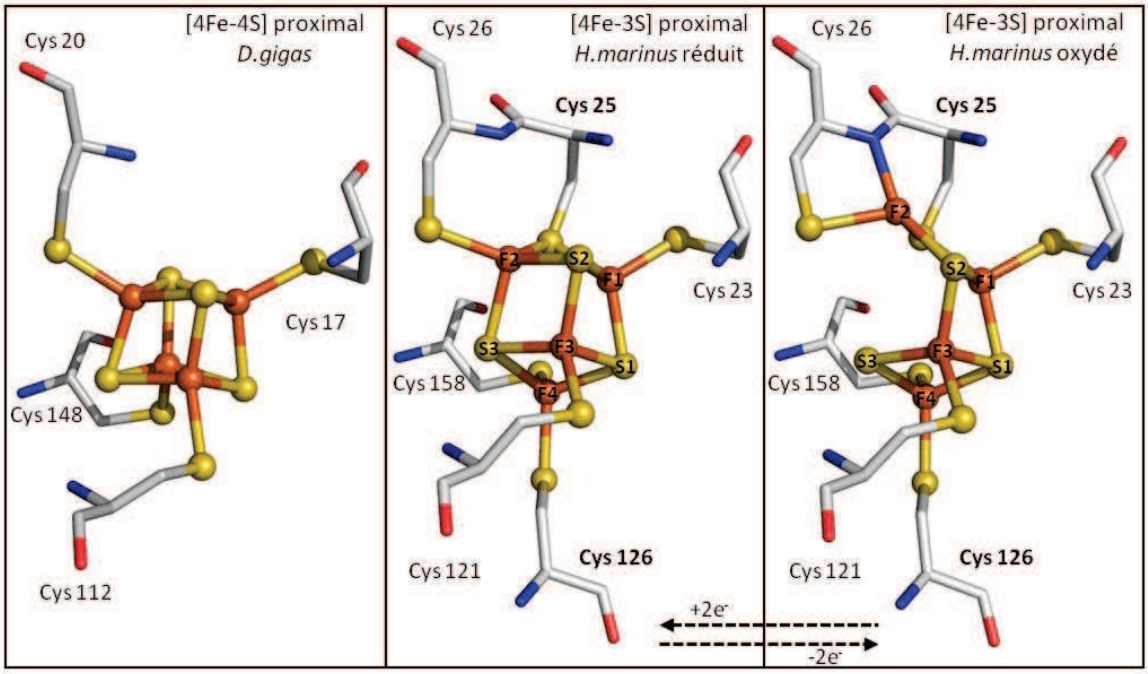


Figure 21: Comparaison des centres [Fe-S] proximaux entre l'hydrogénase [Ni-Fe] sensible à l'O_2 de *Desulfovibrio gigas* (Pdb ID: 1FRV) et l'hydrogénase [Ni-Fe] tolérante à l'O_2 d' *Hydrogenovibrio marinus* (Pdb ID: 3AYX et 3AYY). Les cystéines supplémentaires sont nommées en gras. Les atomes de fer sont représentés en sphères orange, ceux de soufre en jaune. Les bâtonnets représentent les atomes de carbone en gris, les atomes d'oxygène en rouge et les atomes d'azote en bleu.

1.2.4.4 *Mécanisme proposé de tolérance à l'oxygène*

Ces nouvelles informations structurales permettent d'avancer de nouveaux mécanismes réactionnels pour la tolérance à l'O_2 (Parkin et al., 2012). Grâce à ce centre proximal [4Fe-3S]

aux propriétés uniques, deux électrons peuvent être fournis afin de réduire l'O_2 au site actif, au lieu d'un seul pour les hydrogénases sensibles. Ainsi le centre proximal et le centre médian suffisent à fournir les 3 électrons nécessaires à la formation de l'état Ni-B. Les électrons du centre distal ne sont plus requis. La distance tunnel est alors plus courte, et le passage de la barrière thermodynamique du centre médian de plus haut potentiel est évitée. Les électrons seraient alors fournis bien plus rapidement au site actif et permettraient la réactivation rapide de l'enzyme depuis l'état Ni-B inactif vers l'état actif Ni-SI.

La particularité structurale du centre proximal [4Fe-3S] assurerait que seule l'espèce inactive Ni-B soit formée en présence d'oxygène. De plus, par rapport aux hydrogénases [Ni-Fe] sensibles, les potentiels redox des centres [Fe-S] sont plus positifs, et la différence de potentiel redox entre deux centres est plus faible. Le potentiel redox du couple Ni-B/Ni-SI est également plus haut, contribuant au final à la disparition des barrières thermodynamiques présentes chez les hydrogénases [Ni-Fe] sensibles (Figure 22). Globalement, il en résulte une cinétique de réactivation rapide à plus haut potentiel.

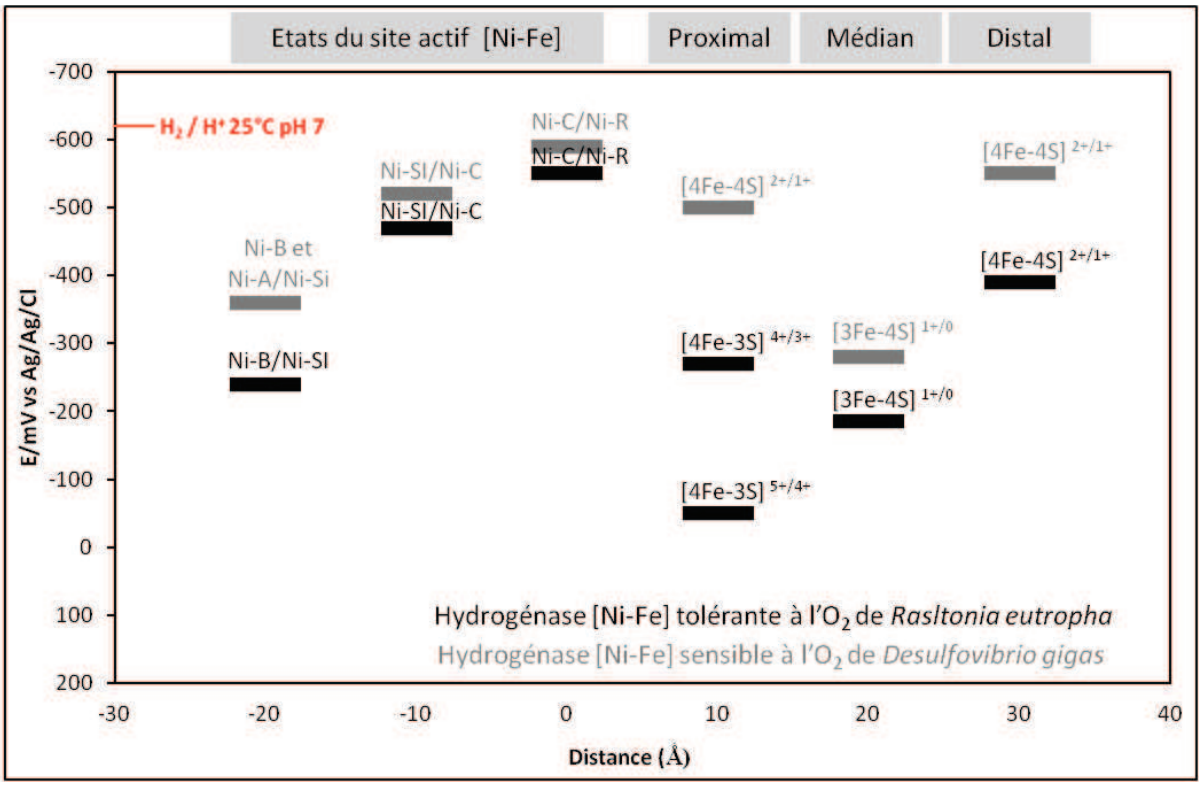


Figure 22: Comparatif des potentiels de transitions redox des centres métalliques de l'hydrogénase de *Ralstonia eutropha* tolérante à l'oxygène et de *Desulfovibrio gigas* sensible à l'oxygène (adapté de (Parkin et al., 2012)). Par souci de lisibilité les 3 états du site actif ont été positionnés à 0, -10 et -20 Å mais doivent être centrés sur 0 Å

1.3 Aquifex aeolicus, une bactérie extrêmophile

1.3.1 Une bactérie hyperthermophile

Dans notre laboratoire, nous nous intéressons au métabolisme énergétique des organismes extrêmophiles et nous caractérisons leurs voies métaboliques. L'idée fondamentale est de comprendre les bases moléculaires de l'adaptation des microorganismes à des environnements extrêmes. A cette fin, nous étudions plusieurs organismes modèles dont une bactérie hyperthermophile: *Aquifex aeolicus*.

Aquifex aeolicus appartient à l'ordre des *Aquificales* des bactéries, contenant des membres thermophiles. Bien que ces organismes thermophiles aient été observés depuis des décennies dans les communautés microbiennes évoluant à haute température, et qu'ils en soient les acteurs principaux, leur ordre n'a été créé qu'au début des années 90. Ils se développent dans des biotopes aux conditions extrêmes tels que les sources marines hydrothermales, les fumeurs noirs, les geysers de surface ou des cratères volcaniques, et ont aussi été isolés dans des mines d'or profondes. En se basant sur les séquences de l'ARN 16s, les *Aquificales* constituent la branche la plus basse du domaine bactérien dans l'arbre phylogénétique universel (Figure 23).

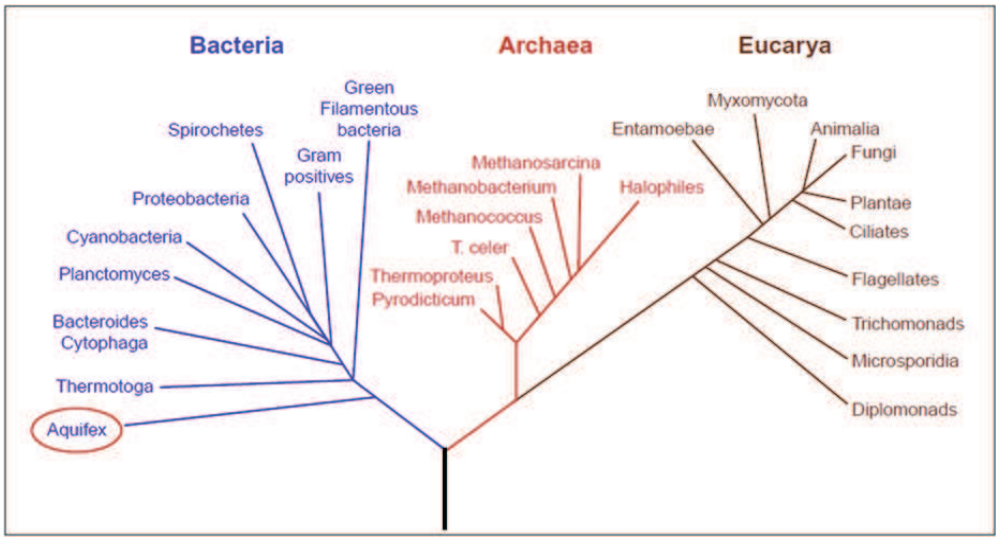


Figure 23 : Arbre phylogénétique basé sur l'ARN 16s (reproduit de (Guiral et al., 2012))

Aquifex aeolicus a été isolée à partir d'une source hydrothermale des îles Vulcano en Italie. Elle est la plus connue des *Aquificales* puisqu'elle a été une des premières isolées et son

génome a été entièrement séquencé. La taille de son génome est 3 fois plus petite que celle d'*Escherichia coli*, avec 1.55 million de paires de base.

La séquence d'acides aminés ou la structure des protéines ne diffèrent par drastiquement entre une bactérie mésophile et une bactérie hyperthermophile. Cependant ces protéines sont extrêmement stables à haute température. Grâce à la résolution de plusieurs structures de protéines d'*Aquifex aeolicus*, les facteurs responsables de l'hyperthermostabilité ont été mis en relief. Il est généralement observé une augmentation du nombre de liaisons ioniques et hydrogène, une plus grande hydrophobicité du cœur de la protéine, et une plus grande compaction de l'enzyme.

Les cellules d'*Aquifex aeolicus*, sont Gram négatives, et forment des bâtonnets mesurant entre 2 et 6 µM de long et 0,4 à 0,5 µm de large (Figure 24). *Aquifex aeolicus* est une bactérie hyperthermophile chimiolithoautotrophe obligatoire cultivée à 85°C.

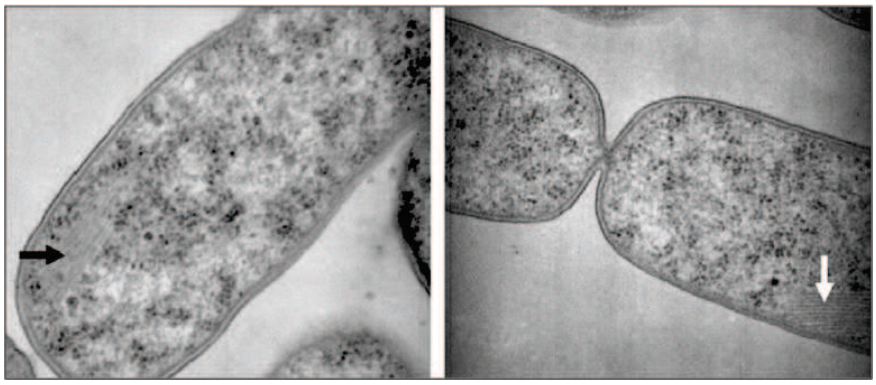


Figure 24 : Cellules d'*Aquifex aeolicus* vues par microscopie électronique à transmission. Les flèches pointent des structures membranaires non identifiées (reproduit de (Guiral et al., 2012))

1.3.2 Une diversité des métabolismes

En tant que bactérie chimiolithoautotrophe obligatoire, *Aquifex aeolicus* nécessite la présence simultanée d'hydrogène, d'oxygène, de dioxyde de carbone et de soufre pour sa croissance. Son métabolisme versatile peut utiliser les composés oxydés et réduits du soufre, mais aussi l'oxygène et l'hydrogène comme substrats énergétiques. Il est probable que ces voies ne fonctionnent pas simultanément, mais permettent une adaptation à différents

environnements, dans lesquels les concentrations en nutriments (oxygène, hydrogène, composés soufrés) peuvent fluctuer.

Les enzymes du métabolisme énergétique *d'Aquifex aeolicus* lui permettent d'utiliser plusieurs donneurs d'électrons (H_2, H_2S) afin de réduire différents accepteur d'électrons (O_2, S^0). Trois voies métaboliques ont été clairement identifiées (Figures 25 A, B, C) (Guiral et al., 2009), (Guiral et al., 2012):

- La voie hydrogène-soufre élémentaire (H_2/S^0)

  En présence de soufre élémentaire, *Aquifex aeolicus* réalise la réduction du soufre. L'hydrogénase II catalyse la réduction du pool de quinone *via* l'oxydation de l'hydrogène. Le transfert d'électrons entre ces deux complexes implique des quinones.

- La voie sulfure d'hydrogène-oxygène (H_2S/O_2)

  La Sulfure Quinone Réductase (SQR) associe l'oxydation du sulfure d'hydrogène à la réduction de l'oxygène *via* le complexe *bc*1 et une cytochrome *c* oxydase.

- La voie hydrogène-oxygène (H_2/O_2)

  L'hydrogénase I (MbH1) catalyse la réduction du pool de quinones par l'oxydation de l'hydrogène. Les électrons sont transférés au complexe *bc*1 puis à une cytochrome *c* oxydase, siège de la réaction de réduction de l'oxygène en eau. Cette voie qui utilise l'hydrogène comme donneur d'électrons et l'oxygène comme accepteur d'électron final est appelée réaction knallgas (Figure 25C).

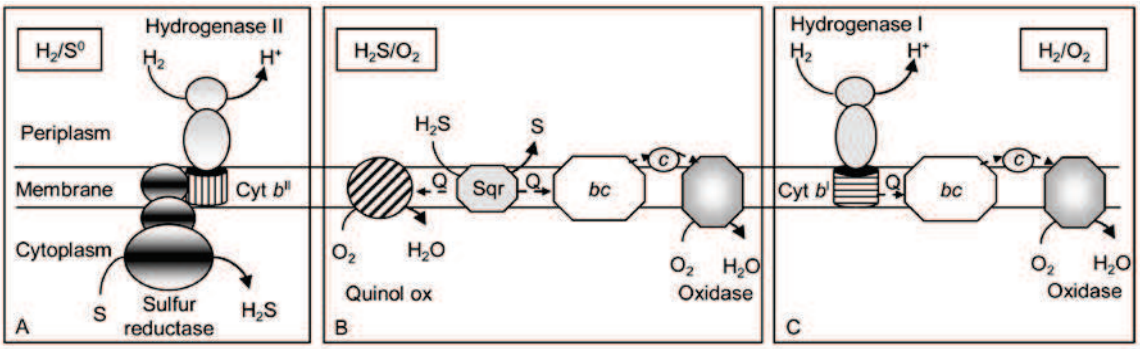


Figure 25 : Modèle de transfert d'électron dans les membranes d'*Aquifex aeolicus* (reproduit de (Guiral et al., 2009)). Cyt *b*I et Cyt *b*II désignent les cytochromes *b*I et cytochrome *b*II, respectivement. Oxidase désigne la cytochrome *c* oxidase, Quinol ox la *bd* quinol oxydase, *bc* le complexe *bc*1, *c* le cytochrome monohémique *c*555, Sqr la Sulfite quinone réductase, Q le pool de quinone et S^0 le soufre élémentaire.

En plus de ces trois voies métaboliques, les voies d'oxydation du thiosulfate et du soufre élémentaire couplées à la réduction de l'oxygène peuvent être proposées par analyse bioinformatique des séquences du génome.

1.3.3 *Le métabolisme de l'hydrogène*

Le métabolisme de l'hydrogène chez *Aquifex aeolicus* fait intervenir trois hydrogénases [Ni-Fe] qui ont été identifiées par notre équipe. Deux d'entre elles ont été purifiées et caractérisées biochimiquement. Les hydrogénases I et II sont membranaires, ancrées à la membrane par un cytochrome de type *b*, leur site actif étant exposé dans le périplasme. Ces hydrogénases I et II appartiennent au groupe I de la classification des hydrogénases et seraient impliquées dans la production d'énergie. L'hydrogénase III est soluble dans le périplasme et appartiendrait au groupe II des senseurs d'hydrogène.

1.3.3.1 *Hydrogénase I (Mbh1)*

L'hydrogénase membranaire I de 133 kDa, est constituée de 3 sous unités (Brugna-Guiral et al., 2003) :

- La grande sous unité catalytique de 72 kDa portant le centre actif [Ni-Fe]
- La petite sous unité de 39 kDa assurant le transfert des électrons *via* trois centres [Fe-S]

- Le cytochrome de type b^{I} dihémique (appelé dans la suite de ce manuscrit cyt *b*) de 22 kDa permettant l'ancrage dans la membrane

Il a été proposé que cette hydrogénase soit impliquée dans le transfert d'électrons jusqu'à l'accepteur terminal, l'oxygène.

1.3.3.2 Hydrogénase II

L'hydrogénase II est constituée par :

- La grande sous unité catalytique de 65 kDa portant le centre actif [Ni-Fe]
- La petite sous unité de 38 kDa assurant le transfert des électrons *via* trois centres [Fe-S]
- Le cytochrome de type b^{II} dihémique de 26 kDa permettant l'ancrage dans la membrane. Ce cytochrome est peu commun, et n'est retrouvé que chez peu très peu d'organismes (Guiral et al., 2012). Le potentiels des hèmes, plus positifs que ceux du cyt *b* est en accord avec une implication dans la réduction d'espèces soufrées (Pandelia et al., 2012).

L'hydrogénase II couple l'oxydation de l'hydrogène, à la réduction d'un pool de quinone *via* le cytochrome b^{II}. Elle serait impliquée dans le métabolisme énergétique du soufre (Guiral et al., 2005a). Cette hydrogénase n'a cependant jamais été purifiée à ce jour.

1.3.3.3 Hydrogénase III

L'hydrogénase III soluble de 80 kDa comprend deux sous unités (Brugna-Guiral et al., 2003):

- La grande sous unité catalytique de 50 kDa portant le centre actif [Ni-Fe]
- La petite sous unité de 30 kDa assurant le transfert des électrons *via* trois centres [Fe-S]

Cette hydrogénase n'aurait pas de rôle énergétique. L'analyse phylogénétique l'associe au groupe II des hydrogénases [Ni-Fe] en tant que senseur d'hydrogène. Sa tolérance à l'oxygène s'explique par la modification du canal d'accès au centre actif.

La caractérisation biochimique des hydrogénases I et III a montré qu'elles étaient tolérantes à l'O_2. Les propriétés moléculaires de l'hydrogénase I (MbH1) ont été étudiées par notre équipe, et en collaboration avec le Pr W. Lubitz du Max Plank Institute (Mülheim, Allemagne). Elle est naturellement tolérante à la température, à l'oxygène et au monoxyde de carbone, ce qui en fait un objet d'étude particulièrement intéressant en vue de la compréhension des bases moléculaires de la tolérance aux inhibiteurs, mais aussi de son intégration dans des procédés biotechnologiques.

1.4 MbH1 : une hydrogénase super-tolérante

1.4.1 Propriétés structurales

La structure de l'hydrogénase [Ni-Fe] membranaire de groupe I *d'Aquifex aeolicus* (MbH1) n'a pas encore été résolue. Cependant, comme les autres hydrogénases [Ni-Fe] du groupe I, elle est constituée d'une grande sous unité catalytique et d'une petite sous unité portant trois centres [Fe-S]. La partie C-terminale de la petite sous unité comprend une hélice transmembranaire qui interagit étroitement avec un cytochrome dihémique de type b^{I} (cyt *b*) membranaire, l'ancrant ainsi à la membrane (Brugna-Guiral et al., 2003).

1.4.2 Mécanisme d'oxydation catalytique de l'hydrogène

Le mécanisme d'oxydation de l'hydrogène par l'hydrogénase d'*Aquifex aeolicus* MbH1 a tout d'abord été mis en évidence par des tests d'activité spectrophotométriques en présence de médiateurs redox (bleu de méthylène et méthylviologène) (Brugna-Guiral et al., 2003). Contrairement aux hydrogénases sensibles à l'oxygène qui sont capables d'oxyder l'hydrogène et réduire les protons, aucune activité de réduction des protons n'a été observée chez MbH1. Ce biais est un phénotype partagé par toutes les hydrogénases tolérantes à l'oxygène. Les origines de ce biais catalytique font l'objet d'études fondamentales récentes (Abou Hamdan et al., 2012).

Le mécanisme d'oxydation catalytique de l'hydrogène par l'hydrogénase peut être également caractérisé par électrochimie. Le flux d'électrons issu de la réaction enzymatique est alors mesuré sous forme de courant. Jusqu'au début des années 90, le comportement électrochimique des hydrogénases était limité à une analyse de la catalyse dite homogène en solution, en présence d'un médiateur redox physiologique ou artificiel échangeant les

électrons avec l'interface électrochimique (Haladjian et al., 1987), (Hoogvliet et al., 1988). Le principe de la mesure électrochimique est dans ce cas très similaire à la mesure d'activité spectrophotométrique en solution. La variation de l'absorption est simplement remplacée par le suivi du transfert d'électrons sur le médiateur redox, qui seul interagit avec l'électrode. La réaction enzymatique est détectée comme un courant résultant du recyclage du médiateur à l'électrode (Schéma 1).

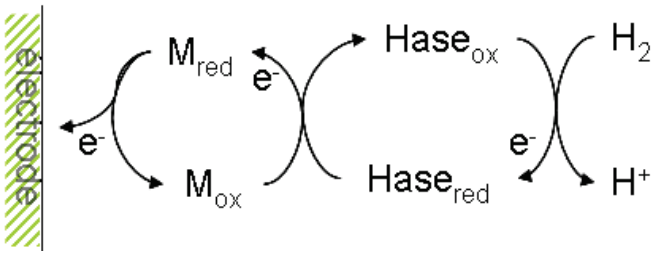


Schéma 1 : Mécanisme catalytique d'oxydation de l'hydrogène par l'hydrogénase en présence d'un médiateur redox M.

C'est à partir du milieu des années 90 que la catalyse hétérogène s'est développée pour étudier les hydrogénases, en partant du principe que l'enzyme s'adsorbait très facilement à l'électrode de graphite pyrolytique (PG) (Varfolomeyev et al., 1993), (Pershad et al., 1999). En présence de substrat, le signal catalytique observé a alors été attribué à un échange d'électrons direct entre l'enzyme et l'électrode, sans médiateurs redox. Cette méthodologie, connue aujourd'hui sous le nom de PVF pour « Protein Film Voltametry » a conduit à des avancées essentielles quant à la compréhension des mécanismes catalytiques et d'inhibition impliquant les hydrogénases (Vincent et al., 2007). Elle permet une mesure de l'activité enzymatique sous forme d'un courant électrique, tout en contrôlant le potentiel électrique, qui détermine l'état redox de l'enzyme (Schéma 2).

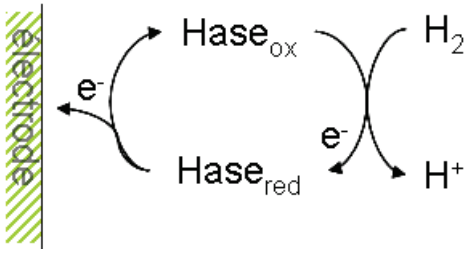


Schéma 2 : Mécanisme catalytique d'oxydation de l'hydrogène par l'hydrogénase adsorbée sur électrode.

Il s'avère cependant qu'une diminution du signal au cours du temps est systématiquement observée (nous verrons plus loin comment y remédier). De plus lorsque

l'hydrogène est remplacé par de l'azote ou du monoxyde de carbone dans la cellule électrochimique, aucun signal non catalytique n'est visible, rendant impossible la quantification de l'enzyme adsorbée sur l'électrode. Ainsi, il est impossible de déterminer les constantes cinétiques de la réaction catalytique impliquant l'enzyme.

Dans notre équipe, les premières études électrochimiques impliquant MbH1 ont mis en évidence en 2009 l'activité d'oxydation directe de l'hydrogène par l'enzyme adsorbée sur électrode de PG (Luo et al., 2009). La figure 23 donne un voltamogramme caractéristique de l'oxydation de l'H_2 à 60°C par MbH1 adsorbée sur PG. L'enzyme commence à oxyder l'hydrogène avec une surtension supérieure à 100 mV par rapport au potentiel thermodynamique du couple H_2/H^+. Ce processus intervient environ 100 mV plus haut que celui impliquant l'hydrogénase sensible à l'oxygène de *Desulfovibrio fructosovorans* (Figure 26). Une hystérèse se produit à -250mV lorsque l'activité de l'hydrogénase diminue. Cela correspond à l'inactivation anaérobie réversible due à la formation de l'espèce Ni-B inactive du site actif à haut potentiel. La même inhibition est observée chez les hydrogénases sensibles à l'oxygène mais à un potentiel plus bas. Au balayage retour, l'enzyme se réactive. Un paramètre E_{Switch} est associé à cette réactivation qui sera discuté plus loin dans ce mémoire.

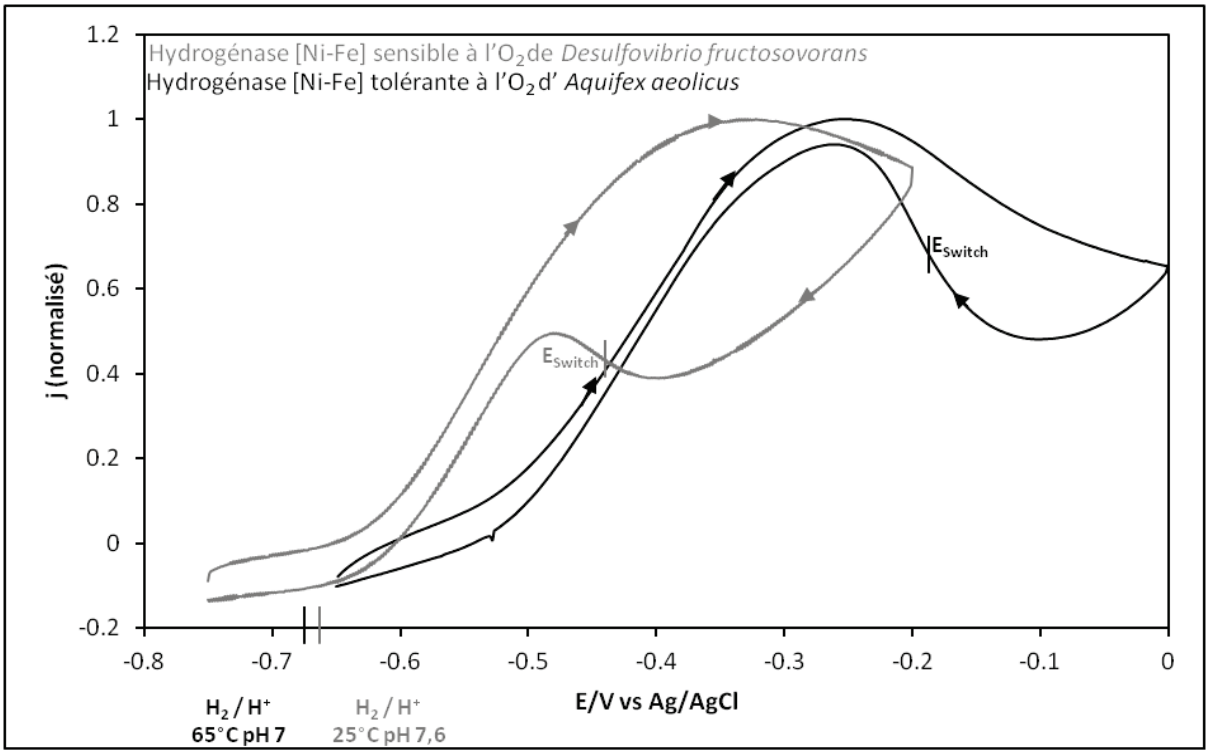


Figure 26 : Comparatif des CV des hydrogénases d'*Aquifex aeolicus* et de *Desulfovibrio fructosovorans*. Les flèches désignent le sens de la rampe de potentiel. Les marqueurs gris et noir sur l'axe des potentiels

désignent les potentiels thermodynamiques du couple H_2/H^+ à 25°C, pH 7,6 pour *Desulfovibrio fructosovorans* et 65 °C, pH 6,8 pour *Aquifex aeolicus* respectivement

1.4.3 Une hydrogénase active à haute température

L'hyperthermophilie de la bactérie *Aquifex aeolicus* se reflète sur les enzymes impliquées dans son métabolisme énergétique. Ainsi il a été démontré que l'hydrogénase [Ni-Fe] membranaire MbH1 est active pour l'oxydation de l'hydrogène dans une large gamme de température s'étalant de 20 à 90 °C. L'activité elle-même est modulée par la température et son optimum se situe à 80 °C (Brugna-Guiral et al., 2003). La stabilité de l'enzyme en fonction de la température est mise en relief par l'évolution de la densité de courant catalytique relative à l'oxydation de l'hydrogène en fonction de la température (Figure 27) (Luo et al., 2009).

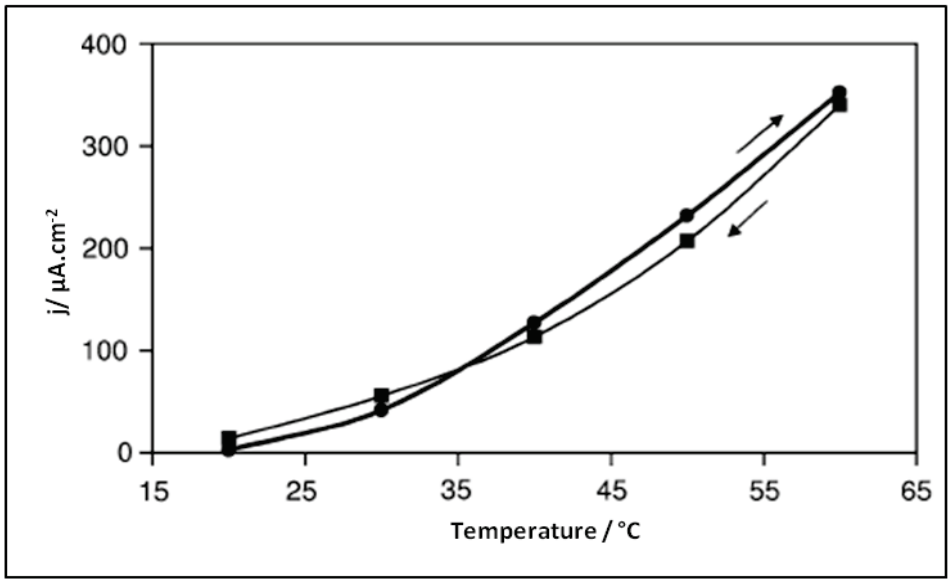


Figure 27 : Evolution de la densité de courant catalytique en fonction de la température pour MbH1. Tampon Hepes 50 mM pH 6,8. (reproduit de (Luo et al., 2009))

1.4.4 Une hydrogénase tolérante au CO

Le monoxyde de carbone est un inhibiteur compétitif des hydrogénases [Ni-Fe] sensibles à l'oxygène. Cependant, il a été démontré que les hydrogénases [Ni-Fe] tolérantes à l'oxygène de *Ralstonia eutropha* et *Escherichia coli* sont tolérantes au CO (Vincent et al., 2005), (Lukey et al., 2010). MbH1 partage cette tolérance au CO, qui a été mise en évidence par électrochimie. En effet, l'addition d'une solution saturée en CO au cours de l'oxydation

catalytique de l'hydrogène par MbH1 adsorbée sur PG, n'entraîne aucune diminution de l'activité électrocatalytique (Figure 28) (Luo et al., 2009).

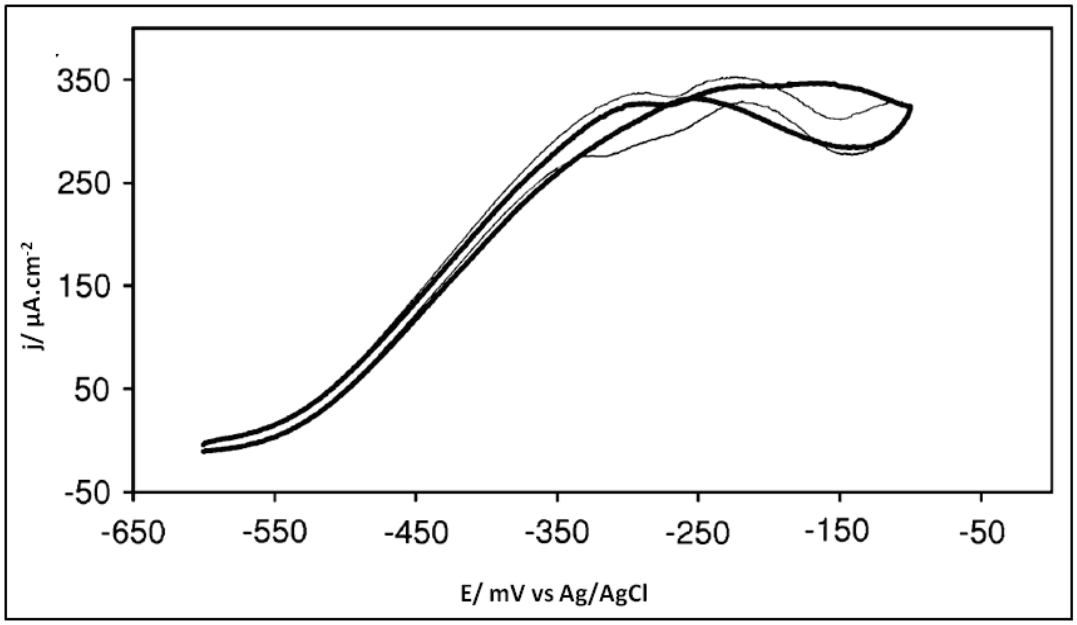


Figure 28 : CV de l'oxydation de l'hydrogène par MbH1 avant (ligne fine) et après (ligne épaisse) addition d'une solution saturée en CO. Tampon Hepes 50 mM pH 6,8, 60°C. (reproduit de (Luo et al., 2009))

A la suite de ces premières expériences, il a été montré par spectroscopie FTIR, que le CO se lie uniquement au site actif sous sa forme Ni-SI. Ces études ont démontré que l'interaction entre le CO et l'atome de nickel du site actif est faible. Les auteurs concluent que la tolérance de MbH1 au CO provient d'un effet synergique entre la faible liaison du CO sur l'atome de nickel et la présence de résidus aminés à proximité du site actif qui pourraient affecter la cinétique de liaison et de relargage du CO (Pandelia et al., 2010b).

1.4.5 Une hydrogénase tolérante à l'oxygène

La première preuve de tolérance de MbH1 à l'oxygène date de 2006 (Guiral et al., 2006). Des mesures d'activité en solution en présence de médiateurs redox révélaient une activité d'oxydation de l'H_2 maintenue après exposition prolongée de MbH1 à l'air. Cette tolérance a ensuite été confirmée et quantifiée par électrochimie après adsorption de MbH1 sur électrode de PG (Luo et al., 2009). De façon notable, l'addition d'O_2 dans la cellule électrochimique n'inactive pas irréversiblement l'activité d'oxydation de l'hydrogène, contrairement à ce qui était observé en utilisant les hydrogénases [Ni-Fe] solubles et sensibles à l'O_2 (Figures 29 A et B).

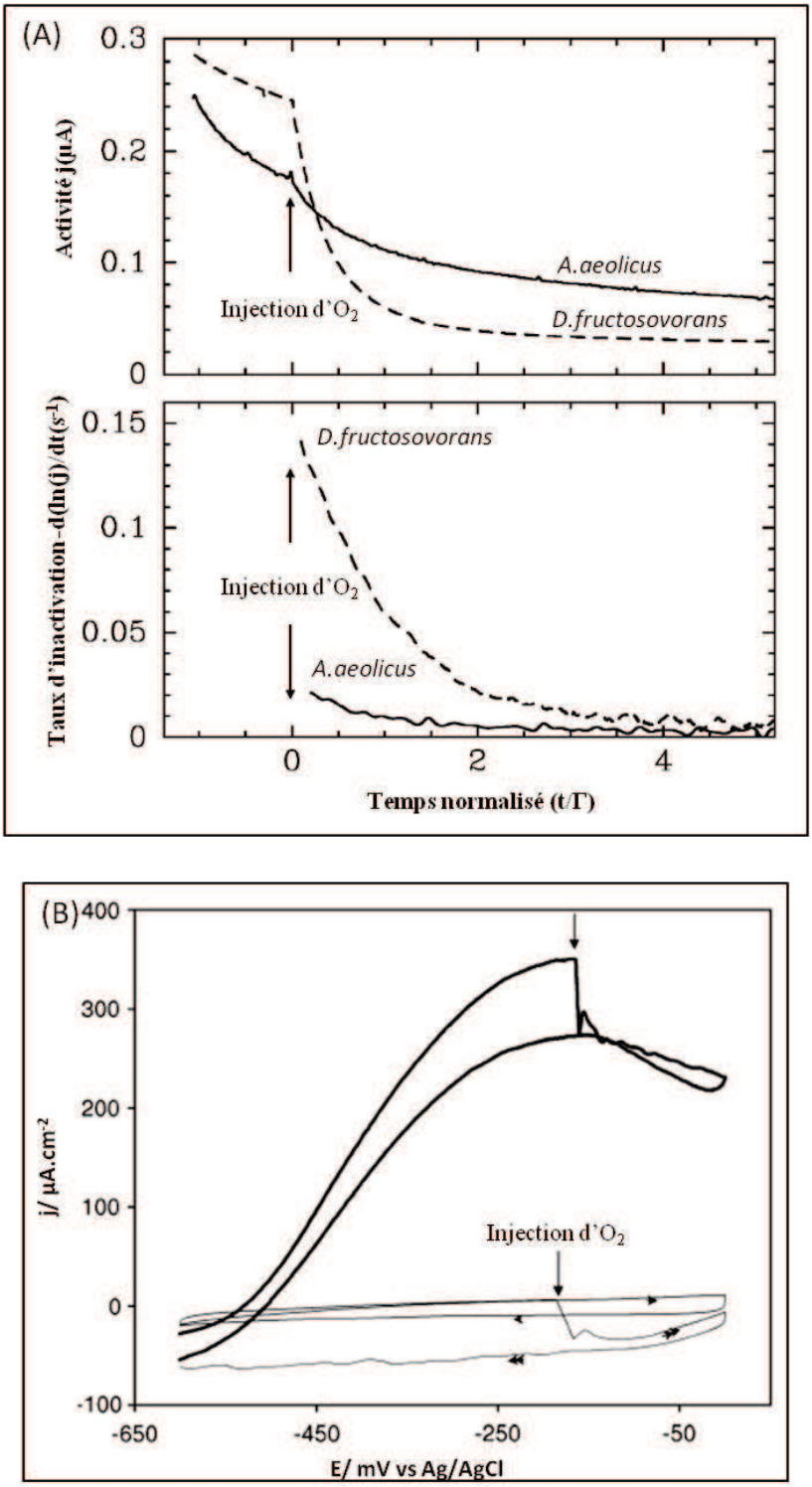


Figure 29: (A) Comparatif de l'inhibition par l'oxygène de l'hydrogénase d'*Aquifex aeolicus* tolérante à l'oxygène et de *Desulfovibrio fructosovorans* sensible à l'oxygène (reproduit de (Guiral et al., 2006)). (B) CV de l'oxydation de l'hydrogène par MbH1 (ligne épaisse) en présence d'O_2 (la flèche désigne l'injection d'une solution saturée en oxygène). CV de l'électrode sans enzyme (ligne fine) en présence d'oxygène (la flèche désigne l'injection de la solution saturée en oxygène). (reproduit de (Luo et al., 2009)). Tampon Hepes 50 mM pH 6,8, 60°C.

Il a été montré par spectroscopie FTIR que seule l'espèce inactive Ni-B, rapidement réactivable est formée lorsque MbH1 est exposée à l'oxygène (Pandelia et al., 2010a). Ce phénotype est donc partagé avec les autres hydrogénases tolérantes à l'O_2. Une étude mécanistique plus poussée a montré que la cinétique d'inactivation par l'oxygène est identique à celle des hydrogénases sensibles à l'oxygène, mais la cinétique de réactivation est plus rapide de deux ordres de grandeur.

Le potentiel « E_{switch} » a été défini comme le point d'inflexion sur le voltamogramme (Figure 23), à partir duquel l'enzyme se réactive lors des balayages cathodiques (Jones et al., 2003). Il constitue un marqueur phénoménologique de la tolérance à l'oxygène. Il a été constaté que les valeurs de E_{Switch} sont plus hautes de 200 mV chez les hydrogénases tolérantes de *Ralstonia eutropha* et *Escherichia coli* par rapport au hydrogénases sensibles à l'oxygène. La valeur de E_{Switch} de MbH1 est également repoussée de 200 mV vers les potentiels positifs par rapport aux hydrogénases sensibles à l'oxygène (Luo et al., 2009), (Fourmond et al., 2010). Il a été démontré que la cinétique de formation de l'espèce Ni-B est indépendante du potentiel de l'électrode, mais que la cinétique de réactivation augmente lorsque le potentiel diminue.

La figure 30 compare les potentiels de transition redox du site actif et des centres [Fe-S] de MbH1 par rapport à ceux de l'hydrogénase sensible à l'oxygène de *Desulfovibrio fructosovorans*. Les potentiels redox des centres [Fe-S] titrés par spectroscopie RPE, se révèlent, comme chez les autres hydrogénases tolérantes (*Ralstonia eutropha, Ralstonia metallidurans*), plus positifs que ceux des hydrogénases sensibles (Pandelia et al., 2011). Le potentiel du couple Ni-B/Ni-SI titré par RPE, est aussi 100 mV plus élevé que celui des hydrogénases sensibles à l'oxygène (Pandelia et al., 2010a).

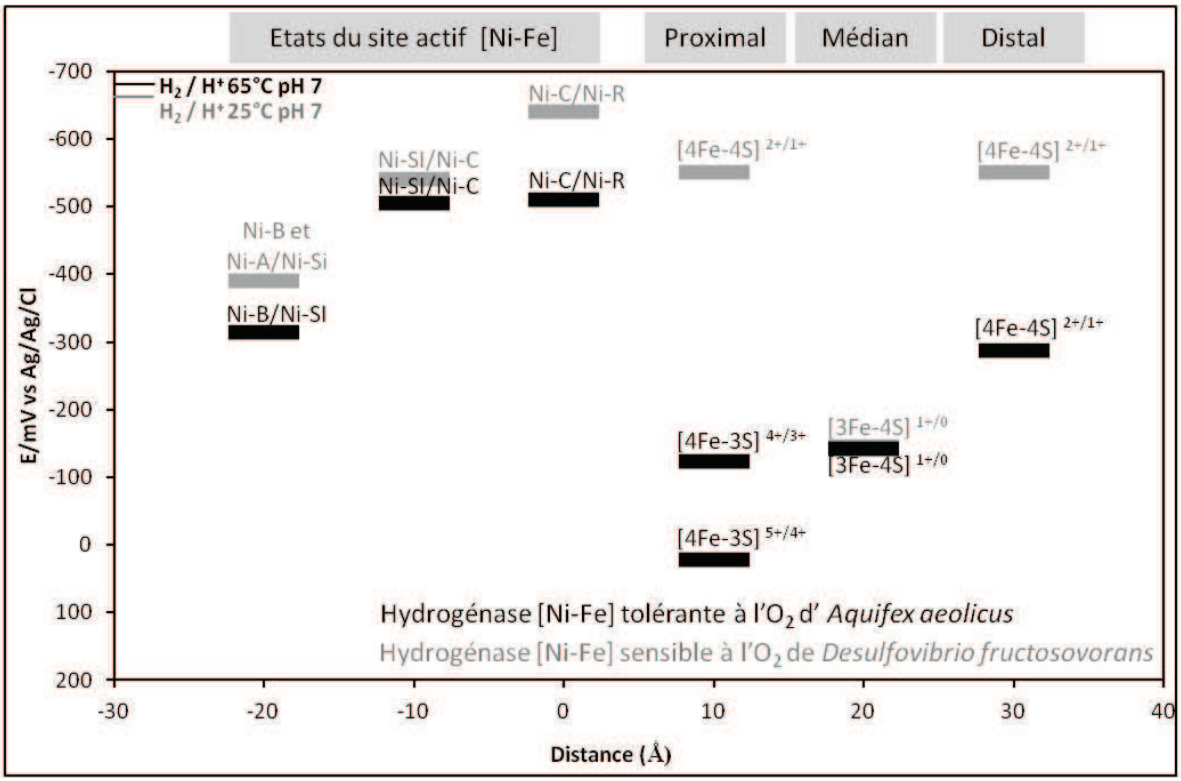


Figure 30: Comparatif des potentiels de transition redox des centres métalliques de l'hydrogénase d'*Aquifex aeolicus* tolérante à l'oxygène et de *Desulfovibrio fructosovorans* sensible à l'oxygène. Par souci de lisibilité les 3 états du site actif ont été positionnés à 0, -10 et -20 Å mais doivent être centrés sur 0 Å.

De plus, l'analyse de la séquence protéique de l'hydrogénase MbH1 identifie la présence du motif de fixation comprenant six cystéines [**CXCC** X_{93-94} **C**X_4 **C**X_{28-30}**C**] (Pandelia et al., 2012), qui induit *a priori* chez MbH1 la conformation atypique du centre [4Fe-3S] proximal observée chez les autres hydrogénases tolérantes à l'O_2. Ce centre [Fe-S] est proposé comme étant responsable de la tolérance à l'O_2.

A partir de ces informations cinétiques, le cycle catalytique de l'oxydation de l'H_2 par l'hydrogénase d'*Aquifex aeolicus* a été proposé (Figure 31) (Pandelia et al., 2010a) :

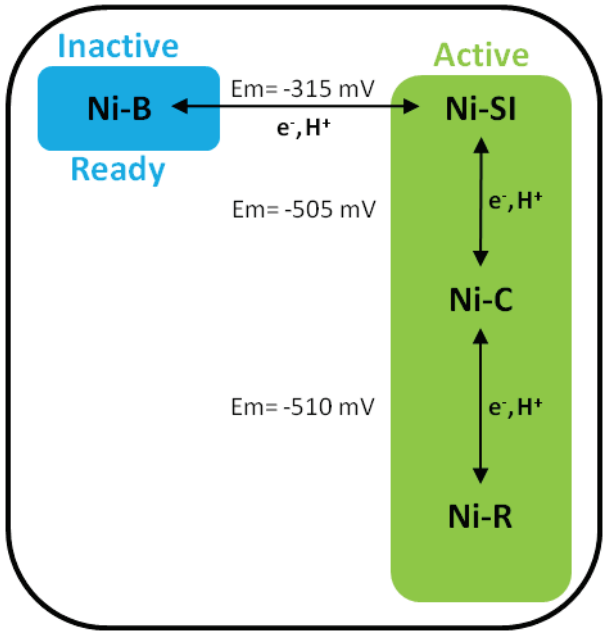


Figure 31: Cycle catalytique proposé pour MbH1. Les potentiels sont reportés par rapport à l'électrode de référence Ag/AgCl. (adapté de (Pandelia et al., 2010a))

1.5 Conclusion

L'hydrogénase [Ni-Fe] mbH1 dispose d'un arsenal de tolérances, T°, CO, oxygène, qui rend son utilisation en tant que biocatalyseur particulièrement attrayante en biotechnologies, et en particulier au sein de biopiles à combustible. Sa tolérance à l'oxygène l'autorise à être utilisée en présence du comburant dans une biopile originale H_2/O_2. Sa tolérance au CO permettrait d'alimenter la biopile en hydrogène non purifié, produit par la biomasse. Enfin sa capacité à être active dans une large gamme de température permettrait sont utilisation dans des environnements variés.

Cependant, l'utilisation d'une enzyme dans des procédés biotechnologiques impose d'autres contraintes que ces tolérances. Les métabolismes énergétiques reposent sur des organisations de chaînes de transfert d'électrons hautement organisées. On est très loin de la simple adsorption de l'enzyme utilisée en électrochimie pour la compréhension des mécanismes catalytiques. La suite de ce chapitre bibliographique se propose donc d'examiner comment l'électrode peut être utilisée comme partenaire de l'enzyme pour reconstituer une chaîne de transfert d'électrons. L'accent sera mis sur la nécessité du contrôle de l'orientation de l'enzyme à l'interface électrochimique afin d'optimiser le transfert d'électrons, à l'instar du transfert d'électrons physiologique.

2. L'ÉLECTRODE, PARTENAIRE PHYSIOLOGIQUE DE L'ENZYME

2.1 Historique et objectifs généraux de l'immobilisation d'une enzyme sur une interface électrochimique

Les réactions d'oxydoréduction impliquées dans le transfert d'électrons entre plusieurs partenaires sont à la base de la vie sur terre. Ces réactions de transfert de charges sont assurées par une grande variété de protéines et de petites molécules redox. Elles sont à la base de la production d'énergie dans la cellule. Ainsi les processus de photosynthèse et de respiration impliquent des chaînes de transfert d'électrons complexes entre plusieurs protéines redox, afin de produire de l'énergie.

La chaîne respiratoire mitochondriale est probablement l'un des systèmes impliquant des transferts électroniques intra et intermoléculaire entre les différents complexes qui a été le plus étudié. Elle couple un transfert électronique à partir d'un donneur primaire d'électron tel que le NADH ou le succinate *via* différents complexes protéiques membranaires (I à IV) jusqu'à l'oxygène moléculaire (Figure 32). Un transfert de protons à travers la membrane est lié à ce transfert électronique, créant une force proton motrice mise à profit par l'ATP synthase (complexe V) pour la création d'Adénosine Tri-Phosphate (ATP).

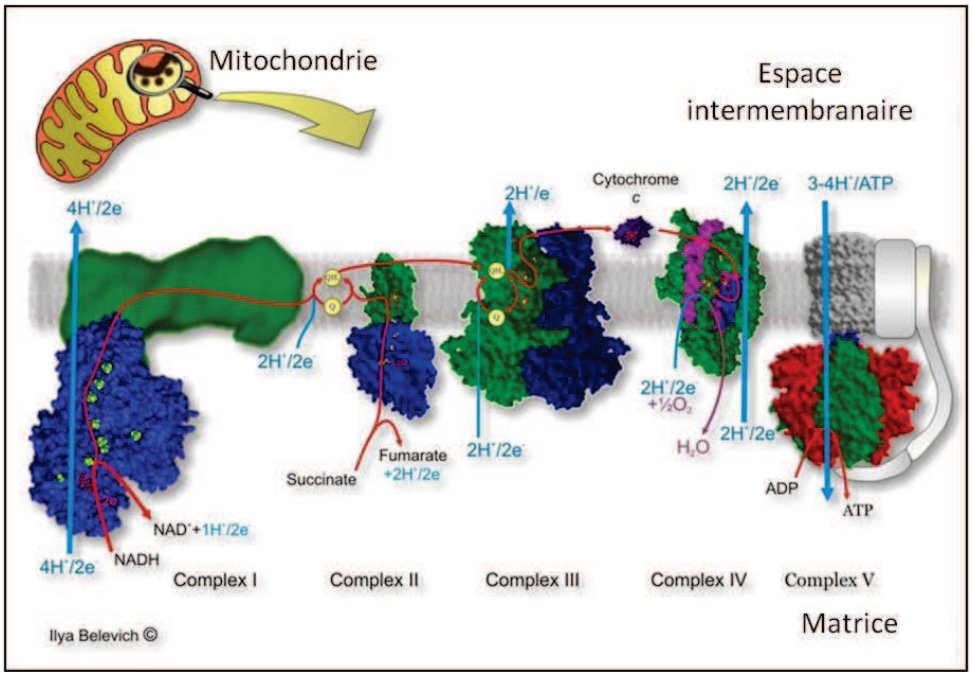


Figure 32 : Représentation de la chaîne respiratoire mitochondriale. Le flux électronique est représenté par les flèches rouges, le gradient de protons transmembranaire par des flèches bleues.

Depuis une trentaine d'années, la bioélectrochimie a pour but de lier les aspects cinétiques et thermodynamiques du transfert électronique aux propriétés fonctionnelles et structurales des protéines. Les techniques électrochimiques, voltamétrie, chronoampérométrie, spectroscopie d'impédance complexe, sont communément utilisées pour les petites molécules redox, et permettent d'accéder à la fois aux données cinétiques et thermodynamiques : constantes de vitesse de transfert électronique intra et intermoléculaires, potentiel redox, constantes de complexation…. L'application de ces mêmes techniques aux protéines et enzymes redox est bien plus délicate, d'autant plus quand il s'agit d'enzymes multi-centres de haut poids moléculaire.

Les toutes premières expériences de bioélectrochimie impliquant des protéines redox faisaient état d'une forte propension à l'adsorption irréversible, voire à la dénaturation, sur l'interface électrochimique. L'utilisation d'électrodes à mercure sur lesquelles l'espèce redox était fortement adsorbée n'était effectivement pas favorable à la stabilité interfaciale de l'objet biologique (Betso et al., 1972). La diversification des matériaux d'électrodes, mais aussi l'amélioration des appareils de mesure en termes de temps de réponse et de rapport signal/bruit, a permis dans les années 80 de quantifier le transfert d'électrons entre une petite protéine hémique, le cytochrome *c*, et diverses électrodes métalliques (Frew et al., 1988), puis des électrodes de graphite (Armstrong et al., 1988). Si la stabilité de la protéine à l'interface électrochimique demeure un enjeu de taille, la seconde limitation des techniques électrochimiques pour l'étude des protéines redox est liée à la taille des protéines et enzymes (proche de 10 nm) et à leur squelette constitué de résidus acides aminés (les protéines ont des masses de quelques kDa à plusieurs centaines de kDa), véritables freins au transfert d'électrons entre l'interface électrochimique et le site actif. Jusque dans les années 90, il était communément admis que le transfert d'électrons entre une protéine et une électrode serait impossible, sauf pour les protéines de masse inférieure à 10 kDa, dont le site actif était suffisamment accessible au solvant. Les avancées dans les domaines de l'électronique, de l'électrochimie, mais aussi de la biologie structurale, ont peu à peu permis d'établir des connections électriques efficaces entre des protéines de plus en plus en plus complexes, mais aussi souvent des interfaces de plus en plus élaborées.

La bioélectrochimie apparaît ainsi comme une méthode de choix pour caractériser les enzymes, et en particulier leur fonction, complémentaires des méthodes spectroscopiques et biochimiques. Une des idées forte et séduisante est de considérer la surface de l'électrode comme le partenaire physiologique de l'enzyme, premier ou dernier accepteur d'électrons

d'une chaîne de transport d'électrons physiologique, électrode qu'il s'agit de modifier pour mimer les processus physiologiques liant deux protéines, ou une protéine et son environnement. Actuellement pourtant, malgré un intérêt croissant dans la technique de « Protein Film Voltametry », le nombre de protéines étudiées reste assez limité et n'excèderait pas quarante (Gulaboski et al., 2011). En particulier, un grand nombre d'enzymes redox reste encore insondables *via* l'électrochimie. Ces échecs mettent en lumière la difficulté, mais aussi le véritable chalenge, que constitue l'immobilisation fonctionnelle d'une enzyme sur une interface électrochimique.

Au cours de ce chapitre, je déclinerai les différentes techniques d'immobilisation des enzymes sur une électrode. Certaines de ces techniques pourront permettre d'envisager l'électrode comme le mime d'un environnement physiologique de l'enzyme. Par la suite, je présenterai des exemples de reconstitution de chaînes de transfert d'électrons entre différents partenaires protéiques à l'interface électrochimique. Je décrirai les limites du transfert d'électrons interfacial entre les enzymes et l'électrode. Pour finir, je présenterai des exemples d'orientations contrôlées d'enzymes sur l'interface électrochimique.

2.2 Procédures d'immobilisation

Les protéines sont des édifices moléculaires hautement organisés. Elles sont formées par une chaîne polypeptidique constituée d'un enchainement linéaire d'acides aminés aux propriétés physicochimiques variées: résidus hydrophobes, hydrophiles, chargés positivement ou négativement, polaires ou apolaires. Cette chaîne polypeptidique se replie sur elle-même par un réseau de liaisons hydrogène pour former des structures secondaires de forme hélicoïdale (hélices α) ou de forme plane plus ou moins distordue (feuillets β) (Figure 33).

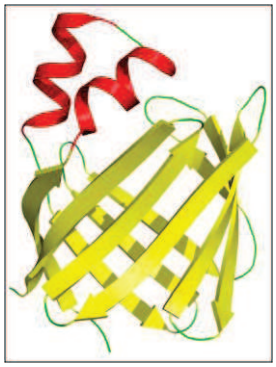


Figure 33 : Représentation des structures secondaires d'une protéine : les hélices α sont représentées en rouge, les feuillets β en jaune, et les boucles en vert.

Ces structures secondaires s'auto-assemblent en structure tertiaire par la formation de ponts salins, la maximisation des interactions hydrophobes, l'optimisation de leurs interactions avec le solvant, et parfois la formation de ponts disulfures. La structure tertiaire correspondant à la structure finale de la protéine, lui confère un cœur hydrophobe et une surface généralement chargée (par des résidus acides ou basiques) qui lui permet de former des liaisons hydrogène avec le solvant.

Le repliement correct de la protéine garantit son activité catalytique. Le site actif est souvent enfoui au sein du cœur hydrophobe de la protéine, et peut être constitué par des acides aminés situés sur des zones différentes de la chaîne polypeptidique qui se colocalisent lors du repliement en un site tridimensionnel, souvent accompagné de cofacteur organique, inorganique, métallique ou un mélange de ces derniers. La structure de la protéine peut également contenir des domaines flexibles nécessaires à l'activité catalytique, permettant la diffusion des substrats ou des produits.

Le mode de repliement des protéines reflète les conditions garantes de leur activité et de leur stabilité *in vivo*. Les protéines sont donc des entités biologiques à « manipuler avec soin » : en condition physiologique, la différence d'énergie libre entre une protéine native et une protéine dénaturée est de seulement 40 kJ/mol (Rubenwolf et al., 2011). L'amélioration des protocoles et des techniques de purification, ont permis la production de protéines plus stables en solution. Néanmoins, l'extraction d'une protéine de son environnement physiologique pour l'immobiliser sur un support solide peut lui être néfaste.

A titre d'exemple, il a été montré par dichroïsme circulaire et spectroscopie de fluorescence que l'anhydrase carbonique humaine immobilisée sur nanoparticules de silice, se dénaturait. Le site actif est le premier à être dénaturé, suivi par la structure tertiaire de la protéine (Karlsson et al., 2005). De même, une étude couplée dichroïsme circulaire /spectroscopie de fluorescence de l'adsorption du cyt *c*, et de la DNAse II sur nanoparticules de silice met en évidence une modification des ratios hélices α/feuillets β, pouvant diminuer l'activité des enzymes jusqu'à 75 % (Figure 34) (Xu et al.).

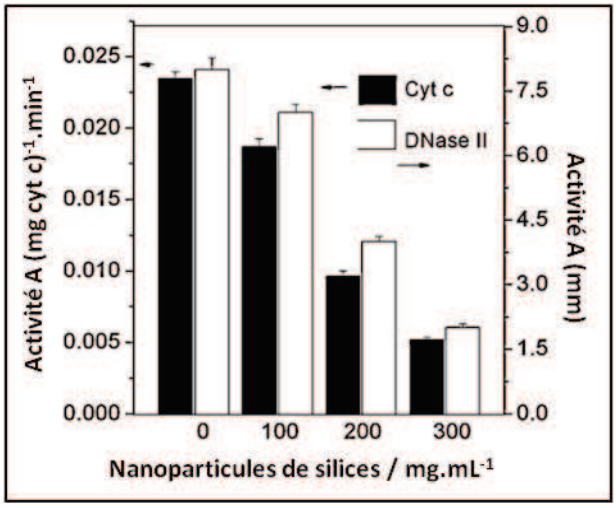


Figure 34 : Activité peroxydase du cyt *c* et désoxyribonucléase de la DNase II en fonction de la concentration en nanoparticules de silices.

D'importants changements structuraux des hélices α ont aussi été constatés sur le lysozyme adsorbé sur des nanoparticules de silice. L'importance de ces changements structuraux est dépendante de la taille des nanoparticules (Vertegel et al., 2004). La même relation entre la perte d'activité et de la taille de la nanoparticule a été observée pour la ribonucléase A adsorbée. La perte d'activité constatée est de 10 % sur des nanoparticules de 4 nm contre 30 % sur des nanoparticules de 15 nm (Shang et al., 2007). Enfin, l'adsorption de la chymotrypsine sur différents polymères hydrophobes a été étudiée par fluorescence, dichroïsme circulaire et spectroscopie RAMAN. Il a été montré que l'enzyme se dénaturait à 80 % avec une perte des structures secondaires et tertiaires (Lahari et al., 2009).

En revanche, l'immobilisation de la pénicilline G acylase covalemment sur une membrane de PVC induit une stabilisation de l'enzyme. Sa température et son pH optimum de fonctionnement ne sont pas altérés par l'immobilisation, et de plus l'enzyme tolère une plus grande variabilité dans la gamme de pH et de température. A titre d'exemple, l'enzyme en solution perd 55 % à 60°C, tandis que l'enzyme immobilisée conserve 75 % de son activité dans les mêmes conditions (Eldin et al., 2012). De la même manière, l'alpha-amylase présente une stabilité accrue à la température et au pH lorsqu'elle est immobilisée sur des billes de dextran et ne concède que 5 % de son activité (Jadhav et al., 2012). Dans le but de réaliser un biocatalyseur de trans-estérification, la lipase a été immobilisée sur des nanofibres de silice. Dans ces conditions, l'activité de la lipase immobilisée est 15 fois supérieure à celle de la lipase en solution. 90 % de l'activité à été conservée pendant 15 jours d'utilisation continue du biocatalyseur (Sakai et al., 2012).

Ces exemples, bien que non exhaustifs, mettent en avant l'effet de l'immobilisation sur la structure et l'activité des protéines, effet fortement dépendant de la nanostructure du support, et bien sur de la protéine elle-même.

L'étape de confinement de l'enzyme sur une électrode doit donc satisfaire plusieurs conditions:

- La structure de la protéine doit être préservée, garantissant son activité
- Le site actif doit être accessible pour une connexion électrique efficace
- Les substrats et produits doivent pouvoir diffuser
- La protéine doit restée fixée sur son support
- La protéine doit être stabilisée à long terme
- Le dépôt d'enzyme doit être contrôlé, reproductible et si possible quantifié.

De nombreuses techniques d'immobilisation d'enzymes peuvent être envisagées, telles que l'adsorption, le couplage covalent, l'encapsulation ou l'affinité. La littérature récente en offre des revues assez exhaustives (Talbert et al., 2012), (Sassolas et al., 2012), (Xiao-Yu et al., 2012), (Hanefeld et al., 2009). Le choix judicieux de la technique d'immobilisation dépend de la nature de l'enzyme, de son environnement physiologique et de l'utilisation finale de la bioélectrode (étude fondamentale ou applications biotechnologiques).

2.2.1 Adsorption

L'adsorption d'une enzyme sur une électrode est la méthode la plus simple à mettre en œuvre et donc la plus largement répandue. L'électrode est trempée pour un temps défini dans une solution homogène d'enzyme. Les enzymes faiblement ou non adsorbées sont éliminées par simple rinçage. L'efficacité de cette méthode dépend des caractéristiques du support telles que la taille des pores, leurs formes, les propriétés hydrophiles et/ou hydrophobes ainsi que des conditions expérimentales de l'absorption (force ionique, pH, T°…). Il en résulte une adsorption de la protéine basée sur des interactions faibles, de type Van der Walls, électrostatiques ou hydrophobes.

Les électrodes modifiées d'or et de carbone ainsi que les électrodes de graphite pyrolytique, permettent généralement d'accéder aux conditions requises par la protéine pour mimer des conditions physiologiques douces, et sont donc couramment utilisées en bioélectrochimie. Les électrodes de graphite pyrolytique en particulier sont *a priori*

d'utilisation simple, et apparaissent souvent bien adaptées à l'adsorption non dénaturante des protéines. A la différence des surfaces de graphite de type basal, où les plans de graphite continus offrent une surface relativement plane, les surfaces de type « edge » offrent une surface poreuse et hautement fonctionnalisée. Ces surfaces ont été caractérisées en termes de porosité et de fonctions chimiques (Blanford et al., 2006). La quantification de la distribution de la taille des pores permet de montrer que 10 % des pores ont une taille supérieure à 10 nm, compatible avec la taille de la plupart de protéines (Figure 35).

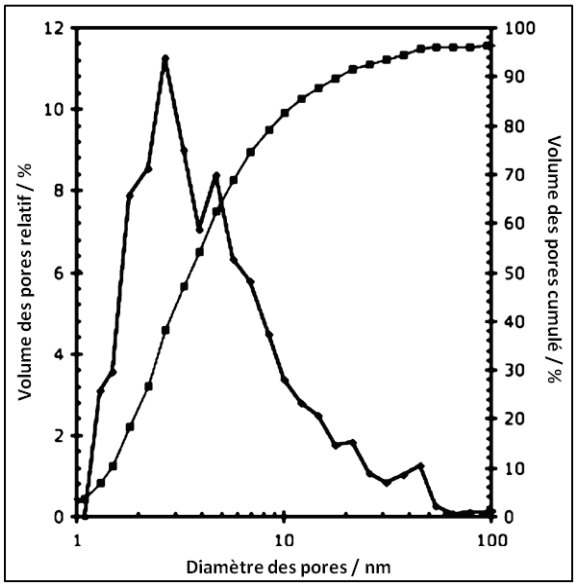


Figure 35 : Distribution du diamètre des pores générés par le polissage au papier émeri P 800 d'une électrode de graphite pyrolytique (reproduit de (Blanford et al., 2006)).

Ces pores portent des fonctions alcools et carboxyliques en surface qui autorisent des interactions électrostatiques et la formation de liaisons hydrogène avec les acides aminés chargés positivement de la protéine. Les électrodes de graphite pyrolytique, permettent ainsi l'accroche efficace, simple et en une étape d'une grande variété de protéines.

La surface des électrodes peut être préalablement modifiée afin de favoriser un type particulier d'interaction enzyme/électrode. La formation de monocouches auto assemblées (Self Assembled Monolayers en anglais, ou SAM) à la surface des électrodes d'or est particulièrement utile à cette fin (Schéma 3). La formation de la SAM se base sur l'utilisation de dérivés thiolés. Ceux-ci comprennent une fonction d'accroche à une extrémité, séparée par un bras espaceur alkyl de longueur contrôlée, ou par un cycle benzénique, et à l'autre extrémité, un groupement de fonction choisie (alcool, amine, hydroxyle, alkyl etc.). Le groupement d'accroche thiol présente une forte affinité pour la surface d'or et permet la

formation d'une liaison S-Au par physisorption, puis chimisorption. En fonction des conditions expérimentales et des précurseurs thiolés, une monocouche compacte peut se former à la surface de l'électrode d'or. La fonction terminale détermine les propriétés de la SAM qui vont régir l'interaction avec l'enzyme lors de l'adsorption.

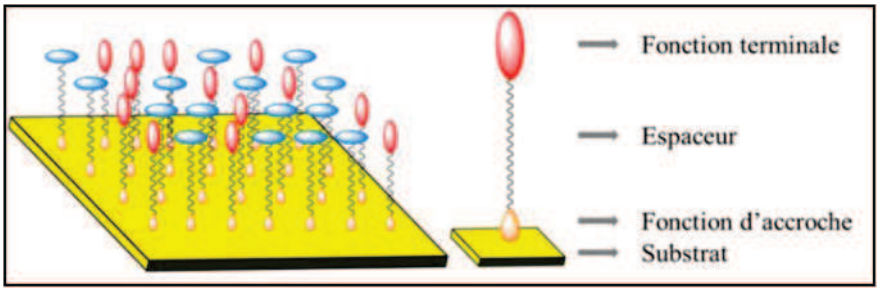


Schéma 3 : Schématisation d'une SAM

Une méthode plus simple de préfonctionnalisation des surfaces, consiste à déposer des films minces de polymères chargés sur l'électrode. La poly(lysine) (PLL), la polymixin, ou encore le poly(éthylèneimine) (PEI) ont ainsi été utilisés pour modifier la charge des graphites pyrolytiques. Ces polymères portent des fonctions amines qui permettront l'adsorption de l'enzyme grâce à des interactions électrostatiques favorables.

L'immobilisation des enzymes par interaction électrostatique peut être effectuée par la méthode de déposition couche par couche (Layer-by-Layer en anglais, ou LBL). Cette technique consiste à alterner des couches de polyélectrolyte avec des couches d'enzymes de charges opposées (Schéma 4). Les polycations les plus couramment utilisés pour la formation des LBL sont le PLL, le PEI, le poly(allylamine), le poly(dimethyldiallylammonium) et le chitosane. Les polyanions tels que les poly(styrènesulfonate), poly(vinylsulfonate), poly(anylinepropanesulfonic acid), poly(acylic acid) et poly(methacrylic acid) sont les plus couramment utilisés. Les édifices ont pu être caractérisés en couplant l'électrochimie à la microbalance à quartz. Dans certains cas, des monocouches d'enzymes ont effectivement été mises en évidence, intercalées par des couches de polyions. Ce procédé, très simple à mettre en œuvre, soufre néanmoins d'un transfert d'électrons très vite ralenti à travers les couches successives non conductrices. Un manque de stabilité de l'édifice est également souvent observé, lié aux forces de liaison mises en jeu entre chaque couche qui induisent un décrochage partiel (Lojou et al., 2003).

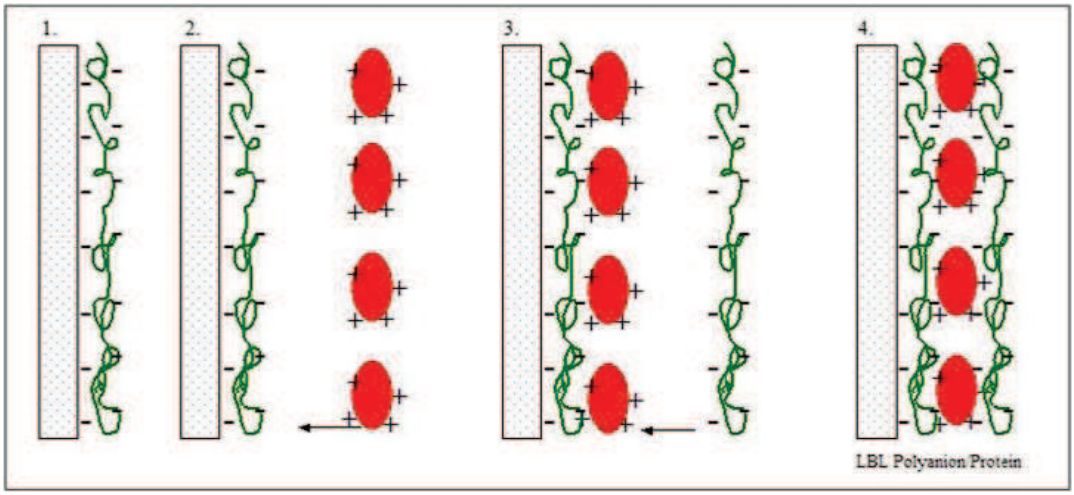


Schéma 4 : Schématisation de l'architecture LBL pour l'assemblage sur une électrode de protéines basiques sur des couches de polyanions

Enfin, les enzymes contenant des thiols (portés pas des résidus cystéine) à leur surface peuvent être directement immobilisées par chimisorption sur une surface d'or. L'insertion de cystéines à la surface de la protéine par mutagénèse dirigée permet alternativement de créer un point d'accroche spécifique sur l'enzyme.

Globalement, les principales limitations du procédé d'adsorption (Schéma 5) proviennent de la non spécificité de l'immobilisation et de la désorption des protéines facilitée par les changements de température, de pH ou de force ionique. Il en résulte souvent un manque de stabilité dans le temps. L'utilisation de solvant organique peut être envisagée pour éviter la désorption en jouant sur l'insolubilité intrinsèque des protéines dans ces milieux. L'activité enzymatique est cependant souvent affectée en milieu non aqueux.

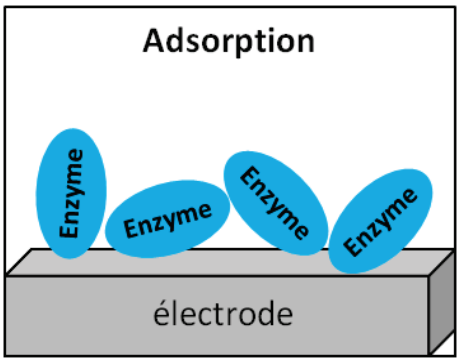


Schéma 5 : Schéma représentant l'adsorption d'une enzyme sur électrode

2.2.2 Couplage covalent

Le couplage covalent est une méthode très efficace pour greffer les protéines à l'électrode. C'est une méthode largement éprouvée qui a l'avantage de réprimer la désorption et d'être utilisable sans modifier préalablement l'enzyme. Plusieurs mises en œuvre du couplage covalent existent : activation des groupements carboxyliques, amines, sulfhydryles, carbonyles.

Les carbodiimides permettent le couplage des fonctions carboxyliques aux fonctions amines primaires, résultant en une liaison amide. Les fonctions carboxyliques C-terminales, ainsi que les chaînes latérales des acides aminés aspartique et glutamique, sont la cible de cette réaction sur la protéine. A l'inverse, ce sont les fonctions carboxyliques de l'électrode (si elle en possède ou peut en être pourvue) qui peuvent être activées pour réagir avec les chaînes latérales amines des résidus lysine ou arginine (Schéma 6).

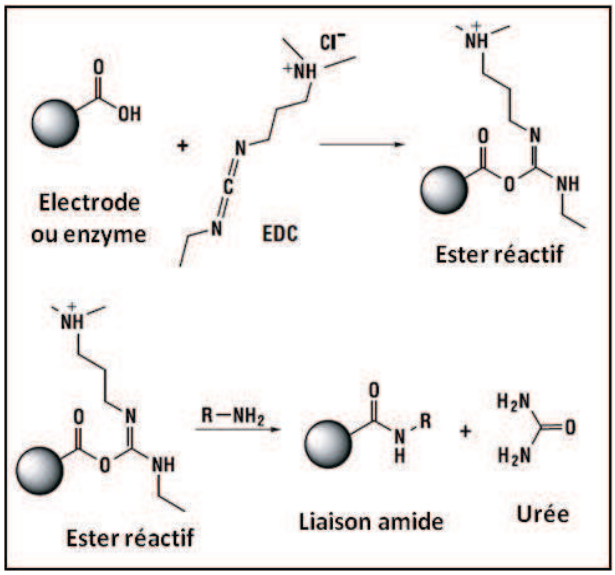


Schéma 6 : Schéma représentant le couplage covalent par activation des fonctions carboxyliques au carbodiimide.

Les hydrazides réagissent avec les groupements carbonyles pour former une liaison hydrazone (Schéma 7). Les groupements carbonyles ne sont pas présents naturellement dans les protéines mais peuvent être générés par oxydation des parties glycolysées des enzymes, en cétones ou aldéhydes.

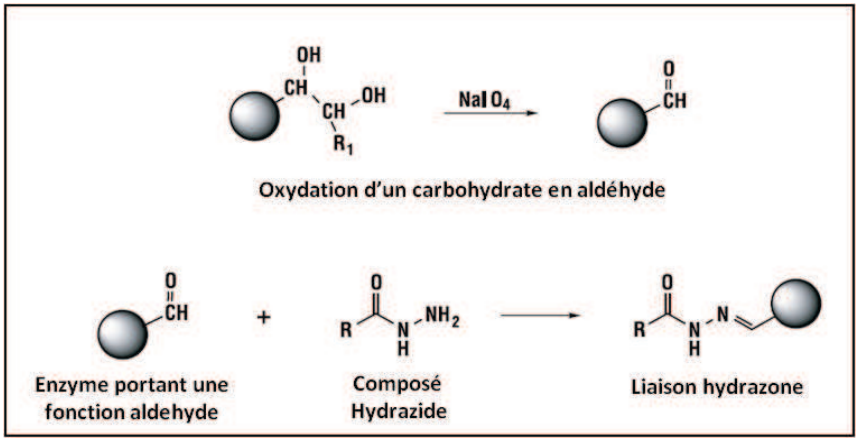


Schéma 7 : Schéma représentant le couplage covalent par activation des groupements aldéhydes par un hydrazide.

Les maléimides, haloacétyles et pyridyl disulfures réagissent avec les groupements sulfhydriles, donnant une liaison thioether pour les deux premiers composés, et un pont disulfure pour le dernier (Schéma 8). Les groupements sulfhydriles sont portés par les acides aminés cystéine potentiellement exposés à sa surface. Alternativement l'électrode peut être modifiée de sorte qu'elle porte les groupements sulfhydriles.

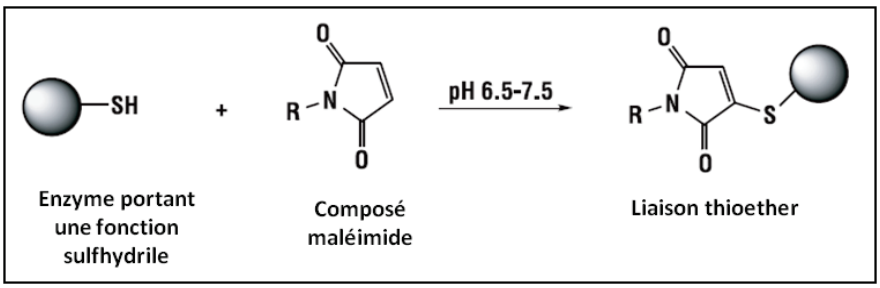


Schéma 8 : Schéma représentant le couplage covalent par activation des groupements sulfhydrile par un composé maléimide.

Les imidoesters et N-hydroxysuccinimide esters (NHS esters) se couplent avec les amines primaires pour former une liaison amidine (Schéma 9).

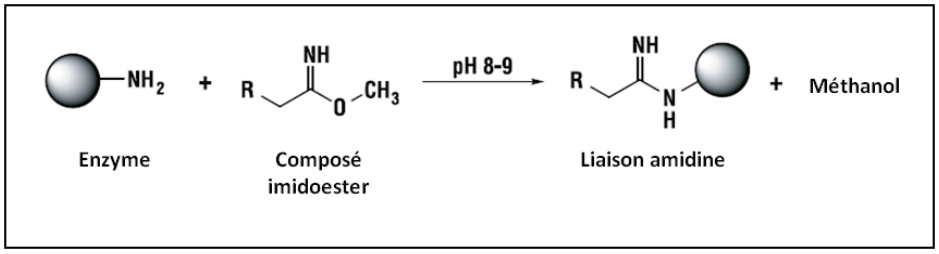


Schéma 9: Schéma représentant le couplage covalent par activation des groupements amine par un composé imidoester.

Les SAMs peuvent être utilisées comme modification du support avant un couplage covalent entre l'enzyme et la fonction terminale (carboxylique ou amine) du dérivé thiolé. On peut également modifier un support carboné grâce à des sels de diazonium qui peuvent porter un groupement terminal de fonction choisie (carboxylique, amine, hydroxyle, méthyle) (Schéma 10).

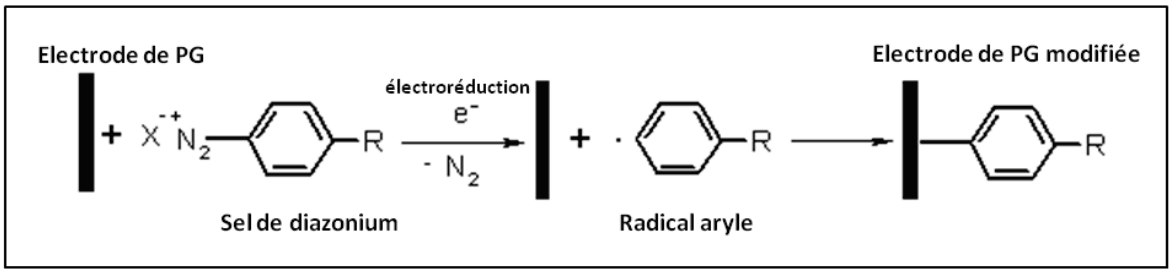


Schéma 10: Modification d'une électrode par réduction de sels de diazonium

De manière générale, le couplage covalent permet de rigidifier la protéine en limitant ses degrés de liberté. Les enzymes sont physiquement stabilisées et la désorption très limitée. La formation de plusieurs liaisons covalentes entre l'enzyme et le support réduit la flexibilité conformationnelle de l'enzyme et peut prévenir sa dénaturation. Cependant l'enzyme doit être capable de supporter la chimie permettant le greffage covalent. En ce qui concerne l'activité de l'enzyme, aucune règle ne peut être établie. Un examen bibliographique met en évidence que l'activité est parfois diminuée, souvent peu affectée, et dans quelques cas améliorée.

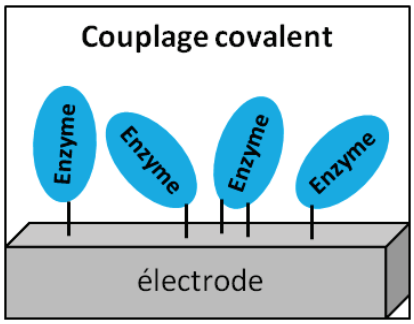


Schéma 11 : Schéma représentant l'immobilisation covalente d'une enzyme sur électrode

2.2.3 Cross-linking

L'immobilisation d'enzymes par des agents de couplage bi-fonctionnel tel que le glutaraldéhyde est une approche bien connue (Schéma 12). Les enzymes sont soit couplées entre elles ou avec des protéines inertes comme la Bovine Serum Albumin (BSA). Cette méthode simple et efficace assure une accroche très forte entre les protéines. Cependant la

conformation de l'enzyme ainsi que le site actif, sont souvent fortement altérés par un tel traitement, et la diminution d'activité est parfois drastique.

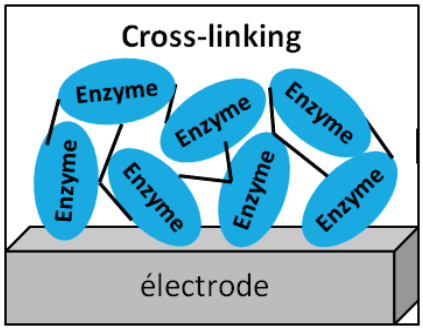


Schéma 12 : Schéma représentant l'immobilisation covalente d'une enzyme par crosslinking.

2.2.4 Encapsulation

L'encapsulation est une technique récente qui permet de préserver la protéine à l'intérieur d'un réseau tridimensionnel (Schéma 13). Le procédé d'immobilisation permet la co-déposition de molécules additionnelles avec l'enzyme au sein de la matrice. L'intégrité de la protéine n'est pas affectée par le processus ce qui lui permet *a priori* de conserver son activité. Différents types de réseau peuvent être utilisés tels que les polymères redox, les polysaccharides, les pâtes de carbone ou les sol-gels.

L'électropolymérisation consiste à tremper le support dans une solution contenant l'enzyme et le monomère. Après application d'un potentiel propice à la polymérisation, le film polymère est formé à la surface de support tout en encapsulant les enzymes. Le potentiel de polymérisation est un paramètre essentiel qui ne doit pas interférer avec l'enzyme. L'épaisseur du film polymère, qui peut être conducteur, est contrôlable par simple coulométrie. Généralement, l'immobilisation au sein de polymères nécessite une grande quantité d'enzyme. Le relargage de celle-ci est fréquent, et la diffusion des produits et substrats à l'intérieur du réseau est souvent limitante.

Les polysaccharides (agarose, chitosane, alginate), contrairement aux polymères synthétiques, fournissent aux enzymes une matrice biocompatible et non toxique. Ils souffrent cependant d'une forte porosité et d'une faible stabilité qui induisent un relargage de l'enzyme.

La pâte de carbone a été largement utilisée dans la conception d'électrodes. Mélangée à l'enzyme et à des molécules additionnelles (médiateurs rédox) si nécessaires, la pâte de carbone permet un transfert électronique efficace. C'est une technique simple à mettre en

œuvre, qui demande néanmoins une grande quantité d'enzyme. De plus, la rétention d'oxygène au sein de la pâte est un inconvénient majeur pour l'immobilisation d'enzymes fonctionnant en anaérobie ou à bas potentiel.

L'immobilisation fonctionnelle d'enzymes dans des sol-gels apparaît comme une technique prometteuse, encore peu explorée. L'enzyme est en effet encapsulée avec des contraintes moindres que dans des polymères et dans des conditions plus douces. Les procédés sol-gel apparaissent comme une solution alternative d'obtention de matrices dont la composition et la microstructure peuvent être contrôlées au niveau moléculaire. Ce procédé se base sur des étapes d'hydrolyse/condensation de précurseurs alcoolates de silicium par exemple, pour donner une matrice macromoléculaire. L'encapsulation de protéines, enzymes voire de cellules dans des matériaux sol-gel a en particulier mis en évidence que : 1- l'activité de la protéine était maintenue, 2- la porosité contrôlée permettait une encapsulation efficace et la diffusion de petites molécules (les médiateurs par exemple) vers les sites actifs protéiques. L'addition de nanotubes de carbone à ces matrices sol-gel permet aujourd'hui d'envisager une encapsulation durable des enzymes tout en assurant un transfert d'électrons direct entre l'enzyme et l'électrode (Walcarius et al., 2009).

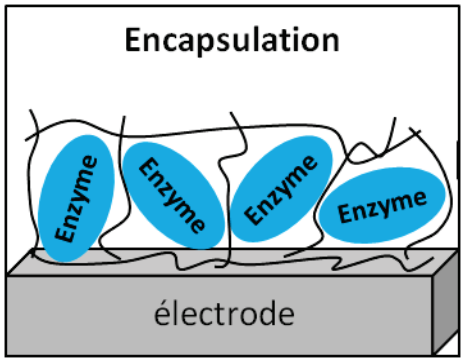


Schéma 13 : Schéma représentant l'immobilisation d'une enzyme par encapsulation.

2.2.5 Affinité

Selon l'utilisation du biomatériau, il peut être parfois nécessaire d'orienter l'enzyme par un site spécifique sur le support (Schéma 14). Ce site peut être inhérent à l'enzyme ou artificiellement introduit par ingénierie des protéines. La stratégie consiste à insérer une étiquette d'affinité sur l'enzyme qui reconnaîtra son partenaire immobilisé sur le support. Plusieurs types d'affinité sont utilisés:

- Biologique : en tirant parti de l'affinité naturelle entre la biotine et l'avidine par exemple (constante de dissociation de 10^{-15}M). La protéine est biotinylée par ingénierie des protéines, et le support est modifié par l'avidine.
- Chélation des métaux : l'étiquette constituée d'un enchaînement d'acides aminés histidine (His-Tag) est connue pour sa capacité à lier les cations lors des processus de purification des protéines. Ce type d'affinité est mis en place entre la protéine et son support.

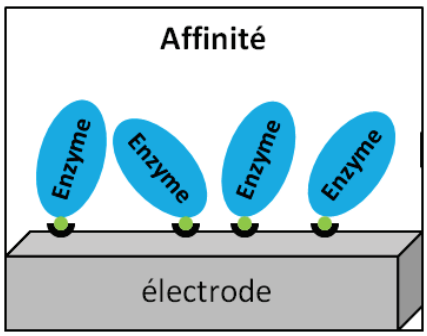


Schéma 14 : Schéma représentant l'immobilisation d'une enzyme par affinité.

La liste des techniques d'immobilisation développées ci-dessus est non exhaustive. Ces techniques peuvent également être combinées en fonction des besoins. Les avantages et inconvénients majeurs des différentes techniques sont décrits dans le tableau ci après.

Techniques d'immobilisation	Nature de la fixation	Avantages	Inconvénients
Adsorption	Liaisons faibles	• Simple et facile • Faible perte d'activité de l'enzyme	• Désorption • Adsorption non-spécifique
Couplage covalent	Pontage chimique entre les groupes fonctionnels de l'enzyme et ceux du support	• Pas de barrière de diffusion • Stable	• Matrice non régénérable • Agent de couplage toxique
Encapsulation	Incorporation de l'enzyme dans un polymère ou un gel	•Absence de réaction chimique entre l'enzyme et le monomère qui pourrait affecter l'activité • Co-immobilisation de plusieurs enzymes ou molécules	• Barrière de diffusion • Relargage de l'enzyme • Hautes concentrations de monomère et d'enzyme pour l'électropolymérisation
Cross-Linking	Pont entre l'enzyme et l'agent de couplage	• Simple	• Grande perte d'activité de l'enzyme
Affinité	Liaisons affines entre un groupement fonctionnel sur le support et une étiquette d'affinité sur la protéine	• Immobilisation contrôlée et orientée	• Nécessité de groupement spécifique sur l'enzyme

Tableau 1 : Récapitulatif des techniques d'immobilisation des protéines synthétisant leurs principaux avantages et inconvénients.

2.3 Augmentation de la concentration en enzymes immobilisées

La nécessité d'augmenter les sensibilités de détection électrochimique dans de nombreux domaines (biocapteurs, biopiles…), ont conduit à la recherche de matrices susceptibles d'augmenter le nombre d'enzymes immobilisées. Toutes les méthodes d'immobilisation décrites ci-dessus pourront s'appliquer pour immobiliser et stabiliser les enzymes sur ces matrices. Ces matrices sont le plus souvent à base de nanoparticules d'or (Pingarron et al., 2008), (Wang, 2012), de carbone (Ouyang et al., 2012) , de mésoporeux d'or (Qin et al., 2008) ou de carbone (Olyveira et al., 2012), (Ramani et al., 2012), (Wang et al., 2012a). Les fibres et nanotubes de carbone (CNTs) sont aujourd'hui très utilisés (Vamvakaki et al., 2007), (Feng et al., 2011), (Holzinger et al., 2012). Dans cette partie, nous décrirons plus spécifiquement l'avantage de l'utilisation des CNTs et leur application pour l'immobilisation de protéines et enzymes variées.

2.3.1 Propriétés des CNTs

La découverte des nanotubes de carbone (CNTs) a permis des avancées considérables dans de nombreux domaines scientifiques, incluant les biocapteurs, la bioélectrochimie,… L'Hydrogène-énergie a lui aussi bénéficié des avantages apportés par les CNTs qui possèdent de remarquables propriétés électroniques, mécaniques et thermiques. La taille nanométrique des CNTs est de plus comparable à celle des enzymes, ce qui permet d'envisager leur connexion électronique. Les CNTs développent de larges surfaces conductrices autorisant la miniaturisation des systèmes dans lesquels ils sont utilisés. On distingue plusieurs types de nanotubes, selon leur géométrie. Les nanotubes de carbone simple paroi (SWCNTs) sont composés de carbone hybridé sp2 en structure de nid d'abeilles, roulé en un tube creux. Les nanotubes de carbone multi parois (MWCNTs) sont composés de plusieurs de ces tubes creux imbriqués de manière concentrique. Selon leur chiralité, les CNTs peuvent être métalliques ou semi conducteurs. La plupart du temps, les échantillons de CNTs sont composés d'un mélange de formes métalliques et semi conductrices (Dresselhaus et al., 2004). En fonction des applications, cette distinction est essentielle, mais la séparation des allotropes reste à ce jour délicate à accomplir. En ce qui concerne les MWCNTs, il suffit qu'une seule des couches de CNTs qui les constitue soit métallique pour que le MWCNT se comporte comme un nanotube métallique. Les CNTs commerciaux sont généralement produits par dépôt chimique en phase vapeur (CVD) durant

la pyrolyse d'hydrocarbures gazeux à haute température. Le contrôle des paramètres de synthèse (gaz, température, catalyseur métallique) contrôle les propriétés des CNTs produits. Des impuretés métalliques peuvent toutefois subsister dans l'échantillon de CNT produit, ce qui impose des étapes de purification. La surface des CNTs peut aussi être traitée et fonctionnalisée.

2.3.2 Utilisation des CNTs pour l'immobilisation d'enzymes et de protéines

De par leurs propriétés de biocompatibilité, de conductivité, et leur taille nanométrique, les CNTs sont largement utilisés lorsqu'il s'agit d'immobiliser des enzymes en grande quantité, dans des procédés biotechnologiques tels que les biocapteurs et les biopiles. Les CNTs forment une matrice conductrice à la surface de l'électrode, qui augmente la surface électroactive. Le diamètre des CNTs (1-10nm) est compatible avec la connexion directe des centres redox des enzymes aux nanotubes. Quelques exemples pertinents de biopiles et de bioélectrodes basées sur des électrodes modifiées par des CNTs sont donnés dans le tableau suivant (Tableau 2).

Techniques d'immobilisation	Biopile	Bioélectrodes	ref
Foret de CNTs	Fructose / O_2 FDH(TED) / Laccase (TED) P = 1.8mW.cm^{-2}		*Miyake, 2011, J. Am. Chem. Soc*
CNTs enroulés d'ADN	Glucose/O_2 Gox(TED) / Laccase (TED) P = 760 µW.cm^{-2}		*Lee, 2011, Biosens. Bioelectron.*
CNTs compressés avec les enzymes	Glucose/O_2 Gox(TED) / Laccase (TED) P = 1.3mW.cm^{-2}		*Zebda, 2011, Nat. Commun.*
CNTs modifiés par du Ferrocenecarboxaldehyde		Gox (TEM) 6mA.cm^{-2}	*Liu, 2012, Biosens. Bioelectron.*
MWCNTs modifiés par de l'anthracène		Laccase (TED) 140µA. cm^{-2}	*Meredith, 2011, ACS. Catalysis.*
SWCNTs modifiés par des sels de diazonium		CDH 500µA. cm^{-2} (TED)	*Tasca, 2011, Anal. Chem.*
SWCNT alignés verticalement modifiés par des dérivés pyrène		Laccase (TED) 400µA. cm^{-2}	*Zloczewska, 2011, Electrochim. Acta.*

Tableau 2 : Exemples de biopiles et de bioélectrodes basées sur des électrodes modifiées par des CNTs.

2.4 L'électrode comme mime d'un environnement protéique

Dans une première approche, l'électrode peut aussi être utilisée pour mimer un environnement protéique, qu'il soit physiologique ou non. Cette approche, axée

principalement sur les applications biotechnologiques, se base sur les conditions d'utilisation finales de l'électrode modifiée par l'enzyme (biocapteur, biorémédiation, biopile). Dans les deux cas, le préalable est que l'enzyme conserve son activité, et donc sa structure native une fois immobilisée sur l'électrode. Ce concept d'électrode comme mime d'un environnement protéique va être illustré par quatre exemples dans des domaines différents.

-1- Modification par des argiles, biorémédiation. La dépollution des sols est un domaine d'application potentiel pour des enzymes réductrices de métaux lourds. En condition anaérobie, les bactéries sulfato réductrices surexpriment des cytochromes de type *c* dans leur membrane externe. Il a été démontré que ces cytochromes c_3 (cyt c_3) tetrahémiques sont impliqués dans le processus de réduction du fer ferrique en fer ferreux selon la réaction :

$$\text{cyt } c_{3ox} + e^- \leftrightarrow \text{cyt } c_{3red}$$

$$\text{cyt } c_{3red} + \text{Fe III} \rightarrow \text{cyt } c_{3ox} + \text{Fe II}$$

Une activité de réduction des métaux lourds tels que l'uranium et le chrome est également démontrée. Cette propriété permet une dépollution des sols par suite d'une moindre mobilité des formes réduites.

Les argiles, déposés en film mince sur l'électrode, permettent de mimer un environnement proche des sols. L'incorporation spontanée des cytochromes dans la matrice argileuse permet ainsi d'évaluer l'efficacité de la réduction des métaux par le cyt c_3 dans des conditions mimant un environnement naturel (Figure 36) (Mousty, 2010).

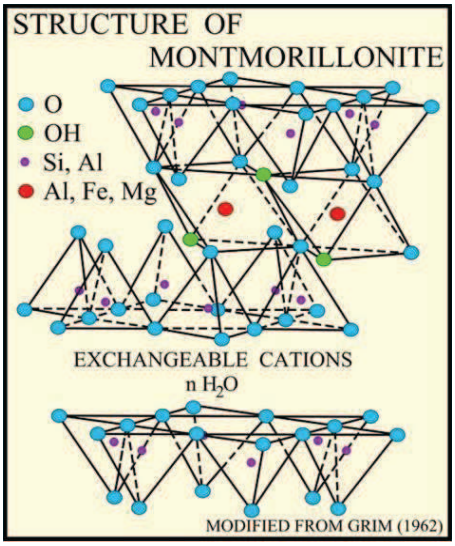


Figure 36 : Structure de la Montmorillonite intercalée avec des cations échangeables.

Le cyt c_3 par exemple a été immobilisé avec succès dans plusieurs argiles (montmorillonite, ocre et kaolinite). La constante de vitesse de réaction entre le cyt c_3 incorporé et le Fe III dans deux argiles différentes (1.5×10^4 $M^{-1}.s^{-1}$ et 4×10^2 $M^{-1}.s^{-1}$ pour la kaolinite et la montmorillonite respectivement), met en évidence la faible activité du cyt c_3 adsorbé dans la montmorillonite (Sallez et al., 2000). Il est démontré que les interactions électrostatiques entre la montmorillonite chargée négativement et le cytochrome fortement basique induisent un changement de conformation de la protéine adsorbée. De plus, les argiles étant peu conductrices, seules les molécules adsorbées sur les arêtes des feuillets sont en contact électrique avec la surface électrochimique. La forte capacité d'encapsulation des argiles restent néanmoins très intéressante dans les cas où une petite molécule diffusante peut servir de navette à électrons.

-2- Modification par des biopolymères. Les polymères d'origine naturelle ont l'avantage d'être biocompatibles et non toxiques. Le chitosane est un polysaccharide obtenu par déacétylation de la chitine, biopolymére largement répandu dans les exosquelettes des crustacées (Schéma 15).

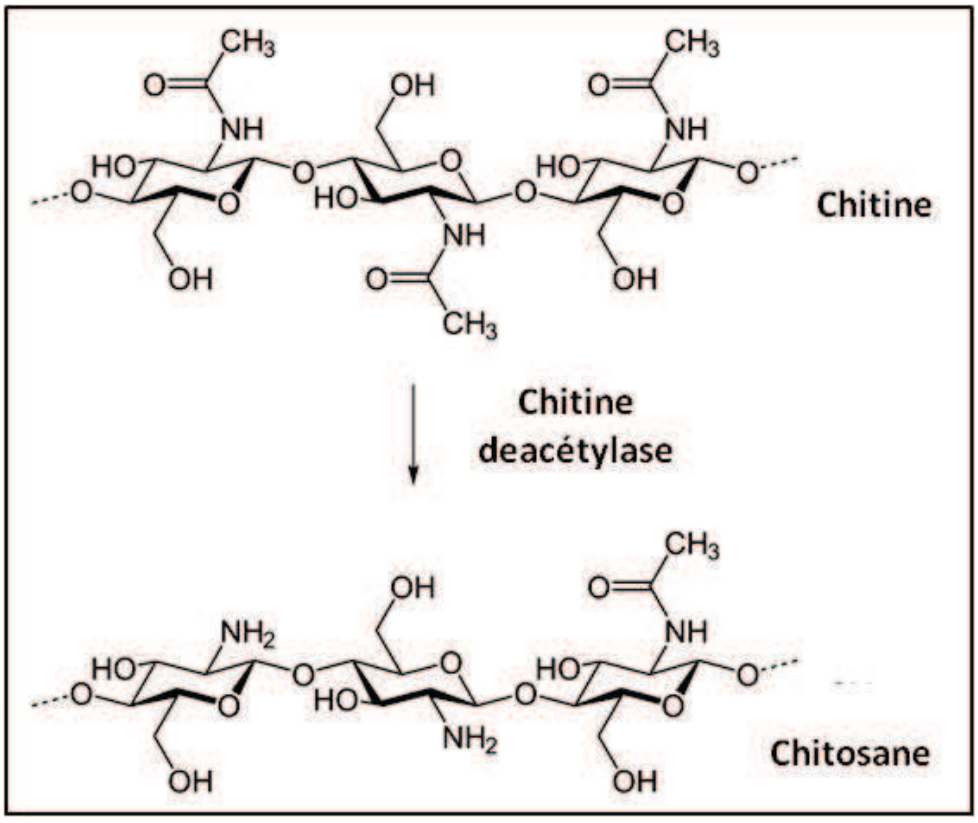


Schéma 15: La déacétylation enzymatique de la chitine produit le chitosane.

Le chitosane est chimiquement inerte, hydrophile, mécaniquement solide et permet la formation de films minces sur supports solides. Il a été utilisé avec succès pour encapsuler des protéines hémiques telles que la myoglobine (Mb), la Horseradish Peroxidase (HRP) et la Catalase (Ct) (Huang et al., 2002). Ces protéines représentent un panel large des propriétés physicochimiques des protéines : leur point isoélectrique varie entre 5,8 pour la Ct et 8,9 pour la HRP, tandis que leur taille varie de 17,8 kDa pour la myoglobine à 240 kDa pour la Ct. Ces protéines préalablement encapsulées dans du chitosane ont été déposées sur une électrode de graphite pyrolytique. L'étude électrochimique met en évidence les signaux caractéristiques de la transition FeIII/FeII des hèmes. La structure secondaire des enzymes est conservée. Les activités catalytiques de ces enzymes envers la réduction de l'oxygène et du peroxyde d'hydrogène sont conservées à l'intérieur des films de chitosane pendant un mois. Il ressort de ces études que le chitosane est un biomatériau particulièrement intéressant pour l'encapsulation stable et efficace de protéines redox. La question de la connexion électrique des protéines à travers la matrice reste cependant ouverte.

-3- Modification par le substrat. La bilirubine oxydase (BOD) est une oxydase multi-cuivre qui catalyse l'oxydation de la bilirubine en biliverdine, couplée à la réduction de l'oxygène en eau. De par sa capacité à réduire efficacement l'oxygène, la BOD est souvent présentée comme un biocatalyseur potentiel dans des bioprocédés type pile à combustible. La résolution de sa structure a mis en évidence la présence de deux acides aminés hydrophiles (une asparagine et une thréonine) proches du site actif cuivre T1, site d'entrée des électrons. Ces deux résidus font partie du site de fixation de la bilirubine. Ces données structurales ont permis d'améliorer l'immobilisation de la BOD sur électrode de graphite pyrolytique (PG). La modification de l'électrode de PG par une couche de bilirubine avant dépôt de la BOD permet de doubler le courant catalytique de réduction de l'oxygène par rapport à une électrode de PG sur laquelle seule la BOD a été immobilisée. Cette méthode d'immobilisation par affinité de la protéine pour son substrat a aussi permis d'augmenter la stabilité dans le temps du courant catalytique de 50 % (Figure 37) (Cracknell et al., 2011).

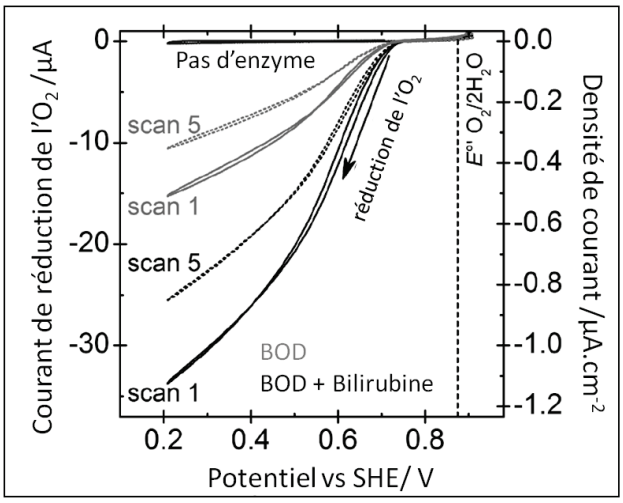


Figure 37: CV représentant l'amélioration du courant catalytique de réduction de l'oxygène obtenue en modifiant l'électrode de PG avec de substrat de la BOD (reproduit de (Cracknell et al., 2011)). Les courbes en gris représentent les CV de la BOD adsorbée sur une électrode de PG nue. Les courbes noires représentent les CV de la BOD adsorbée sur une électrode de PG préalablement modifiée avec de la bilirubine. La ligne en pointillés représente le potentiel thermodynamique de réduction de l'oxygène en eau dans les conditions expérimentales. Tampon phosphate 0,1 M, pH 6,0, T = 25 °C, w = 4000 rpm, v = 10 mV.s^{-1}, 1 bar O_2.

-4- Modification par des membranes lipidiques. Dans un autre domaine, l'étude fondamentale des protéines redox impliquées dans les processus bioénergétiques tels que la respiration et la photosynthèse représente un défi, du fait de la complexité et de la diversité de leurs centres redox ainsi que de leur localisation membranaire. Ces enzymes sont en général difficiles à extraire de la membrane, les étapes de purification sont lourdes et la présence de détergent peut interférer avec les techniques d'investigation. L'étude mécanistique des réactions impliquant ces enzymes par électrochimie, nécessite leur immobilisation fonctionnelle sur électrode. La cytochrome *c* oxydase (Cco) est l'enzyme terminale de la chaîne respiratoire. Elle assure la réaction de réduction de l'oxygène en eau associée à un transfert de protons transmembranaire. Pour contourner la difficulté liée à l'immobilisation, les fragments solubles de ces enzymes membranaires ont été étudiés, comme l'illustre la récente étude du fragment Cu_A de la Cytochrome c oxydase (Cco) de *Thermus thermophilus* (Meyer et al., 2011).

La méthode la plus mimétique est néanmoins de reconstituer l'environnement physiologique : la membrane lipidique. La Cco recombinante de *Rhodobacter sphaeroides* portant un His-tag a été immobilisée avec succès sur électrode d'or par affinité, avant qu'une bicouche lipidique mimant une membrane physiologique soit reconstituée autour d'elle (Figure 38) (Friedrich et al., 2008).

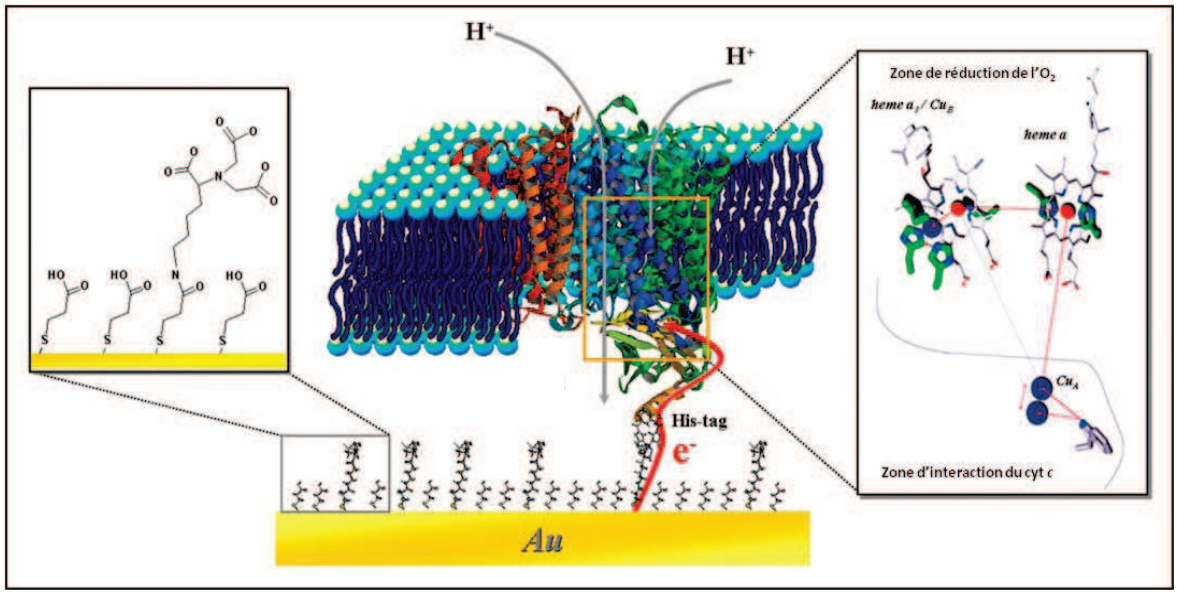


Figure 38: Représentation schématique de la Cco immobilisée dans la membrane supportée par l'électrode d'or. La protéine est attachée à l'électrode par affinité grâce à l'His-tag. La bicouche lipidique est assemblée autour de la protéine. Le schéma de droite présente un détail du transfert électronique intramoléculaire, et le schéma de gauche représente la modification de l'électrode

Les paramètres thermodynamiques et cinétiques (potentiel redox du centre Cu_A accepteur d'électrons physiologique du cyt *c* et vitesse de transfert d'électrons hétérogène) ont été obtenus dans des conditions très proches des conditions physiologiques.

L'immobilisation d'une enzyme en milieu physiologique membranaire permet également d'avancer dans la compréhension des mécanismes d'inhibition. Le cyanure est un inhibiteur potentiel de la Cco, qui agit en bloquant la réaction de réduction de l'oxygène en eau, au niveau du centre Cu_B. Une fois la Cco bovine immobilisée dans une bicouche lipidique supportée par une électrode d'or (Su et al., 2005), il a été montré que l'activité catalytique de réduction de l'oxygène par la Cco était inhibée en présence de cyanure. La stœchiométrie et les constantes d'inhibition pour le complexe CcO : cyanure, ont pu être calculées. Il a également a été montré que l'inhibition de la Cco par le cyanure était un processus réversible.

Ainsi, les argiles modèles de sols, ou encore les polymères biologiques peuvent offrir des matrices d'immobilisation de protéines dans des environnements mimétiques, favorables à l'activité électrochimique stable. La présence du substrat de l'enzyme, ou la reconstitution de membranes lipidiques sur l'électrode fournissent également des environnements favorables

proches de l'environnement physiologique. Il en découle une augmentation des cinétiques de transfert d'électrons.

2.5 Reconstitution d'une chaîne de transfert d'électron

Au-delà du mime de l'environnement protéique, l'électrode peut être considérée comme un partenaire protéique, ou encore un des éléments protéiques de la chaîne de transfert d'électrons. Ainsi, il doit être possible d'identifier les sites de reconnaissance spécifiques, de quantifier les constantes d'interactions protéines-protéines dans une même chaîne, et les vitesses de transfert d'électrons intra moléculaires. Nous distinguerons au cours de cette discussion le cas où tous les éléments d'une chaîne sont en solution, et les cas où un des éléments de la chaîne est immobilisé à l'interface électrochimique.

2.5.1 En solution

Un exemple particulièrement pertinent pour illustrer le propos a été décrit par Fourmond *et al*. Une chaîne de transfert d'électron multienzymatique comprenant le photosystème I (PSI), le cytochrome c_6 (cyt c_6) et la ferrédoxine (Fd) comme transporteurs d'électrons et la ferrédoxine/NADPH oxydoréductase (FNR) a été reconstituée en solution et étudiée par voltamétrie cyclique (Figure 39) (Fourmond et al., 2007).

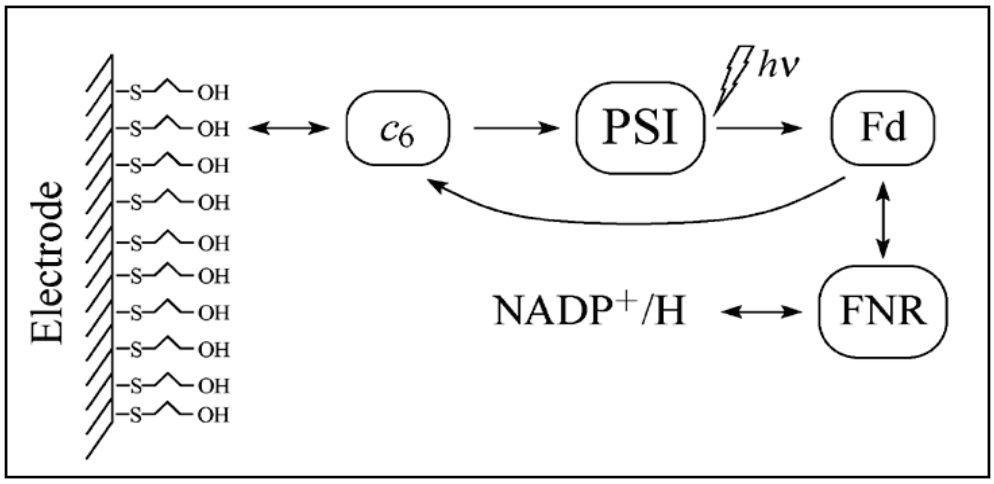


Figure 39: Chaîne de transfert d'électrons reconstituée *ex vivo* sous illumination. Les flèches unidirectionnelles représentent les transferts d'électrons irréversibles, tandis que les flèches bidirectionnelles représentent les transferts d'électrons réversibles

Le PSI est une protéine membranaire complexe composée de 12 sous unités contenant 127 pigments et cofacteurs. La chaîne de transfert d'électrons peut être décrite selon la séquence de réactions suivantes. A la lumière, l'excitation du centre P700 donneur primaire, déclenche un transfert d'électrons intramoléculaire aux accepteurs F_A ou F_B (des centres [4Fe-4S]) grâce à une séparation de charge ($P700^+/F_{AB}^-$). Le donneur primaire une fois oxydé en $P700^+$ peut recevoir des électrons du cyt c_6 réduit. Le centre F_B du PSI réduit la Fd. La Fd réduite interagit avec la FNR pour convertir le $NADP^+$ en NADPH.

Les paramètres cinétiques de ce système ont été déterminés : pseudo constante de vitesse de réduction du PSI par le cyt c_6, constante d'association du complexe ($P700/F_{AB}^-$)Fd_{ox}, constante de dissociation du complexe ($P700/F_{AB}$)Fd_{red}. Le modèle de régénération de la Fd_{ox} catalysée par la FNR, *via* un complexe FNR/$NADP^+$ a été également modélisé. Les constantes d'association des complexes ont pu être déterminées.

Cette étude démontre deux points intéressants : (i) il est possible de reconstituer une chaîne de transfert d'électrons complexe *ex vivo* en solution, (ii) l'effet de la variation des concentrations des différents partenaires du système, suivi par voltamétrie cyclique, permet de quantifier les constantes cinétiques d'étapes clés des transferts électroniques du système étudié.

Cependant, on notera que l'électrode a du être modifiée afin d'interagir spécifiquement avec le cyt c_6. De même, la gamme de potentiel utilisée dans cette étude a été ajustée entre -0,25 et +0,25 V vs SCE garantissant que seul le signal électrochimique du cyt c_6 soit observé. Il est donc envisageable que les autres protéines du système multi enzymatique interagissent avec l'électrode, sans qu'elles soient détectées. De plus, le PSI est une enzyme membranaire, qui se retrouve solubilisée dans ce système reconstitué *ex vivo*, s'éloignant ainsi de ses conditions physiologiques de fonctionnement. Les constantes de transfert électronique de pseudo premier ordre entre le cyt c_6 et le PSI, ainsi que les constantes d'association et de dissociation du complexe PSI/Fd pourraient être différentes *in vivo*.

2.5.2 *Immobilisée sur une électrode*

L'immobilisation d'une enzyme sur électrode offre l'opportunité d'étudier par électrochimie les interactions entre partenaires physiologiques, impliquant un transfert d'électrons intermoléculaire. Cette configuration permet en particulier l'étude cinétique de réactions catalytiques. Par comparaison avec les essais classiques en solution par

spectrophotométrie, une quantité minime de protéine est utilisée (classiquement la monocouche soit quelques pmol.cm^{-2}). La contrainte supplémentaire apportée par l'immobilisation permet d'appréhender et d'optimiser la surface de reconnaissance et d'interaction entre les deux partenaires. Quelques exemples permettent d'illustrer cette problématique.

-1- Catalyse de réduction du nitrite. Les cytochromes de type *c* tiennent une place centrale dans les processus énergétiques de par le rôle de transporteur d'électrons entre les complexes des chaînes respiratoires. La nature de leur centre redox, une porphyrine héminique, ainsi que l'exposition de ce centre au solvant, en a fait très tôt la sonde biologique type pour étudier les transferts d'électrons interfaciaux. Le cytochrome *c* (cyt *c*) de la levure *Saccharomyces cerevisiae* a par exemple été immobilisé par chimisorption sur électrode d'or *via* le soufre de l'unique cystéine qu'il porte à sa surface (Heering et al., 2004). Dans ces conditions, le cyt *c* conserve sa conformation native et échange des électrons avec l'électrode de manière quasi réversible. L'interaction avec son partenaire physiologique, la cytochrome *c* peroxydase (Ccp), ainsi qu'avec la cytochrome cd_1 nitrite réductase (NiR) et l'oxyde nitrique réductase (NoR) a été validée par voltamétrie cyclique. Des vagues catalytiques sont effectivement observées en présence de substrat avec un potentiel de demi-vague spécifique de chacun des partenaires. Judicieusement, les auteurs ont tiré parti de deux propriétés des enzymes afin d'identifier la NiR et la NoR immobilisées sur la même électrode : (i) les potentiels de demi vague de la NiR et de la NoR sont différents et (ii) le produit de la NiR (le NO) est le substrat de la NoR.

$$NO_2^- + 2H^+ + \text{cyt } c_{red} \rightarrow \mathbf{NO} + H_2O + \text{cyt } c_{ox} \text{ (NiR)}$$

$$2\mathbf{NO} + 2H^+ + \text{cyt } c_{red} \rightarrow N_2O + H_2O + \text{cyt } c_{ox} \text{ (NoR)}$$

Il a ainsi été possible d'observer les vagues catalytiques des deux enzymes sur un même voltamogramme en ne fournissant que le nitrite comme substrat (Figure 40).

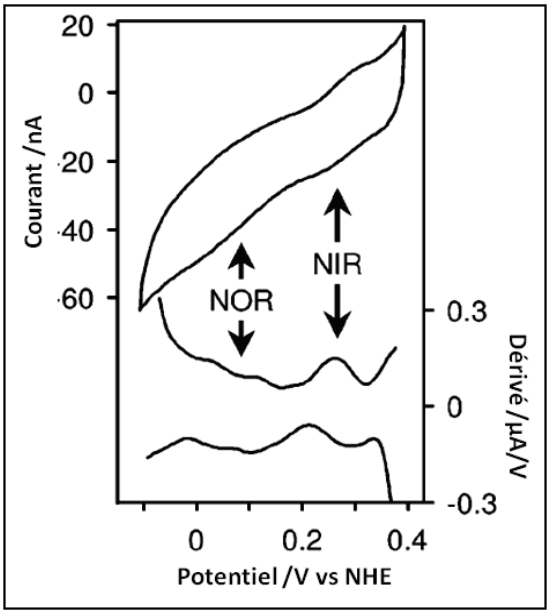


Figure 40: CV de la NoR et la NiR coimmobilisées sur une électrode d'or modifiée par le cyt *c* en présence du substrat de la NiR, le KNO_2. Tampon phosphate de potassium 17 mM, pH 6, T = 25 °C, v = 5 mV.s^{-1}

Le transfert électronique entre la NiR de *Pseudomonas aeruginosa* et ses partenaires physiologiques ou non a également été étudié par électrochimie. La NiR est coimmobilisée avec le cyt c_{551} cytochrome monohémique, ou l'azurine, protéine à cuivre, *via* une membrane de dialyse sur électrode de PG (Lojou et al., 2002). En présence de nitrite, des vagues catalytiques sont observées pour les couples NiR/cyt c_{551} et NiR/azurine coimmobilisés. Les valeurs respectives des constantes de second ordre pour les deux couples révèlent une efficacité de transfert d'électrons vers la NiR différente selon le partenaire, cyt c_{551} ou azurine. Ces résultats corroborent les données obtenues *in vivo*. Le cyt c_{551} est en effet le partenaire physiologique de la NiR, tandis que l'azurine pourrait être utilisé dans une autre voie respiratoire en condition de stress.

-2- Catalyse de réduction du peroxyde d'hydrogène. L'interaction physiologique entre la Ccp et son donneur d'électrons, la pseudoazurine (Paz) de *Paracoccus pantotrophus* a également été examinée par voltamétrie cyclique (Paes de Sousa et al., 2007). La réduction incomplète de l'oxygène à 2 électrons produit du peroxyde d'hydrogène, qui génère des espèces réactives de l'oxygène responsables de dommages cellulaires irréversibles. Les peroxydases permettent la réduction à deux électrons du peroxyde d'hydrogène en eau. La Ccp et la Paz ont été confinées en couche mince sur une électrode d'or par l'intermédiaire

d'une membrane de dialyse. La Paz est une petite protéine à cuivre qui présente un signal d'oxydoréduction à un potentiel moyen de +230 mV vs SHE selon la réaction :

$$Cu^{2+} + e^{-} \leftrightarrow Cu+$$

En présence de peroxyde d'hydrogène, une vague catalytique de réduction du peroxyde d'hydrogène est observée au potentiel de la Paz. La variation de l'intensité de la vague redox avec la concentration en Ccp et en peroxyde d'hydrogène permet de calculer la constante de second ordre entre les deux partenaires physiologiques.

-3- Catalyse d'oxydation de l'H_2. Les bactéries sulfato-réductrices sont anaérobies strictes et utilisent l'hydrogène comme donneur d'électron, et le sulfate ou le thiosulfate comme accepteur terminal d'électrons. Ces processus d'oxydation de l'hydrogène et de réduction du sulfate se déroulent de part et d'autre de la membrane cellulaire. Les électrons issus de l'oxydation de l'hydrogène doivent donc être transférés à travers la membrane pour participer à la réduction du sulfate. Comme on l'a vu dans le premier chapitre de cette thèse, les hydrogénases sont les enzymes clés du métabolisme de l'hydrogène. Les hydrogénases [Ni-Fe] solubles échangent leurs électrons avec des cytochromes tetrahémiques de type c_3 qui interagissent avec la chaîne respiratoire. Plusieurs hydrogénases de bactéries sulfato réductrices ont été coadsorbées sur électrode de PG avec leur partenaire physiologique le cyt c_3. Cette configuration a permis le calcul des constantes d'affinité et des constantes de transfert électronique avec les cyt c_3 partenaires lors de l'oxydation de l'hydrogène (Tableau 3) (Lojou et al., 2004).

Hydrogénase	partenaire redox	k($M^{-1}.s^{-1}$ x 10^7)	Tampon	K_m(µM)
D. desulfomicrobium Norway	Cyt c_3	3	100 mM Tris chloride pH 7.6	3
D.vulgaris Hildenborough	Cyt c_3	30	100 mM Tris chloride pH 7.6	
	Cyt c_3	20	20 mM Hepes pH 7	17
	Cyt c_{553}	0.2	20 mM Hepes pH 7	46
D.gigas	Cyt c_3	6.5	10 mM Tris chloride pH 7.6	7.4
D.fructosovorans	Cyt c_3	4.4	10 mM Tris chloride pH 7.6	0.4
D.africanus	Type I Cyt c_3	90	50 mM Tris chloride pH 8.5	0.5

Tableau 3: Paramètres cinétiques de transfert électronique entre l'hydrogénase et son partenaire physiologique dans les conditions d'oxydation de l'hydrogène (reproduit de (Lojou et al., 2004)).

La reconstitution d'une partie de la chaîne de transfert d'électrons couplant l'oxydation de l'hydrogène à la réduction des sulfates est donc efficace à l'électrode. Physiologiquement, cette chaîne ne se résume cependant pas aux deux éléments hydrogénase et cytochrome. Plusieurs autres cytochromes de plus hauts poids moléculaires que le cyt c_3 ont en particulier été identifiés. L'électrochimie a permis d'avancer dans le rôle de ces différentes protéines dans la chaîne de transfert d'électrons. Il a ainsi été montré que le cyt c_3 est capable d'interagir avec un cytochrome transmembranaire contenant 16 hèmes appelé Hmc pour « High molecular weight cytochrome » (Guiral et al., 2005b). Plus précisément, le transfert d'électrons de l'Hmc à l'électrode n'est permis qu'en présence du cyt c_3. L'étude électrochimique fine de ce couplage a permis d'avancer une hypothèse quant au couplage d'oxydation de l'hydrogène à la réduction du sulfate. L'oxydation de l'hydrogène par l'hydrogénase enclencherait les réactions successives de réduction du cyt c_3, puis de l'Hmc. L'Hmc membranaire pourrait transférer les électrons à travers la membrane du coté cytoplasmique pour la réduction du sulfate.

Ces différents exemples de reconstitution de chaînes de transfert d'électrons physiologiques à l'électrode mettent en relief un dénominateur commun : l'utilisation d'un partenaire physiologique, type cytochrome de type *c*, qui joue le rôle de médiateur redox. Ces reconstitutions à l'électrode de chaînes physiologiques ont permis la détermination de nombreux paramètres cinétiques et thermodynamiques. Les cinétiques de transfert d'électrons sont cependant dans ce cas limitées par l'interaction entre l'enzyme et son partenaire. Si l'on souhaite optimiser le transfert d'électrons interfacial, ou suivre les états redox de l'enzyme au cours d'une réaction électrocatalytique, il est souhaitable de s'affranchir d'un médiateur redox. A cette fin, une maîtrise de l'orientation de l'enzyme à l'électrode est nécessaire. Cette notion va être explicitée en l'illustrant d'exemples pertinents de la littérature.

2.6 Optimisation du transfert d'électron interfacial

2.6.1 Les limitations du transfert d'électron interfacial

Dans le but d'utiliser une enzyme en tant que biocatalyseur de l'oxydation ou de la réduction d'un substrat à l'électrode, il est nécessaire -même si ce n'est pas suffisant, la stabilité de l'enzyme étant un autre paramètre clé- d'obtenir un transfert d'électron interfacial efficace. La vitesse du transfert d'électrons dépend de la distance entre le donneur et l'accepteur. C'est aussi ce paramètre qui régit les vitesses de transfert d'électrons au sein des

protéines. En analysant les structures cristallographiques d'oxydoréductases disponibles sur la protein data bank (pdb), l'équipe du Dr. Dutton a montré que le transfert d'électrons intramoléculaire est efficace sur une distance maximale de 14 Å entre deux centres redox (pour des réactions favorables, avec un $\Delta G < 0$) (Page et al., 1999). Avec cette distance centre à centre de 14Å, alors que les constantes de transfert électronique (k_{ET}) observées varient entre 10^7 s^{-1} et 10^{13} s^{-1}, les constantes catalytiques (k_{cat}) des enzymes varient entre 10 s^{-1} et 10^4 s^{-1}(Figure 41). Ainsi le transfert d'électrons intramoléculaire n'est pas considéré comme limitant puisqu'il s'effectue à des vitesses bien plus grandes que celles des réactions catalytiques d'oxydoréduction du substrat.

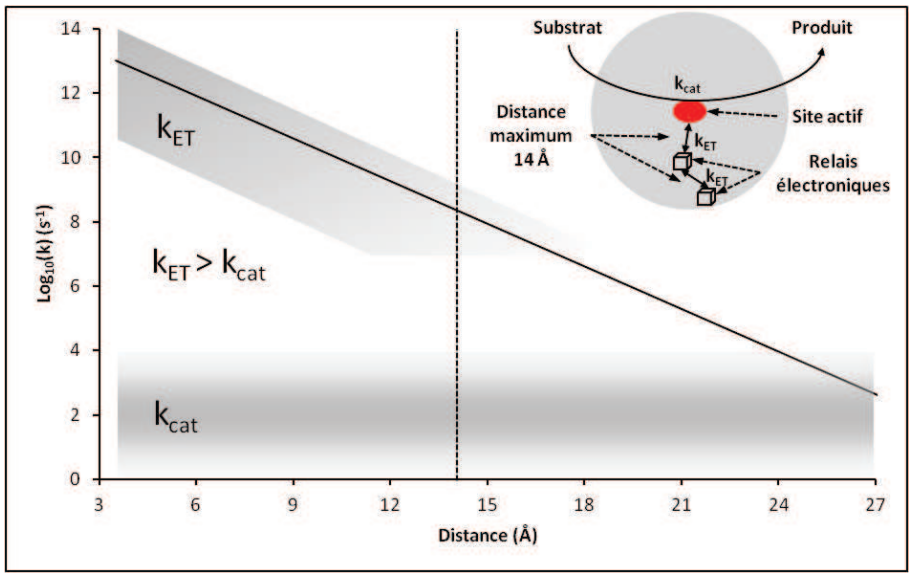


Figure 41: Distribution des constantes de transfert électronique calculées pour les oxydoréductases de structure connue en fonction de la distance entre les centres redox (adapté de (Page et al., 1999)). La partie grisée k_{ET} correspond à la zone des valeurs calculées pour les transferts électroniques entre centres redox. La partie grisée k_{cat} correspond à la distribution des valeurs de constante catalytique mesurée indépendamment de la distance. La ligne pointillée montre la limite d'un transfert électronique efficace constaté dans les oxydoréductases de structure connue.

La règle générale de diminution de la vitesse de transfert d'électrons avec la distance s'applique au transfert d'électron interfacial. Ainsi, la distance entre l'électrode et le centre actif de la protéine ou plus communément, le relais électronique le plus proche de la surface, ne doit pas excéder 14 Å, afin de connecter électriquement l'enzyme (Cracknell et al., 2008). Cette distance limite doit être mise en relation avec la taille de la protéine et l'organisation interne des relais électroniques. Les protéines ont un diamètre moyen de l'ordre de 50 Å, bien supérieur à la limite des 14 Å. De ce fait, lorsqu'elles sont simplement adsorbées sur une électrode, une distribution des distances électrode/relais électronique se produit (figure 42).

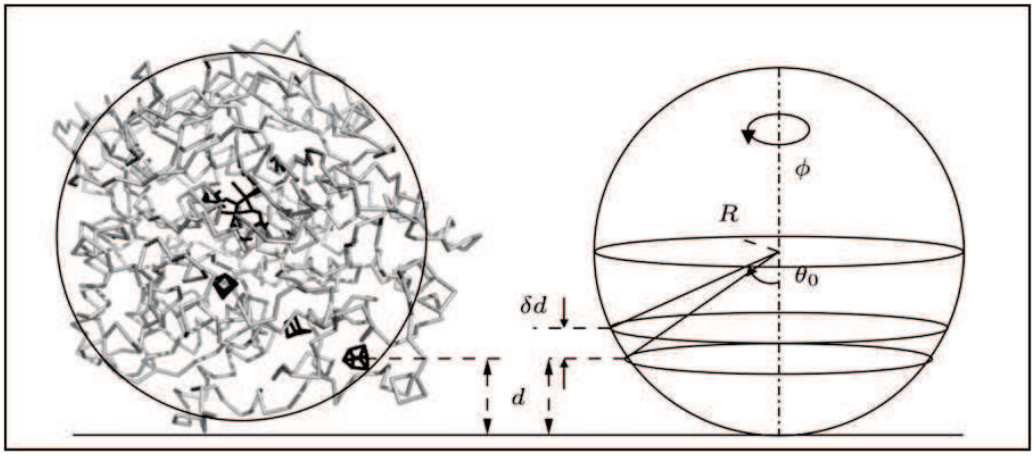


Figure 42: Représentation de la distribution des distances (d) entre le relais électronique le plus proche de la surface de la protéine et l'électrode.

Puisque la vitesse de transfert électronique est dépendante de cette distance, une distribution des k_{ET} est créée. Cette distribution des k_{ET}, qui affecte l'efficacité du transfert électronique interfacial, transparaît sur la forme des voltamogrammes, et a été modélisée dans le cas d'un transfert d'électrons à l'électrode impliquant une enzyme (Figure 43) (Leger et al., 2008).

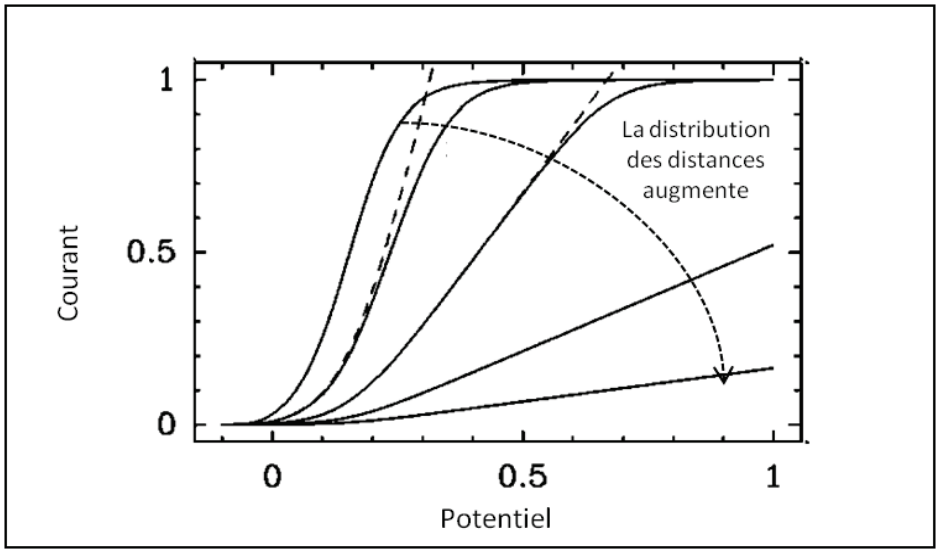


Figure 43: Impact de la distribution des distances entre le relais électronique le plus proche de la surface de la protéine et l'électrode sur la forme des CV.

Dès lors, la notion d'orientation d'une enzyme sur électrode, dans le double objectif de se rapprocher des conditions de reconnaissance avant transfert physiologique d'électrons, et d'optimiser l'efficacité du transfert d'électrons en connectant efficacement le plus grand nombre de molécules avec la distribution d'orientation la plus faible possible, prend tout son

sens. Une enzyme correctement orientée pourra effectuer ce que l'on appelle le transfert d'électron direct (TED). Le cas idéal serait *a priori* d'obtenir une couche d'enzymes immobilisées dans laquelle toutes les enzymes seraient spécifiquement orientées, avec une minimisation de la distance entre le relais électronique de surface et l'électrode.

2.6.2 Transfert d'électrons direct vs Transfert d'électrons médié

L'orientation d'une enzyme sur une interface électrochimique dans une configuration telle qu'un transfert direct des électrons (TED) est possible doit permettre: (i) l'accession directe aux paramètres cinétiques de l'activité enzymatique d'une enzyme, (ii) d'avoir théoriquement 100% des enzymes actives capables d'échanger des électrons avec l'électrode, améliorant ainsi la densité de courant, (iii) de catalyser les réactions de transformation des substrats au potentiel redox de l'enzyme, qui est très proche du potentiel thermodynamique, (iv) d'accéder aux signaux redox non catalytiques de l'enzyme, permettant de quantifier le nombre d'enzymes électroactives immobilisées. Malgré ces avantages certains, la notion d'orientation reste encore marginale dans les études de bioélectrochimie actuelles (Figure 44). A titre d'illustration, sur les vingt dernières années, 98,3% des publications traitent de l'immobilisation des enzymes, et seulement 1,7 % de leur orientation.

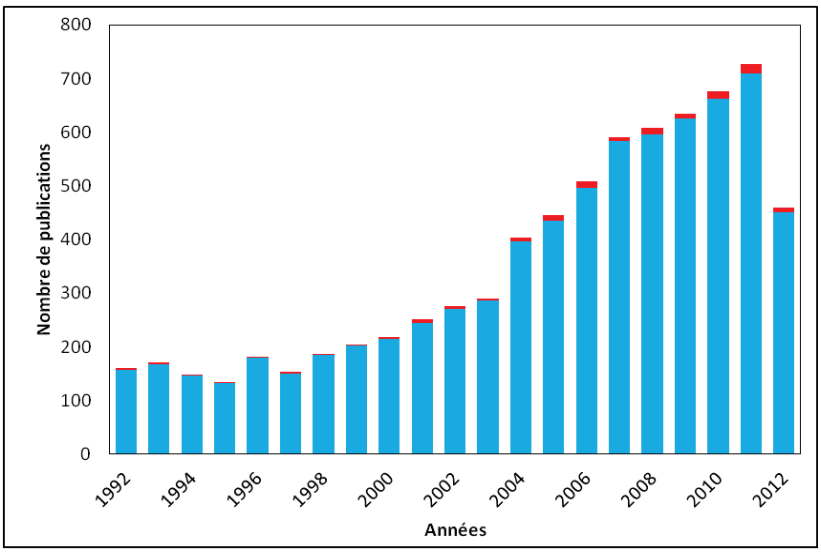


Figure 44: Nombre de publications comportant les mots clés « enzyme » et « immobilisation » en bleu, et contenant les mots clés « enzyme », « immobilisation » et « orientation » en rouge. Recherche effectuée sur la base de données pubmed.

Une solution alternative s'offre au TED, le transfert d'électron médié (TEM). Il s'agit dans ce dernier cas d'utiliser une petite molécule redox, capable d'échanger des électrons

rapidement et réversiblement à l'électrode. Cette molécule, ou médiateur redox, fera la navette entre l'électrode et le point d'entrée/sortie de électrons de la protéine immobilisée dans une orientation défavorable à un transfert direct (Figure 45).

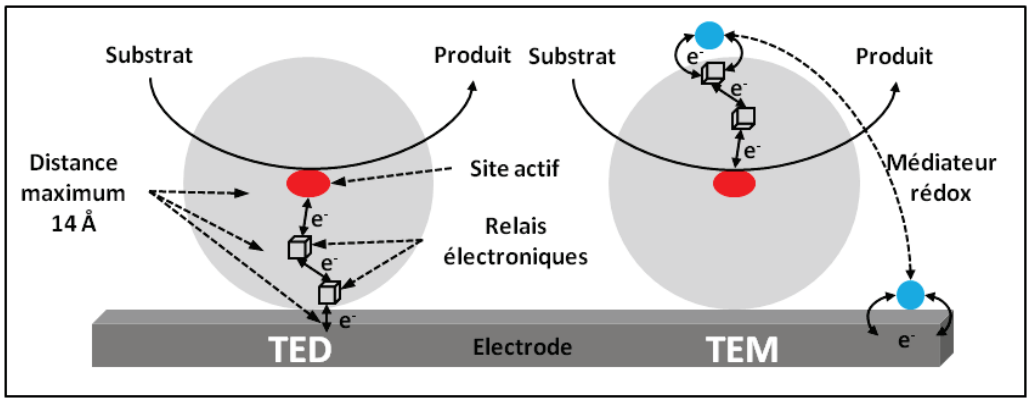


Figure 45: Représentation schématique de transfert d'électron direct (TED) à droite et du transfert d'électron médié (TEM) à gauche.

Le médiateur redox est le plus souvent une molécule organique ou un complexe métallique. Les petites protéines, partenaires physiologiques des enzymes, peuvent aussi jouer le rôle de médiateurs redox, comme montré dans les paragraphes précédents. Le médiateur redox peut diffuser en solution, ou être accroché à l'électrode par un linker autorisant son mouvement tout en minimisant son relargage en solution. La diffusion du médiateur en solution, augmente *a priori* les constantes de vitesse d'interaction entre la protéine et le médiateur. Dans certaines applications, cas des biopiles par exemple, un médiateur en solution exige cependant la présence d'une membrane séparatrice entre compartiments anodique et cathodique pour éviter une fuite des électrons vers l'électrode opposée. Dans le cas d'un médiateur immobilisé à l'électrode, la coimmobilisation peut s'avérer délicate du fait de la complémentarité de charge souvent nécessaire entre l'enzyme et le médiateur. Une matrice d'immobilisation favorable à l'enzyme ne le sera pas au médiateur redox et réciproquement. Dans le même ordre d'idées, si l'enzyme est adsorbée sur l'électrode, il faudra s'assurer que le médiateur redox n'ait pas plus d'affinité que l'enzyme pour l'électrode et ne devienne un compétiteur qui induirait un relargage des enzymes en solution. Enfin, certains médiateurs redox sont toxiques (viologènes, complexes de ruthénium, d'osmium) ce qui limite leur utilisation *in vivo* et plus généralement dans un contexte de développement durable.

Idéalement, le médiateur redox doit être capable d'échanger les électrons efficacement avec l'électrode à un potentiel le plus proche possible de celui de la réaction enzymatique. La diversité des médiateurs redox permet de couvrir une large gamme de potentiels, mais encore

faut-il que le médiateur puisse interagir avec l'enzyme, à la manière d'un partenaire physiologique. Si le médiateur diffuse en solution, les paramètres cinétiques entre la protéine et le médiateur sont aussi à prendre en compte. Enfin, le recours à l'utilisation d'un médiateur redox ajoute une étape supplémentaire à la chaîne de transfert d'électrons. Cette étape supplémentaire peut impacter la constante catalytique si la réaction de transfert d'électrons entre la protéine et le médiateur ou la réaction de transfert électronique entre le médiateur et l'électrode est limitante. Dans certains cas, l'utilisation d'un médiateur redox est inévitable: le site actif est trop enfoui dans la protéine, et aucune orientation ne permettra un échange direct d'électrons avec l'électrode. Ou encore une multicouche de protéine est immobilisée sur l'électrode, et seule la couche la plus proche de l'électrode est capable de fonctionner en TED. Certains médiateurs redox peuvent être électropolymérisés en une matrice conductrice capable d'encapsuler et de connecter des enzymes qui seraient à distances incompatibles avec un TED. Comme évoqué plus haut (Chap.I §2.2.4), si le médiateur ne peut pas être électropolymérisé, il peut tout de même être coimmobilisé avec l'enzyme dans un polymère (chitosane, polysaccharide) ou un sol-gel.

Cette dualité TED et TEM peut être illustrée par l'étude de la Cellobiose déshydrogénase (CDH) de *Phanerochaete sordida* (Tasca et al., 2009). La CDH est une enzyme produite par les Basidomycètes et les Ascomycètes, et excrétée dans le milieu extracellulaire. C'est une enzyme monomérique composée de deux domaines : un domaine flavine dont le cofacteur est une flavine dinucléotide (FAD), et un petit domaine cytochrome contenant un hème de type *b*. La CDH oxyde ses substrats naturels (β-D-cellobiose, cello-oligosaccharides), mais aussi le lactose, en lactones correspondantes avec une forte efficacité catalytique. Il est envisagé d'utiliser la CDH comme biocatalyseur de l'oxydation des substrats « low cost » tels que le lactose et la cellobiose dans un procédé type biopile (Tasca et al., 2008).

Les processus de transfert d'électrons entre la CDH et une électrode ont été étudiés. L'interface électrochimique est constituée de graphite pyrolytique (PG) modifié par des nanotubes de carbone (Single Walled Carbon Nanotubes: SWCNT). Un polymère d'osmium joue le rôle de médiateur redox (Figure 46).

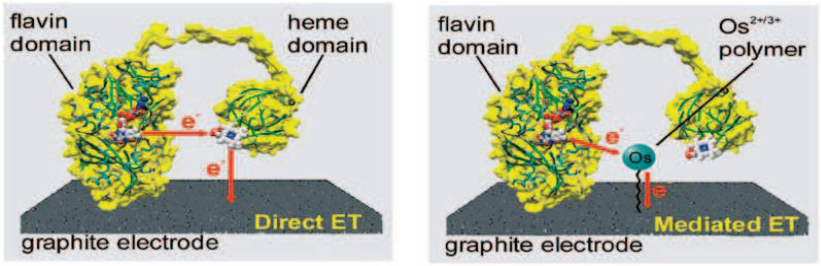


Figure 46: Représentation schématique de transfert d'électron direct (TED) à droite et du transfert d'électron médié (TEM) à gauche impliquant la Cellobiose Deshydrogénase (reproduit de (Tasca et al., 2009)).

Consécutivement à l'oxydation du substrat (ici le lactose), les électrons transitent par le FAD, sont transférés au domaine hémique par un transfert d'électrons intramoléculaire, puis sont échangés directement avec l'électrode. La vague catalytique d'oxydation du substrat démarre à un potentiel de +100 mV *vs* NHE et l'intensité du courant est dépendante du pH. Elle diminue lorsque le pH augmente dans la gamme pH 3,5-6 avec un optimum à pH 3,5 (Figure 47A). Le TEM est également dépendant du pH. A pH 3,5, la vague catalytique se décompose en deux parties. Un premier processus débutant à 0 mV vs NHE correspond à un transfert médié par le complexe d'osmium *via* le FAD. Un second processus à +100 mV vs NHE correspond à un transfert d'électrons *via* l'hème. A pH plus basique (pH 6), une seule vague catalytique est observée à -100 mV vs NHE. Elle correspond au TEM médié par le complexe d'osmium *via* le FAD (Figure 47 B).

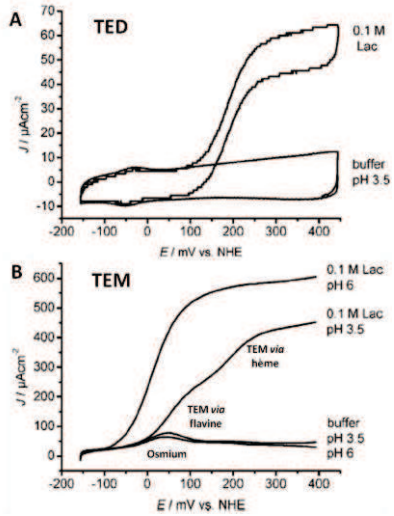


Figure 47: (A) CV de la CDH sur électrode de PG modifiée par des SWNCTs à pH 3,5 en présence et en absence de substrat (0,1 M lactose). (B) CV de la CDH sur électrode de PG modifiée par des SWNCTs et le polymère d'osmium à pH 3,5 et 6 en présence et en absence de substrat (0,1 M lactose). Tampon citrate 0,1 M pH 3,5, tampon phosphate 0,1 M pH 6, T = 25 °C, v = 1 mV.s^{-1}

La dépendance des processus catalytiques en fonction du pH peut s'expliquer par la flexibilité relative des domaines flavine et hémique. A pH 3,5, une hétérogénéité de conformation implique que seules certaines enzymes voient leur domaine hémique en interaction avec le domaine flavine. Dans ces conditions, le domaine flavine ne peut transférer les électrons au complexe d'osmium, et l'oxydation du substrat se fait *via* l'hème. Les CDH dont les domaines sont séparés autorisent un transfert d'électrons entre le complexe d'osmium et le domaine flavine. Deux processus distincts de catalyse seront donc observés. A pH 6, les deux domaines sont séparés spatialement, le complexe d'osmium peut récupérer les électrons directement au domaine FAD, et le processus de transfert d'électrons se fait par un processus unique médié. Cette explication est cohérente avec les points isoélectriques des deux domaines qui induisent des charges opposées à pH acide favorisant leur interaction, tandis qu'à pH 6 les résidus acides déprotonés induisent une répulsion électrostatique.

Dans ce cas précis, le TEM offre plusieurs avantages par rapport au TED : une densité de courant un ordre de grandeur plus élevé, une stabilité accrue dans le temps, une utilisation à un pH proche du pH neutre, un potentiel d'oxydation plus bas permettant d'accroitre les performances en pile. Le processus TED observé peut même être considéré comme un processus TEM. En effet le domaine hémique relié par un linker flexible au domaine flavine, est très proche d'un cytochrome, qui joue *in vivo* le rôle de médiateur redox. On peut ainsi considérer que le complexe d'osmium se substitue au domaine hémique pour le transfert des électrons, avec les avantages d'un potentiel plus proche de celui du domaine flavine, et d'une stabilité dans le temps grâce à son immobilisation sur l'électrode. Le processus TED ne serait alors vraiment obtenu qu'en arrivant à connecter le domaine flavine directement à l'électrode.

Dès lors on peut se demander s'il est possible d'orienter à façon et spécifiquement une enzyme pour favoriser un transfert d'électrons direct. Cette orientation contrôlée requiert une connaissance de la structure de l'enzyme, de la nature des interactions avec ses partenaires physiologiques, et une maîtrise de la modification de l'électrode de manière à mimer une interaction physiologique. Alternativement, il est aussi envisageable de promouvoir une interaction un modifiant directement l'enzyme par mutagénèse dirigée.

2.6.3 L'orientation

Orienter une protéine sur un support solide nécessite un contrôle précis des propriétés de l'électrode sur laquelle l'enzyme va être immobilisée. Plusieurs méthodes de modifications

chimiques des électrodes sont développées, qui permettent un contrôle de l'orientation d'une protéine. L'une d'elle est la modification d'électrode de carbone par réduction de sels de diazonium, est une alternative. Cette technique ne sera pas développée ici. En effet, malgré des améliorations significatives, l'épaisseur des films de diazonium restent encore mal contrôlés. Nous citerons plus particulièrement l'utilisation de SAMs sur électrode d'or, qui constitue une technique versatile et maîtrisée de modification d'électrode. Sur ce type de surface, quelques publications récentes illustrent l'intérêt de l'orientation spécifique des enzymes.

2.6.3.1 SAMs

Les SAMs peuvent être formées sur divers substrats, dont les métaux (Au, Ag, Cu et Ni) et les surfaces hydroxylées (silanes sur verre, oxydes métalliques, oxydes de silice). Les propriétés des monocouches peuvent être contrôlées en termes d'épaisseur, de structure, de stabilité, et la fonction terminale leur confère les propriétés de réactivité chimique.

Comme évoqué plus haut dans ce manuscrit (Chap.I §2.2.1), les SAMs sont formées à partir de molécules thiolées dont le groupement terminal permet de conférer une fonction à l'interface et une accroche covalente ultérieure. Le principal inconvénient est la durée de formation de la SAM, de l'ordre de la dizaine d'heures, nécessaire à la formation d'une monocouche homogène et structurée. La formation de la SAM est influencée par le solvant dans lequel le dérivé thiolé est dissout, la concentration du dérivé thiolé, la température, et le prétraitement de l'électrode. Le maîtrise de ces paramètres est essentielle afin d'assurer une reproductibilité dans la formation et la structure de la SAM.

La structure de la SAM dépend en outre des interactions latérales entre chaque molécule constitutive, ainsi que des fonctions terminales. Les chaînes composées d'alcanes forment des monocouches compactes grâce aux interactions latérales de type van der Walls. Plus la chaîne est longue, plus les interactions latérales sont nombreuses, ordonnant la monocouche et induisant la formation d'une monocouche cristalline. En revanche, les chaînes alcanes plus courtes forment des SAMs qui sont qualifiées de fluide. Les fonctions terminales influent également sur la structure de la SAM. Les fonctions terminales chargées ($-COO^-$, $-NH_3^+$) peuvent induire selon le pH d'utilisation, des répulsions électrostatiques résultant en la formation de monocouches fluides même pour des chaînes alcanes longues. Ces SAMs, ainsi

que les SAMs hydrophiles (–OH), sont également plus perméables aux solvants aqueux que les SAMs portant des fonctions terminales hydrophobes (–CH_3).

2.6.3.2 *Quelques exemples d'orientation spécifique de protéines*

La versatilité des SAMs pour l'orientation des enzymes est illustrée par quelques exemples ci après.

-1- La nitrite réductase (NiR) *d'Alcaligenes faecalis* (Krzeminski et al., 2011) catalyse la réduction du nitrite en oxyde nitrique selon la réaction :

$$NO_2^- + 2H^+ + 2e^- \xrightarrow{NiR} NO + H_2O$$

L'enzyme est un homotrimère. Chaque sous unité contient un centre cuivre de type T1 et un centre cuivre de type T2. Le centre cuivre de type T1 est proche de la surface et reçoit les électrons de son partenaire physiologique, la pseudoazurine (Paz). Il transfère ensuite les électrons au site T2, enfoui dans l'enzyme, qui associé à un acide aspartique et une histidine forme le site catalytique. Dans ce travail, le but est de substituer la Paz par l'électrode. Des SAMs sont utilisées afin de définir les paramètres physico chimiques qui contrôlent l'orientation fonctionnelle de l'enzyme.

Une enzyme mutante (L93C) portant une cystéine à proximité du centre T1 est plus particulièrement étudiée. La cystéine permet l'attache de la molécule ATTO 565 *via* un maleimide. La molécule ATTO 565 est un fluorochrome zwitterionique qui porte un groupement carboxylique, un cycle aminé chargé positivement, et une structure cyclique conjuguée de caractère hydrophobe (Schéma 16).

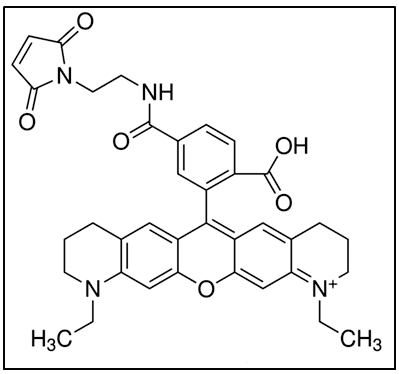


Schéma 16: Représentation de la molécule d'ATTO 565

Plusieurs types de SAMs de type alcanethiol HS-$(CH_3)_n$-R sont testées, avec n variant entre 6 et 8. R peut être un carboxylique, un hydroxyl, un méthyle ou une amine. Des SAMs mixtes sont également utilisées. Le mutant L93C est uniquement électroactif sur une SAM mixte HS-$(CH_3)_8$-NH_2 / HS-$(CH_3)_8$-OH. La présence d'une fonction positive terminale sur la chaîne HS-$(CH_3)_8$-NH_2 permet la fixation de l'enzyme par son patch négatif, patch qui lui permet d'interagir physiologiquement avec la Paz. Cette interaction électrostatique permet un TED entre le centre Cu T1 et l'électrode, détecté par voltamétrie cyclique en présence de substrat (Figure 48 A).

Le mutant L93C modifié par la molécule ATTO 565 n'est en revanche électroactif que sur les SAMs HS-$(CH_3)_6$-OH, démontrant la perte de l'orientation spécifique en changeant la fonction terminale de la SAM. De façon plus surprenante, la SAM HS-$(CH_3)_8$-OH, pourtant de caractéristiques similaires, ne permet pas de TED. Il est suggéré par mesure de la capacitance, que la SAM HS-$(CH_3)_8$-OH présente une organisation plus cristalline que la SAM HS-$(CH_3)_6$-OH. Le fluorochrome ATTO, très hydrophobe aurait plus de facilité à s'intercaler dans la SAM la plus fluide (Figure 48 B). Ces résultats mettent en évidence la richesse des SAMs pour suivre l'immobilisation orientée d'enzymes, mais aussi la nécessité de prise en considération de paramètres multiples (Figure 49).

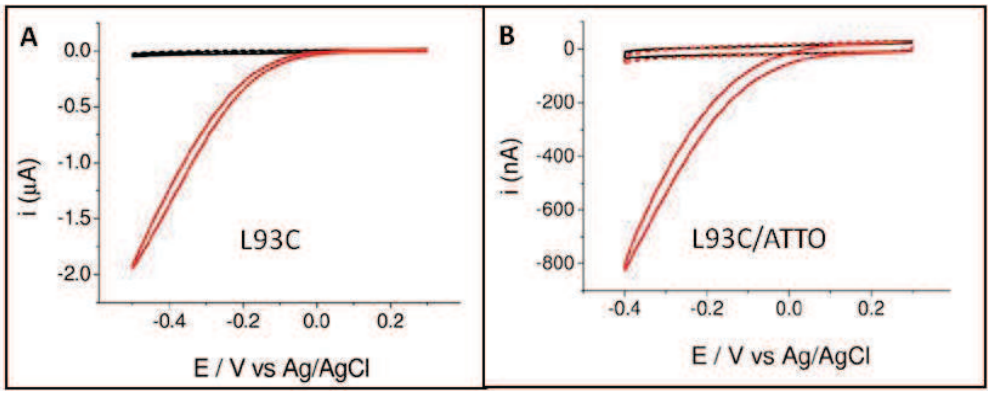
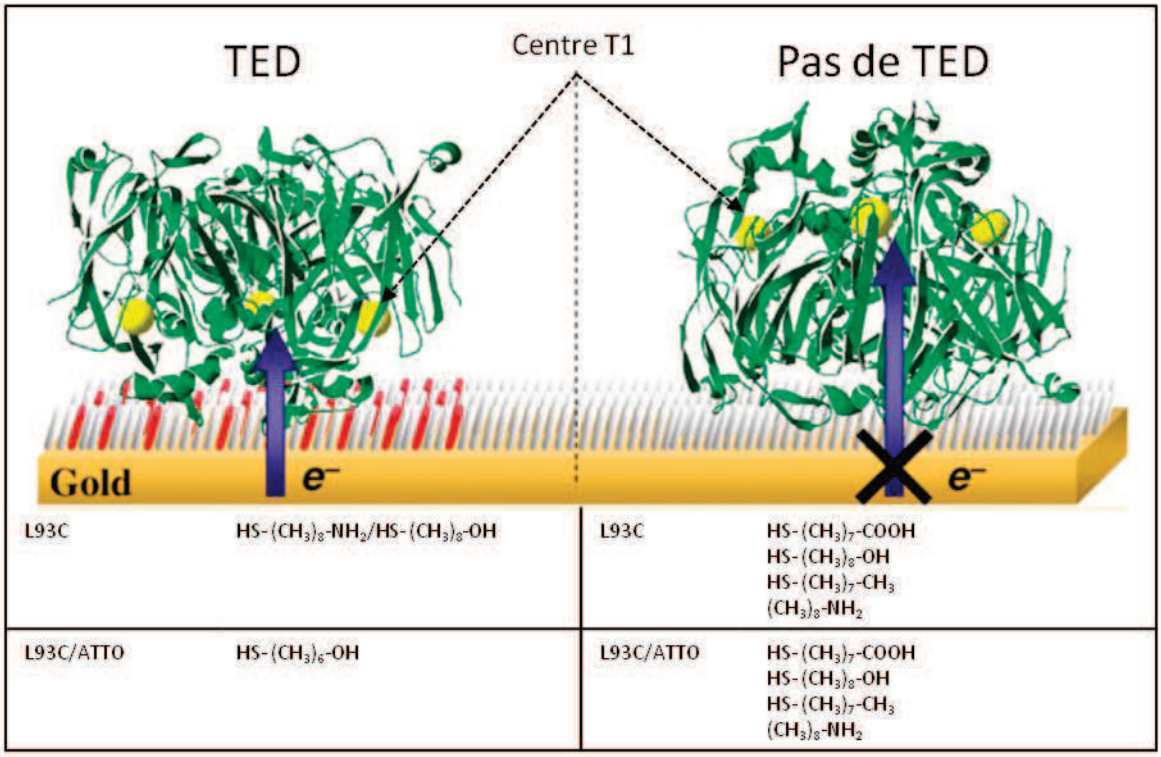


Figure 48: (A) CV de la NiR L93C sur électrode d'or modifiée par une SAM HS-$(CH_3)_8$-NH_2 / HS-$(CH_3)_8$-OH en absence (noir) et présence (rouge) de nitrite. (B) CV de la NiR L93C/ATTO (rouge) et de la NiR L93C (rouge pointillé) sur électrode d'or modifiée par une SAM HS-$(CH_3)_6$-OH en présence de nitrite. NiR L93C/ATTO en absence de nitrite (noir). Tampon MOPS 20 mM pH 6,85, T = 25 °C, v = 10 mV.s^{-1}



L93C	HS-$(CH_3)_8$-NH_2/HS-$(CH_3)_8$-OH	L93C	HS-$(CH_3)_7$-COOH HS-$(CH_3)_8$-OH HS-$(CH_3)_7$-CH_3 $(CH_3)_8$-NH_2
L93C/ATTO	HS-$(CH_3)_6$-OH	L93C/ATTO	HS-$(CH_3)_7$-COOH HS-$(CH_3)_8$-OH HS-$(CH_3)_7$-CH_3 $(CH_3)_8$-NH_2

Figure 49 : Représentation des orientations de la NiR en fonction des mutations/modifications et des SAM utilisées.

-2- La Cco de *Rhodobacter sphaeroides* (Ataka et al., 2006), enzyme membranaire de la chaîne respiratoire, catalyse la réduction de l'oxygène en eau côté cytoplasmique de la cellule, grâce aux électrons fournis par le cytochrome *c* (cyt *c*) côté périplasmique selon la réaction :

$$O_2 + 4H^+ + \text{cyt } c_{red} \xrightarrow{CcO} 2H_2O + \text{cyt } c_{ox}$$

Cette enzyme est immobilisée sur électrode d'or et son activité suivie en présence de son partenaire physiologique, le cyt *c*. Un His-tag, chaîne de 6 histidines, a été introduit sur la Cco côté exposé soit au périplasme, soit au cytoplasme. L'électrode d'or est modifiée de façon à réagir par affinité avec l'His-tag. Une fois que l'enzyme est immobilisée, une bicouche lipidique est reconstituée sur l'électrode autour de la Cco membranaire afin de recréer un environnement physiologique.

Lorsque la Cco est orientée avec le site de fixation périplasmique du cyt *c* contre l'électrode, aucun courant catalytique n'est mesuré en présence d'oxygène et de cyt *c* (Figure 50). Il est de plus montré par FT-IR que le cyt *c* est incapable de traverser la membrane lipidique. Ces résultats suggèrent qu'il n'y a pas de connexion électronique directe entre la

Cco et l'électrode. Des résultats similaires ont été observés lorsque la Cco Bovine est adsorbée dans la même orientation sur une électrode d'or non modifiée : aucun signal de transfert direct des électrons n'est détecté par voltamétrie cyclique (Haas et al., 2001)[1].

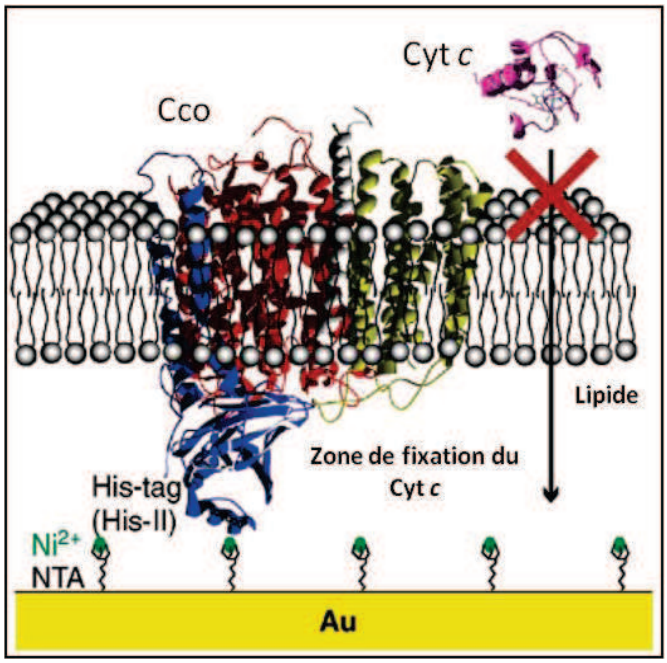


Figure 50: Représentation de l'orientation contre l'électrode de la Cco côté périplasmique. Le cyt *c* ne peut pas traverser la bicouche lipidique.

Lorsque la Cco de *Rhodobacter sphaeroides* modifiée par His-tag est orientée avec le site de fixation du cyt *c* vers le solvant (orientation physiologique), un courant de réduction apparaît à +260 mV vs NHE, en présence d'oxygène et de cyt *c*, caractéristique de la réduction catalytique de l'oxygène par la Cco *via* le cyt *c* (Figure 51).

Pour autant des expériences de SEIRAS confirment que le cyt *c* ne traverse pas la bicouche lipidique. Dans ce cas comment pourrait-il se réduire à l'électrode et transférer ses électrons à la Cco ? Les auteurs proposent que la Cco agisse comme un médiateur qui faciliterait le transfert d'électrons de l'électrode vers le cyt *c* *via* un mécanisme « through - bond»

[1] En revanche si une couche de cyt *c* est préformée sur une SAM portant des fonctions hydroxyles, le cyt c se comporte comme un système réversible électrochimiquement. La Cco est capable d'interagir avec le cyt *c*. Il en résulte une vague catalytique de réduction de l'oxygène au potentiel du cyt *c*.

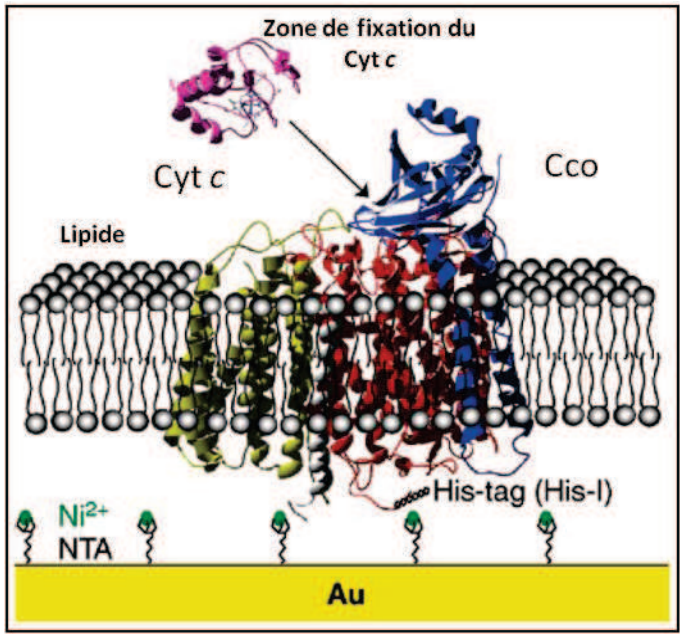


Figure 51: Schéma représentant l'orientation contre l'électrode du côté cytoplasmique de la Cco. Le cyt *c* peut interagir physiologiquement avec la Cco.

Dans cette étude, l'électrode n'est pas un mime du partenaire physiologique de l'enzyme, mais sert de support à la reconstitution du milieu physiologique. La spécificité spatiale des réactions assurées par la protéine est ainsi mise en relief. De part et d'autre de la membrane plasmique, les sites de fixation du cyt *c* et de réduction de l'oxygène s'opposent spatialement. L'orientation de l'enzyme à l'électrode est alors une condition nécessaire pour mesurer un transfert d'électrons physiologique.

-3- Une orientation unique a été mise en évidence pour le cytochrome monohémique P450 humain immobilisé sur électrode d'or (Mak et al., 2010). Cette orientation a été permise par l'analyse structurale de la protéine. Celle-ci met en évidence la présence de 4 cystéines exposées au solvant parmi lesquelles deux (Cys 261 et 268) sont situées à proximité de l'hème. Ces deux cystéines ont été alternativement conservées, tandis que les autres cystéines exposées à la surface du cytochrome ont été mutées par des sérines. Il en résulte deux mutants, disposant d'une unique cystéine exposée à la surface de la protéine. A la manière de la formation des SAMs, grâce au groupement thiol, ces cystéines servent de point d'ancrage sur l'électrode d'or. Afin de valider l'efficacité de l'orientation des ces mutants par rapport à la protéine sauvage, l'activité de conversion de p-Nitrophénol en p-Nitrocatéchol est comparée lorsque le cytochrome P450 est en solution ou immobilisé sur l'électrode. Les valeurs mesurées des activités en solution ne diffèrent pas entre les mutants et le sauvage, indiquant que la mutation n'a pas d'effet néfaste sur la catalyse. En revanche lorsque les

enzymes sont immobilisées sur l'électrode, les mutants présentent une activité 3 fois supérieure à celle du sauvage. Ce résultat implique une optimisation du transfert d'électrons interfacial, résultant de la maîtrise de l'orientation spécifique des cytochromes P450 mutants sur l'électrode.

-4- Le cytochrome c_4 de *Pseudomonas stutzeri* est une protéine dihémique. La constante de transfert électronique intramoléculaire entre les deux hèmes a pu être calculée après une orientation spécifique du cytochrome sur électrode d'or. Cette orientation est rendue possible grâce à un fort moment dipolaire, qui permet d'orienter spécifiquement un hème contre l'électrode modifiée par une SAM portant une fonction terminale carboxylique (Figure 52).

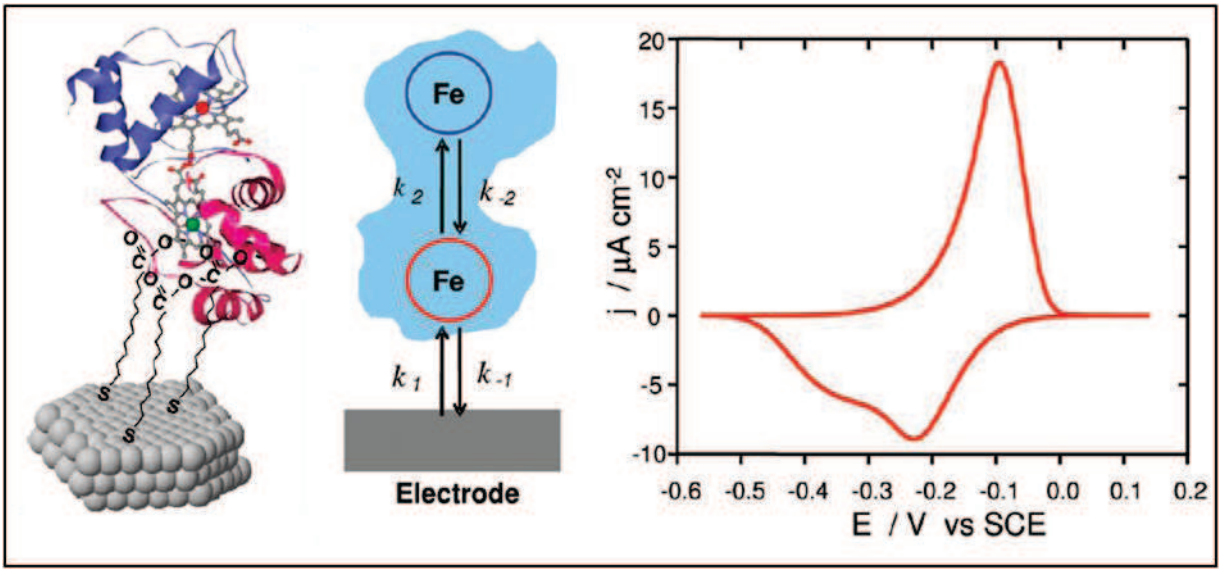


Figure 52: Schéma représentant l'orientation du cytochrome c_4 de *Pseudomonas stutzeri* contre l'électrode modifiée par une SAM à fonction terminale carboxylique (à gauche). Représentation des constantes de transfert intramoléculaire (k_2, k_{-2}) et interfaciale (k_1, k_{-1}) (au milieu). CV associée à l'orientation spécifique du cytochrome c_4 sur l'électrode.

La forme du voltamogramme est significative de l'orientation du cytochrome c_4. Deux pics de réduction successifs sont observés, alors qu'un unique pic d'oxydation, plus large que les pics de réduction, apparaît lors du balayage retour. Cette allure implique un transfert d'électrons interfacial sur le premier hème, suivi du transfert d'électrons intramoléculaire. Lors du balayage cathodique, l'hème de plus haut potentiel orienté vers l'électrode est réduit à l'électrode à -0.23 V, puis réduit l'hème de plus bas potentiel à -0.37 V. Thermodynamiquement, lors du balayage anodique, l'hème de plus bas potentiel devrait être réoxydé en premier. Compte tenu de l'orientation spécifique du cytochrome, il ne peut cependant être réoxydé que *via* l'hème de plus haut potentiel. Cette orientation se traduit par

une vague unique en oxydation au potentiel de l'hème le plus positif. Les valeurs des constantes de transfert électronique intramoléculaire et interfaciale ont ainsi pu être obtenues. L'orientation spécifique du cytochrome a donc permis de mettre en évidence un transfert d'électrons séquentiel entre les deux hèmes, et d'en déterminer les paramètres cinétiques.

2.6.3.3 *Conséquences de l'orientation des protéines en biotechnologie*

Au delà de la compréhension des mécanismes qui régissent le fonctionnement physiologique d'une enzyme dans une chaîne de transfert d'électrons, et de la quantification des cinétiques de transfert d'électrons intra- et inter-moléculaires, l'orientation d'une enzyme sur une interface électrochimique présente des avantages non négligeables dans le domaine applicatif. L'efficacité catalytique des hydrogénases [Ni-Fe] a été comparée au platine, catalyseur chimique communément utilisé à l'anode et la cathode des piles à combustible basse température. Les densités de courant comparées à +0.242 V vs RHE sous 1 bar de H_2 sur une électrode de graphite pyrolytique modifiée avec l'hydrogénase d'*Allochromatium vinosum* ou une électrode de carbone platinée met en évidence une efficacité comparable pour l'oxydation de l'hydrogène (Figure 53) (Jones et al., 2002).

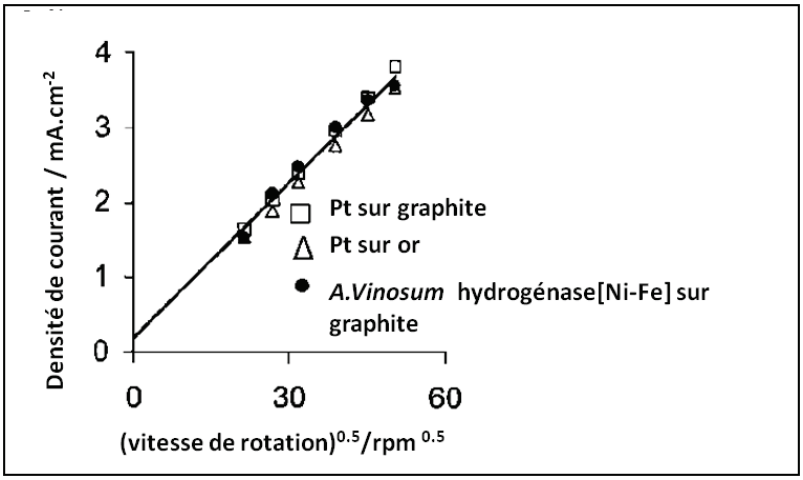


Figure 53: Efficacité catalytique comparée de l'hydrogénase d'*Allochromatium vinosum* et du platine pour l'oxydation de l'H_2 (reproduit de (Jones et al., 2002)). E = 0,242 V vs RHE, 45°C, 1 bar H_2, pH 7,0

En revanche, en abaissant le potentiel vers des valeurs moins positives, le courant catalytique produit par l'hydrogénase de *Desulfomicrobium baculatum* est bien plus faible que celui obtenu avec le platine. Certes les conditions expérimentales ne sont pas les mêmes: tampon pH 7, 60 °C pour l'hydrogénase, contre H_2SO_4 0.5 M et électrode tournante à 900

rpm pour l'électrode de Pt (Figure 54) (Karyakin et al., 2005) (en milieu neutre l'activité catalytique du platine est diminuée d'un facteur 100).

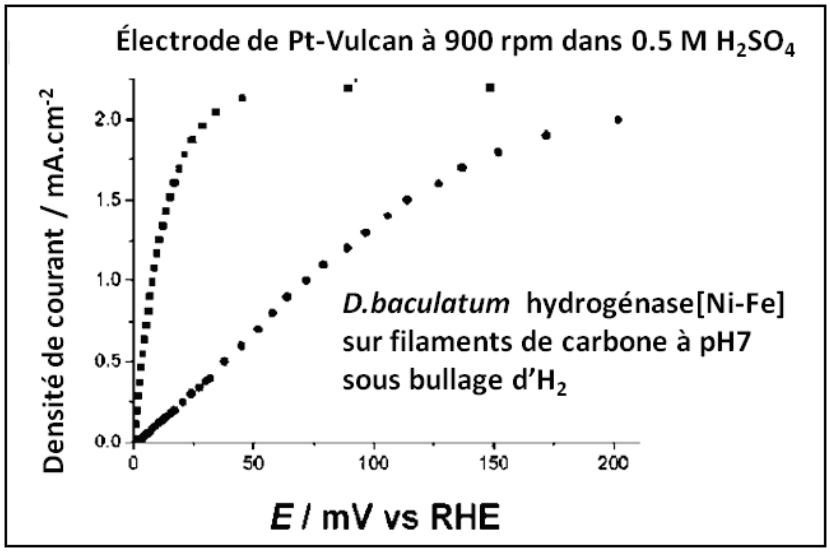


Figure 54: Efficacité catalytique comparée de l'hydrogénase de *Desulfomicrobium baculatum* et du platine pour l'oxydation de l'H_2 en fonction du potentiel (reproduit de (Karyakin et al., 2005)).

Mais le fait que l'hydrogénase n'atteigne les performances du platine qu'en appliquant de fortes surtensions peut être lié directement à la constante de transfert électronique interfacial (Cracknell et al., 2008). Cette vitesse de transfert d'électrons, comme on l'a vu plus haut (Chap.1 §2.6.1), dépend de l'orientation des enzymes sur l'électrode, et de la distance entre le dernier relais électronique en surface de l'enzyme et l'électrode (Leger et al., 2008). L'hétérogénéité spatiale de l'enzyme est ainsi responsable de l'augmentation progressive des densités de courant avec la surtension (Figure 54). On comprend alors qu'une orientation spécifique et homogène, minimisant la distance entre le point de sortie des électrons de l'hydrogénase et l'électrode permettra d'optimiser le biocatalyseur. Cette notion essentielle est bien sûr généralisable aux autres enzymes susceptibles d'être utilisées comme biocatalyseurs dans un procédé type biopile à combustible.

En conclusion, la bioélectrochimie doit considérer l'interface entre la protéine et l'électrode comme la clé de voûte de la maîtrise de l'immobilisation d'une enzyme, des transferts d'électrons associés et des retombées fondamentales et applicatives qui en découlent. Une connaissance approfondie de la structure de la protéine est donc nécessaire, tout comme la capacité à façonner une surface d'électrode pour lui conférer les caractéristiques physicochimiques les plus en adéquation avec les sites d'interaction physiologiques.

3. BIOPILES ENZYMATIQUES : UNE PRODUCTION D'ÉNERGIE PROPRE

3.1 Pile à combustible : Généralités

Les piles à combustible (PACs) permettent de convertir l'énergie chimique en énergie électrique, à partir de réactions d'oxydoréduction. Le carburant est oxydé à l'anode et le comburant réduit à la cathode. Le flux d'électrons est canalisé par un circuit externe, tandis que les ions en solution diffusent afin d'équilibrer les charges (Schéma 17). Comparée à une pile classique (pile Daniel, pile au lithium…), la pile à combustible a l'avantage de pouvoir générer de l'électricité de manière continue tant que le combustible et le comburant lui sont fournis.

Actuellement, plusieurs types de piles à combustible sont commercialisés : les PACs alcalines, échangeuses de protons, à méthanol direct, à carbonate fondu, à acide phosphorique et à oxydes solides. Toutes ces piles ont une chimie qui leur est propre, ainsi que des catalyseurs et des électrolytes spécifiques. Leur température de fonctionnement, ainsi que la puissance qu'elles délivrent, définissent les applications pour lesquelles elles vont être utilisées (Schéma 17).

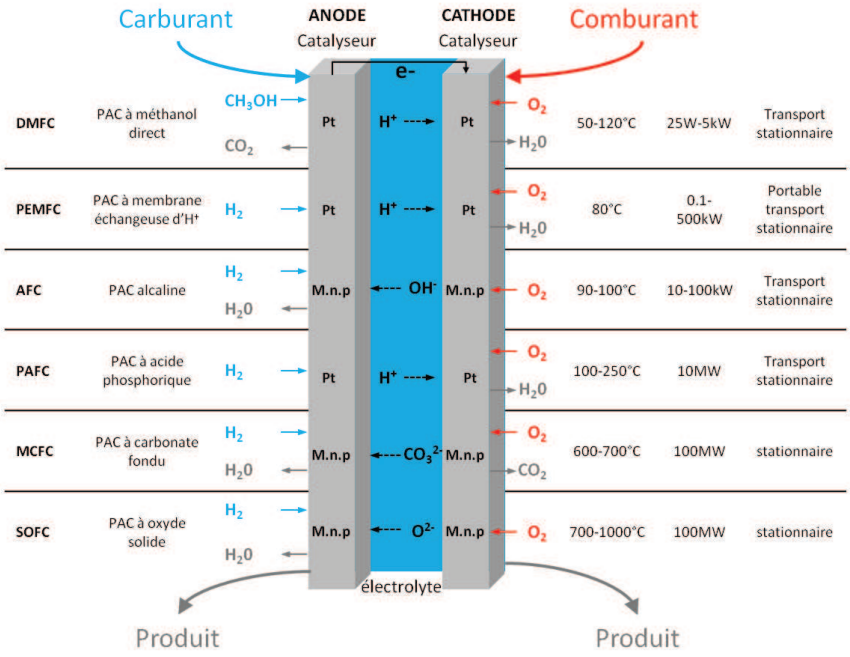


Schéma 17: Liste non exhaustive des différentes PACs et les réactions chimiques associées. Les carburants sont en bleu, les comburants en rouge et les produits en gris. Les catalyseurs sont le platine (Pt) ou des métaux non précieux (M.n.p). Leur température de fonctionnement, puissances fournies et domaines applicatifs sont énoncés.

Bien que les piles à combustible puissent produire de l'électricité plus proprement que les centrales thermiques ou nucléaires, avec des rendements supérieurs aux moteurs à combustion par exemple, elles ne sont pas exemptes de défauts. Les catalyseurs utilisés à l'anode et la cathode afin d'accélérer les cinétiques des réactions, sont généralement des métaux nobles tels que le platine. Ces catalyseurs sont polluants, rares et par conséquent onéreux. Ils ne sont pas spécifiques des réactions d'oxydation et de réduction ce qui impose l'utilisation de membranes séparatrices entre les compartiments anodique et cathodique. Ces membranes doivent maintenir le carburant séparé du comburant, tout en étant perméables aux électrolytes. Elles sont en général très chères. Le Nafion® qui est utilisé dans les PACs à membrane échangeuses de protons par exemple, est la seule membrane réellement efficace sur le marché, d'où un coût très élevé. Les produits formés lors du fonctionnement d'une PAC sont principalement de l'eau, mais parfois du dioxyde de carbone, un gaz à effet de serre. Les carburants utilisés restent limités à l'hydrogène et quelques alcools primaires tels que le méthanol ou l'éthanol. Ces propriétés pointent les problèmes liés au fonctionnement des PACs.

Actuellement, la majorité de la production d'hydrogène mondiale est assurée par le vaporeformage de ressources fossiles hydrocarbonées, telles que le charbon, le pétrole et le gaz naturel. Cette méthode transforme l'hydrocarbure en H_2 selon les réactions suivantes :

$$C_nH_m + (n/2)\ O_2 \xrightarrow{(1)} n\ CO + (m/2)\ H_2$$

$$n\ CO + n\ H_2O \xrightarrow{(2)} n\ CO_2 + n\ H_2$$

$$C_nH_m + n\ H_2O + (n/2)\ O_2 \xrightarrow{(1+2)} n\ CO_2 + (n+m/2)\ H_2$$

Elle se déroule à haute température (1000-1500°C) et sous pression (20-90 bar). L'hydrogène produit contient environ 1% de CO et entre 16 à 20 % de CO_2 en plus de produits soufrés (H_2S, COS). En l'état, il est inutilisable comme carburant dans les PACs. Il a en effet été montré que la présence de CO, même en très faible quantité (0,001 – 0,01%), inhibe presque totalement la capacité du platine à oxyder l'hydrogène (Avgouropoulos et al., 2005, Bonnet et al., 2010). L'hydrogène produit doit donc subir des étapes de purifications lourdes (tamis moléculaire par exemple). Sa pureté est alors évaluée entre 95 à 99,9%, et les teneurs finales en CO et CO_2 sont de l'ordre de 0,001%.

Toutefois, des alternatives « propres » de production d'hydrogène existent. L'électrolyse de l'eau permet de produire de l'hydrogène très pur. Ce processus consomme cependant beaucoup d'énergie. Le concept de photosynthèse artificielle peut limiter la consommation d'énergie non renouvelable: l'idée est d'alimenter les électrolyseurs par l'énergie provenant de panneaux photovoltaïques. La photoélectrolyse est la méthode de production d'hydrogène la plus efficace et la moins coûteuse. Les photoélectrodes sont composées d'une partie photovoltaïque (TiO_2, Fe_2O_3, WO_3) pour la photoanode et d'alliages de platine pour la photocathode. Les photoélectrodes sont immergées dans l'eau, et absorbent l'énergie solaire créant la tension de 1.35V, nécessaire à l'électrolyse de l'eau.

Les processus biologiques sont également envisagés pour la production de ce que l'on appellera le biohydrogène. Les algues vertes telles que *Chlamydomonas reinhardtii* sont utilisées dans des photobioréacteurs où leur système photosynthétique utilise l'énergie solaire afin de produire de l'hydrogène et de l'oxygène par photolyse de l'eau. Le niveau d'oxygène produit doit cependant être maintenu très bas, pour éviter l'inhibition de l'activité hydrogénase impliquée. Des pistes existent actuellement, qui se basent sur une séparation temporelle de la phase de photosynthèse oxygénique et de production d'hydrogène. La bascule entre ces deux phases est réalisée en stoppant la réaction d'oxydation de l'eau au niveau du photosystème II (Carence en soufre). On joue sur la capacité des micro-organismes photosynthétiques à stocker l'énergie produite lors de la phase oxygénique sous forme d'amidon. Le micro-organisme est alors capable de puiser dans son stock d'amidon pour le dégrader et ainsi libérer les électrons nécessaires.

La biomasse peut être mise à profit pour la production de biohydrogène par fermentation. Les acides organiques sont convertis en dioxyde de carbone et hydrogène en condition anaérobie et en présence de lumière par des bactéries telles que *Rhodobacter sphaeroides*. La biomasse des déchets agricoles, riches en composés sucrés (lactose, glucose, sucrose) est utilisable comme substrat par des microorganismes fermenteurs comme les Clostridies. Ces substrats sont décomposés par le processus de fermentation sombre en dioxyde de carbone et hydrogène. En théorie, le glucose fermenté peut générer 12 moles d'hydrogène par mole de glucose. Les rendements sont cependant faibles, et des solutions d'association de processus d'électrolyse de la biomasse à ces processus fermentaires sont actuellement explorées. La fermentation sombre est la voie propre utilisant des substrats renouvelables la plus prometteuse, car son efficacité (60-80%) (Bicakova et al., 2012) est comparable à celle des processus de production d'hydrogène utilisés actuellement.

3.2 Piles à combustible : Principe

Les performances d'une pile à combustible se caractérisent par sa puissance délivrée (P), produit du courant disponible (j) pour une tension (E) selon la formule (Schéma 18):

$$P(W) = j(A) \times E(V)$$

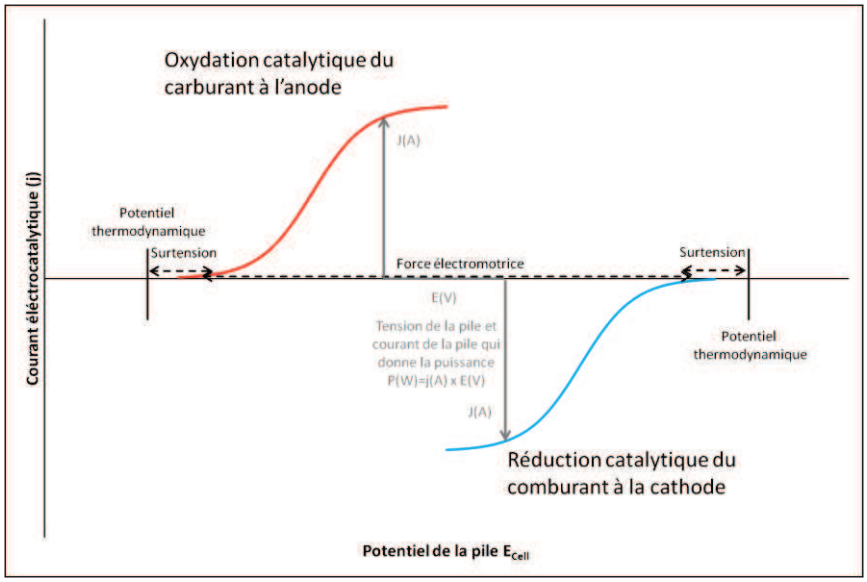


Schéma 18: Relation courant-tension pour une anode (rouge) et une cathode (bleu) testées séparément. Les valeurs utilisées pour calculer la puissance sont indiquées en gris.

La force électromotrice de la pile (f.e.m), ou potentiel à circuit ouvert, est définie par la différence de potentiel entre les réactions d'oxydation du carburant à l'anode et de réduction du comburant à la cathode. C'est la tension maximale de la pile à courant nul. Dans le cas idéal, la f.e.m est définie par la différence des potentiels thermodynamiques des couples redox du carburant et du comburant. La surtension, ou différence entre le potentiel d'équilibre donné par la loi de Nernst et le potentiel de catalyse, sera une mesure significative de l'efficacité du catalyseur. Elle doit être minimisée pour augmenter les performances en terme de puissance de la pile. Le court-circuit est atteint lorsque l'anode et la cathode sont connectées électriquement entre elles mais avec une différence de potentiel nulle.

La puissance utile est obtenue pour des valeurs de potentiel comprises entre la f.e.m et le court-circuit. En général, les courants les plus élevés sont enregistrés à des tensions de pile faibles. Mais ce n'est pas toujours le cas. Certains catalyseurs par exemple subissent des

transformations électrochimiques et/ou chimiques, dépendantes du potentiel, qui inhibent la réaction de catalyse. C'est le cas des biocatalyseurs de l'oxydation de l'H_2, les hydrogénases, comme on l'a vu dans le premier chapitre de ce mémoire (Chap.1§1.1.4.5). L'amplitude du courant est quant à elle directement fonction des efficacités catalytiques des catalyseurs anodiques et cathodiques. Elle sera limitée par le catalyseur, et donc l'électrode anode ou cathode, qui fonctionne avec la plus faible constante catalytique.

La surtension qui se produit indépendamment à chaque électrode se traduit par une surtension de la pile. Trois pertes majeures contribuent à cette surtension (Schéma 19):

- A faibles courants, les pertes liées à l'énergie d'activation dominent. Elles proviennent des barrières énergétiques liées au transfert de charge entre l'électrode et le catalyseur. Cette surtension peut être limitée en améliorant la catalyse, en augmentant la surface de l'électrode, ou en améliorant les conditions de fonctionnement.

- La chute ohmique est liée aux composants de la pile : résistances du transport des ions et résistances électriques, qui proviennent des électrodes, de l'électrolyte, de la membrane et de leurs interfaces.

- Les résistances dues au transfert de masse (apport de carburant/comburant aux électrodes) dominent aux courants les plus élevés. Des gradients de concentration s'établissent, aboutissant à une déplétion en carburant/comburant aux alentours de l'électrode. Les problèmes de transfert de masse peuvent être résolus par établissement d'une convection forcée.

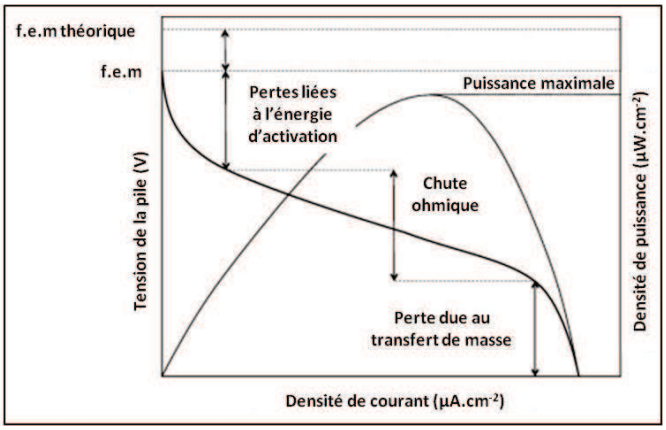


Schéma 19: Variations typiques de la tension et de la puissance d'une pile en fonction de la densité de courant (reproduit de (Osman et al., 2011))

3.3 Les enzymes en tant que biocatalyseurs d'une biopile à combustible

Une biopile est une PAC, dont les catalyseurs utilisés afin de convertir l'énergie chimique en énergie électrique, sont biologiques (biocatalyseurs). On distinguera deux types de biopiles :

- Les biopiles microbiennes, dont les biocatalyseurs sont des microorganismes.
- Les biopiles enzymatiques, dont les biocatalyseurs sont des enzymes.

L'idée de remplacer les catalyseurs chimiques par des catalyseurs biologiques n'est pas nouvelle. Au début du siècle dernier, les travaux de M.C Potter ont montré que la décomposition de composés organiques par des microorganismes immobilisés sur électrode de platine était accompagnée de production d'électricité (Potter, 1911). Un demi-siècle plus tard, en 1964, Yahiro conçoit la première biopile enzymatique (Yahiro et al., 1964). Une cellule à deux compartiments séparés par une membrane est construite, avec deux électrodes de platine immergées dans une solution de tampon phosphate. Dans le compartiment anodique sont introduits du glucose et l'enzyme responsable de son oxydation catalytique, la glucose oxydase. Du côté cathodique, la solution est saturée en oxygène. Une f.e.m d'environ 700 mV est obtenue, et la pile délivre une puissance de 30 $nA.cm^{-2}$ à 300 mV. Très vite, à la suite de ces travaux pionniers, il est apparu qu'une des clés pour améliorer les performances de ces bioprocédés se trouvait dans la connexion électrique des biocatalyseurs sur l'interface électrochimique.

Si les recherches en bioélectrochimie se sont concentrées pendant quelque trente années sur ce verrou, c'est entre autre que l'utilisation de biocatalyseurs au sein d'une PAC offre de nombreux intérêts. Certains de ces avantages peuvent être mis en lumière en établissant un parallèle entre les chaînes de transfert d'électrons impliquées dans le métabolisme énergétique des microorganismes et les PACs (Cracknell et al., 2008). De nombreuses réactions d'oxydation et de réduction sont couplées au niveau de la membrane interne de microorganismes *via* un couple de quinones. C'est le cas chez la bactérie *Escherichia coli* illustrée ci-dessous (Figure 55). La diversité des réactions catalysées par ces enzymes reflète la diversité des couples carburants/comburants qui sont potentiellement utilisables pour le fonctionnement d'une biopile.

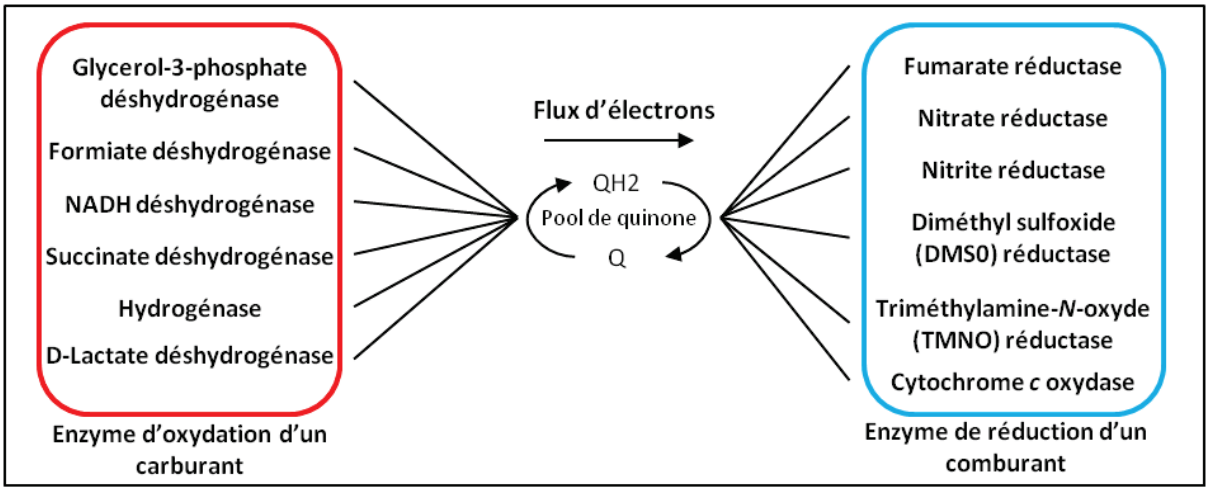


Figure 55: Sélection d'enzymes respiratoires de la bactérie *Escherichia coli* qui couplent l'oxydation d'un carburant à la réduction d'un comburant (reproduit de (Cracknell et al., 2008)).

De plus, de nombreux microorganismes adaptés à des niches écologiques particulières, ont élaboré des métabolismes alternatifs qui impliquent des enzymes spécifiques. Le champ des couples carburant/comburant envisageables est donc considérablement élargi par rapport aux PACs chimiques qui se cantonnent à l'hydrogène et quelques alcools primaires. Les enzymes sont capables d'oxyder une multitude de substrats, parmi lesquels l'hydrogène, les alcools (éthanol, méthanol, glycérol), les aldéhydes, les acides organiques (acide lactique, gluconique), les glucides (glucose, fructose), autant de substrats souvent disponibles, et qui ont l'avantage d'être peu onéreux. En ce qui concerne le choix du comburant utilisé pour la réduction, l'oxygène se révèle être le plus logiquement utilisé, de par son potentiel élevé (+0.82V vs NHE), mais également de sa disponibilité dans l'air ambiant.

L'énergie produite par ces réactions d'oxydoréduction au sein du microorganisme est utilisée pour maintenir un gradient de protons transmembranaire, qui sera utilisé par l'ATP-Synthase pour la synthèse d'ATP, brique énergétique du microorganisme. Dans l'exemple ci-dessous, la formiate déshydrogénase oxyde le formiate dans le périplasme. Les deux électrons libérés vont être transférés au couple quinone/quinol membranaire, puis à la nitrate réductase, qui réduit le nitrate dans le cytoplasme, en relarguant les protons dans le périplasme (Figure 56 A). Cette boucle biologique d'oxydo-réduction équivaut à utiliser une pile à combustible pour charger un condensateur (Figure 56 B et C).

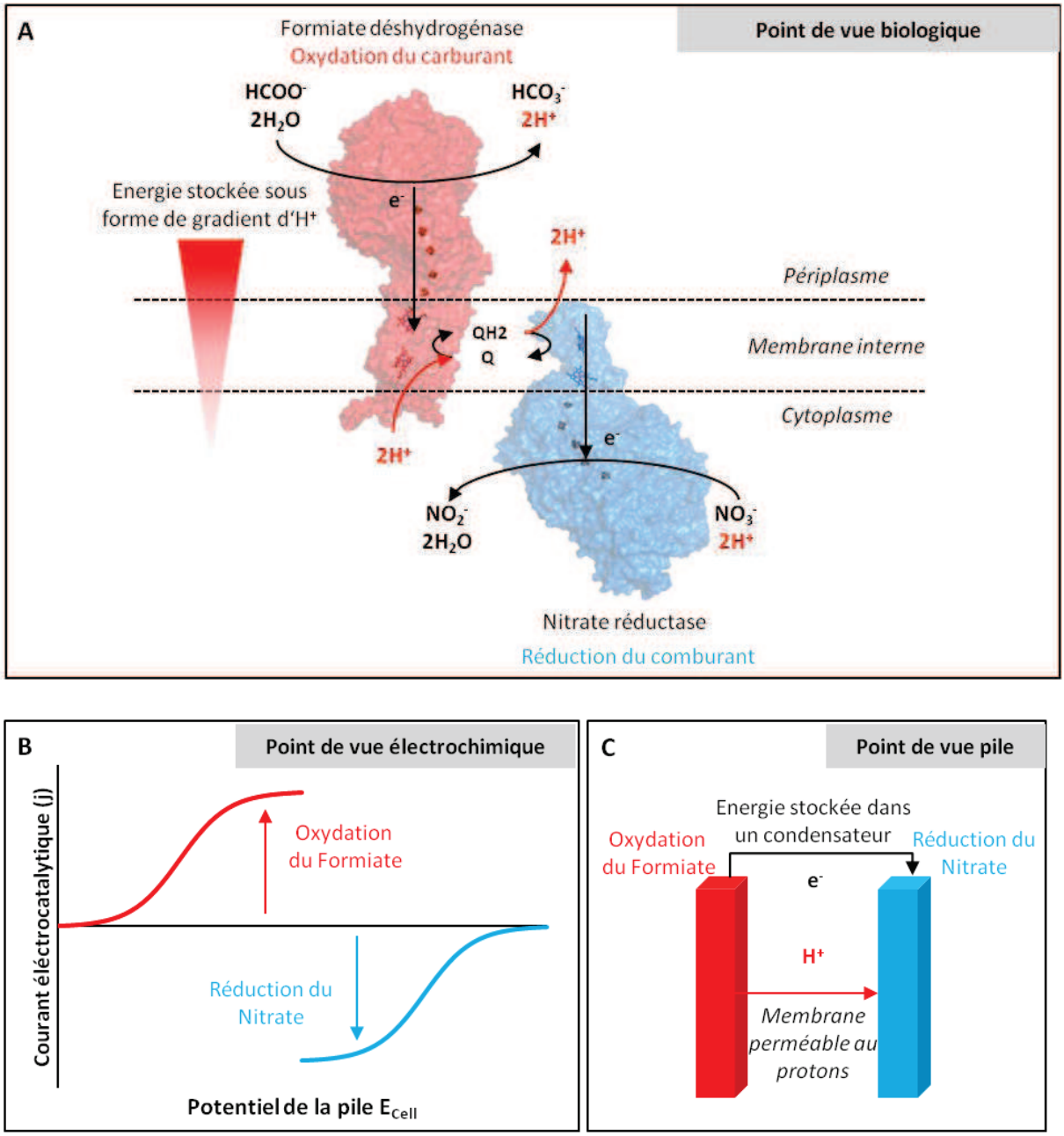


Figure 56: (A) Boucle redox de respiration anaérobie impliquant la formiate déshydrogénase (rouge pale) et la nitrate réductase (bleu pale) d' *Escherichia coli* couplées par un pool de quinone membranaire. L'énergie produite est stockée sous la forme d'un gradient de protons (rouge). (B) Courbes courant-tension pour chacune des enzymes donnant l'équivalent électrochimique de la boucle redox biologique. (C) Boucle redox biologique considérée en tant que biopile. (reproduit de (Cracknell et al., 2008)).

Contrairement à la membrane échangeuse de protons de type Nafion® utilisée dans une PAC, la membrane plasmique biologique est perméable aux carburants et comburants physiologiques. C'est la spécificité des enzymes vis-à-vis de leurs substrats qui permet aux micro-organismes de générer de l'énergie grâce à ces réactions. L'utilisation d'enzymes dans une PAC, qui devient donc une BioPAC, permet ainsi, en théorie, de s'affranchir de la

membrane séparatrice onéreuse, qui peut se dégrader et augmente la résistance interne de la pile. Cela permet aussi d'envisager la miniaturisation du système.

L'affinité de l'enzyme pour le substrat, ou constante de Michaelis (k_M), ainsi que son efficacité catalytique (k_{cat}) sont deux paramètres qui définissent les propriétés catalytiques d'une enzyme. Lorsque deux enzymes fonctionnent en tandem, un nouveau paramètre apparaît: la différence de potentiel entre les deux réactions d'oxydo-réduction (Tableau 4). Le choix du couple d'enzymes impactera ainsi directement sur la puissance de la pile.

Couples rédox	Enzymes	E°' (V) vs NHE 25 °C pH7
acétate/acétaldéhyde	Acétaldéhyde déshydrogénase	-0.6
CO/CO_2	Monoxyde carbone déshydrogénase	-0.51
glucose/gluconolactone	Glucose oxydase	-0.45
H^+/H_2	Hydrogénase	-0.41
NAD^+/NADH	NADH déshydrogénase	-0.32
pyruvate/lactate	Lactate déshydrogénase	-0.19
CH_3OH/CH_2O	Alcool déshydrogénase	-0.18
fumarate/succinate	Fumarate réductase	0.03
NO_3^-/NO_2^-	Nitrate réductase	0.42
O_2/H_2O	Bilirubine oxydase/Laccase/Cco	0.82
H_2O_2/H_2O	Microperoxydase/Horseradish peroxydase	1.35

Tableau 4: Potentiels redox standards de couples redox pertinents pour la conception de biopiles, ainsi que les enzymes associées.

En plus des avantages précédemment évoqués (variété de substrats en particulier), l'utilisation des enzymes en tant que biocatalyseurs au sein des PACs offre *a priori* de nombreux bénéfices, essentiellement liés à leurs propriétés intrinsèques (Tableau 5).

Avantages	Inconvénients
Faible surtension	Faible densité de courant par volume d'enzyme
Renouvelables infiniment	Purification longue et couteuse
Spécificité envers les substrats	Faible stabilité
Oxydation de carburant très divers	Transfert électronique direct parfois impossible
biodégradable	

Tableau 5: Points forts et points faibles de l'utilisation des enzymes en tant que biocatalyseur dans une biopile à combustible (reproduit de (Cracknell et al., 2008)).

Un enzyme catalyse la réaction de transformation du substrat dans des conditions douces (température ambiante, pH neutre). La surtension est minime, ce qui devrait permettre de maximiser la tension au bornes de la pile et par extension sa puissance. Cette propriété ne sera cependant vérifiée que si l'enzyme est immobilisée de façon physiologique, *i.e.* de manière à transférer en direct les électrons à l'électrode. Un médiateur pourra être utilisé s'il n'est pas possible de connecter efficacement l'enzyme. En revanche le potentiel du médiateur redox déterminera alors la f.e.m de la pile.

Les enzymes sont spécifiques envers leur substrat, et catalysent leur oxydation/réduction avec une grande efficacité. La fréquence (k_{cat}) à laquelle elles convertissent leur substrat peut être supérieure à 10^4 s^{-1} (cas des hydrogénases) (Madden et al., 2012). A titre de comparaison le k_{cat} d'un site actif de Pt a été estimé entre 0,1 et 100 s^{-1} (Vincent et al., 2007). La spécificité envers le substrat (k_M) est une donnée essentielle. En effet, même si lors du fonctionnement d'une biopile on s'assure que les substrats soient en concentration saturante, le gradient de concentration aux abords des électrodes, ou au sein du volume poreux des électrodes, va limiter les courants délivrés. Il est donc préférable de sélectionner des enzymes possédant des valeurs de k_M très faibles.

Comparé à un catalyseur métallique tel que le platine, les enzymes ont une taille gigantesque (entre 50 et 200 Å de diamètre si l'enzyme est considérée comme globulaire). La densité de courant pour une aire d'électrode donnée est de ce fait comparativement très faible. A titre d'exemple, une enzyme de 100 kDa et d'aire 100 nm², formant une monocouche et ayant un « turnover » [2] pour la transformation de son substrat de 500 s^{-1}, génère un courant maximum de 80 $\mu A.cm^{-2}$. Pour atteindre des densités de courant de l'ordre de 0.5 $mA.cm^{-2}$, valeur qui permet d'envisager des applications biotechnologiques, il faudrait 6000 couches d'enzymes superposées, soit une épaisseur de 60 µm (Barton et al., 2004). Même s'il était possible de superposer 6000 couches d'enzyme, encore faudrait-il y faire diffuser le substrat, et connecter toutes les enzymes en direct à l'électrode…à moins d'utiliser un médiateur redox qui lui aussi devrait pouvoir diffuser librement jusqu'à l'électrode. Ces considérations mettent en évidence la nécessité de développer des électrodes de larges surfaces spécifiques.

Un autre point à considérer est la stabilité intrinsèque des enzymes qui va déterminer la durée de vie de la biopile. La plupart des biopiles ont une durée de vie de quelques jours

[2] Le turnover est défini comme le nombre de molécules de substrat transformées par unité de temps par une seule molécule d'enzyme.

(Kim et al., 2006). Mais l'immobilisation des enzymes peut améliorer leur stabilité dans le temps : une biopile glucose/oxygène basée sur la glucose oxydase et la BOD immobilisées dans un polymère redox d'osmium a ainsi pu fonctionner pendant 20 jours (Mano et al., 2002). Une déshydrogénase immobilisée par une membrane de Nafion® modifiée par des sels d'ammonium a conservé son activité pendant 45 jours alors que son temps de demi-vie en solution n'excède pas la dizaine d'heures (Moore et al., 2004a).

Enfin, les enzymes d'intérêt proviennent d'organismes variés. De ce fait, leur expression et purification peuvent être plus ou moins aisées. L'expression homologue engendre généralement de faibles rendements, tandis que l'expression hétérologue chez *Escherichia coli* peut s'avérer compliquée dans le cas des métalloenzymes qui nécessitent souvent l'insertion de cofacteurs métalliques (Lenz et al., 2005). Ces cofacteurs métalliques sont insérés grâce à des protéines accessoires qui ne sont parfois pas exprimées dans l'organisme hôte. Ainsi, les enzymes utilisées dans les biopiles actuellement développées sont souvent celles qui sont facilement purifiables, mais qui pour autant ne sont pas forcement les plus efficaces en terme de k_M et k_{cat}. Les enzymes commerciales ont quant à elles une pureté faible, qui nécessite des étapes de purification, et sont accompagnées de contaminants qui peuvent diminuer l'activité électrocatalytique.

Ainsi, la puissance des biopiles développées à ce jour, peine à dépasser le $mW.cm^{-2}$, ce qui limite les domaines d'applications envisageables. La production d'énergie à grande échelle est pour l'instant limitée, et l'alimentation d'un moteur électrique en vue de la propulsion de véhicule est bien entendu hors de portée des biopiles. Cependant il reste des domaines applicatifs dans lesquels les biopiles peuvent s'illustrer. Les dispositifs portables nécessitant de faibles puissances sont déjà à l'état de prototype, comme l'atteste la biopile glucose/oxygène présentée en 2007 par Sony qui développe une puissance de 1,5 $mW.cm^{-2}$ (Sakai et al., 2009). Un baladeur numérique a ainsi pu être alimenté par quatre biopiles en série. Grâce à leur capacité à fonctionner dans des conditions physiologiques, une des applications actuellement visées est une utilisation *in vivo* pour alimenter des dispositifs implantables (micromachine, micropompe,..).

3.4 Biopiles à combustible : Bioélectrodes

La littérature consacrée à la conception de bioélectrodes performantes pour des applications biopiles est aujourd'hui très vaste. Les architectures élaborées sur les électrodes

afin d'augmenter la quantité d'enzyme immobilisée sont variées, allant des nanotubes de carbone aux mésoporeux de carbone, en passant par les nanoparticules de carbone ou métalliques. La connexion des enzymes reste encore le plus souvent médiée *via* l'utilisation en particulier de polymères redox. De plus en plus de travaux relatent néanmoins un transfert d'électrons direct entre enzymes et électrode. Ces succès de connexion directe sont en grande partie liés aux réseaux tridimensionnels utilisés. Cette partie bibliographique ne se veut pas exhaustive. Elle présentera quelques exemples récents et pertinents de bioélectrodes performantes. Des biopiles à combustible implantables seront présentées, car elles constituent des concepts originaux de biopiles conçues spécifiquement pour fonctionner en milieu contraint, en l'occurrence physiologique, pour des applications dédiées. Les premiers exemples de biopiles H_2/O_2 basés sur les hydrogénases tolérantes à l'oxygène seront finalement discutés.

3.4.1 Biocathodes

Le comburant classique dans les biopiles enzymatiques est l'oxygène car il est disponible directement dans l'atmosphère. Sa concentration dans une solution exposée à l'air ambiant est de 0,27 mM à 25°C. Le potentiel standard du couple O_2/H_2O offre la possibilité d'obtenir une f.e.m élevée pour une future pile. Les deux enzymes les plus utilisées pour la réduction électrocatalytique à quatre électrons de l'oxygène en eau sont la laccase et la BOD. Ces deux enzymes permettent de diminuer la surtension de réduction de O_2 par rapport au platine (Mano et al., 2003) (Mano et al., 2006).

Laccase et BOD appartiennent à la famille des « blue copper oxidases ». Elles partagent la même structure cristallographique. Le site actif de réduction de l'oxygène comprend trois atomes de cuivre de type T2/T3, coordinés par des ligands histidine. Les électrons provenant de l'oxydation des substrats (la bilirubine pour la BOD et des dérivés phénoliques pour la laccase) sont transférés à ce site actif par un quatrième atome de cuivre de type T1 localisé dans une poche hydrophobe. Le cuivre de type T1, situé à la surface de la protéine, est le site de fixation des substrats (Figure 57).

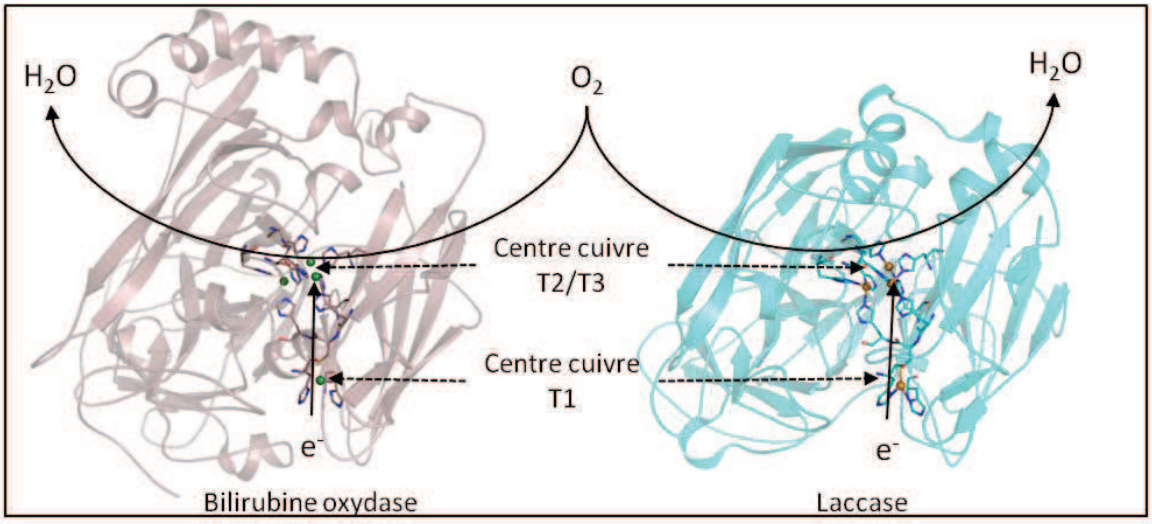


Figure 57 : Structure des enzymes majoritairement utilisées pour la réduction de l'oxygène à la cathode: la BOD (rose) et la laccase (cyan).

Les laccases utilisées dans la conception de biocathodes proviennent des champignons. Le potentiel de réduction de l'O_2 est en effet plus élevé que celui obtenu avec les laccases provenant de plantes. Le pH optimum d'activité varie entre 3 et 5, ce qui limite leur utilisation, en particulier pour les applications bioimplantables qui nécessitent un pH neutre. Les laccases sont inhibées par les ions halogénures, en particulier les fluorures, mais de manière plus problématique par les chlorures. La BOD permet de s'affranchir de ces limitations puisqu'elle est active à pH 7 sans être inhibée par les chlorures. Elle est cependant inhibée par les urates, ce qui peut s'avérer rédhibitoire pour des applications biomédicales. Elle est électroactive au même potentiel que la laccase fongique pour la réduction de l'oxygène.

3.4.1.1 Biocathodes basées sur une connexion directe de l'enzyme

Il a été montré que la laccase et la BOD peuvent être connectées en direct à l'électrode par le centre cuivre T1. La réduction catalytique de l'oxygène a alors lieu sans médiateur redox (Bogdanovskaya et al., 2002, Tsujimura et al., 2004). Une technique rationnelle d'immobilisation de la laccase a été mise au point, qui s'appuie sur la relation structure cristallographique/fonction de l'enzyme (Blanford et al., 2007). Le substrat, une lignine phénolique dégradée, se fixe au centre cuivre T1 bordée d'une poche hydrophobe en surface de la protéine. Les électrons issus de la réaction d'oxydation du substrat sont ensuite transférés au centre T2/T3 qui réduit l'oxygène. L'idée est de mimer le substrat de la protéine à l'électrode. A cette fin, un analogue structural de la lignine, l'anthracène, a été immobilisé

sur électrode de graphite pyrolytique *via* l'électroréduction d'une fonction diazonium. La laccase est ensuite adsorbée sur l'électrode modifiée par l'analogue de substrat. Comparativement à une électrode non modifiée, le courant lié au transfert d'électrons direct est au minimum multiplié par deux, tandis que la stabilité est considérablement accrue (plus de 60 jours) (Figure 58).

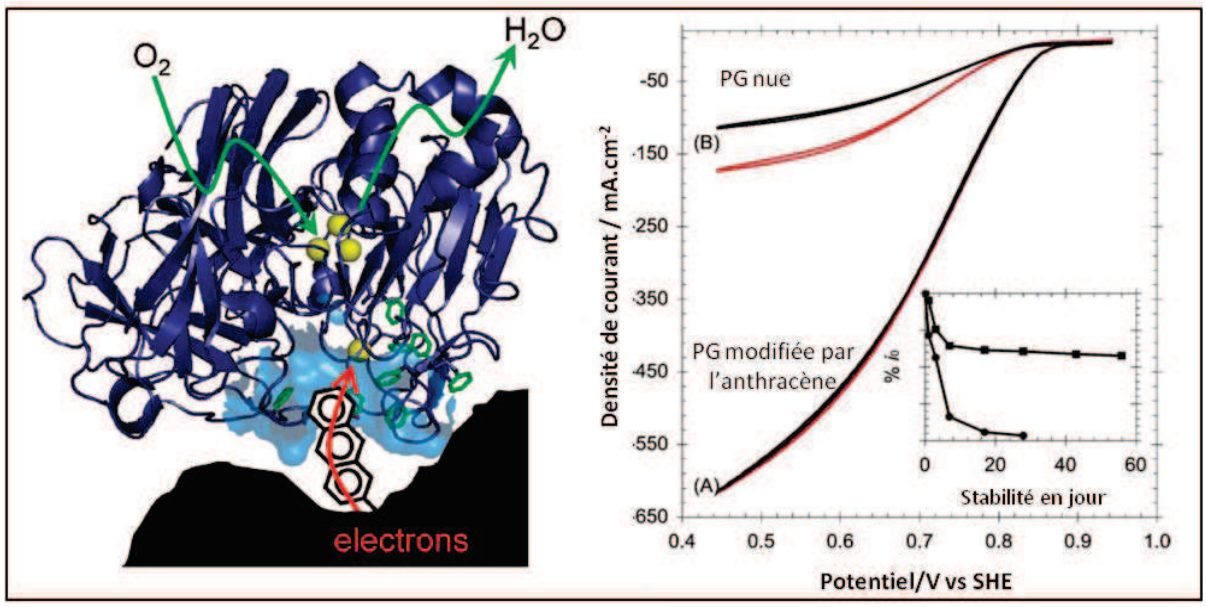


Figure 58: Stratégie développée pour immobiliser de manière fonctionnelle et stable la laccase. L'anthracène sert de point d'ancrage pour la poche hydrophobe de la laccase (à gauche). A droite, CV de la réduction de O_2 sur électrode de graphite pyrolytique nue (B) et modifiée par l'anthracène (A) sur laquelle la laccase est adsorbée. Les courbes rouges sont enregistrées après l'immobilisation de l'enzyme et les courbes noires après renouvellement de l'électrolyte. Insert : stabilité dans le temps de l'électrode (B) en ronds noirs et de l'électrode (A) en carrés noirs.

Un des moyens de favoriser la connexion directe des enzymes à l'électrode est de développer des architectures 3D. Au cours des deux dernières années, de nombreuses études sont consacrées à l'élaboration de telles interfaces électrochimiques pour la réduction enzymatique de l'O_2. Une biocathode aux performances intéressantes a ainsi été développée (Salaj-Kosla et al., 2012), basée sur une électrode d'or de structure nanoporeuse, offrant un très haut rapport surface sur volume (Figure 59). La taille des pores est contrôlée pour être compatible avec la taille des enzymes (entre 12 et 20nm) (Scanlon et al., 2012). La BOD de *Myrothecium verracuria* a été adsorbée sur cette électrode. Une densité de courant de réduction de l'oxygène de 300 $\mu A.cm^{-2}$ liée à un transfert d'électrons direct a été obtenue. Cette densité de courant est parmi les plus élevées jamais atteintes. En revanche l'instabilité, attribuée en première approche à un relargage rapide de l'enzyme, reste limitante. Pour

diminuer la perte d'enzyme, un polymère capable de former des liaisons covalentes avec les fonctions amines, thiols et hydroxyle, est déposé sur l'électrode après encapsulation de l'enzyme. Cette stratégie permet de développer une densité de courant de 800 $\mu A.cm^{-2}$. La stabilité n'a malheureusement été validée que sur deux cycles de voltamétrie, l'équivalent de 10 min de fonctionnement de l'enzyme.

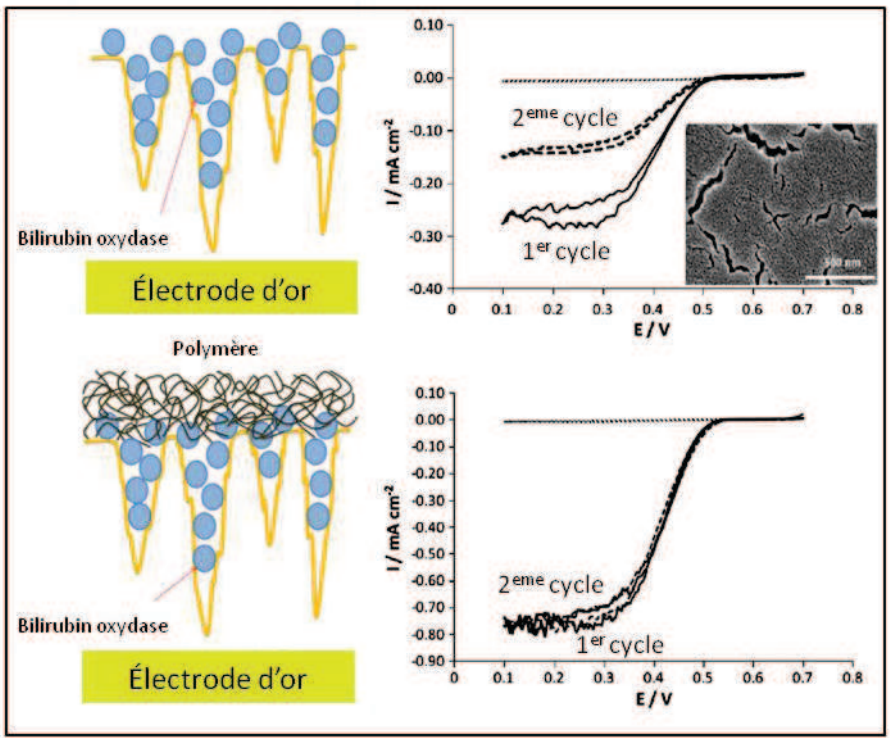
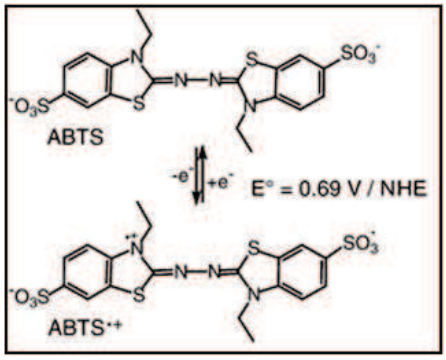


Figure 59: Représentation schématique des électrodes nanoporeuses d'or avec la BOD adsorbée (à droite). CV de la réduction de O_2 sur les électrodes correspondantes (à gauche). Insert : vue en microscopie électronique des électrodes d'or nanoporeuses.

3.4.1.2 Biocathodes basées sur une connexion médiée de l'enzyme

Dans le cadre de l'utilisation de la BOD ou de la laccase dans une biopile, les densités de courant ont pu être améliorées en utilisant l'ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) comme médiateur redox. Compte tenu du potentiel de l'ABTS, l'oxygène est réduit avec une faible surtension (Schéma 20).



Shéma 20: Réaction d'oxydo-réduction de l'ABTS.

Cependant, si on veut tirer parti de la spécificité des enzymes envers leur substrat, et s'affranchir de la membrane séparatrice entre les deux compartiments, les médiateurs redox en solution ne sont pas appropriés, car ils diffuseraient aussi bien à l'anode qu'à la cathode, déroutant les électrons du circuit extérieur. La co-immobilisation du médiateur avec l'enzyme sur l'électrode est nécessaire. Des polymères redox particulièrement versatiles ont été développés par le groupe d'Heller aux Etats-Unis dans les années 90 (Ohara et al., 1993). Ces polymères sont basés sur des complexes d'osmium, qui servent de relais électronique entre l'enzyme et l'électrode. L'osmium est complexé par des ligands pyridine, dont la nature chimique permet d'ajuster le potentiel redox. La longueur du bras portant le complexe d'osmium peut influer sur la densité de courant électrocatalytique (Figure 60) (Mano et al., 2006).

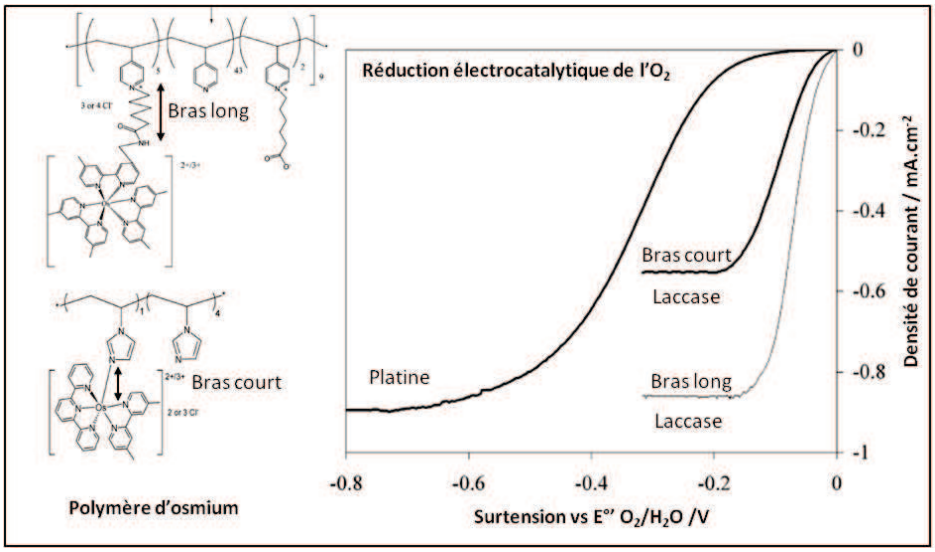


Figure 60: Polymères d'osmium dont la longueur du bras liant le complexe d'osmium varie (à droite). CV de la réduction de l'O_2 sur électrode de platine, et électrode modifiée par la laccase encapsulée dans les deux complexes d'osmium. Le potentiel est reporté par rapport au potentiel thermodynamique du couple O_2/H_2O (à gauche).

En tirant profit des propriétés de matrice hôte des polymères d'osmium, une nouvelle BOD a été caractérisée très récemment chez la bactérie *Bacillus pumilus*, présentant des propriétés très prometteuses pour l'élaboration de biocathode (Durand et al., 2012). Son efficacité pour la réduction de l'O_2 est très proche de celle de la BOD de *Trachyderma tsunodae*, qui était à ce jour considérée comme la BOD la plus efficace pour la réduction de l'oxygène en eau. Les densités de courant pour la réduction électrocatalytique de l'oxygène sont de l'ordre de 650 $\mu A.cm^{-2}$, avec une faible inhibition en présence d'ions chlorures. Il a également été montré que cette BOD est thermostable avec un temps de demi-vie à 80°C dépassant les 100 min. De plus, en condition physiologique (37°C) son activité reste inaltérée après 300 min, alors que la BOD de *T.tsunodae* perd plus de 50% de son activité après seulement 90 min. Cette BOD présente donc de très bonnes caractéristiques (activité efficace, thermostabilité, tolérance aux chlorures) pour être utilisée comme biocathode.

Les deux approches, structure 3D de l'électrode et recours à un médiateur redox, peuvent être combinées pour une immobilisation fonctionnelle des enzymes. Une biocathode basée sur une approche combinée d'augmentation de la surface conductrice grâce à l'utilisation de nanotubes de carbone, et du nombre d'enzymes connectées grâce à un médiateur redox a été réalisée (Sadowska et al., 2010). L'ABTS est préféré aux métaux lourds polluants des polymères d'osmium. Il est attaché covalemment par deux linkers différents, soit aux parois, soit aux extrémités des nanotubes de carbone. Un mélange de Nafion® et de laccase est ensuite séché sur l'électrode modifiée (Figure 61). La densité de courant la plus forte (420 $\mu A.cm^{-2}$) est obtenue avec les nanotubes modifiés par l'ABTS greffé sur les parois par un linker court. Le greffage *via* le linker plus long entraîne des densités de courant équivalentes à celles obtenues sur nanotubes de carbone non modifiés. La meilleure efficacité catalytique (rapport du courant catalytique sur le courant lié au médiateur) est quant à elle obtenue avec les nanotubes de carbone modifiés aux extrémités par de l'ABTS lié *via* un linker long. La densité de courant n'est dans ce cas que de 70 $\mu A.cm^{-2}$. L'efficacité catalytique est cependant de 66 contre 10 environ pour les nanotubes modifiés par l'ABTS sur les parois des nanotubes, malgré une quantité d'ABTS immobilisés bien moindre. Une explication pourrait venir de l'état d'hybridation sp2 du carbone aux extrémités des nanotubes comparée à l'hybridation sp3 des parois. L'hypothèse d'un encombrement stérique n'est pas écartée, et il est probable que la laccase ait plus d'accessibilité sur les extrémités des CNTs que sur les parois. Les électrodes retiennent 70 % de leur activité après trois jours de fonctionnement.

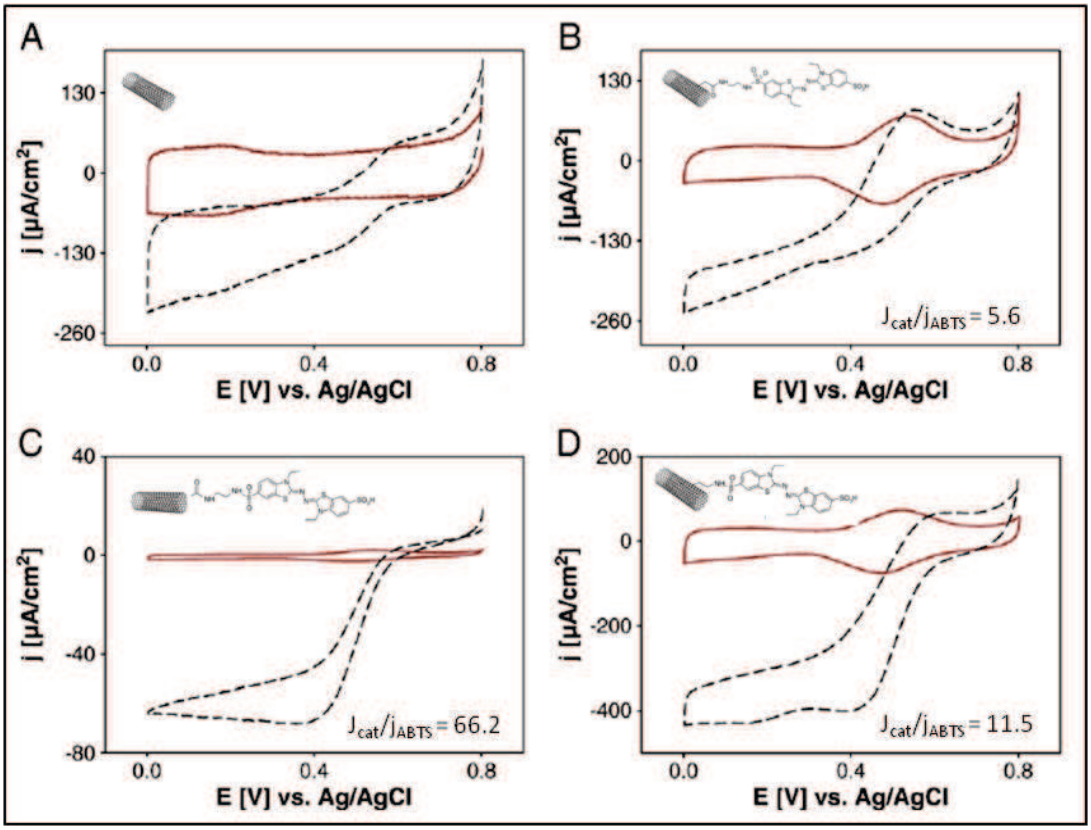


Figure 61: CV de la réduction de l'O_2 par la laccase adsorbée sur différents types de nanotubes de carbone. (A) nanotubes de carbone non modifiés, (B) nanotubes de carbone modifiés avec de l'ABTS lié covalemment par un bras long sur les parois, (C) nanotubes de carbone modifiés avec de l'ABTS lié covalemment sur les extremités, (D) nanotubes de carbone modifiés avec de l'ABTS lié covalemment par un bras court sur les parois.

3.4.1.3 D'autres couples comburant / enzyme pour la biocathode

La tyrosinase a été décrite très récemment comme biocathode alternative à la BOD pour réduire l'oxygène (Reuillard et al., 2012). Cette enzyme oxyde les polyphénols avec l'oxygène en tant que cosubstrat. Le site actif est constitué de deux atomes de cuivre de type T3. Il a été montré que la tyrosinase est capable de réduire l'oxygène par transfert d'électrons direct sur une électrode composée d'enzymes encapsulées dans des nanotubes de carbone compactés. La réduction de l'oxygène se produit avec une surtension plus grande que celle observée pour la laccase et la BOD (+0,6 V vs NHE à pH 7, contre +0,82V et +0,69V à pH 7 pour la laccase et la BOD respectivement). Une densité de courant de 550 µA.cm^{-2} à 0,24 V est rapportée. 50 % de l'activité de la bioélectrode est conservée après une semaine, 30 % étant perdue dès le premier jour. La tyrosinase offrant l'avantage de ne pas être inhibée par la

majorité des substances présentes dans les fluides physiologiques, contrairement à la laccase et la BOD, apparaît comme une biocathode d'avenir pour les biopiles implantables.

Si l'oxygène est le comburant le plus couramment utilisé à l'anode, d'autres comburants sont possibles. Le peroxyde d'hydrogène présente un intérêt évident du fait du potentiel thermodynamique du couple H_2O_2/H_2O (1,35V vs NHE), 500 mV plus élevé que celui de l'oxygène. Les enzymes catalysant sa réduction sont les peroxydases. Ce sont des protéines hémiques. La plus connue est la Horseradish peroxidase (HRP) disponible commercialement. La cytochrome *c* peroxydase, dont le donneur physiologique d'électrons est le cyt *c*, a été largement étudiée par électrochimie. Le potentiel de réduction catalytique du peroxyde d'hydrogène est très positif: +0,75V pour la cyt *c* peroxydase, et même +0,88V pour un mutant. Néanmoins, une très faible stabilité rend cette enzyme inutilisable en l'état dans une biopile (Mondal et al., 1998).

3.4.2 Bioanodes

Les bioanodes les plus répandues se basent sur des enzymes oxydant le glucose en gluconolactone. Certaines enzymes qui catalysent l'oxydation des fonctions alcool des sucres peuvent aussi oxyder des alcools primaires comme l'éthanol et le méthanol. Parmi les enzymes oxydant le glucose, se trouvent des oxydases et des déshydrogénases qui diffèrent par leurs cofacteurs et leur accepteur d'électrons physiologique. Celles qui utilisent l'oxygène comme accepteur sont classées dans les oxydases, tandis que celles qui utilisent de petites molécules tels les cytochromes sont classées dans les déshydrogénases.

Parmi les difficultés liées à l'utilisation de ce type d'enzymes dans des biopiles, on retiendra :

1- Les sites actifs sont enfouis profondément dans la protéine, ce qui rend délicate la connexion directe à l'électrode. L'utilisation de médiateurs redox est envisagée, si l'orientation spécifique de l'enzyme échoue.

2- La valeur du k_M de ces enzymes est élevée, entre 0,3 et 42 mM (Cracknell et al., 2008), ce qui peut être limitant dans des conditions de faibles concentrations en carburant (en mode implantable par exemple).

3- Les alcool déshydrogénases ne sont pas affectées par l'oxygène ce qui permet de les utiliser dans des biopiles sans membrane séparatrice. En

revanche la glucose oxydase qui utilise l'oxygène comme accepteur d'électrons peut court-circuiter l'anode, et un effort particulier sur l'architecture de la biopile devra être mis pour pallier ce problème.

La littérature est très riche, qui rapporte de nombreuses architectures aptes à l'immobilisation fonctionnelle des enzymes utilisables comme bioanodes (Forti et al., 2011), (Park et al., 2011), (Murata et al., 2009). Les recherches se sont peu à peu orientées vers la connexion directe de l'enzyme. Celles-ci restent cependant souvent controversées. C'est en particulier dans le cas de la glucose oxydase, pour laquelle l'apparition du signal électrochimique du FAD est plus le signe de la dénaturation de l'enzyme que d'une connexion directe fonctionnelle. Néanmoins, certaines études apportent la preuve d'une oxydation des sucres sans médiateur redox. C'est le cas de la CDH que nous avons déjà décrite dans ce mémoire (Chap.1 §2.6.2).

La CDH oxyde le lactose, carburant disponible à moindre frais, à un pH optimum de 4. Dans le but d'améliorer les performances et la stabilité des bioanodes basées sur la CDH, l'immobilisation sur des films de nanotubes de carbone fonctionnalisés a été étudiée (Figure 62) (Tasca et al., 2011). Par réduction de sels de diazonium portant soit des fonctions carboxyliques soit des fonctions amines, deux types de nanotubes de carbone simple paroi ont été obtenus. La CDH est composée d'une sous unité catalytique de pI 5,7, et d'une sous unité hémique d'un pI inférieur à 3,5. Les auteurs ont tiré avantage des cette différence de charge pour orienter favorablement l'enzyme sur la surface positive obtenue avec les nanotubes de carbone portant la fonction amine. Les densités de courant et vitesse de transfert d'électrons interfaciale s'en trouvent améliorées en comparaison des nanotubes de carbone portant la fonction carboxylique. La stabilité de l'électrode a été validée pendant 50 heures. Une faible perte de l'activité initiale est observée.

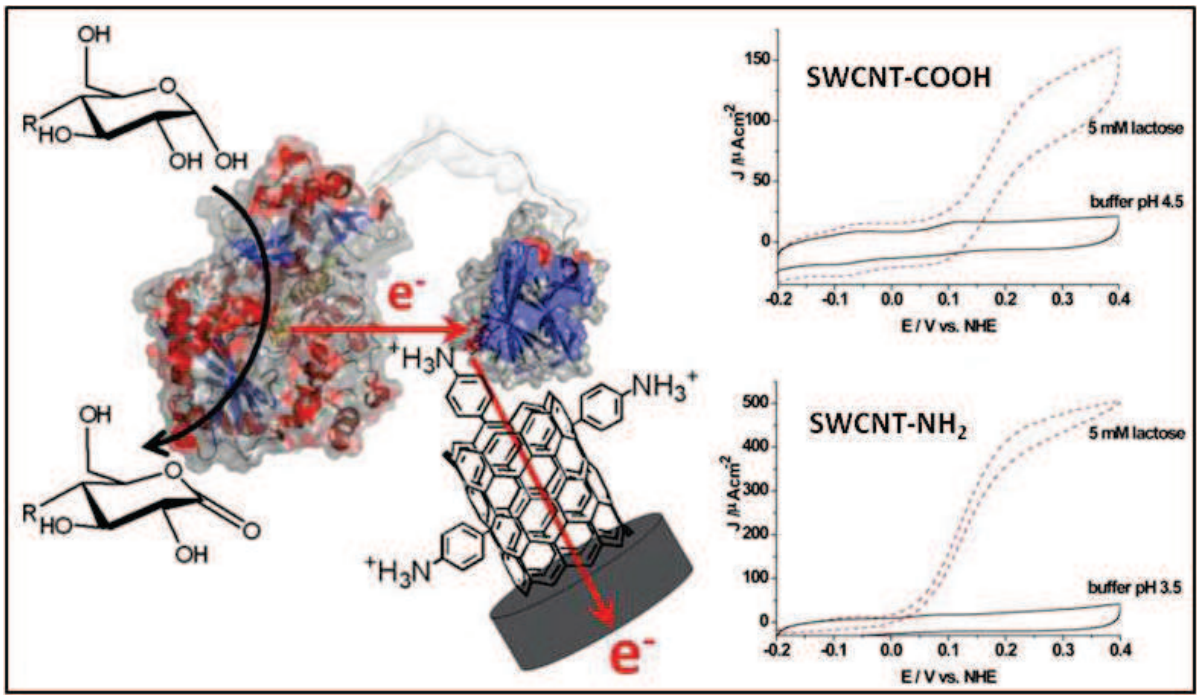


Figure 62: Représentation schématique des électrodes de carbone vitreux modifiées par les nanotubes de carbone (SWCNT) fonctionnalisés par un diazonium aminé. CV de l'oxydation du lactose par la CDH adsorbée sur une électrode de carbone vitreux modifiée par des SWCNT portant des fonctions carboxyliques (en haut à droite) ou des fonctions aminées (en bas à droite).

Dans le cas de la glucose oxydase (Gox), une électrode macroporeuse constituée d'une matrice de nanotubes de carbone dans laquelle sont insérées des billes de polystyrène a été développée (Figure 63) (Wen et al., 2012). Après destruction à la chaleur, les billes découvrent une structure macroporeuse dont les pores mesurent en moyenne 500 nm. Devant les difficultés liées à la connexion directe de la Gox, un hydrogel constitué de Gox, d'un polymère d'osmium et d'un crosslinker (PEGDGE) est appliqué sur l'électrode. L'optimisation de la quantité de billes de polystyrène permet d'augmenter la surface électroactive et de doubler la densité de courant catalytique par rapport à la seule matrice de nanotubes de carbone. Une densité de courant particulièrement élevée de 8 $mA.cm^{-2}$ est enregistrée. Malheureusement la stabilité dans le temps de ce type d'électrode n'a pas été étudiée, et on peut regretter que l'oxydation du glucose se passe 800 mV au dessus du potentiel thermodynamique.

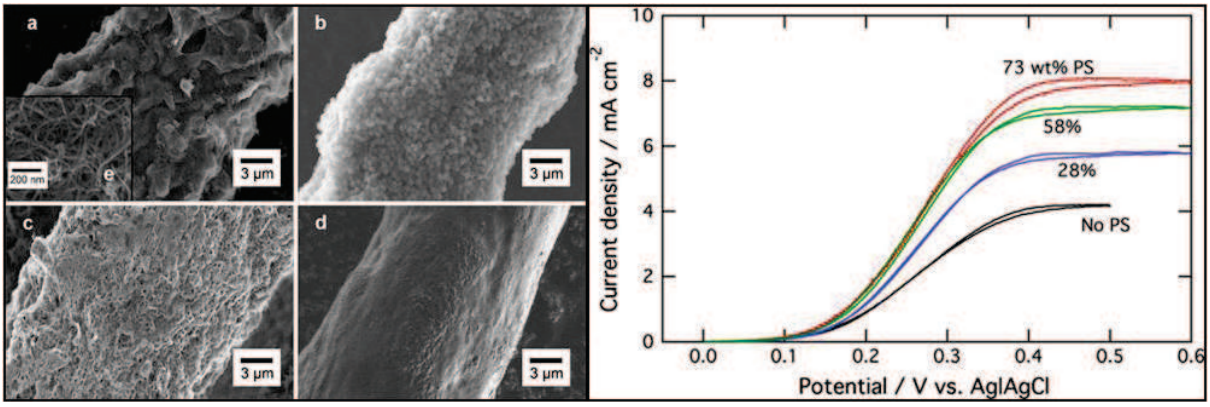


Figure 63: Suivi par microscopie électronique des étapes de modification de l'électrode macroporeuse. (a) électrodes avant l'insertion des billes de polystyrène, (b) électrode avec des billes de polystyrène insérées, (c) électrode après le traitement supprimant les billes de polystyrène, (d) électrode après ajout de l'hydrogel comprenant l'enzyme, le médiateur redox et un crosslinker. CV de l'oxydation du glucose par la Gox sur une électrode sans (noir) ou avec différentes quantités de billes de polystyrène (à gauche).

3.4.3 Biopile

3.4.3.1 Biopile implantable

Puisque la plupart des bioélectrodes explorées sont basées sur la réduction et l'oxydation de fluides physiologiques, l'O_2 d'une part et sucres d'autre part, les biopiles sont très vite apparues comme sources potentielles d'énergie implantée. L'alimentation de petits dispositifs réclamant de faibles puissances, comme les pacemakers dont le fonctionnement ne nécessite pas plus de 10 µW, est la cible actuelle du développement de nombreuses biopiles. Une biopile implantable semble avantageuse par rapport à une PAC classique : i) il n'est pas nécessaire de fournir les substrats qui sont déjà présents dans l'organisme, ii) ces substrats sont fournis de manière continue par l'apport nutritionnel et la respiration, iii) le fluide physiologique fait office d'électrolyte, iv) la spécificité des enzymes permet de s'affranchir d'une membrane séparatrice, v) les produits des réactions sont inoffensifs pour l'organisme hôte puisqu'ils sont déjà présents (le gluconolactone et l'eau).

Les limitations attendues de ce type de biopile sont sa puissance et sa stabilité dans le temps. Il faut également savoir que les concentrations en substrats dans un fluide physiologique sont loin d'être optimales pour une utilisation en biopile. Le k_M de la glucose oxydase d'*Aspergillus niger* (la plus utilisée car disponible commercialement) varie de 15 à 30 mM selon les conditions d'utilisation, alors que la concentration en glucose dans les

fluides extra cellulaires est de seulement 5 mM. De plus, la concentration en oxygène dans le sang est de 45µM, alors qu'elle est de 270 µM dans une solution exposée à l'air ambiant (Cinquin et al., 2010b).

Un prototype de biopile glucose/oxygène fonctionnant dans des conditions pseudo-physiologiques (un tampon dont les concentrations en substrats ont volontairement été augmenté) a été developpée par Heller (Soukharev et al., 2004). Cette pile basée sur la Gox à l'anode et la BOD à la cathode développe une puissance de 4.4 µW à 37 °C. Cette puissance a été considérablement améliorée (280µW.cm^{-2}), pour fonctionner à des concentrations plus faibles en glucose, grâce à une glucose oxydase disposant d'un k_M plus faible envers le glucose (6,2 mM) (Mano, 2008).

Ces piles sont classiquement basées sur des biocathodes utilisant la laccase ou la BOD pour la réduction de l'O_2. L'activité laccase nécessite un pH bas (pH optimal de 5), et ces deux enzymes sont inhibées par des molécules présentes dans les fluides extra cellulaires: les ions chlorures pour la première et les ions urates pour la seconde. Des enzymes plus tolérantes sont donc nécessaires.

Ainsi une biopile glucose/oxygène implantée dans le rat a vu le jour, grâce à l'utilisation d'une cathode atypique, basée sur la polyphénol oxydase, une enzyme capable de réduire l'oxygène à pH physiologique en présence de chlorures et d'urates (Cinquin et al., 2010a). L'oxydation du glucose reste catalysée par la glucose oxydase d'*Aspergillus niger*. Une catalase, enzyme responsable de la dismutation du peroxyde d'hydrogène en eau et oxygène, a été ajoutée à l'anode afin de stabiliser le système. En effet, les électrons produits lors de l'oxydation du glucose par la glucose oxydase peuvent être utilisés pour réduire l'oxygène en peroxyde d'hydrogène, un composé peu recommandable en condition physiologique. Les deux électrodes sont composées des enzymes et d'un médiateur rédox (des quinones) compactées dans des pastilles de graphite. La biopile implantée dans le rat présente une f.e.m de 0,275 V et une puissance maximale de 6.5 µW à 0,13 V. Elle a été testée pendant 11 jours consécutifs (Figure 64). Ces résultats sont la première démonstration de l'implantation d'une biopile Glucose/oxygène dans un animal.

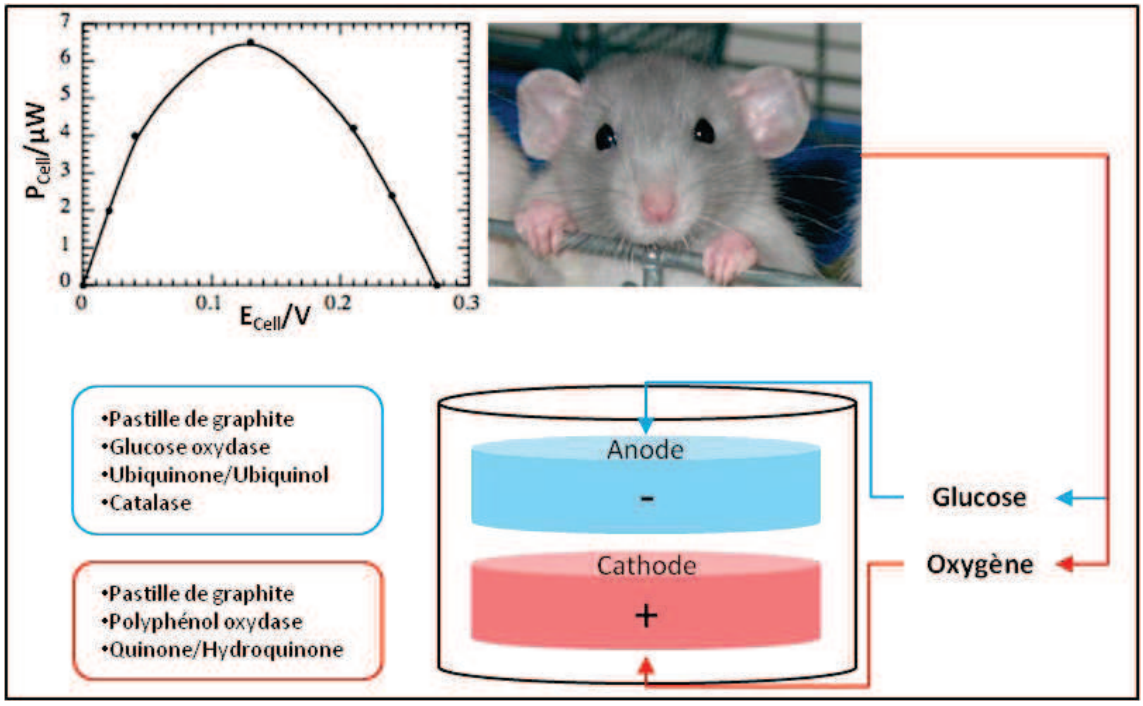


Figure 64: Représentation schématique de la biopile implantée dans le rat alimentée par ses fluides physiologiques : le glucose et l'oxygène.

Dans une optique d'utilisation à long terme de cette nouvelle biopile, plusieurs défis doivent être relevés. Les enzymes doivent être immobilisées et connectées en direct pour éviter l'utilisation de médiateurs rédox. L'oxygène ne doit pas interférer avec l'oxydation du carburant à l'anode. Les bioélectrodes doivent supporter de faibles concentrations en substrats.

Ainsi, une biopile capable de fonctionner dans le plasma et le sang humain a été développée et optimisée. Les électrodes ont la particularité d'être basées sur des nanoparticules d'or de 20 nm de diamètre (Wang et al., 2012b). La CDH qui ne réagit pas avec l'oxygène, est utilisée comme anode pour l'oxydation du glucose, tandis que la BOD est utilisée pour la réduction de l'oxygène. Les deux enzymes fonctionnent en transfert d'électrons direct, et aucune membrane séparatrice n'est utilisée. En présence de 5 mM de glucose dans du tampon phosphate, la biopile développe une f.e.m de 0,68 V et délivre une puissance 15 $\mu W.cm^{-2}$ à 0,52 V avec un temps de demi-vie supérieur à 12h. Dans du sang humain et du plasma, une f.e.m de 0,65 V est obtenue avec une puissance de 3 $\mu W.cm^{-2}$ à 0,45 V. Le temps de demi-vie dans le sang est inférieur à celui observé dans le plasma (3h contre 8h), probablement en raison de la formation d'un biofilm de cellules sanguines à l'électrode.

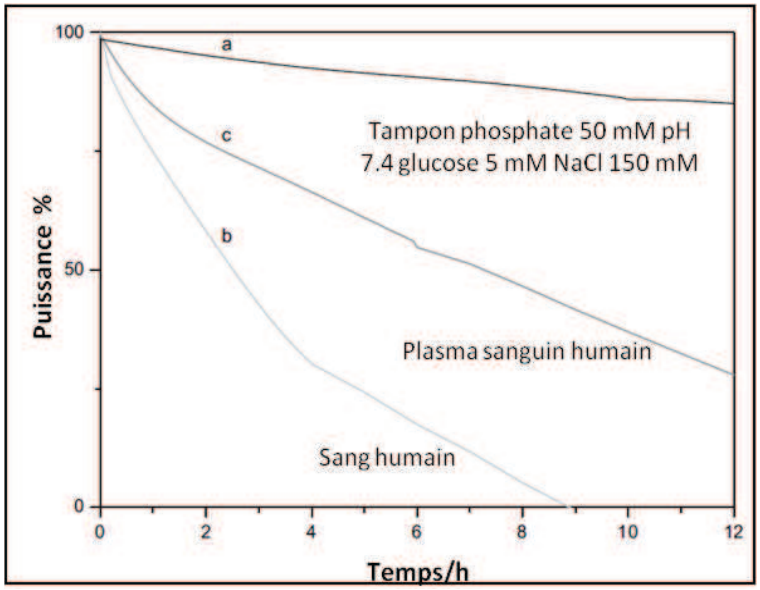


Figure X: Variation de la puissance de la biopile en fonction du temps, dans (a) un tampon phosphate (b) du sang humain et (c) du plasma sanguin humain.

D'autres applications peuvent être envisagées pour les biopiles, comme l'alimentation de biocapteurs environnementaux. Ainsi des biopiles miniaturisées pourraient être implantées dans de petits organismes vivants (escargots, vers, insectes), à condition d'adapter ces biopiles pour des conditions différentes de celles des liquides physiologiques humain.

Un exemple récent et pertinent est donné par une biopile glucose/oxygène développée pour une implantation dans un escargot. La pile est implantée dans l'hémolymphe (équivalent du sang) (Figure 65)(Halamkova et al., 2012). Le glucose est présent dans l'hémolymphe à une concentration de 60 µM. La laccase est utilisée à la cathode pour la réduction de l'oxygène, malgré un pH optimal mal adapté. L'enzyme oxydant le glucose est une glucose déshydrogénase, enzyme encore peu caractérisée à ce jour, la pyrroloquinoline quinone–dépendante glucose déshydrogénase (PQQ-Glucose déshydrogénase). Cette enzyme n'est pas dépendante du NAD^+, cofacteur délicat à immobiliser sur électrode. L'enzyme est greffée covalemment sur des nanotubes de carbone multi parois par l'intermédiaire d'un dérivé pyrène. La fonction pyrène interagit par π–stacking avec les parois des nanotubes de carbone, tandis qu'une fonction carboxylique sur le pyrène permet la liaison covalente aux enzymes *via* les lysines de surface. Une fois implantée, la biopile présente une f.e.m de 530 mV et délivre une puissance de 30 $\mu W.cm^{-2}$. Il est intéressant de noter que seuls 6 % des enzymes apparaissent directement connectées à l'électrode, ce qui laisse une marge pour l'optimisation du système. Deux limitations ont cependant été mises en évidence : (i) l'hémolymphe des

escargots contient peu de glucose, nécessitant une régénération métabolique du glucose en arrêtant le fonctionnement de la biopile, (ii) la diffusion du glucose jusqu'à l'électrode est très limitante le liquide physiologique visqueux qu'est l'hémolymphe.

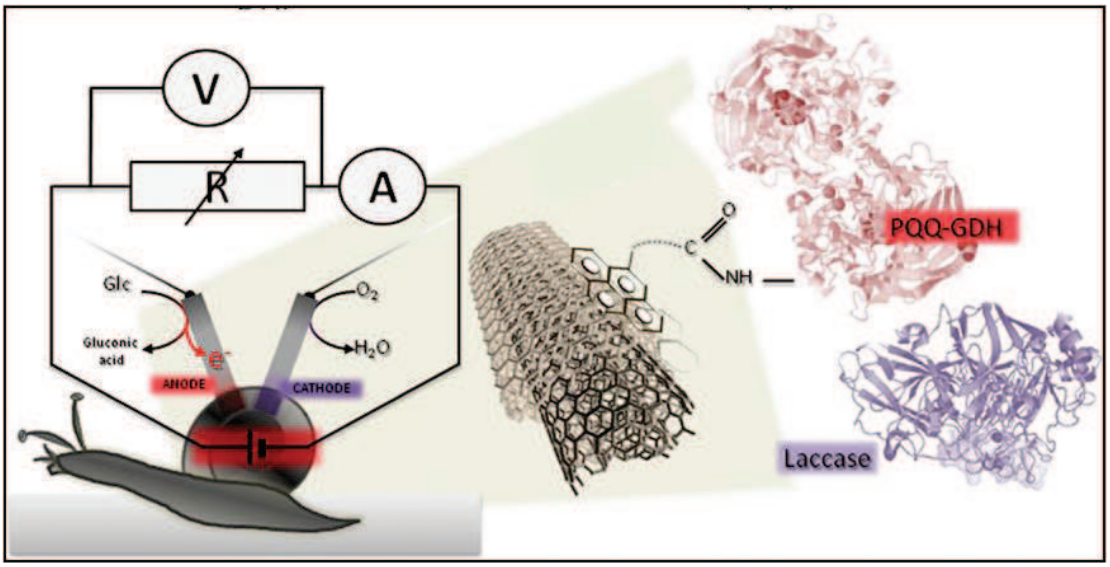


Figure 65: Représentation schématique de la biopile implantée dans l'escargot alimentée par le glucose et l'oxygène présents dans son hémolymphe (à droite). Schéma des électrodes basées sur des feuilles de nanotubes de carbone multi parois modifiées par des pyrènes fonctionnalisés par des fonctions carboxyliques servant d'ancrage covalent aux enzymes (à gauche).

3.4.3.2 *Biopile H_2/O_2*

D'autres carburants peuvent être utilisés dans le cadre d'applications autres qu'implantables pour les biopiles. C'est en particulier le cas de l'hydrogène, considéré comme on l'a rappelé dans ce manuscrit comme un vecteur énergétique d'avenir. La biopile obtenue sera alors l'équivalent de la PAC à membrane échangeuse de protons basse température classique. Très peu de publications rapportent à ce jour études sur ce type de biopile. C'est très certainement en lien avec la difficulté de purification et stabilisation des hydrogénases, en particulier leur sensibilité à l'oxygène. La première biopile H_2/O_2 utilisait d'ailleurs non pas des enzymes mais des bactéries sulfatoréductrices (*Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough) à l'anode (Tsujimura et al., 2001). Ces bactéries sont connues pour contenir au moins quatre hydrogénases différentes, qui leur permettent de coupler la réduction des sulfates à l'oxydation de l'H_2. Dans notre équipe, il avait d'ailleurs été montré indépendamment que les cellules de l'espèce *Desulfovibrio* immobilisées sur électrode de carbone vitreux était capables d'oxyder l'hydrogéne *via* le méthylviologène (Lojou et al., 2004). La biopile était

constituée d'une bioanode recouverte de bactéries, et d'une biocathode à base de BOD. En présence de médiateurs redox en solution et d'une membrane séparatrice, l'alimentation de la biopile par de l'hydrogène pur dans le compartiment anodique et de l'O_2 pur dans le compartiment cathodique avait permis de débiter 0,9 mA avec une f.e.m de 1,17 V.

La première biopile H_2/O_2 enzymatique n'a été décrite que très récemment. C'est grâce notamment à la découverte d'hydrogénases tolérantes à l'oxygène qu'une telle biopile a pu être mise au point. En 2005, l'hydrogénase tolérante à l'oxygène de *Ralstonia eutropha* simplement adsorbée sur une électrode de graphite pyrolytique a été couplée, dans une biopile sans membrane, à la laccase (Figure 66) (Vincent et al., 2005). La biopile sous flux d'H_2 et d'air délivre une puissance de 7 $\mu W.cm^{-2}$ et une f.e.m de 0,95 V. Mais lorsque l'hydrogénase tolérante est remplacée par l'hydrogénase sensible à l'oxygène d'*Allochromatium vinosum*, une puissance négligeable est observée. L'addition de CO, un inhibiteur connu des hydrogénases, n'influe pas sur la puissance obtenue, mettant en évidence la tolérance au CO de cette hydrogénase tolérante à l'oxygène. En revanche lorsque le flux d'oxygène est approché de l'anode, sa concentration augmente et la puissance diminue drastiquement. Deux phénomènes en sont hypothétiquement responsables: une inhibition partielle de l'hydrogénase, ainsi que la réduction compétitive de l'oxygène sur l'électrode à bas potentiel, un problème récurrent des biopiles sans membrane. Ces premières expériences mettaient déjà en lumière l'avantage à travailler avec des hydrogénases multi-tolérantes, mais aussi certaines limitations liées aux propriétés intrinsèques de ces enzymes. Malgré la faible puissance obtenue, la preuve de concept était faite.

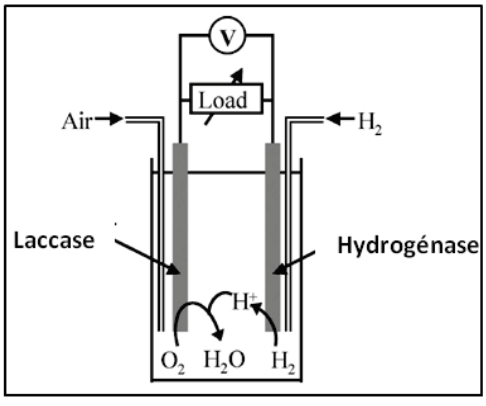


Figure 66: Représentation schématique de la biopile H_2/O_2 sans membrane. L'oxydation de l'hydrogène est catalysée par une hydrogénase tolérante à l'oxygène et la réduction de l'oxygène est catalysée par la laccase.

En 2006, la même biopile est réévaluée, alimentée cette fois avec seulement 3% d'hydrogène dans l'air (un ratio non explosif) (Vincent et al., 2006). La puissance de la biopile (5 $\mu W.cm^{-2}$) reste inaffectée par l'addition de CO. Trois de ces biopiles montées en série délivrent une f.e.m de 2,7 V, tension suffisante pour alimenter une montre pendant plus de 24 h. Il est remarqué que la puissance chute fortement à des tensions inférieures à 0,5 V, phénomène attribué à l'inactivation anaérobie à haut potentiel des hydrogénases. (Figure 67).

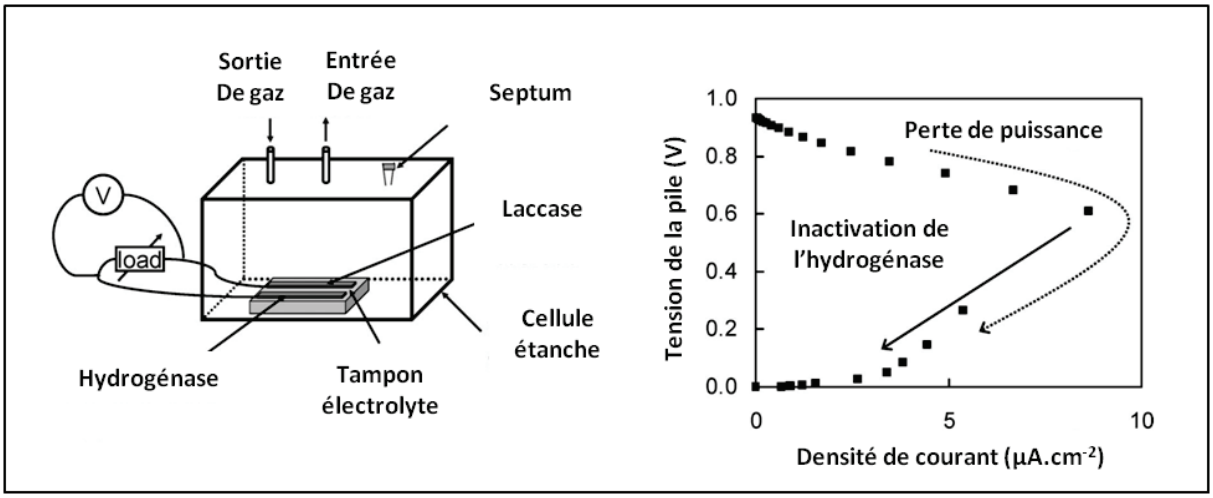


Figure 67: Représentation schématique de la biopile H_2/O_2 fonctionnant grâce à un mélange de 3% d'H_2 dans l'air (à gauche). Relation courant-tension atypique de la biopile liée à l'inactivation anaérobie à haut potentiel de l'hydrogénase.

Les puissances obtenues par ces dispositifs restent faibles. Aucune tentative d'optimisation des densités de courant n'a d'ailleurs été faite. Il n'en reste pas moins que la découverte d'hydrogénases tolérantes à l'oxygène a permis d'envisager le développement de biopiles H_2/O_2 jusque là inimaginables. De nombreuses pistes pour améliorer le dispositif ont dès lors été évoquées : augmentation de la surface électroactive, modification des enzymes et des électrodes pour accroître la stabilité du système, design de piles dans le but d'optimiser les flux de gaz, et en particulier limiter l'accès de l'oxygène dans le compartiment anodique, recherche d'enzymes permettant de fonctionner dans des conditions extrêmes. C'est avec ces objectifs que je me propose de développer les résultats obtenus au cours de mon doctorat.

Objectifs de la thèse

Objectifs de la thèse

Les hydrogénases, enzymes responsables de la transformation réversible de l'hydrogène dans de nombreux microorganismes, suscitent un intérêt croissant en bioélectrochimie, en tant que biocatalyseurs potentiels d'une nouvelle génération de biopiles à combustible H_2/O_2. Parmi ces enzymes, l'hydrogénase purifiée à partir de la bactérie *Aquifex aeolicus* est particulièrement séduisante. Cette hydrogénase est en effet capable d'oxyder l'hydrogène avec de forts rendements catalytiques sur une large gamme de température (25 à 90 °C). Elle présente surtout des propriétés remarquables de tolérance à l'oxygène et au monoxyde de carbone, atouts essentiels pour une future utilisation en biopile. Si de nombreuses études ont concerné la compréhension des bases moléculaires à l'origine de ces tolérances, la maîtrise des paramètres qui contrôlent l'immobilisation fonctionnelle de cette enzyme sur une interface électrochimique reste une étape clé à franchir.

Dans le cadre de ma thèse, je me suis attaché à définir une méthodologie qui me permette de discriminer, ou tout au moins contrôler, l'orientation de l'enzyme immobilisée sur différentes interfaces électrochimiques. Mon premier objectif -basé sur le postulat selon lequel la vitesse de transfert d'électrons direct entre l'enzyme et l'électrode est plus rapide que le transfert d'électrons médié par un médiateur redox- a été de montrer que ces processus de transfert d'électrons direct ou médié permettaient la discrimination entre les enzymes orientées favorablement ou défavorablement à l'électrode pour un transfert d'électrons interfacial optimal. Des études couplées électrochimie/microscopie/spectrométrie ont été menées pour relier cette orientation à la structure de l'enzyme. Les résultats de cette étude doivent permettre de définir les paramètres optimaux pour une immobilisation fonctionnelle de l'hydrogénase.

Mon deuxième objectif était de faire la preuve de concept d'une biopile performante H_2/O_2. Dans ce but, les paramètres définis comme optimaux pour l'immobilisation de l'hydrogénase, ont été exploités pour une augmentation de la stabilité et de l'efficacité catalytique de la bioélectrode. Couplée à une biocathode pour la réduction catalytique de l'oxygène, notre bioanode basée sur l'hydrogénase d'*Aquifex aeolicus* a ensuite été optimisée, en particulier en intégrant de nouvelles modifications d'électrode. Ces différentes études ont conduit à la mise au point d'un premier prototype de biopile H_2/O_2 performante, capable de

fonctionner dans des environnements extrêmes, qui ouvre la voie à des applications nouvelles dans le domaine des biopiles.

Résultats et discussions

Chapitre II : Orientation fonctionnelle de l'hydrogénase [Ni-Fe] d'*Aquifex aeolicus* sur électrode

Résultats et discussions

Chapitre II : Orientation fonctionnelle de l'hydrogénase [Ni-Fe] d'*Aquifex aeolicus* sur électrode

1. IMMOBILISATION FONCTIONNELLE DE L'HYDROGÉNASE [Ni-Fe] D'*AQUIFEX AEOLICUS* SUR ÉLECTRODE DE GRAPHITE PYROLYTIQUE

1.1 Discrimination de l'orientation : méthodologie

Lorsqu'elle catalyse l'oxydation de l'hydrogène, l'hydrogénase d'*Aquifex aeolicus* (MbH1) transfère les électrons du site actif [Ni-Fe] vers l'extérieur de la protéine *via* une série de trois centres [Fe-S] séparés par moins de 15 Å. Dans la partie introductive de ce manuscrit, les conditions pour lesquelles un transfert d'électrons interfacial suffisamment rapide pour permettre la catalyse ont été définies. En première approche, le centre [Fe-S] distal, le plus proche de la surface de la protéine, ne peut transférer efficacement les électrons avec l'électrode qu'à condition d'être à une distance inférieure à 15 Å de celle-ci (Page et al., 1999), (Cracknell et al., 2008). Le courant enregistré par électrochimie sera alors lié à un transfert d'électrons direct (TED). Cependant, il n'y a *a priori* aucune raison pour que toutes les molécules d'hydrogénases s'orientent spontanément de manière homogène sur une électrode non modifiée spécifiquement. Afin d'évaluer l'orientation de l'enzyme, et de faire « travailler » toutes les enzymes à l'électrode, un médiateur redox, espèce se comportant comme un système réversible et rapide au sens électrochimique, peut être utilisé. Si ce dernier diffuse librement en solution, ou est capable une fois immobilisé d'interagir avec l'enzyme, il jouera le rôle de navette entre l'électrode et l'enzyme.

1.2 Une électrode de graphite pyrolytique omnipotente

1.2.1 *Connexion directe de l'hydrogénase [Ni-Fe] d'*Aquifex aeolicus

Comme vu dans l'introduction, le comportement électrochimique des hydrogénases, et plus spécifiquement le transfert d'électrons direct entre l'enzyme et l'électrode, est classiquement étudié par adsorption sur électrode de graphite pyrolytique (PG) (Figure 1). Après adsorption de MbH1 sur électrode de PG, un processus d'oxydation catalytique apparaît dans une solution saturée en H_2, sans addition de médiateurs redox. Ce processus disparaît quand la solution est saturée en azote, confirmant ainsi l'oxydation catalytique directe de l'H_2 par MbH1 (TED). Cette vague catalytique démarre avec une surtension d'environ 100 mV comparée au potentiel standard du couple H^+/H_2 à pH 6,8 et 60°C (-660 mV). La diminution du courant catalytique à un potentiel supérieur à -250 mV n'est pas due à une limitation en substrat, mais au processus d'inactivation réversible anaérobie. Pour rappel, ce processus qui démarre à -250 mV correspond à l'apparition d'un ligand pontant hydroxyle au niveau du site actif, générant la forme Ni-B inactive pour l'oxydation de l'hydrogène. Ce processus est réversible comme l'atteste l'activité recouvrée lors de l'inversion du sens de balayage des potentiels (Figure 1). L'existence d'un courant de catalyse direct prouve qu'au moins une proportion de MbH1 est orientée à l'interface avec le centre [Fe-S] distal à une distance inférieure à 15 Å.

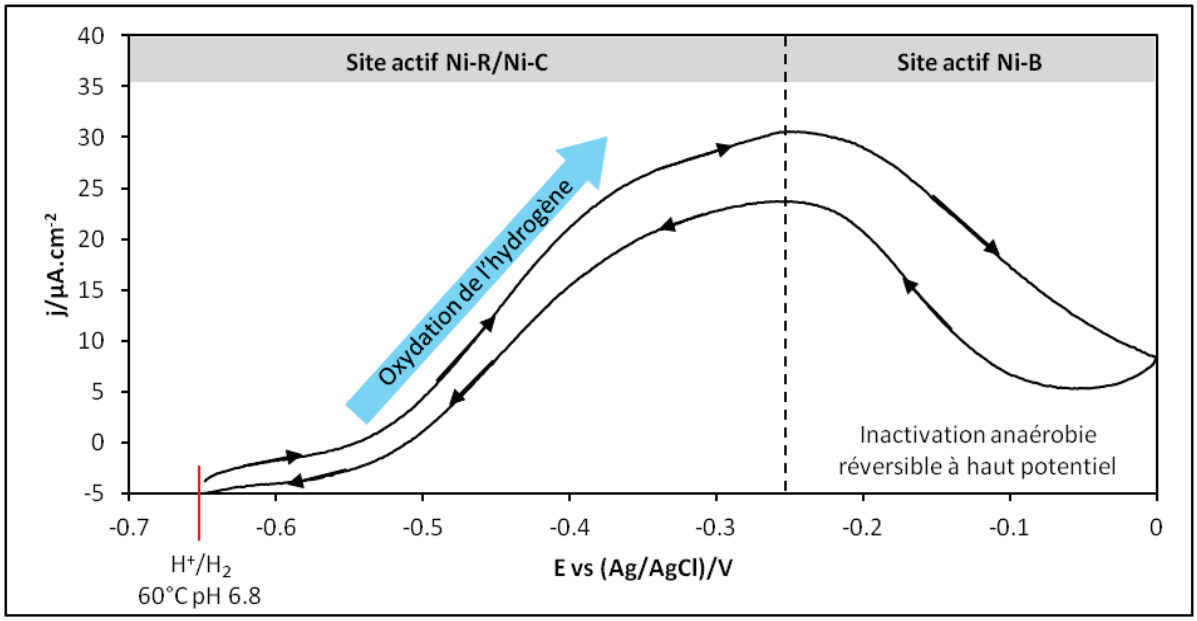


Figure 1 : CV de l'oxydation de l'hydrogène par MbH1 adsorbée sur électrode de PG. Vitesse de balayage 5 mV.s^{-1}, tampon Hepes 50 mM pH 6,8 à 60 °C sous H_2.

L'adsorption de MbH1 ne nécessite pas plus de 30 secondes sur ce type d'électrode. L'adsorption sur une durée plus longue ne permet pas d'augmenter les intensités de courant

catalytique. Il faut donc admettre que la cinétique d'adsorption de l'hydrogénase MbH1 sur graphite est très rapide.

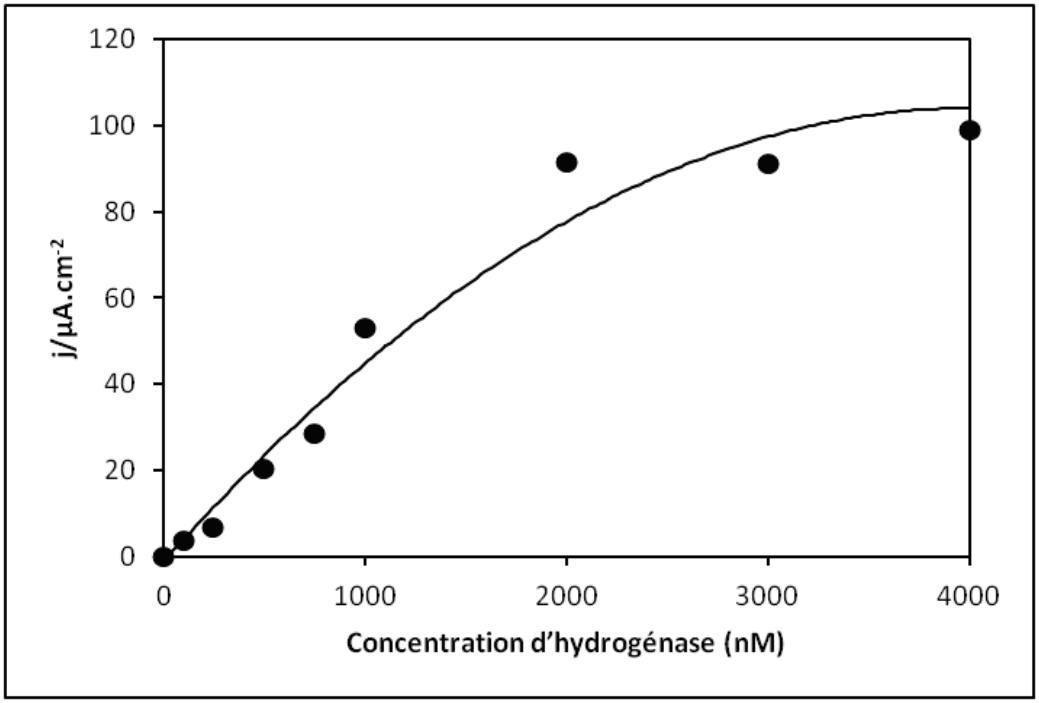


Figure 2 : Isotherme d'adsorption de l'hydrogénase MbH1 sur électrode de PG. La densité de courant catalytique direct maximum est représentée en fonction de la concentration en hydrogénase. Vitesse de balayage 5 mV.s^{-1}, tampon Hepes 50 mM pH 6,8 à 60 °C sous H_2.

L'évolution du courant catalytique direct lié à l'oxydation de l'hydrogène en fonction de la concentration en hydrogénase suit une isotherme de Frumkin. La saturation de l'électrode en enzyme apparaît à des concentrations en solution supérieures à 1 µM d'hydrogénase (Figure 2)

1.2.2 *Influence de l'addition d'un médiateur redox*

Afin de vérifier l'homogénéité spatiale de l'enzyme, un médiateur redox est ajouté dans la cellule électrochimique. Si l'on postule que la vitesse du transfert d'électrons direct est plus grande que la vitesse de réaction entre le médiateur et l'enzyme, le courant médié ne sera lié qu'aux enzymes non connectées « en direct ». Les médiateurs utilisés sont le bleu de méthylène (BM) ou le Toluidine Blue O (TBO), petites molécules lipophiles, de type phénothiazine, chargées positivement et dont le potentiel redox est compatible avec le potentiel de fonctionnement de MbH1 (Schéma 1).

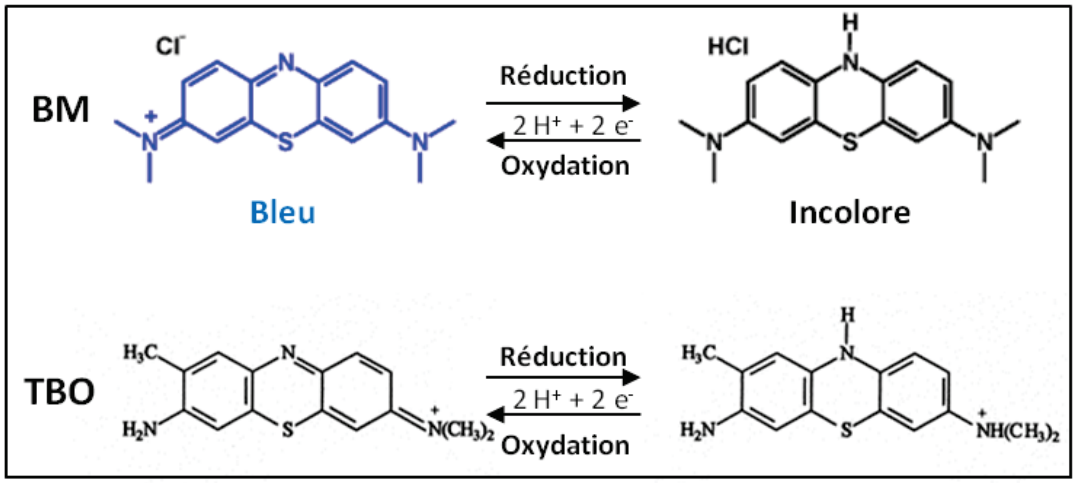
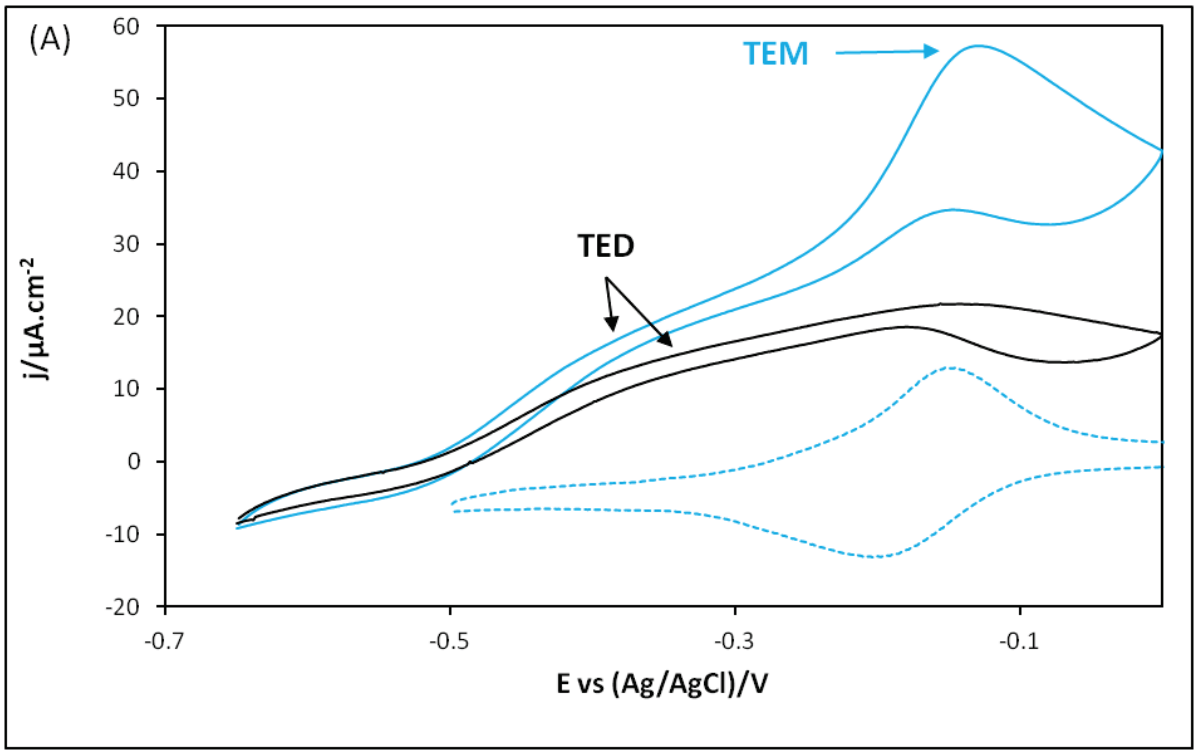


Schéma 1 : Réaction d'oxydoréduction du bleu de méthylène (BM) et du Toluidine Blue O (TBO).

Un processus d'oxydation supplémentaire apparaît au potentiel du BM ou du TBO. Ce processus est attribué à l'oxydation de l'hydrogène médié par le BM ou le TBO (TEM). Il est lié aux hydrogénases qui ne sont pas orientées favorablement pour une connexion directe avec l'électrode, mais qui sont actives dès lors qu'une navette redox peut prendre en charge les électrons (Figures 3 A et B).



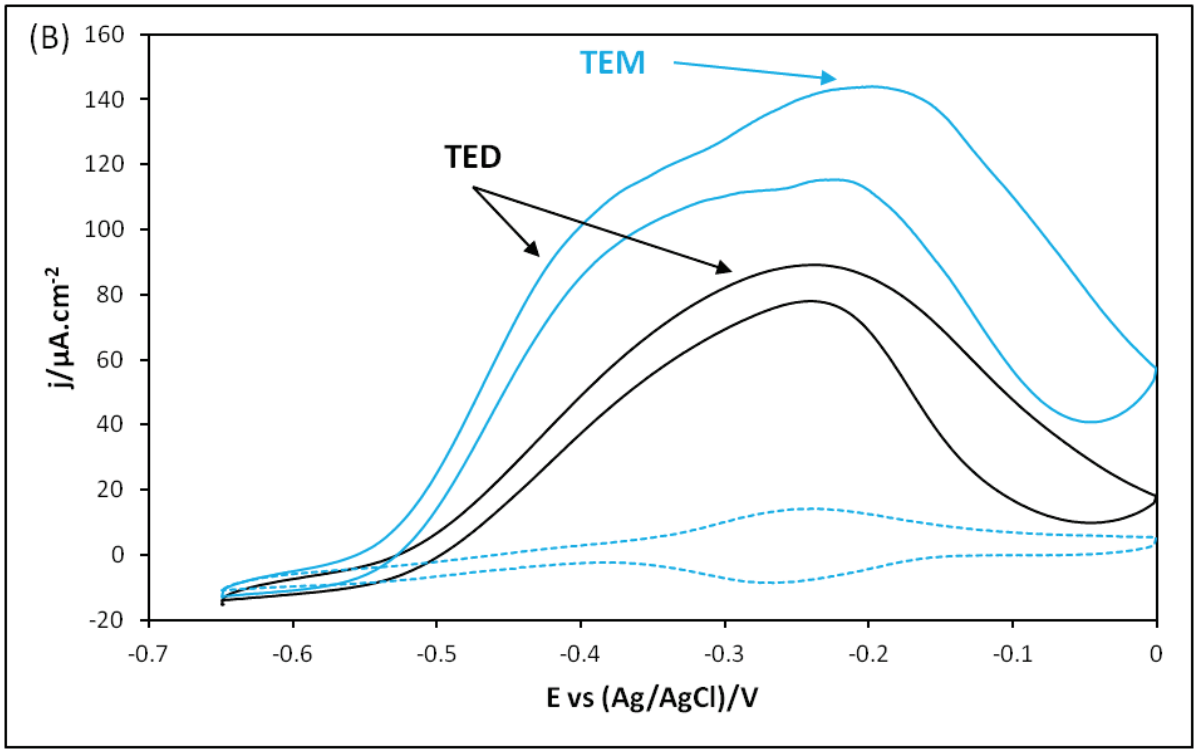


Figure 3 : (A) CV de l'oxydation de l'hydrogène par MbH1 adsorbée sur électrode de PG sans (ligne noire) et avec BM 10 µM (ligne bleue). BM 10 µM seul (ligne bleu pointillée). (B) CV de l'oxydation de l'hydrogène par MbH1 adsorbée sur électrode de PG sans (ligne noire) et avec TBO 16 µM (ligne bleue). TBO 16 µM seul (ligne bleu pointillée). Vitesse de balayage 5 mV.s^{-1}, tampon Hepes 50 mM pH 6,8 à 60 °C sous H_2.

1.2.3 Quels processus de transfert d'électrons ?

Après addition du médiateur redox, que ce soit le MB ou le TBO, on peut constater en plus du processus d'oxydation médié :

1- une augmentation de la densité de courant direct,

2- un redressement de la vague d'oxydation qui traduit une augmentation de la vitesse du transfert d'électrons interfacial.

Cette évolution suggère que des hydrogénases qui n'étaient pas connectées, car défavorablement orientées pour communiquer directement avec l'électrode, sont à présent capables d'effectuer un transfert d'électrons direct (TED) pour l'oxydation de l'hydrogène. On peut remarquer que le transfert d'électrons direct est plus efficace en présence de TBO. Le courant lié au transfert d'électrons médié (TEM) est d'ailleurs aussi plus faible. La signification de ce rapport TED/TEM sera explicitée plus loin dans le manuscrit. Les

structures et potentiels redox du TBO et du BM étant très similaires, il est difficile de prévoir une différence d'affinité ou de vitesse d'interaction pour expliquer ce résultat. En revanche, comme il va être largement discuté, la structure de la surface de l'électrode de graphite est largement dépendante du mode de polissage utilisé. La réactivité de surface de l'électrode peut donc raisonnablement favoriser une connexion directe de l'enzyme.

Les dérivés phénothiazines sont connus pour s'adsorber irréversiblement sur les électrodes de graphite (Malinauskas et al., 2000). Ainsi, une électrode de PG trempée dans une solution de TBO puis transférée en milieu tampon permet d'identifier en voltamétrie cyclique une vague redox liée au TBO adsorbé. Ce processus réversible est situé à un potentiel moyen (E_m) de -0,25V, en accord avec la littérature (Malinauskas et al., 2000) (Figure 4). On peut se demander alors si l'augmentation de la vitesse de transfert d'électrons pour l'oxydation directe de l'hydrogène par MbH1 adsorbée en présence de phénothiazine peut être liée à l'adsorption du médiateur redox.

L'oxydation de l'H_2 par MbH1 adsorbée sur l'électrode modifiée par le TBO préadsorbé est analysée. Il apparaît que les processus TED et TEM sont observés à 60 °C sous atmosphère d'hydrogène (Figure 4).

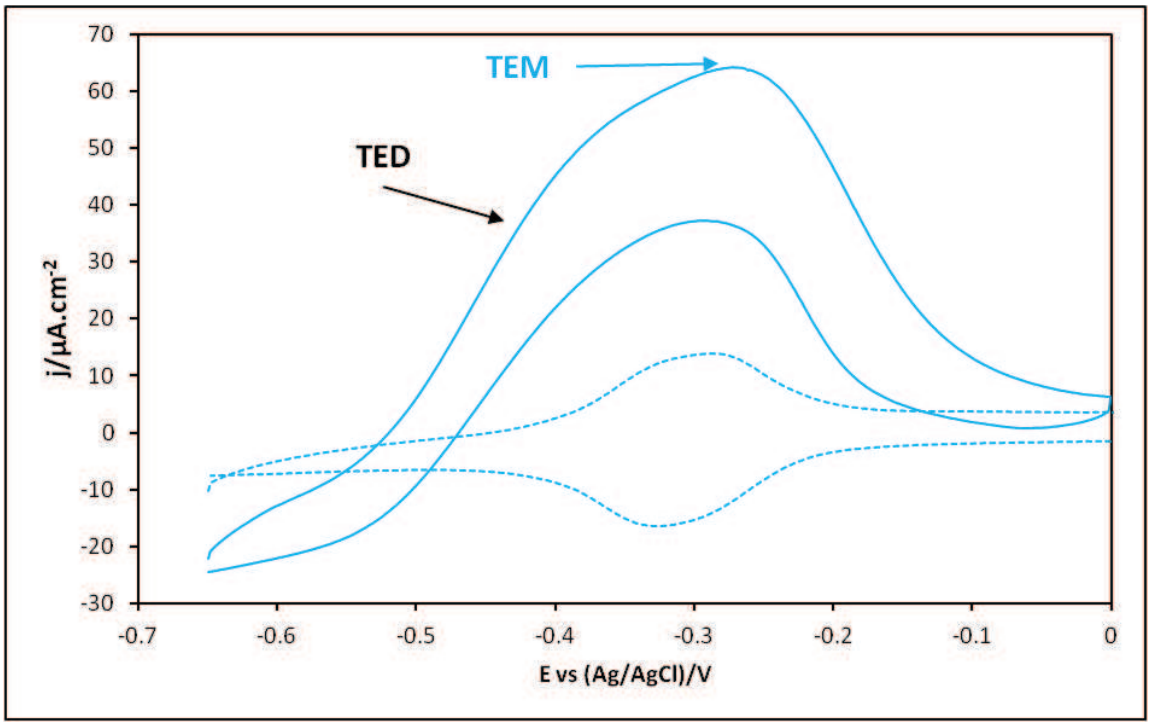


Figure 4 : CV de l'oxydation de l'hydrogène de l'électrode de PG sur laquelle le TBO a été préadsorbé (ligne pointillée bleue). CV après l'ajout de l'hydrogénase sur l'électrode modifiée par le TBO préadsorbé (ligne bleue). Vitesse de balayage 5 mV.s^{-1}, tampon Hepes 50 mM pH 6,8 à 60 °C sous H_2.

L'obtention d'un processus TED signifie que l'hydrogénase est capable d'oxyder l'hydrogène et de transférer les électrons à l'électrode à travers une couche de TBO. Les résultats obtenus avec le BM sont très similaires. Il a été montré par ailleurs que la formation d'hybrides carbone/BM augmentait de façon significative le transfert d'électrons interfacial. Une analyse comparée par spectroscopie d'impédance complexe d'une électrode de carbone vitreux modifiée par des nanotubes de carbone ou par un hybride BM/nanotubes de carbone montre par exemple une résistance de transfert de charge divisée par 3 en présence du BM (Yang et al., 2011).

Il est donc proposé que le dérivé phénothiazine joue le rôle « d'ancre » ou de fil conducteur et induise une augmentation du nombre d'hydrogénases directement connectées à l'électrode.

Afin de relier cette augmentation de la vitesse de transfert d'électrons interfacial, non pas aux propriétés redox du médiateur, mais à un rôle potentiel d'ancrage ou de fil conducteur, un médiateur de type phénothiazine a été utilisé, dont le potentiel redox est moins susceptible de médier l'oxydation de l'hydrogène par MbH1. Le Neutral Red (NR) a ainsi été sélectionné (Schéma 2), dont le potentiel moyen est de -0,56 V (Figure 5 A). Le processus d'oxydoréduction du NR est régi par l'adsorption de la phénothiazine sur l'électrode de PG (Figure 5 B).

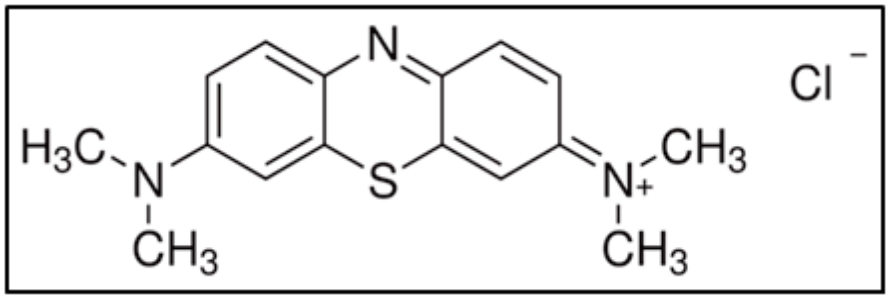


Schéma 2: Structure du Neutral Red

Le phénomène d'augmentation de la vitesse de transfert électronique lié à l'oxydation directe de l'hydrogène par l'hydrogénase est retrouvé *via* le NR. La densité de courant électrocatalytique est améliorée (Figure 5 C). Aucun signal d'oxydation médiée de l'hydrogène n'est observé, alors que le signal redox du NR apparaît. Ce résultat renforce l'idée d'un rôle d'ancrage des hydrogénases par le dérivé phénothiazine. Lorsque l'électrode est transférée dans un tampon sans NR, le signal électrochimique ne change pas, suggérant

que l'amélioration du signal électrocatalytique est du uniquement aux molécules de médiateur adsorbées.

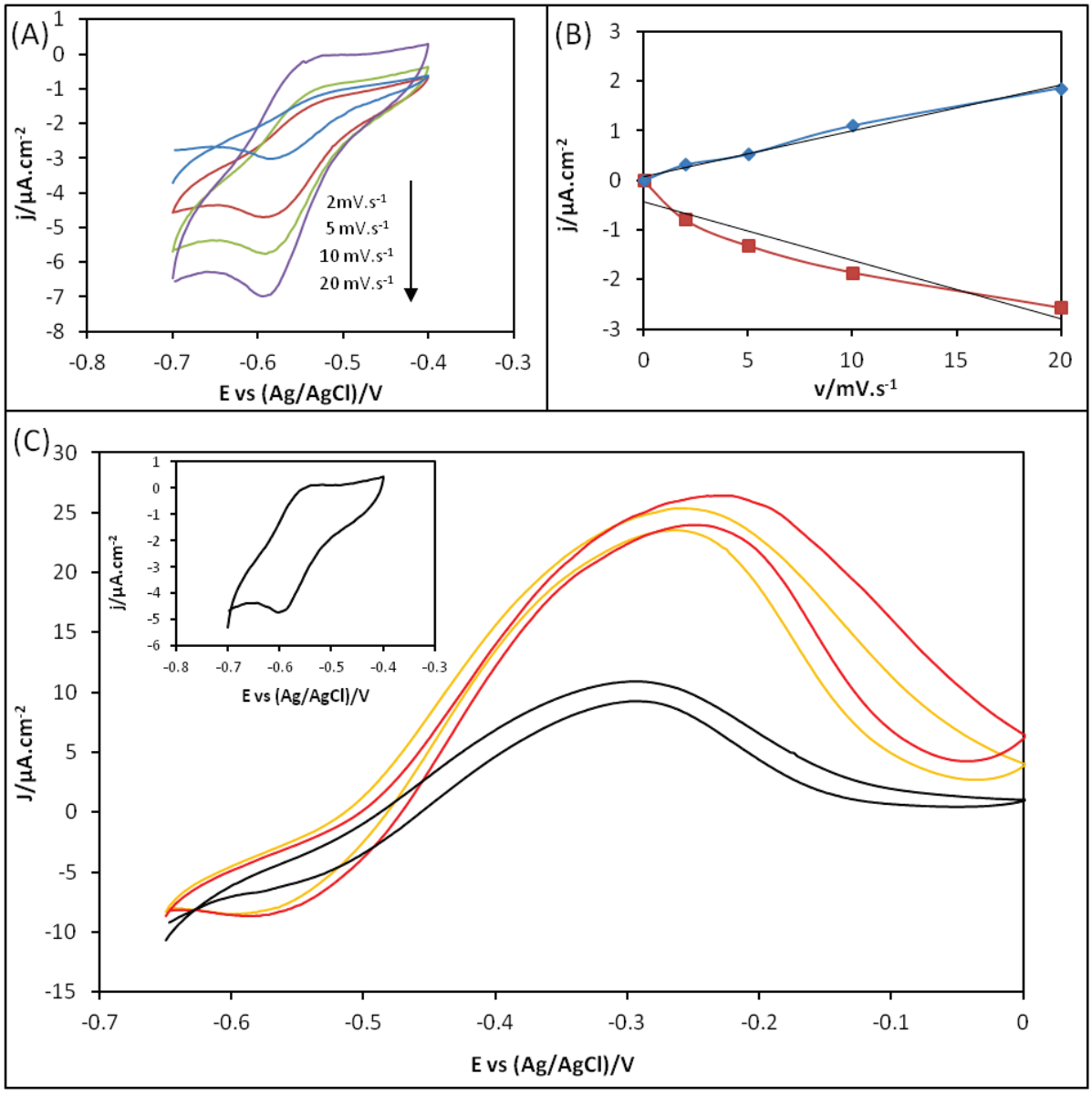


Figure X : (A) CV du NR 10 µM en fonction de la vitesse de balayage. (B) Variations du courant de pic d'oxydation (bleu) et de réduction (rouge) du NR 10 µM en fonction de la vitesse de balayage (C) CV de l'oxydation de l'hydrogène sur l'électrode de PG par MbH1 avant (noir) et après (rouge) addition de NR 10µM. Transfert de l'électrode dans un tampon sans NR (orange). Insert : NR 10 µM après transfert dans un tampon sans NR (v = 20 mV.s^{-1}). Vitesse de balayage 5 mV.s^{-1}, tampon Hepes 50 mM pH 6,8 à 60 °C sous H_2.

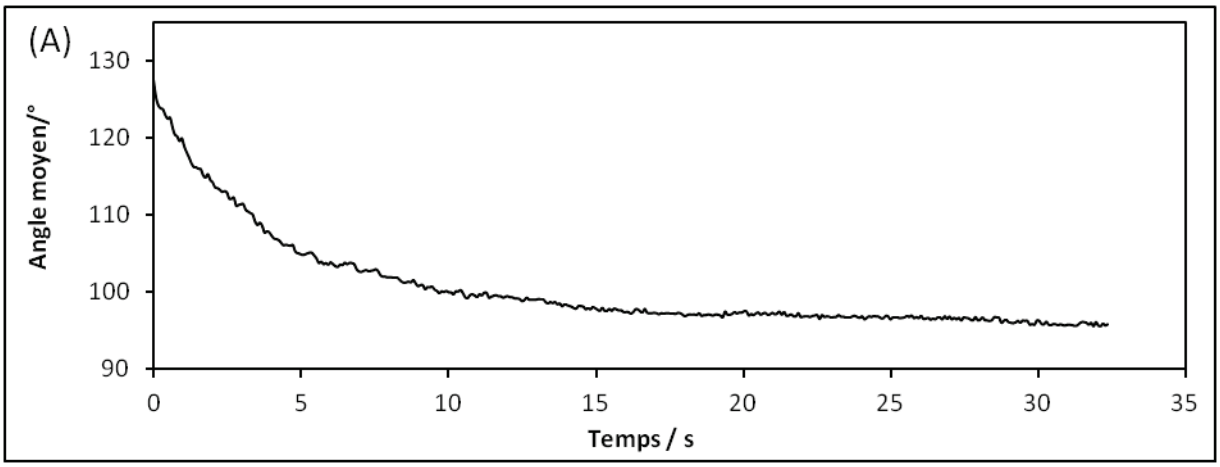
Au vu des structures des médiateurs redox (BM, TBO et NR sont analogues), il devient tentant de mettre en relation la structure cyclique avec l'amélioration du transfert électronique, et le caractère hydrophobe avec l'accroche stable de l'hydrogénase. On peut

également supposer que de par une structure similaire aux plans « edge » du graphite pyrolytique, ces médiateurs s'intercalent dans la structure du graphite fournissant des points d'accroche favorables pour les enzymes.

Il ressort de ces premières expériences que, bien que l'électrochimie des hydrogénases soit classiquement effectuée sur des électrodes de PG, dont il est admis qu'elles fournissent les caractéristiques physico-chimiques essentielles pour une immobilisation efficace, aucune orientation préférentielle de l'enzyme n'est obtenue.

1.2.4 Les caractéristiques physico-chimiques de l'électrode de graphite pyrolytique contrôlent l'orientation de l'hydrogénase [Ni-Fe] d'Aquifex aeolicus

Cette absence d'orientation spécifique peut s'expliquer en examinant la structure microscopique et la composition chimique de l'électrode de PG (Collaboration avec le Pr R. Gadiou, IS2M, Mulhouse). La mesure d'angle de contact sur ce type d'électrode, donne un angle initial de 127,5° (Figure 6A). Il est admis que les valeurs d'angles de contact supérieures à 90 ° sont caractéristiques de surfaces hydrophobes. L'observation de la surface de l'électrode par microscopie confocale, microscopie à balayage électronique et microscopie à force atomique, montre une surface accidentée, présentant des pores de taille micrométrique (Figures 6 B, C, D, E). Rappelons qu'une molécule d'enzyme a une taille de l'ordre de 5 nm. La structure poreuse de l'électrode de PG permet donc l'immobilisation anisotrope de l'enzyme.



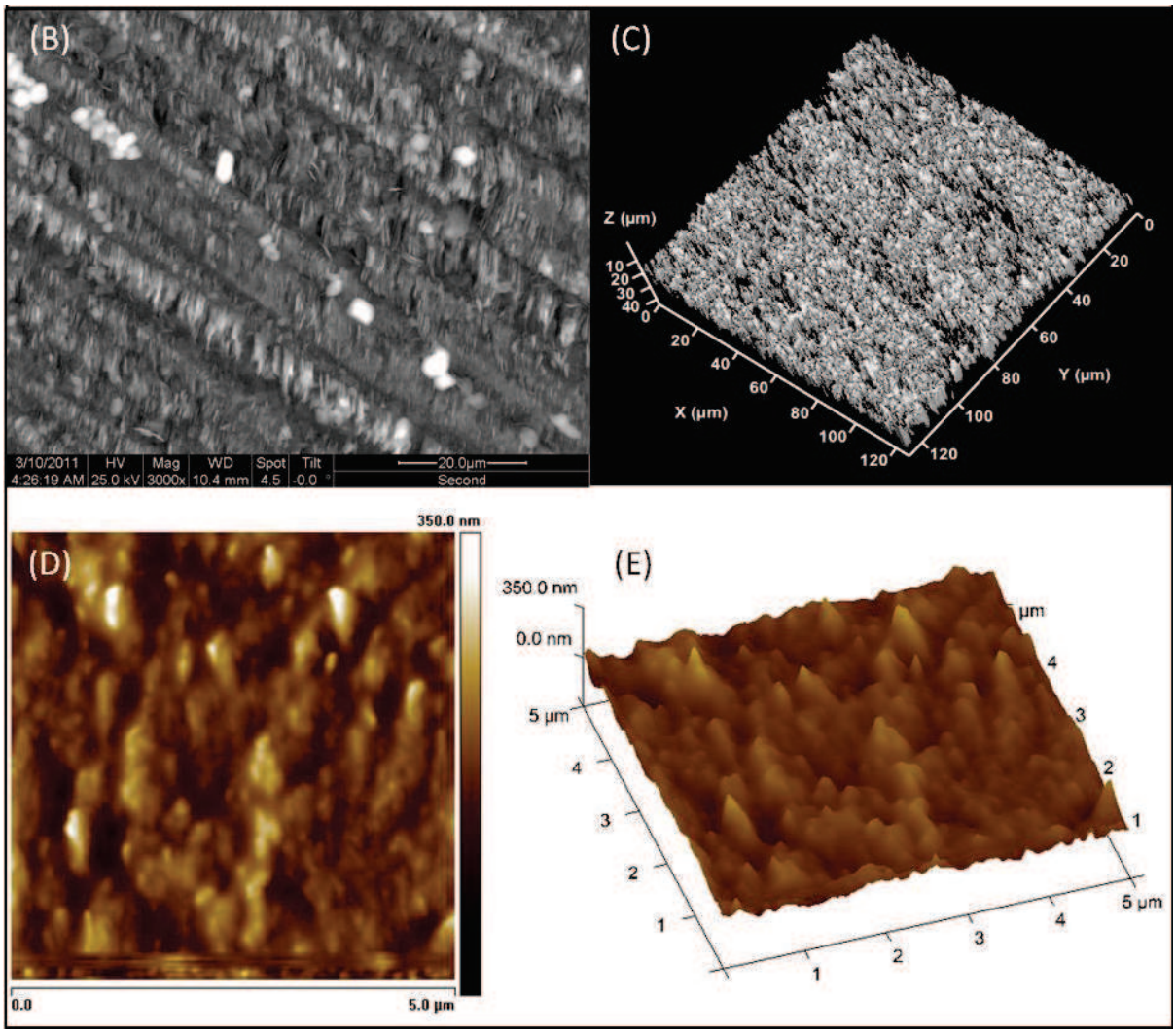


Figure 6 : (A) Mesure d'angle de contact avec une goutte d'eau de 1 µL déposée à la surface de l'électrode de PG en fonction du temps. (B) Microscopie à balayage électronique de la surface de l'électrode de PG. (C) Reconstruction tridimensionnelle de la surface de l'électrode de PG à partir de l'analyse par microscopie confocale. (D et E) Microscopie à force atomique de la surface de l'électrode de PG.

De plus, avant toute utilisation, les électrodes de PG sont polies sur surface d'émeri afin d'assurer un nettoyage mécanique. Ce polissage induit la formation d'espèces oxygénées sur la surface telles que des cétones, des acides carboxyliques et des phénols (Blanford et al., 2006). La chimie de surface de l'électrode de PG a été analysée par Désorption Programmée en Température couplée à une analyse en spectrométrie de masse (TPD-MS). Cette méthode permet l'analyse quantitative des groupes fonctionnels présents en surface du graphite (Rietsch et al., 2009), (Brender et al., 2012). En chauffant le graphite jusqu'à la température de 900°C, la décomposition des groupes de surface, principalement CO, CO_2, H_2O et H_2, est analysée par spectrométrie de masse. En fonction de la température de décomposition, différentes fonctions sont identifiées: les fonctions carboxyles à basse température, les éthers

et quinones à haute température. Un grand nombre de fonctions sont présentes à la surface de l'électrode (Figure 7). La désorption de l'eau emprisonnée dans l'électrode est observée à 150°C. Un second pic à 350°C est observé qui correspond à des réactions de déshydratation entre les fonctions phénols et carboxyliques voisines, qui forment des anhydrides, des lactones et des fonctions éthers. En ce qui concerne la désorption du CO_2, un premier pic de faible intensité est observé en dessous de 400°C, indiquant la présence d'une faible quantité de fonctions carboxyliques. Ensuite, un large pic de désorption du CO s'étale entre 400°C et 800 °C. Il correspond aux anhydrides et aux lactones précédemment formées. La quantité de CO est supérieure à celle de CO_2 (2.2 x 10^6 mol/g contre 1.7 x 10^6 mol/g), indicatif de la présence de fonctions stables qui se décomposent en augmentant la température (anhydrides, lactones, phénols, éthers, et cétones).

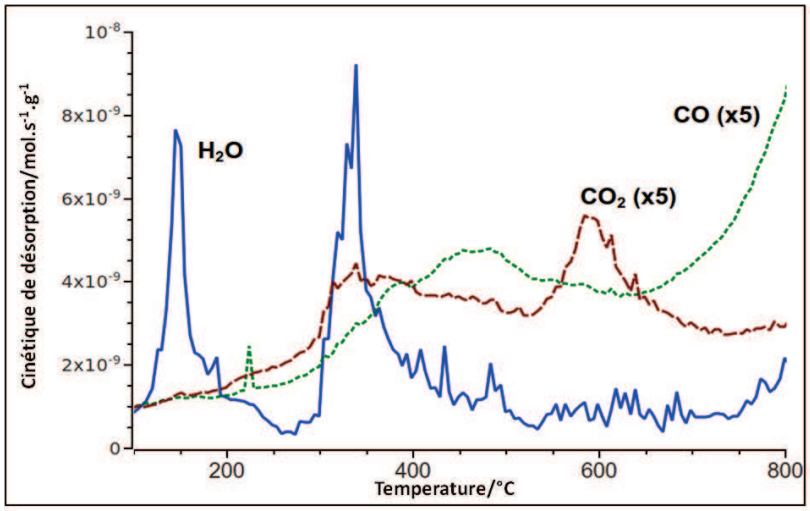


Figure 7 : TPD-MS: Cinétique de désorption de l'eau et des oxydes de carbone résultant de la décomposition des groupes de surface du PG en fonction de la température (Les signaux du CO et CO_2 ont été multipliés par 5 pour une visualisation claire).

1.2.5 Conclusion

Ainsi la surface de l'électrode de PG est complexe à la fois chimiquement et structurellement. Elle offre de multiples types d'interactions pour l'enzyme, allant des interactions de type hydrophobe aux interactions de type électrostatique, sans oublier la structure microporeuse de l'électrode qui peut permettre l'encapsulation de l'enzyme. Cette hétérogénéité de surface explique pourquoi aucune orientation spécifique de l'hydrogénase sur ce type d'électrode n'est possible. Ainsi sur électrode de PG, certaines enzymes sont orientées de manière à oxyder l'H_2 directement, d'autres dont le centre [Fe-S] distal est trop

éloigné de la surface, n'oxyderont l'hydrogène qu'en présence d'un médiateur redox. L'addition de phénothiazines peut néanmoins augmenter le nombre d'enzymes connectées.

2. COMMENT CONTRÔLER L'ORIENTATION DE L'HYDROGÉNASE [Ni-Fe] D'*AQUIFEX AEOLICUS*

2.1 Contrôle de la surface de l'électrode : Les mono couches auto assemblées ou SAMs

Les outils génétiques étant absents chez *Aquifex aeolicus*, il n'est pas possible de modifier l'enzyme afin de contrôler son orientation spécifique sur le support conducteur. C'est donc sur l'électrode elle même qu'il faut travailler afin de procurer à l'enzyme l'environnement le plus adéquat pour une orientation favorable au transfert d'électrons direct. Les surfaces hétérogènes comme le graphite ne sont pas propices à l'orientation spécifique de MbH1. En revanche, les SAMs permettent de former des surfaces plus homogènes sur électrode. Les possibilités de fonctionnalisations chimiques variées permettent de mimer un environnement protéique ou un partenaire physiologique. Selon la fonction terminale de la SAM, on peut ainsi orienter, ou au moins contrôler l'orientation de l'enzyme.

2.1.1 Contrôle de la structure de la SAM

La structure des SAMs à fonction terminale méthyle, formées sur électrode d'or, a été largement étudiée dans la littérature. Il est admis que les SAMs constituées par de longues chaînes alcanes forment des monocouches denses et ordonnées, dans lesquelles le transfert électronique s'effectue par effet tunnel. Les SAMs composées de chaînes courtes sont toutefois préférées en bioélectrochimie, car elles se comportent comme des surfaces moins isolantes grâce à un désordre plus prononcé (Badia et al., 2000), (Krzeminski et al., 2011).

Le PM-IRRAS (Polarization Modulated-InfraRed Reflection Absorption Spectroscopy) est une technique spectroscopique très sensible, qui permet de caractériser les groupements chimiques présents en surface d'un substrat réfléchissant tel que l'or (Boujday et al., 2011) (Collaboration avec le Dr S. Lecomte, CBMN, Bordeaux). Les spectres PM-IRRAS sont enregistrés dans ce travail pour différentes longueurs de chaîne, soit des chaînes $HS(CH_2)_n$-CH_3 avec n = 3, 7, 11. Par souci de simplification, le groupe $HS(CH_2)_n$ sera dénoté C_n dans la suite de ce manuscrit.

L'adsorption des SAMs alcanethiols de type C_nCH_3 peut être suivie par le signal de vibrations des liaisons C-H des groupements méthylènes CH_2 de la chaîne aliphatique et de la fonction terminale alkyle CH_3. Les vibrations antisymétriques (ν_{as}) et symétriques (ν_{s}) des chaînes CH_2 sont caractérisées par des bandes centrées respectivement à 2925 cm^{-1} et 2852 cm^{-1}. Les vibrations antisymétriques et symétriques des fonctions terminales CH_3 pour les chaînes alcanes sont observées aux nombres d'onde 2880 cm^{-1} et 2964 cm^{-1} respectivement (Porter et al., 1987). L'analyse de la figure 6 montre que le rapport d'absorbance (CH_2/CH_3) augmente logiquement avec la longueur de la chaine (Figure 8).

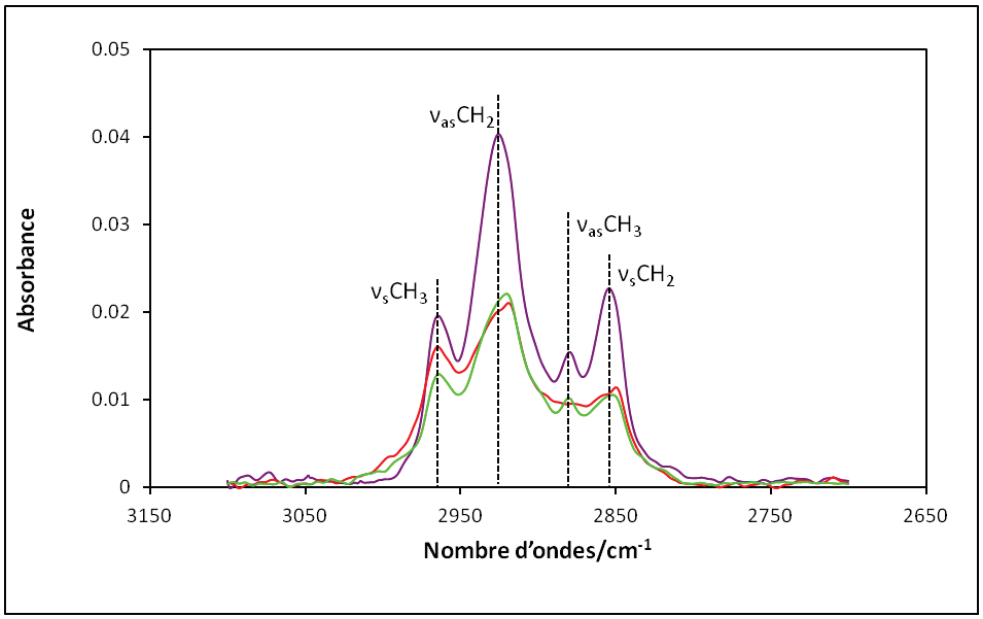


Figure 8 : Spectres PM-IRRAS des SAMs C_3CH_3 (rouge) C_7CH_3 (vert) et $C_{11}CH_3$ (violet) greffées sur électrode d'or dans la gamme de vibration des liaisons C-H. Les spectres ont été enregistrés à température ambiante, 600 scans avec une résolution de 8 cm^{-1}.

2.1.2 Contrôle de la stabilité de la SAM

L'activité d'oxydation catalytique de l'H_2 par l'hydrogénase est mesurée sur électrode dans des conditions non conventionnelles: une température de 60-65 °C, sous atmosphère d'hydrogène, en appliquant un potentiel réducteur qui descend jusqu'à -0,65V. Ces conditions expérimentales ont une incidence sur la stabilité des SAMs, et peuvent limiter leur potentialité pour l'étude de l'oxydation catalytique de l'hydrogène par MbH1.

Afin d'évaluer l'impact de nos conditions expérimentales sur la formation et la stabilité des SAMs, des mesures de capacité électrique et de désorption sont effectuées. La capacité est mesurée sur des électrodes d'or recouvertes par des SAMs alcanethiols dans une gamme de potentiel où aucun courant faradique n'est observé, et dans le même tampon que celui utilisé pour mesurer l'activité hydrogénase. Une capacité de 30 $\mu F.cm^{-2}$ est mesurée pour une électrode nue. Elle diminue à 6 $\mu F.cm^{-2}$ et 3 $\mu F.cm^{-2}$ pour les SAMs C_3CH_3 et C_7CH_3 respectivement, ce qui indique la formation de la couche de thiol à la surface de l'électrode d'or. A titre de comparaison, des valeurs de capacité de l'ordre de 3 $\mu F.cm^{-2}$ ont été obtenues pour des monocouches denses de thiol observées par STM (Wackerbarth et al., 2004).

La stabilité de la SAM est examinée en quantifiant sa désorption dans un tampon KOH 500 mM après incubation de l'électrode modifiée sous atmosphère d'hydrogène. La désorption se traduit par l'apparition de pics de réduction à bas potentiel selon la réaction :

$$Au(I)\text{-}S(CH_2)_n\text{-}CH_3 + e^- \overset{\overset{adsorption}{\longleftarrow}}{\underset{désorption}{\longrightarrow}} Au(0) + {}^-S(CH_2)_n\text{-}CH_3$$

Le potentiel de réduction de la liaison Au-S dépend de la longueur de la chaîne alkyle et du type de fonctions terminales (Anderson et al., 2003). En règle générale, il est rapporté que au plus la chaine alkyle de la SAM est courte, au moins la SAM est ordonnée, et moins la SAM est ordonnée, plus haut est le potentiel de désorption (Tableau 1) (Grumelli et al., 2010), (Chi et al., 2001).

Nombre (n) de groupement CH_2	pic de désorption / mV
4	- 991
7	- 1023
9	- 1048
11	- 1106
13	- 1149
15	- 1164
17	- 1190

Tableau 1 : Potentiel de désorption en fonction du nombre de groupement méthylène des SAMs C_nCH_3 (reproduit de (Chi et al., 2001))

D'autre part, l'incubation des SAMs sous hydrogène peut induire leur désorption, et là aussi, plus la chaîne est courte, plus la cinétique de désorption est rapide et la réaction se produit à haut potentiel (Gorham et al., 2007). L'accroche de protéines à la surface de la SAM induit elle aussi une variation des potentiels de désorption et peut probablement affecter leur structure. Les variations dépendent cependant de la molécule adsorbée à la surface de la SAM. Ainsi, il a été démontré que l'adsorption de la streptavidine et du fibrinogène induisent un déplacement vers les potentiels de réduction plus positifs (Choi et al., 2009), tandis que l'adsorption de l'azurine induit un déplacement vers les potentiels de réduction plus négatifs (Chi et al., 2001).

L'effet de la température et du temps d'incubation en présence d'hydrogène sur la désorption de différentes SAMs a été évalué (Tableau 2). La désorption se traduit par l'apparition de deux pics de réduction dont l'intégration permet le calcul de la densité surfacique du dérivé thiolé. Des valeurs comprises entre 6 et 9 x10^{-10} mol.cm^{-2} sont calculées. Celles-ci varient peu en fonction des SAMs et des conditions testées. Ces valeurs correspondent à la formation d'une monocouche de SAM, et sont en accord avec la bibliographie (Chi et al., 2001), (Rudiger et al., 2010).

	1er pic de désorption / V	2ème pic de désorption/V	Charge cumulée des deux pics / µC.cm^{-2}	Densité surfacique de la SAM / x 10^{-10}mol.cm^{-2}
C_2COOH 15 min 25°C	-0,68	-0,88	72	7,5
C_2COOH 15 min 40°C	-0,69	-0,89	69	7,1
C_2COOH 15 min 60 °C	-0,69	-0,92	65	6,7
C_2COOH 30 min 60 °C	-0,68	-0,91	58	6
C_5COOH 15 min 25°C	-0,83	-0,92	90	9,7
C_3CH3 30 min 60°C	-0,93	-1,1	86	9

Tableau 2 : Paramètres caractéristiques de la désorption des SAMs C_2COOH, C_5COOH et C_3CH_3 en fonction de la température et du temps d'incubation sous hydrogène.

Nos expériences montrent que l'augmentation de la température n'influe que très peu sur les potentiels de désorption de la SAM C_2COOH. En effet ceux-ci ne varient que de quelques dizaines de mV entre 25°C et 60 °C (Figure 9 A et Tableau 2). La variation du temps d'incubation sous hydrogène à 60 °C de 15 à 30 min n'influe pas non plus sur les potentiels de désorption (Figure 9 B et Tableau 2). Néanmoins, en augmentant la longueur de la chaîne aliphatique de 2 à 5 carbones, un déplacement des potentiels de désorption vers des

valeurs plus négatives est observé en accord avec les données bibliographiques (Figure 9 C et Tableau 2).

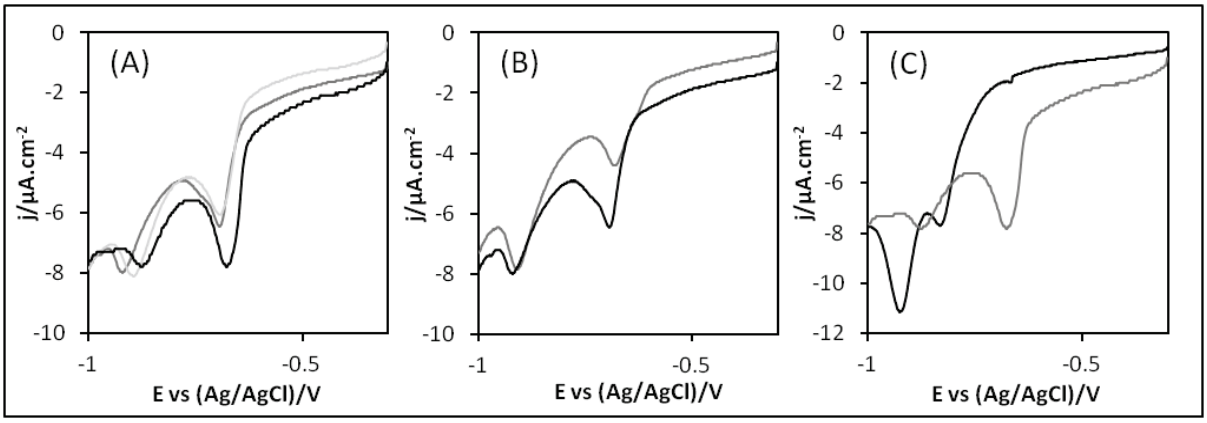


Figure 9 : (A) Mesure de désorption de la SAM C_2COOH dans un tampon KOH 500mM en fonction de la température d'incubation pendant 15 min sous hydrogène : 25°C (noir), 40 °C (gris), 60°C, (gris clair). (B) Mesure de désorption de la SAM C_2COOH dans un tampon KOH 500mM en fonction du temps d'incubation sous hydrogène à 60 °C : 15 min (noir), 30 min (gris). (C) Mesure de désorption de la SAM C_2COOH (gris) et C_5COOH (noir) dans un tampon KOH 500mM après 15 min d'incubation à 25 °C sous H_2.

Le premier pic de désorption d'une SAM C_5COOH apparaît ainsi à des potentiels 100 mV plus négatifs que celui d'une SAM C_2COOH. Cette plus grande fragilité des SAMs à chaîne courte se traduit dans la densité surfacique. La chaine C_2COOH peut perdre ainsi jusqu'à 20% de la densité surfacique après 30 min d'incubation à 60°C. Cependant, les potentiels de réduction des SAMs observés après incubation sous hydrogène et à 60 °C restent en dessous de la gamme de potentiel utilisée pour l'électrochimie de l'hydrogénase (-0,65 V à 0 V).

2.1.3 Comportement électrochimique du bleu de méthylène sur les SAMs

Les SAMs peuvent donc être utilisées dans les conditions électrochimiques d'étude de l'hydrogénase. Le but ultime de l'étude étant leur utilisation pour contrôler l'orientation de l'enzyme, le médiateur redox utilisé comme sonde de l'homogénéité spatiale de l'enzyme doit se comporter comme un système redox rapide et réversible sur les SAMs. Ainsi l'électrochimie du BM est étudiée sur les SAMs C_nCH_3 et $C_{11}COOH$ (Figures 10 A et B).

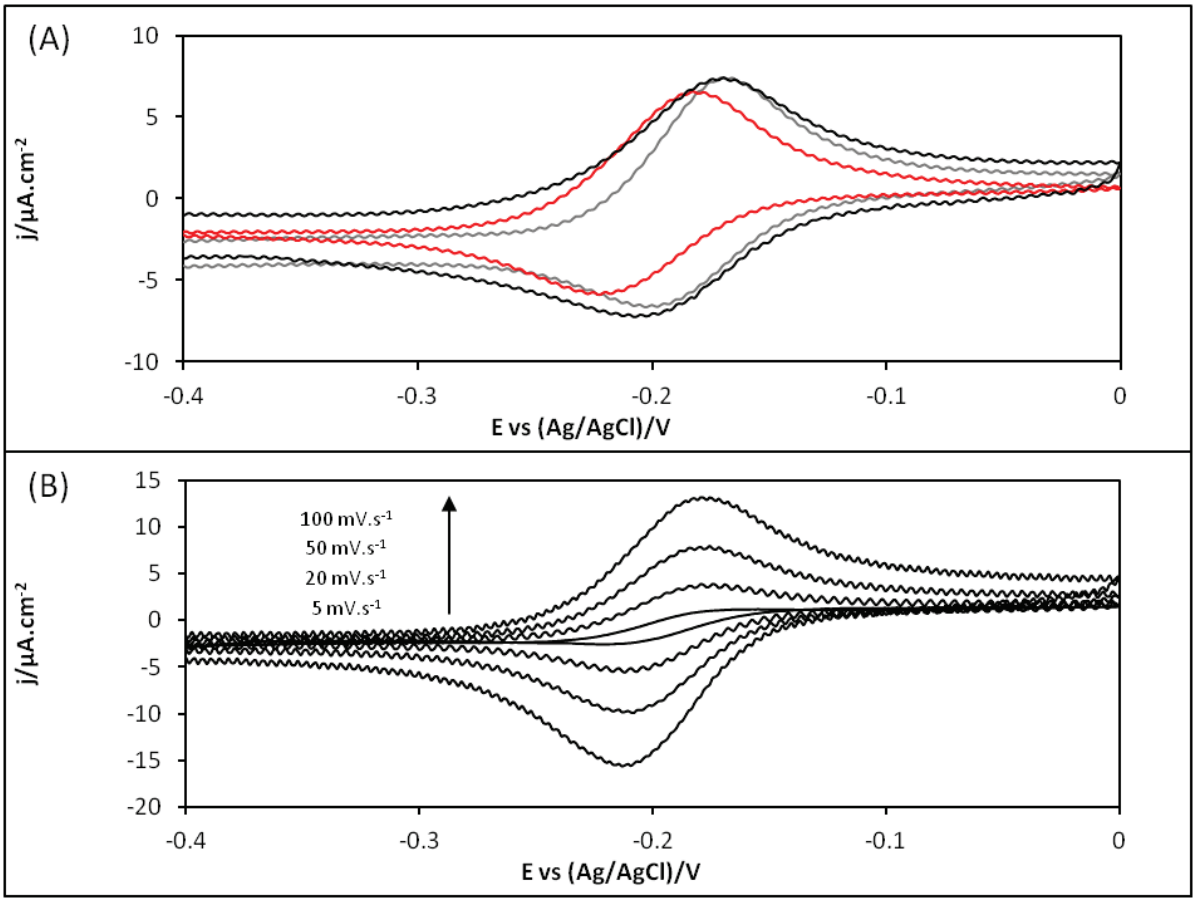
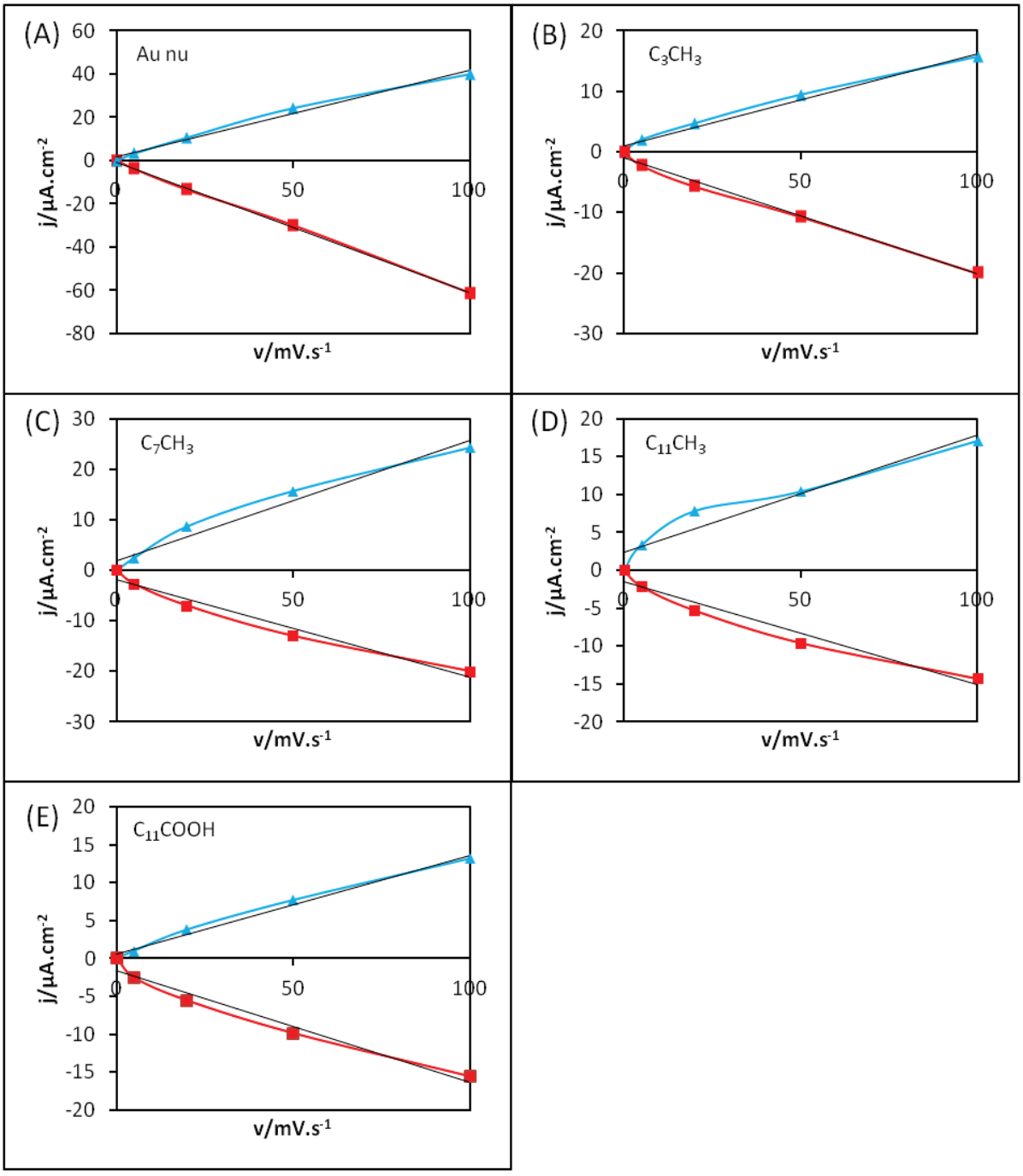


Figure 10 : (A) CV du BM 10 µM sur électrode d'or modifiée par une SAM C_3CH_3 (noir), C_7CH_3 (gris), $C_{11}CH_3$ (rouge) à 20 mV.s^{-1}. (B) CV du BM 10 µM sur électrode d'or modifiée par une SAM $C_{11}COOH$ en fonction de la vitesse de balayage. Tampon Hepes 50 mM pH 6,8 à 60 °C sous H_2

Le BM est électroactif avec un potentiel redox moyen de -190 mV quel que soit la longueur et la fonction terminale de la SAM. Ce potentiel est comparable à celui obtenu sur électrode d'or non modifiée. Le courant est contrôlé par un processus mixte de diffusion-adsorption comme démontré par la relation courant/vitesse de balayage (Figure 11).


(A)
Au nu
(B)
C_3CH_3
(C)
C_7CH_3
(D)
$C_{11}CH_3$
(E)
$C_{11}COOH$
j/µA.cm^{-2}
v/mV.s^{-1}

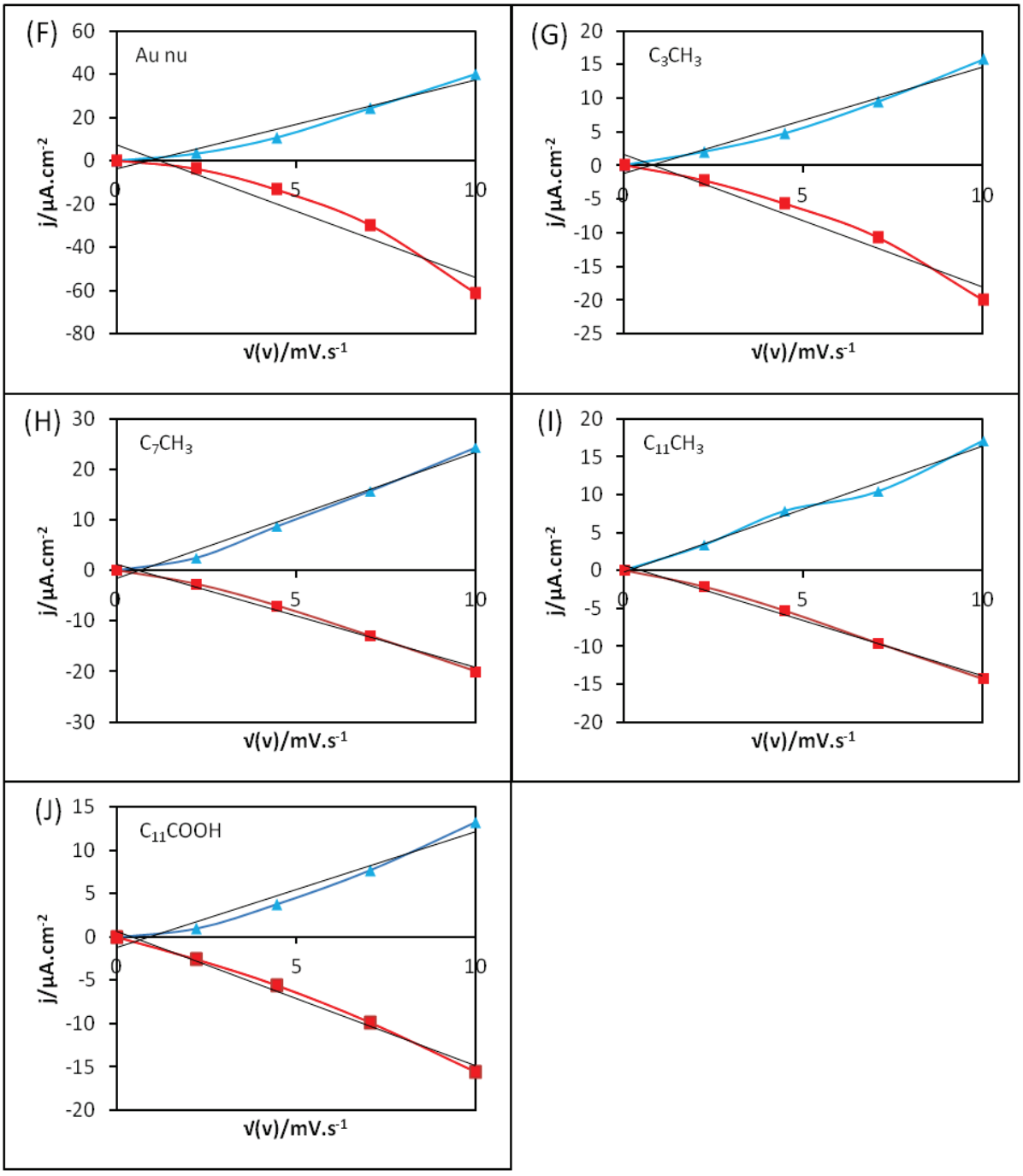


Figure 11 : Variations du courant de pic d'oxydation (bleu) et de réduction (rouge) du BM 10 µM en fonction de la vitesse de balayage (A) sur Au nu, (B) sur C_3CH_3 , (C) sur C_7CH_3, (D) sur $C_{11}CH_3$, (E) sur $C_{11}COOH$, et en fonction de la raciné carrée de la vitesse de balayage, (F) sur Au nu, (G) sur C_3CH_3 , (H) sur C_7CH_3, (I) sur $C_{11}CH_3$, (J) sur $C_{11}COOH$. Les régressions linéaires sont représentées en lignes noires. Tampon Hepes 50 mM pH 6,8, 60 °C, sous H_2.

La réaction d'oxydoréduction du BM semble régie par un processus diffusionnel pour les chaînes courtes allant jusqu'au C_3CH_3, (Figure 11 B). Pour les chaînes plus longues à fonction terminale CH_3 ou COOH, les processus relèvent plus de l'adsorption (Figures 11 H, I

et J). En revanche, aucun signal électrochimique du ferricyanure n'est observé jusqu'à une concentration de 1 mM sur la SAM de type $C_{11}COOH$. La présence de la SAM à la surface de l'électrode empêche la diffusion d'une espèce de même charge, et sa longueur diminue considérablement la vitesse du transfert d'électrons. Dans le cas du BM, on peut penser que le caractère lipophile aide à la diffusion/adsorption à travers les SAMs. Ces résultats sont en accord avec les travaux récents de Grumelli *et al.*. Les auteurs ont montré que le BM était capable de diffuser librement dans les chaînes alcanethiols courtes d'une longueur inferieure à 6 carbones, tandis qu'il avait tendance à se retrouver emprisonné dans les SAMs plus longues. Son insertion est d'autant plus facilitée que la chaîne longue est désordonnée (Grumelli et al., 2010). Ces résultats sont également en accord avec une étude par spectroscopie RAMAN définissant la position du BM à l'intérieur de SAMs alcanethiols courtes et longues, de fonction terminale CH_3 ou COOH. Le schéma 2 résume les positions spatiales du BM en fonction du type de SAMs (Schéma 3) (Tognalli et al., 2006).

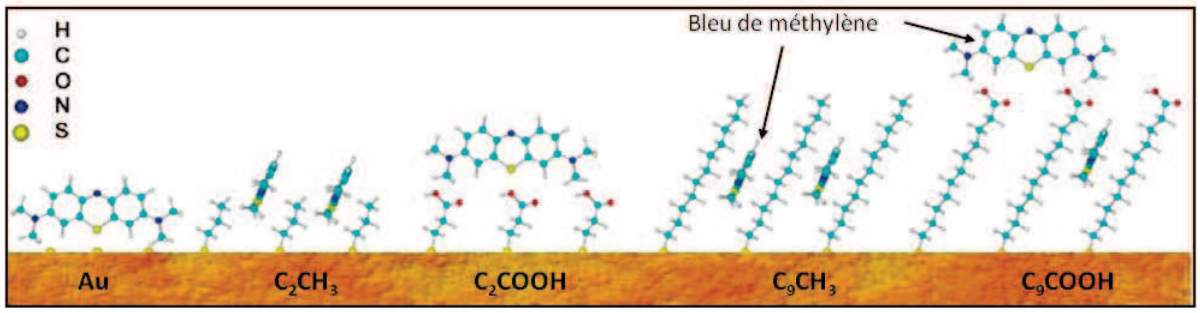


Schéma 3: Représentation de la disposition spatiale du BM à l'intérieur de différentes SAMs (reproduit de (Tognalli et al., 2006))

2.2 Exemples d'orientation d'hydrogénases

Jusqu'à présent, très peu d'études ont concerné l'orientation d'hydrogénases sur électrode. Les travaux existants concernent principalement des hydrogénases [Ni-Fe] solubles issues du périplasme des bactéries sulfato réductrices de l'espèce *Desulfovibrio*. Ces enzymes partagent un partenaire physiologique commun, le cytochrome c_3 (cyt c_3) (Lojou et al., 2004). Ce cytochrome multihémique est chargé positivement (pI = 10), et interagit avec l'hydrogénase *via* un patch chargé négativement. Ce patch mis en évidence par les structures cristallographiques, encercle le centre [Fe-S] distal qui est le point de sortie des électrons (Volbeda et al., 1995). De plus un fort moment dipolaire (1100 D) pointe vers ce centre [Fe-S]

distal (Millo et al., 2009). A titre de comparaison, le moment dipolaire moyen calculé pour une banque de données contenant 15000 structures protéiques est de 500 D.

Grâce à ces informations structurales, des électrodes ont pu être rationnellement modifiées afin de mimer la reconnaissance physiologique entre l'hydrogénase et le cyt c_3 avant transfert d'électrons. L'hydrogénase de *Desulfovibrio gigas* a ainsi été orientée sur une électrode de carbone modifiée par une couche de sels de diazonium (4-aminophenyl) chargée positivement (Rudiger et al., 2005). La même enzyme a ensuite été orientée de manière similaire sur des électrodes d'or modifiées par une SAM 4-aminothiophénol (Rudiger et al., 2009). Enfin, l'hydrogènase [Ni-Fe] de *Desulfovibrio fructosovorans* a été orientée sur électrode d'or modifiée par une SAM cystéamine chargée positivement (Lojou et al., 2008). Sur toutes ces surfaces, l'enzyme immobilisée oxyde directement et efficacement l'hydrogène, preuve que les biomolécules sont bien connectées *via* le centre [Fe-S] distal. L'orientation spécifique de l'hydrogènase [Ni-Fe] de *Desulfovibrio fructosovorans* a été prouvée par l'utilisation d'un médiateur redox, dont l'addition n'engendre aucune augmentation du signal catalytique. De plus, l'immobilisation de cette hydrogénase sur une SAM de type C_2COOH ne permet aucune catalyse directe de l'H_2, mais une catalyse médiée efficace (Lojou et al., 2008). Il a donc ainsi été montré la possibilité d'orientation spécifique de ce type d'enzymes par simple interaction électrostatique.

L'hydrogénase soluble [Fe-Fe] de *Clostridium acetobutylicum* présente quant à elle un grand nombre de résidus chargés positivement autour de son centre [Fe-S] distal. Ainsi a-t-elle été orientée sur électrode d'or modifiée par des SAM alcanethiols de longueur croissante portant une fonction terminale carboxylique. Un courant d'oxydation direct de l'hydrogène est observé, celui-ci diminuant avec l'augmentation de la longueur de la SAM (Madden et al., 2012).

L'orientation d'hydrogénases sur électrodes est donc *a priori* possible, même si les différentes études restent limitées aux enzymes solubles. Une exception peut être faite pour l'hydrogénase cytoplasmique de la bactérie *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough associée à la membrane par une queue lipidique. Récemment, cette hydrogénase a été orientée sur électrode d'or. La queue lipidique se situe du coté opposé au centre [Fe-S] distal. L'électrode d'or a été modifiée avec une SAM positive 4-aminothiophénol, avant que l'enzyme n'y soit adsorbée de manière orientée comme pour les hydrogénases [Ni-Fe] solubles. Une bicouche lipidique est finalement formée à la surface de la couche d'hydrogénase, dans laquelle

s'insère la queue lipidique. Cette bicouche confine l'enzyme à l'électrode. (Gutierrez-Sanchez et al., 2011). Un transfert d'électrons direct est observé. Les auteurs proposent que l'augmentation de la stabilité du signal soit liée à l'ancrage de la queue lipide dans la bicouche supérieure. Pour autant, l'hétérogénéité de l'orientation des enzymes n'a pas été évaluée.

Ces procédures d'orientations spécifiques permettent d'évaluer l'efficacité du TED. Elles offrent aussi la possibilité d'étudier les hydrogénases par spectroscopie couplée à l'électrochimie (SEIRA en particulier) pendant le cycle catalytique.

2.3 Immobilisation contrôlée de l'hydrogénase [Ni-Fe] d'Aquifex aeolicus sur SAMs

*2.3.1 Modélisation de la structure de l'hydrogénase [Ni-Fe] d'*Aquifex aeolicus

La structure cristallographique de l'hydrogénase d'*Aquifex aeolicus* n'est à ce jour pas déterminée. Cependant les structures d'homologues ont été résolues au cours de l'année dernière, partageant entre 49 % et 52 % d'identité pour la grande sous unité et entre 69 % et 73 % pour la petite sous unité. Ces pourcentages d'identité pour les hydrogénases d'*Escherichia coli*, *Ralstonia eutropha* et *Hydrogenovibrio marinus* permettent la construction d'un modèle robuste de MbH1. Ce modèle est d'autant plus valide que ces hydrogénases partagent des caractéristiques physiologiques communes avec celle d'*Aquifex aeolicus* : position membranaire, tolérance à l'oxygène et au CO. Seule la thermophilie est une caractéristique unique chez *Aquifex aeolicus*.

L'hydrogénase membranaire d'*Aquifex aeolicus* est composée de deux sous unités : la grande sous unité catalytique abrite le site actif [Ni-Fe], la petite sous unité porte les 3 centres [Fe-S]. Son partenaire physiologique est un cytochrome *b* membranaire. Ce dernier (cyt *b*) est absent des structures des homologues structuraux.

Afin de déterminer les paramètres structuraux qui régissent l'interaction entre l'hydrogénase et son partenaire physiologique, et donc les modifications à apporter à l'interface électrochimique pour une orientation efficace, un modèle complet, intégrant le cytochrome *b* est nécessaire. La seule structure disponible présentant un cytochrome *b* membranaire est celle de la formiate déshydrogénase d'*Escherichia coli*. Pour construire le modèle complet de MbH1, la structure de l'hydrogénase de *Ralstonia eutropha* (Figure 12 A),

et indépendamment la structure du cyt *b* de la formiate déshydrogénase (Figure 12 B) ont été utilisées.

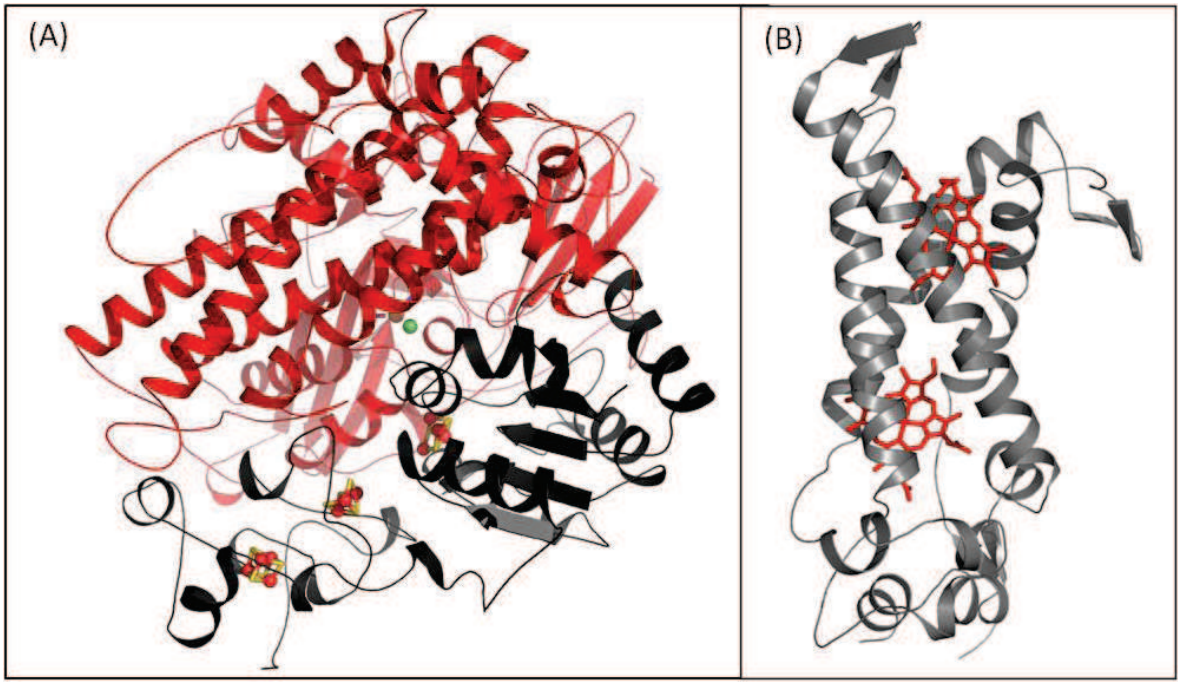


Figure 12 : (A) Modèle structural de l'hydrogénase [Ni-Fe] d'*Aquifex aeolicus* basé sur la structure de l'hydrogénase de *Ralstonia eutropha* (pdb ID : 3RGW). La grande sous unité est représentée en rouge, la petite sous unité en noir. Les centres [Fe-S] sont représentés en bâtonnets orange et sphères rouges pour les atomes de soufre et de fer respectivement. (B) Modèle du cyt *b* d'*Aquifex aeolicus* basé sur le cyt *b* de la formiate déshydrogénase (pdb ID : 1KQF), les hèmes sont représentés en bâtonnets rouges.

La petite sous unité de l'hydrogénase comprend dans sa partie C-terminale, une extension de 40 acides aminés, principalement hydrophobes, dont la structure secondaire est prédite comme étant une hélice alpha. Le rôle supposé de cette hélice est d'ancrer l'hydrogénase à la membrane en interagissant avec cyt *b* de la même manière que la sous unité catalytique de la formiate déshydrogénase interagit avec le cyt *b* membranaire par une hélice transmembranaire (Figure 13).

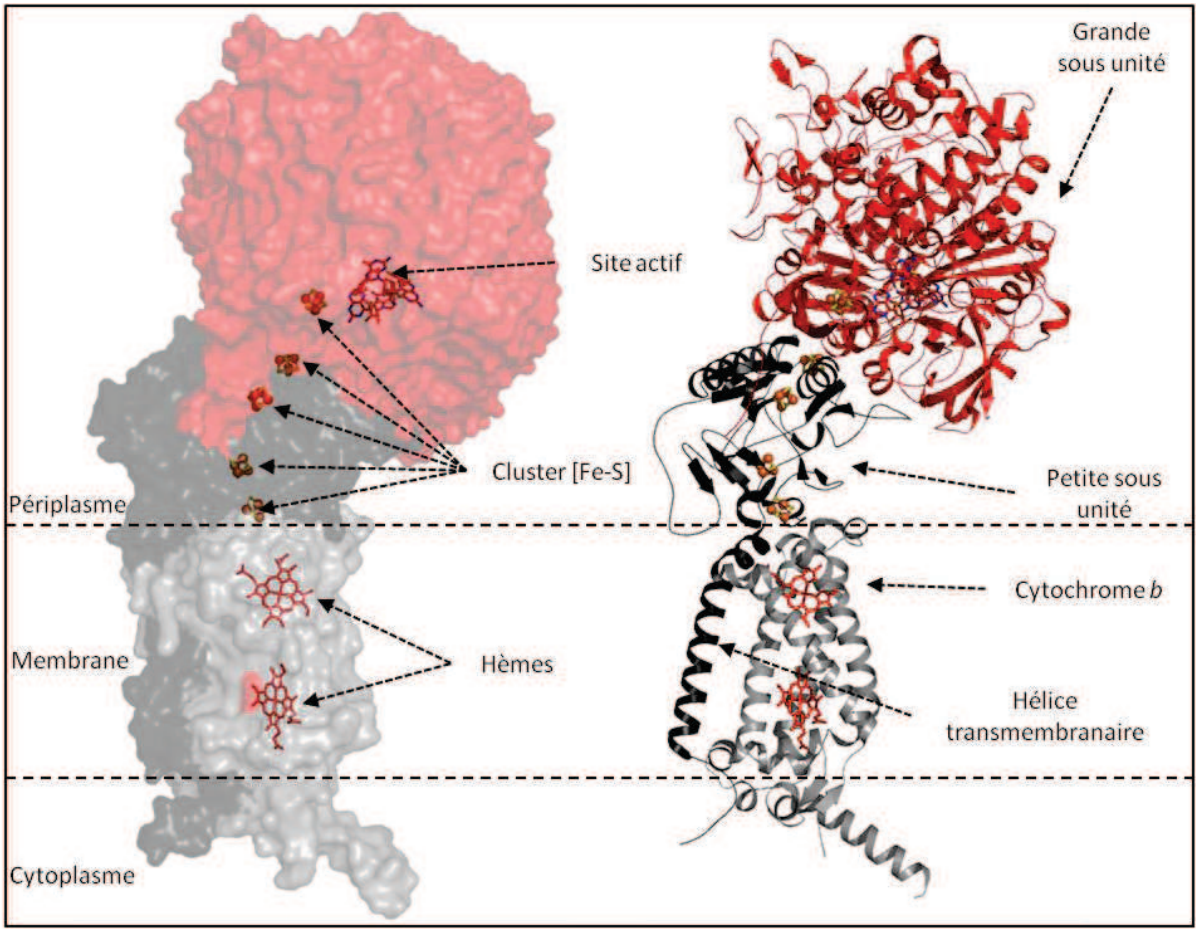


Figure 13 : Structure de la formiate déshydrogénase d'*Escherichia coli* (pdb ID : 1KQF). A gauche, les centres redox participant au transfert électronique sont mis en évidence. A droite, la structure de la formiate déshydrogénase décomposée en trois sous unités est présentée. L'hélice transmembranaire ancre la sous unité catalytique (rouge) et la sous unité qui transfère les électrons (noire) à la membrane. La membrane est représentée par les lignes pointillées noires.

A partir des ces informations, un modèle complet de MbH1, incluant la grande sous unité, la petite sous unité et le cyt *b* a été construit (Figure 14). Les interactions entre la petite sous unité de l'hydrogénase et le cyt *b*, n'ont pas été optimisées. La seule contrainte imposée lors de ce docking « manuel » est la distance entre le centre [Fe-S] distal et l'hème coté périplasmique du cyt *b*. Cette distance est fixée à moins de 15 Å afin d'être compatible avec un transfert électronique rapide.

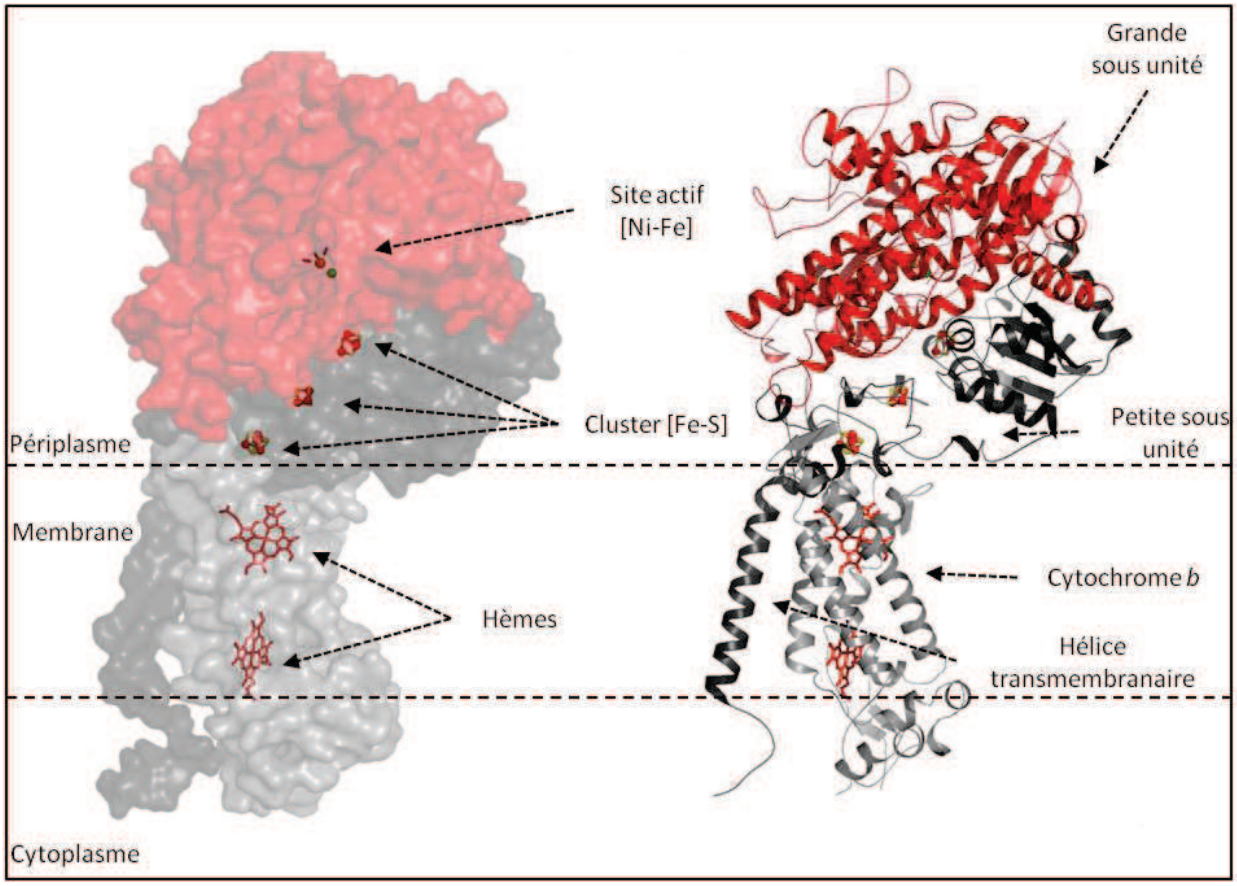


Figure 14 : Modèle de l'hydrogénase [Ni-Fe] membranaire d'*Aquifex aeolicus*. A gauche les centres redox participant au transfert électronique sont mis en évidence. A droite la structure de l'hydrogénase décomposée en trois sous unités est présentée. L'hélice transmembranaire (provenant de la formiate déshydrogénase) ancre la grande sous unité catalytique (rouge) et la petite sous unité qui transfère les électrons (noire) à la membrane. La membrane est représentée par les lignes pointillées noires.

2.3.2 *Caractérisation de l'hélice transmembranaire de l'hydrogénase [Ni-Fe] d'*Aquifex aeolicus

Je viens d'évoquer que la séquence C-terminale de la petite sous unité de MbH1 présente une extension constituée d'une quarantaine d'acides aminés majoritairement hydrophobes. Cette extension n'est pas identifiée sur les structures cristallographiques des homologues de MbH1. Les prédictions bioinformatiques décrivent cette extension comme une hélice transmembranaire (Figure15 A). Par analogie avec la formiate déshydrogénase, cette hélice servirait d'ancrage à l'hydrogénase au cyt *b*. Une comparaison bioinformatique entre l'hélice prédite de MbH1 et l'hélice de la formiate déshydrogénase révèle les mêmes caractéristiques en terme de répartition des propriétés physicochimiques des résidus. En effet, si on observe l'hélice transmembranaire de la formiate déshydrogénase (Figure 15 C), on

remarque qu'elle est constituée de deux faces: une face hydrophobe, en contact avec les lipides membranaires, et une face hydrophile comprenant des résidus chargés et polaires qui interagissent avec le cyt *b*. Cette même répartition d'acides aminés en faces hydrophobe et hydrophile est observée sur l'hélice transmembranaire prédite de MbH1, renforçant l'idée que cette hélice est en forte interaction avec le cyt *b* (Figure 15 B). Elle est située à moins de 15 Å du centre [Fe-S] distal, un point qui doit être à prendre en considération pour une immobilisation ultérieure.

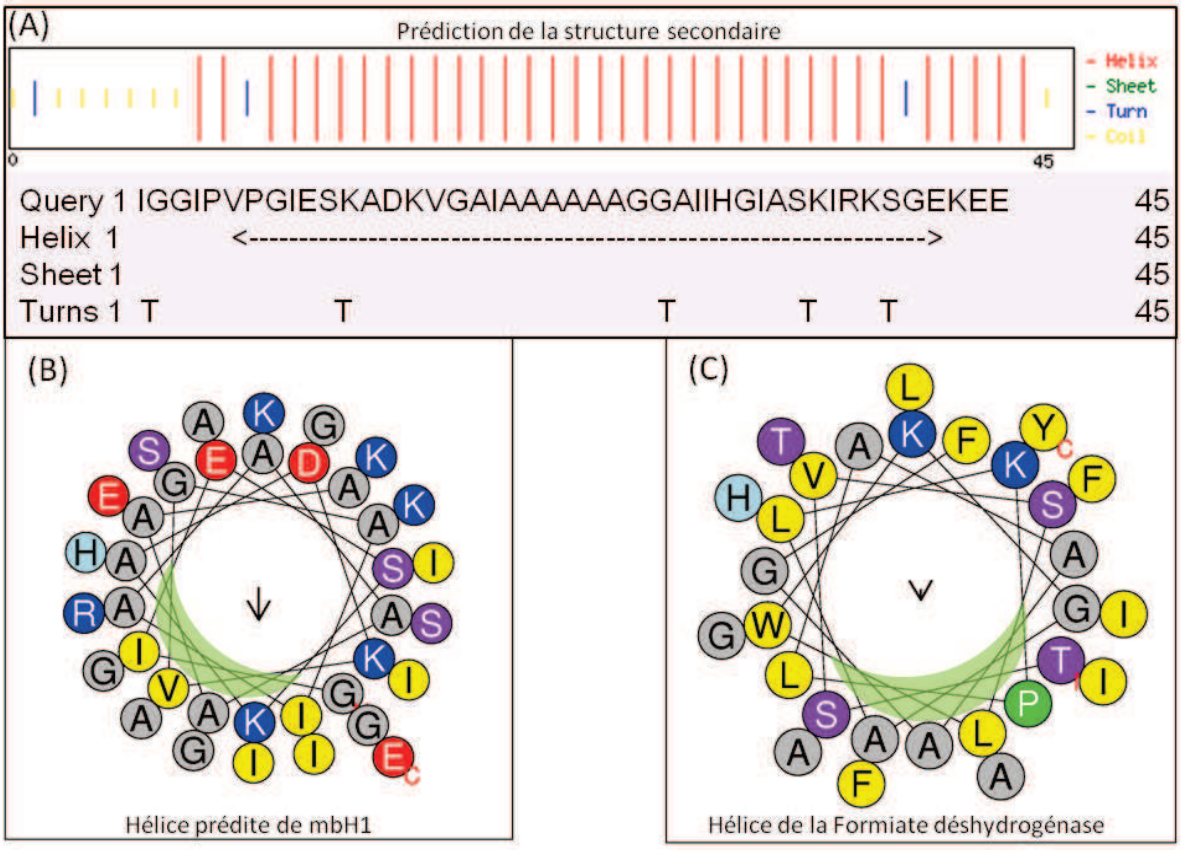


Figure 15 : (A) Prédiction bioinformatique de la structure secondaire de la séquence C-terminal de la petite sous unité. (B) Propriétés physico-chimiques de l'hélice transmembranaire prédite de MbH1 et (C) de l'hélice transmembranaire de la formiate déshydrogénase d'*Escherichia coli*. Les croissants en vert représentent la face hydrophobe des hélices. Données générées sur le serveur Expazy : CFSSP (Chou & Fasman Secondary Structure Prediction) pour la prédiction de structure et HeliQuest pour les propriétés physicochimiques.

Lors de la purification de MbH1, la grande et la petite sous unité peuvent être séparées du cyt *b*. La grande majorité de nos études est donc réalisée avec l'hydrogénase sans le cyt *b*. Néanmoins, l'analyse par spectrométrie de masse de l'hydrogénase identifie 35 acides aminés

sur les 43 résidus de l'hélice transmembranaire. Ce résultat montre donc que l'hélice est conservée sur la petite sous unité lors de la purification (Figure 16).

METFWEVFKRHGVSRRDFLKFATTITGLMGLAPSMVPEVVRAMETKPRVPVLWIHGL
ECTCCSESFIRATPLASDVVLSMISLEYDDTLSAAAGEAVEKHRERIIKEYWGNYILAVEG
NPPLGEDGMYCIIGGRPFVEILKESAEGAKAVIAWGSCASWGCVQAAKPNPTTAVPID
KVKDKPIIKVPGCPPIAEVMTGVIMYMVLFDRIPPLDSQGRPKMFYNRIHDTCYRRSFF
NAGQFVEQFDDEGAKKGWCLYKVGCRGPTTNSCGNMRWYNGLSYPIQSGHGCIGC
AENNFWDNGPFYER**IGGIVPGIESKADKVGAIAAAAAAGGAIIHGIASKIRKSGEKE**

Figure 16 : Identification par spectrométrie de masse de l'hélice transmembranaire sur l'hydrogénase purifiée. Les peptides en rouge sont ceux qui ont été identifiés dans la petite sous unité. La séquence de l'hélice transmembranaire apparaît en gras soulignée.

Ces données structurales sont essentielles pour échafauder une stratégie d'immobilisation de l'enzyme sur une interface électrochimique. La présence de l'hélice trans-membranaire sur la protéine purifiée, dont on ne connaît pas la position dans l'espace, impose cependant d'explorer l'immobilisation de MbH1 sur des SAMs de fonctions variées.

2.3.3 *Influence de la charge de surface*

2.3.3.1 *Oxydation de l'hydrogène sur SAMs chargées positives et négatives*

Dans la littérature, les hydrogénases qui ont été orientées sur électrodes, ont toujours été immobilisées sur des surfaces chargées, afin de diriger le centre [Fe-S] distal lui-même entouré de charges vers l'électrode. L'environnement du centre [Fe-S] distal dans le cas de MbH1 étant difficile à connaître du fait de la présence de l'hélice trans-membranaire, la même stratégie a été appliquée dans un premier temps. Des électrodes d'or ont été modifiées par des SAMs positives Ar-NH_2 (4-aminothiophénol) ou négatives C_6COOH (6-mercaptohexanoic acid). Après adsorption de l'hydrogénase, dans les deux cas un courant d'oxydation direct de l'hydrogène est observé à 60°C (Figures 17 A et C). A l'instar de l'électrode de PG, le processus d'oxydation de l'hydrogène débute avec une surtension de 100 mV par rapport au potentiel du couple H^+/H_2 à 60°C et pH 6,8. Le processus d'inactivation réversible anaérobie à haut potentiel est également toujours observé à partir d'un potentiel de -250 mV. La surface de l'électrode d'or polycristallin implique que les densités de courant mesurées présentent une grande variabilité. Néanmoins, les densités de courant observées sur Ar-NH_2, plus conducteur que C_nNH_2 ou C_nCOOH grâce aux électrons π délocalisés sur le cycle, sont systématiquement

les plus faibles. Le pKa du groupement NH_2 de l'Ar-NH_2 est de 6,8. Pour autant, l'adsorption de l'hydrogénase à pH plus acide (pH = 5,5) ne permet pas d'augmenter la densité de courant. Cette faible densité de courant peut s'expliquer par un nombre plus faible d'hydrogénases adsorbées, du à l'encombrement apporté par le cycle Ar-NH_2.

Lorsque le BM est ajouté en solution, un processus supplémentaire d'oxydation apparaît au potentiel redox du médiateur, potentiel auquel les hydrogénases directement connectées à l'électrode sont inhibées. Ce processus a lieu que la SAM soit chargée positivement ou négativement. Le même processus mixte est observée sur des chaînes plus courtes chargées positivement Cys (cystéamine) ou négativement MPA (mercaptopropionic acid) qui sont connues pour avoir une structure plus désordonnée (Figures 17 B et D). Ce second processus est lié à l'oxydation médiée de l'hydrogène par les hydrogénases qui ne sont pas connectées directement à l'électrode. Il est marqué par un phénomène d'inhibition réversible à haut potentiel très similaire au processus décrit lors du processus TED. Même si l'état du site actif [Ni-Fe] n'est pas déterminé expérimentalement dans ces conditions, l'oxydation de l'hydrogénase immobilisée *via* le médiateur redox à haut potentiel, semble donc conduire à une espèce inactive. Ce postulat est en accord avec le fait que les états inactifs du site [Ni-Fe] de l'hydrogénase ont été déterminés par titrage spectroscopique en présence de médiateurs redox (Pandelia et al., 2010a).

L'environnement du centre [Fe-S] distal ne permettait *a priori* pas de prédire la surface favorable à un transfert d'électrons direct. On aurait pu s'attendre à ce que les électrodes chargées positivement ou négativement se différencient, indiquant qu'une des surfaces chargées orientait spécifiquement l'enzyme et que l'autre induisait une distribution aléatoire des orientations. L'absence de spécificité de la charge des SAMs vis-à-vis du processus d'oxydation de l'H_2 par l'hydrogénase MbH1 indique que l'immobilisation n'est pas contrôlée par les interactions électrostatiques.

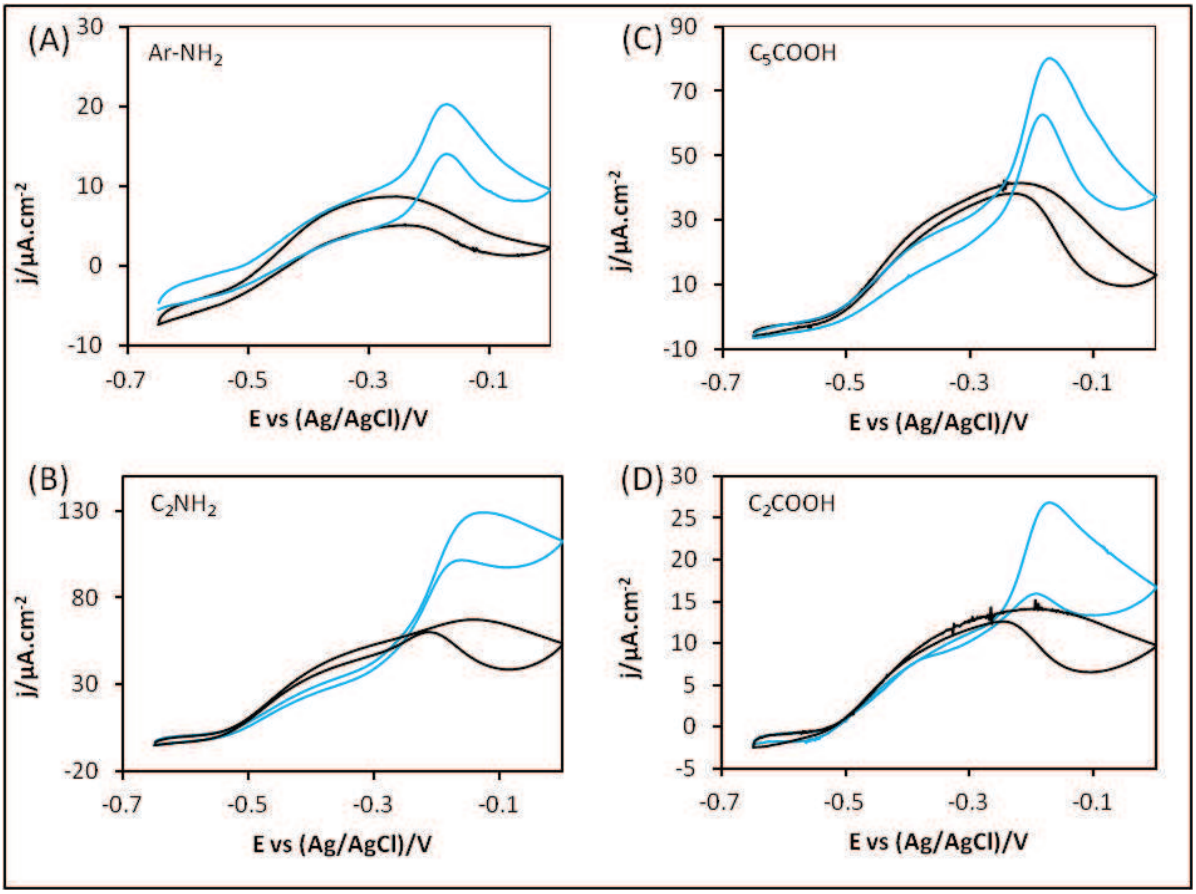


Figure 17 : CV représentant l'oxydation directe de l'hydrogène (noir) et l'oxydation médiée de l'hydrogène par le bleu de méthylène 10 µM (bleu) de MbH1 adsorbée sur des SAMs chargées positivement (A) (4-aminothiophénol) et (B) (cystéamine), et sur des SAMs chargées négativement (C) (6-mercaptohexanoic acid) et (D) (3-mercaptopropionic acid). Tampon Hepes 50 mM pH 6.8, 60°C, sous H_2, vitesse de balayage : 5mV.s^{-1}.

L'oxydation électrocatalytique de l'hydrogène est donc liée à des orientations multiples des hydrogénases à la surface des SAMs chargées. Le confinement de l'hydrogénase dans des défauts de la SAM est également peu probable puisque SAMs longues et courtes de même charge conduisent aux processus TED et TEM dans les mêmes proportions. Ceci est observé, bien que les SAMs courtes soient connues pour être moins ordonnées et plus facilement désorbables.

D'autre part, le BM a été démontré comme pouvant être incorporé dans les SAMs à chaîne longue (Tognalli et al., 2006). De nombreuses études rapportent que le transfert électronique à travers la chaîne alcane dépend peu de la longueur de la chaîne jusqu'à 6 à 8 groupements méthylène (Chi et al., 2001). Il diminue ensuite de manière exponentielle (1.03 par groupement méthylène) avec la longueur de la chaîne carbonée (Figure 18).

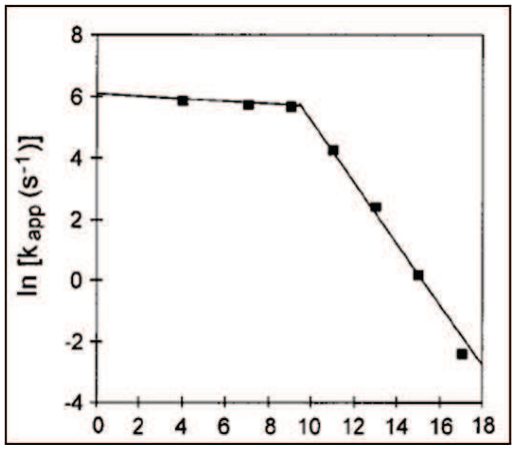


Figure 18 : Constante apparente de transfert électronique en fonction du nombre de groupements méthylène. (Reproduit de (Chi et al., 2001))

Ainsi lorsque la longueur d'une SAM portant une fonction terminale carboxylique, est augmentée jusqu'à 11 groupements méthylène, seul le processus d'oxydation de l'hydrogène médié est observé, bien que la fonction terminale puisse induire une multitude d'orientation, y compris une orientation favorable au TED (Figure 19).

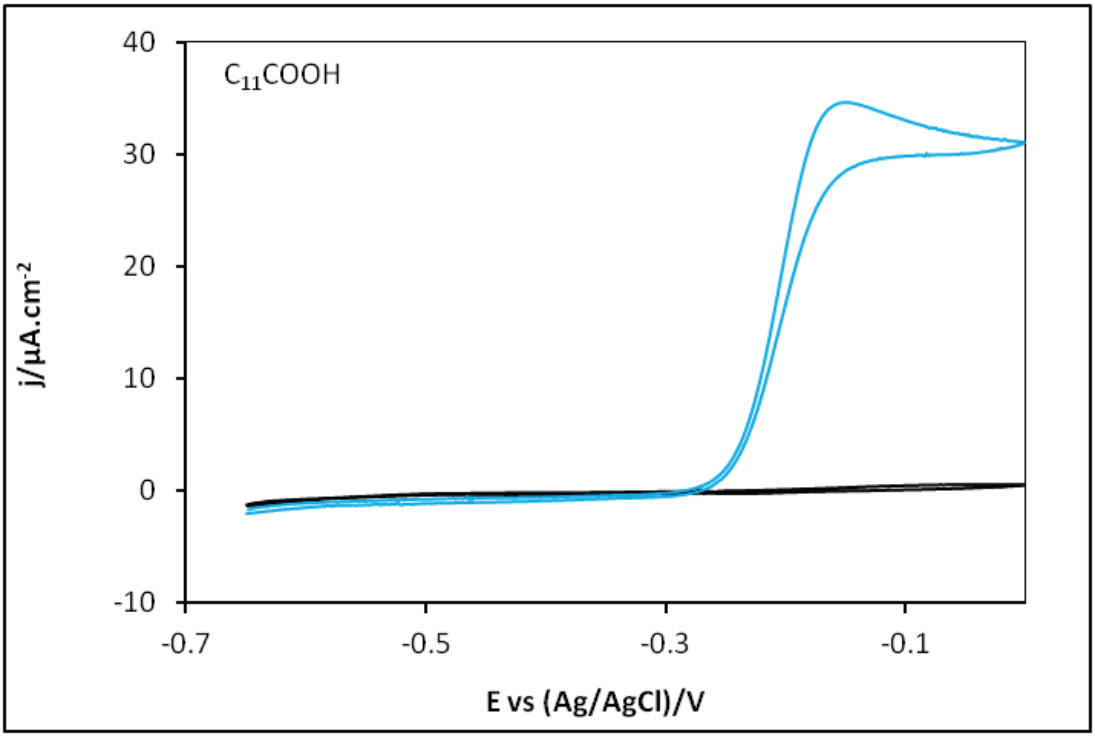


Figure 19 : CV représentant l'oxydation directe de l'hydrogène (noir) et l'oxydation médiée par le bleu de méthylène 10 µM (bleu) de MbH1 adsorbée sur une SAM longue chargée négativement (12-mercaptododecanoic acid). Tampon Hepes 50 mM pH 6,8, 60°C, sous H_2, vitesse de balayage : 5mV.s^{-1}.

2.3.3.2 *Mise en relation avec les caractéristiques physico-chimiques de l'hydrogénase [Ni-Fe]*

Contrairement aux hydrogénases solubles, l'immobilisation de MbH1 n'est donc pas contrôlée par les forces électrostatiques. Ce comportement très différent entre les deux types d'hydrogénase peut être rationalisé en considérant la localisation cellulaire de l'hydrogénase MbH1. De par sa position membranaire, la composition en acides aminés de surface autour du centre [Fe-S] distal chez l'hydrogénase MbH1 est très différente de celle des hydrogénases solubles. Alors que ces dernières présentent un patch bien défini d'acides aminés chargés négativement, MbH1 présente une zone plutôt hydrophobe autour du centre [Fe-S] distal (Figure20).

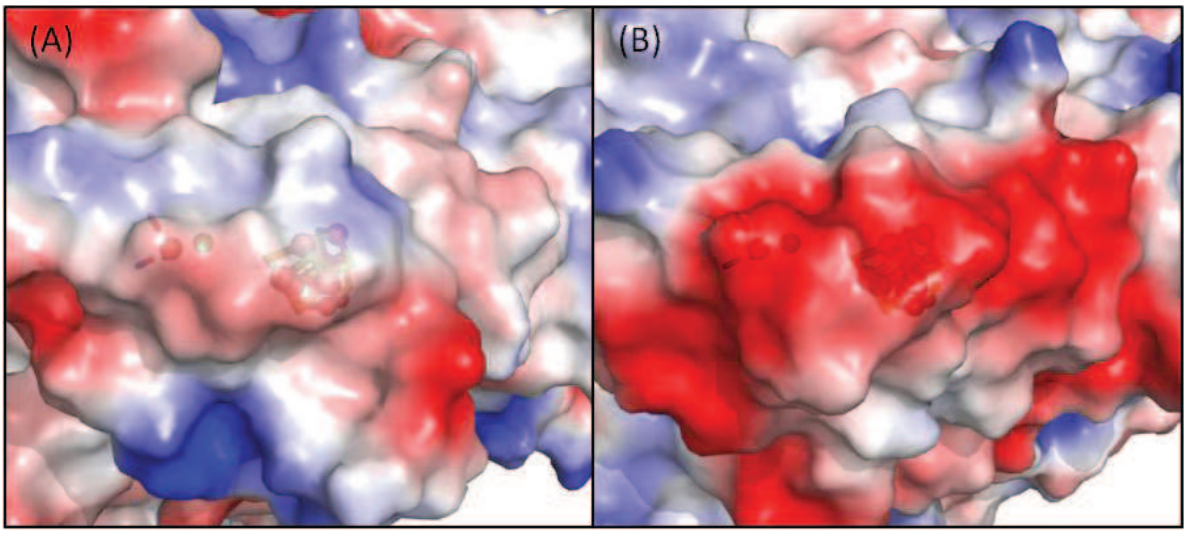


Figure 20 : Représentation de l'environnement électrostatique du centre [Fe-S] distal de MbH1 (A) et de l'hydrogénase soluble de *Desulfovibrio fructosovorans* (B). Les résidus chargés négativement et positivement sont représentés en rouge et bleu respectivement, tandis que les résidus hydrophobes sont représentés en blanc.

De même, le moment dipolaire (492 D) de MbH1 est bien plus faible que celui de l'hydrogénase de *Desulfovibrio fructosovorans* (1018D) et ne pointe pas vers le centre [Fe-S] distal (Figure 21).

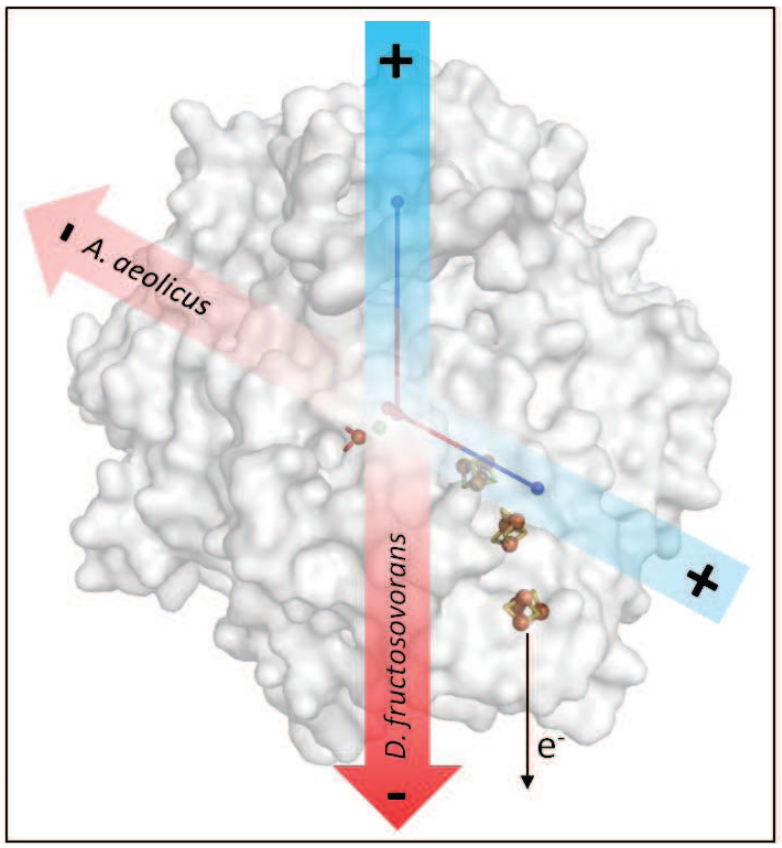


Figure 21 : Comparatif des moments dipolaires de MbH1 et de l'hydrogénase soluble de *Desulfovibrio fructosovorans*. Calculs effectués sur le Protein Moment Dipole Server (http://bioinfo.weizmann.ac.il/dipol/).

Il faut noter que les hydrogénases membranaires de *Ralstonia Eutropha* et d'*Hydrogenovibrio marinus* qui sont des homologues de MbH1, partagent ce faible moment dipolaire (~500 D) qui n'est pas orienté vers le centre [Fe-S] distal.

2.3.3.3 *Mise en évidence du patch négatif dans les liquides ioniques*

Outre un comportement différent selon la charge du support d'immobilisation, cette différence d'environnement a été clairement mise en évidence lors de l'investigation de l'activité hydrogénase en présence de liquides ioniques (RTIL). Les RTILS sont des sels liquides à température ambiante qui ont la particularité d'être conducteurs et d'avoir une très faible pression de vapeur, permettant une utilisation à très haute température. Ces milieux sont donc intéressants à étudier comme électrolytes pour l'oxydation de l'H_2 par l'hydrogénase hyperthermophile MbH1, dans des conditions de température difficilement utilisables en électrochimie classique en milieu aqueux. Trois liquides ioniques différents ont été testés qui varient selon leur anion d'un caractère hydrophile à hydrophobe (Tableau 3). L'activité

d'oxydation de l'hydrogène par MbH1 adsorbée sur électrode est étudiée en augmentant la température jusqu'à 90 °C.

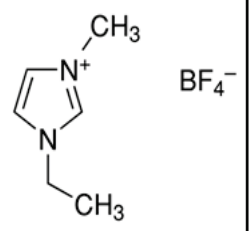
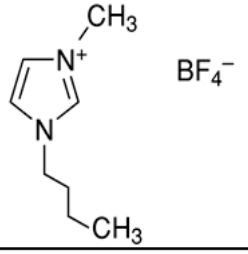
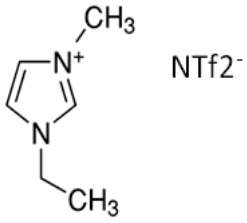
		
Hydrophile	Hydrophile	Hydrophobe
1-Ethyl-3-methylimidazolium Tetrafluoroborate	1-Butyl-3-methylimidazolium Tetrafluoroborate	1-Ethyl-3-methylimidazolium bis(trifluoromethanesulfonyl) imide

Tableau 3 : Liste des RTILs testés lors de l'étude de l'activité hydrogénase en milieu liquide ionique.

Dans un électrolyte composé de liquide ionique pur, aucune activité électrocatalytique d'oxydation de l'hydrogène n'est détectée, que ce soit pour l'enzyme soluble de *Desulfovibrio fructosovorans* ou l'enzyme membranaire MbH1 adsorbées sur électrode de PG. Lorsque les électrodes sont transférées du milieu liquide ionique, vers un électrolyte aqueux (tampon Hepes 50 mM pH 6,8), seule l'activité hydrogénase de MbH1 est restaurée (Figure 22).

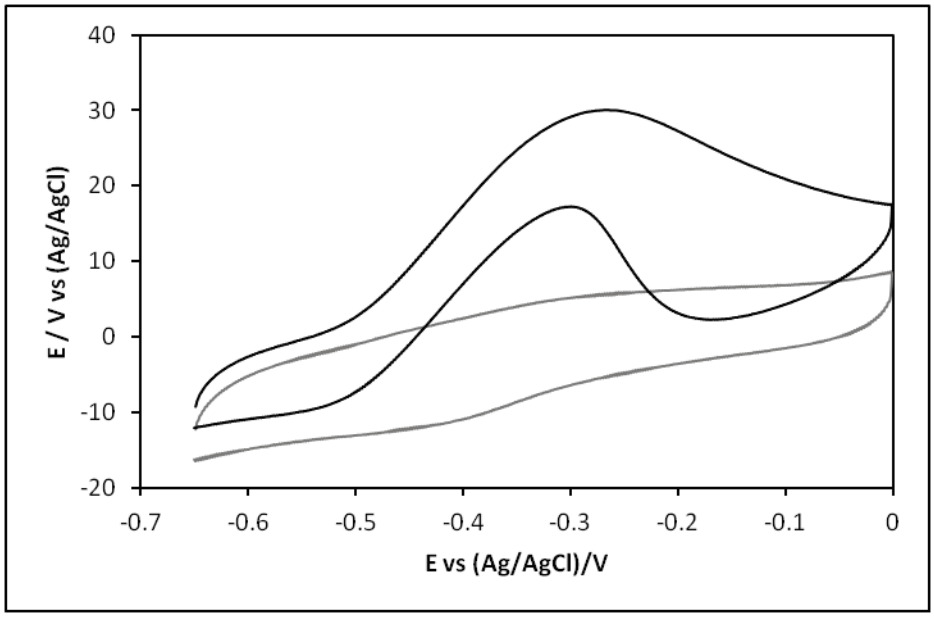


Figure 22 : CV représentant l'oxydation directe de l'hydrogène (gris) de MbH1 adsorbée sur une électrode de PG en milieu liquide ionique puis après transfert de l'électrode dans un Tampon Hepes 50 mM pH 6,8 (noir). 60°C, sous H_2, vitesse de balayage : 5mV.s^{-1}.

L'hypothèse émise est que les cations du liquide ionique interagissent fortement avec le patch négatif entourant le centre [Fe-S] distal de l'hydrogénase de *Desulfovibrio fructosovorans*, bloquant la sortie des électrons. En revanche, l'absence de ce patch chez MbH1, limiterait les interactions avec les ions du liquide ionique, et permettrait de restaurer l'activité après transfert dans un électrolyte aqueux.

2.3.4 *Influence de l'hydrophobicité de surface*

2.3.4.1 *Oxydation de l'hydrogène sur SAMs hydrophobes*

Une hélice transmembranaire hydrophobe associée à un patch hydrophobe a été mise en évidence dans l'environnement proche du centre [Fe-S] distal chez MbH1. Pour une immobilisation et orientation efficace de l'enzyme, l'objectif a été de chercher à recréer un environnement membranaire. Les SAMs hydrophobes constituent à ce titre une couche d'accroche *a priori* favorable. MbH1 est adsorbée sur des SAMs de type C_nCH_3 (avec n=3, 7 et 11), et l'activité de l'oxydation de l'hydrogène suivie par voltamétrie à 60°C. De manière inattendue, le processus d'oxydation de l'hydrogène s'effectue majoritairement *via* un transfert d'électrons médié, et ce quel que soit la longueur de la chaîne (Figure 23).

Cette observation est à mettre en relation avec l'immobilisation d'une autre protéine présentant un patch hydrophobe près du site actif, l'azurine. Il a été démontré que l'azurine immobilisée sur des SAMs hydrophobes de type C_nCH_3 allant jusqu'à 9 groupements CH_2 est capable d'effectuer un transfert d'électrons direct, sans que la longueur de la chaine n'affecte la constante apparente de transfert électronique (Chi et al., 2001). Un caractère isolant de la SAM hydrophobe ne peut donc pas expliquer le transfert électronique majoritairement médié observé avec MbH1.

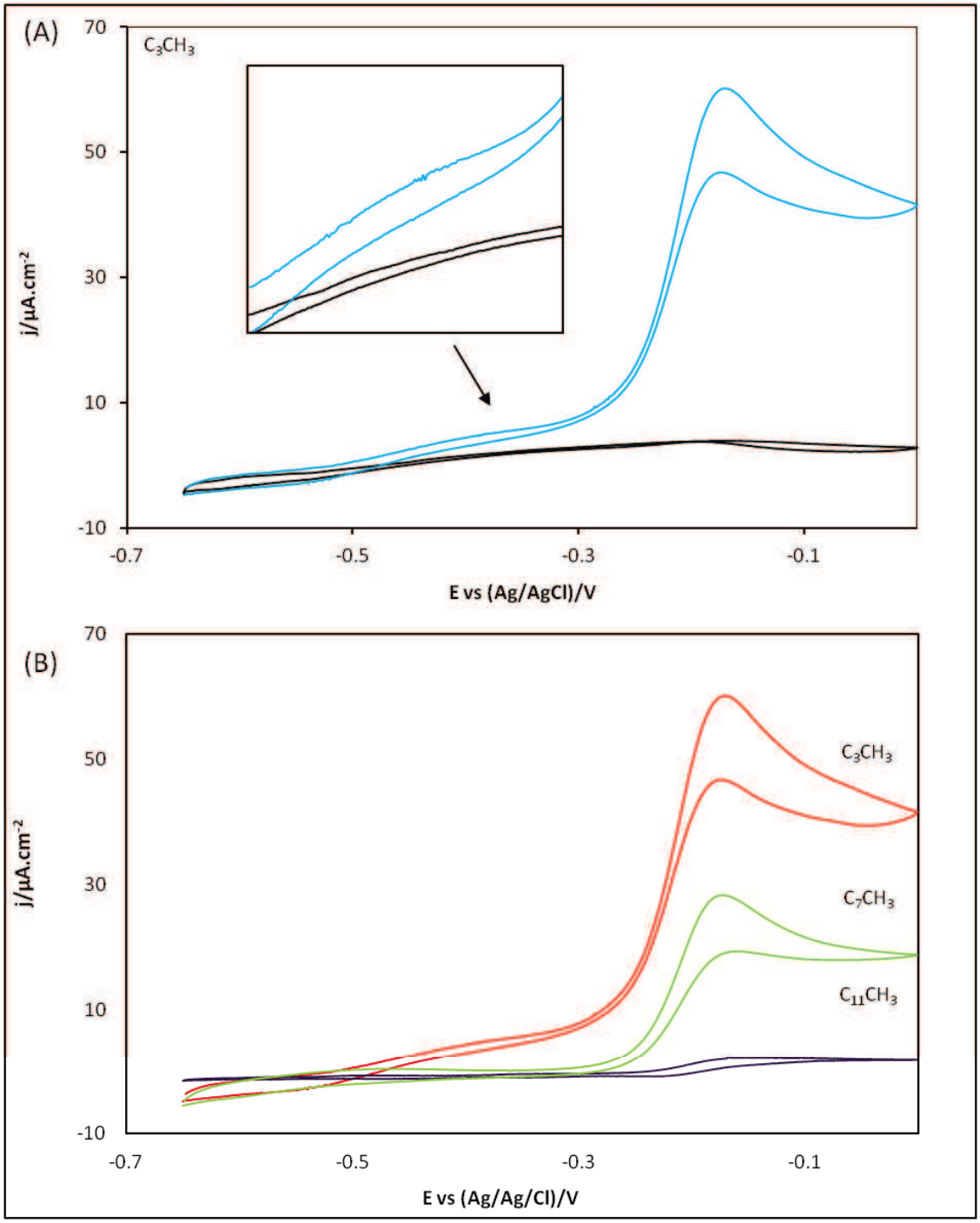


Figure 23 : (A) CV représentant l'oxydation directe de l'hydrogène (noir) et l'oxydation médiée par le bleu de méthylène 10 µM (bleu) de MbH1 adsorbée sur une SAM courte hydrophobe C_3CH_3 (1-butanethiol). L'insert représente l'augmentation du TED après addition de BM dans la gamme de potentiel -0,55 V à -0,3 V (B) CV représentant l'oxydation de l'hydrogène médiée par le bleu de méthylène 10 µM et MbH1 adsorbée sur des SAMs hydrophobes de longueur décroissante $C_{11}CH_3$ (1-dodecanethiol) (mauve), C_7CH_3 (1-octanethiol) (vert) et C_3CH_3 (1-butanethiol) (rouge). Tampon Hepes 50 mM pH 6,8, 60°C, sous H_2, vitesse de balayage : 5 mV.s^{-1}.

Pour les SAMs hydrophobes courtes (C_3CH_3), un très faible courant d'oxydation direct est néanmoins observé. Notons que ce processus augmente de 50 % après addition de BM (Figure 23 A). La faible contribution du courant lié à un processus direct d'oxydation de l'hydrogène n'est pas augmentée lorsque la concentration en BM est accrue jusqu'à 50 µM (Figure 24).

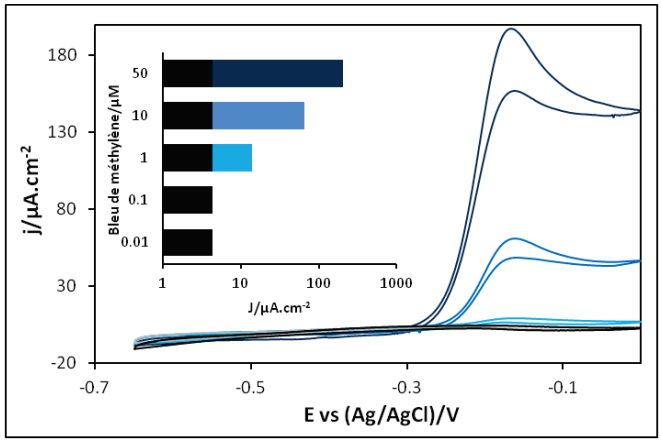


Figure 24 : CV de l'évolution du courant d'oxydation de l'H_2 par MbH1 en fonction de la concentration en BM (de 10 nM à 50 µM) sur SAM hydrophobe C_3CH_3. Insert : contribution du TED (noir), contribution du TEM (bleu clair à bleu foncé). Tampon Hepes 50 mM pH 6,8, 60°C, sous H_2.

Cette augmentation de courant est attribuée au même phénomène que celui observé précédemment avec le TBO, à savoir un ancrage des enzymes non favorablement orientées par le dérivé phénothiazine adsorbé dans/sur la SAM. La taille du BM est d'ailleurs suffisante pour que son insertion dans la SAM courte (C_3CH_3) fournisse un point d'ancrage à la surface de celle-ci. Cette insertion revient à insérer, dans une monocouche largement hydrophobe, un petit nombre de fonctions chargées positivement, capables d'induire un processus d'oxydation direct de l'hydrogène (Schéma 4). Ainsi une faible fraction d'enzymes peut être orientée favorablement, et la densité de courant liée au processus d'oxydation direct de l'hydrogène augmentée. Ce phénomène reste néanmoins très minoritaire au regard du processus d'oxydation médié de l'hydrogène sur les SAMs hydrophobes.

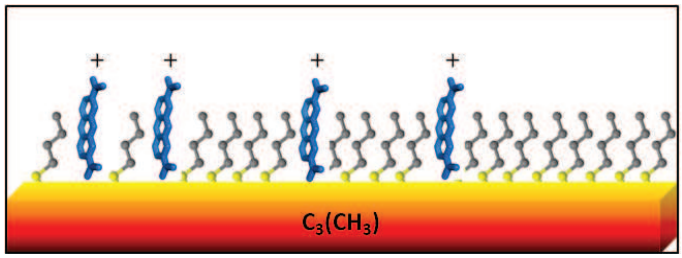


Schéma 4 : Représentation de l'incorporation du BM dans une SAM C_3CH_3, offrant des points d'ancrage pour MbH1.

2.3.4.2 *Influence de la longueur de la SAM*

On note également que la densité de courant médié diminue en fonction de la longueur de la chaîne de la SAM hydrophobe (Figure 23 B). Il est difficile de mettre ces résultats en relation avec la quantité d'hydrogénase immobilisée sur l'électrode. Une méthode permettant de coupler activité et résolution spatiale des enzymes à l'électrode reste à mettre au point. Une étude portant sur l'adsorption de l'azurine, enzyme dont on peut quantifier la concentration surfacique, a été effectuée en variant la longueur de la chaîne des SAMs hydrophobes (Chi et al., 2001). Il a été montré que la quantité d'enzyme électroactive immobilisée augmentait avec la longueur de la chaîne. A titre indicatif, la quantité d'azurine immobilisée est doublée lorsqu'on passe d'une chaîne C_4CH_3 à une chaîne C_9CH_3. L'augmentation de la quantité d'enzyme est attribuée au caractère de plus en plus ordonné des SAMs à mesure que la longueur des chaînes augmente.

Dans le cas de l'hydrogénase, les isothermes d'adsorption réalisées sur deux SAMs hydrophobes différentes suggèrent une quantité d'enzymes équivalente quelque soit la longueur de la chaîne (Figure 25).

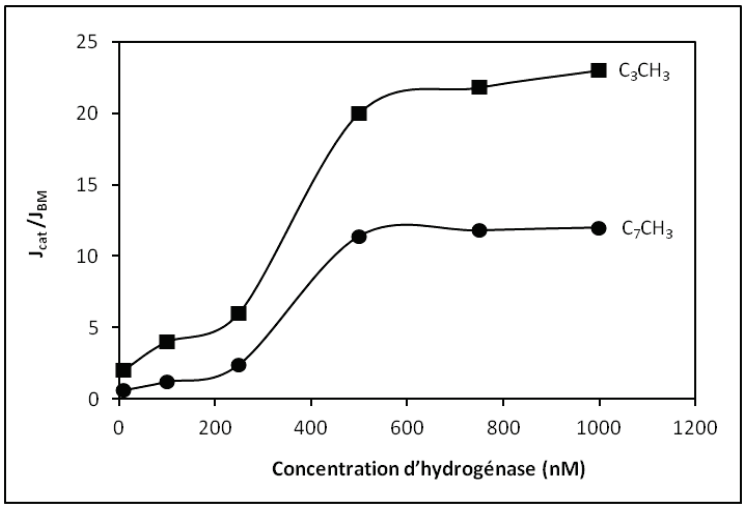


Figure 25 : Isothermes d'adsorption de MbH1 sur les SAMs hydrophobes (■) C_3CH_3 et (●) C_7CH_3. Le ratio (J_{cat}/J_{BM}) est représenté en fonction de la concentration en hydrogénase. Le ratio (J_{cat}/J_{BM}) pour la SAM C_7CH_3 a été multiplié par 3 pour plus de clarté. Tampon Hepes 50 mM pH 6,8, 60°C, sous H_2.

Pour réaliser ces isothermes, l'adsorption de l'hydrogénase sur la SAM est réalisée pendant 45 min, durée d'incubation permettant d'atteindre l'équilibre. Les électrodes ainsi préparées sont testées par voltamétrie à 60 °C en présence d'hydrogène et de BM 10 µM. L'intensité du courant médié lié à l'oxydation de l'hydrogène par l'hydrogénase (J_{cat}) est

mesurée, puis divisée par l'intensité du courant lié au BM seul (J_{BM}). Ce ratio (J_{cat} /J_{BM}), mesure de l'efficacité catalytique, est ensuite reporté en fonction de la concentration en enzyme. Deux longueurs différentes de SAM hydrophobe ont été utilisées : C_3CH_3 et C_7CH_3. La forme des isothermes d'adsorption est identique quelle que soit la longueur de la SAM. Deux domaines distincts se dessinent. Pour les concentrations en hydrogénase inférieures à 250 nM, le ratio J_{cat} /J_{BM} augmente peu avec la concentration en hydrogénase, signifiant qu'une faible intensité de courant d'oxydation de l'hydrogène médié est enregistrée. Les raisons de cette absence de catalyse seront discutées plus loin dans ce chapitre. Au delà de 250 nM en hydrogénase, le ratio J_{cat} /J_{BM} augmente jusqu'à atteindre un plateau pour une concentration d'hydrogénase de 500 nM. La saturation de la surface de l'électrode par l'hydrogénase est atteinte. Cette concentration ne donne toutefois pas d'indication sur la quantité d'enzymes actives à l'électrode. On peut émettre l'hypothèse que la quantité d'hydrogénase est identique quelque soit la longueur de la chaîne puisque les deux isothermes d'adsorption présente une saturation pour une même concentration d'enzyme.

Comment peut-on expliquer la diminution du courant d'oxydation médié avec la longueur de la SAM (Figure 23 B) ? En règle générale, le transfert d'électrons d'une espèce adsorbée ou en solution à travers une SAM sans défauts se produit par effet tunnel. En revanche, il est connu que les SAMs alcanethiols courtes sont suffisamment défectueuses pour laisser diffuser de petites molécules telles que le BM. De plus il a été montré que le BM peut s'incorporer dans la SAM. Pour les SAMs courtes, l'incorporation du BM est un processus réversible, tandis que pour les SAMs plus longues, le BM reste emprisonné de manière irréversible dans la monocouche (Grumelli et al., 2010). On peut alors supposer qu'à mesure que la longueur de la chaîne augmente, le BM s'insère de manière irréversible à l'intérieur de la SAM. Il est électroactif, mais cependant incapable de jouer son rôle de navette en allant chercher les électrons provenant de l'oxydation catalytique de l'hydrogène par les hydrogénases en surface de la SAM (Tognalli et al., 2006).

Les constantes de vitesse de 2nd ordre de transfert d'électrons entre le BM et MbH1 lorsqu'elle est immobilisée sur des SAMs hydrophobes ont été calculées (Tableau 4). Des valeurs comprises entre 10^6 et 10^8 $M^{-1}.s^{-1}$ sont calculées à partir de la concentration saturante en hydrogénase. Même si ces constantes de vitesse sont obtenues par défaut, puisque la concentration de l'enzyme à saturation déterminée par l'isotherme d'adsorption (500 nM) est une valeur maximum, ces valeurs font sens puisque comparables aux constantes cinétiques obtenues entre deux partenaires physiologiques. La valeur la plus élevée obtenue sur la chaîne

courte est en effet du même ordre de grandeur que les constantes de vitesse calculées pour l'interaction entre le cyt c_3 et l'hydrogénase [Ni-Fe] soluble des espèces *Desulfovibrio* (voir Tableau 3 Chap.1 §2.5.2). Dans ces conditions également, le calcul de la constante de vitesse se basait sur la concentration en enzyme ajoutée en solution. Or plusieurs expériences ont prouvé que seule l'enzyme adsorbée contribuait au courant catalytique.

SAM	Constante de vitesse de 2nd ordre $M^{-1}.s^{-1}$
C_3CH_3	$3.4 \times 10^8 < k < 7.2 \times 10^8$
C_7CH_3	$7.6 \times 10^6 < k < 1.5 \times 10^8$
$C_{11}CH_3$	$1.6 \times 10^6 < k < 3.8 \times 10^6$

Tableau 4 : Valeurs des constantes de vitesse de 2nd ordre entre MbH1 et le BM.

2.3.4.3 *Oxydation de l'hydrogène sur SAMs hydrophiles*

Afin de valider la spécificité des SAMs hydrophobes à induire majoritairement un processus d'oxydation médié, l'immobilisation de l'hydrogénase a finalement été étudiée sur une SAM hydrophile à 6 groupements méthyles C_6OH (6-mercaptohexanol).

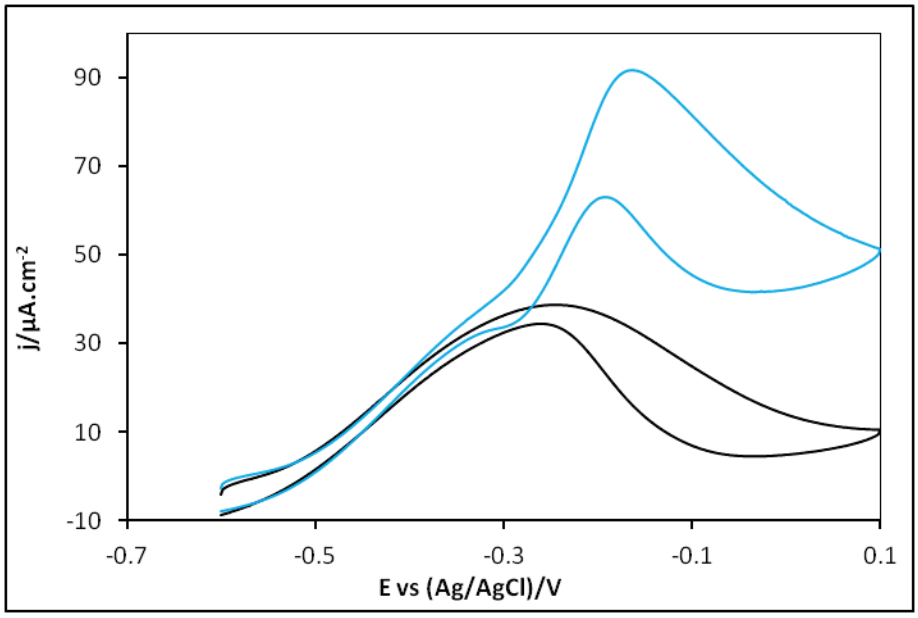


Figure 26 : (A) CV représentant l'oxydation directe de l'hydrogène (noir) et médiée par le bleu de méthylène 10 µM (bleu) de MbH1 adsorbée sur une SAM hydrophile de longueur moyenne C_6OH (6-mercaptohexanol). Tampon Hepes 50 mM pH 6.8, 60°C, sous H_2, vitesse de balayage : $5mV.s^{-1}$.

A l'instar des SAMs chargées de longueur équivalente, un processus d'oxydation catalytique de l'hydrogène mixte TED et TEM est observé (Figure 26). Il apparaît donc que seules les SAMs hydrophobes privilégient un type de processus (TEM) au détriment d'un autre (TED) pour l'oxydation de l'hydrogène.

2.4 Bilan de l'immobilisation de l'hydrogénase sur SAMs

L'exploitation des données électrochimiques de l'immobilisation de l'hydrogénase sur différentes SAMs permet de mettre en relief deux comportements distincts. Le ratio $J_{TED}/(J_{TED}+J_{TEM})$ est défini comme la densité de courant maximum lié à un processus TED divisé par la somme de la densité de courant maximum lié à un processus TED et/ou TEM (Figure 27).

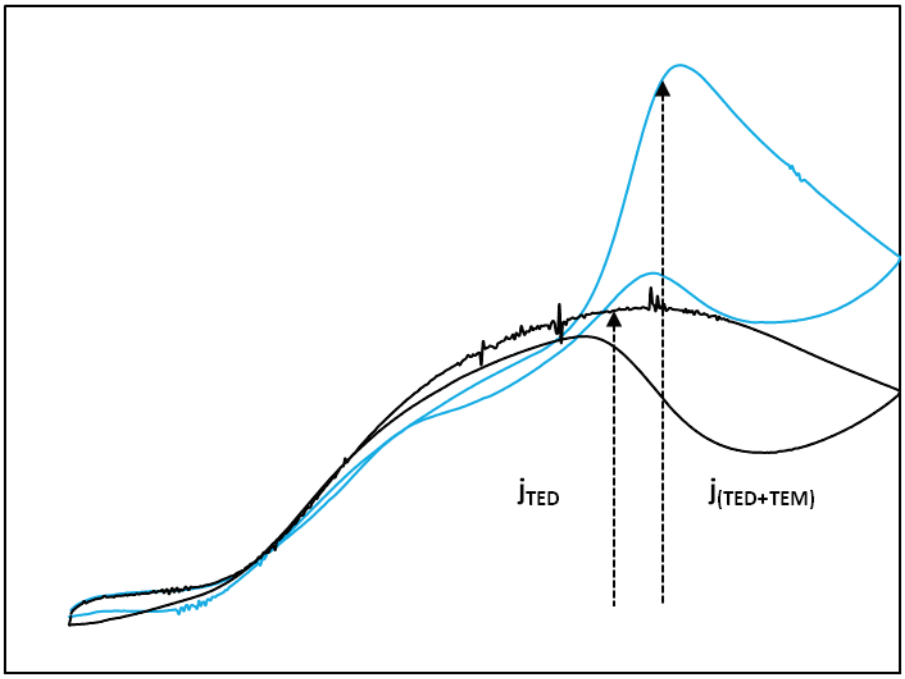


Figure 27: Détermination du ratio $J_{TED}/(J_{TED}+J_{TEM})$.

Ce ratio est un indicateur de l'orientation de l'hydrogénase sur l'électrode (Figure 28):

- S'il est égal à 1, toutes les enzymes immobilisées sont directement connectées à l'électrode pour l'oxydation de l'H_2,
- S'il est égal à 0, toutes les enzymes sont orientées de manière incompatible avec un transfert d'électrons direct.

- Un ratio compris entre 1 et 0 est significatif d'une hétérogénéité d'orientations, induisant un processus mixte d'oxydation de l'H_2.

Ainsi sur les surfaces chargées (positivement ou négativement) et hydrophiles, l'oxydation de l'hydrogène par MbH1 se produit *via* un processus mixte TED et TEM. Les densités de courant direct et médié sont équivalentes du moment que le nombre de groupements CH_2 de la chaîne alcane est inférieur à 10. Le ratio $J_{TED}/(J_{TED}+J_{TEM})$ prend alors une valeur d'environ 0,5. Pour des chaînes plus longues, la diminution de la vitesse du transfert d'électrons à travers la SAM entraine une baisse du ratio, non significative d'une mauvaise orientation. En revanche sur les SAMs hydrophobes, le processus TEM est largement favorisé, même pour les chaînes alcanes courtes. Le ratio $J_{TED}/(J_{TED}+J_{TEM})$ prend alors des valeurs très faibles comprises entre 0 et 0,08 bien plus basses que le ratio obtenu pour les SAMs chargées. Bien que les densités de courant présentent une grande variabilité, les ratios présentés ci-dessus ne varient pas. La relation directe entre un processus TEM favorisé par rapport à un processus TED et l'hydrophobicité de l'interface électrochimique est clairement mise en évidence.

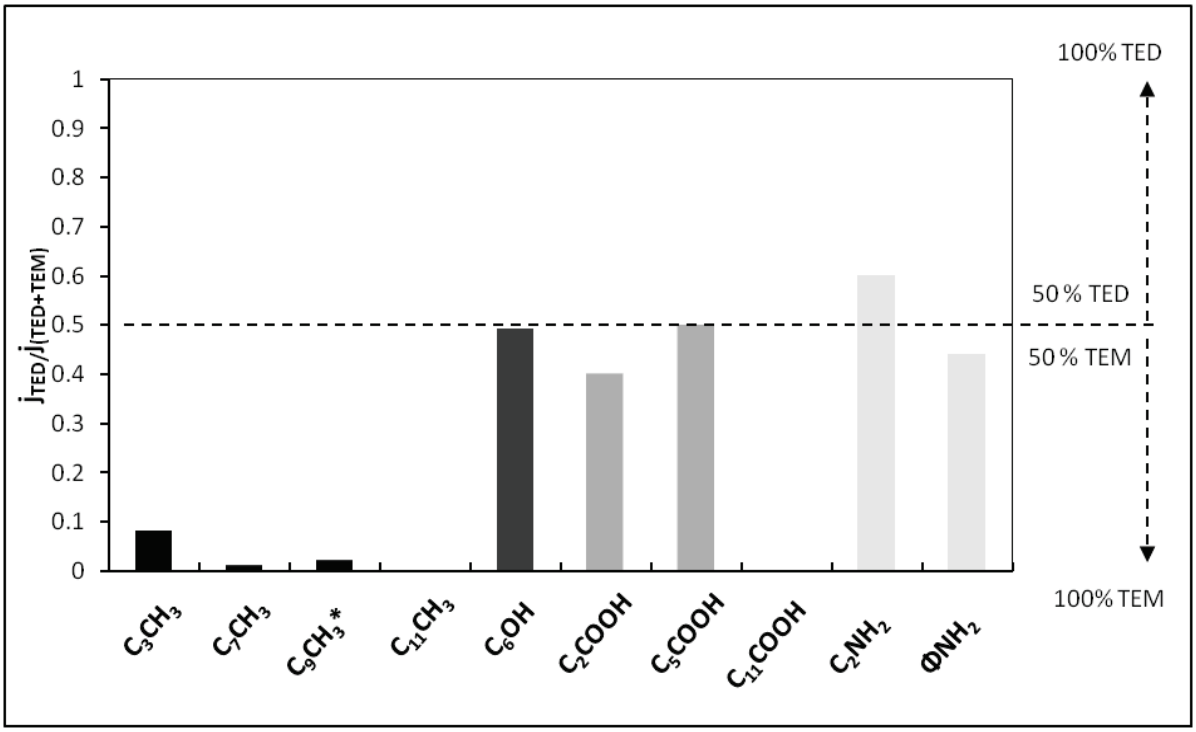


Figure 28: Histogramme représentant le ratio $J_{TED}/(J_{TED}+J_{TEM})$ indicatif de l'orientation de l'hydrogénase en fonction de la longueur de la chaine et des propriétés de la SAM hydrophobe (noir), hydrophile (gris foncé), chargée négativement (gris) et positivement (gris clair).* : (Luo et al., 2009)

Les expériences menées par électrochimie semblent donc établir que les SAMs hydrophobes induisent de manière surprenante une orientation de l'enzyme pour laquelle le centre [Fe-S] distal serait à l'opposé de la surface de l'électrode. C'est un résultat inattendu, puisque les SAMs hydrophobes avaient été choisies afin de mimer un environnement physiologique. L'idée était de plus d'induire l'insertion de l'hélice transmembranaire à l'intérieur de la SAM, qui de fait remplacerait la membrane périplasmique, orientant ainsi l'hydrogénase avec son centre [Fe-S] distal vers la surface de l'électrode.

Notons cependant que dans le cas d'un processus mixte TED+TEM, ce ratio ne peut pas être relié à une proportion d'enzymes bien orientées par rapport aux enzymes mal orientées à l'électrode. En effet aucun signal non catalytique de MbH1 n'est observable en absence d'hydrogène. La quantification du nombre de molécules immobilisées électroactives, et donc connectées en direct, est à ce jour impossible. En estimant la taille de l'enzyme[3] à 6 x 4 nm = 24 nm^2, la valeur théorique de la concentration surfacique maximum d'une monocouche hydrogénase Γ est estimée à 6.4 $pmol.cm^{-2}$. L'absence de signaux non catalytiques, laissent cependant à penser que la concentration surfacique en hydrogénase électroactive soit bien inférieure à cette valeur théorique (Vincent et al., 2007). Parmi les rares cas de détection de signaux non catalytiques pour les hydrogénases [Ni-Fe], on peut noter la détection des signaux des centres [Fe-S] de l'hydrogénase d'*Allochromatium vinosum*, dont l'intégration a permis de calculer une concentration surfacique Γ de 3 $pmol.cm^{-2}$ (Pershad et al., 1999). En se basant sur un turnover de l'oxydation de l'hydrogène estimé à 10^3 s^{-1} pour l'hydrogénase d'*Allochromatium vinosum* (Hoeben et al., 2008), une concentration surfacique Γ de MbH1 électroactives sur SAMs chargées est calculée à partir du courant TED. Un Γ de 0,33 $pmol.cm^{-2}$ est obtenu. Cette donnée n'a cependant qu'une valeur tout à fait relative, puisque :i) les signaux non catalytiques n'ont été observés que dans une étude datant de 1999 pour l'hydrogénase d'*Allochromatium vinosum*, ii), le turnover estimé dans la littérature varie entre 10^3 et 10^4 s^{-1}, iii) l'aire de MbH1 ne tient pas compte de l'éventuelle présence de détergent.

De plus, même si un signal non catalytique était observable, il ne signifierait pas pour autant que toutes les enzymes immobilisées soient actives. En effet, on peut supposer qu'il est possible de voir les signaux catalytiques des centres [Fe-S] même si le site actif [Ni-Fe] est dégradé. En conséquence, ne connaissant pas avec acuité la concentration surfacique en

[3] Je fais l'hypothèse que les hydrogénases sont à la verticale sur l'électrode.

enzymes électroactives, la constante de catalyse k_{cat} est également inaccessible. Seule la connaissance de ces paramètres permettra de relier le rapport $J_{TED}/(J_{TED}+J_{TEM})$ à une quantité d'enzymes bien orientées à l'électrode.

3. PARTICULARITÉS DES PROTÉINES MEMBRANAIRES ET DU TRANSFERT D'ÉLECTRONS SUR SAMs HYDROPHOBES/ RÔLE DU DÉTERGENT

3.1 Généralités sur la solubilisation des protéines

Comme explicité précédemment, MbH1 est une protéine membranaire insérée dans la membrane cellulaire par une hélice transmembranaire en interaction avec le cyt *b*. 30 % des gènes exprimés codent pour des enzymes membranaires. Paradoxalement, seules 4% des enzymes dont les structures ont été résolues sont membranaires, mettant bien en exergue la difficulté d'étudier ce type de protéines. Bien qu'elles tiennent un rôle central dans les processus énergétiques, l'électrochimie des protéines membranaires reste d'ailleurs limitée à quelques exemples. La cytochrome *c* oxydase est certainement l'enzyme membranaire qui a été la plus étudiée par électrochimie comme vu dans l'introduction bibliographique. Ces observations traduisent les difficultés rencontrées dans la purification de ces enzymes, dans le maintien de leur stabilité dans le temps, dans le maintien de leur activité une fois qu'elles sont solubilisées et enfin dans la reconstitution des environnements physiologiques.

La solubilisation des protéines membranaires requiert l'utilisation de détergents qui disloquent les membranes lipidiques. Il s'agit de molécules amphiphiles, composées d'une tête hydrophile et d'une queue hydrophobe. La tête hydrophile peut être chargée (anionique ou cationique) ou neutre (non ionique ou zwitterionique). Les détergents sont caractérisés par leur concentration micellaire critique (CMC) qui leur est propre : il s'agit de la concentration minimale à partir de laquelle les monomères de détergent vont s'assembler en micelles (Figure 29).

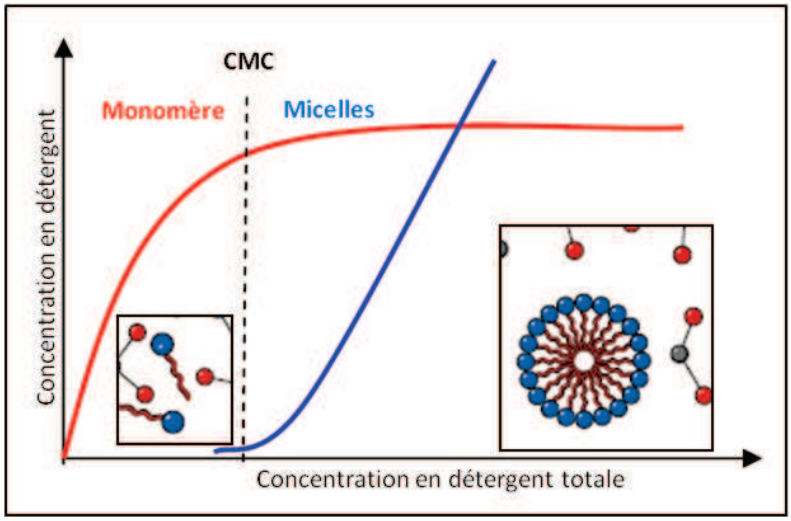


Figure 29 : Représentation du passage de l'état monomérique à l'état de micelle en fonction de la concentration totale en détergent et de la concentration micellaire critique (CMC).

La CMC dépend de la température. Pour les détergents ioniques, la CMC augmente avec la température. Le point de Kraft correspond à la température en dessous de laquelle, aucun micelle ne se forme même si la concentration en monomère est au-dessus de la CMC. Le détergent forme alors un précipité cristallin. Le point de Kraft peut être proche de la température ambiante. Pour les détergents non ioniques, il existe un point trouble, qui correspond à la température au dessus de laquelle il y a démixtion des micelles.

Au laboratoire, MbH1 est solubilisée grâce à un détergent non ionique, le n-Dodecyl-β-D-Maltoside (DDM) dont la CMC est de 0.2 mM et la température de point trouble inconnue. Il forme des micelles de 50 kDa comprenant 98 molécules de détergent.

Lors de la solubilisation de l'hydrogénase (Figure 30), la quantité initiale de DDM ajoutée à l'échantillon comprenant les fragments de membrane, est connue.

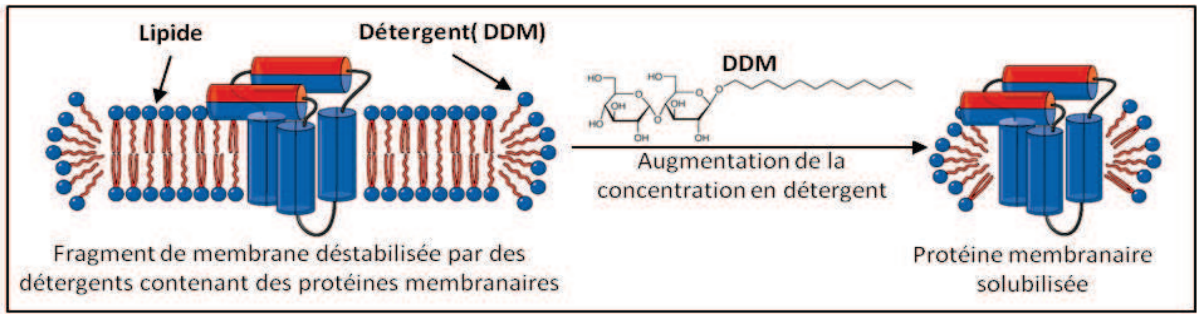


Figure 30 : Représentation de la solubilisation des protéines membranaires grâce au détergent n-Dodecyl-β-D-Maltoside (DDM).

Cependant cette concentration varie au cours des différentes étapes de concentration de l'enzyme. De fait, il est impossible de connaître *a priori* la concentration en DDM finale de l'échantillon. Celui-ci étant en contact avec l'enzyme, soit lié à la protéine, soit l'entourant sous forme micellaire, il est pourtant fort probable qu'il joue un rôle sur l'immobilisation de l'enzyme sur l'électrode. Très peu d'informations sont disponibles sur l'électrochimie des protéines membranaires, et sur l'influence de la concentration en détergent sur la réponse électrochimique. Un protocole de quantification du DDM a donc été mis au point, puis l'influence du DDM sur l'oxydation catalytique de l'H_2 par MbH1 a été étudiée.

3.2 Mise au point du protocole de quantification du détergent DDM

3.2.1 Solution calibrée de DDM

Afin de quantifier la concentration en détergent dans les échantillons d'hydrogénases, une technique de chromatographie en couche mince (CCM) a été utilisée, technique classiquement utilisée pour séparer et quantifier les lipides.

La phase stationnaire utilisée est polaire (gel de silice) et la phase mobile est un mélange de solvant polaire (méthanol) et apolaire (chloroforme) utilisé pour faire migrer les molécules amphiphiles, telles que les lipides, ou dans notre cas le DDM, un détergent neutre. Après la migration, les taches correspondant aux détergents sont révélées à l'acide phosphorique et leur intensité relative à la quantité déposée est mesurée par densitométrie.

La courbe de calibration [4] de la quantité de DDM est donnée Figure 31. La limite de détection basse se situe à 0,1 x CMC (soit 0,02 mM), tandis que la limite haute se situe aux alentours de 75 x CMC (soit 15 mM).

[4] La courbe de calibration doit être reproduite à chaque nouvelle CCM, et les fractions de DDM doivent être déposées sur la même plaque que les échantillons d'hydrogénases, car les conditions expérimentales peuvent varier en fonction des CCM.

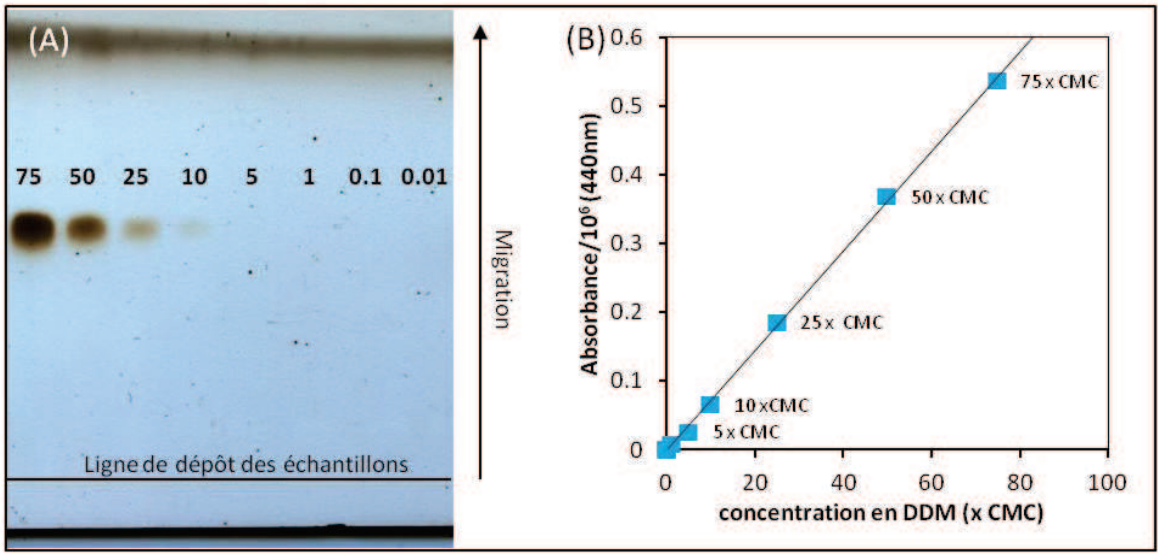


Figure 31 (A) CCM de concentrations décroissantes de 75 à 0,01 en multiple de la CMC (0,2 mM) du détergent n-Dodecyl-β-D-Maltoside (DDM). Migration en chloroforme/méthanol/hydroxyde d'ammonium/eau (65 :25 :4 :1, v/v/v/v). (B) Courbe de calibration du DDM déterminée à partir de l'absorbance des taches mesurées (carrés bleus) à 440 nm dont l'intensité est reportée en fonction de multiples de la CMC.

3.2.2 *Quantification du DDM dans les échantillons d'hydrogénase d'*Aquifex aeolicus

De la même manière, des échantillons d'hydrogénase de concentration connue sont déposés sur la plaque ayant servi à déterminer la courbe de calibration. La migration est effectuée dans le même solvant. La protéine est dénaturée dans le solvant organique. Seul le détergent, et les lipides d'*Aquifex aeolicus* éventuellement associés à l'enzyme à la fin de la purification, migrent (Figure 32A). L'intensité des taches correspondant au DDM présent dans les échantillons d'hydrogénase est reportée sur la courbe de calibration, permettant une lecture directe de la quantité de DDM en fonction de la concentration en hydrogénase (Figure 32 B). Une tâche brune est systématiquement présente sous la tâche caractéristique du DDM pour les échantillons d'hydrogénase. Ce lipide a été identifié en faisant migrer un échantillon contenant des lipides connus : le phosphatidylglycérol, et la phosphatidylethanolamine. Le lipide présent dans les fractions d'hydrogénase migre à la même hauteur que le phosphatidylglycérol. Contrairement aux études menées sur l'hydrogénase [Ni-Fe] membranaire tolérante à l'oxygène de *Ralstonia eutropha*, aucune trace de phosphatidylethanolamine n'a pu être détectée (Frielingsdorf et al., 2011). Nos résultats corroborent les travaux effectués en collaboration avec le Dr J.S. Sinninghe Damsté (NIOz,

Pays-Bas) sur la nature des lipides membranaires d'*Aquifex aeolicus,* qui ont permis de mettre en évidence la présence de phosphatidylglycérol, mais pas de phosphatidyléthanolamine.

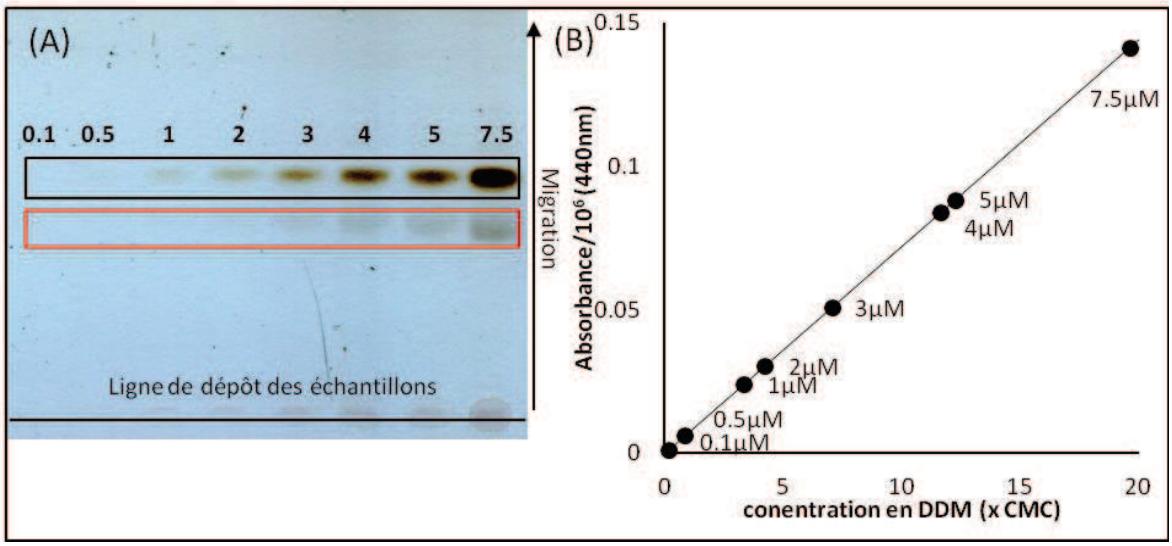


Figure 32: (A) CCM de concentrations croissantes de 0,1 à 7,5 µM d'hydrogénase. Migration en Chloroforme/méthanol/hydroxyde d'ammonium/eau (65 :25 :4 :1, v/v/v/v). (B) L'intensité des tâches correspondant au DDM (encadré noir sur la figure 31 A) présent dans les échantillons d'hydrogénase est reportée sur la courbe de calibration du DDM en figure 31 B. Un lipide inconnu est encadré de rouge sur la figure 31 A.

Afin d'avoir une idée de la reproductibilité du protocole de purification en terme de concentration finale en DDM dans les échantillons d'hydrogénase, le DDM a été quantifié sur 3 lots différents de purification. Pour ces 3 lots, la quantité de DDM est identique (70 x CMC) lorsqu'elle est quantifiée sur une fraction d'hydrogénase à 50 µM. De manière surprenante, bien qu'en fin de purification les dernières étapes de concentration de l'enzyme soient effectuées avec des concentrateurs de cut-off de 100 kDa, une quantité importante de DDM est mesurée (rappelons que la forme micellaire du DDM est de 50 kDa). Il en découle que l'hydrogénase utilisée classiquement pour les expériences d'électrochimie (1 µM) contiendra classiquement une concentration en DDM de 3 x CMC à savoir 0,6 mM.

Il faut noter que cette méthode de quantification ne permet pas de distinguer entre le DDM libre sous forme micellaire et/ou monomérique, et celui qui est en interaction avec les parties hydrophobes de la protéine. Néanmoins, il est possible de diminuer la concentration en DDM libre dans la solution d'hydrogénase. Pour ce faire, des Bio-Beads sont utilisées, dont le mode d'action peut être comparé à un chélateur de métaux. Ces Bio-Beads, qui peuvent être remplacées efficacement par des cyclodextrines, se présentent sous forme de petites billes

composées par des polymères de polystyrène qui adsorbent le détergent. Une solution de DDM concentrée à 25 x CMC peut être totalement adsorbée par les Bio-Beads. Le traitement d'un échantillon d'hydrogénase de 50 µM par des Bio-Beads permet de diminuer la concentration en DDM de 70 x CMC à 35 x CMC (Figure 33).

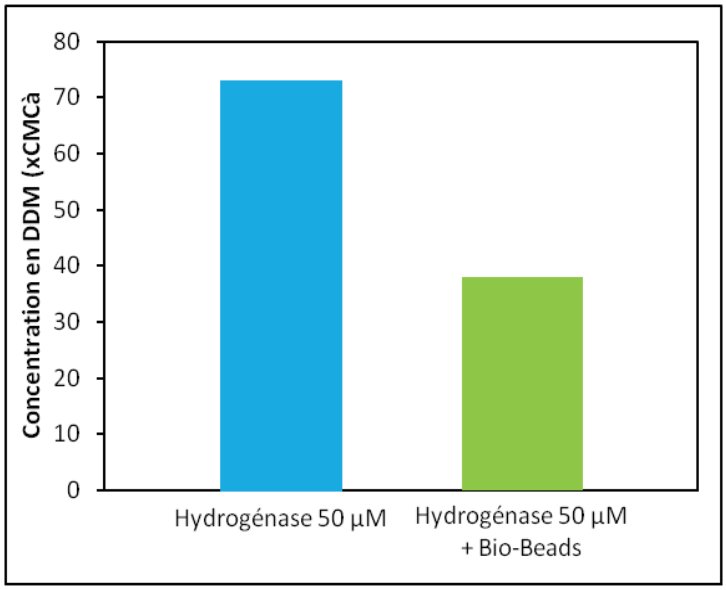


Figure 33 : Concentration en DDM mesurée dans des échantillons de 50 µM d'hydrogénase avant (bleu) et après (vert) le traitement par les Bio-Beads.

La quantité finale de DDM dans la solution d'hydrogénase est donc importante, et largement au dessus de la CMC. Il faut se placer à des concentrations en hydrogénase en dessous de 350 nM, pour que la concentration en DDM dans la solution d'enzyme diluée soit inférieure à la CMC. Ainsi, pour une concentration d'hydrogénase de 1 µM, classiquement utilisée en électrochimie, l'échantillon d'hydrogénase contient une concentration de DDM correspondant à 3 x CMC (1.5 x CMC avec traitement Bio-Beads). Ces résultats suggèrent fortement que des molécules de détergent restent intimement liées à l'enzyme.

3.3 Localisation du détergent sur l'enzyme

Si des molécules de détergent sont présentes sur l'hydrogénase, il est fort probable qu'elles soient en interaction avec les zones hydrophobes de l'enzyme. L'hélice transmembranaire ancrant l'enzyme dans la membrane est à ce titre la première cible du DDM. Cette hypothèse est appuyée par une comparaison avec la structure de la formiate déshydrogénase d'*Escherichia coli* qui présente une organisation très proche de celle de MbH1 comme montré précédemment. En effet une molécule de cardiolipine, un lipide présent

dans la membrane d'*Escherichia coli*, est retrouvée en interaction avec l'hélice transmembranaire de la formiate déshydrogénase (Figure 34) (Jormakka et al., 2002).

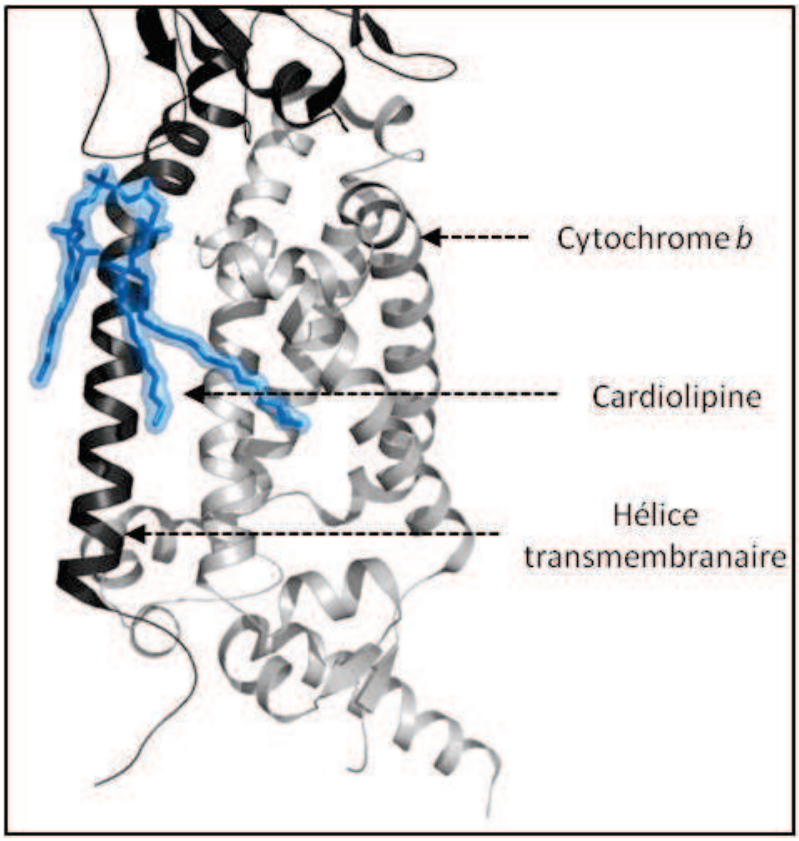


Figure 34 : Zoom sur la partie membranaire de la formiate déshydrogénase d'*Escherichia coli* composée d'un cytochrome *b* (gris) et de l'hélice transmembranaire (noir) provenant de la petite sous unité de l'enzyme. La molécule de cardiolipine est en interaction avec l'hélice (bleu).

Cette observation souligne le caractère hautement hydrophobe de l'hélice transmembranaire de la formiate déshydrogénase, et par analogie de celle de MbH1. Ainsi on peut supposer que le détergent présent dans les échantillons d'hydrogénase se fixe préférentiellement sur l'hélice transmembranaire. Cette hélice étant localisée à moins de 15 Å du centre [Fe-S] distal, et au vu de la quantité de DDM détectée dans nos échantillons, il est légitime de se demander dans quelle mesure la présence de DDM sur ce segment transmembranaire peut interférer avec le transfert d'électrons interfacial lorsque l'enzyme est immobilisée sur l'électrode.

3.4 Interaction DDM/SAM

Les détergents ont déjà été utilisés afin d'induire l'orientation de protéines telle que la myoglobine sur des électrodes de PG (Lee et al., 2010). Cependant, ce sont souvent des

enzymes solubles, orientées grâce à des interactions électrostatiques induites par l'utilisation de détergents ioniques. La structure que prend la couche de détergent elle-même à la surface de l'électrode reste également floue. Il a été montré qu'en fonction de la longueur de la chaîne alkyle du détergent (longueur qui détermine le diamètre du micelle), la couche de détergent passe d'une forme hémi-micellaire, pour les chaînes alcanes longues, à une simple couche de monomère pour les chaînes alkyles courtes (Grant et al., 1998).

Le DDM, molécule amphiphile, est *a priori* capable de s'adsorber sur l'électrode d'or modifiée par une SAM hydrophobe. L'étude de l'influence du DDM sur l'oxydation catalytique directe et médiée de l'H_2 par l'hydrogénase, suppose au préalable d'évaluer les interactions entre les SAMs et le détergent, puis d'étudier l'influence du DDM sur le comportement redox du bleu de méthylène. La concentration de DDM utilisée au cours de cette étude est de 5 x CMC, de l'ordre de grandeur de la quantité de DDM présente dans une solution d'hydrogénase à 1 µM.

Compte tenu des propriétés respectives des SAMs hydrophobes et du DDM, on pourrait s'attendre à ce que les chaînes hydrophobes du détergent viennent s'intercaler entre les chaînes alkyles de la SAM. Une étude par spectroscopie de surface PM-IRRAS a été menée, afin de comprendre la nature de l'interaction entre le DDM et la SAM hydrophobe. Pour ce faire, du DDM deuteré est utilisé, afin de discriminer les vibrations des groupements CH_2 provenant des chaines alkyles de la SAM de celles provenant des chaines alkyles deutérées du détergent.

Les surfaces d'or sont modifiées par les SAMs hydrophobes C_3CH_3 et C_7CH_3 avant d'être incubées dans un tampon Hepes 50 mM pH 6,8 contenant du DDM à la concentration de 5 x CMC pendant 2 heures. Les vibrations des bandes CD_2 attribuées au DDM apparaissent à 2180 cm^{-1} (ν_{as}) et 2100 cm^{-1} (ν_s). Les vibrations des groupements CH_2 de la SAM ne sont quasiment pas perturbées par rapport à celles décrites précédemment (Figure 35). De plus, une faible variation des intensités relatives des vibrations ν_{as} et ν_s des CH_3 est observée. Ainsi, l'insertion présupposée des chaînes alkyles du détergent à l'intérieur de la SAM n'a pas lieu. L'adsorption du DDM se produit uniquement en surface de la SAM induisant une modification de la vibration des CH_3.

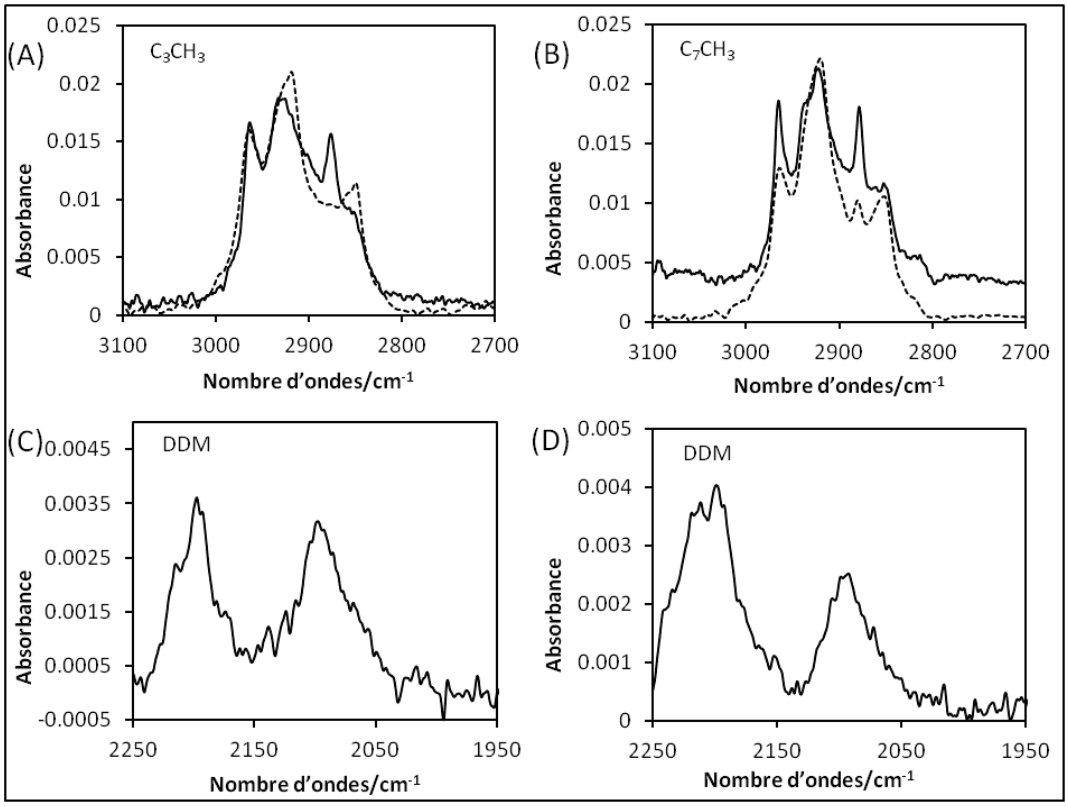


Figure 35 : (A) Spectres PM-IRRAS dans la zone de vibration des groupements CH_2 des SAMs C_3CH_3 (A) et C_7CH_3 (B) sans (noir pointillé) et avec DDM (noir continu). Spectre PM-IRRAS dans la zone de vibration des groupements CD_2 des SAMs C_3CH_3 (C) et C_7CH_3 (D) en présence de DDM 5 x CMC. Les spectres ont été enregistrés à température ambiante, 600 scans avec une résolution de 8 cm^{-1}.

3.5 Influence du DDM sur l'électrochimie du Bleu de méthylène sur SAM

L'influence de la couche de DDM présente en surface de la SAM sur le comportement électrochimique du BM est ensuite étudiée. Il est démontré que l'oxydoréduction du BM est contrôlée par un processus mixte d'adsorption/diffusion sur ce type de SAM hydrophobe. Lorsque l'électrode d'or modifiée par la SAM hydrophobe est incubée en présence de DDM, à une concentration inférieure à la CMC, aucune influence sur le comportement électrochimique du BM n'est observée. L'électrode d'or modifiée par la SAM hydrophobe est alors incubée dans une solution de DDM de concentration 5 x CMC dans les mêmes conditions que lors de l'étude spectroscopique PM-IRRAS. L'électrochimie du BM est comparée à une électrode identique qui n'a pas été exposée au détergent. Aucune influence de cette étape d'incubation sur le comportement redox du BM n'est enregistrée. L'intensité du pic d'oxydation du BM suit la même évolution en présence ou en absence de DDM adsorbé sur l'électrode (Figure 36). De la même manière lorsque la longueur de la chaîne alkyle de la

SAM augmente, le comportement du BM reste identique en absence ou en présence de DDM à la concentration de 5 x CMC.

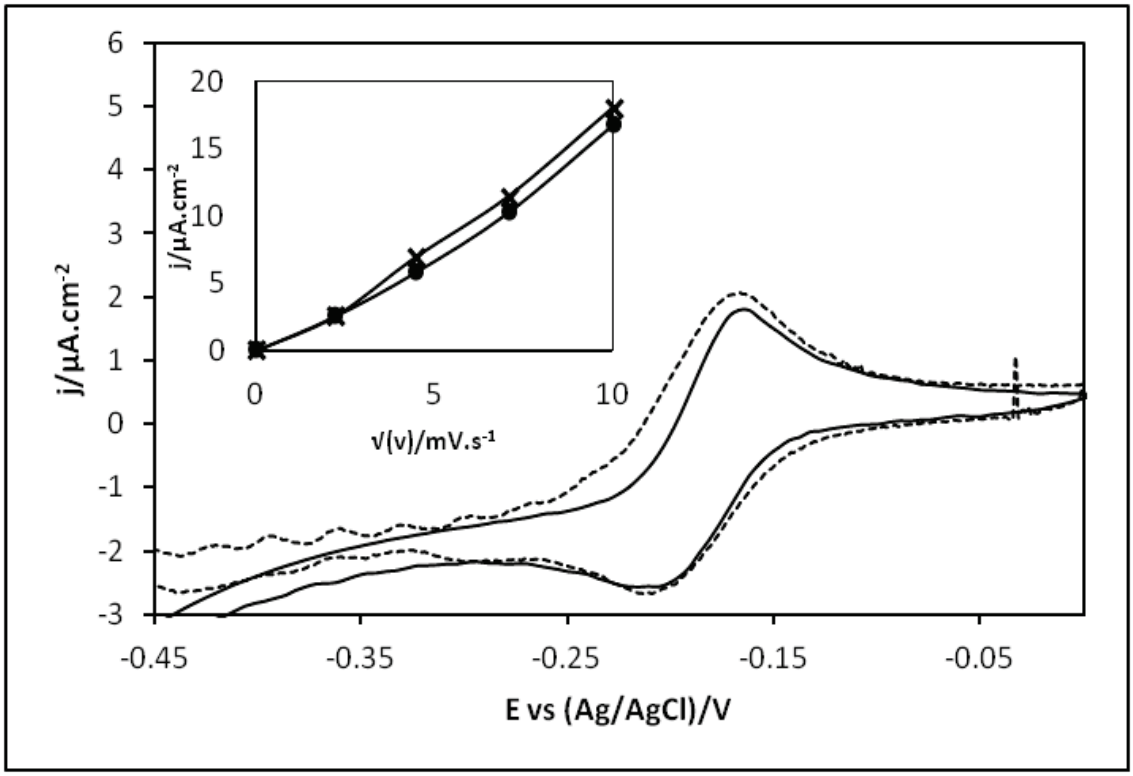


Figure 36 : CV du bleu de méthylène 10 µM sur électrode d'or modifiée par une SAM C_3CH_3 avec (noir continu) et sans préincubation dans une solution de DDM 5 x CMC (noir pointillé). L'insert représente l'évolution de l'intensité du pic d'oxydation du bleu de méthylène en fonction de la racine carrée de la vitesse de balayage avec (●) et sans (×) DDM 5 x CMC. Tampon Hepes 50 mM pH 6,8, 60°C, sous N_2, vitesse de balayage : 5 mV.s^{-1}.

Sur ces deux types de SAMs hydrophobes, le comportement électrochimique du BM n'est donc pas altéré en présence du détergent DDM, tout au moins pour des concentrations allant jusqu'à 5 fois la CMC. Pour rappel, la concentration d'hydrogénase utilisée dans les expériences d'électrochimie est de 1 µM, concentration pour laquelle une concentration maximale de 3 x CMC en DDM a été mesurée.

3.6 Influence du DDM sur la catalyse de l'oxydation de l'hydrogène

Afin de mieux comprendre dans quelle mesure le processus d'immobilisation de l'enzyme sur les SAMs hydrophobes peut être affecté par la présence de détergent, l'isotherme d'adsorption de MbH1 est reproduite sur la SAM hydrophobe C_3CH_3, mais en

présence de DDM exogène (Figure 37). Au lieu d'effectuer la dilution de l'hydrogénase dans du tampon, l'enzyme est diluée dans un tampon contenant du DDM à la concentration de 0,1 x CMC. En l'absence de DDM exogène lors de la dilution de l'enzyme, l'allure de l'isotherme est biphasique. Ce comportement peut être relié à la concentration en DDM dans l'échantillon dilué. En effet, lorsque l'hydrogénase est diluée en dessous de 350 nM dans du tampon sans DDM exogène, le DDM est présent dans l'échantillon en concentration inférieure à la CMC. Ces conditions peuvent favoriser l'agrégation des enzymes. Cet état d'agrégation n'est pas favorable à la catalyse de l'oxydation de l'hydrogène, et entraine la diminution du ratio J_{cat} /J_{BM}. L'addition de DDM exogène au tampon de dilution pour les concentrations en hydrogénase inferieures à 350 nM confirme cette hypothèse. Elle permet en effet de restaurer l'activité enzymatique d'oxydation de l'H_2 (Figure 37).

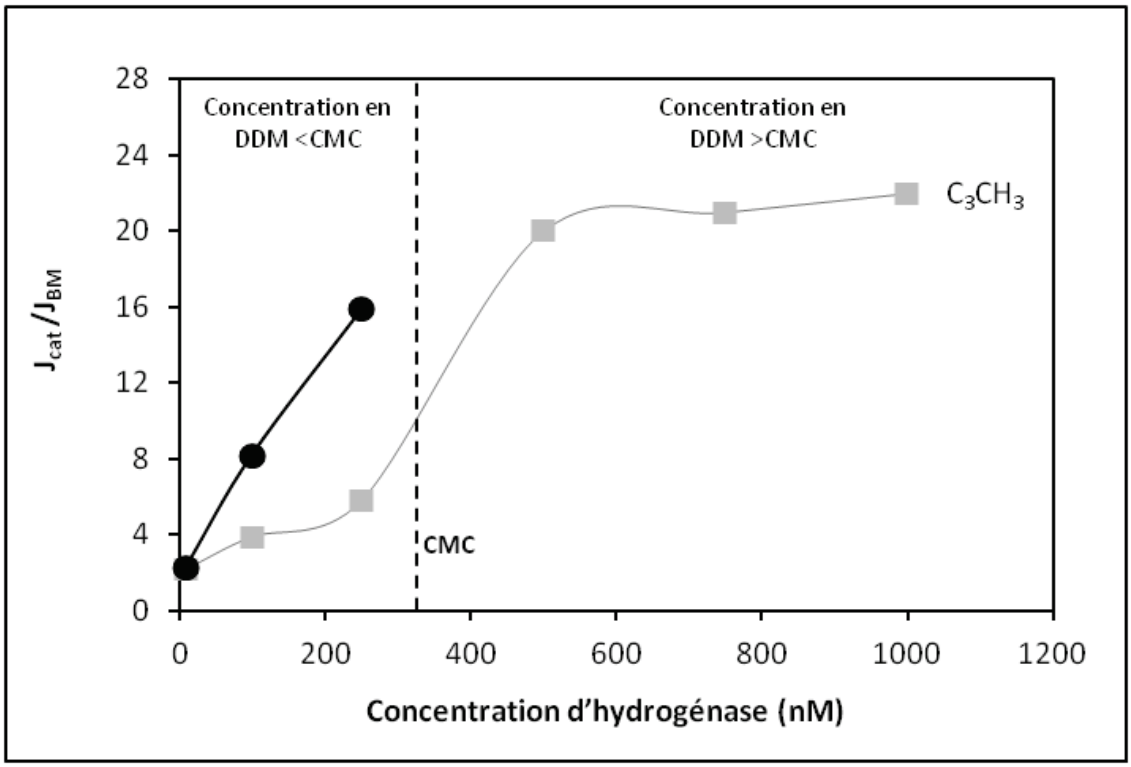


Figure 37 : Isothermes d'adsorption de l'hydrogénase sur les SAMs hydrophobes C_3CH_3 diluée avec (●) ou sans (■) DDM 0,1 x CMC. Le ratio (J_{cat} /J_{BM}) est représenté en fonction de la concentration en hydrogénase. La ligne verticale pointillée représente la concentration d'enzyme qui contient du DDM à la concentration de 1xCMC.

Ce phénomène de restauration de l'activité catalytique de l'hydrogénase peut avoir cependant deux origines : l'état conformationnel de l'enzyme en fonction de la quantité de DDM présente dans l'échantillon, ou la présence de molécules de détergent à la surface de la SAM favorisant l'adsorption de l'enzyme. Les expériences menées jusque là ne permettent

d'écarter aucune de ces deux hypothèses. Pour étudier l'interaction éventuelle de molécules de DDM en surface des SAMs avec l'hydrogénase adsorbée, l'adsorption de l'hydrogénase en présence de DDM deutéré exogène a été suivie par spectroscopie PM-IRRAS (Figure 38). Ces expériences sont réalisées dans les mêmes conditions que les expériences d'isotherme d'adsorption. Les bandes amides I et II sont toujours observées, révélant l'adsorption de l'hydrogénase. La position du maximum de la bande amide I (1661 cm^{-1}) est inchangée, indiquant que la structure secondaire de l'hydrogénase n'est pas modifiée.

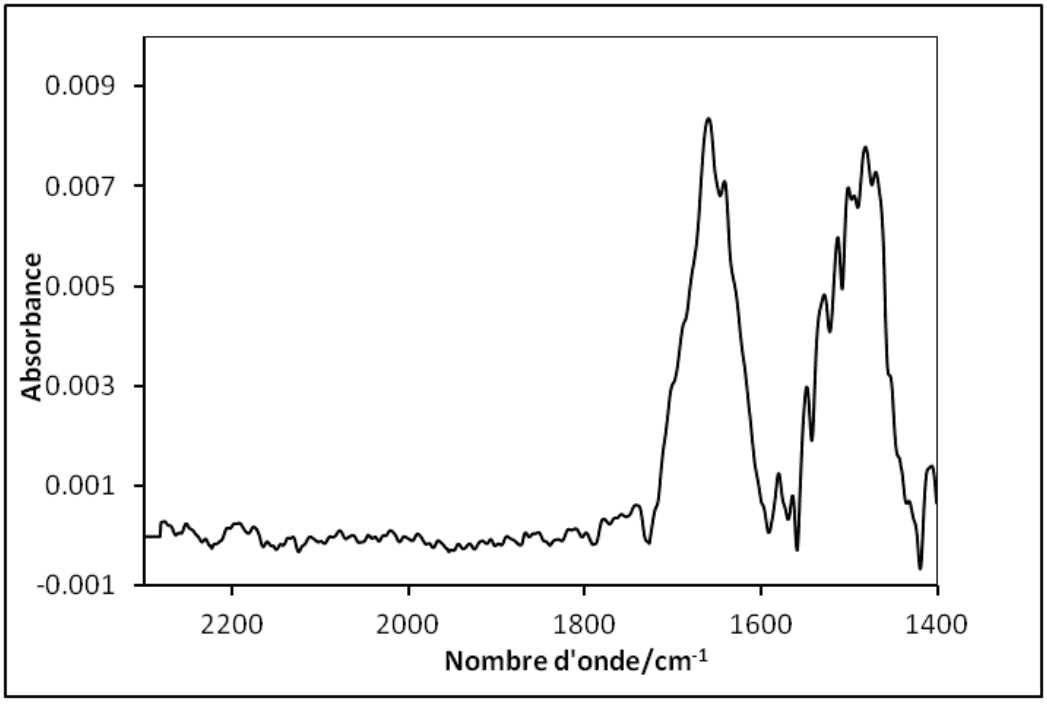


Figure 38 : Spectre PM-IRRAS de l'hydrogénase préincubée dans une solution de DDM deutéré 0,1 x CMC adsorbée sur une SAM hydrophobe C_7CH_3. Les spectres ont été enregistrés à température ambiante, 600 scans avec une résolution de 8 cm^{-1}.

Il est à noter, qu'aucun signal lié au DDM deuteré n'est observable dans la zone des groupements vibrationnels CD_2 à 2180 cm^{-1} (ν_{as}) et 2100 cm^{-1} (ν_s), montrant que l'enzyme a plus d'affinité que le détergent pour la SAM hydrophobe. Ainsi, la restauration de l'activité catalytique par addition de DDM, est plutôt attribuée à un phénomène de désagrégation des hydrogénases, agrégées lorsque la concentration en détergent est inférieure à la CMC. Des observations similaires ont été reportées pour le photosystème I, complexe membranaire, pour lequel il a été démontré des états d'agrégation variant en fonction de la concentration en détergent (Mukherjee et al., 2011). On peut supposer qu'en dessous de la CMC, les hydrogénases monomériques s'associent en oligomères inefficaces pour la catalyse, et que

l'addition de DDM exogène déplace l'équilibre vers la formation de formes monomériques catalytiquement efficaces.

3.7 Affinités relatives du DDM et de l'Hydrogénase MbH1 pour les SAMs hydrophobes

Des surfaces d'or modifiées par des SAMs hydrophobes (C_3CH_3 et C_7CH_3) sont ensuite préincubées dans des solutions de DDM à plus forte concentration (5 x CMC)[5] et étudiées par spectroscopie PM-IRRAS, afin de vérifier l'affinité respective du détergent et de l'enzyme pour la SAM. Les bandes caractéristiques du DDM apparaissent à 2180 cm^{-1} et 2100 cm^{-1}, indiquant la présence du DDM en surface de la SAM. L'hydrogénase est ensuite adsorbée sur ces SAMs hydrophobes. La signature des groupements amides (bandes amide I et II) de l'hydrogénase est présente, indiquant l'adsorption effective de l'enzyme à la surface de la SAM. Cependant, les bandes attribuées au DDM deutéré à 2180 cm^{-1} et 2100 cm^{-1} disparaissent (Figure 39).

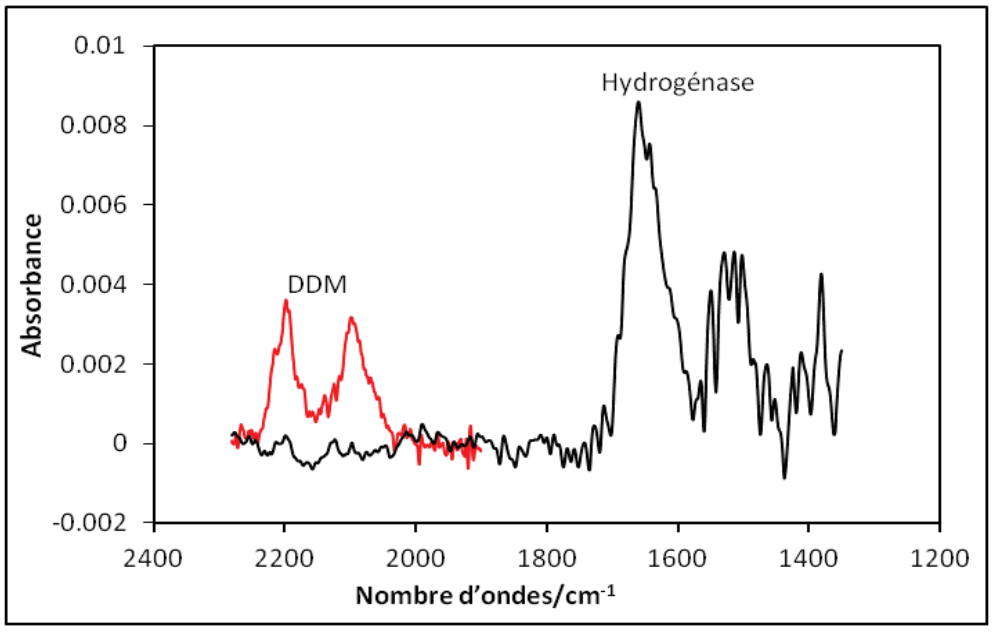


Figure 39 : Spectre PM-IRRAS dans la zone de vibration des groupements amide I et II correspondant à l'hydrogénase (noir) lorsqu'elle est adsorbée sur une SAM C_3CH_3 préincubée en présence de DDM à la concentration de 5 x CMC. Le spectre PM-IRRAS dans la zone de vibration des groupements CD_2 du DDM deutéré avant l'adsorption de l'enzyme est donné en rouge. Les spectres ont été enregistrés à température ambiante, 600 scans avec une résolution de 8 cm^{-1}.

[5] Ce sont les mêmes surfaces d'or qui ont servi à produire la figure 34

Les données expérimentales accumulées permettent de déduire que l'hydrogénase présente une grande affinité pour la surface de l'électrode hydrophobe. L'hydrogénase est également capable de « déplacer » le détergent exogène adsorbée sur l'électrode. Elle a donc bien plus d'affinité pour la SAM hydrophobe que le DDM lui-même.

3.8 Conclusion

Quel est donc l'influence du DDM sur le transfert d'électrons interfacial entre l'hydrogénase et l'électrode ? De manière claire, et quelque peu attendue pour une protéine membranaire, le détergent est nécessaire afin d'éviter son agrégation. Il est cependant démontré que l'enzyme présente une forte affinité pour la surface hydrophobe, et qu'elle est capable de déplacer le DDM adsorbé sur l'interface électrochimique. A partir du moment où il y a suffisamment de détergent pour maintenir l'enzyme sous forme non agrégée (concentration en DDM aux alentours de la CMC), l'enzyme est active vis-à-vis de l'oxydation de l'H_2. Le DDM ajouté de manière exogène sur les électrodes n'induit pas d'orientation spécifique de l'enzyme, comme rapporté dans certaines études (Guto et al., 2006). Il n'inhibe pas non plus l'activité électrocatalytique. Il est cependant difficile de concevoir que le détergent « naturellement » lié à l'enzyme ne joue aucun rôle dans l'orientation, dans la mesure où il se situe sur l'hélice transmembranaire, elle-même très proche du centre [Fe-S] distal, point de sortie des électrons de l'hydrogénase.

4. PEUT-ON LIER LA SPÉCIFICITE DU TRANSFERT D'ÉLECTRON À UNE ORIENTATION SPÉCIFIQUE ?

L'étude électrochimique a montré que le processus d'oxydation de l'H_2 par MbH1 immobilisée sur des SAMs était dépendant de l'hydrophobicité de la surface, mais indépendant de la charge. Un processus TED et TEM est observé sur SAMs chargées alors qu'un processus TEM est favorisé sur SAMs hydrophobes. La question est maintenant de savoir si cette spécificité peut être reliée à une orientation particulière sur les SAMs hydrophobes par rapport aux SAMs chargées.

4.1 Visualisation de la couche d'enzyme sur SAMs

Un préalable pour que les processus d'oxydation TED et TEM puissent être reliés à une orientation spécifique à l'électrode, est que seule une monocouche d'enzyme travaille à

l'interface. Une multicouche d'enzymes engendrerait effectivement un courant médié pour la catalyse d'oxydation de l'H_2 lié à l'activité des enzymes les plus éloignées de l'interface. Nos conditions de modification des SAMs conduisent à l'obtention d'une monocouche de cytochrome *c*. Dans ce cas, l'obtention d'un signal électrochimique lié à la protéine immobilisée sur une SAM chargée négativement permet la quantification de la concentration surfacique en protéine. Une concentration surfacique de 18 pmol/cm^2 est mesurée, très proche des valeurs rapportées dans la littérature (Clark et al., 1997). Puisque dans le cas de l'hydrogénase, il est impossible d'avoir accès à la concentration surfacique de l'enzyme *via* l'électrochimie (rappelons qu'aucun signal non catalytique n'est détecté), l'évaluation de la couverture de la SAM a été faite par microscopie à force atomique (Collaboration avec A.Ronda, IM2NP ,Marseille). MbH1 est immobilisée sur SAM hydrophobe C_3CH_3. La SAM est formée sur des substrats d'or utilisables en AFM, mais dont la surface est semblable à la surface des électrodes d'or. D'après les images topographiques, une distribution homogène de particules sphériques est observée sur toute la surface. La hauteur moyenne des particules est de 3 nm et la largeur de 30 nm (Figures 40 A, B et C). Les dimensions de l'enzyme étant estimées à 10 nm de long, en incluant l'hélice et 5 nm de large, ces observations suggèrent la formation d'une monocouche d'hydrogénase. Notons que ces images sont comparables aux clichés de microscopie à force atomique obtenus lors de l'immobilisation de l'hydrogénase soluble de *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough par Gutierrez *et al.*. Des sphères de l'ordre de 5 nm de hauteur étaient également visualisées, et attribuées à une monocouche d'enzyme sur le substrat d'or modifié (Gutierrez-Sanchez et al., 2011). La comparaison entre l'immobilisation de l'enzyme sur le substrat d'or utilisé en AFM et l'électrode a été validée en testant l'activité d'oxydation électrochimique de l'H_2 par l'hydrogénase immobilisée sur le substrat d'or modifié par la SAM hydrophobe. L'oxydation électrocatalytique de l'hydrogène par MbH1 procède *via* un processus médié sans détection d'un transfert d'électrons direct, en accord avec les données obtenues sur nos électrodes d'or millimétriques (Figure 40 D).

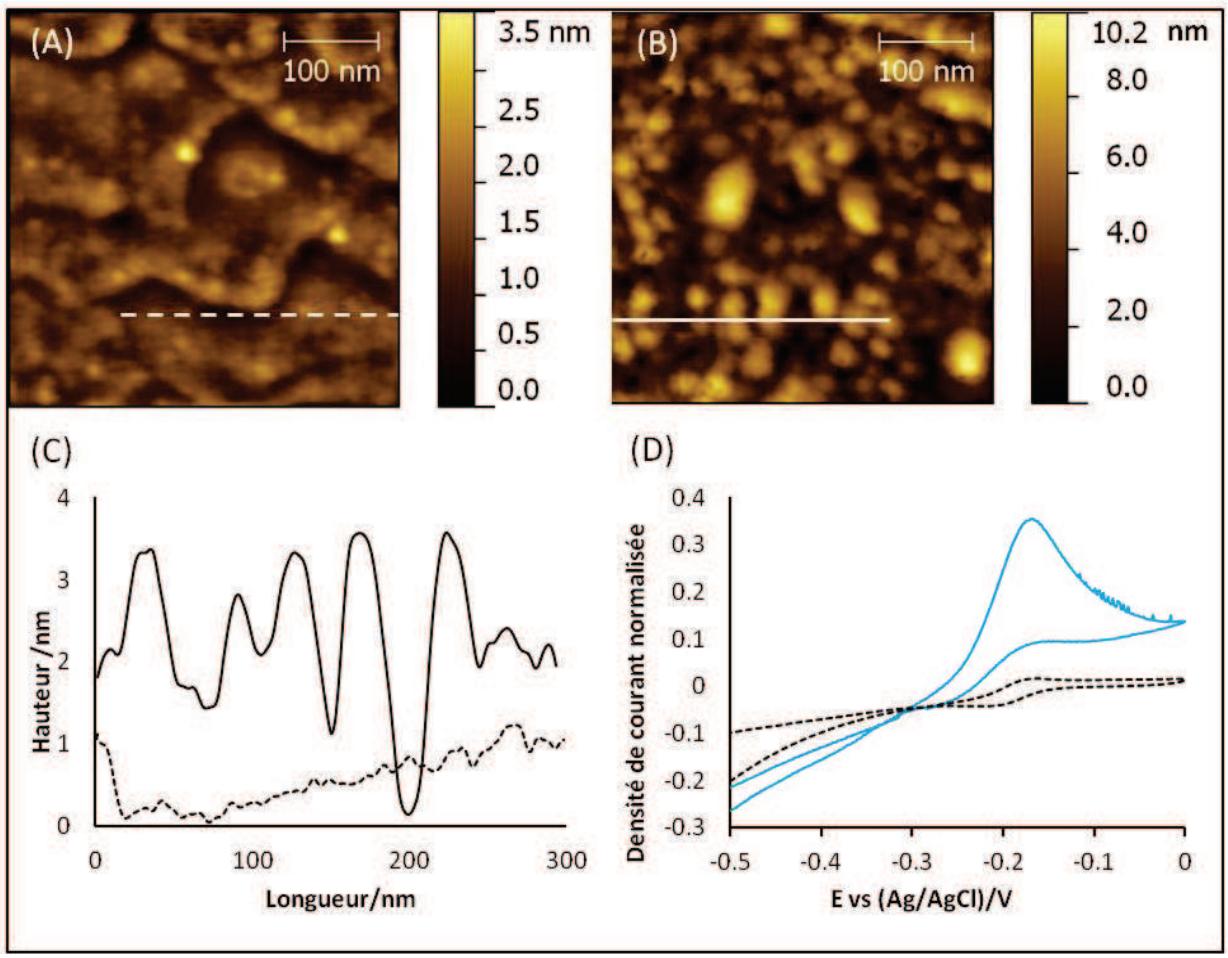


Figure 40 : Images topographiques obtenues par microscopie à force atomique en mode non-contact d'un substrat d'or modifié par une SAM hydrophobe C_3CH_3 avant (A) et après (B) l'adsorption de MbH1. (C) Profil topographique de l'axe z (perpendiculaire au plan de l'image) le long des lignes blanches en pointillé de la figure (A) et continue de la figure (B) représenté respectivement par les lignes noires pointillées et continues. (D) CV de l'oxydation électrocatalytique de l'hydrogène par l'hydrogénase d'*Aa* immobilisée sur la plaque d'or utilisée pour produire l'image de la figure (B) (ligne bleue), le signal du bleu de méthylène est représenté en pointillés noirs. Tampon Hepes 50 mM pH 6,8, 60°C, sous H_2, vitesse de balayage : 5 mV.s^{-1}.

Les mesures AFM couplées à l'activité électrocatalytique confirment que le processus médié de l'oxydation de l'H_2 sur les surfaces hydrophobes n'est pas lié à la présence d'une multicouche d'enzymes, mais plus vraisemblablement à une monocouche d'enzymes dans une orientation spécifique, qu'il s'agit maintenant de déterminer.

4.2 Mise en évidence d'une orientation spécifique

*4.2.1 Structure secondaire de l'hydrogénase [Ni-Fe] d'*Aquifex aeolicus

Au cours de ce mémoire, j'ai montré que la spectroscopie infrarouge PM-IRRAS permet de caractériser les groupements chimiques adsorbés sur une surface. Mais elle permet aussi de déterminer l'orientation des molécules sur cette surface. L'apparition des signaux des bandes amides I (1661 cm^{-1}) et II (1545 cm^{-1}) de l'hydrogénase lorsqu'elle est adsorbée sur un substrat d'or modifiée par des SAMs est observé. La position des bandes amide indique que la structure secondaire de l'hydrogénase est principalement constituée d'hélice-α. Ces observations sont cohérentes avec les structures des trois homologues structuraux connus de MbH1 qui sont constitués à plus de 40 % d'hélice-α et à 15 % de feuillets β. La majeure partie de ces hélices est d'ailleurs regroupée en un faisceau de quatre longues hélices qui forment la structure principale de la grande sous unité (Figure 41).



Figure 41 : Modélisation de MbH1, la petite sous unité est représentée en noir et la grande sous unité en rouge. Les hélices-α sont représentées sous forme de cylindre. La flèche grise représente l'orientation moyenne des hélices-α de l'hydrogénase.

4.2.2 Influence du caractère physico-chimique de la SAM sur l'orientation

Le spectre ATR-FTIR de l'hydrogénase en solution est présenté Figure 42. La position de la bande amide I (1651 cm^{-1}) confirme que la structure secondaire de l'hydrogénase est essentiellement sous forme d'hélice α .

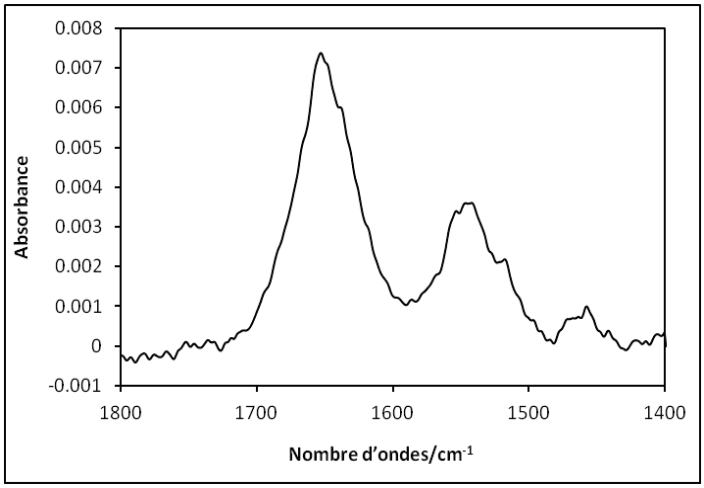


Figure 42 : Spectre ATR-FTIR (cristal de Germanium) dans la zone de vibration des groupements amide I et II correspondant à l'hydrogénase en solution.

De plus, la forme du signal obtenu par spectroscopie PM-IRRAS de la bande amide I de l'hydrogénase adsorbée sur les SAMs hydrophiles (C_nCOOH)[6] et hydrophobes (C_nCH_3) (avec n variant de 2 à 11 pour les SAMs hydrophiles et de 3 à 11 pour les SAMs hydrophobes) est identique à celle obtenue pour l'hydrogénase en solution sur un cristal de Germanium par spectroscopie ATR-FTIR (Figure 43). La structure secondaire de l'enzyme n'est donc pas significativement modifiée lorsqu'elle est adsorbée sur la SAM, qu'elle soit hydrophile, chargée négativement (C_nCOOH) ou hydrophobe (C_nCH_3).

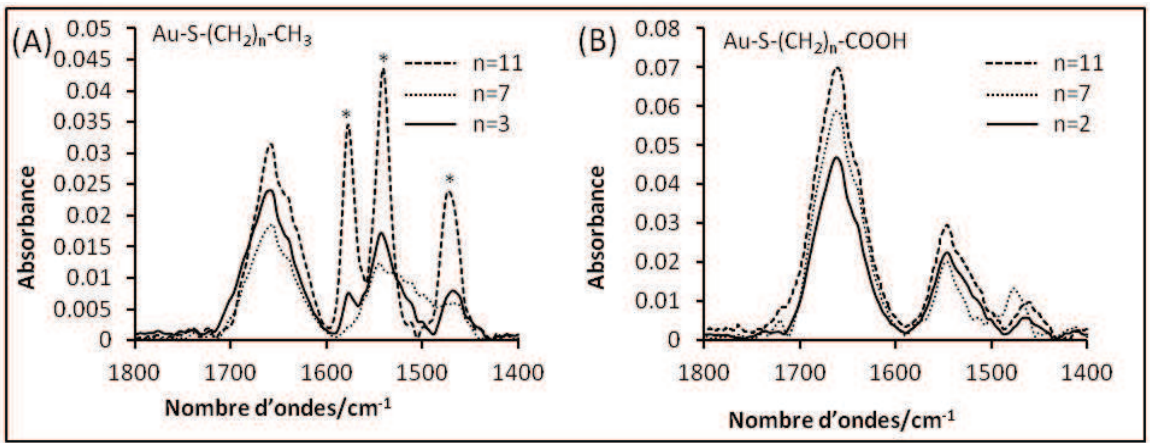


Figure 43 : Spectres PM-IRRAS dans la zone de vibration des groupements amide I et II correspondant à l'hydrogénase lorsqu'elle est adsorbée sur des SAMs hydrophobes (A) ou hydrophiles (B) de longueur de chaîne alkyl croissante. (*) Bandes additionnelles à la bande amide II pouvant être attribuées à du CO_3 ou HCO_3.

[6] J'ai choisi de faire l'étude sur les SAMs chargées négativement, qui permettent la modulation de la longueur, contrairement aux SAMs chargées positivement

Cependant le ratio des aires correspondant aux bandes amide I et amide II est différent selon le type de surface sur laquelle l'hydrogénase est adsorbée. Ce ratio est un indicateur de l'orientation des structures secondaires sur la surface, et par extension de l'orientation de l'enzyme (Fezoua-Boubegtiten et al., 2010). Le ratio des aires des bandes amide I/amide II est égal à 4 pour les SAMs hydrophobes, tandis qu'il est égal à 6.5 pour les SAMs hydrophiles. Les hydrogénases s'orientent donc de manière différente selon le type de surface sur laquelle elles sont adsorbées.

L'orientation des hélices-α de MbH1 peut être déterminée en se basant sur des modèles simulés d'orientation (Fezoua-Boubegtiten et al., 2010), et en posant les conditions suivantes : (i) tous les groupes amide font partie d'une structure secondaire de type hélice-α (ce qui est le cas pour la majorité des amides de l'hydrogénase) et (ii) toutes les hélices sont orientées avec le même angle par rapport à la normale de la surface d'or (ce qui est également le cas pour l'hydrogénase, où la majorité des hélices sont orientées dans le même sens). L'angle des hélices-α de l'hydrogénase par rapport à la normale de la surface du substrat d'or est ainsi estimé à 25° sur les SAMs hydrophiles et à 40° sur les SAMs hydrophobes (Figure 44).

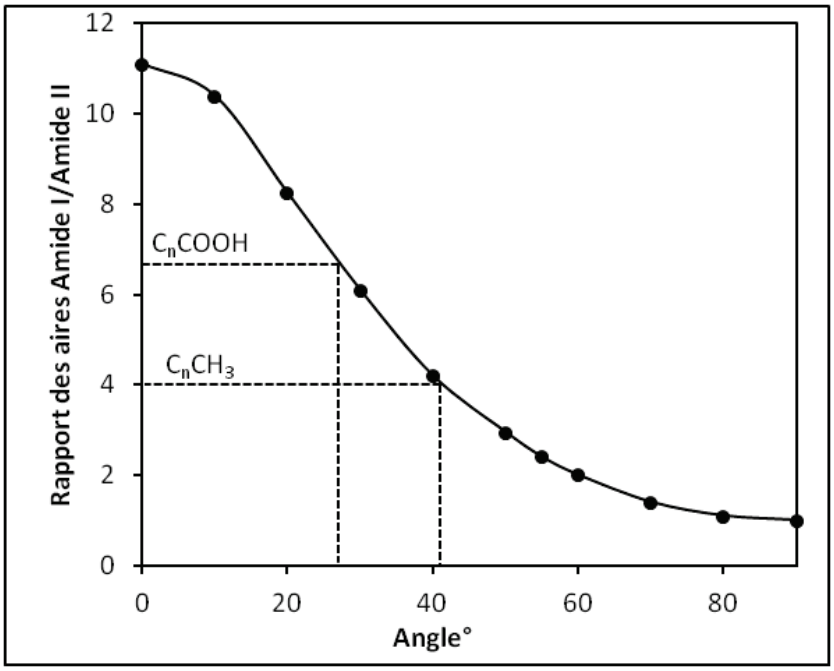


Figure 44 : Relation du rapport des aires amide I/amide II en fonction de l'angle des structures secondaires hélices-α par rapport à la normale à la surface (reproduit de (Fezoua-Boubegtiten et al., 2010)).

4.3 Conclusion

En mettant en relation ces données spectroscopiques avec les données électrochimiques, il est proposé que l'observation d'un courant catalytique exclusivement médié sur SAM hydrophobe, en comparaison avec un processus mixte de TED et de TEM sur SAM hydrophile et/ou chargée, provienne d'une différence dans l'orientation de l'hydrogénase en fonction de l'hydrophobicité de la surface. L'angle de 25 °déterminé pour les hélices-α des hydrogénases adsorbées sur une surface hydrophile résulterait d'une moyenne des orientations multiples prises par les enzymes, tandis que l'angle de 40 ° déterminé pour les SAMs hydrophobes serait lié à une orientation préférentielle de l'hydrogénase, dans laquelle le centre [Fe-S] distal se retrouve à une distance de l'interface incompatible avec un transfert électronique direct.

5. MODÈLE PROPOSÉ

J'ai démontré grâce à une combinaison de plusieurs approches expérimentales, l'électrochimie, la spectroscopie PM-IRRAS, la microscopie à force atomique, sans oublier la biochimie structurale, que le principal facteur gouvernant l'orientation de l'hydrogénase membranaire d'*Aquifex aeolicus* sur l'électrode est l'hydrophobicité. Les surfaces hydrophiles n'induisent aucune orientation préférentielle, alors que les surfaces hydrophobes induisent une orientation spécifique incompatible avec un transfert direct des électrons.

J'ai également montré que contrairement aux hydrogénases solubles de l'espèce *Desulfovibrio*, qui portent un patch de résidus acides chargés négativement autour de leur centre [Fe-S] distal, l'hydrogénase membranaire d'*Aquifex aeolicus* dispose dans cette région d'une zone plutôt hydrophobe cohérente avec sa position membranaire. Ainsi, les hydrogénases solubles de l'espèce *Desulfovibrio* oxydent l'H_2 exclusivement *via* un processus direct sur électrodes chargées positivement et *via* un processus médié sur électrodes chargées négativement. En revanche, il n'est pas possible d'orienter spécifiquement l'hydrogénase d'*Aquifex aeolicus* en utilisant une électrode chargée positivement ou négativement. L'immobilisation n'est pas contrôlée par les interactions électrostatiques. J'ai mis en évidence la présence d'une hélice transmembranaire, à une distance du centre [Fe-S] distal inférieure à 15 Å. Nos expériences de quantification de DDM suggèrent très fortement que cette hélice est

entourée de détergent. Le DDM se fixe par sa queue hydrophobe sur l'hélice transmembranaire et expose sa tête maltoside hydrophile au solvant (Figure 45).

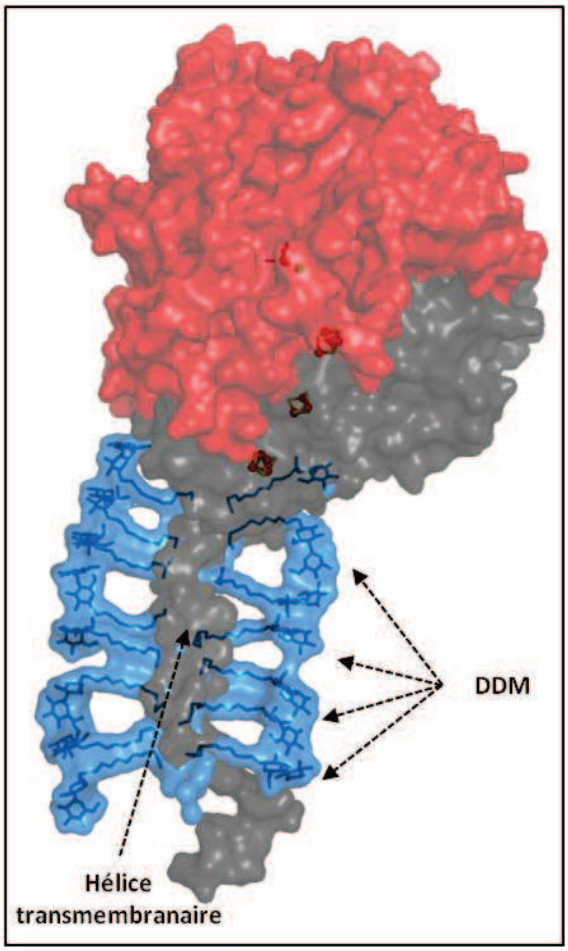


Figure 45 : Représentation de l'hélice transmembranaire de MbH1 entourée par des molécules de détergent DDM (bleu).

Ainsi, en l'absence de charges autour du centre [Fe-S] distal, la composante majeure pouvant guider une interaction est de type hydrophile, générée par la « bouée » de DDM entourant l'hélice transmembranaire. Le scénario suivant est proposé: lorsque l'hydrogénase s'approche d'une surface hydrophobe, l'hélice rendue hydrophile par le DDM n'a aucune affinité pour la surface. La région autour de cette hélice, qui comprend le centre [Fe-S] distal est rejetée loin de la surface. Il s'en suit une orientation de l'hydrogénase immobilisée pour laquelle le centre [Fe-S] distal est à une distance telle de l'électrode que la vitesse du transfert d'électrons par effet tunnel est trop lente pour permettre l'oxydation directe de l'H_2 (Figure 46).

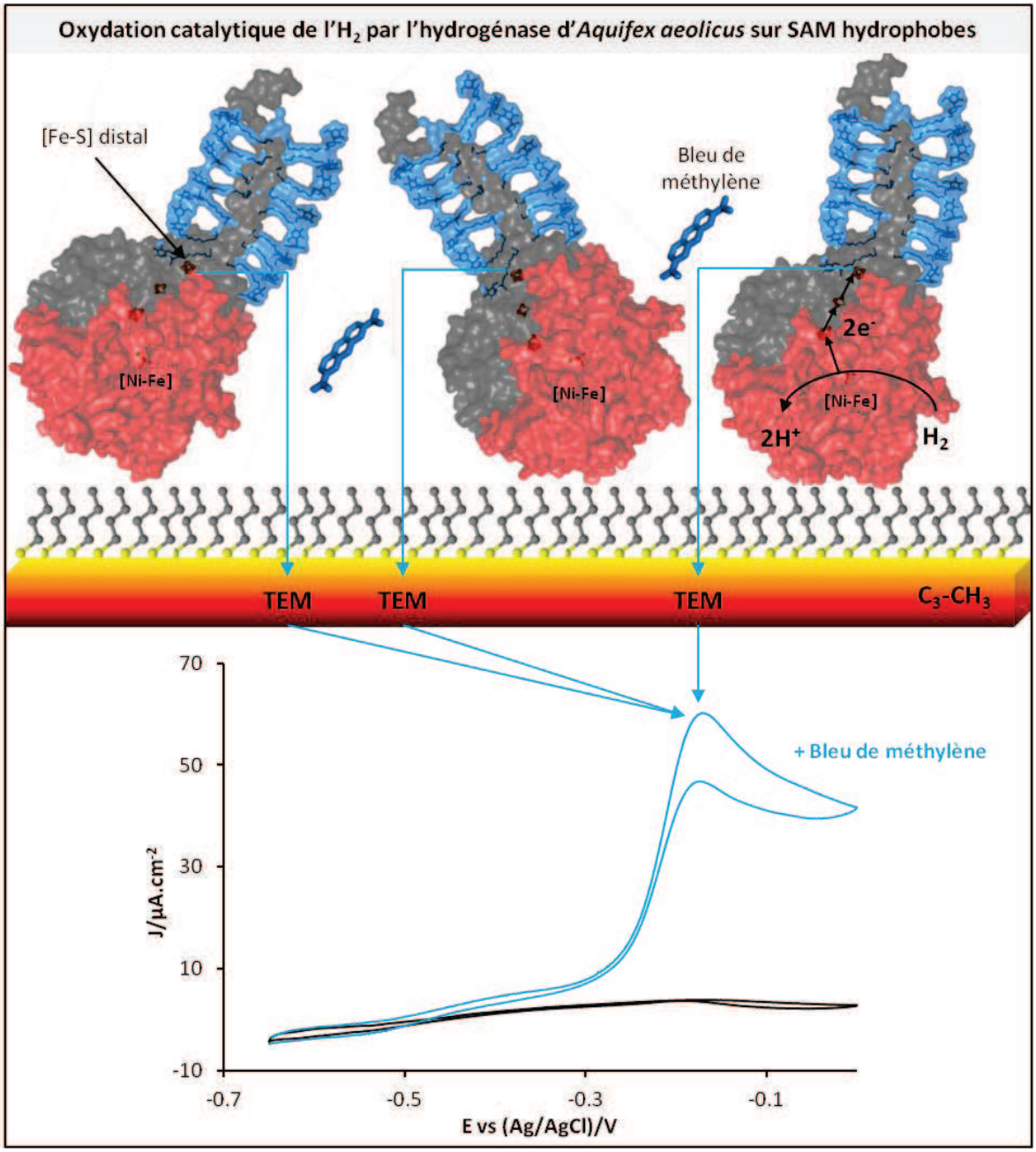


Figure 46 : Modèle d'orientation proposée pour l'oxydation de l'hydrogène par MbH1 sur SAM hydrophobe. Le transfert d'électrons médié par le bleu de méthylène est représenté par les flèches bleues. Le voltamogramme caractéristique d'une orientation spécifique de l'hydrogénase est associé au modèle.

En revanche, lorsque l'hydrogénase s'approche d'une surface hydrophile, aucune interaction forte ne contrôle l'immobilisation, et l'hydrogénase adopte une multitude d'orientations, sans orientation spécifique (Figure 47). L'oxydation de l'H_2 peut alors se faire à la fois *via* un processus direct par la population d'enzymes dont le centre [Fe-S] distal est à distance tunnel de l'interface, et *via* un processus médié par la population d'enzymes non directement connectée.

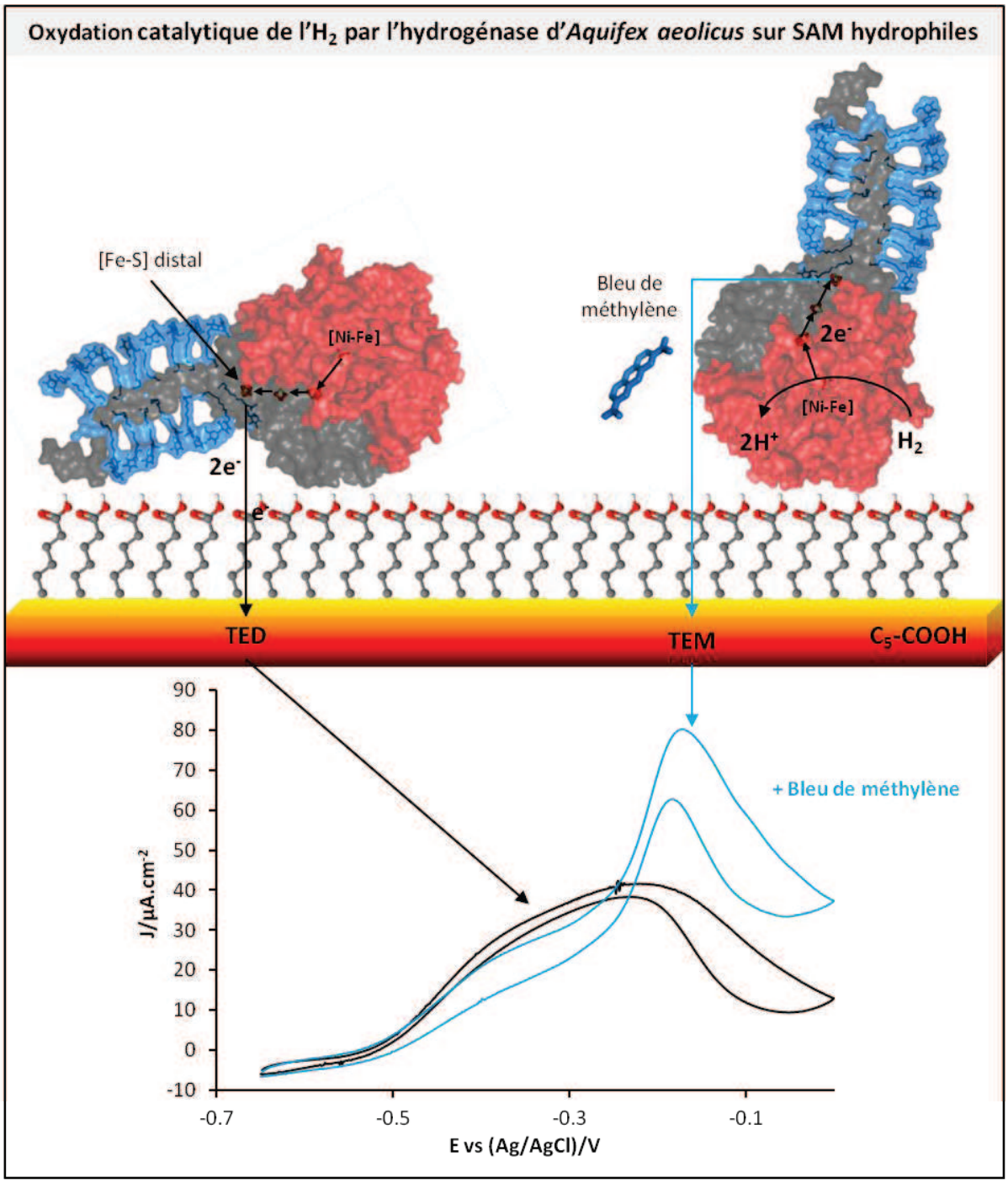


Figure 47: Modèle d'orientation proposée pour l'oxydation de l'hydrogène par MbH1 sur SAM hydrophile. Le transfert d'électrons direct est représenté par les flèches noires et le transfert d'électrons médié par le bleu de méthylène est représenté par les flèches bleues. Les voltamogrammes caractéristiques de l'orientation de l'hydrogénase sont associés au modèle.

Résultats et discussions

Chapitre III : Vers une Biopile H_2/O_2

Résultats et discussions

Chapitre III : Vers une Biopile H_2/O_2

1. INTRODUCTION GÉNÉRALE

Face à l'accroissement de la demande énergétique mondiale, à l'épuisement des réserves de combustibles fossiles et à la nécessité de réduire les émissions de gaz à effet de serre, une transition énergétique s'avère indispensable. Certains engagements politiques significatifs traduisent depuis plus d'une décennie cette prise de conscience : (i) le Protocole de Kyoto; (ii) l'engagement de l'Europe qui a adopté en 2008 le paquet « climat-énergie »; (iii) et celui de la France cadré par la Loi-programme d'Orientation de la Politique Energétique introduisant dans le paysage français la notion de « Facteur 4 » (augmentation de la production d'électricité de 520 MW fin 2012 à 2 300 MW fin 2020).

Cette transition nécessitera (i) la diversification du bouquet énergétique, (ii) l'amélioration de l'efficacité énergétique et (iii) des transformations de la législation, des comportements et des usages. Avec un rendement énergétique élevé et un fonctionnement qui ne rejette que de l'eau, les piles à combustibles (PACs) s'inscrivent dans un objectif de développement durable où l'hydrogène prendra une place prépondérante par rapport aux énergies fossiles. De plus, de nouveaux marchés en expansion, dont les applications portables et autonomes, peuvent être aujourd'hui couverts par les PACs (Figure 1). Ces marchés seront déterminés par la réduction du coût du kW, grâce à la simplification du système d'alimentation en H_2.

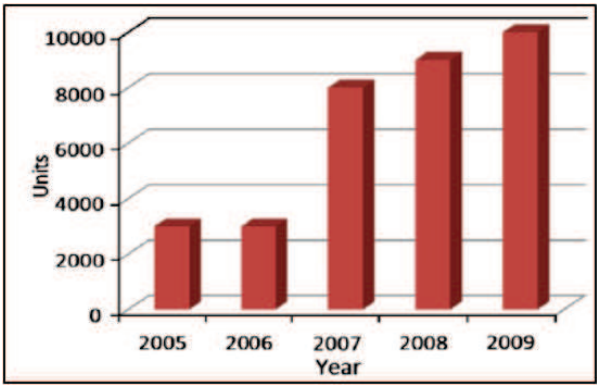


Figure 1 : Evolution de la commercialisation des PACs PEM en applications Portable (Wang et al., 2011)

L'oxydation de l'H_2 et la réduction de l'O_2 nécessitent l'emploi de catalyseurs au sein de la PAC. Le platine reste le catalyseur chimique le plus efficace. Même si les charges en quantité de platine ont bien diminué, la nécessité du remplacement du platine est motivée par sa disponibilité à terme, sa biodégradabilité, et la nécessité d'utiliser de l'hydrogène pur.

L'utilisation d'un biocatalyseur répond à ces différents critères. L'enjeu réside dans la réalisation totalement innovante d'une bioPAC verte à H_2 et O_2, utilisant par exemple la biomasse pour produire l'hydrogène, et dont la puissance et la taille seront compatibles avec une utilisation comme source d'énergie autonome (capteurs environnementaux associés à la production de l'hydrogène vert) ou nomade (ordinateur, téléphone, jouets, système de communication militaire,…). L'ouverture vers des carburants comme l'H_2 vise à étendre le champ d'application des biopiles classiques qui utilisent majoritairement le glucose comme combustible. Compte tenu des potentiels mis en jeu, l'utilisation de l'enzyme hydrogénase, biocatalyseur spécifique et très efficace de l'oxydation de l'H_2, doit permettre d'atteindre des différences de potentiel de pile de l'ordre de 1V. L'hydrogénase extraite d'*Aquifex aeolicus* est une candidate sérieuse dans la mesure où elle présente une tolérance à O_2 et au CO.

De nombreux verrous doivent cependant encore être levés avant qu'une telle pile puisse être crédible. Le premier concerne la stabilité de la bioélectrode, qui inclut la stabilité de l'enzyme et celle de film protéique à l'électrode. Si les enzymes sont les moteurs énergétiques des microorganismes, leur isolement comme source d'énergie exogène n'est pas trivial. Le second concerne l'augmentation des densités de courant biocatalytiques, et donc des densités de puissance futures. Au cours du premier chapitre, les paramètres qui contrôlent l'immobilisation de l'hydrogénase sur électrodes ont été examinés. Ces travaux impliquent une monocouche d'enzymes, soit environ 5 pmol/cm^2. Un calcul rapide montre que si toutes les enzymes étaient bien orientées sur l'électrode, avec un turn over de 1000s^{-1}, la densité de puissance maximale serait de l'ordre de 500µW/cm^2. En fonction des applications visées, il sera donc nécessaire de rechercher des matrices aptes à augmenter la quantité d'enzymes sans que les surfaces nécessaires ne soient rédhibitoires.

Dans ce chapitre, ces verrous vont être étudiés dans le cas de l'hydrogénase extraite d'*Aquifex aeolicus*. Dans une première partie, j'étudierai la stabilité de l'enzyme, en particulier en fonction de la concentration en détergent. En tirant profit des paramètres définis au cours du premier chapitre, des matrices permettant d'augmenter les densités de courant et la stabilité des films protéiques seront ensuite développées. Enfin, en couplant cette bioanode

optimisée avec une biocathode basée sur une protéine à cuivre pour la réduction de l'oxygène, une biopile H_2/O_2 sera architecturée et ses performances étudiées.

2. STABILITÉ DE L'HYDROGÉNASE : INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN DÉTERGENT

Un des verrous à lever si l'on veut développer des procédés biotechnologiques basés sur des enzymes, est la stabilité de l'enzyme elle-même. Il est admis qu'une enzyme extraite de son environnement cellulaire n'est pas stable sur le long terme. Des stratégies de confinement, ou d'intégration dans des environnements proches des conditions physiologiques, peuvent améliorer cette stabilité. Au cours de ce travail, je n'ai pas abordé de façon exhaustive cet aspect du fonctionnement enzymatique. Néanmoins, l'utilisation d'une enzyme membranaire, solubilisée par des détergents, m'a conduit à examiner l'influence de la concentration en détergent sur la stabilité dans le temps de la protéine.

Cette étude est réalisée en examinant l'oxydation de l'H_2 par l'hydrogénase MbH1 adsorbée sur électrode de graphite. L'échantillon d'hydrogénase utilisé est fraîchement purifié, et est traitée par des Bio-Beads avant l'étape finale de concentration. De cette manière, à concentration équivalente, l'hydrogénase préparée contient 30 fois moins de DDM, que l'hydrogénase utilisée précédemment. Ainsi lorsque cet échantillon d'hydrogénase est dilué à 1µM, il contient du DDM à la concentration 0,1 x CMC.

2.1 Isotherme d'adsorption de l'hydrogénase d'*Aquifex aeolicus* sur électrode de graphite pyrolytique

L'isotherme d'adsorption sur électrode de PG décrite (Chap.2 §1.2.1 Figure 2) est répétée en diluant dans un premier temps l'enzyme fraîchement purifiée dans un tampon contenant du DDM dans une gamme de concentration comprise entre 0,1 x CMC et 2 x CMC. Très peu de différences sont observées entre les deux protocoles (Figure 2). Ce résultat n'est pas surprenant pour une addition de DDM à 0,1 x CMC. En effet, dans la gamme de concentration d'hydrogénase testée, la concentration en DDM est systématiquement en dessous de la CMC (au maximum 0,4 x CMC pour l'hydrogénase à 4 µM). L'addition de DDM exogène à 0,1 x CMC ne permet donc pas de passer au dessus de la CMC, ni d'induire des changements dans les états d'agrégation éventuels de l'enzyme. Il est plus surprenant qu'aucune variation de l'activité catalytique ne soit observée lorsque la concentration en

DDM exogène est supérieure à la CMC. Il faut supposer que les effets d'agrégation de l'enzyme observés précédemment (Chap.2 §3.6 Figure 36) sont minimisés avec une hydrogénase fraîchement purifiée.

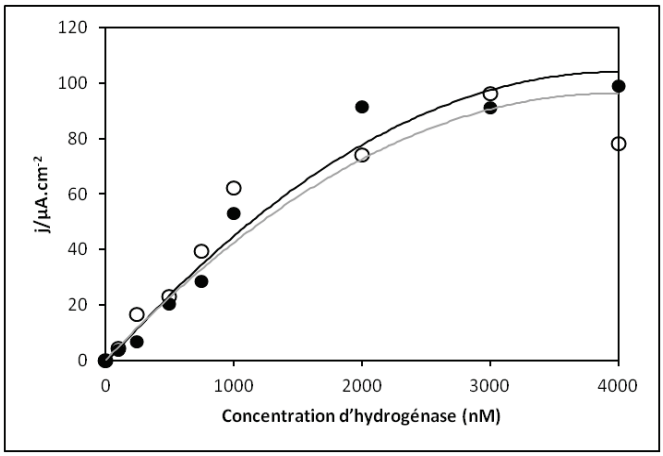


Figure 2 : Isotherme d'adsorption de l'hydrogénase sur électrode de PG diluée avec (○) ou sans (●) dans la gamme 0.1 – 2 x CMC DDM. La densité de courant catalytique direct est représentée en fonction de la concentration en hydrogénase.

2.2 Restauration de l'activité catalytique par l'addition de DDM exogène

Une semaine après la purification, le courant de catalyse de l'hydrogène par le même échantillon d'hydrogénase, est néanmoins diminué d'un facteur 2, malgré une conservation de l'enzyme à -20°C. La restauration éventuelle de l'activité enzymatique a été suivie en modifiant l'électrode de PG par des films de DDM de concentration variable. L'enzyme est ensuite adsorbée à la surface de l'électrode modifiée par le DDM. Une membrane de dialyse est appliquée sur l'électrode afin de confiner le DDM et l'enzyme en couche mince à l'électrode (Figure 3).

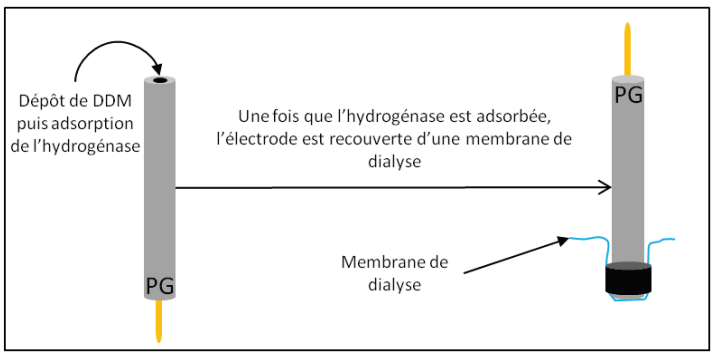


Figure 3 : Schéma de du confinement de l'hydrogénase sur l'électrode de PG modifiée par du DDM dans une configuration de membrane de dialyse.

Sur les électrodes modifiées avec des concentrations élevées de DDM (20 et 50 x CMC), la diminution du courant catalytique de l'oxydation de l'hydrogène est drastique (Figure 4)

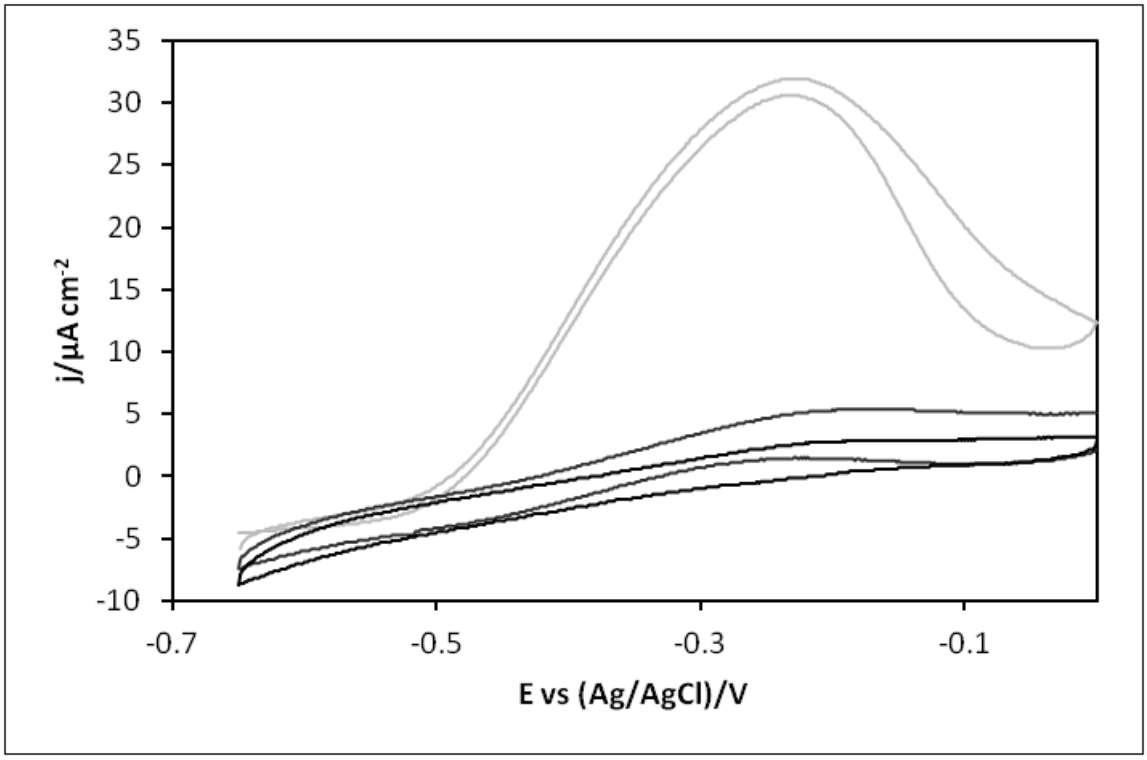


Figure 4: CV à l'électrode à membrane de l'hydrogénase 1µM, une semaine après la purification, sur PG nue (gris clair), modifiée par du DDM 20 x CMC (gris) et par du DDM 50 x CMC (noir). Tampon Hepes 50 mM pH 6,8, 60°C, sous H_2, vitesse de balayage : 5mV.s^{-1}.

Deux phénomènes distincts peuvent être tenus responsables d'une telle baisse de courant d'oxydation directe de l'hydrogène : soit le DDM oriente l'enzyme de sorte que le transfert d'électrons direct soit impossible, soit le DDM passive la surface électroactive de l'électrode. L'hypothèse d'une orientation défavorable est vérifiée par addition de bleu de méthylène en solution. De manière surprenante, un processus mixte TED et TEM d'oxydation électrocatalytique de l'hydrogène apparaît progressivement au cours du temps.

L'oxydation catalytique de l'hydrogène au cours des cycles de voltamétrie sur l'électrode de PG nue, modifiée avec du DDM 20 x CMC et 50 x CMC avant et après l'ajout du BM est donnée sur la Figure 5.

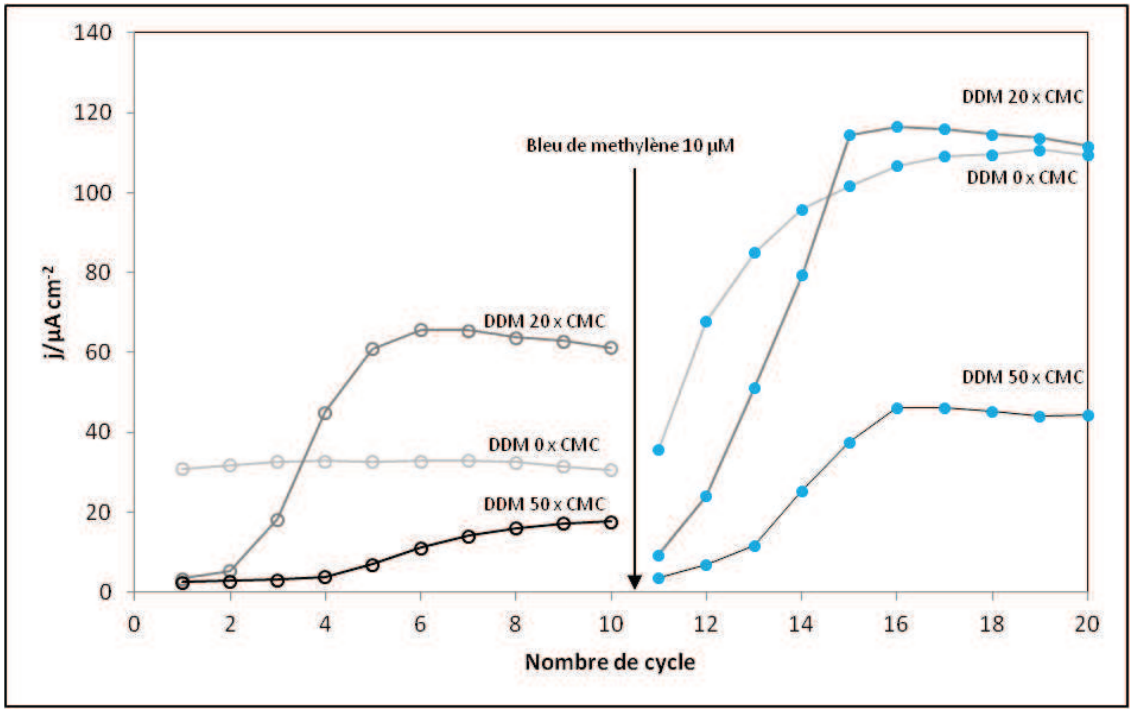


Figure 5: Suivi du courant maximum de l'oxydation de l'hydrogène par l'hydrogénase 1 µM, une semaine après purification en fonction des cycles de CV sur électrode nue (ligne grise claire) ou modifiée par du DDM 20 x CMC (ligne grise) ou 50 x CMC (ligne noire) avant (○) et après(●) addition de bleu de méthylène 10 µM. Electrode à membrane, tampon Hepes 50 mM pH 6.8, 60°C, sous H_2, vitesse de balayage : 5mV.s^{-1}.

Sur électrode nue, le courant catalytique direct est stable sur 10 cycles. Sur les électrodes modifiées par du DDM 20 x CMC et 50 x CMC, l'oxydation catalytique directe de l'hydrogène apparaît après 2 et 4 cycles respectivement. La présence de 50 x CMC en DDM ne permet pas de restaurer la densité de courant obtenue sur électrode nue probablement à cause d'une passivation de l'électrode par le large excès de DDM. En revanche, l'électrode modifiée par du DDM 20 x CMC permet de restaurer un courant catalytique identique à celui obtenu avec l'hydrogénase fraîchement purifiée. On peut raisonnablement penser que la présence de DDM a permis de désagréger une proportion d'enzymes. De plus, l'ajout de BM induit l'apparition d'un courant médié d'intensité identique sur électrode de PG nue et électrode modifiée avec du DDM de concentration 20 x CMC. Ce résultat suggère que le BM a la capacité d'accéder à l'électrode malgré les fortes concentrations en DDM (Figure 5). Son affinité pour le carbone est plus forte que celle du DDM, et il déplace des molécules de détergent de la surface. Ces molécules, confinées à l'électrode à membrane, peuvent réactiver des molécules d'hydrogénase pauvres en détergent dans leur voisinage.

2.3 Conclusion

Peu de travaux concernent l'influence des détergents sur l'activité électrochimique de protéines ou enzymes redox. Les études impliquant le DDM décrites dans ce mémoire sont donc originales. Elles mettent en évidence plusieurs points clé pour le fonctionnement de MbH1 à l'interface électrochimique, qui pourront être étendus à d'autres enzymes membranaires :

1- Le détergent entourant l'hélice trans-membranaire contrôle l'immobilisation de l'hydrogénase.

2- Le détergent présent sous forme de micelles est nécessaire à la stabilité de l'hydrogénase. Il évite son agrégation et permet de maintenir son activité enzymatique.

3- Le détergent n'inhibe pas l'activité électroenzymatique, sauf s'il est présent dans des concentrations largement supérieures à la CMC. L'hydrogénase, mais aussi le BM, ont en effet plus d'affinité que le DDM pour l'électrode. Cette étude met ainsi en relief des effets de compétition entre les différents acteurs de la catalyse enzymatique sur électrode.

3. RECHERCHE DE MATRICES POUVANT AUGMENTER LES DENSITÉS DE COURANT CATALYTIQUE

Plusieurs méthodes existent dans la littérature qui permettent l'augmentation des courants de catalyse. Pour une vitesse du transfert d'électrons direct donnée, l'augmentation des courants de catalyse directe va être liée à l'augmentation du nombre d'enzymes connectées. L'augmentation des sites d'ancrage est donc la première solution pour augmenter les courants de catalyse. La fonctionnalisation contrôlée, mais aussi l'augmentation de la surface développée, seront des moyens pour y arriver. Le développement de matrices tridimensionnelles va permettre non seulement d'assurer la connexion directe d'un nombre important d'enzymes, mais aussi éventuellement de modifier la vitesse du transfert d'électrons en augmentant par exemple la conductivité de la matrice. Au cours de ce travail, j'ai plus particulièrement exploré l'immobilisation de l'hydrogénase dans des réseaux de nanotubes de carbone (CNT) et dans des polymères redox.

3.1 Immobilisation sur des réseaux de nanotubes de carbone

3.1.1 Généralités sur l'immobilisation des hydrogénases sur nanotubes de carbone

L'étude des paramètres qui contrôlent l'immobilisation de l'hydrogénase sur électrode pour un transfert efficace d'électrons, a montré qu'une surface chargée hydrophile était favorable à un transfert d'électrons direct. Des travaux antérieurs menés dans l'équipe avaient démontré par ailleurs que des films de nanotubes de carbone fonctionnalisés par des fonctions carboxyliques générées par simple oxydation à chaud, permettaient une connexion directe de l'hydrogénase soluble de *Desulfovibrio fructosovorans* (Lojou et al., 2008). Cette connexion directe était favorisée par le réseau nanométrique des nanotubes, qui permettait éventuellement de s'affranchir d'un contrôle de l'orientation de l'enzyme sur chaque nanotube. Il a déjà été suggéré que la conductivité, ainsi que les fonctions carboxyliques présentes sur les parois des SWCNT-COOH, pouvaient améliorer les vitesses de transfert électronique interfacial (Lojou et al., 2008), (Gooding, 2005). L'existence d'un complexe de transfert de charge entre l'hydrogénase [Fe-Fe] de *Clostridium acetobutylicum* et les CNT a également été mise en évidence par photoluminescence et spectroscopie RAMAN, indiquant qu'au moins un des centres [Fe-S] est situé à proximité des CNT (Blackburn et al., 2008), (Svedruzic et al., 2011).

Mais c'est essentiellement la surface géométrique développée par les nanotubes de carbone qui est à l'origine de l'augmentation de la densité de courant électrocatalytique. A titre d'exemple, l'équipe d'Antonio De Lacey, a fait pousser une forêt de nanotubes de carbone multi parois (MWCNT) alignés verticalement sur une électrode d'or par déposition chimique d'acétylène en phase vapeur. Les MWCNT ont ensuite été fonctionnalisés par électroréduction de sels de diazonium avant d'y accrocher covalemment l'hydrogénase [Ni-Fe] soluble de *Desulfovibrio gigas*. Par mesure électrochimique, une concentration surfacique d'enzyme électroactive 33 fois supérieure comparée à une électrode de PG est estimée. L'augmentation de la densité de courant électrocatalytique étant du même ordre de grandeur que les fonctions amines générées à la surface de l'électrode, les auteurs conluent que toute la surface développée par les MWCNT est accessible à l'hydrogénase (Alonso-Lomillo et al., 2007). Dans une autre étude, une électrode d'or modifiée par de la poly-myxine, puis des CNTs, est utilisée afin d'immobiliser l'hydrogénase d'*Allochromatium vinosum*. La densité de

courant électrocatalytique mesurée est un ordre de grandeur supérieure à celle mesurée sur une électrode d'or non modifiée. Cette augmentation de la densité de courant est encore une fois attribuée à la surface développée par les CNTs (Hoeben et al., 2008). On peut noter que l'intervention des fonctions amines provenant des sels diazonium ou de la poly-myxine favorise l'orientation directe des hydrogénases [Ni-Fe] solubles par leur patch acide. Plus récemment, une quantité de 250 µg d'hydrogénase de *Thiocapsa roseopersicina* a été immobilisée à l'intérieur d'une forêt de nanotubes présente à la surface d'une électrode de carbone vitreux (Kihara et al., 2011).

3.1.2 *Immobilisation de l'hydrogénase d'Aquifex aeolicus sur nanotubes de carbone*

Ces deux informations ont été mises à profit afin d'augmenter la densité de courant électrocatalytique d'oxydation de l'hydrogène par MbH1. L'immobilisation est réalisée sur des CNT simple paroi fonctionnalisés par des groupements carboxyliques (SWCNT-COOH). Outre l'augmentation de la surface développée, ces films de CNT offrent de nombreux sites d'ancrage pour une connexion directe de l'hydrogénase à l'électrode. Les parois hydrophobes des CNT sont en effet rendus hydrophiles, favorisant l'orientation favorable de l'hydrogénase. Dans ces conditions, les densités de courant moyennes liées à l'oxydation de l'hydrogène sont au minimum un ordre de grandeur supérieur à celles atteintes sur PG nue (500 $\mu A.cm^{-2}$ contre 50 $\mu A.cm^{-2}$) (Figure 6).

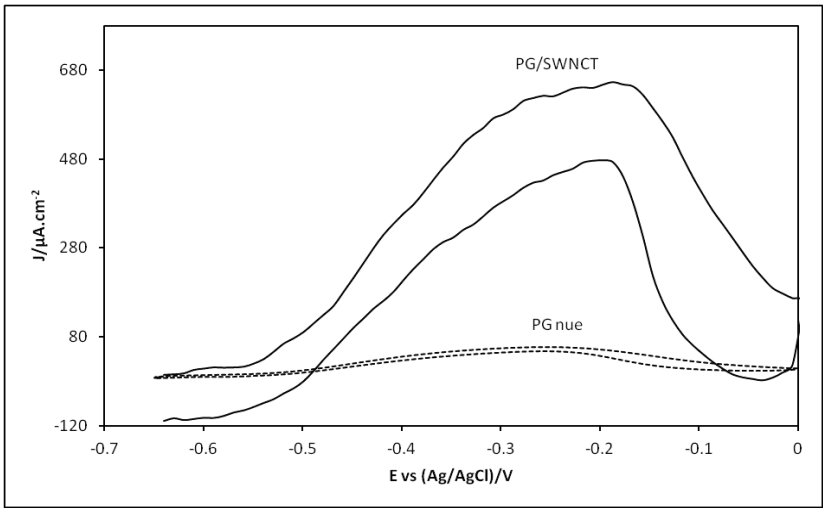


Figure 6 : CV de l'oxydation électrocatalytique directe de l'hydrogène par l'hydrogénase MbH1 adsorbée sur électrode de PG nue (noir pointillé) ou modifiée par 10 µg de SWCNT-COOH (noir continu). Tampon Hepes 50 mM pH 6,8, 60°C, sous H_2, vitesse de balayage : 5 $mV.s^{-1}$.

Des densités atteignant le $mA.cm^{-2}$ ont même été rapportées dans des conditions similaires dans notre laboratoire, dépendant très certainement de la nature des CNT commerciaux (Luo et al., 2009).

La relation entre densité de courant électrocatalytique et quantité de SWCNT-COOH déposée a été explorée. En parallèle à la mesure de l'activité catalytique, la capacité électrique du film de CNT est mesurée (Figure 7).

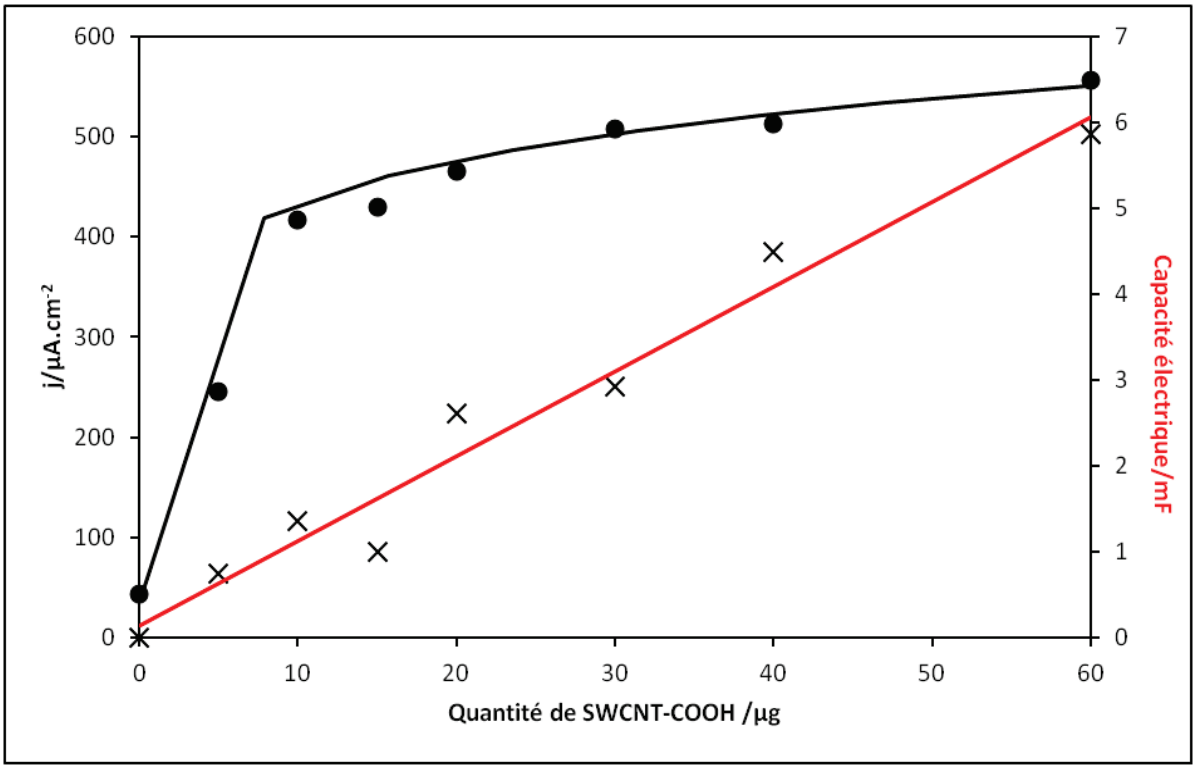


Figure 7: Evolution de la densité de courant catalytique de l'oxydation de l'hydrogène (●) et de la capacité électrique (×) en fonction de la quantité de SWCNT-COOH déposée sur l'électrode de PG.

La variation de la capacité électrique reflète la variation de la surface électroactive en faisant l'hypothèse que la structure et la composition du film varient peu. Dans un premier temps, la densité de courant électrocatalytique croit très rapidement en fonction de la quantité de SWCNT-COOH déposée (jusqu'à 10 µg). De manière concomitante, la capacité électrique du film de SWCNT-COOH augmente. Cela signifie que dans la gamme de SWCNT-COOH déposée (0 - 10µg), l'augmentation de la densité de courant est liée à une augmentation de la surface géométrique de l'électrode. Au-delà de 10 µg de SWCNT-COOH déposés, la densité de courant catalytique atteint un plateau, tandis que la capacité électrique continue d'augmenter de manière linéaire. Ainsi, une saturation rapide de la surface se produit, bien que la surface géométrique et donc le nombre de sites d'ancrage disponibles pour

l'hydrogénase augmentent avec la quantité de SWCNT-COOH déposée. Ces résultats sont en accord avec les études précédentes menées dans notre laboratoire (Luo et al., 2009), et avec d'autres travaux de la littérature qui concernent l'immobilisation d'hydrogénase de l'espèce *Desulfovibrio* (Baur et al., 2011). L'ensemble de ces études met en évidence l'intérêt des films de nanotubes de carbone pour l'augmentation des densités de courant, mais aussi la nécessité du contrôle de la porosité de ces structures tridimensionnelles si l'on veut optimiser l'immobilisation des enzymes.

3.2 Intérêt de l'utilisation de polymère redox pour l'hydrogénase d'*Aquifex aeolicus*

Au cours du chapitre précédent, l'intérêt de travailler avec des médiateurs redox fonctionnant à des potentiels où l'enzyme non directement connectée n'est pas inhibée, a été clairement mis en évidence. Il a aussi été montré que les phénothiazines pouvaient augmenter le transfert d'électrons direct par un effet type « fil conducteur ». L'immobilisation du médiateur redox est néanmoins une étape nécessaire pour le développement de bioélectrodes dédiées à une biopile, dépourvue de membrane. Cette co-immobilisation n'est pas triviale. En effet, un médiateur redox efficace comporte le plus souvent des propriétés physico-chimiques complémentaires au site de reconnaissance sur l'enzyme. Il va donc s'agir de co-immobiliser enzyme et médiateur dans une même matrice mais avec des interactions antagonistes. Certains médiateurs redox, tels que le Toluidine Blue O (TBO), un analogue du bleu de méthylène, sont capables d'être électropolymérisés sur divers supports pour former une matrice conductrice. Ce procédé offre *a priori* l'avantage de co-immobiliser l'enzyme et le médiateur dans un même film conducteur. Le polymère développe également une surface conductrice plus grande, permettant une augmentation du nombre de sites d'ancrage pour l'hydrogénase, et par la même occasion l'augmentation des densités de courant électrocatalytique. De nombreux biocapteurs pour le NADH et le glucose ont ainsi vu leurs performances de détection améliorées grâce à l'utilisation de polymères de type phénothiazine (Kumar et al., 2008), (Yao et al., 2007). Les polypyrroles ont été également largement utilisés dans la création de biocapteurs à éthanol basés sur l'enzyme alcool déshydrogénase (Shimomura et al., 2010), (Yildiz et al., 2006), ou dans l'amélioration de la catalyse de réduction du peroxyde d'hydrogène et du nitrite par des protéines hémiques (Lu et al., 2008). Au cours de ce travail, dans l'objectif d'augmentation des densités de courant, l'efficacité de la catalyse de l'oxydation de l'hydrogène par MbH1 en présence de polymère de TBO (pTBO) est évaluée.

3.3.1 *Electropolymérisation du Toluidine Blue O : TBO*

L'électropolymérisation du TBO est bien décrite dans la littérature. Elle s'effectue classiquement par voltamétrie cyclique, qui permet de suivre la formation du polymère sur l'électrode au cours des cycles (Figure 8). A haut potentiel, la forme monomérique du TBO est oxydée au niveau du groupement amine formant un cation radicalaire. La forme radicalaire initie l'électropolymérisation par une réaction de couplage entre l'amine radicalaire et un carbone d'un autre monomère, formant le polymère de TBO. Le nombre de cycles effectués contrôle l'épaisseur du film de polymère à la surface de l'électrode (Yao et al., 2007).

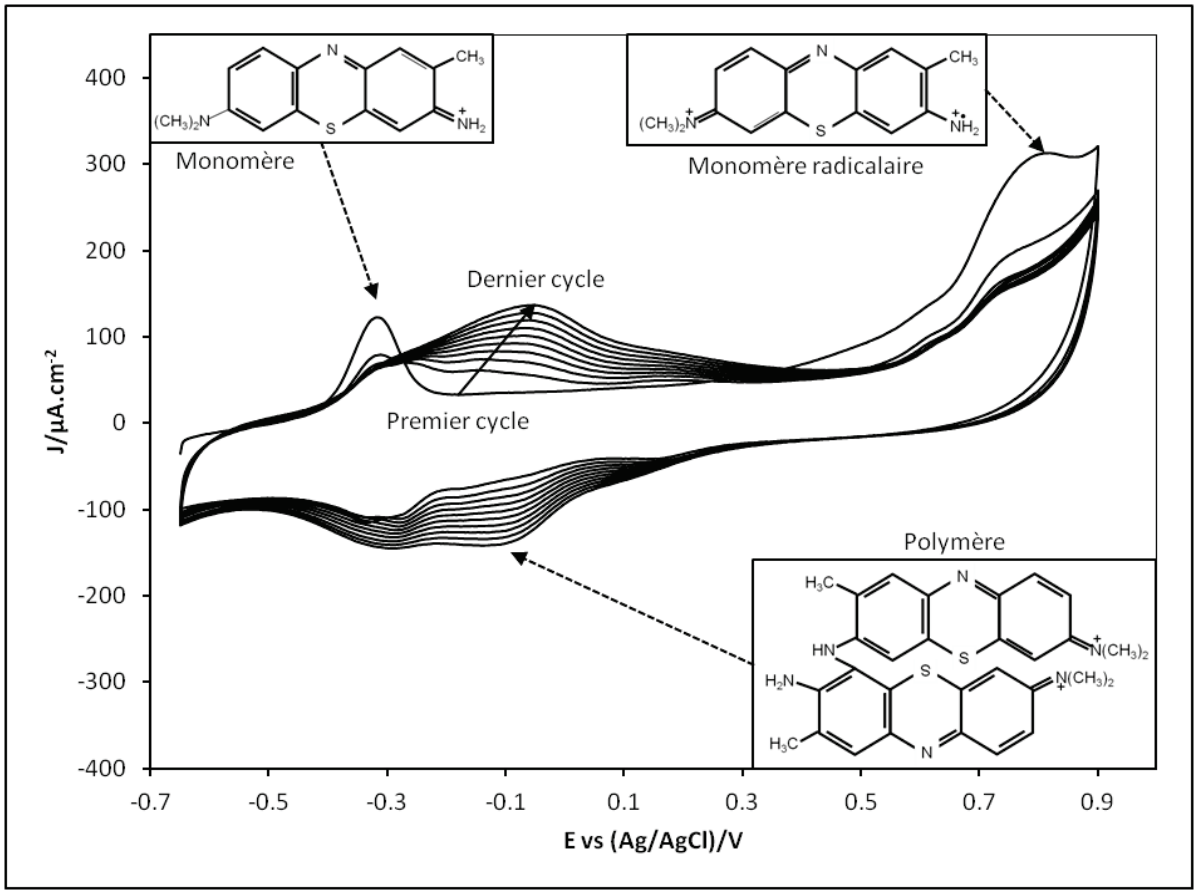


Figure 8 : CV de l'électropolymérisation du TBO 160 µM dans un tampon Tris-HCl 25 mM pH 9,5, 25 °C, à 50 mV.s^{-1}.

En vue de l'utilisation de ce polymère redox pour l'immobilisation de l'hydrogénase, la stabilité du polymère a été suivie en fonction de la température. En effet la catalyse de l'oxydation de l'hydrogène par MbH1, une enzyme hyperthermophile est classiquement

mesurée vers 60 °C, et aucune donnée dans la littérature ne permet de connaître le comportement du polymère redox dans ces conditions expérimentales. La stabilité du film de pTBO a été suivie dans une gamme de température s'étalant de 27 °C à 60°C (Figure 9). Le signal redox présent à -25 mV attribué au pTBO reste stable sur toute la gamme de température explorée. Il ne montre aucune variation ni en intensité, ni en potentiel pendant 3 heures à 60 °C. Le signal redox présent à -225 mV attribué à une forme monomérique dans le polymère diminue à mesure que la température augmente. Après stabilisation de ce signal, le courant de pic d'oxydation des deux signaux varie linéairement avec la vitesse de balayage, indiquant un processus contrôlé par le confinement des espèces à la surface de l'électrode.

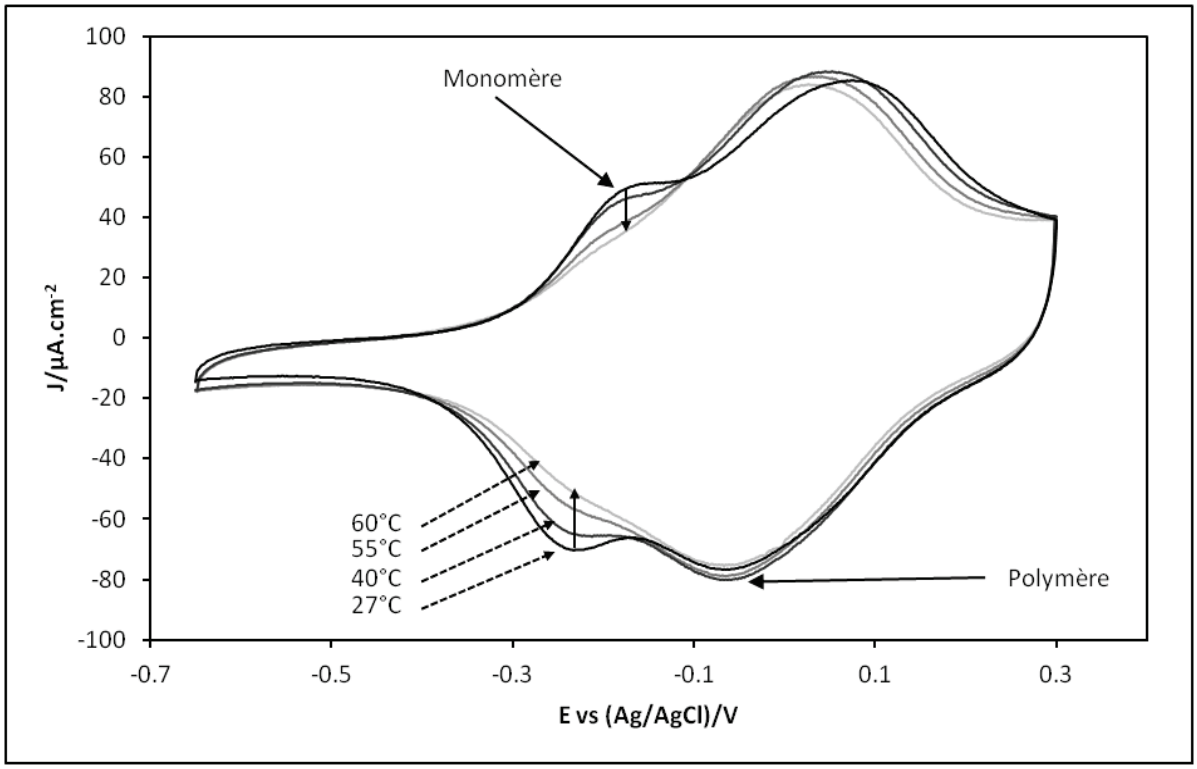


Figure 9 : CV présentant l'évolution du film de pTBO formé sur une électrode de PG en fonction de la température. Tampon Hepes 50 mM pH 6,8, 60°C, sous H_2, vitesse de balayage : 5 mV.s^{-1}.

*3.3.2 Encapsulation de l'hydrogénase d'*Aquifex aeolicus *dans le polymère de TBO*

Un premier type d'expériences a été réalisé en encapsulant l'hydrogénase à l'intérieur du polymère redox. L'idée était non seulement de stabiliser l'hydrogénase en tirant profit de la structure polymère, mais aussi d'augmenter les interactions entre l'enzyme et les unités

redox. Le TBO a donc été électropolymérisé dans une solution contenant l'hydrogénase. Cette méthode a été utilisée avec succès pour encapsuler d'autres enzymes comme par exemple la glucose oxydase (Kumar et al., 2008) et la Horseradish peroxydase (Razola et al., 2002). Plus récemment l'hydrogénase [Ni-Fe] de *Desulfovibrio fructosovorans* a été immobilisée sur des CNTs, puis encapsulée par électropolymérisation d'un polypyrole portant un médiateur redox, le méthylviologène. On notera toutefois que seul un courant d'oxydation de l'hydrogène médié par le méthylviologène a été observé (Baur et al., 2011). Des travaux de notre groupe avaient pourtant montré l'existence d'une connexion directe de la même hydrogénase dans des matrices de nanotubes de carbone (Lojou et al., 2008). Dans le cas de MbH1, la procédure de co-immobilisation au sein du polymère redox n'est pas valide. En effet l'activité électrocatalytique d'oxydation directe de l'hydrogène par l'hydrogénase est progressivement perdue lorsque le potentiel est porté vers les valeurs très positives nécessaires pour générer le polymère (Figure 10). Ce phénomène n'est pas lié au polymère redox, mais à l'hydrogénase, elle-même inhibée à partir de potentiels supérieurs à + 500 mV. La nature de l'espèce « morte » de l'enzyme à haut potentiel n'est à ce jour pas connue.

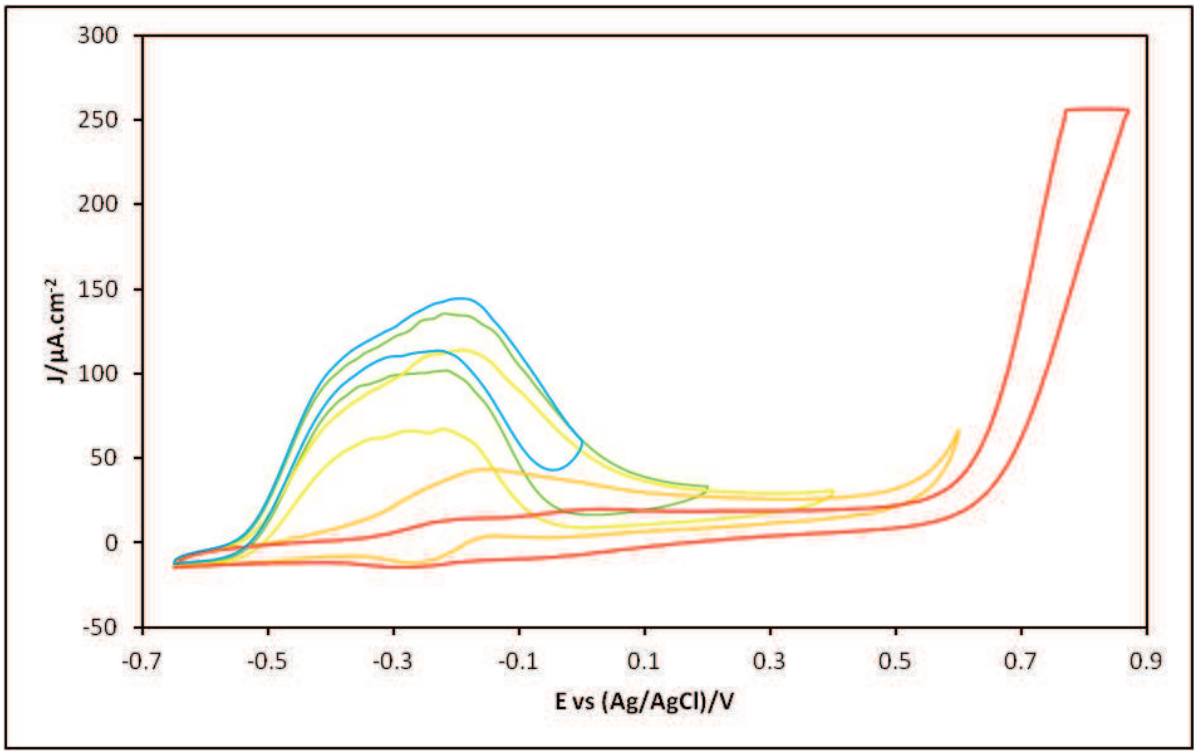


Figure 10 : CV présentant l'évolution de l'oxydation catalytique de l'hydrogène par MbH1 en fonction du potentiel limite anodique : 0 V (bleu), + 0,2 V (vert), +0,4 V (jaune), +0,6 V (orange), +0,8 V (rouge). TBO 16 µM Tampon Hepes 50 mM pH 6,8, 60°C, sous H_2, vitesse de balayage : 5 mV.s^{-1}.

3.3.3 *Adsorption de l'hydrogénase d'*Aquifex aeolicus *sur le polymère de TBO*

Puisqu'il est impossible de conserver l'activité électrocatalytique de l'hydrogénase lorsqu'elle est co-immobilisée pendant l'électropolymérisation du TBO, l'enzyme a été déposée sur le polymère de TBO. Si cette procédure est moins intéressante, puisque l'effet de protection par emprisonnement et une proportion importante de la surface active sont perdus, l'objectif est de pouvoir utiliser la fonction de médiation de l'oxydation de l'H_2. L'influence de l'épaisseur du film de TBO sur l'oxydation de l'hydrogène par MbH1 a été examinée dans un premier temps. En modifiant la conductivité du film, il était attendu que l'efficacité catalytique soit affectée (Figure 11) (Yao et al., 2007).

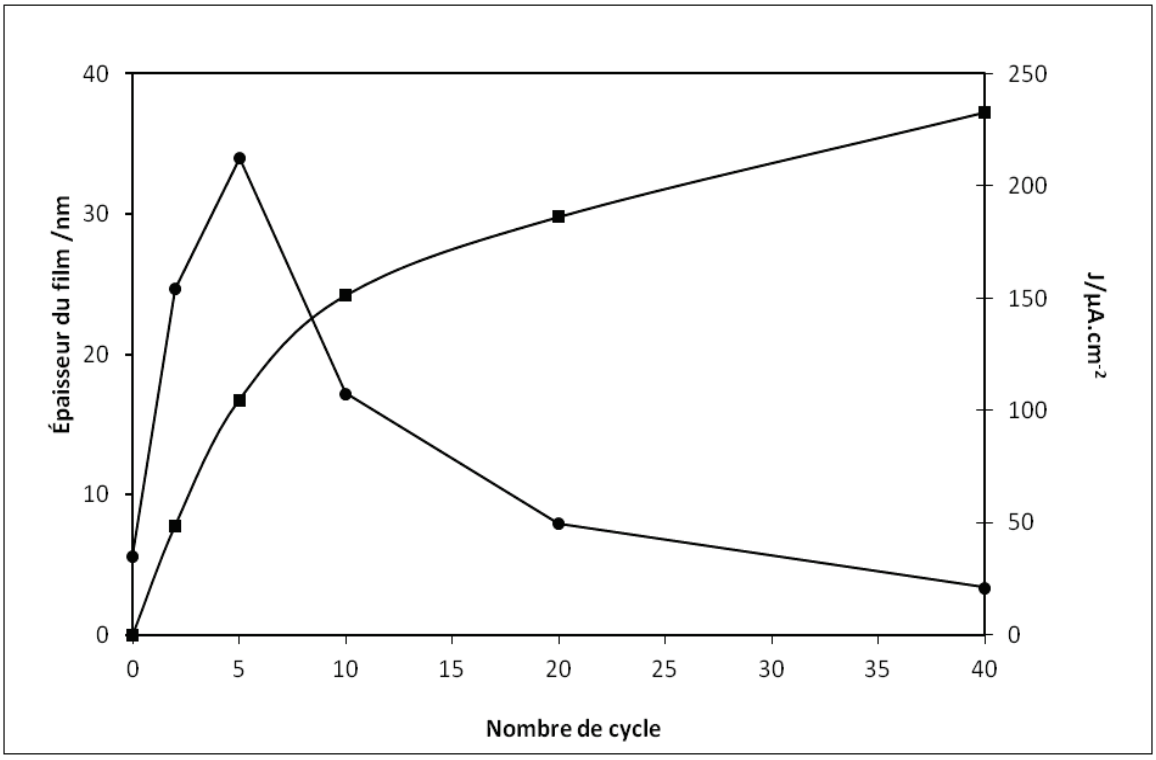


Figure 11: Evolution de la densité de courant électrocatalytique d'oxydation de l'hydrogène (●) en fonction de l'épaisseur du film de polymère pTBO (■) généré en modulant le nombre de cycles.

3.3.3.1 *Influence de l'épaisseur du polymère de TBO*

Une forte dépendance de l'activité catalytique d'oxydation de l'hydrogène en fonction du nombre de cycles d'électropolymérisation est mise en évidence. Deux domaines sont distingués (Figure 11).

1- Pour les épaisseurs de film les plus faibles (en dessous de 5 cycles d'électropolymérisation), la densité de courant, rapportée à la surface géométrique, augmente en fonction de l'épaisseur du film. Elle atteint une densité de 200 $\mu A.cm^{-2}$, soit une densité de courant environ 5 fois supérieure à celle observée sur une électrode de PG nue. Le film mesure alors un peu moins de 20 nm d'épaisseur. La forme de la vague catalytique est aussi très particulière. Le processus d'oxydation de l'hydrogène décrit un plateau étendu de -0,35V à -0,1V. Cette forme particulière est attribuée en première approche à un processus mixte de transfert d'électrons direct à travers le film polymère et médié par les unités monomères présentes sur le film polymère (Figure 12). Cette hypothèse est supportée par l'étude de l'électroactivité de sondes redox à travers les films polymères d'épaisseurs variables dans la gamme 1 à 30 nm. Le ferricyanure, mais aussi une protéine redox, le cytochrome c_3 (protéine à 4 hèmes de potentiels redox proches du potentiel de l'hydrogénase) se comportent comme des systèmes rapides et réversibles sur les films polymères, tant que l'épaisseur du film n'excédait pas 15 nm. La conductivité du film polymère autorise donc un processus de transfert d'électrons direct à travers le film de TBO pour les hydrogénases qui sont adsorbées à sa surface. Le processus de transfert d'électrons médié est attribué aux monomères de TBO emprisonnés dans/sur le film de polymère.

2- Pour les épaisseurs de film polymère supérieures à 20 nm, une nette baisse de la densité de courant est enregistrée. La baisse de conductivité est très vraisemblablement responsable de cette diminution du courant, mais la diffusion de l'hydrogène à travers le film peut aussi être limitante. Le potentiel d'oxydation de l'hydrogène est alors rejeté vers des potentiels plus positifs, très proches du potentiel redox du monomère de TBO. Le processus de transfert d'électrons médié semble ainsi favorisé pour les films de polymère d'une épaisseur supérieure à 20 nm.

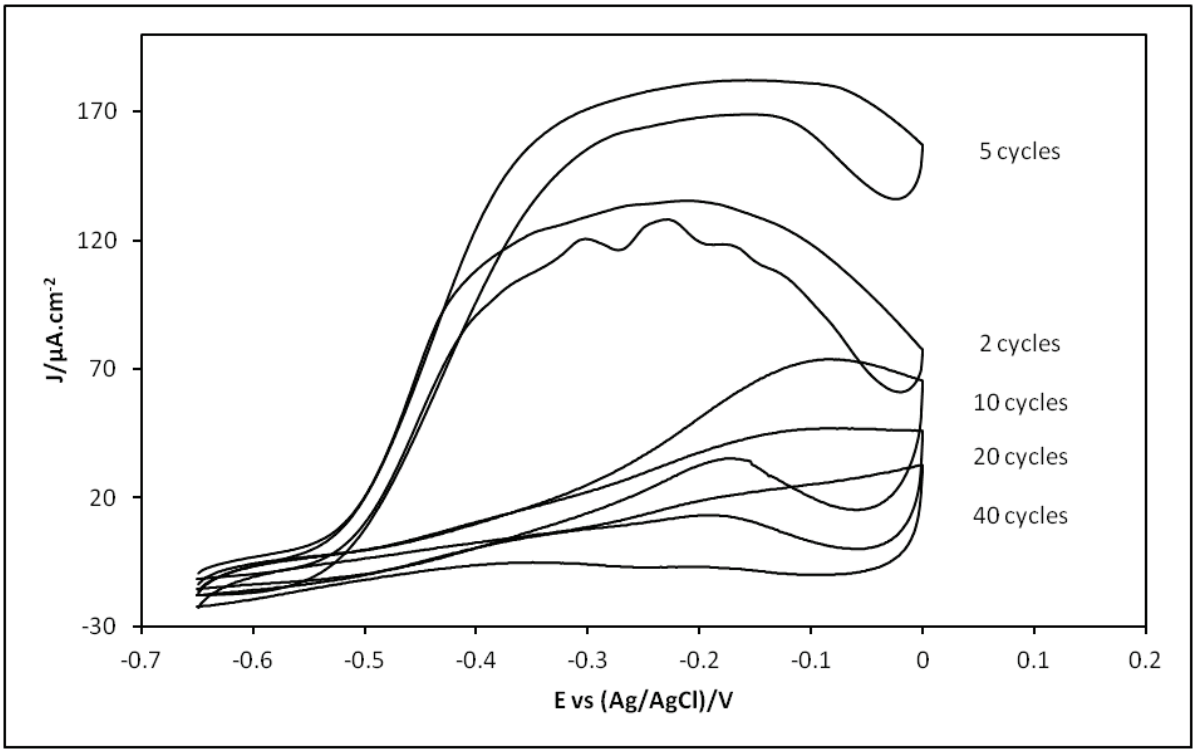


Figure 12: CV de l'oxydation électrocatalytique de l'hydrogène sur une électrode de PG modifiée par un polymère de TBO d'épaisseur variable. L'épaisseur est modulée par le nombre de cycles d'électropolymérisation. Tampon Hepes 50 mM pH 6,8, 60°C, sous H_2, vitesse de balayage : 5 mV.s^{-1}.

3.3.3.2 *Adsorption de l'hydrogénase d'Aquifex aeolicus sur une matrice mixte polymère TBO/ nanotube de carbone*

Dans le but d'améliorer encore les densités de courant pour l'oxydation catalytique de l'hydrogène par MbH1, le TBO a été électropolymérisé sur une électrode de PG préalablement modifiée par des SWCNT-COOH. Le but est de créer un film polymère moins compact et plus conducteur grâce à la présence des nanotubes de carbone, qui pourraient augmenter les vitesses de transfert d'électrons et favoriser l'interaction de l'enzyme avec le médiateur redox présent sous forme monomérique dans le film. Cette procédure a été utilisée avec succès dans la conception de biocapteurs au glucose basé sur la glucose oxydase (Gao et al., 2011),(Joshi et al., 2005). Une augmentation de la densité de courant d'un facteur 2 est observée, passant de 200 µA.cm^{-2} à 400 µA.cm^{-2} lorsque l'électropolymérisation se fait sur le réseau de CNT (Figure 13).

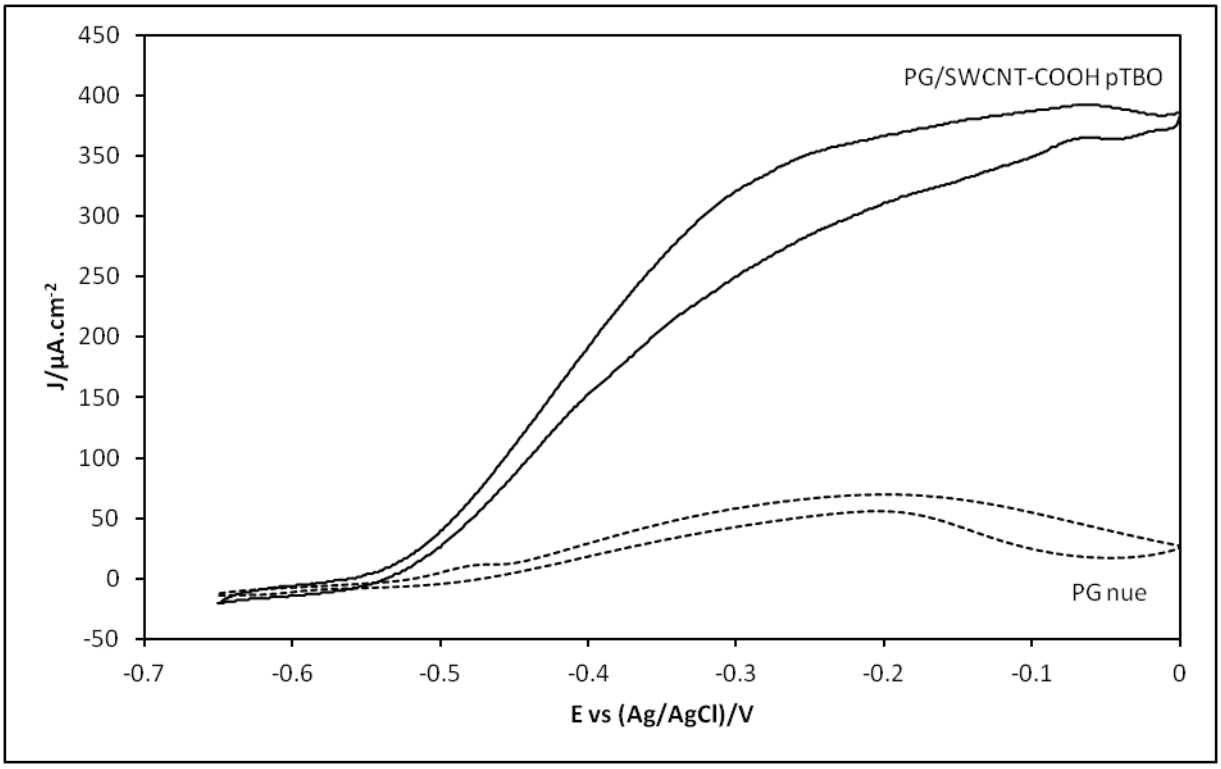


Figure 13 : CV de l'oxydation électrocatalytique de l'hydrogène sur une électrode de PG nue (pointillée), et modifiée par un polymère de pTBO (5 cycles de polymérisation) sur des SWCNT-COOH (noir). Tampon Hepes 50 mM pH 6.8, 60°C, sous H_2, vitesse de balayage : 5mV.s^{-1}.

En comparaison avec l'oxydation directe de l'H_2 par l'hydrogénase immobilisée sur un réseau de CNT (Luo et al., 2009), le processus n'est cependant pas amélioré par la présence du polymère. La forme du signal est d'ailleurs très proche de celle obtenue sur les nanotubes de carbone seuls, ce qui suggère une distribution d'orientation de l'hydrogénase. L'augmentation de la densité de courant serait donc essentiellement liée à l'augmentation de la surface électroactive, avec une participation mineure du polymère redox et des entités TBO. Ces résultats suggèrent aussi une faible constante de vitesse entre l'hydrogénase et le médiateur redox.

4. STABILITÉ DU SIGNAL ÉLECTROCATALYTIQUE

La stabilité du signal catalytique est une question essentielle en bioélectrochimie. Elle devient rédhibitoire lorsqu'on envisage l'utilisation d'enzymes en biotechnologie en général, et en tant que biocatalyseur dans des biopiles en particulier. Le fonctionnement sur le long terme dans les domaines applicatifs est un prérequis pour la crédibilité de ces systèmes. L'étude fondamentale des mécanismes catalytiques de l'oxydation de l'H_2 par l'hydrogénase

est elle-même confrontée à ces problèmes de stabilités qui peuvent nuire à l'analyse des signaux électrochimique, et par conséquent mener à des interprétations erronées. Ainsi des méthodes de correction du signal ont été mises au point pour remédier à la perte de signal électrocatalytique (Leger et al., 2008), (Fourmond et al., 2009). Cette instabilité peut être intrinsèquement liée à l'enzyme. Une condition nécessaire, mais non suffisante, est la quantité de détergent apte à améliorer la stabilité de l'enzyme. L'instabilité du signal catalytique peut avoir cependant une toute autre origine. Le film protéique lui-même présent sur l'électrode peut présenter une instabilité qu'il va s'agir de corriger. Les raisons de cette instabilité sont soit une simple perte de film au cours du temps, soit une réorganisation du film protéique non favorable à un transfert électronique interfacial rapide.

4.1 Une simple perte de film ? …

Comme évoqué à plusieurs reprises dans ce manuscrit, le comportement électrochimique des hydrogénases est classiquement étudiée par simple adsorption de l'enzyme sur électrode de PG (Vincent et al., 2007), (Lojou et al., 2005). Cette technique souffre cependant d'une faible stabilité du signal électrochimique dans le temps. Il a été montré de plus que la perte du signal électrocatalytique est plus prononcée à haute température (Jones et al., 2003), (Lojou, 2011).

La stabilité du signal d'oxydation de l'hydrogène par MbH1 a déjà fait l'objet d'une étude précédente dans l'équipe (Luo et al., 2009). Il a été montré que l'activité électrocatalytique de l'enzyme simplement adsorbée sur des CNT diminue de 70 % au bout d'une heure à 60 °C. L'instabilité du film de CNT, dans les mêmes conditions, a été mise hors de cause par des mesures de spectroscopie d'impédance complexe. De plus, l'activité enzymatique de l'hydrogénase, mesurée par un test d'activité spectrophotométrique, est conservée à 70 %, après incubation à 60 °C pendant une heure. Ces résultats suggèrent que l'enzyme n'est pas dégradée en solution. Rappelons que l'absence de signal non catalytique pour l'hydrogénase adsorbée empêche toute quantification de l'enzyme électroactive adsorbée sur l'électrode. Deux hypothèses ont alors été formulées pour expliquer la perte de signal électrocatalytique: soit l'enzyme est relarguée progressivement en solution, soit elle est inactivée par un changement de conformation induit par son immobilisation.

En examinant la littérature, c'est la perte de film protéique au cours du temps qui est la plus largement évoquée comme étant responsable de la diminution du signal catalytique

(Vincent et al., 2007), (Leger et al., 2008), (Cracknell et al., 2008). Afin de confirmer cette hypothèse, l'enzyme a été immobilisée *via* la configuration de l'électrode à membrane. Dans cette configuration, une membrane de dialyse de cut off approprié est apposée à la surface de l'électrode après y avoir adsorbé l'enzyme (Chap.3 §2.2 Figure 2).

L'enzyme est ainsi confinée (5 – 10 nm de diamètre) dans une couche mince dont l'épaisseur est estimée à 10 µm (Correia dos Santos et al., 2003). Bien que l'espace de confinement ne suffise pas à éviter toute diffusion de l'enzyme, un équilibre devrait être atteint entre les hydrogénases relarguées et les hydrogénases adsorbées. Pour autant, aucune stabilisation du signal électrocatalytique n'a pu être observée par une mesure voltamétrique en continu durant 3 heures à 60°C sous H_2. Ces résultats suggèrent que d'autres facteurs que le simple relargage de l'enzyme doivent être à l'origine de la diminution du signal électrocatalytique.

4.2 … Rôles des phénothiazines

En gardant la même configuration d'hydrogénase confinée à l'électrode *via* une membrane de dialyse, un médiateur redox est ajouté en solution. L'addition de TBO doit permettre de médier l'oxydation de l'H_2 par les hydrogénases relarguées mais toujours présentes au sein de la couche mince. Il a déjà été fait état (Chap.2 §1.2.2 Figure 2) que l'addition de TBO en solution permettait non seulement de médier l'oxydation de l'H_2, mais aussi d'augmenter la vitesse de transfert d'électrons pour l'oxydation directe de l'H_2. Ce processus est attribué à une connexion des hydrogénases *via* le TBO qui joue le rôle de fil conducteur. Après addition du TBO dans la cellule électrochimique, en plus de cette augmentation globale du courant électrocatalytique, la stabilité du signal électrocatalytique est observée pendant 3 heures de CV en continue dans la gamme -0,65V - 0V. Si on pouvait s'attendre à une stabilité du courant médié, puisque les hydrogénases éventuellement relarguées restent confinées à l'électrode, la stabilité du processus d'oxydation direct est plus remarquable. Le TBO semble alors avoir un rôle stabilisateur de l'enzyme à l'électrode dans une conformation favorable à la connexion directe. La stabilité du signal électrocatalytique observé grâce à l'addition de TBO en solution est également retrouvée lorsque l'enzyme est confinée par une membrane sur du TBO électropolymérisé sur l'électrode. Dans ces conditions, l'intensité du signal ne montre aucune variation pendant 3 heures d'utilisation à 60°C sous atmosphère d'hydrogène (Figure 14).

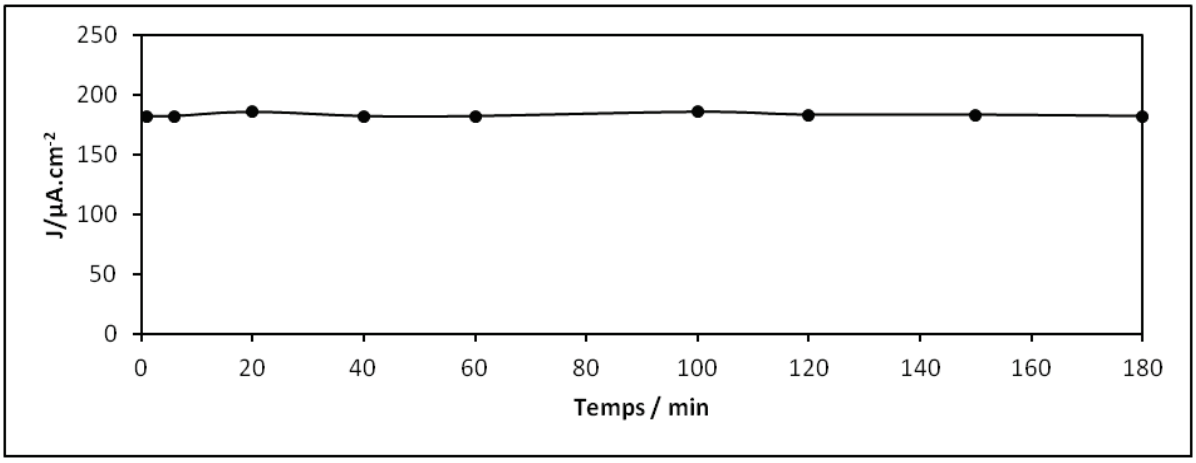


Figure 14 : Evolution de l'activité électrocatalytique de l'oxydation de l'hydrogène par MbH1 adsorbée sur un polymère de TBO et confinée par une membrane de dialyse en fonction du temps. Tampon Hepes 50 mM pH 6,8, 60°C, sous H_2, vitesse de balayage : 5 mV.s^{-1}.

4.3 Influence des processus de transfert électronique sur la stabilité

Comme le caractère hydrophobe des phénothiazines semble jouer un rôle dans la stabilisation du signal électrocatalytique, la stabilité du signal d'oxydation de l'H_2 lorsque l'hydrogénase est adsorbée sur les SAM hydrophobes a également été étudiée. Rappelons que dans ces conditions seul un courant médié est enregistré. De manière remarquable, le courant d'oxydation de l'hydrogène mesuré par chronoampérométrie pendant une heure présente une très grande stabilité (Figure 15).

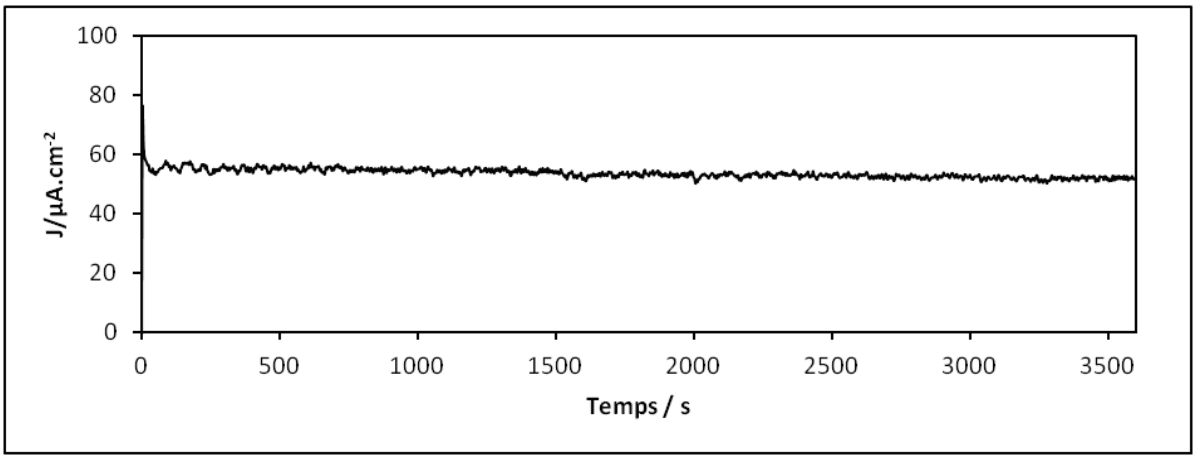


Figure 15 : Evolution de l'activité électrocatalytique de l'oxydation de l'hydrogène par chronoampérométrie *via* MbH1 adsorbée sur une électrode d'or modifiée par une SAM C_3CH_3 en fonction du temps. Tampon Hepes 50 mM pH 6,8, BM 10 µM, 60°C, sous H_2, E= -0,175 V.

En effet l'intensité du signal diminue de moins de 10 %. Cela suggère que la désorption de l'hydrogénase est très peu prononcée sur les SAMs hydrophobes, bien que des interactions de faible énergie soient mises en jeu. Ces résultats contrastent avec la perte continue du signal lorsque l'enzyme est adsorbée sur une électrode de PG, ou sur électrode de PG modifiée par des nanotubes de carbone (SWCNT-COOH) (Luo et al., 2009). Pour rappel, lorsque MbH1 était simplement adsorbée sur des SWCNT-COOH, une perte de 70 % du signal était observée après une heure à 60 °C.

Il faut néanmoins remarquer que le type d'interactions non covalentes entre l'hydrogénase et le support varie entre les deux procédures. L'immobilisation sur SAM hydrophobe implique des interactions exclusivement hydrophobes, tandis que l'immobilisation sur une électrode de PG ou des nanotubes de carbone met en jeu des interactions de type électrostatiques et hydrophobes. De plus, il faut se rappeler que ces interactions différentes induisent des processus d'oxydation de l'H_2 différents: un courant d'oxydation direct de l'hydrogène est mesuré sur l'électrode de PG et les nanotubes de carbone, alors que seul un courant médié est mesuré sur les SAMs hydrophobes.

Des études de spectroscopie SEIRAS couplées à l'électrochimie menées sur l'hydrogénase [Ni-Fe] de *Desulfovibrio miyazaki* permettent d'avancer une explication quant à l'instabilité du signal électrocatalytique observée sur certaines électrodes (Millo et al., 2009). Dans ces travaux, l'hydrogénase soluble et sensible à l'oxygène de *Desulfovibrio miyazaki* est immobilisée sur une SAM chargée positivement de manière à effectuer un transfert d'électrons direct à l'électrode. Bien que l'enzyme soit immobilisée covalemment, une perte d'activité électrocatalytique en fonction du temps est mesurée par voltamétrie cyclique. En revanche, l'intensité des signaux des bandes amides, empreintes de la structure secondaire de l'enzyme, ne diminuent pas. Le ratio des bandes amides I et amide II ne change pas non plus. Ces résultats suggèrent que l'enzyme n'est ni relarguée, ni réorientée. Cependant, l'intensité des signaux relatifs aux liaisons CO et CN, ligands du site actif de l'enzyme, diminue. Les auteurs proposent donc qu'une lente dégradation du site actif soit responsable de la perte de signal constatée. Cette dégradation serait due à la génération d'espèces réactives de l'oxygène au site actif lors de l'inactivation anaérobie à haut potentiel. En effet, sur une même durée d'observation, la signature spectrale du site actif reste inchangée lorsque l'enzyme est maintenue à son potentiel d'équilibre.

Dans nos expériences, aucun couplage covalent n'a été effectué, que ce soit sur PG ou SAM hydrophobe. Le relargage progressif de l'enzyme n'est donc pas à exclure. Un essai de quantification par dosage protéique de la perte de film sur PG a d'ailleurs été effectué, en évaluant la quantité d'hydrogénases relarguées en solution. Cependant les valeurs mesurées sont très faibles et se situent dans la zone de limite de détection du dosage. Néanmoins, au vu de nos résultats et des résultats obtenus sur l'hydrogénase de *Desulfovibrio miyazaki*, une hypothèse supplémentaire peut être avancée pour expliquer l'instabilité du signal électrocatalytique sur PG nue, et sa stabilisation sur SAM hydrophobe ou après addition de phénothiazine. La connexion directe de MbH1 adsorbée sur électrode de PG nue ou modifiée par des SWCNT-COOH, peut induire une dégradation progressive du site actif. En effet le site actif va passer d'une forme active à une forme inactive au cours du balayage des potentiels. Pour rappel, le site actif des hydrogénases [Ni-Fe] tolérantes à l'oxygène ne s'interconvertit qu'en espèce Ni-B à haut potentiel, espèce qui est plus facilement réactivable que l'espèce Ni-A formée par les hydrogénases sensibles à l'oxygène en aérobie. Même si ce processus est réversible, et que MbH1 est tolérante à l'O_2, la cinétique de réactivation va contrôler la concentration en forme inactive à l'électrode. Il est possible qu'en présence de phénothiazines, monomériques ou polymérisées, de par leur capacité à fournir des électrons, la cinétique de réactivation de l'hydrogénase soit plus rapide, et que par conséquent la stabilité du signal électrocatalytique soit accrue. D'autre part, les phénothiazines pourraient contribuer à éliminer par réduction les traces d'oxygène de la solution, protégeant ainsi l'enzyme contre l'inactivation réversible.

D'autre part, il semblerait que l'enzyme connectée directement à l'électrode soit irréversiblement dégradée en appliquant les potentiels trop oxydants, nécessaires à l'électropolymérisation du TBO. Ces résultats peuvent être mis en parallèle avec les travaux d'encapsulation de l'hydrogénase [Ni-Fe] soluble, sensible à l'oxygène, de *Desulfovibrio fructosovorans* dans un polymère redox de polypyrole-viologène adsorbé sur des nanotubes de carbone (Baur et al., 2011). Les auteurs montrent une vague catalytique de l'oxydation de l'hydrogène médiée par le polymère redox. Aucun courant d'oxydation direct de l'hydrogène n'est enregistré. Un résultat surprenant, car des travaux menés dans notre laboratoire ont montré que la même enzyme est capable d'effectuer un transfert d'électrons direct très efficace sur des nanotubes de carbone (Lojou et al., 2008). Il faut remarquer que la procédure d'électropolymérisation du polypyrole-viologène effectuée en présence d'hydrogénase requiert un potentiel de +0.8 V. Ainsi le site actif des hydrogénases, ou bien leurs centres [Fe-

S] directement connectées à l'électrode pourraient être dégradé par un potentiel trop oxydant. En revanche, les enzymes non directement connectées resteraient actives et pourraient oxyder l'H_2 via la médiation par le polymère viologène.

Il semble donc que la perte de stabilité du signal électrocatalytique soit multifactorielle, incluant le relargage et/ou la réorientation de l'enzyme, mais également la dégradation de son site actif, bien que celle-ci semble lente et intimement liée à la façon dont l'enzyme est utilisée.

5. SÉLECTION DES ÉLÉMENTS CONSTITUTIFS DE LA BIOPILE H_2/O_2

En vue d'une utilisation de MbH1 dans des procédés biopile à combustible, la solution la plus adéquate au maintien dans le temps de l'activité électrocatalytique doit être recherchée. Une stabilité du signal électrocatalytique de l'hydrogénase en présence de phénothiazine en solution a été observée. Cette stabilité est retrouvée lorsque l'hydrogénase est adsorbée sur un polymère de TBO, avec toutefois une densité de courant plus intéressante.

Ces procédés de stabilisation du courant ne sont cependant pas appropriés pour une application en biopile. D'un côté, la membrane à dialyse ajoute une résistance supplémentaire au système. De l'autre, l'addition d'un médiateur redox diffusant en solution peut s'avérer problématique : en cas de maintien dans la pile d'une membrane séparatrice, un colmatage de la membrane peut se produire, en cas d'absence de membrane, une perte de performance est attendue. En début de ce chapitre, un des moyens d'augmenter de façon significative les courants en adsorbant l'hydrogénase sur des réseaux de nanotubes de carbone a été décrit. En partant de l'hypothèse que l'instabilité du signal électrocatalytique pouvait en partie venir d'un décrochage des enzymes, des moyens de fixation plus durables de l'enzyme sur les nanotubes de carbone ont été recherchés.

5.1 Stabilisation du signal électrocatalytique sur les films de nanotubes de carbone

Dans un premier temps, des dérivés pyrènes portant une fonction COOH ou NH_2 ont été utilisés. Ces composés peuvent se lier de manière forte par interaction π-π aux parois des CNTs. Une multitude de sites d'ancrage covalent pour les hydrogénases sur les CNTs est ainsi supposée promouvoir la stabilité du signal électrocatalytique. Cette méthode a fait ses

preuves sur l'immobilisation de l'hydrogénase d'*Escherichia coli* et de la bilirubine oxydase de *Myrothecium verracuria* (BOD) en augmentant d'un facteur 5 les densités de courant observées (Krishnan et al., 2012). Cependant, dans nos conditions, bien qu'un couplage covalent ait été effectué, aucune stabilisation du signal électrocatalytique n'a été obtenue. Ce résultat n'est à ce jour pas compris, mais pourrait provenir du type de nanotubes utilisé.

Le polymère de Nafion® dont l'efficacité à stabiliser le signal électrocatalytique d'enzymes à l'électrode a été montrée (Reuillard et al., 2012), (Morra et al., 2011), a également été utilisé. Lorsque l'hydrogénase est adsorbée sur des CNTs puis recouverte d'un film de Nafion® 0.5 %, aucun signal catalytique n'est obtenu. Aucun signal d'oxydation de l'hydrogène n'est obtenu non plus lorsque l'hydrogénase est mélangée au Nafion® 0.5 % puis adsorbée sur les CNTs. L'isolement électrique de l'enzyme par le Nafion® pourrait être la cause de cette absence de signal électrochimique. Il a été montré par ailleurs que l'utilisation de sels de bromure a pour effet d'élargir la taille des pores du polymère de Nafion® (Moore et al., 2004b). De manière intéressante, l'addition de ces sels au Nafion® permet de récupérer un signal électrocatalytique de l'oxydation de l'hydrogène. Ces résultats sont préliminaires, mais dans la mesure où le signal obtenu est très stable, cette piste pourrait dans l'avenir être explorée.

En revanche la stabilité du signal électrocatalytique est améliorée en tirant partie des fonctions carboxyliques générées lors de l'oxydation à chaud en milieu acide sur les parois des nanotubes de carbone. Ces fonctions carboxyliques ont été activées par un couplage covalent classique utilisant le carbodiimide. Des liaisons covalentes entre les fonctions carboxyliques et les acides aminées lysines et arginines en surface de l'hydrogénase sont alors créées. Au préalable, la présence de tels résidus dans l'environnement proche du centre [Fe-S] distal est vérifiée, par l'analyse du modèle structural de MbH1. Parmi les résidus arginines et lysines présents à la surface de l'enzyme, deux arginines et deux lysines de la petite sous unité sont présentes à moins de 15 Å du centre [Fe-S] distal. Ces résidus assurent qu'une proportion d'hydrogénases sera en connexion directe avec l'électrode pour l'oxydation de l'H_2 (Figure 16).

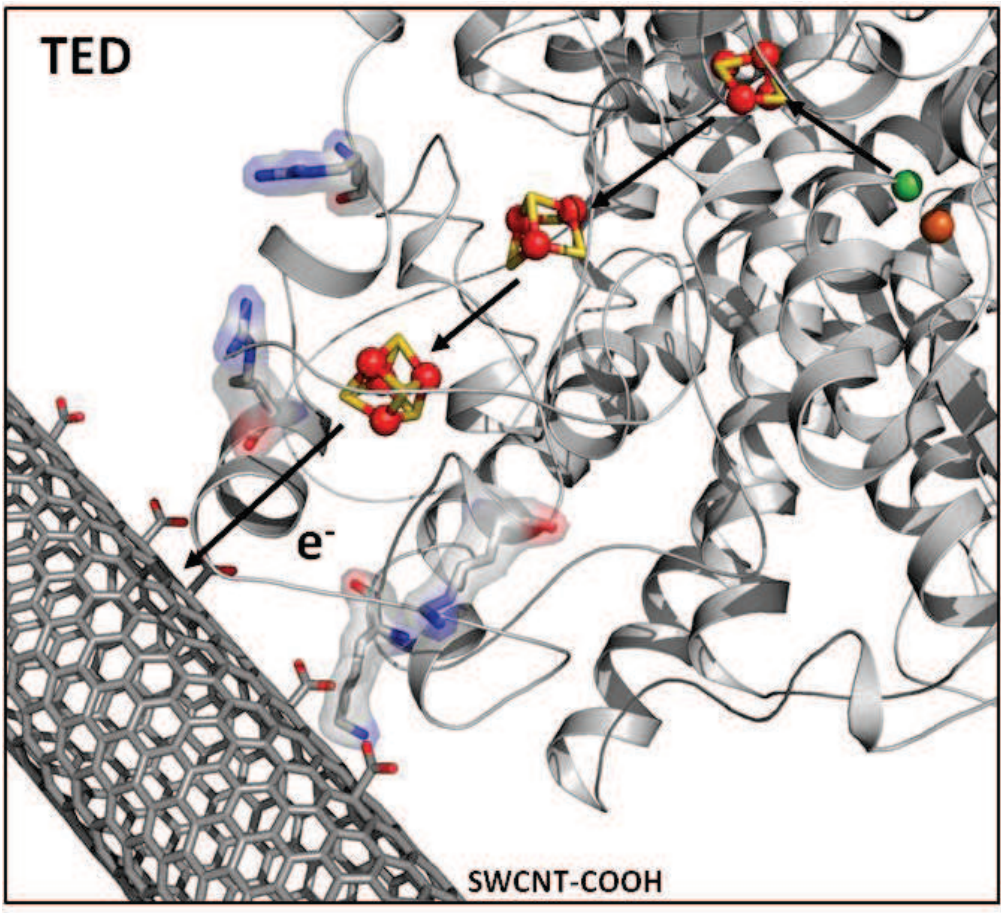


Figure 16 : Représentation de l'interaction entre MbH1 et un SWCNT-COOH. Les lysines et arginines disponibles pour un couplage covalent avec les fonctions carboxyliques du nanotube sont représentées en surface.

Les concentrations d'agent de couplage (carbodiimide EDC / N-hydroxy-succinimide NHS) à utiliser afin de ne pas nuire à l'activité de l'enzyme ont tout d'abord été évaluées. Pour cela, l'état de l'enzyme après son incubation avec une concentration croissante d'agent de couplage a été évalué par gel dénaturant SDS-Page (Figure 17). Sur ce type de gel, l'enzyme est dénaturée et migre donc en deux bandes: une bande d'un poids moléculaire de 70 kDa correspondant à la grande sous unité et une bande de 35 kDa correspondant à la petite sous unité. Pour les fortes concentrations d'EDC/NHS (400mM/100mM), l'enzyme ne migre pas dans le gel mais reste dans le puits de dépôt, ce qui signifie que les hydrogénases sont agrégées. C'est un phénomène préalablement débattu en termes d'inefficacité catalytique. Une quantité intermédiaire d'agent de couplage (40mM/10mM) qui n'induit pas d'agrégation de l'enzyme a donc été utilisée.

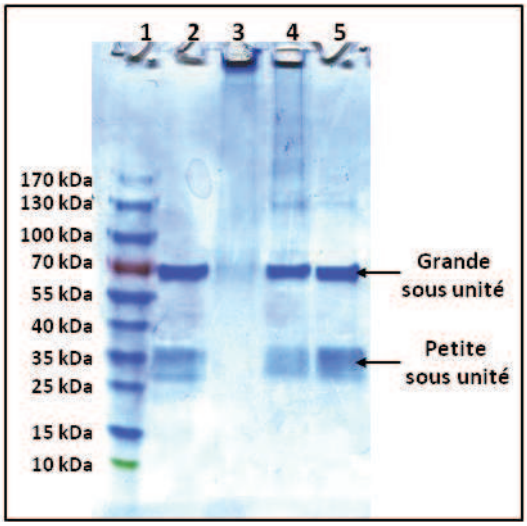


Figure 17 : Gel SDS-Page 15 % de MbH1 (10 µg) (piste 2) incubée avec 400 mM /100 mM (piste 3), 40 mM / 10 mM (piste 4) et 4 mM / 1mM EDC/NHS (piste 5). Marqueur de poids moléculaire (piste 1).

Une bonne stabilité du signal électrocatalytique direct pour l'oxydation de l'hydrogène est observée sur une vingtaine de minutes grâce à ce couplage covalent. La densité de courant catalytique subit moins de 5% de perte sur 25 min de cyclage voltamétrique entre -0,65 V et 0 V. Dans les mêmes conditions sans couplage covalent, une perte de 60 % du signal est observée (Figure 18).

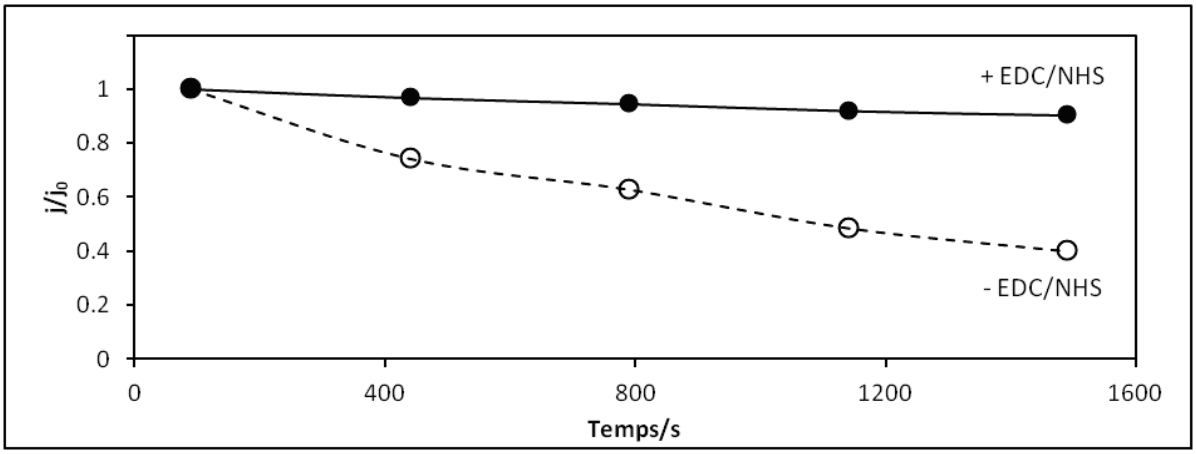


Figure 18 : Evolution de l'activité électrocatalytique de l'oxydation de l'hydrogène en fonction du temps par MbH1 adsorbée (○) ou couplée covalemment (●) sur des SWCNT-COOH. Tampon Hepes 50 mM pH 6,8, 60°C, sous H_2, vitesse de balayage : 5 mV.s^{-1}.

La stabilisation du courant catalytique de l'oxydation de l'hydrogène par MbH1 grâce au couplage covalent implique que la diminution de courant qui était observée en absence de couplage covalent était due soit à un relargage de l'enzyme, soit à un changement de conformation de l'enzyme qui n'est maintenant plus permis. Toutefois, bien que la stabilité du

signal électrocatalytique soit grandement améliorée, de nouvelles solutions doivent être envisagées afin de parfaire la stabilité de l'hydrogénase à l'électrode.

5.2 Premier prototype de biopile H_2/O_2

Les paramètres qui contrôlent l'orientation de l'hydrogénase MbH1 sur des interfaces électrochimiques ont été définis. Quelques pistes ont été avancées afin d'augmenter la stabilité de l'enzyme et du film protéique. J'ai montré aussi comment augmenter les densités de courant pour l'oxydation de l'H_2. L'objectif est maintenant de faire la preuve de concept d'une biopile fonctionnant à l'anode avec l'hydrogénase MbH1. Les contraintes fixées pour le développement de cette biopile enzymatique H_2/O_2 sont:

1- Utilisation des enzymes pour la réduction de l'O_2 et oxydation de l'H_2 dans un même électrolyte, afin d'envisager le retrait d'une membrane séparatrice entre les compartiments cathodique et anodique.

2- Utilisation de deux enzymes qui transfèrent directement les électrons à l'électrode. Ce processus direct permet de s'affranchir de l'utilisation de médiateurs redox solubles qui peuvent affecter la puissance de la pile, soit en diminuant sa f.e.m, soit en déroutant des électrons du circuit.

3- Recherche de fortes densités de courant, afin de maximiser la puissance de la biopile. Dans un souci purement économique et de cohérence avec la démarche de remplacement des catalyseurs chimiques basés sur le platine, j'exclus l'utilisation d'électrodes basées sur les métaux précieux tels que l'or.

5.2.1 Bioanode sélectionnée

Parmi les différents protocoles mis au point afin d'immobiliser MbH1, une bioanode a été sélectionnée dont les critères en terme de densité de courant catalytique, faible surtension et stabilité dans le temps permettent des performances les plus élevées possibles.

Le protocole d'immobilisation de l'hydrogénase sur nanotubes de carbone fonctionnalisés par les groupements carboxyliques, qui permet de connecter l'enzyme

directement à l'électrode avec de fortes densités de courant en solution saturée en hydrogène (> 500 $\mu A.cm^{-2}$), apparaît comme le plus intéressant. En outre, les groupements carboxyliques présents sur les nanotubes, permettent le couplage covalent de l'hydrogénase, dont le bénéfice sur la stabilité du signal électrocatalytique en fonction du temps a été montré.

Afin de sélectionner une bioanode compatible avec les conditions d'utilisation de l'hydrogénase, le pH optimum d'utilisation de l'hydrogénase immobilisée sur CNTs a été déterminé (Figure 19). Le potentiel de demi-vague pour l'oxydation de l'H_2 est déplacé vers les potentiels plus positifs quand le pH diminue, en relation avec le potentiel thermodynamique du couple H^+/H_2. L'activité maximale de l'hydrogénase est obtenue pour un pH proche de 7. Pour une application en biopile, le pH neutre sera donc optimal.

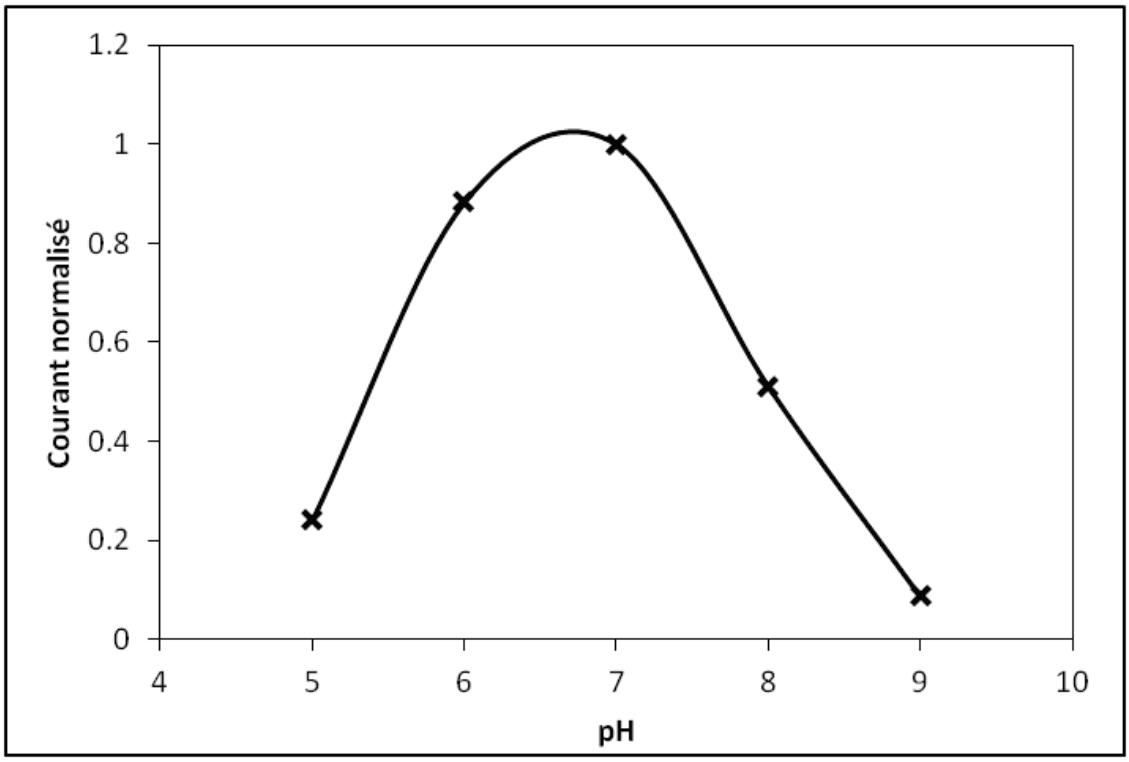


Figure 19 : Evolution du courant électrocatalytique de l'oxydation l'hydrogène en fonction du pH par MbH1 adsorbée sur une électrode de PG modifiée par des SWCNT-COOH. Tampon Britton Robinson 50 mM, 60°C, sous H_2, vitesse de balayage : 5 $mV.s^{-1}$.

5.2.2 Biocathode sélectionnée

Comme évoqué dans l'introduction, les enzymes classiquement utilisées à la cathode pour la réduction de l'oxygène sont des protéines à cuivre, comme la laccase et la BOD. Bien que leurs structures soient très proches, ces deux enzymes diffèrent par leurs inhibiteurs et

leur pH optimum d'utilisation. Pour rappel, le pH optimum d'activité est de 5 pour la laccase, et aux alentours de 7 pour la BOD. Puisque le pH optimum d'activité de l'hydrogénase est proche de 7, la BOD de *Myrothecium verracuria* a été choisie afin de catalyser la réduction catalytique de l'oxygène.

Plusieurs travaux récents ont été dédiés à la conception de biocathodes basées sur la BOD (Tableau 1) (Zheng et al., 2010), (Rozniecka et al., 2011), (Salaj-Kosla et al., 2012), (Jonsson-Niedziolka et al., 2010), (Song et al., 2011), (Durand et al., 2012). Ces études portent aussi bien sur la recherche d'interfaces permettant le TED, mais aussi sur des processus de transfert médié au sein de polymères d'osmium. On note sur le tableau 1 que les densités de courant sont améliorées par augmentation de la surface développée grâce à l'utilisation d'électrodes nanoporeuses, de nanoparticules, ou de nanotubes de carbone.

Organisme	Electrode	Modifications	Densité de courant (TED ou TEM)	stabilité	Ref
Myrothecium verrucaria	Carbone vitreux	CNTs	80 µA.cm-2 TED	☒	Zheng *et al.* (2010)
Myrothecium verrucaria	Carbone vitreux	Nanoparticules d'ITO	100 µA.cm^{-2} TED	60%/100min	Rozniecka *et al.* (2011)
Myrothecium verrucaria	Or nanoporeux	P017-epoxy	800 µA.cm^{-2} TED	100%/10 min	Salaj-Kosla *et al.* (2012)
Myrothecium verrucaria	Carbone vitreux	PSA/SWCNT/TMOS$_{gel}$	900µA.cm^{-2} TEM	☒	Jönsson-Niedziolka *et al.* (2010)
Trachyderma tsunodae	Carbone vitreux	SWCNT-COOH/PEGDGE/Polymère d'osmium	400µA.cm^{-2} TEM	99%/130 min	Song *et al.* (2011)
Bacillus pumilus	Carbone vitreux	PEGDGE/Polymère d'osmium	700µA.cm^{-2} TEM	50% /100 min @ 80°C	Durand *et al.* (2012)

Tableau 1 : Exemples de techniques d'immobilisation de la BOD, et performances et stabilité associées.

Une procédure d'immobilisation sur SWCNT-COOH a été choisie pour la BOD. Les réseaux de nanotubes de carbone ont en effet été souvent utilisés dans la littérature pour immobiliser la BOD, et ont montré leur capacité à favoriser un transfert d'électrons direct. L'utilisation d'un protocole commun d'immobilisation des deux enzymes permet en outre de simplifier la fabrication des deux bioélectrodes.

Cette procédure d'immobilisation permet d'obtenir une réduction catalytique de l'oxygène liée à un transfert d'électrons direct par le centre cuivre T1 (Chap.1 §3.4.1 figure 57). Ce processus de réduction débute à un potentiel de + 0,54 V, en accord avec la littérature

(Ramirez et al., 2008), (Cracknell et al., 2011), (Salaj-Kosla et al., 2012). Dans une solution saturée en oxygène, une densité de courant maximale de 700 $\mu A.cm^{-2}$ est atteinte (Figure 20).

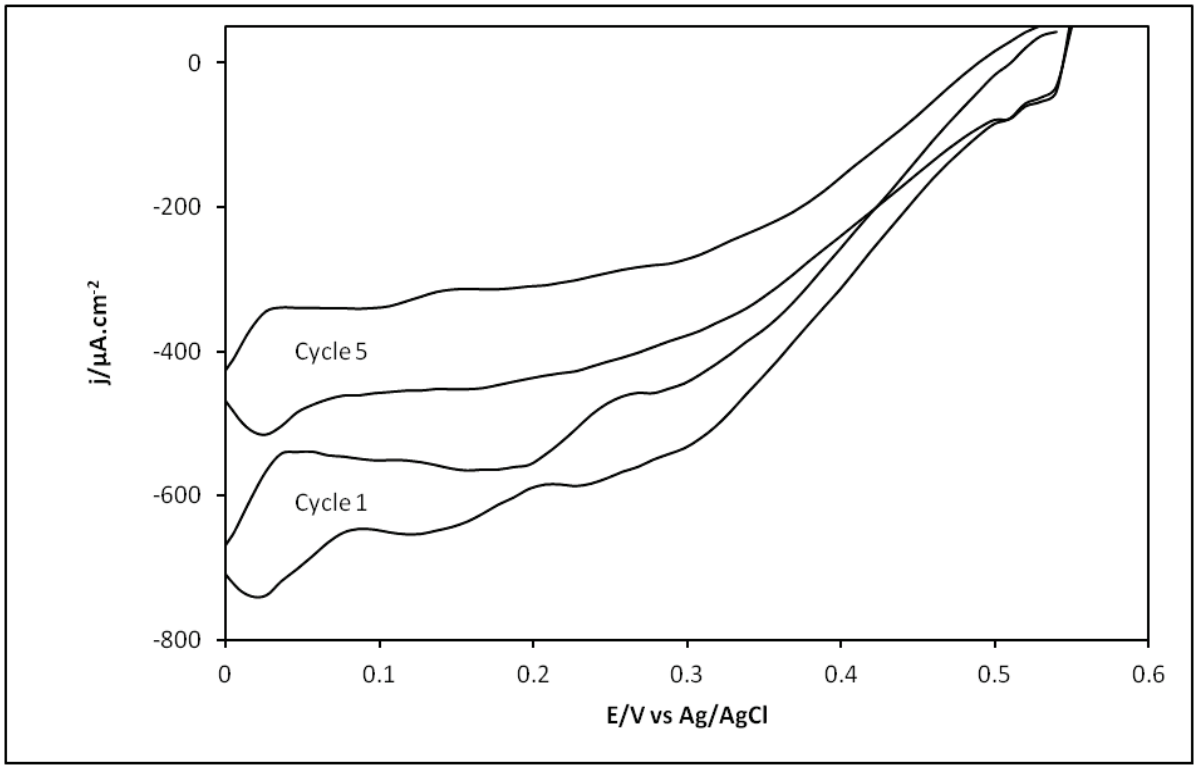


Figure 20 : CV de la réduction électrocatalytique de l'oxygène par la BOD immobilisée sur une électrode de PG modifiée par des SWCNT-COOH. Tampon Hepes 50 mM pH 6,8, 25°C, sous O_2, vitesse de balayage : 5 $mV.s^{-1}$.

Cependant, bien que les performances en termes de densité de courant soient satisfaisantes par rapport aux données de la littérature, la procédure de simple adsorption sur les nanotubes de carbone ne permet pas la stabilisation du courant dans le temps, comme l'atteste la diminution de la densité de courant après 5 cycles de balayage voltamétrique (Figure 20).

Afin d'immobiliser la BOD de manière covalente, et ainsi d'augmenter la stabilité du processus de catalyse, la présence de résidus lysine ou arginine dans l'environnement proche du centre cuivre T1, site qui transfère les électrons vers l'électrode, a été vérifiée. L'analyse de la structure de la BOD de *Myrothecium verracuria* révèle la présence de 4 arginines exposées au solvant, à moins de 15 Å du centre cuivre T1. Ces résidus sont disponibles pour un couplage covalent avec les groupements carboxyliques portés par les nanotubes de carbones (Figure 21).

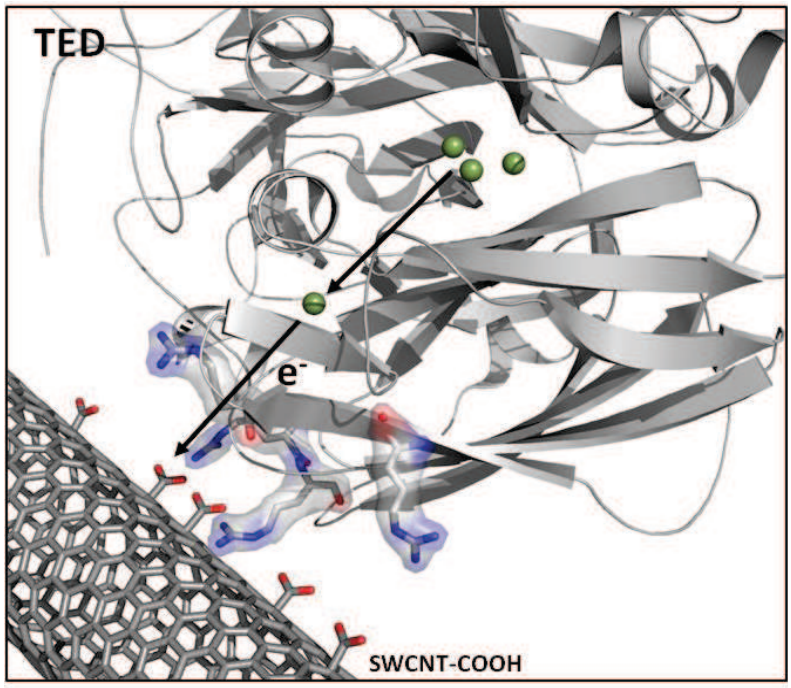


Figure 21 : Représentation de l'interaction entre la BOD de *Myrothecium verracuria* et un SWCNT-COOH. Les résidus arginines disponibles pour un couplage covalent avec les fonctions carboxyliques du nanotube de carbone sont représentés en surface.

De la même manière qu'avec l'hydrogénase, la quantité d'agent de couplage EDC/NHS évitant l'agrégation de la BOD a été évaluée. L'enzyme dénaturée migre à un poids moléculaire attendu de 60 kDa (Figure 22). Une fois encore les fortes concentrations d'EDC/NHS induisent une agrégation de l'enzyme. L'utilisation d'EDC/NHS à une concentration de 40 mM / 10mM identique à celle utilisée pour le couplage de l'hydrogénase est choisie.

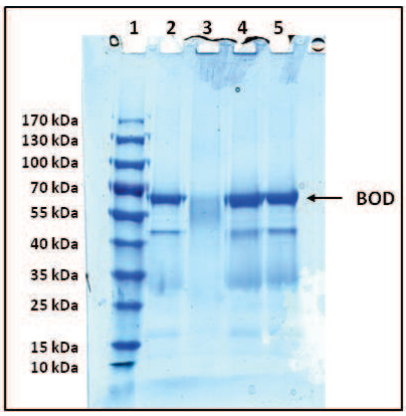


Figure 22 : Gel SDS-Page 15 % de la Bilirubien oxydase de *Myrothecium verracuria* (10 µg) (piste 2) incubée avec 400 mM /100 mM (piste 3), 40 mM / 10 mM (piste 4) et 4 mM / 1mM EDC/NHS (piste 5). Marqueur de poids moléculaire (piste 1).

Grâce au couplage covalent *via* le carbodiimide, la chute de la densité de courant catalytique enregistrée en continu par voltamétrie cyclique passe de 25 % à moins de 5 % sur une durée de 25 min (Figure 23).

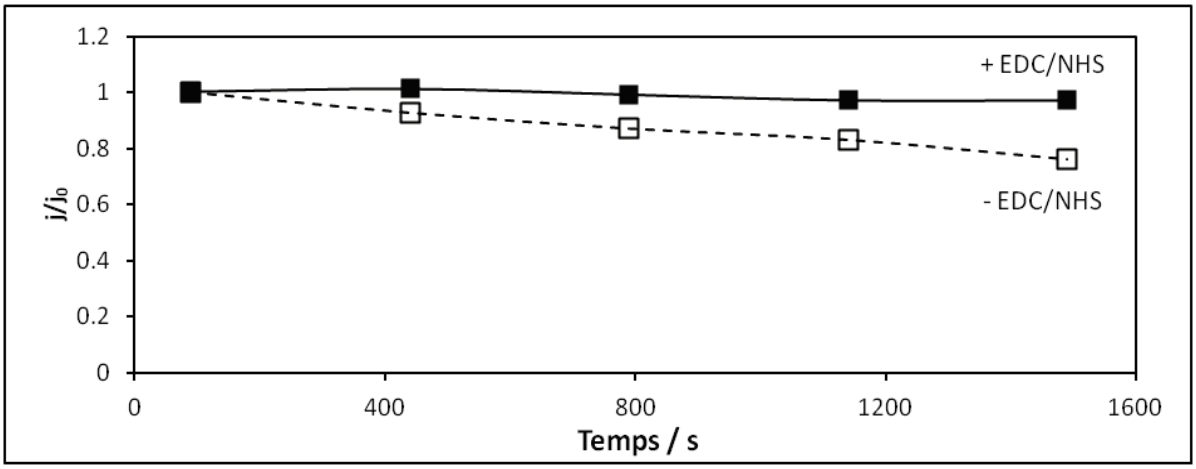


Figure 23 : Evolution de l'activité électrocatalytique de la réduction de l'oxygène par la BOD de *Myrothecium verracuria* adsorbée (□) ou couplée covalemment (■) sur SWCNT-COOH. Tampon Hepes 50 mM pH 6,8, 25°C, sous O_2, vitesse de balayage : 5 mV.s^{-1}.

5.2.3 Architecture de la biopile H_2/O_2

Deux bioélectrodes sont disponibles, l'une catalysant l'oxydation de l'hydrogène à l'anode, et l'autre la réduction de l'oxygène à la cathode, toutes deux par un processus de transfert d'électrons direct. De plus, les deux enzymes sélectionnées catalysent leur réaction respective dans le même électrolyte, avec des densités de courant supérieures à 500 µA.cm^{-2}. La stabilité dans le temps permet d'envisager la réalisation d'un premier prototype de biopile H_2/O_2. Cependant, la température de fonctionnement des deux enzymes est différente. L'hydrogénase hyperthermophile d'*Aquifex aeolicus* est plus active à température élevée. Classiquement une température de 60 °C a été utilisée pour les études électrochimiques. BOD mésophile de *Myrothecium verracuria* est quant à elle dégradée à des températures supérieures à 40°C (Durand et al., 2012).

En l'absence à ce jour d'oxydase thermophile, une cellule à deux compartiments a été conçue, avec possibilité de réguler la température des deux demi-cellules indépendamment (Figure 24). Une membrane séparatrice échangeuse de protons entre les compartiments cathodique et anodique est conservée. Cette membrane limite la diffusion de l'oxygène dans le compartiment anodique avec deux conséquences bénéfiques : l'inhibition réversible de

l'hydrogénase par l'oxygène (même si cette inhibition est moindre dans le cas de MbH1), mais aussi la réduction de l'oxygène sur l'anode sont minimisées. De plus, les meilleures performances du système en saturant les deux compartiments anodique et cathodique en hydrogène et oxygène respectivement sont espérées, sans pour autant risquer de former un mélange de gaz explosif (Schroder et al., 2003). Ainsi les concentrations atteintes en H_2 et O_2 dissous dans les compartiments anodiques et cathodiques sont de 0,6 mM à 60 °C et 0,26 mM à 25 °C. Les k_M des hydrogénases [Ni-Fe] et de la BOD pour l'H_2 et l'O_2 respectivement sont de 9 µM et 0,7 mM (Krishnan et al., 2012). La valeur du k_M de la BOD étant très élevée, la concentration en O_2 sera limitante.

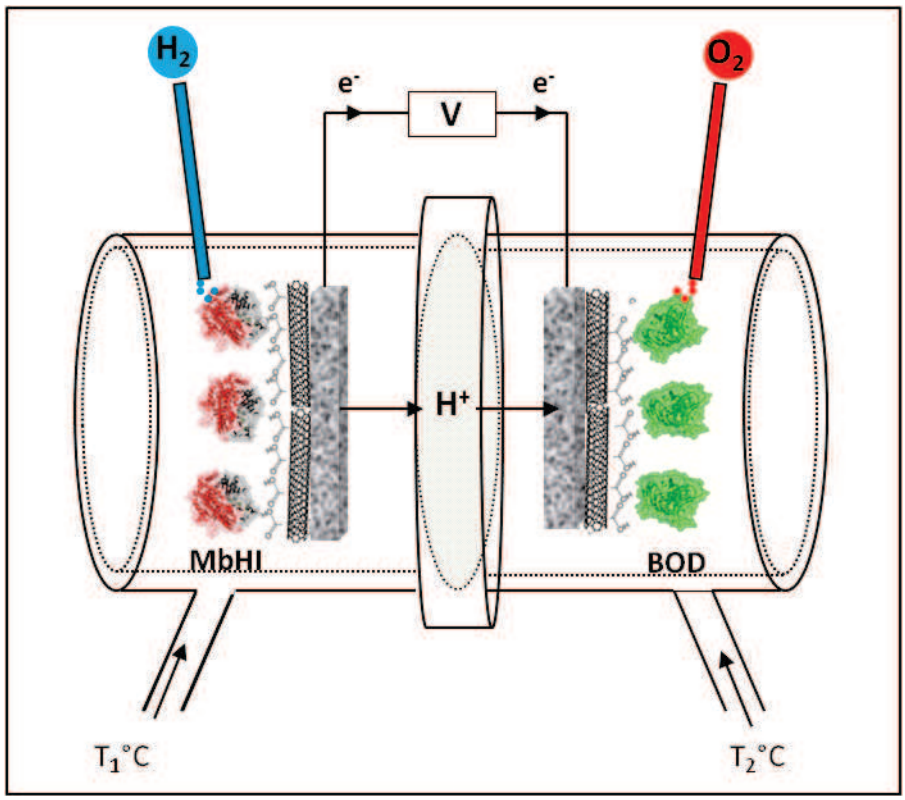


Figure 24 : Représentation schématique de la biopile H_2/O_2.

5.3 Analyse du mode de fonctionnement de la biopile

5.3.1 Transposition des bioélectrodes vers la biopile (Collaboration avec les Dr C. Innocent et S. Tingry, IEM, Montpellier)

Les courbes de polarisation de la bioanode et de la biocathode sont d'abord enregistrées séparément. L'objectif est de vérifier que la transposition des bioélectrodes de la cellule électrochimique, vers la biopile conçue, n'affecte pas les performances des deux

bioélectrodes. Lorsque les enzymes sont immobilisées covalemment sur des nanotubes de carbone SWCNT-COOH, les densités de courant catalytique atteintes sont de 900 µA.cm^{-2} et 600 µA.cm^{-2} pour la BOD sous 100 % O_2 et MbH1 sous 100 % H_2 respectivement (Figure 25). En comparaison, les densités de courant obtenues sur des électrodes de PG sans SWCNT-COOH sont 35 et 300 fois inférieures pour MbH1 et la BOD respectivement.

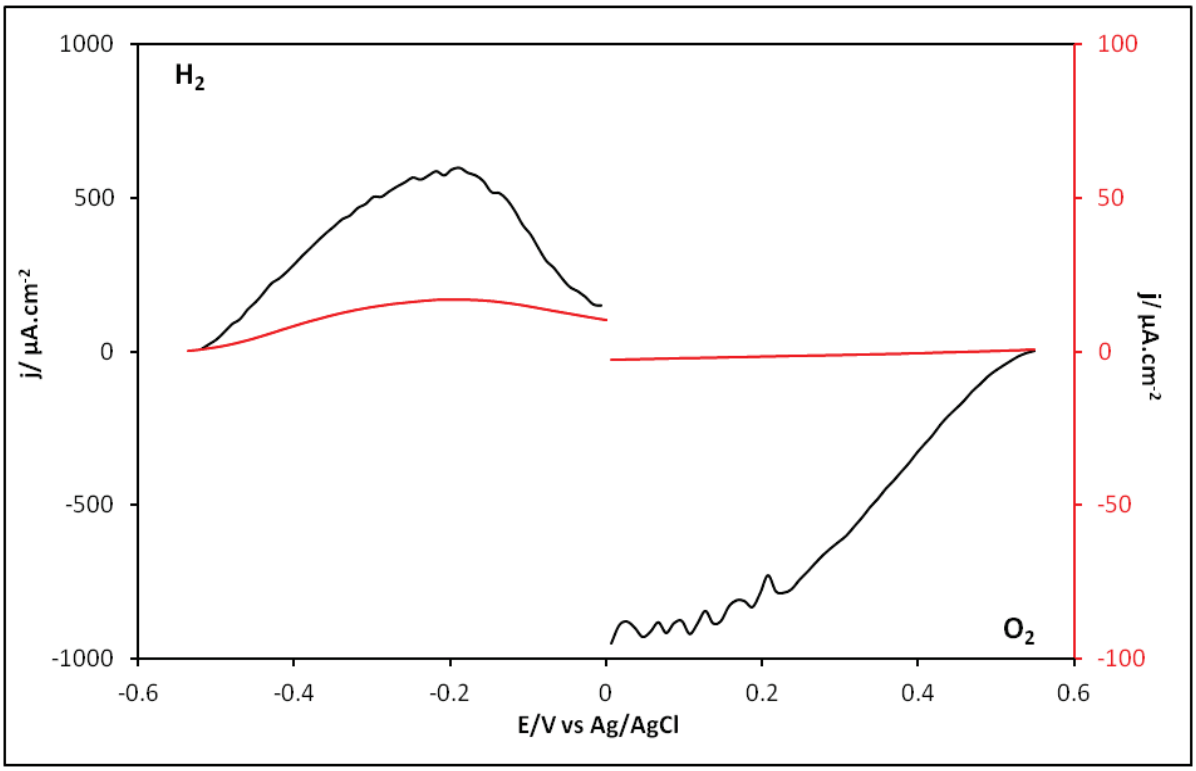


Figure 25 : Courbes de polarisation de MbH1 et de la BOD immobilisées covalemment sur une électrode de PG modifiée par des SWCNT-COOH (noir) ou sur une PG nue (rouge). Tampon Hepes 50 mM pH 6,8, 60°C à l'anode / 25°C à la cathode, vitesse de balayage : 3,33 mV.s^{-1}.

5.3.2 Mise en évidence d'un phénomène limitant

Lorsque les deux électrodes sont connectées, une f.e.m de 1,1 V est relevée aux bornes de la biopile. Une densité de puissance maximum de 270 µW.cm^{-2} est obtenue pour une tension de 0,6 V (figure 26). L'évolution de la densité de courant en fonction du potentiel suivie par polarisation de la pile est inhabituelle. En effet, les densités de courant les plus fortes sont en général atteintes pour les tensions de pile les plus faibles. Or dans nos conditions expérimentales, la densité de courant catalytique chute brutalement pour des tensions inférieures à 0,4 V (Figure 26 A).

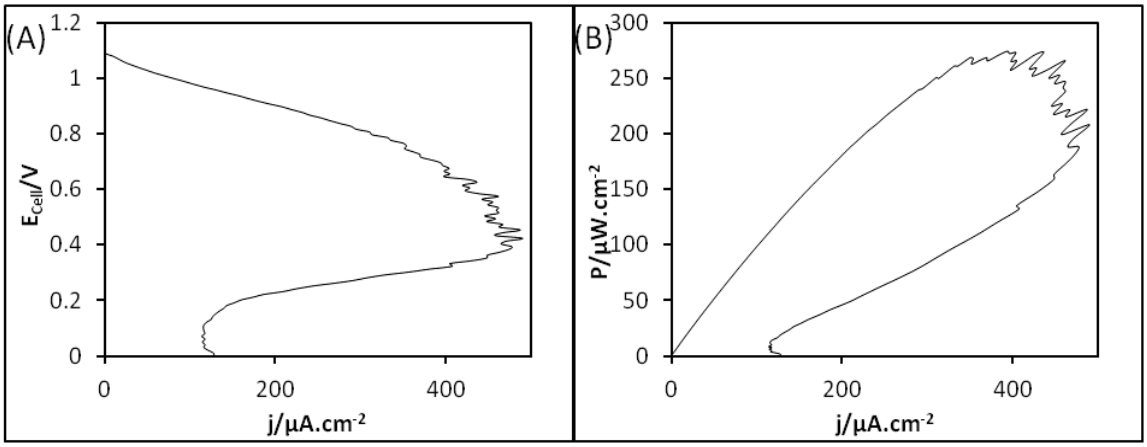


Figure 26 : (A) Courbe de polarisation de la biopile et (B) courbes de puissance associée. Tampon Hepes 50 mM pH 6,8, H_2 atm. 60°C à l'anode / O_2 atm. 25°C à la cathode, vitesse de balayage : 3,33 mV.s^{-1}.

L'évolution non conventionnelle de la densité de courant catalytique en fonction de la tension de la pile se reflète sur la courbe de puissance (Figure 26 B). Ce comportement était aussi observé dans la première biopile H_2/O_2 développée dans l'équipe de F.A. Arsmtrong (Vincent et al., 2006). La bioanode était basée sur l'hydrogénase [Ni-Fe] tolérante à l'oxygène de *Ralstonia metallidurens*, qui présente les mêmes phénotypes que MbH1, hyperthermophilie exceptée. La chute de courant peut être attribuée à la désactivation anaérobie réversible à haut potentiel des hydrogénases [Ni-Fe] (Cracknell et al., 2008). Cette inhibition se produit à des potentiels supérieurs à - 0,25 V vs Ag/AgCl, et induit une diminution de l'activité catalytique de l'enzyme.

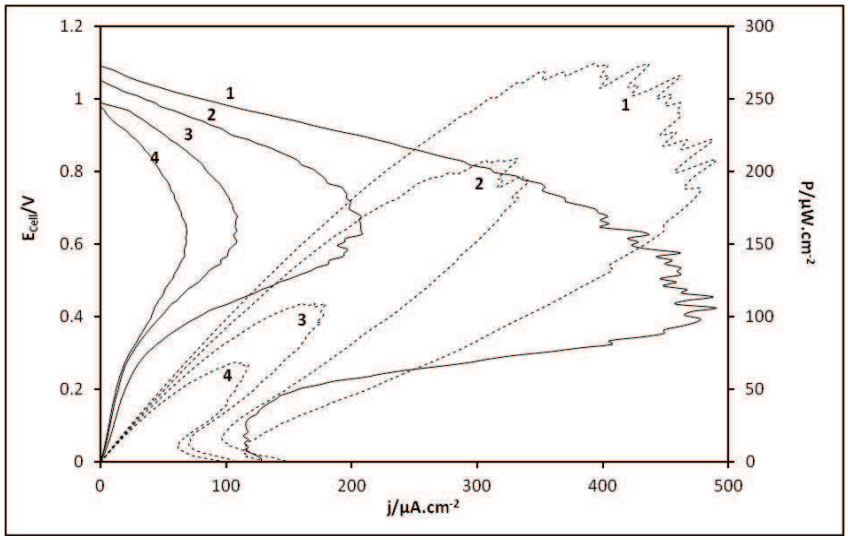


Figure 27 : Evolution de 4 courbes de polarisation consécutives (lignes noires continues) de la biopile et des courbes de puissance associées (lignes pointillées). Tampon Hepes 50 mM pH 6,8, H_2 atm. 60°C à l'anode / O_2 atm. 25°C à la cathode, vitesse de balayage : 3,33 mV.s^{-1}.

De plus, si l'on effectue plusieurs polarisations successives sur la même biopile, la densité de courant maximale diminue, passant de 500 µA.cm^{-2} à 70 µA.cm^{-2}. La densité de puissance maximale passe elle de 270 µW/cm^2 à 60 µW/cm^2. On remarque également une diminution de f.e.m passant de 1,1 V à 0,96 V lors de la 4ème polarisation (Figure 27). Si la désactivation réversible anaérobie à haut potentiel de l'hydrogénase est responsable de ce phénomène, l'application d'un potentiel réducteur de -0,7 V vs Ag/AgCl à l'anode devrait permettre la réactivation des hydrogénases [Ni-Fe] inactivées (Krishnan et al., 2012). Or, même après plusieurs dizaines de minutes d'application d'un potentiel réducteur, la f.e.m initiale de la pile n'est pas restaurée. Les courbes de polarisation de la bioanode et de la biocathode sont alors réenregistrées indépendamment afin de vérifier l'état de chacune des deux bioélectrodes. La comparaison entre les courbes de polarisation des bioéléctrodes avant et après les 4 polarisations successives de la biopile est présentée dans la figure 28. Clairement, tandis que la BOD catalyse toujours efficacement la réduction de l'oxygène avec 77 % de sa densité de courant initiale, MbH1 a quant à elle perdu 92% son activité catalytique d'oxydation de l'hydrogène.

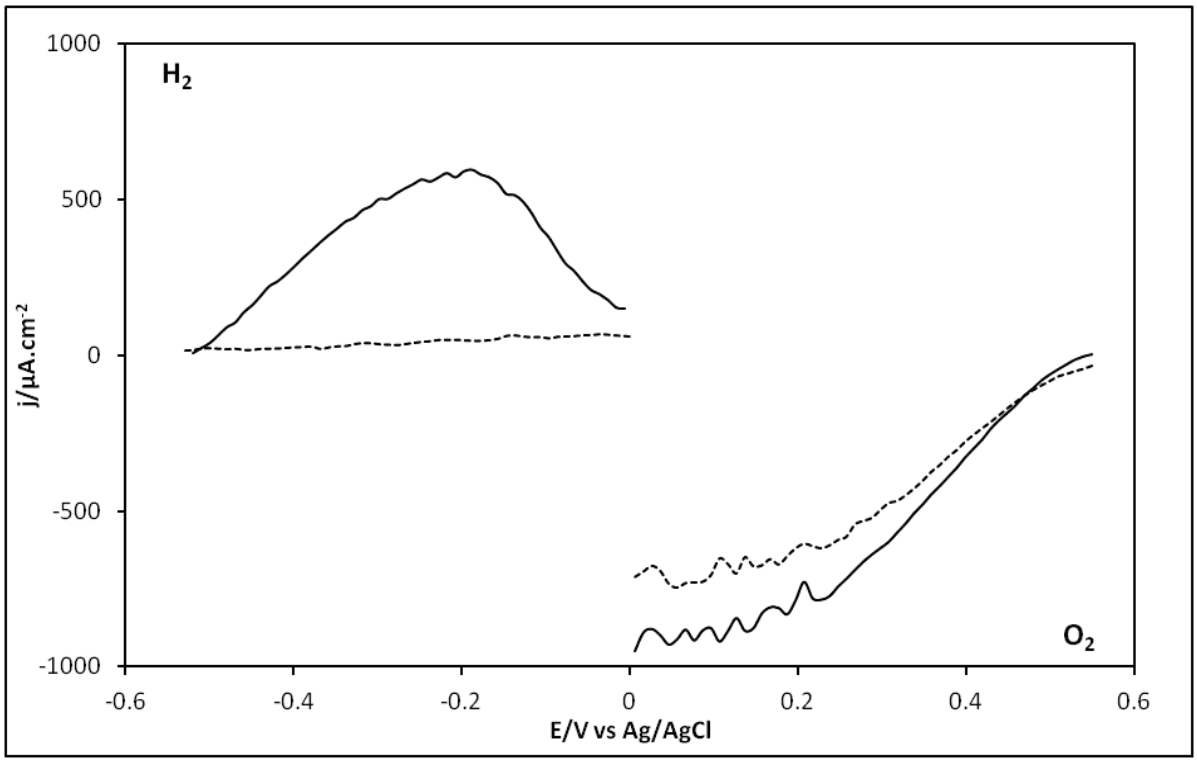


Figure 28 : Courbes de polarisation de MbH1 et de la BOD immobilisées covalemment sur une électrode de PG modifiée par des SWCNT-COOH avant (noir continu) et après (noir pointillé) 4 polarisations successives de la biopile associée. Tampon Hepes 50 mM pH 6,8, 60°C à l'anode / 25°C à la cathode, vitesse de balayage : 3,33 mV.s^{-1}.

5.3.3 La bioanode limite les performances

Un comportement similaire a été mis en évidence dans la biopile H_2/O_2 concurrente basée sur l'hydrogénase [Ni-Fe] tolérante à l'oxygène d'*Escherichia coli* et la BOD de *Myrothecium verracuria* (Wait et al., 2010). Les conditions expérimentales sont toutefois différentes : aucune membrane échangeuse de protons ne sépare le compartiment anodique du compartiment cathodique et la biopile est alimentée par un mélange de gaz pauvre en hydrogène (4% H_2/ 96 % air). Les auteurs montrent que la puissance de la biopile diminue pour les tensions faibles et qu'elle n'est pas totalement restaurée après la mesure. La f.e.m initiale n'est pas non plus restaurée. A partir de ces données ils concluent que la perte irréversible de puissance est liée aux conditions expérimentales utilisées, en particulier un milieu riche en oxygène dans l'environnement de l'anode qui favorise l'inactivation de l'hydrogénase.

Nos conditions expérimentales sont très différentes. L'hydrogénase est peu exposée à l'oxygène puisque la membrane échangeuse de protons, imperméable au gaz, sépare les deux demi-cellules et évite la diffusion de l'O_2 côté anodique. La perte de puissance irréversible ne peut donc pas être attribuée à une inhibition aérobie de l'hydrogénase. En revanche, il faut remarquer que dans la biopile utilisée, l'anode est limitante. En effet la densité de courant maximum relevée à l'anode plafonne à 600 $\mu A.cm^{-2}$. La biocathode présente elle, une densité de courant maximum de 900 $\mu A.cm^{-2}$. Lors de la polarisation de la pile, cette dissymétrie des densités de courant anodique et cathodique va induire une augmentation du potentiel anodique. Or MbH1 est réversiblement inhibée à des potentiels supérieurs à -0,2 V vs Ag/AgCl, et j'ai montré au cours de ce travail qu'elle est irréversiblement inactivée à des potentiels supérieurs à +0,2 V vs Ag/AgCl. On peut donc raisonnablement penser qu'une biopile où l'anode ne serait pas limitante pourrait délivrer une puissance même après plusieurs polarisations.

Afin de vérifier cette hypothèse, trois configurations ont été analysées, obtenues en ajustant les densités de courant des bioélectrodes par modification de la quantité de BOD immobilisée à la cathode (Figure 29):

1- anode limitante ($j_a < j_c$),

2- cathode limitante ($j_a > j_c$),

3- anode et cathode équilibrées (j_a=j_c).

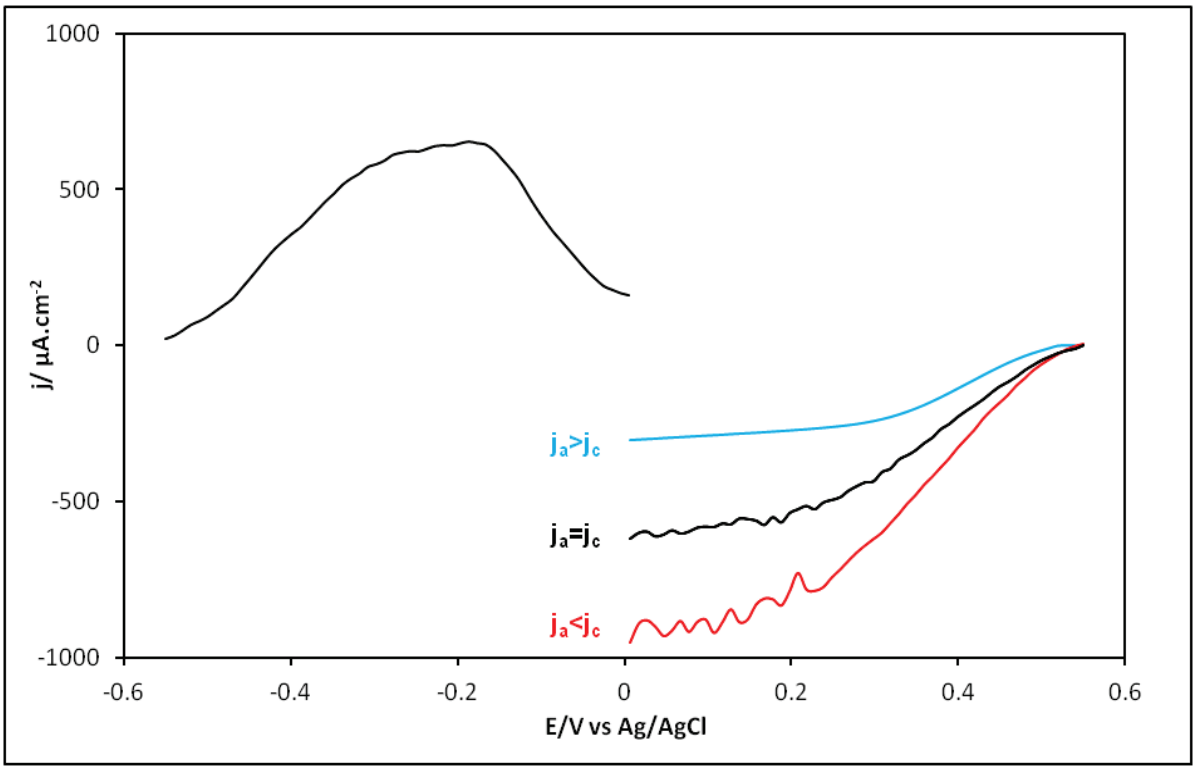


Figure 29: Courbes de polarisation de MbH1 et de la BOD immobilisées covalemment sur une électrode de PG modifiée par des SWCNT-COOH. La concentration de BOD a été ajustée à 2µM (bleu), 20µM (noir) et 100µM (rouge) afin de faire varier les ratio j_a/j_c. Tampon Hepes 50 mM pH 6,8, 60°C à l'anode / 25°C à la cathode, vitesse de balayage : 3,33 mV.s^{-1}.

Pour ces trois configurations, les courbes courant/tension sous polarisation de la pile sont enregistrées, et la courbe de puissance associée est déterminée (Figure 30).

1- Dans le cas d'une limitation anodique (j_a<j_c), la chute de la densité de courant pour les faibles tensions de la pile déjà décrite ci-dessus est observée. Son impact sur l'évolution de la puissance est retrouvé.

2- Lorsque la cathode est limitante (j_a>j_c), la courbe de polarisation et la courbe de puissance suivent une évolution déjà observée dans le cas de déplétion en oxygène à la cathode (Jayashree et al., 2010).

3- Enfin, lorsque les deux bioélectrodes délivrent des densités de courant équivalentes (j_a=j_c), la courbe de polarisation et la courbe de puissance associée décrivent l'évolution attendue, décrite dans la partie bibliographique de ce manuscrit (Chap.1 § 3.4.3.2 Figure 67).

Il faut noter que pour ces deux derniers cas, la f.e.m de la pile est totalement restaurée après une série de polarisations de biopile.

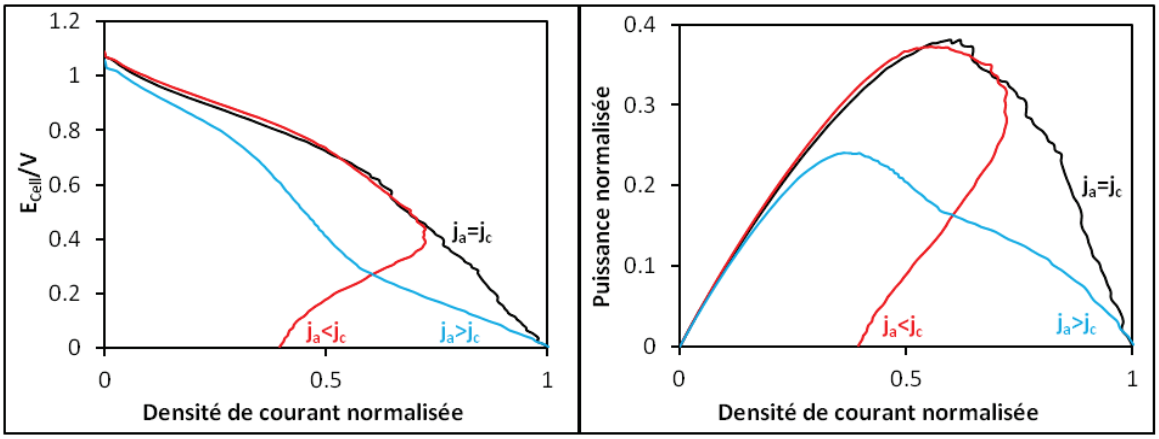


Figure 30 : Courbes de polarisation (à droite) et courbes de puissance associées (à gauche) de la biopile en fonction des ratios j_a/j_c. Les densités de courant, et par conséquent les densités de puissance, ont été normalisées pour plus de clarté. Tampon Hepes 50 mM pH 6,8, H_2 atm. 60°C à l'anode / O_2 atm. 25°C à la cathode, vitesse de balayage : 3,33 mV.s^{-1}.

Le potentiel pris par l'anode au cours de la polarisation en fonction de la tension de la biopile dans ces trois configurations est simultanément enregistré (Figure 31).

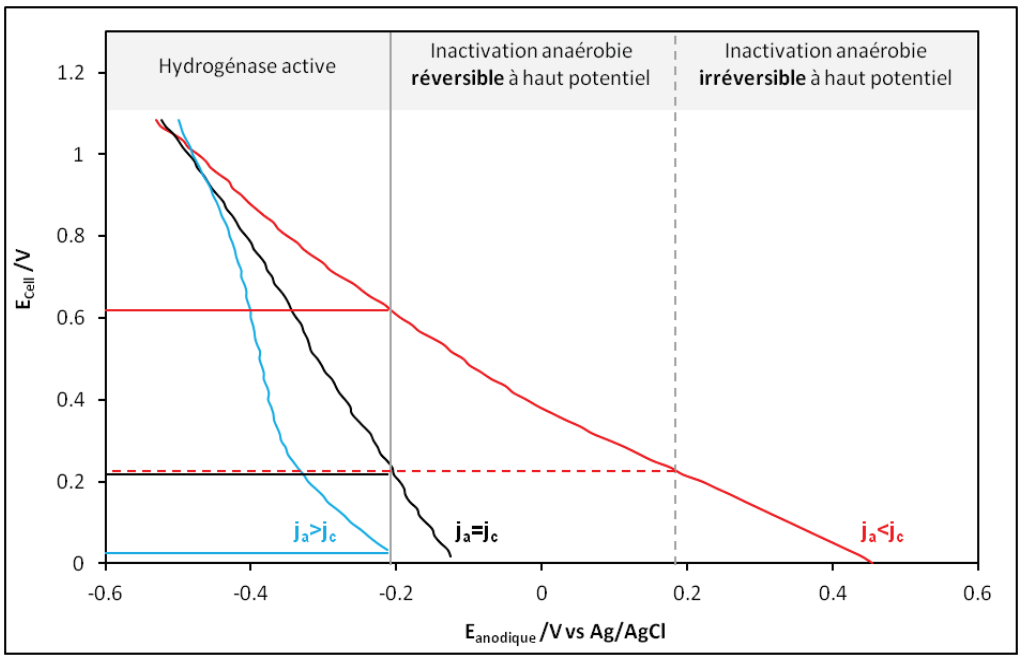


Figure 31 : Evolution du potentiel anodique en fonction de la tension de la pile pour différents ratios j_a/j_c. Tampon Hepes 50 mM pH 6,8, H_2 atm. 60°C à l'anode / O_2 atm. 25°C à la cathode, vitesse de balayage : 3,33 mV.s^{-1}.

1- Dans le cas d'une limitation anodique ($j_a<j_c$), le potentiel de l'anode atteint des potentiels supérieurs à + 0,4 V. Cette situation peut également se retrouver en présence d'un ratio $O_2/H_2>>1$, comme dans le cas de la biopile développée dans l'équipe du Pr. Armstrong (Wait et al., 2010). La montée en potentiel de l'anode était induite par l'inhibition aérobie de l'hydrogénase qui entraîna de fait une limitation anodique. Notre situation est différente puisque le compartiment anodique est *a priori* exempt d'oxygène.

2- Lorsque la cathode est limitante ($j_a>j_c$), le potentiel de l'anode est toujours inférieur à -0,2 V.

3- Lorsque les deux bioélectrodes délivrent des densités de courant équivalentes ($j_a=j_c$), le potentiel de l'anode ne dépasse pas la valeur de -0,1 V.

5.3.4 Définition des domaines de fonctionnement

Cette évolution du potentiel de l'anode en fonction des densités de courant relatives de chacune des deux bioélectrodes influe directement sur le comportement électrochimique de l'hydrogénase. Trois zones de potentiel anodique peuvent effectivement être définies selon les informations acquises sur l'activité de l'hydrogénase en fonction du potentiel. Une première zone, s'étalant de -0,55 V à -0,2 V vs Ag/AgCl est définie comme la zone où l'hydrogénase catalyse l'oxydation de l'hydrogène sans subir d'inactivation. Une deuxième zone de -0,2 V à +0,2 V vs Ag/AgCl correspond aux potentiels responsables de l'inactivation anaérobie réversible de l'enzyme (Vincent et al., 2007). La dernière zone, de +0,2 V à +0,6 V [7] vs Ag/AgCl est létale pour l'hydrogénase. Sans connaître à l'heure actuelle la conformation et l'état du site actif, cette zone de potentiel induit une inactivation anaérobie irréversible de l'enzyme. Cette inactivation n'est pas liée à la concentration en oxygène, mais bien aux potentiels oxydants.

Ainsi :

1- Dans le cas d'une limitation anodique ($j_a<j_c$), l'hydrogénase est irréversiblement inactivée. La f.e.m de la pile diminue, le signal d'oxydation de l'hydrogène disparaît après plusieurs polarisations successives

[7] Limite supérieure arbitraire

2- Lorsque la cathode est limitante ($j_a > j_c$), l'hydrogénase ne subit aucune inactivation, et par conséquent la f.e.m de la biopile est restaurée après polarisation.

3- Lorsque les deux bioélectrodes délivrent des densités de courant équivalentes ($j_a = j_c$), l'hydrogénase subit une inactivation anaérobie réversible. La f.e.m de la biopile est restaurée en fonction de la cinétique de réactivation de l'enzyme.

L'analyse des courbes de polarisation et le suivi en potentiel de chacune des bioélectrodes permettent ainsi de définir les paramètres de tension de fonctionnement de la biopile pour lesquels l'hydrogénase ne subit aucune inactivation :

- $j_a > j_c$: la biopile fonctionne entre 0 et 1,1 V
- $j_a = j_c$: la biopile fonctionne entre 0,2 et 1,1V
- $j_a < j_c$: la biopile fonctionne entre 0,6 et 1,1V

Ces domaines permettent de définir une gamme de tension de pile pour laquelle l'hydrogénase ne sera pas inhibée quel que soit le ratio j_a/j_c. En se rapportant à la figure 31, notre biopile peut fonctionner à partir d'une tension minimum de 0,6 V sans que les performances ne soient altérées par l'inactivation de l'hydrogénase.

5.4 Une Biopile H_2/O_2 fonctionnant à haute température

5.4.1 Performances du système optimisé

Lorsque le système électrochimique est optimisé à un ratio $j_a = j_c$, une densité de puissance de 300 $\mu W.cm^{-2}$ pour une tension de 0,6 V est obtenue (Figure 32). Ces performances font de notre biopile, la biopile la plus puissante construite à ce jour. Sans minimiser ce résultat, il faut cependant admettre qu'il n'existe à ce jour que deux biopiles H_2/O_2 performantes. La biopile H_2/O_2 concurrente basée sur l'hydrogénase tolérante à l'oxygène d'*Escherichia coli* et la BOD de *Myrothecium verracuria* développe une densité de puissance de 120 $\mu W.cm^{-2}$. Les enzymes sont immobilisées covalemment sur des nanotubes de carbone de type MWCNT, eux-mêmes modifiés par des pyrènes fonctionnalisés. Outre la toxicité des composés pyréniques, notre construction apparaît plus simple puisqu'elle permet l'immobilisation des enzymes en une seule étape.

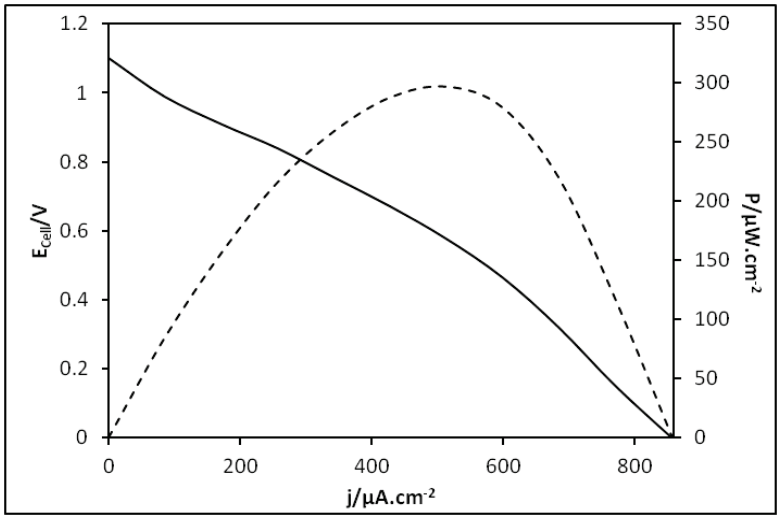


Figure 32 : Courbes de tension (ligne noire) et de puissance (ligne pointillée) de la biopile en fonction de la densité de courant pour un système optimisé j_a=j_c. Tampon Hepes 50 mM pH 6,8, H_2 atm. 60°C à l'anode / O_2 atm. 25°C à la cathode, vitesse de balayage : 3,33 mV.s^{-1}.

Le bénéfice apporté par l'utilisation des nanotubes de carbone de type SWCNT-COOH sur les performances de la biopile, a tout d'abord été vérifié. Une biopile avec des électrodes de PG nue modifiées uniquement par les enzymes a été construite (Figure 33). Des puissances inférieures à 1,5 µW.cm^{-2} sont obtenues, soit 0.5 % de la puissance de la biopile en présence de nanotubes de carbone. Une pile basée sur des électrodes de PG modifiées seulement par des nanotubes de carbone de type SWCNT-COOH sans enzyme ne délivre elle aussi qu'une puissance de l'ordre du µW/cm^2 (Figure 33).

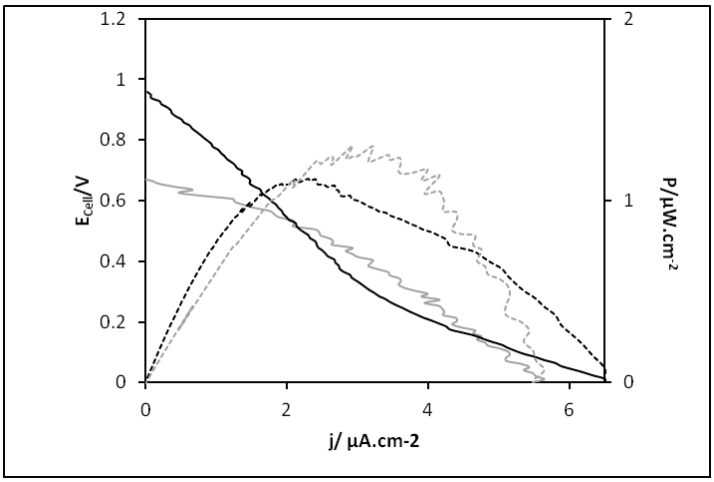


Figure 33 : Courbes de tension (ligne noire) et de puissance (ligne pointillée) de la biopile en fonction de la densité de courant pour des enzymes immobilisées sur électrode de PG nue (noir) et électrode de PG modifiée par des SWCNT-COOH sans enzymes (gris). Tampon Hepes 50 mM pH 6,8, H_2 atm. 60°C à l'anode / O_2 atm. 25°C à la cathode, vitesse de balayage : 3,33 mV.s^{-1}.

Les paramètres propres à l'immobilisation des enzymes et aux conditions de température sont ensuite examinés en vue d'une optimisation des performances de la biopile. Ces études ont été faites dans des conditions indépendantes du ratio j_a/j_c , c'est à dire pour une tension de pile supérieure à 0,6 V.

5.4.2 Influence de la température

Un paramètre essentiel dans notre système est la température. L'impact de la température sur les performances de la biopile a été évalué en enregistrant la densité de courant par chronoampérométrie à un potentiel de pile de 0,65 V. La température du compartiment anodique contenant MbH1 T_a, ainsi que celle du compartiment cathodique contenant la BOD de *Myrothecium verracuria* T_c ont été indépendamment modulées (Figure 34).

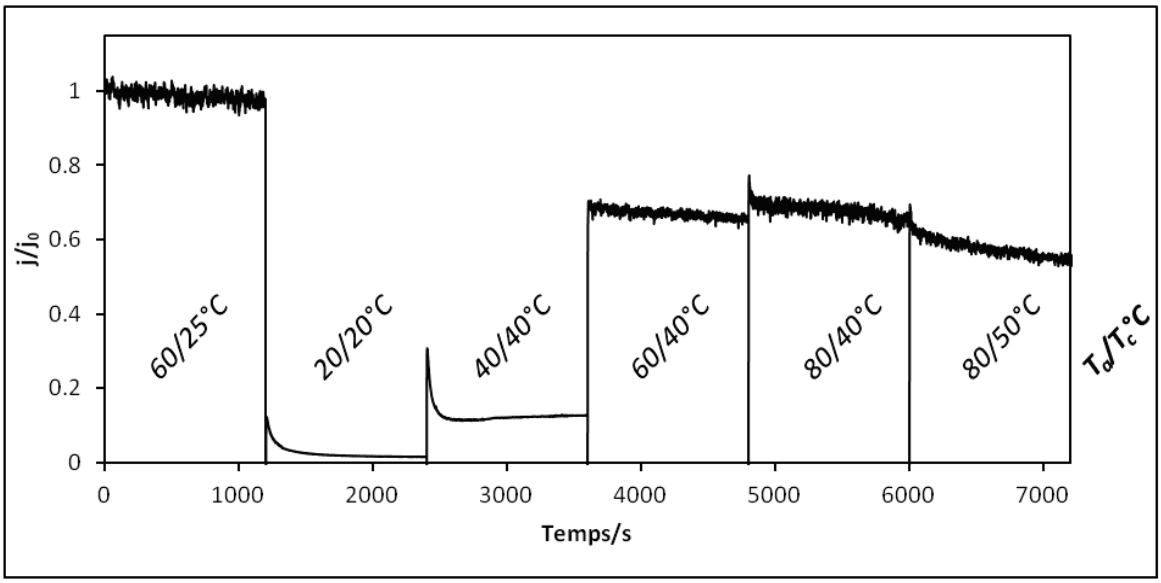


Figure 34 : Evolution de la densité de courant de la biopile en fonction des températures du compartiment anodique et cathodique T_a/T_c suivi par chronoampérometrie à 0,65 V. Tampon Hepes 50 mM pH 6,8, H_2 atm, vitesse de balayage : 3,33 mV.s^{-1}.

Deux phénomènes sont mis en évidence. La densité de courant est dépendante de la température du compartiment anodique. Ce résultat est en accord avec le caractère hyperthermophile de l'hydrogénase. Il n'est pas surprenant puisque il a été montré par ailleurs que l'activité électrocatalytique de MbH1 pour l'oxydation de l'H_2 augmente avec la température (Luo et al., 2009). La densité du courant augmente donc pour une température fixée dans le compartiment cathodique quand augmente la température dans le compartiment anodique de 20 à 60°C. L'augmentation de la température du compartiment anodique jusqu'à

80 °C induit une diminution de la densité de courant. La densité de courant dans des conditions de température 60°C à l'anode et 40°C à la cathode est d'ailleurs déjà bien inférieure à la mesure effectuée dans les conditions initiales 60°C à l'anode et 25°C à la cathode. Il est peu probable que cette diminution importante de la densité de courant soit liée à l'hydrogénase. Celle-ci présente une remarquable résistance et réversibilité aux stress thermiques (Luo et al., 2009) et son optimum d'activité se situe à 85 °C. La diminution enregistrée est également bien supérieure à la faible baisse continue de l'activité déjà visible au premier enregistrement (T_a/T_c = 60°C/25°C). Cette diminution des performances est plus vraisemblablement liée à la dégradation progressive de la BOD. De fait, lorsque la température du compartiment cathodique est augmentée jusqu'à 50 °C, non seulement la densité de courant de la biopile diminue, mais la stabilité dans le temps accuse elle aussi une diminution significative. A titre de comparaison, la densité de courant de la biopile conserve 98 % de son intensité dans les conditions T_a/T_c = 60°C/25°C pendant une heure contre seulement 75 % dans les conditions T_a/T_c = 80°C/50°C sur la même durée. Ce comportement est attendu puisque la BOD est une enzyme mésophile. Plus de 50 % de l'activité est perdue au-delà de 50°C, mais l'enzyme commence déjà à s'inactiver vers 40°C (Figure 35). Des résultats similaires ont été obtenus avec la BOD de *Trachyderma tsunodae*, qui perd plus de 50 % de son activité lorsque qu'elle est incubée une heure à 37 °C (Durand et al., 2012).

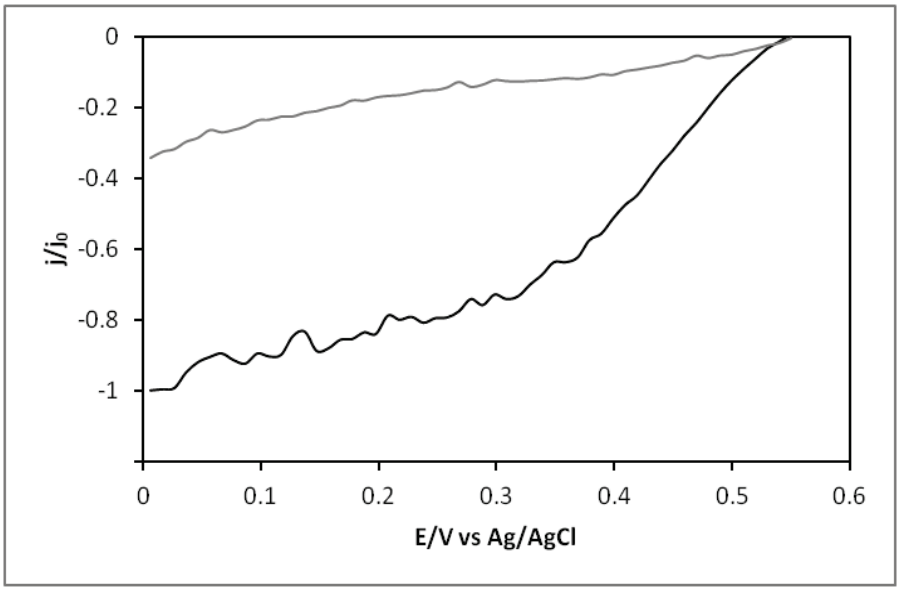


Figure 35 : Courbes de polarisation de la BOD immobilisée covalemment sur une électrode de PG modifiée par des SWCNT-COOH avant (noir continu) et après (gris) une heure à 50 °C. Tampon Hepes 50 mM pH 6,8, 60°C à l'anode / 25-50°C à la cathode, vitesse de balayage : 3,33 mV.s^{-1}.

5.4.3 Stabilité

La stabilité des performances de la biopile H_2/O_2 a finalement été testée par une mesure chronoampérométrique en continu sur 24 h à 0,65 V. Cette condition de tension de pile correspond à un fonctionnement très proche de la puissance maximale, et est indépendante du ratio j_a/j_c. Les températures des compartiments anodiques et cathodiques ont été fixées à 60°C et 25°C respectivement, pour éviter à la fois une dégradation de la BOD et la convection de chaleur trop importante qui imposerait des conditions de thermostatation drastiques. La densité de courant catalytique retient plus de 60 % de sa valeur initiale après 24h de fonctionnement continu (Figure 36 A). Les courbes de polarisation des deux bioélectrodes après 24 h de fonctionnement continu de la pile, montrent une diminution de l'activité électrocatalytique des enzymes de l'ordre de 50 % (Figure 36 B).

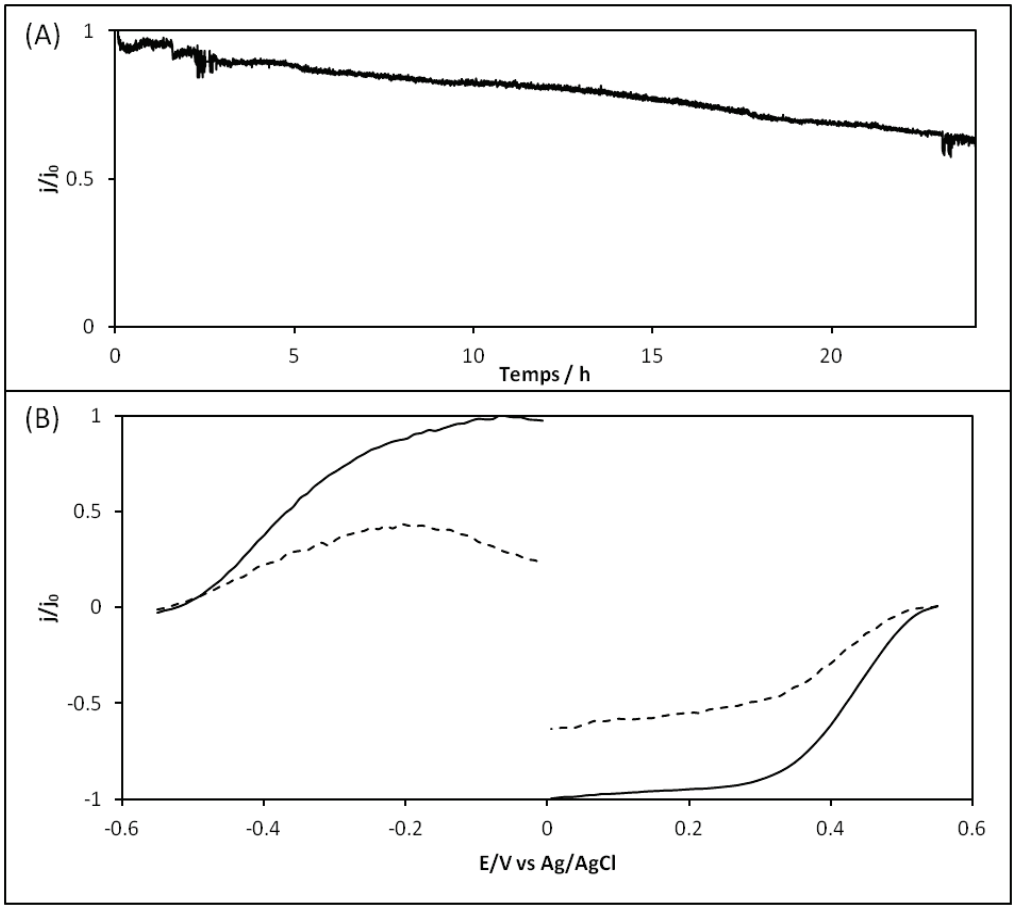


Figure 36 : (A) Evolution de la densité de courant de la biopile en fonction du temps suivie par chronoampérométrie à 0,65 V. (B) courbes de polarisation de MbH1 et de la BOD avant (lignes continues) et après (lignes pointillés) 24 h de chronoampérométrie à 0,65 V Tampon Hepes 50 mM pH 6,8, H_2 atm. 60°C à l'anode / O_2 atm. 25°C à la cathode, vitesse de balayage : 3,33 mV.s^{-1}.

La perte de la densité de courant peut être attribuée en première approche à une perte de l'activité des enzymes ou à un relargage de celles-ci, qui mettrait en cause la stabilité du couplage covalent. Ces résultats sont cependant très proches de ceux obtenus par la biopile concurrente qui accuse une perte de 40 % de sa densité de puissance après 24 heures d'utilisation continue, malgré un greffage différent des enzymes (Krishnan et al., 2012).

5.5 Conclusion

J'ai donc développé une biopile H_2/O_2 basée sur l'hydrogénase hyperthermophile d'*Aquifex aeolicus* en tant que catalyseur de l'oxydation de l'hydrogène, et la BOD de *Myrothecium verracuria* en tant que catalyseur de la réduction de l'oxygène. J'ai mis au point une technique d'immobilisation covalente sur des nanotubes de carbone fonctionnalisés de type SWCNT-COOH, méthode simple, en une étape, et commune aux deux enzymes. Cette configuration permet d'obtenir de fortes densités de courant catalytique (> 500 $\mu A/cm^2$) sans l'aide de médiateur redox, ainsi qu'une stabilité acceptable du signal électrocatalytique dans le temps. J'ai démontré, grâce à l'analyse du mode de fonctionnement de la biopile, que le potentiel de l'anode limite les performances de la biopile. Une zone de tension de fonctionnement de la biopile indépendante des performances relatives des deux bioélectrodes a été définie, pour laquelle la puissance maximum de la biopile est atteinte. En optimisant les paramètres de fonctionnement, une puissance de 300 $\mu W.cm^{-2}$ à 0,6 V pour une f.e.m de 1,1 V a été obtenue. Ces performances constituent les meilleures performances obtenues à ce jour pour une biopile enzymatique H_2/O_2, et sont donc très encourageantes.

Conclusion générale

Conclusion générale

Dans la première partie de ce manuscrit, j'ai présenté les enzymes clés de la réaction d'interconversion de l'hydrogène en protons : les hydrogénases. J'ai mis l'accent sur les hydrogénases [Ni-Fe] et plus particulièrement, sur la découverte récente des hydrogénases tolérantes à l'oxygène et leur implication dans les applications biotechnologiques. En effet, les études récentes sur les hydrogénases tolérantes à l'oxygène montrent qu'elles peuvent entrer en compétition directe avec les catalyseurs chimiques onéreux tels que le platine pour l'oxydation de l'hydrogène dans les procédés de pile à combustible. Ainsi la création de biopiles à combustible enzymatiques H_2/O_2 est envisageable, à condition de maîtriser l'immobilisation fonctionnelle de l'hydrogénase. Un état de l'art des techniques d'immobilisation des enzymes sur support conducteur a été présenté, ainsi que quelques exemples de biopiles enzymatiques récemment développées.

Dans le deuxième chapitre de cette thèse, j'ai étudié l'orientation de l'hydrogénase [Ni-Fe] membranaire hyperthermophile d'*Aquifex aeolicus*. Dans un premier temps, j'ai construit un modèle de la structure de l'hydrogénase membranaire d'*Aquifex aeolicus* en me basant sur des homologues structuraux ainsi que sur l'analyse par spectrométrie de masse de la séquence protéique qui a mis en évidence la présence d'une hélice transmembranaire. La construction de ce modèle a permis de rationnaliser l'approche expérimentale d'orientation de l'enzyme.

Pour immobiliser l'enzyme, j'ai utilisé des électrodes d'or dont les caractéristiques physico-chimiques de surface peuvent être finement contrôlées par formation de monocouches auto assemblées. J'ai pu mettre en évidence, par électrochimie, deux processus de transfert électronique distincts, dépendants de la surface de l'électrode. Les surfaces chargées et hydrophiles induisent un processus mixte, direct et médié de transfert d'électrons, tandis que les surfaces hydrophobes induisent majoritairement un processus de transfert d'électrons médié pour l'oxydation de l'hydrogène. De façon originale, en couplant l'électrochimie à la spectroscopie PM-IRRAS, j'ai pu mettre en relation cette différence de processus de transfert électronique avec une orientation différente des hydrogénases selon les caractères physico-chimiques de la surface de l'électrode. Ainsi une multitude d'orientation des hydrogénases est obtenue pour les surfaces hydrophiles et chargées, tandis qu'une

orientation favorisant le transfert d'électrons médié est observée sur les surfaces hydrophobes. Ce dernier résultat est *a priori* surprenant, puisqu'il était attendu qu'une surface hydrophobe mime l'environnement physiologique de notre hydrogénase membranaire, et par conséquent oriente l'enzyme de manière favorable a un transfert d'électrons direct. La présence d'une hélice transmembranaire sur l'hydrogénase, soulève la question de la présence de détergent lié à la protéine. J'ai donc mis au point un protocole de quantification du détergent présent dans les échantillons d'hydrogénase, qui a permis de mettre en évidence la présence de détergent très vraisemblablement lié à l'hélice transmembranaire hautement hydrophobe. Cette hélice étant située dans l'environnement proche du dernier relais électronique disponible à la surface de la protéine, j'ai pu établir un modèle de l'orientation de l'hydrogénase en fonction des caractéristiques physico-chimiques de l'interface électrochimique, cohérent avec les données expérimentales. L'absence de moment dipolaire marqué autorise l'hydrogénase *d'Aquifex aeolicus* à adopter une multitude d'orientations sur les surfaces hydrophiles et chargées, expliquant le processus de transfert d'électrons mixte (direct et médié). En revanche, la présence de détergent autour de l'hélice transmembranaire et donc du relais électronique de surface, induit une zone hautement hydrophile, rejetée par les surfaces hydrophobes, qui explique le transfert d'électrons majoritairement médié.

Après avoir défini les paramètres gouvernant l'orientation fonctionnelle de l'hydrogénase sur l'interface électrochimique, j'ai fait la preuve de concept d'une biopile H_2/O_2 basée sur une bioanode hyperthermophile. Un cahier des charges pour la mise au point de cette biopile a été fixé:

i) des électrodes abordables au sens financier, excluant l'utilisation des électrodes d'or et privilégiant des électrodes de graphite pyrolytique,

ii) l'utilisation de deux enzymes fonctionnant dans le même électrolyte. Ainsi la bilirubine oxydase a été sélectionnée pour réduire l'oxygène en eau à la cathode.

iii) l'obtention de densités de courant élevées ainsi que d'une f.e.m importante afin d'optimiser les performances de la biopile. Dans ce but, j'ai exclu l'utilisation de médiateurs redox, et opté pour la connexion directe des enzymes sur l'électrode. L'amélioration des densités de courant par l'augmentation de la surface géométrique de l'électrode ainsi que la connexion directe des enzymes ont été permises par l'utilisation de nanotubes de carbones fonctionnalisés par des groupements carboxyliques.

iv) l'optimisation de la stabilité des performances de la biopile. J'ai tiré parti de la possibilité de fonctionnaliser les nanotubes de carbone par des groupements carboxyliques afin de lier covalemment les enzymes à l'électrode tout en maintenant une connexion directe.

v) la conception du prototype de biopile a nécessité l'utilisation de compartiments anodique et cathodique régulés en température afin de faire cohabiter une enzyme hyperthermophile et une enzyme mésophile. J'ai pris le parti d'utiliser une membrane séparatrice échangeuse de protons afin de saturer les solutions en H_2 et O_2, et de tirer les meilleures performances du système.

J'ai pu mettre en évidence que les performances de la biopile sont affectées par l'anode lorsque celle-ci est limitante. L'analyse du mode de fonctionnement de la biopile a permis de définir une gamme de tension de fonctionnement indépendante des performances relatives des deux bioélectrodes. Ainsi lorsque le système est optimisé, la biopile délivre une puissance maximale de 300 $\mu W.cm^{-2}$ et une f.e.m de 1,1 V, des performances de tout premier ordre qui font de cette biopile H_2/O_2 la plus puissante développée à ce jour.

Les travaux effectués au cours de cette thèse ont mis en relief les points à améliorer tant dans l'orientation de l'hydrogénase, que dans l'amélioration des performances de la biopile. Ces améliorations tracent les perspectives d'étude que je vais décliner en trois volets principaux : (i) augmentation de la densité de courant, (ii) utilisation d'une enzyme compatible en température avec l'hydrogénase hyperthermophile, (iii) amélioration de la stabilité du signal électrocatalytique au cours du temps.

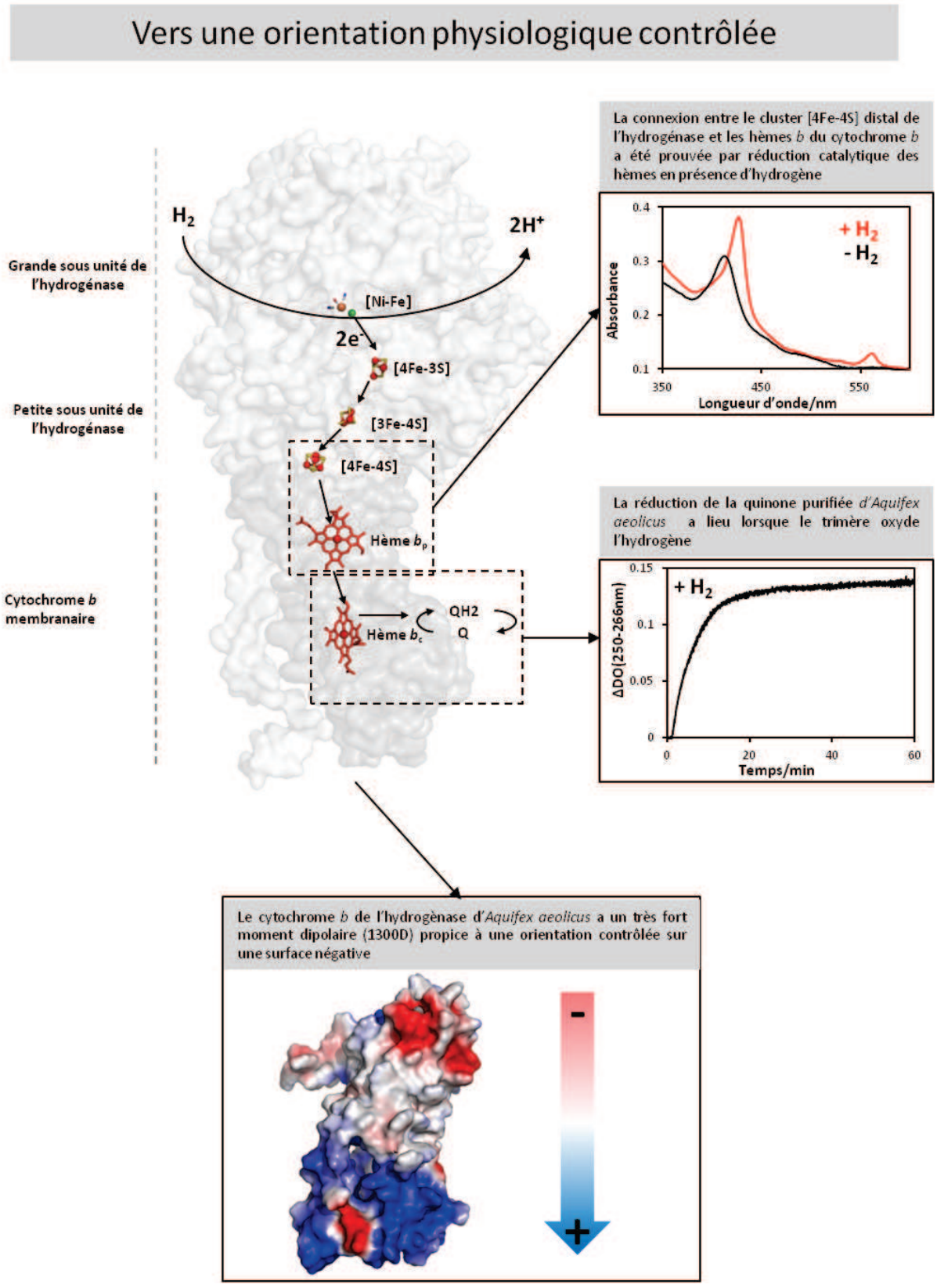
L'augmentation de la densité de courant électrocatalytique est intimement liée à la quantité d'enzyme disponible et active à la surface de l'électrode. Ainsi la conception de matériaux carbonés mésoporeux, constitués par une hiérarchie de taille de pores compatible avec la taille de l'enzyme est envisagée. Dans un espace confiné de taille nanométrique, le contrôle de l'orientation de l'enzyme ne serait pas nécessaire, pour peu que l'enzyme se retrouve systématiquement assez proche de la surface du mésoporeux conducteur pour un transfert d'électrons direct. Cependant il est fort probable que, comme observé sur les nanotubes de carbone, la saturation en enzyme de ce support soit très vite atteinte, et que seule la surface du mésoporeux soit recouverte de protéines. En augmentant la taille des pores, on peut espérer utiliser tout le volume tridimensionnel pour l'immobilisation de l'enzyme. La problématique de l'orientation spécifique de l'enzyme prendra alors tout son sens. L'utilisation de médiateurs redox de potentiel redox approprié sera envisageable, dans le cas

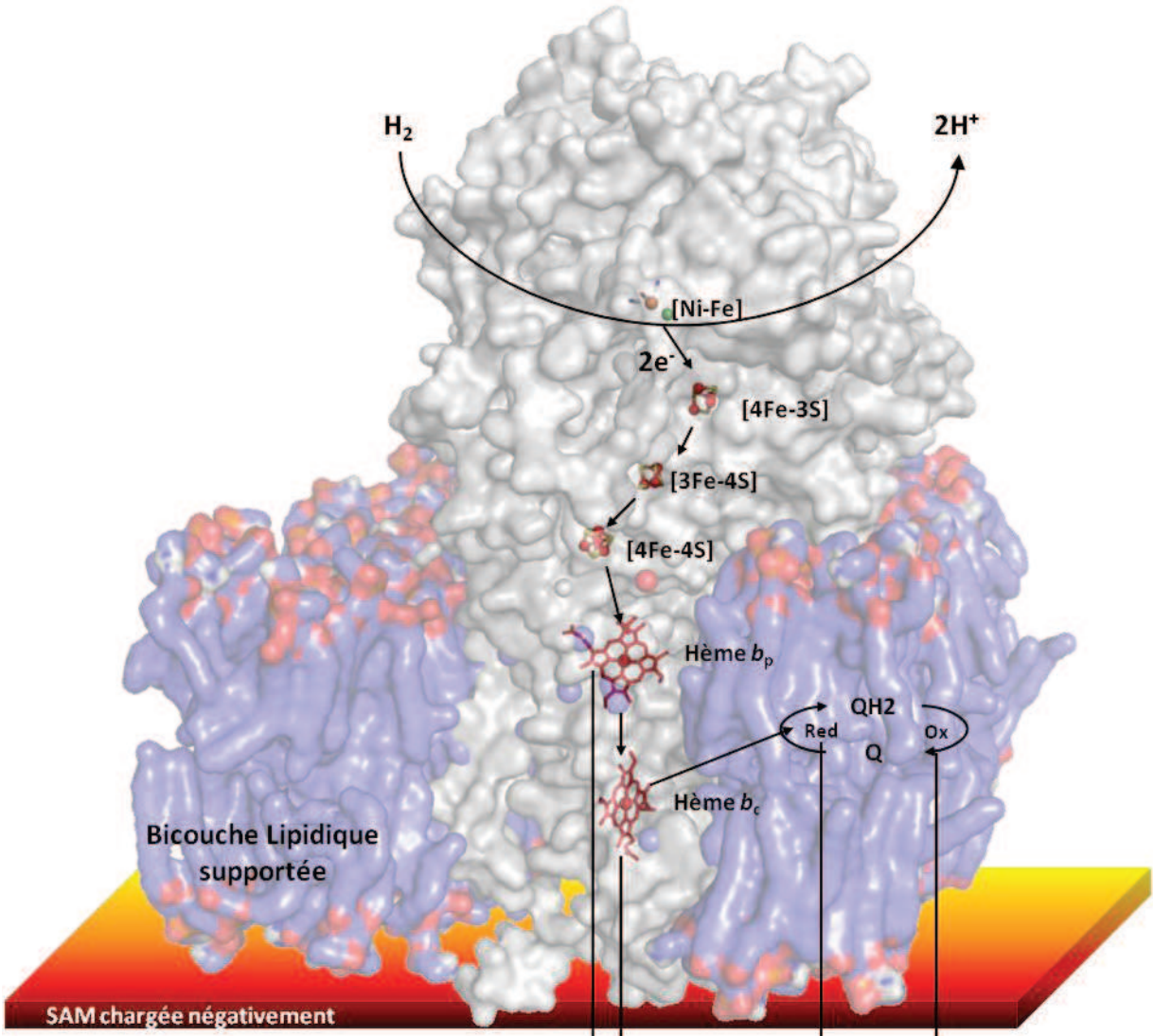
d'une impossibilité d'orientation spécifique, pour faire fonctionner la totalité des enzymes présentes dans la matrice tridimensionnelle carbonée. Cependant, j'ai montré au cours de ce travail de thèse que les médiateurs redox de type phénothiazine, très affins pour l'hydrogénase, ont aussi une très forte propension à s'adsorber sur les surfaces carbonées. Les travaux poursuivis actuellement dans l'équipe renforcent l'idée émise que cette adsorption réduit leur efficacité de médiation. Une solution envisagée serait de développer des polymères redox ou des matrices carbonées pourvus de bras espaceurs portant le médiateur redox. Ce dernier sera ainsi confiné dans l'environnement proche de l'électrode, tout en conservant une relative mobilité pour une interaction efficace avec l'enzyme. Cette solution a déjà fait ses preuves avec les polymères redox d'osmium (Ohara et al., 1993), mais également avec les polymères de viologène (Baur et al., 2011).

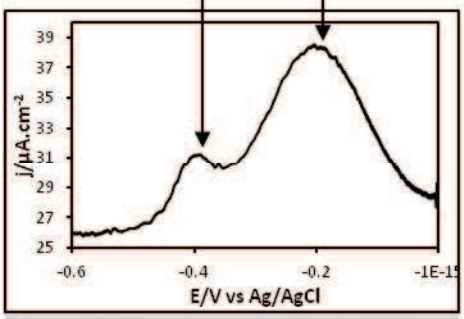
L'hydrogénase d'*Aquifex aeolicus* est hyperthermophile. J'ai tiré parti de cette propriété pour développer une biopile innovante capable de fonctionner à haute température. Pour que le système soit utilisable à haute température, il est nécessaire de trouver une oxydase pouvant travailler en tandem. Il sera intéressant de screener la biodiversité afin de découvrir des organismes thermophiles possédant des oxydases thermophiles. La recherche d'oxydases thermophiles vraies, qui auront plus d'affinité pour la réduction de l'oxygène est à privilégier, mais reste un challenge puisque ces oxydases sont membranaires. Alternativement, il serait possible par évolution dirigée, de muter la bilirubine oxydase pour lui conférer des propriétés de résistance à la température. Une bilirubine oxydase thermophile a déjà été explorée dans l'équipe du Dr. Mano à Bordeaux (Durand et al., 2012).

En ce qui concerne la résolution des problèmes de stabilité du courant électrocatalytique, la première solution serait de s'affranchir complètement de l'instabilité intrinsèque de l'enzyme en utilisant la bactérie entière. Ce procédé existe déjà et donne naissance à ce qu'on appelle les biopiles microbiennes. Cependant, plusieurs inconvénients accompagnent ce type de système. La spécificité envers un substrat que présente une enzyme isolée se retrouve noyée dans le flux métabolique d'un microorganisme entier. Le biofilm que va créer le microorganisme à la surface de l'électrode est lui aussi sujet à une instabilité tant en terme de tenue que de durée de vie. Pour finir, le biofilm peut s'étendre sur d'autres composants de la biopile que l'électrode, limitant les performances du système. La stabilisation de la protéine peut être néanmoins apportée par la reconstitution d'un environnement proche du physiologique tels les protéoliposomes qui ont déjà été étudiés sur l'hydrogénase d'*Aquifex aeolicus* (Infossi et al., 2010).

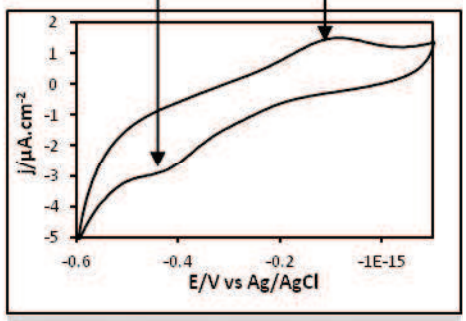
La méthode de stabilisation la plus élégante sera de reconstituer un environnement mimétique d'un environnement physiologique. Une orientation elle-même physiologique de l'hydrogénase sur l'électrode serait ainsi obtenue. Ces développements auront de plus l'intérêt de ne pas être exclusifs de l'hydrogénase, mais de pouvoir être étendus à d'autres systèmes membranaires étudiés dans l'équipe. Dans cette optique, j'ai déjà acquis plusieurs résultats préliminaires très encourageants (Figures suivantes). Nous sommes capables dans l'équipe de purifier le cytochrome *b* seul, mais aussi l'hydrogénase sous forme trimérique, qui comprend la grande sous unité catalytique, la petite sous unité transférant les électrons, ainsi que le cytochrome *b* dihémique ancré dans la membrane. Les potentiels redox des deux hèmes du cytochrome *b* ont été déterminés par électrochimie. J'ai aussi montré, en suivant la réduction des hèmes par spectrophotométrie UV-Vis, qu'il y avait transfert d'électrons entre l'hydrogénase et le cytochrome *b* au cours de l'oxydation de l'hydrogène. La chaîne de transfert d'électrons, du trimère jusqu'à la quinone membranaire, a également été reconstituée et a permis de mettre en évidence que l'oxydation de l'hydrogène par l'hydrogénase induit la réduction spécifique de la quinone purifiée d'*Aquifex aeolicus*. La modélisation du cytochrome *b* m'a permis par ailleurs de calculer un fort moment dipolaire pointant vers l'hème côté cytoplasmique, autorisant une orientation contrôlée du trimère sur l'électrode. Afin de reconstituer cette chaîne de transfert d'électrons en l'immobilisant de manière orientée sur l'électrode, l'utilisation de monocouches auto assemblées lipidiques apparaît pertinente. J'ai à ce jour pu étudier le comportement redox de la quinone d'*Aquifex aeolicus* dans ce type de couches lipidiques. La reconstitution du complexe sur l'électrode, associée à une activité électrocatalytique reste une perspective de recherche particulièrement séduisante pour les années à venir.


Vers une orientation physiologique contrôlée
La connexion entre le cluster [4Fe-4S] distal de l'hydrogénase et les hèmes b du cytochrome b a été prouvée par réduction catalytique des hèmes en présence d'hydrogène
Grande sous unité de l'hydrogénase
Petite sous unité de l'hydrogénase
Cytochrome b membranaire
H2
2H+
[Ni-Fe]
2e-
[4Fe-3S]
[3Fe-4S]
[4Fe-4S]
Hème bp
Hème bc
QH2
Q
+ H2
- H2
Absorbance
Longueur d'onde/nm
La réduction de la quinone purifiée d'Aquifex aeolicus a lieu lorsque le trimère oxyde l'hydrogène
+ H2
ΔDO(250-266nm)
Temps/min
Le cytochrome b de l'hydrogènase d'Aquifex aeolicus a un très fort moment dipolaire (1300D) propice à une orientation contrôlée sur une surface négative
-
+





Les potentiels des hèmes *b* ont été déterminés par électrochimie



Le signal électrochimique de la quinone purifiée d'*Aquifex aeolicus* a été observé lorsqu'elle est immobilisée dans une SAM lipidique (DPTL)

D'autres challenges sont à relever pour la crédibilité des biopiles H_2/O_2. Pour revenir à la problématique générale de l'utilisation d'une nouvelle source d'énergie telle que l'hydrogène, il faut rappeler qu'actuellement la majeure partie de la production d'hydrogène provient de la décomposition des hydrocarbures, un talon d'Achille qui est cependant en train d'être contourné par le concept récent de Biohydrogène. Je mentionnerai tout d'abord les complexes biomimétiques, molécules organométalliques de synthèse s'inspirant des sites actifs des hydrogénases, et dont la capacité à produire très efficacement de l'hydrogène (dans une moindre mesure de l'oxyder) a été démontrée en solution aqueuse. Ainsi il serait envisageable de concevoir une biopile H_2/O_2 où l'hydrogène serait généré *in situ* par les complexes biomimétiques, puis consommé par la bioanode à base d'hydrogénase d'*Aquifex aeolicus*. Mais l'approche la plus en adéquation avec le concept de Biohydrogène est très certainement la conception de bioréacteurs, contenant des bactéries productrices d'hydrogène. Dans notre équipe, un consortium bactérien constitué par deux bactéries a été démontré comme capable de produire trois fois plus d'hydrogène que les bactéries utilisées séparément, ce qui ouvre la voie à une production efficace et propre de biohydrogène. L'utilisation de l'hydrogénase spécifique et tolérante à la bioanode de la biopile trouve alors tout son intérêt, puisque l'hydrogène issu de ce procédé ne sera pas pur.

Les applications visées par les biopiles H_2/O_2 restent bien sûr à affiner. La biopile que j'ai développée au cours de ma thèse peut satisfaire des dispositifs portables nécessitant de faibles puissances, mais aussi des dispositifs statiques tels que l'alimentation de capteur environnementaux. Compte tenue de l'hyperthermophilie de l'hydrogénase, l'alimentation de capteurs fonctionnant dans des environnements chauds sera ciblée. A titre d'exemple, la pose de capteurs de CO dans les gaines chauffantes de bâtiments industriels ou de bureaux est aujourd'hui limitée par leur alimentation électrique. Ce dosage de gaz repose sur plusieurs centaines de capteurs par bâtiment, et donc sur plusieurs km de fils électriques. Notre biopile H_2/O_2 à condition d'une stabilité dans le temps accrue, pourrait avantageusement servir d'alimentation électrique. Un second exemple concerne les digesteurs de boues anaérobies qui fonctionnent parfois à des températures de l'ordre de 50°C afin d'activer les microorganismes thermophiles. Le contrôle de la température est essentiel pour maintenir l'activité microbienne. La biopile H_2/O_2 développée au cours de cette thèse pourrait permettre l'alimentation des capteurs de contrôle de température au sein de digesteurs. On peut même aller jusqu'à imaginer d'alimenter la pile en hydrogène provenant directement de la digestion anaérobie.

Matériels et méthodes

Matériel et méthodes

1. CULTURE BACTÉRIENNE

La souche d'*Aquifex aeolicus* a été fournie au laboratoire par le Pr Karl O. Stetter de l'université de Regensburg en Allemagne. La souche est cultivée à 85°C sous agitation à 350 rpm, à pH 6,8 sous H_2/CO_2 (80/20 à une pression de 1,35 bar). Les cultures bactériennes sont réalisées en bouteilles de 2 L contenant 400 mL d'un milieu minéral non dégazé, dans lequel est ajouté du thiosulfate (1g/L). Le rendement est de 50 à 80 g de cellules pour 100 L de culture. En fin de phase exponentielle, les bactéries sont récoltées par centrifugation et le culot bactérien est congelé et conservé à -80°C.

Ces cultures sont réalisées au centre de fermentation de l'institut (plateforme IMM).

2. BIOCHIMIE

2.1 Purification de l'hydrogénase

La purification de l'hydrogénase a nécessité l'utilisation de différents types de chromatographies.

L'hydrogénase est purifiée à température ambiante et tous les tampons sont dégazés sous argon.

50 g de cellules sont resuspendues dans un tampon Tris/HCl 50 mM pH 7,4 , 4mM EDTA, DNAse I, en présence d'inhibiteurs de protéases (cocktail d'inhibiteurs de protéases Roche et 0.5mM PMSF) cassées au désintégrateur à une pression de 1,6 Kbar. Les cellules non cassées sont éliminées par une centrifugation à 8,000 x g pendant 15 min. La fraction membranaire est séparée de la fraction soluble par ultracentrifugation à 200,000 g pendant 1 h (Beckman, rotor 45Ti). Le culot contenant les membranes est alors resuspendu dans le tampon A (Tris/HCl 50 mM pH 7,4, 1mM PMSF, 2% glycérol, 1 mM EDTA) et après dosage protéique, ajusté à une concentration de 10mg protéine/ml. La solubilisation est réalisée avec le n-Dodecyl β–D-maltoside (DDM) à une concentration de 1,5 mg détergent/mg protéine pendant 1 h à 37 °C sous faible agitation. La suspension est alors centrifugée à 200,000 x g pendant 1h et le surnageant de solubilisation est chargé sur une colonne échangeuse d'anions

(DE52 cellulose, Whatman) équilibrée avec le tampon A contenant 0,05 % DDM. Les protéines sont éluées par un gradient de force ionique NaCl 0-500 mM et la fraction 50 mM NaCl contient l'hydrogénase. Après dialyse, cette fraction est chargée sur une colonne HTP (hydroxylapatite Bio-Rad) équilibrée avec le tampon A contenant 0,05 % DDM. Les protéines sont éluées avec un tampon phosphate KH_2PO_4/K_2HPO_4 pH 7,6 et l'hydrogénase est retrouvée dans la fraction 400 mM. Après dialyse, la fraction contenant l'hydrogénase est chargée sur une colonne de type échangeuse d'anions Q Sépharose (Hi load 16/10 Pharmacia, FPLC apparatus AMERSHAM Pharmacia Biotech.). L 'hydrogénase est éluée à 150 mM NaCl, lavée et concentrée par centrifugation sur « vivaspin » (cut off 100 KDa). L'hydrogénase est alors aliquotée sous atmosphère d'argon, congelée dans l'azote liquide et stockée à -80°C. Pour 50g de bactéries, environ 15mg d'hydrogénase sont obtenus.

2.2 Dosage protéique

Les concentrations protéiques sont déterminées en utilisant la méthode de LOWRY modifiée. L'albumine de serum bovin (BSA est utilisée comme standard pour la courbe étalon). (Lowry et al., 1951).

2.3 Electrophorèse sur gel d'acrylamide

2.3.1 Condition dénaturante

L'électrophorèse en présence de détergent, le sodium dodécyl sulfate (SDS), permet de séparer les protéines préalablement dénaturées en fonction de la masse moléculaire. Les échantillons sont traités avec du tampon de désagrégation (Tris-125mM pH 6,8 β-mercaptoéthanol 20 mM, SDS 4%, glycérol 20%, bleu de bromophénol 0,01%) selon un ratio de 1 :1, puis portés à ébullition pendant 5 min. Le SDS, molécule chargée négativement, va dénaturer les protéines en se fixant sur les protéines selon un ratio une molécule de SDS pour 2 acides aminés. Les protéines dénaturées seront toutes chargées négativement et migreront uniquement en fonction de la masse moléculaire. La migration s'effectue sur un gel de polyacrylamide (8-15%) sous un courant de 25 mA et à température ambiante dans du tampon de migration Tris 25mM, glycine 190 mM, SDS 0,1% pH 8,3. Des marqueurs de poids moléculaire Fermentas sont utilisés.

2.3.2 Condition native

Les conditions sont les mêmes que précédemment mais sans détergent ni β-mercaptoéthanol. Les protéines migrent alors selon leur poids moléculaire et leur point isoélectrique et ne sont pas dénaturées. Des tests d'activité sur gel sont alors possibles et l'hydrogénase peut ainsi être révélée.

2.3.3 Révélation des gels

Les gels sont incubés 1h30 dans le bleu de Coomassie (éthanol 45%, acide acétique 9 %, Bleu R250 0.25 %) puis décolorés dans un tampon éthanol 30 % acide acétique 10 %.

2.4 Test d'activité hydrogénase

2.4.1 En cuve

L'activité hydrogénase au cours de la purification est déterminée par un test de consommation d'hydrogène, en utilisant le méthylviologène (mev) comme accepteur d'électrons et l'hydrogène comme donneur d'électrons. La cinétique de réduction du mev dépendante de l'oxydation de l'hydrogène est suivie grâce à un spectrophotomètre à effet Peltier (Cary WinUV 50) à 604 nm ($\varepsilon_{mev(604nm)}$ = 13600 $M^{-1}.cm^{-1}$). Tous les tests d'activité sont effectués à 80 °C dans un tampon Hepes 50 mM pH 7, 1mM mev. Avant chaque expérience, le tampon dans la cuve d'activité est dégazé 10 min sous argon, 10 min sous hydrogène, puis porté 10 min à 80 °C. La réaction est initiée au temps zéro par l'injection d'une quantité appropriée d'hydrogénase préincubée à 80 °C dans la cuve.

2.4.2 Sur gel en condition native

Au cours de la purification, l'activité est révélée sur gel en utilisant l'H_2 comme donneur d'électrons et le méthylviologène (mev) comme accepteur d'électrons. Après migration, le gel est incubé dans du tampon Hepes/NaOH 50 mM pH7,4, 1 mM méthyl viologène préalablement dégazé sous argon puis sous H_2 à 85°C. En présence d'hydrogénase, le mev réduit devient bleu et afin de fixer la réaction on rajoute du 2,3,5 Triphenyltetrazolium Chloride (SIGMA) qui, réduit à son tour forme un précipité rouge. Sur gel, les protéines

correspondant à l'hydrogénase apparaissent sous forme de bandes de couleur rouge. (Qualitatif)

2.4.3 Par électrochimie

L'activité hydrogénase est finalement testée par électrochimie par simple adsorption d'hydrogénase 1µM sur électrode de PG. Le courant direct obtenu servira de référence à l'activité spécifique de chacun des lots d'hydrogénase.

2.5 Spectrométrie de masse (Trappes à ions)

Les protéines provenant d'un échantillon sont préparées selon le protocole réduction/alkylation, puis sont hydrolysées par la trypsine. Les peptides obtenus sont analysés par spectrométrie de masse de type trappe à ions. Cet appareil (ESI-IT LCQ XP plus, Thermofinnigan) est couplé à une nanochromatographie liquide qui permet la séparation des peptides avant la détermination de leur masse. L'identification des protéines est réalisée grâce à l'utilisation du logiciel TurboSEQUEST en utilisant la banque de données de NCBI limitée au génome d'*Aquifex aeolicus*.

2.6 Quantification du détergent DDM

Le DDM présent dans les échantillons d'hydrogénase a été quantifié par chromatographie en couche mince (CCM). La courbe de calibration déterminant la concentration de DDM a été réalisée en utilisant des aliquots de DDM de concentration connue. Ils Ces aliquots sont déposés sur une plaque de CCM par un applicateur d'échantillons Camag linomat IV Sample Applicator. Les échantillons d'hydrogénase sont appliqués sur la même plaque de CCM silica gel $60F_{254}$ de Merck. Les échantillons déposés migrent dans une phase mobile chloroforme-méthanol-hydroxyde d'ammonium-eau (65 :25 :4 :1, v/v/v/v). Un mélange d'une solution de sulfate de cuivre saturée et de d'acide phosphorique 85,5 % (50 :50, v/v) est vaporisé sur la plaque avant qu'elle ne soit chauffée. Les plaques sont ensuite scannées à 40 nm par densitométrie avec un densitomètre Camag TLC scanner II. L'aire des pics de détergent obtenus est analysée par régression linéaire grâce à un D-2000 Merck integrator.

2.7 Adsorption du détergent par le traitement Bio-Beads

Les Bio-Beads (Bio-Rad) sont préparées par mouillage préalable dans de l'éthanol pendant 10 min. Elles sont ensuite lavées plusieurs fois par du tampon Hepes 50 mM pH 6,8 jusqu'à élimination de l'éthanol. Les échantillons d'hydrogénase à traiter sont mis en présence d'une petite quantité de Bio-Beads (une vingtaine de billes) et laissés à température ambiante pendant 2 heures. L'échantillon ainsi traité est récupéré à l'aide d'une pipette.

3. ÉLECTROCHIMIE

3.1 Appareillage

La voltamétrie et la chronoampérométrie, ont été effectuées grâce à un potentiostat PARSTAT 2273 de Princeton Applied Research. Un système conventionnel à trois électrodes comprenant une électrode de référence Ag/AgCl/NaCl(sat), un fil d'or comme contre éléctrode et une électrode de travail. Tous les potentiels sont donnés contre l'électrode de référence Ag/AgCl/NaCl(sat). La température de l'électrolyte est contrôlée par un bain thermostaté. L'électrode de référence est séparée de l'électrolyte par une jonction contenant une solution saturée en NaCl maintenue à temperature ambiante. Avant chaque experience, l'electrolyte est dégazé avec de l'azote, de l'hydrogène ou de l'oxygène. Chaque voltamogramme ou chronoampérogramme est la moyenne de 3 essais.

3.2 Electrodes

3.2.1 Préparation des électrodes de graphite pyrolytique(PG)

Les électrodes de PG edge de Bio-Logic SAS (S = 0.07 cm^2) sont constituées d'une pastille de graphite de 3mm de diamètre insérée dans un cylindre de polymère PEEK résistant à la température. Les électrodes de PG sont polies sur papier émeri P800 puis P1200 (PRESI) puis rincées à l'eau distillée, soniquées, et rincées à nouveau avant dépôt de l'échantillon protéique. Une membrane de dialyse (Visking membrane MWCO 6000-8000) d'un cut-off de 6-8 kDA peut être appliquée sur l'électrode afin de confiner l'échantillon protéique. La membrane de dialyse est maintenue par une durite qui encercle l'électrode.

3.2.2 Modification des électrodes de PG

3.2.2.1 Adsorption du TBO

L'électrode de PG est immergée dans une solution de TBO 160 µM pendant 1 minute puis rincée à l'eau distillée.

3.2.2.2 Electropolymérisation du TBO

L'électropolymerisation du TBO est effectuée par voltamétrie cyclique entre -0,65 V et +0,9 V vs Ag/AgCl à une vitesse de balayage de 50 $mV.s^{-1}$ dans un tampon Tris-HCl 5 mM pH 9,5, TBO 160 µM. L'électrode modifiée est ensuite rincée à l'eau distillée.

3.2.2.3 Adsorption de DDM

2 µL d'une solution de DDM de concentration choisie sont déposés sur l'électrode et séchés sous flux d'azote.

3.2.2.4 SWCNT-COOH

Les nanotubes de carbone simple paroi (SWCNT) commerciaux (Sigma) sont fonctionnalisés par traitement acide à chaud. Ce traitement génère des fonctions carboxyliques sur les parois et aux extrémités des nanotubes. 10 µg de SWCNT sont ajoutés à un mélange 1:3 acide sulfurique concentré/ acide nitrique concentré. Le mélange est soniqué pendant 4 heures puis dilué dans 500 mL d'eau distillée. Les SWCNT-COOH générés sont ensuite filtrés à l'aide d'une membrane Zitex 0,45 µm (Norton, Wayne, USA), et lavés jusqu'à obtention d'un pH neutre. Ils sont ensuite dilués dans 10 mL d'éthanol. L'éthanol est ensuite évaporé, puis les SWCNT-COOH sont resuspendus dans du tampon Hepes 50 mM pH 6,8. La concentration finale de la solution est mesurée par gravimétrie. Une solution de SWCNT-COOH de 1mg/mL environ est obtenue.

Pour la modification des bioélectrodes utilisées dans la biopile, 10 µL d'une solution à 1mg/mL de SWCNT-COOH sont déposés sur l'électrode puis séchés sous flux d'azote.

3.2.2.5 *Couplage covalent de l'enzyme sur l'électrode modifiée par les SWCNT-COOH*

L'électrode de PG modifiée par des SWCNT-COOH est trempée pendant 30 minutes dans une solution à 40 mM EDC (N-(3-Dimethylaminopropyl)-N′-ethylcarbodiimide) et 10 mM NHS (N-Hydroxysuccinimide) (Sigma). L'électrode est ensuite rincée, puis l'enzyme est déposée en surface. Typiquement- 8 µL d'hydrogénase à 5µM sont utilisés et 5 µL de bilirubine oxydase (Amano enzyme) à 20 µM pour les essais en biopiles.

3.2.3 Caractérisation des électrodes de PG (Collaboration avec Roger Gadiou IS2M, Mulhouse)

3.2.3.1 *Microscopie confocale, AFM et électronique à balayage*

La microscopie confocale est effectuée grâce à un microscope confocale à scan laser 3D (ZEISS LSM 700). Des images de 128 µm de large sont enregistrées avec une résolution spatiale de 0,25 µm et une résolution verticale de 0,5 µm. La texture nanométrique de l'électrode de PG est étudiée par microscopie à force atomique. La rugosité de surface est mesurée à l'aide d'un microscope AFM Dimension 3000 scanning probe microscope (Digital Instrument). Un cantilever en silicone est utilisé pour toutes les expériences. La morphologie de surface 10 µm x 10 µm et 5 µm x 5 µm au centre de l'électrode est observé en mode tapping. La microscopie électronique à balayage (MEB) de la surface de l'électrode est effectuée avec un appareillage FEI Quanta 400. Les images sont obtenues dans des conditions de quasi vide.

3.2.3.2 *Mesure d'angle de contact*

Les mesures d'angles de contact sont effectuées en utilisant un appareil de capture vidéo (Krüss G2) avec une goutte d'1 µL d'eau ultra pure. Les valeurs d'angle de contact est déterminée en fonction du temps. Les mesures ont été pratiquées sur les deux côtés de la goutte et moyennées.

3.2.3.3 *Désorption programmée en température couplée à la spectrométrie de masse (TPD-MS)*

La chimie de surfaces des électrodes PG est déterminée par TPD-MS. Cette méthode permet l'analyse quantitative des groupements chimiques présents à la surface de l'électrode. Les

échantillons sont mis sous vide puis chauffés à vitesse constante de 10 K par minute jusqu'à 900 °C. Les espèces résultants de la décomposition des groupements chimiques de surface, principalement du CO, CO_2, H_2O et H_2 sont analysées par spectrométrie de masse. Selon la température de désorption, différents groupes de surface peuvent être identifiés.

3.2.4 Préparations des électrodes d'or

Les électrodes d'or sont polies à l'alumine de taille décroissante de 0,3µm à 0,04 µm puis soniquées dans de l'eau distillée. Elles subissent ensuite un nettoyage électrochimique qui consiste à balayer les potentiels entre -0,3V et +1,5 V à 150 $mV.s^{-1}$ dans un tampon 50mM H_2SO_4, jusqu'à obtention d'un signal reproductible. Les électrodes sont rincées à l'eau puis à l'éthanol.

3.2.4.1 Modification des électrodes par les monocouches auto assemblées : SAMs

Pour l'assemblage de la monocouche, les électrodes d'or préparées comme décrit précédemment sont trempées dans une solution éthanolique du dérivé thiolé désiré à une concentration de 5mM (tableau ci dessous) pendant 12 heures à température ambiante.

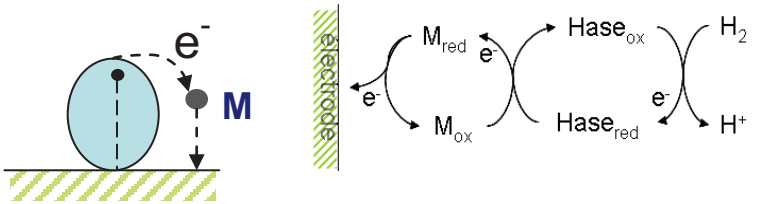
Dérivé thiolé	Formule linéaire	Abréviation dans le manuscrit
1-butanethiol	$CH_3(CH_2)_3SH$	C_3CH_3
1-octanethiol	$CH_3(CH_2)_7SH$	C_7CH_3
1-Decanethiol	$CH_3(CH_2)_9SH$	C_9CH_3
1-Dodecanethiol	$CH_3(CH_2)_{11}SH$	$C_{11}CH_3$
3-Mercaptopropionic acid	$COOH(CH_2)_2SH$	C_2COOH
6-Mercaptohexanoic acid	$COOH(CH_2)_5SH$	C_5COOH
12-Mercaptododecanoic acid	$COOH(CH_2)_{11}SH$	$C_{11}COOH$
6-Mercaptohexanol	$OH(CH_2)_6SH$	C_6OH
Cysteamine	$NH_2(CH_2)_2SH$	C_2NH_2
4-Aminothiophenol	$NH_2C_6H_4SH$	Ar-NH_2

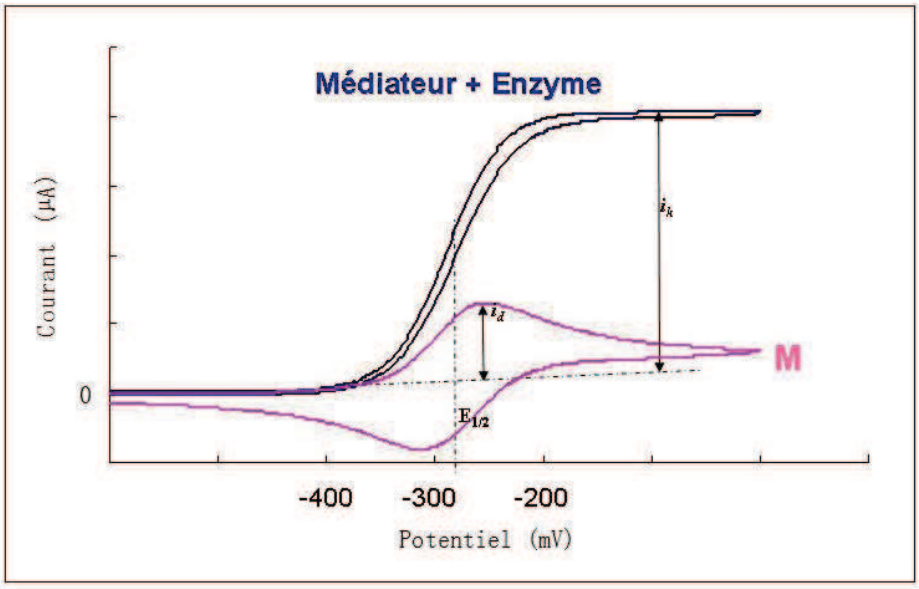
3.3 Cellule électrochimique de la biopile

Les deux demi cellules électrochimiques double parois en verre ont été réalisées par la Verrerie Phocéenne (Marseille). Les double parois permettent de thermostater indépendamment les deux demi-cellules. Une zone de 4 cm de large qui ne contient pas de double parois fait la jonction entre les deux demi-cellules, et contient la membrane de Nafion®. Cette zone tampon permet de minimiser les transferts de chaleur entre les deux compartiments. La température dans la demi-cellule a été mesurée au niveau de la bioélectrode placée à moins de 4 cm de la membrane de séparatrice. Un bullage constant d'H_2 et d'O_2 est maintenu dans chaque demi-cellule.

3.4 Méthodes de calcul des constantes de vitesse catalytiques et de l'épaisseur du film de polymère pTBO

3.4.1 Calcul de la vitesse du second ordre entre l'hydrogénase et le médiateur redox (M)





$$M_{red} \longleftrightarrow M_{ox} + e^-$$

$$M_{ox} + Enzyme_{red} \xrightarrow{k} M_{red} + Enzyme_{ox}$$

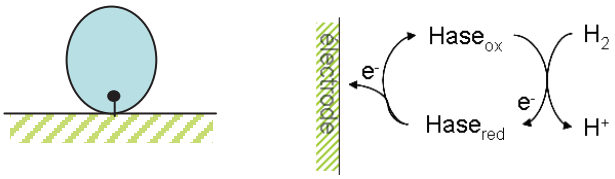
$$Enzyme_{ox} + H_2 \longrightarrow Enzyme_{red} + H^+$$

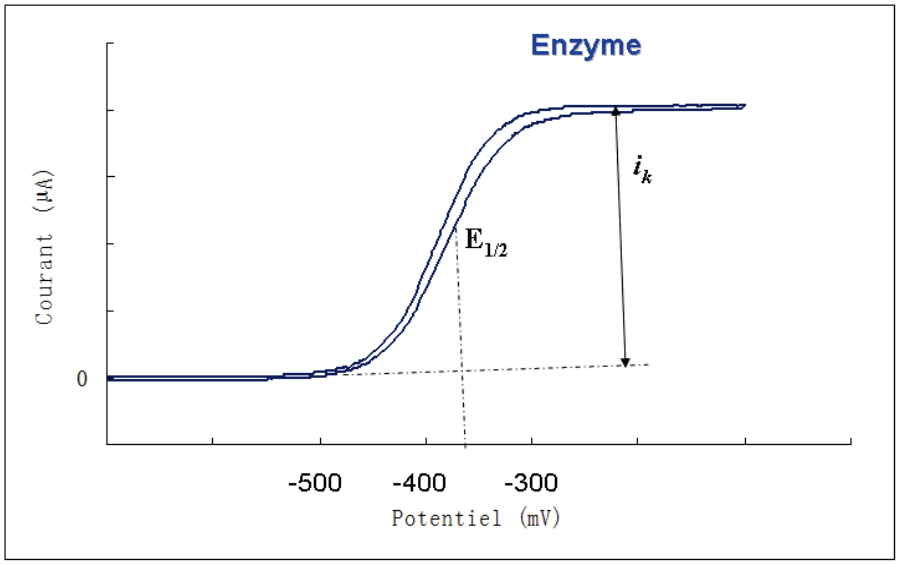
La constante de vitesse du second ordre entre le médiateur et l'hydrogénase, k (en M^{-1} s^{-1}) s'écrit :

$$k = ((i_k/i_d)^2 \times v)/ (RT/nF)$$

avec i_k, courant catalytique (A), i_d, courant de diffusion du médiateur (A), n, nombre d'électrons échangés, v, vitesse de balayage (V s^{-1}).

3.4.2 *Calcul de la constante catalytique de l'oxydation directe de l'hydrogène*





$$Enzyme_{red} \longrightarrow Enzyme_{ox} + e^-$$

$$Enzyme_{ox} + H_2 \xrightarrow{k_{cat}} Enzyme_{red} + H^+$$

La constante catalytique de transformation de H_2 par l'hydrogénase k_{cat} (en s^{-1}) s'écrit :

$$k_{cat} = i_k / nFA\Gamma$$

avec n, nombre d'électrons échangés, F, constante de Faraday, A, aire de l'électrode en cm^2, Γ, concentration surfacique en enzyme en mol cm^{-2}.

3.4.3 Calcul de l'épaisseur du film polymère pTBO

L'épaisseur, l, du film polymère pTBO est donnée par :

$$l = (Q/nFA) \times (d^3 \times \mathcal{N})$$

avec Q, quantité d'électricité (C cm^{-2}) mise en jeu pour électropolymériser, A, aire de l'électrode (cm^2), d, longueur de l'unité monomère (cm), $\mathcal{N}$, nombre d'Avogadro.

4. SPECTROSCOPIE INFRA-ROUGE (Collaboration avec Sophie Lecomte CBMN, Bordeaux)

4.1 PM-IRRAS

Les plaques d'or sont préparées de la même manière que les électrodes d'or. Elles sont immergées dans une solution éthanolique du dérivé thiolé désiré pendant 12h à température ambiante. Elles sont ensuite rincées à l'éthanol, séchées sous flux d'azote, puis déposées dans la solution contenant l'échantillon à analyser (hydrogénase 1 µM, 2 heures à 4 °C, DDM 2 heures à température ambiante). La plaque d'or ainsi modifiée est rincée avec du tampon puis séchée avant l'enregistrement des spectres PM-IRRAS. Chaque spectre est enregistré 2 fois sur le même échantillon et chaque échantillon est reproduit 2 fois.

Les échantillons sont placés à température ambiante dans le faisceau extérieur de l'appareillage FT-IR (Nicolet Nexus 870 FT-IR spectrometer Madison, WI) et la lumière réfléchie est concentrée sur un détecteur HgCdTe (MCT SAT Poitiers) refroidi par de l'azote liquide à 77 K. La valeur optimale de l'angle d'incidence pour la détection est de 75° par rapport à l'axe optique perpendiculaire à l'interface. Une grille polarisée ZnSe et un modulateur photoacoustique ZnSe modulent l'incidence du faisceau entre les polarisations p et s. Le signal de sortie du détecteur est envoyé à un appareil électronique double canal qui

génère la somme et la différence des interférogrammes. Les spectres Infra-Rouge (600 accumulations) sont enregistrés à une résolution de 8cm^{-1}.

4.2 ATR FT-IR

Une goutte de 10 µL de l'hydrogénase d'*Aquifex aeolicus* 15 µM en tampon Hepes 50 mM pH 6,8 est déposée sur un cristal de Germanium. Le spectre ATR (400 accumulations) est enregistré sur un Nicolet Nexus 870 FT-IR spectrometer Madison, WI équipé d'un détecteur MCT avec une résolution spectrale de 4 cm^{-1}.

5. MESURE AFM SUR LES MONOCOUCHES AUTO ASSEMBLÉES (Collaboration avec Antoine Ronda IM2NP, Marseille)

Des plaques d'or (Arrandee) ont été utilisées pour l'AFM. Un protocole de « flame annealing » a été utilisé pour obtenir des terrasses d'or monocristallin (Au 111) d'approximativement 100 x 100 nm. Les plaques d'or ont été modifiées par immersion dans une solution éthanolique du dérivé thiolé désiré pendant 12 heures à temperature ambiante. Elles sont ensuite rincées à l'éthanol puis au tampon Hepes 50 mM pH 6,8 avant adsorption de l'hydrogénase 1 µM pendant 1heure à 4°C sous atmosphère d'hydrogène. La mesure AFM a été effectuée en mode non contact.

6. BIOINFORMATIQUE

Les structures des protéines proviennent de la Protein Data Bank (pdb). Les images ont été générées par Pymol 1.3. Les modélisations des enzymes ont été effectuées sur le serveur SWISS-MODEL en utilisant le mode alignement de séquences.

Références

ABOU HAMDAN, A., DEMENTIN, S., LIEBGOTT, P. P., GUTIERREZ-SANZ, O., RICHAUD, P., DE LACEY, A. L., ROUSSETT, M., BERTRAND, P., COURNAC, L. & LEGER, C. (2012) Understanding and Tuning the Catalytic Bias of Hydrogenase. *Journal Of The American Chemical Society,* 134**,** 8368-8371.

ALONSO-LOMILLO, M. A., RUDIGER, O., MAROTO-VALIENTE, A., VELEZ, M., RODRIGUEZ-RAMOS, I., MUNOZ, F. J., FERNANDEZ, V. M. & DE LACEY, A. L. (2007) Hydrogenase-coated carbon nanotubes for efficient H2 oxidation. *Nano Lett,* 7**,** 1603-8.

ANDERSON, M. R. & BALTZERSEN, R. (2003) Reductive desorption of 11-mercaptoundecanoic acid monolayers modified by covalent attachment of 1,3- and 1,4-phenylenediamine. *J Colloid Interface Sci,* 263**,** 516-21.

ARMSTRONG, F. A., HILL, H. A. O. & WALTON, N. J. (1988) Direct electrochemistry of redox proteins. *Accounts of Chemical Research,* 21**,** 407.

ATAKA, K., RICHTER, B. & HEBERLE, J. (2006) Orientational control of the physiological reaction of cytochrome c oxidase tethered to a gold electrode. *J Phys Chem B,* 110**,** 9339-47.

AVGOUROPOULOS, G. & IOANNIDES, T. (2005) CO tolerance of Pt and Rh catalysts: effect of CO in the gas-phase oxidation of H2 over Pt and Rh supported catalysts. *Applied Catalysis B: Environmental,* 56**,** 77-86.

BADIA, A., LENNOX, R. B. & REVEN, L. (2000) A dynamic view of self-assembled monolayers. *Acc Chem Res,* 33**,** 475-81.

BALTAZAR, C. S., TEIXEIRA, V. H. & SOARES, C. M. (2012) Structural features of [NiFeSe] and [NiFe] hydrogenases determining their different properties: a computational approach. *J Biol Inorg Chem,* 17**,** 543-55.

BARTON, S. C., GALLAWAY, J. & ATANASSOV, P. (2004) Enzymatic biofuel cells for implantable and microscale devices. *Chem Rev,* 104**,** 4867-86.

BAUR, J., LE GOFF, A., DEMENTIN, S., HOLZINGER, M., ROUSSET, M. & COSNIER, S. (2011) Three-dimensional carbon nanotube-polypyrrole-[NiFe] hydrogenase electrodes for the efficient electrocatalytic oxidation of H(2). *International Journal Of Hydrogen Energy,* 36**,** 12096-12101.

BETSO, S. R., KLAPPER, M. H. & ANDERSON, L. B. (1972) Electrochemical studies of heme proteins. Coulometric, polarographic, and combined spectroelectrochemical methods for reduction of the heme prosthetic group in cytochrome c. *Journal of the American Chemical Society,* 94**,** 8197.

BICAKOVA, O. & STRAKA, P. (2012) Production of hydrogen from renewable resources and its effectiveness. *International Journal Of Hydrogen Energy,* 37**,** 11563-11578.

BLACKBURN, J. L., SVEDRUZIC, D., MCDONALD, T. J., KIM, Y. H., KING, P. W. & HEBEN, M. J. (2008) Raman spectroscopy of charge transfer interactions between single wall carbon nanotubes and [FeFe] hydrogenase. *Dalton Transactions***,** 5454-5461.

BLANFORD, C. F. & ARMSTRONG, F. A. (2006) The pyrolytic graphite surface as an enzyme substrate: microscopic and spectroscopic studies. *J solid State Electrochem,* 10**,** 826-832.

BLANFORD, C. F., HEATH, R. S. & ARMSTRONG, F. A. (2007) A stable electrode for high-potential, electrocatalytic O-2 reduction based on rational attachment of a blue copper oxidase to a graphite surface. *Chemical Communications***,** 1710-1712.

BOGDANOVSKAYA, V. A., TARASEVICH, M. R., KUZNETSOVA, L. N., REZNIK, M. F. & KASATKIN, E. V. (2002) Peculiarities of direct bioelectrocatalysis by laccase in aqueous-nonaqueous mixtures. *Biosens Bioelectron,* 17**,** 945-51.

BONNET, C., FRANK-LACAZE, L., RONASI, S., BESSE, S. & LAPICQUE, F. (2010) PEM fuel cell Pt anode inhibition by carbon monoxide: Non-uniform behaviour of the cell caused by the finite hydrogen excess. *Chemical Engineering Science,* 65**,** 3050-3058.

BOUJDAY, S., BLAUDEZ, D., BUREAU, B., BÃ¼RGI, T., BUSSON, B., CASTANO, S., CHABAL, Y. J., DAZZI, A., DESBAT, B., DUMAS, P., FRANKING, R., HAMERS, R. J., HUMBERT, C., HUMBLOT, V., LAPIN, N. A., LUCAS, P., PRADIER, C.-M., POLICAR, C., RUTHER, R., SALMAIN, M., SEITZ, O., STAVIS, C., WANG, X. & CHABAL, C. M. P. A. Y. J. (2011) Contributors. *Biointerface Characterization by Advanced IR Spectroscopy.* Amsterdam, Elsevier.

BRENDER, P., GADIOU, R., RIETSCH, J. C., FIOUX, P., DENTZER, J., PONCHE, A. & VIX-GUTERL, C. (2012) Characterization of Carbon Surface Chemistry by Combined Temperature Programmed Desorption with in Situ X-ray Photoelectron Spectrometry and Temperature Programmed Desorption with Mass Spectrometry Analysis. *Analytical Chemistry,* 84**,** 2147-2153.

BRUGNA-GUIRAL, M., TRON, P., NITSCHKE, W., STETTER, K. O., BURLAT, B., GUIGLIARELLI, B., BRUSCHI, M. & GIUDICI-ORTICONI, M. T. (2003) [NiFe] hydrogenases from the hyperthermophilic bacterium Aquifex aeolicus: properties, function, and phylogenetics. *Extremophiles,* 7**,** 145-57.

BUHRKE, T., LENZ, O., KRAUSS, N. & FRIEDRICH, B. (2005) Oxygen tolerance of the H2-sensing [NiFe] hydrogenase from Ralstonia eutropha H16 is based on limited access of oxygen to the active site. *J Biol Chem,* 280**,** 23791-6.

CHI, Q. J., ZHANG, J. D., J.E.T, A. & ULSTRUP, J. (2001) Ordered assembly and controlled electron transfer of the blue copper protein azurin at gold (111) single-crystal substrates. *J Phys Chem B,* 105**,** 4669-4679.

CHOI, S. & CHAE, J. (2009) A regenerative biosensing surface in microfluidics using electrochemical desorption of short-chain self-assembled monolayer. *Microfluidics And Nanofluidics,* 7**,** 819-827.

CINQUIN, P., GONDRAN, C., GIROUD, F., MAZABRARD, S., PELLISSIER, A., BOUCHER, F., ALCARAZ, J. P., GORGY, K., LENOUVEL, F., MATHE, S., PORCU, P. & COSNIER, S. (2010a) A glucose biofuel cell implanted in rats. *PLoS One,* 5**,** e10476.

CINQUIN, P., GONDRAN, C., GIROUD, F., MAZABRARD, S., PELLISSIER, A., BOUCHER, F., ALCARAZ, J. P., GORGY, K., LENOUVEL, F., MATHE, S., PORCU, P. & COSNIER, S. (2010b) A Glucose BioFuel Cell Implanted in Rats. *Plos One,* 5.

CLARK, R. A. & BOWDEN, E. F. (1997) Voltammetric Peak Broadening for Cytochrome c/Alkanethiolate Monolayer Structures:â€‰ Dispersion of Formal Potentials. *Langmuir,* 13**,** 559.

COHEN, J., KIM, K., KING, P., SEIBERT, M. & SCHULTEN, K. (2005) Finding gas diffusion pathways in proteins: application to O2 and H2 transport in CpI [FeFe]-hydrogenase and the role of packing defects. *Structure,* 13**,** 1321-9.

CORNISH, A. J., GARTNER, K., YANG, H., PETERS, J. W. & HEGG, E. L. (2011) Mechanism of proton transfer in [FeFe]-hydrogenase from Clostridium pasteurianum. *J Biol Chem,* 286**,** 38341-7.

CORREIA DOS SANTOS, M. M., PAES DE SOUSA, P. M., SIMÃµES GONÃ§ALVES, M. L., KRIPPAHL, L., MOURA, J. J. G., LOJOU, Ã. & BIANCO, P. (2003) Electrochemical studies on small electron transfer proteins using membrane electrodes. *Journal of Electroanalytical Chemistry,* 541**,** 153.

CRACKNELL, J. A., MCNAMARA, T. P., LOWE, E. D. & BLANFORD, C. F. (2011) Bilirubin oxidase from Myrothecium verrucaria: X-ray determination of the complete crystal structure and a rational surface modification for enhanced electrocatalytic O2 reduction. *Dalton Trans,* 40**,** 6668-75.

CRACKNELL, J. A., VINCENT, K. A. & ARMSTRONG, F. A. (2008) Enzymes as working or inspirational electrocatalysts for fuel cells and electrolysis. *Chem Rev,* 108**,** 2439-61.

CRACKNELL, J. A., WAIT, A. F., LENZ, O., FRIEDRICH, B. & ARMSTRONG, F. A. (2009) A kinetic and thermodynamic understanding of O2 tolerance in [NiFe]-hydrogenases. *Proc Natl Acad Sci U S A,* 106**,** 20681-6.

DEMENTIN, S., BELLE, V., BERTRAND, P., GUIGLIARELLI, B., ADRYANCZYK-PERRIER, G., DE LACEY, A. L., FERNANDEZ, V. M., ROUSSET, M. & LEGER, C. (2006) Changing the ligation of the distal [4Fe4S] cluster in NiFe hydrogenase impairs inter- and intramolecular electron transfers. *J Am Chem Soc,* 128**,** 5209-18.

DEMENTIN, S., BURLAT, B., DE LACEY, A. L., PARDO, A., ADRYANCZYK-PERRIER, G., GUIGLIARELLI, B., FERNANDEZ, V. M. & ROUSSET, M. (2004) A glutamate is the essential proton transfer gate during the catalytic cycle of the [NiFe] hydrogenase. *J Biol Chem,* 279**,** 10508-13.

DRESSELHAUS, M., DRESSELHAUS, G. & JORIO, A. (2004) Unusual properties and structure of carbon nanotubes. *Annual Review of Material Research,* 34**,** 247-278.

DURAND, F., KJAERGAARD, C. H., SURANITI, E., GOUNEL, S., HADT, R. G., SOLOMON, E. I. & MANO, N. (2012) Bilirubin oxidase from Bacillus pumilus: a promising enzyme for the elaboration of efficient cathodes in biofuel cells. *Biosens Bioelectron,* 35**,** 140-6.

ELANTAK, L., MORELLI, X., BORNET, O., HATCHIKIAN, C., CZJZEK, M., DOLLA, A. & GUERLESQUIN, F. (2003) The cytochrome c3-[Fe]-hydrogenase electron-transfer complex: structural model by NMR restrained docking. *FEBS Lett,* 548**,** 1-4.

ELDIN, M. S. M., EL ENSHASY, H. A., HASSAN, M. E., HAROUN, B. & HASSAN, E. A. (2012) Covalent immobilization of penicillin G acylase onto amine-functionalized PVC membranes for 6-APA production from penicillin hydrolysis process. II. Enzyme immobilization and characterization. *Journal Of Applied Polymer Science,* 125**,** 3820-3828.

FENG, W. & JI, P. J. (2011) Enzymes immobilized on carbon nanotubes. *Biotechnology Advances,* 29**,** 889-895.

FEZOUA-BOUBEGTITEN, Z., DESBAT, B., BRISSON, A. & LECOMTE, S. (2010) Determination of molecular groups involved in the interaction of annexin A5 with lipid membrane models at the air-water interface. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes,* 1798**,** 1204-1211.

FONTECILLA-CAMPS, J. C., VOLBEDA, A., CAVAZZA, C. & NICOLET, Y. (2007) Structure/function relationships of [NiFe]- and [FeFe]-hydrogenases. *Chem Rev,* 107**,** 4273-303.

FORTI, J. C., NETO, S. A., ZUCOLOTTO, V., CIANCAGLINI, P. & DE ANDRADE, A. R. (2011) Development of novel bioanodes for ethanol biofuel cell using PAMAM dendrimers as matrix for enzyme immobilization. *Biosensors & Bioelectronics,* 26**,** 2675-2679.

FOURMOND, V., INFOSSI, P., GIUDICI-ORTICONI, M. T., BERTRAND, P. & LEGER, C. (2010) "Two-step" chronoamperometric method for studying the anaerobic inactivation of an oxygen tolerant NiFe hydrogenase. *J Am Chem Soc,* 132**,** 4848-57.

FOURMOND, V., LAGOUTTE, B., SETIF, P., LEIBL, W. & DEMAILLE, C. (2007) Electrochemical study of a reconstituted photosynthetic electron-transfer chain. *J Am Chem Soc,* 129**,** 9201-9.

FOURMOND, V., LAUTIER, T., BAFFERT, C., LEROUX, F., LIEBGOTT, P. P., DEMENTIN, S., ROUSSET, M., ARNOUX, P., PIGNOL, D., MEYNIAL-SALLES, I., SOUCAILLE, P., BERTRAND, P. & LEGER, C. (2009) Correcting for Electrocatalyst Desorption and Inactivation in Chronoamperometry Experiments. *Analytical Chemistry,* 81**,** 2962-2968.

FOURNIER, M., DERMOUN, Z., DURAND, M. C. & DOLLA, A. (2004) A new function of the Desulfovibrio vulgaris Hildenborough [Fe] hydrogenase in the protection against oxidative stress. *J Biol Chem,* 279**,** 1787-93.

FREW, J. E. & HILL, H. A. O. (1988) Direct and indirect electron transfer between electrodes and redox proteins. *European Journal of Biochemistry,* 172**,** 261.

FRIEDRICH, M. G., ROBERTSON, J. W., WALZ, D., KNOLL, W. & NAUMANN, R. L. (2008) Electronic wiring of a multi-redox site membrane protein in a biomimetic surface architecture. *Biophys J,* 94**,** 3698-705.

FRIELINGSDORF, S., SCHUBERT, T., POHLMANN, A., LENZ, O. & FRIEDRICH, B. (2011) A trimeric supercomplex of the oxygen-tolerant membrane-bound [NiFe]-hydrogenase from Ralstonia eutropha H16. *Biochemistry,* 50**,** 10836-43.

FRITSCH, J., SCHEERER, P., FRIELINGSDORF, S., KROSCHINSKY, S., FRIEDRICH, B., LENZ, O. & SPAHN, C. M. (2011) The crystal structure of an oxygen-tolerant hydrogenase uncovers a novel iron-sulphur centre. *Nature,* 479**,** 249-52.

GAO, Q., GUO, Y. Y., LIU, J., YUAN, X. Q., QI, H. L. & ZHANG, C. X. (2011) A biosensor prepared by co-entrapment of a glucose oxidase and a carbon nanotube within an electrochemically deposited redox polymer multilayer. *Bioelectrochemistry,* 81**,** 109-113.

GOODING, J. J. (2005) Nanostructuring electrodes with carbon nanotubes: A review on electrochemistry and applications for sensing. *Electrochimica Acta,* 50**,** 3049-3060.

GORHAM, J., SMITH, B. & FAIRBOTHER, D. H. (2007) Modification of alkanethiolate self-assembled monolayers by atomic hydrogen: Influence of alkyl chain length. *J phys Chem C,* 111**,** 374-382.

GORIS, T., WAIT, A. F., SAGGU, M., FRITSCH, J., HEIDARY, N., STEIN, M., ZEBGER, I., LENDZIAN, F., ARMSTRONG, F. A., FRIEDRICH, B. & LENZ, O. (2011) A unique iron-sulfur cluster is crucial for oxygen tolerance of a [NiFe]-hydrogenase. *Nat Chem Biol,* 7**,** 310-8.

GRANT, L. M., TIBERG, F. & DUCKER, W. A. (1998) Nanometer-Scale Organization of Ethylene Oxide Surfactants on Graphite, Hydrophilic Silica, and Hydrophobic Silica. *J Phys Chem B,* 102**,** 4288-4294.

GRUMELLI, D., MENDEZ DE LEO, L. P., BONAZZOLA, C., ZAMLYNNY, V., CALVO, E. J. & SALVAREZZA, R. C. (2010) Methylene blue incorporation into alkanethiol SAMs on Au(111): effect of hydrocarbon chain ordering. *Langmuir,* 26**,** 8226-32.

GUIRAL, M., AUBERT, C. & GIUDICI-ORTICONI, M. T. (2005a) Hydrogen metabolism in the hyperthermophilic bacterium Aquifex aeolicus. *Biochem Soc Trans,* 33**,** 22-4.

GUIRAL, M., PRUNETTI, L., AUSSIGNARGUES, C. M., CIACCAFAVA, A., INFOSSI, P., ILBERT, M., LOJOU, E., GIUDICI-ORTICONI, M.-T. R. S. & ROBERT, K. P. (2012) The Hyperthermophilic Bacterium Aquifex aeolicus: From Respiratory Pathways to Extremely Resistant Enzymes and Biotechnological Applications. *Advances in Microbial Physiology.* Academic Press.

GUIRAL, M., PRUNETTI, L., LIGNON, S., LEBRUN, R., MOINIER, D. & GIUDICI-ORTICONIT, M. T. (2009) New insights into the respiratory chains of the chemolithoautotrophic and hyperthermophilic bacterium Aquifex aeolicus. *J Proteome Res,* 8**,** 1717-30.

GUIRAL, M., TRON, P., AUBERT, C., GLOTER, A., IOBBI-NIVOL, C. & GIUDICI-ORTICONI, M. T. (2005b) A membrane-bound multienzyme, hydrogen-oxidizing, and sulfur-reducing complex from the hyperthermophilic bacterium Aquifex aeolicus. *J Biol Chem,* 280**,** 42004-15.

GUIRAL, M., TRON, P., BELLE, V., AUBERT, C., LÉGER, C., GUIGLIARELLI, B. & GIUDICI-ORTICONI, M. T. (2006) Hyperthermostable and oxygen resistant hydrogenases from a hyperthermophilic bacterium Aquifex aeolicus: Physicochemical properties. *Int. J. Hydrogen Energy,* 31**,** 1424-1431.

GULABOSKI, R., MIRCESKI, V., BOGESKI, I. & HOTH, M. (2011) Protein film voltammetry: electrochemical enzymatic spectroscopy. A review on recent progress. *J solid State Electrochem*.

GUTIERREZ-SANCHEZ, C., OLEA, D., MARQUES, M., FERNANDEZ, V. M., PEREIRA, I. A., VELEZ, M. & DE LACEY, A. L. (2011) Oriented immobilization of a membrane-bound hydrogenase onto an electrode for direct electron transfer. *Langmuir,* 27**,** 6449-57.

GUTO, P. M. & RUSLING, J. F. (2006) Myoglobin retains iron heme and near-native conformation in DDAB films prepared from pH 5 to 7 dispersions. *Electrochemistry Communications,* 8**,** 455-459.

HAAS, A. S., PILLOUD, D. L., REDDY, K. S., BABCOCK, G. T., MOSER, C. C., BLASIE, J. K. & DUTTON, P. L. (2001) Cytochrome c and cytochrome c oxidase: monolayer assemblies an catalysis. *j Phys Chem B,* 105**,** 11351-11362.

HALADJIAN, J., BIANCO, P., GUERLESQUIN, F. O. & BRUSCHI, M. (1987) Electrochemical study of the electron exchange between cytochrome C3 and hydrogenase from Desulfovibrio desulfuricans Norway. *Biochemical and Biophysical Research Communications,* 147**,** 1289.

HALAMKOVA, L., HALAMEK, J., BOCHAROVA, V., SZCZUPAK, A., ALFONTA, L. & KATZ, E. (2012) Implanted biofuel cell operating in a living snail. *J Am Chem Soc,* 134**,** 5040-3.

HANEFELD, U., GARDOSSI, L. & MAGNER, E. (2009) Understanding enzyme immobilisation. *Chem Soc Rev,* 38**,** 453-68.

HAPPE, R. P., ROSEBOOM, W., EGERT, G., FRIEDRICH, C. G., MASSANZ, C., FRIEDRICH, B. & ALBRACHT, S. P. (2000) Unusual FTIR and EPR properties of the H2-activating site of the cytoplasmic NAD-reducing hydrogenase from Ralstonia eutropha. *FEBS Lett,* 466**,** 259-63.

HAPPE, R. P., ROSEBOOM, W., PIERIK, A. J., ALBRACHT, S. P. & BAGLEY, K. A. (1997) Biological activation of hydrogen. *Nature,* 385**,** 126.

HEERING, H. A., WIERTZ, F. G., DEKKER, C. & DE VRIES, S. (2004) Direct immobilization of native yeast iso-1 cytochrome C on bare gold: fast electron relay to redox enzymes and zeptomole protein-film voltammetry. *J Am Chem Soc,* 126**,** 11103-12.

HIGUCHI, Y., YAGI, T. & YASUOKA, N. (1997) Unusual ligand structure in Ni-Fe active center and an additional Mg site in hydrogenase revealed by high resolution X-ray structure analysis. *Structure,* 5**,** 1671-80.

HIROMOTO, T., ATAKA, K., PILAK, O., VOGT, S., STAGNI, M. S., MEYER-KLAUCKE, W., WARKENTIN, E., THAUER, R. K., SHIMA, S. & ERMLER, U. (2009) The crystal structure of C176A mutated [Fe]-hydrogenase suggests an acyl-iron ligation in the active site iron complex. *FEBS Lett,* 583**,** 585-90.

HOEBEN, F. J., HELLER, I., ALBRACHT, S. P., DEKKER, C., LEMAY, S. G. & HEERING, H. A. (2008) Polymyxin-coated Au and carbon nanotube electrodes for stable [NiFe]-hydrogenase film voltammetry. *Langmuir,* 24**,** 5925-31.

HOLZINGER, M., LE GOFF, A. & COSNIER, S. (2012) Carbon nanotube/enzyme biofuel cells. *Electrochimica Acta,* 82**,** 179.

HOOGVLIET, J. C., LIEVENSE, L. C., VAN DIJK, C. & VEEGER, C. (1988) Electron transfer between the hydrogenase from Desulfovibrio vulgaris (Hildenborough) and viologens. 1. Investigations by cyclic voltammetry. *European Journal Of Biochemistry / FEBS,* 174**,** 273.

HOPPE-SEYLER, F. (1887) Die Methangährung der Essigsäure. *Zeitschrift für Physiologische Chemie,* 11**,** 561-568.

HORCH, M., LAUTERBACH, L., LENZ, O., HILDEBRANDT, P. & ZEBGER, I. (2012) NAD(H)-coupled hydrogen cycling - structure-function relationships of bidirectional [NiFe] hydrogenases. *FEBS Lett,* 586**,** 545-56.

HUANG, H., HU, N., ZENG, Y. & ZHOU, G. (2002) Electrochemistry and electrocatalysis with heme proteins in chitosan biopolymer films. *Anal Biochem,* 308**,** 141-51.

INFOSSI, P., LOJOU, E., CHAUVIN, J. P., HERBETTE, G., BRUGNA, M. & GIUDICI-ORTICONI, M. T. (2010) Aquifex aeolicus membrane hydrogenase for hydrogen biooxidation: Role of lipids and physiological partners in enzyme stability and activity. *International Journal Of Hydrogen Energy,* 35**,** 10778-10789.

JADHAV, S. B. & SINGHAL, R. S. (2012) Conjugation of alpha-amylase with dextran for enhanced stability: Process details, kinetics and structural analysis. *Carbohydrate Polymers,* 90**,** 1811-1817.

JAYASHREE, R. S., YOON, S. K., BRUSHETT, F. R., LOPEZ-MONTESINOS, P. O., NATARAJAN, D., MARKOSKI, L. J. & KENIS, P. J. A. (2010) On the performance of membraneless laminar flow-based fuel cells. *Journal Of Power Sources,* 195**,** 3569-3578.

JONES, A. K., LAMLE, S. E., PERSHAD, H. R., VINCENT, K. A., ALBRACHT, S. P. & ARMSTRONG, F. A. (2003) Enzyme electrokinetics: electrochemical studies of the anaerobic interconversions between active and inactive states of Allochromatium vinosum [NiFe]-hydrogenase. *J Am Chem Soc,* 125**,** 8505-14.

JONES, A. K., SILLERY, E., ALBRACHT, S. P. & ARMSTRONG, F. A. (2002) Direct comparison of the electrocatalytic oxidation of hydrogen by an enzyme and a platinum catalyst. *Chem Commun (Camb)*, 866-7.

JONSSON-NIEDZIOLKA, M., KAMINSKA, A. & OPALLO, M. (2010) Pyrene-functionalised single-walled carbon nanotubes for mediatorless dioxygen bioelectrocatalysis. *Electrochimica Acta,* 55, 8744-8750.

JORMAKKA, M., TORNROTH, S., BYRNE, B. & IWATA, S. (2002) Molecular basis of proton motive force generation: structure of formate dehydrogenase-N. *Science,* 295, 1863-8.

JOSHI, P. P., MERCHANT, S. A., WANG, Y. D. & SCHMIDTKE, D. W. (2005) Amperometric biosensors based on redox polymer-carbon nanotube-enzyme composites. *Analytical Chemistry,* 77, 3183-3188.

KARLSSON, M. & CARLSSON, U. (2005) Protein adsorption orientation in the light of fluorescent probes: mapping of the interaction between site-directly labeled human carbonic anhydrase II and silica nanoparticles. *Biophys J,* 88, 3536-44.

KARYAKIN, A. A., MOROZOV, S. V., KARYAKINA, E. E., ZORIN, N. A., PERELYGIN, V. V. & COSNIER, S. (2005) Hydrogenase electrodes for fuel cells. *Biochem Soc Trans,* 33, 73-5.

KIHARA, T., LIU, X. Y., NAKAMURA, C., PARK, K. M., HAN, S. W., QIAN, D. J., KAWASAKI, K., ZORIN, N. A., YASUDA, S., HATA, K., WAKAYAMA, T. & MIYAKE, J. (2011) Direct electron transfer to hydrogenase for catalytic hydrogen production using a single-walled carbon nanotube forest. *International Journal Of Hydrogen Energy,* 36, 7523-7529.

KIM, D. H. & KIM, M. S. (2011) Hydrogenases for biological hydrogen production. *Bioresour Technol,* 102, 8423-31.

KIM, J., JIA, H. & WANG, P. (2006) Challenges in biocatalysis for enzyme-based biofuel cells. *Biotechnol Adv,* 24, 296-308.

KLEIHUES, L., LENZ, O., BERNHARD, M., BUHRKE, T. & FRIEDRICH, B. (2000) The H(2) sensor of Ralstonia eutropha is a member of the subclass of regulatory [NiFe] hydrogenases. *J Bacteriol,* 182, 2716-24.

KRISHNAN, S. & ARMSTRONG, F. A. (2012) Order-of-magnitude enhancement of an enzymatic hydrogen-air fuel cell based on pyrenyl carbon nanostructures. *Chemical Science,* 3, 1015-1023.

KRZEMINSKI, L., CRONIN, S., NDAMBA, L., CANTERS, G. W., AARTSMA, T. J., EVANS, S. D. & JEUKEN, L. J. (2011) Orientational control over nitrite reductase on modified gold electrode and its effects on the interfacial electron transfer. *J Phys Chem B,* 115, 12607-14.

KUMAR, S. & CHEN, S.-M. (2008) Electroanalysis of NADH Using Conducting and Redox Active Polymer/Carbon Nanotubes Modified Electrodes-A Review. *Sensors,* 8, 739-766.

LAHARI, C., JASTI, L. S., FADNAVIS, N. W., SONTAKKE, K., INGAVLE, G., DEOKAR, S. & PONRATHNAM, S. (2009) Adsorption induced enzyme denaturation: the role of polymer hydrophobicity in adsorption and denaturation of alpha-chymotrypsin on allyl glycidyl ether (AGE)-ethylene glycol dimethacrylate (EGDM) copolymers. *Langmuir,* 26, 1096-106.

LEE, C. Y. & BOND, A. M. (2010) A comparison of the higher order harmonic components derived from large-amplitude Fourier transformed ac voltammetry of myoglobin and heme in DDAB films at a pyrolytic graphite electrode. *Langmuir,* 26, 5243-53.

LEGER, C. & BERTRAND, P. (2008) Direct electrochemistry of redox enzymes as a tool for mechanistic studies. *Chem Rev,* 108**,** 2379-438.

LENZ, O., GLEICHE, A., STRACK, A. & FRIEDRICH, B. (2005) Requirements for heterologous production of a complex metalloenzyme: the membrane-bound [NiFe] hydrogenase. *J Bacteriol,* 187**,** 6590-5.

LIEBGOTT, P. P., DE LACEY, A. L., BURLAT, B., COURNAC, L., RICHAUD, P., BRUGNA, M., FERNANDEZ, V. M., GUIGLIARELLI, B., ROUSSET, M., LEGER, C. & DEMENTIN, S. (2011) Original design of an oxygen-tolerant [NiFe] hydrogenase: major effect of a valine-to-cysteine mutation near the active site. *J Am Chem Soc,* 133**,** 986-97.

LIEBGOTT, P. P., LEROUX, F., BURLAT, B., DEMENTIN, S., BAFFERT, C., LAUTIER, T., FOURMOND, V., CECCALDI, P., CAVAZZA, C., MEYNIAL-SALLES, I., SOUCAILLE, P., FONTECILLA-CAMPS, J. C., GUIGLIARELLI, B., BERTRAND, P., ROUSSET, M. & LEGER, C. (2010) Relating diffusion along the substrate tunnel and oxygen sensitivity in hydrogenase. *Nature Chemical Biology,* 6**,** 63-70.

LOJOU, E. (2011) Hydrogenases as catalysts for fuel cells: Strategies for efficient immobilization at electrode interfaces. *Electrochimica Acta,* 56**,** 10385-10397.

LOJOU, E. & BIANCO, P. (2003) Quartz crystal microbalance and voltammetry monitoring for layer-by-layer assembly of cytochrome c(3) and poly(ester sulfonic acid) films on gold and silver electrodes. *Journal Of Electroanalytical Chemistry,* 557**,** 37-47.

LOJOU, E. & BIANCO, P. (2004) Electrocatalytic reactions at hydrogenase-modified electrodes and their applications to biosensors: from the isolated enzymes to the whole cells. *Electroanalysis,* 16**,** 1093-1100.

LOJOU, E., CUTRUZZOLA, M., TEGONI, M. & BIANCO, P. (2002) Electrochemical study of the intermolecular electron transfer to Pseudomonas aeruginosa cytochrome cd1 nitrite reductase. *Electrochimica Acta,* 48**,** 1055-1064.

LOJOU, E., GIUDICI-ORTICONI, M. T. & BIANCO, P. (2005) Hydrogenases from the hyperthermophilic bacterium Aquifex aeolicus: Electrocatalysis of the hydrogen production/consumption reactions at carbon electrodes. *Journal Of Electroanalytical Chemistry,* 577**,** 79-86.

LOJOU, E., LUO, X., BRUGNA, M., CANDONI, N., DEMENTIN, S. & GIUDICI-ORTICONI, M. T. (2008) Biocatalysts for fuel cells: efficient hydrogenase orientation for H2 oxidation at electrodes modified with carbon nanotubes. *J Biol Inorg Chem,* 13**,** 1157-67.

LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L. & RANDALL, R. J. (1951) Protein Measurement With The Folin Phenol Reagent. *Journal Of Biological Chemistry,* 193**,** 265-275.

LU, Q. & LI, C. M. (2008) One-step co-electropolymerized conducting polymer-protein composite film for direct electrochemistry-based biosensors. *Biosensors & Bioelectronics,* 24**,** 767-772.

LUKEY, M. J., PARKIN, A., ROESSLER, M. M., MURPHY, B. J., HARMER, J., PALMER, T., SARGENT, F. & ARMSTRONG, F. A. (2010) How Escherichia coli is equipped to oxidize hydrogen under different redox conditions. *J Biol Chem,* 285**,** 3928-38.

LUKEY, M. J., ROESSLER, M. M., PARKIN, A., EVANS, R. M., DAVIES, R. A., LENZ, O., FRIEDRICH, B., SARGENT, F. & ARMSTRONG, F. A. (2011) Oxygen-tolerant [NiFe]-hydrogenases: the

individual and collective importance of supernumerary cysteines at the proximal Fe-S cluster. *J Am Chem Soc,* 133**,** 16881-92.

LUO, X., BRUGNA, M., TRON-INFOSSI, P., GIUDICI-ORTICONI, M. T. & LOJOU, E. (2009) Immobilization of the hyperthermophilic hydrogenase from Aquifex aeolicus bacterium onto gold and carbon nanotube electrodes for efficient H2 oxidation. *J Biol Inorg Chem,* 14**,** 1275-88.

LYON, E. J., SHIMA, S., BUURMAN, G., CHOWDHURI, S., BATSCHAUER, A., STEINBACH, K. & THAUER, R. K. (2004) UV-A/blue-light inactivation of the 'metal-free' hydrogenase (Hmd) from methanogenic archaea. *Eur J Biochem,* 271**,** 195-204.

MADDEN, C., VAUGHN, M. D., DIEZ-PEREZ, I., BROWN, K. A., KING, P. W., GUST, D., MOORE, A. L. & MOORE, T. A. (2012) Catalytic turnover of [FeFe]-hydrogenase based on single-molecule imaging. *J Am Chem Soc,* 134**,** 1577-82.

MAK, L. H., SADEGHI, S. J., FANTUZZI, A. & GILARDI, G. (2010) Control of Human Cytochrome P450 2E1 Electrocatalytic Response as a Result of Unique Orientation on Gold Electrodes. *Analytical Chemistry,* 82**,** 5357-5362.

MALINAUSKAS, A., NIAURA, G., BLOXHAM, S., RUZGAS, T. & GORTON, L. (2000) Electropolymerization of Preadsorbed Layers of Some Azine Redox Dyes on Graphite. *J Colloid Interface Sci,* 230**,** 122-127.

MANO, N. (2008) A 280 mu W cm(-2) biofuel cell operating at low glucose concentration. *Chemical Communications***,** 2221-2223.

MANO, N., FERNANDEZ, J. L., KIM, Y., SHIN, W., BARD, A. J. & HELLER, A. (2003) Oxygen is electroreduced to water on a "wired" enzyme electrode at a lesser overpotential than on platinum. *J Am Chem Soc,* 125**,** 15290-1.

MANO, N., MAO, F. & HELLER, A. (2002) A miniature biofuel cell operating in a physiological buffer. *J Am Chem Soc,* 124**,** 12962-3.

MANO, N., SOUKHAREV, V. & HELLER, A. (2006) A laccase-wiring redox hydrogel for efficient catalysis of O2 electroreduction. *J Phys Chem B,* 110**,** 11180-7.

MATIAS, P. M., SOARES, C. M., SARAIVA, L. M., COELHO, R., MORAIS, J., LE GALL, J. & CARRONDO, M. A. (2001) [NiFe] hydrogenase from Desulfovibrio desulfuricans ATCC 27774: gene sequencing, three-dimensional structure determination and refinement at 1.8 A and modelling studies of its interaction with the tetrahaem cytochrome c3. *J Biol Inorg Chem,* 6**,** 63-81.

MEYER, T., GROSS, J., BLANCK, C., SCHMUTZ, M., LUDWIG, B., HELLWIG, P. & MELIN, F. (2011) Electrochemistry of Cytochrome c(1), Cytochrome c(552), and Cu(A) from the Respiratory Chain of Thermus thermophilus Immobilized on Gold Nanoparticles. *Journal Of Physical Chemistry B,* 115**,** 7165-7170.

MILLO, D., PANDELIA, M. E., UTESCH, T., WISITRUANGSAKUL, N., MROGINSKI, M. A., LUBITZ, W., HILDEBRANDT, P. & ZEBGER, I. (2009) Spectroelectrochemical study of the [NiFe] hydrogenase from Desulfovibrio vulgaris Miyazaki F in solution and immobilized on biocompatible gold surfaces. *J Phys Chem B,* 113**,** 15344-51.

MONDAL, M. S., GOODIN, D. B. & ARMSTRONG, F. A. (1998) Simultaneous Voltammetric Comparisons of Reduction Potentials, Reactivities, and Stabilities of the High-Potential Catalytic States of Wild-Type and Distal-Pocket Mutant (W51F) Yeast Cytochrome c Peroxidase. *J Am Chem Soc,* 120**,** 6270-6276.

MONTET, Y., AMARA, P., VOLBEDA, A., VERNEDE, X., HATCHIKIAN, E. C., FIELD, M. J., FREY, M. & FONTECILLA-CAMPS, J. C. (1997) Gas access to the active site of Ni-Fe hydrogenases probed by X-ray crystallography and molecular dynamics. *Nat Struct Biol,* 4**,** 523-6.

MOORE, C. M., AKERS, N. L., HILL, A. D., JOHNSON, Z. C. & MINTEER, S. D. (2004a) Improving the environment for immobilized dehydrogenase enzymes by modifying Nafion with tetraalkylammonium bromides. *Biomacromolecules,* 5**,** 1241-7.

MOORE, C. M., AKERS, N. L., HILL, A. D., JOHNSON, Z. C. & MINTEER, S. D. (2004b) Improving the environment for immobilized dehydrogenase enzymes by modifying Nafion with tetraalkylammonium bromides. *Biomacromolecules,* 5**,** 1241-1247.

MORRA, S., VALETTI, F., SADEGHI, S. J., KING, P. W., MEYER, T. & GILARDI, G. (2011) Direct electrochemistry of an [FeFe]-hydrogenase on a TiO(2) Electrode. *Chemical Communications,* 47**,** 10566-10568.

MOUSTY, C. (2010) Biosensing applications of clay-modified electrodes: a review. *Anal Bioanal Chem,* 396**,** 315-25.

MUKHERJEE, D., MAY, M. & KHOMAMI, B. (2011) Detergent-protein interactions in aqueous buffer suspensions of Photosystem I (PS I). *J Colloid Interface Sci,* 358**,** 477-84.

MULDER, D. W., BOYD, E. S., SARMA, R., LANGE, R. K., ENDRIZZI, J. A., BRODERICK, J. B. & PETERS, J. W. (2010) Stepwise [FeFe]-hydrogenase H-cluster assembly revealed in the structure of HydA(DeltaEFG). *Nature,* 465**,** 248-51.

MURATA, K., SUZUKI, M., KAJIYA, K., NAKAMURA, N. & OHNO, H. (2009) High performance bioanode based on direct electron transfer of fructose dehydrogenase at gold nanoparticle-modified electrodes. *Electrochemistry Communications,* 11**,** 668-671.

NICOLET, Y., CAVAZZA, C. & FONTECILLA-CAMPS, J. C. (2002) Fe-only hydrogenases: structure, function and evolution. *J Inorg Biochem,* 91**,** 1-8.

NICOLET, Y., DE LACEY, A. L., VERNEDE, X., FERNANDEZ, V. M., HATCHIKIAN, E. C. & FONTECILLA-CAMPS, J. C. (2001) Crystallographic and FTIR spectroscopic evidence of changes in Fe coordination upon reduction of the active site of the Fe-only hydrogenase from Desulfovibrio desulfuricans. *J Am Chem Soc,* 123**,** 1596-601.

OHARA, T. J., RAJAGOPALAN, R. & HELLER, A. (1993) Glucose Electrodes Based On Cross-Linked [Os(Bpy)(2)](+/2+) Complexed Poly(L-Vinylimidazole) Films. *Analytical Chemistry,* 65**,** 3512-3517.

OLYVEIRA, G. M., KIM, J. H., MARTINS, M. V. A., IOST, R. M., CHAUDHARI, K. N., YU, J. S. & CRESPILHO, F. N. (2012) Flexible Carbon Cloth Electrode Modified by Hollow Core-Mesoporous Shell Carbon as a Novel Efficient Bio-Anode for Biofuel Cell. *Journal Of Nanoscience And Nanotechnology,* 12**,** 356-360.

OSMAN, M. H., SHAH, A. A. & WALSH, F. C. (2011) Recent progress and continuing challenges in bio-fuel cells. Part I: enzymatic cells. *Biosens Bioelectron,* 26**,** 3087-102.

OUYANG, X. Y., LIU, J. H., LI, J. S. & YANG, R. H. (2012) A carbon nanoparticle-based low-background biosensing platform for sensitive and label-free fluorescent assay of DNA methylation. *Chemical Communications,* 48**,** 88-90.

PAES DE SOUSA, P. M., PAULETA, S. R., GONCALVES, M. L., PETTIGREW, G. W., MOURA, I., DOS SANTOS, M. M. & MOURA, J. J. (2007) Mediated catalysis of Paracoccus pantotrophus cytochrome c peroxidase by P. pantotrophus pseudoazurin: kinetics of intermolecular electron transfer. *J Biol Inorg Chem,* 12**,** 691-8.

PAGE, C. C., MOSER, C. C., CHEN, X. & DUTTON, P. L. (1999) Natural engineering principles of electron tunnelling in biological oxidation-reduction. *Nature,* 402**,** 47-52.

PANDELIA, M. E., FOURMOND, V., TRON-INFOSSI, P., LOJOU, E., BERTRAND, P., LEGER, C., GIUDICI-ORTICONI, M. T. & LUBITZ, W. (2010a) Membrane-bound hydrogenase I from the hyperthermophilic bacterium Aquifex aeolicus: enzyme activation, redox intermediates and oxygen tolerance. *J Am Chem Soc,* 132**,** 6991-7004.

PANDELIA, M. E., INFOSSI, P., GIUDICI-ORTICONI, M. T. & LUBITZ, W. (2010b) The Oxygen-Tolerant Hydrogenase I from Aquifex aeolicus Weakly Interacts with Carbon Monoxide: An Electrochemical and Time-Resolved FTIR Study. *Biochemistry,* 49**,** 8873.

PANDELIA, M. E., LUBITZ, W. & NITSCHKE, W. (2012) Evolution and diversification of Group 1 [NiFe] hydrogenases. Is there a phylogenetic marker for O2-tolerance? *Biochimica et Biophysica Acta,* 1817**,** 1565-1575.

PANDELIA, M. E., NITSCHKE, W., INFOSSI, P., GIUDICI-ORTICONI, M. T., BILL, E. & LUBITZ, W. (2011) Characterization of a unique [FeS] cluster in the electron transfer chain of the oxygen tolerant [NiFe] hydrogenase from Aquifex aeolicus. *Proc Natl Acad Sci U S A,* 108**,** 6097-102.

PARK, H. J., WON, K., LEE, S. Y., KIM, J. H., KIM, W. J., LEE, D. S. & YOON, H. H. (2011) Fabrication of CNT/Ferrocene/Glucose Oxidase/Chitosan-Layered Bioanode for Glucose/Oxygen Biofuel Cells. *Molecular Crystals And Liquid Crystals,* 539**,** 238-246.

PARKIN, A. & SARGENT, F. (2012) The hows and whys of aerobic H2 metabolism. *Curr Opin Chem Biol,* 16**,** 26-34.

PERSHAD, H. R., DUFF, J. L. C., HEERING, H. A., DUIN, E. C., ALBRACHT, S. P. J. & ARMSTRONG, F. A. (1999) Catalytic Electron Transport in Chromatium vinosum [NiFe]-Hydrogenase:â€‰ Application of Voltammetry in Detecting Redox-Active Centers and Establishing That Hydrogen Oxidation Is Very Fast Even at Potentials Close to the Reversible H+/H2 Valueâ€. *Biochemistry,* 38**,** 8992.

PETERS, J. W., STOWELL, M. H. B., SOLTIS, S. M., FINNEGAN, M. G., JOHNSON, M. K. & REES, D. C. (1997) Redox-Dependent Structural Changes in the Nitrogenase P-Clusterâ€,â€¡. *Biochemistry,* 36**,** 1181.

PIERIK, A. J., ROSEBOOM, W., HAPPE, R. P., BAGLEY, K. A. & ALBRACHT, S. P. (1999) Carbon monoxide and cyanide as intrinsic ligands to iron in the active site of [NiFe]-hydrogenases. NiFe(CN)2CO, Biology's way to activate H2. *J Biol Chem,* 274**,** 3331-7.

PINGARRON, J. M., YANEZ-SEDENO, P. & GONZALEZ-CORTES, A. (2008) Gold nanoparticle-based electrochemical biosensors. *Electrochimica Acta,* 53**,** 5848.

PORTER, M. D., BRIGHT, T. B., ALLARA, D. L. & CHIDSEY, C. E. D. (1987) Spontaneously organized molecular assemblies. 4. Structural characterization of n-alkyl thiol monolayers on gold by optical ellipsometry, infrared spectroscopy, and electrochemistry. *Journal of the American Chemical Society,* 109**,** 3559.

POTTER, M. C. (1911) Electrical effects accompanying the decomposition of organic compounds. *Proceedings Of The Royal Society Of London Series B-Containing Papers Of A Biological Character,* 84**,** 260-276.

QIN, G. W., LIU, J., BALAJI, T., XU, X. N., MATSUNAGA, H., HAKUTA, Y., ZUO, L. & RAVEENDRAN, P. (2008) A facile and template-free method to prepare mesoporous gold sponge and its pore size control. *Journal Of Physical Chemistry C,* 112**,** 10352-10358.

RAMANI, K., KARTHIKEYAN, S., BOOPATHY, R., KENNEDY, L. J., MANDAL, A. B. & SEKARAN, G. (2012) Surface functionalized mesoporous activated carbon for the immobilization of acidic lipase and their application to hydrolysis of waste cooked oil: Isotherm and kinetic studies. *Process Biochemistry,* 47**,** 435-445.

RAMIREZ, P., MANO, N., ANDREU, R., RUZGAS, T., HELLER, A., GORTON, L. & SHLEEV, S. (2008) Direct electron transfer from graphite and functionalized gold electrodes to T1 and T2/T3 copper centers of bilirubin oxidase. *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics,* 1777**,** 1364-1369.

RAZOLA, S. S., RUIZ, B. L., DIEZ, N. M., MARK, H. B., JR. & KAUFFMANN, J. M. (2002) Hydrogen peroxide sensitive amperometric biosensor based on horseradish peroxidase entrapped in a polypyrrole electrode. *Biosens Bioelectron,* 17**,** 921-8.

REUILLARD, B., LE GOFF, A., AGNÈS, C., ZEBDA, A., HOLZINGER, M. & COSNIER, S. (2012) Direct electron transfer between tyrosinase and multi-walled carbon nanotubes for bioelectrocatalytic oxygen reduction. *Electrochem. comm.,* 20**,** 19-22.

RIETSCH, J. C., DENTZER, J., DUFOUR, A., SCHNELL, F., VIDAL, L., JACQUEMARD, P., GADIOU, R. & VIX-GUTERL, C. (2009) Characterizations of C/C composites and wear debris after heavy braking demands. *Carbon,* 47**,** 85.

ROUSSET, M., MONTET, Y., GUIGLIARELLI, B., FORGET, N., ASSO, M., BERTRAND, P., FONTECILLA-CAMPS, J. C. & HATCHIKIAN, E. C. (1998) [3Fe-4S] to [4Fe-4S] cluster conversion in Desulfovibrio fructosovorans [NiFe] hydrogenase by site-directed mutagenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A,* 95**,** 11625-30.

ROZNIECKA, E., JONSSON-NIEDZIOLKA, M., SOBCZAK, J. W. & OPALLO, M. (2011) Mediatorless bioelectrocatalysis of dioxygen reduction at indium-doped tin oxide (ITO) and ITO nanoparticulate film electrodes. *Electrochimica Acta,* 56**,** 8739-8745.

RUBENWOLF, S., KERZENMACHER, S., ZENGERLE, R. & VON STETTEN, F. (2011) Strategies to extend the lifetime of bioelectrochemical enzyme electrodes for biosensing and biofuel cell applications. *Appl Microbiol Biotechnol,* 89**,** 1315-22.

RUDIGER, O., ABAD, J. M., HATCHIKIAN, E. C., FERNANDEZ, V. M. & DE LACEY, A. L. (2005) Oriented immobilization of Desulfovibrio gigas hydrogenase onto carbon electrodes by covalent bonds for nonmediated oxidation of H2. *J Am Chem Soc,* 127**,** 16008-9.

RUDIGER, O., GUTIERREZ-SANCHEZ, C., OLEA, D., PEREIRA, I. A. C., VELEZ, M., FERNANDEZ, V. M. & DE LACEY, A. L. (2009) Enzymatic Anodes for Hydrogen Fuel Cells based on Covalent

Attachment of Ni-Fe Hydrogenases and Direct Electron Transfer to SAM-Modified Gold Electrodes. *Electroanalysis,* 22**,** 776-783.

RUDIGER, O., GUTIERREZ-SANCHEZ, C., OLEA, D., PEREIRA, I. A. C., VELEZ, M., FERNANDEZ, V. M. & DE LACEY, A. L. (2010) Enzymatic Anodes for Hydrogen Fuel Cells based on Covalent Attachment of Ni-Fe Hydrogenases and Direct Electron Transfer to SAM-Modified Gold Electrodes. *Electroanalysis,* 22**,** 776-783.

SADOWSKA, K., STOLARCZYK, K., BIERNAT, J. F., ROBERTS, K. P., ROGALSKI, J. & BILEWICZ, R. (2010) Derivatization of single-walled carbon nanotubes with redox mediator for biocatalytic oxygen electrodes. *Bioelectrochemistry,* 80**,** 73.

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 Environ. Sci.,* 2**,** 133-138.

SAKAI, S., LIU, Y., WATANABE, R., KAWABE, M., TAYA, M. & KAWAKAMI, K. (2012) An electrospun ultrafine fibrous silica catalyst incorporating an alkyl-silica coating containing lipase for reactions in organic solvents. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic,* 83**,** 120.

SALAJ-KOSLA, U., PÖLLER, S., BEYL, Y., SCANLON, M. D., BELOSHAPKINE, S., SHLEEV, S., SCHUHMANN, W. & MAGNER, E. (2012) Direct electron transfer of bilirubin oxidase (Myrothecium verracuria) at an unmodified nanoporous gold biocathode. *Electrochem. comm.,* 16**,** 92-95.

SALLEZ, Y., BIANCO, P. & LOJOU, E. (2000) Electrochemical behavior of c-type cytochromes at clay-modified carbon electrodes: a model for the interaction between proteins and soils. *Journal Of Electroanalytical Chemistry,* 493**,** 37-49.

SASSOLAS, A., BLUM, L. J. & LECA-BOUVIER, B. D. (2012) Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. *Biotechnol Adv,* 30**,** 489-511.

SCANLON, M. D., SALAJ-KOSLA, U., BELOCHAPKINE, S., MACAODHA, D., LEECH, D., DING, Y. & MAGNER, E. (2012) Characterization of nanoporous gold electrodes for bioelectrochemical applications. *Langmuir,* 28**,** 2251-61.

SCHRODER, V., EMONTS, B., JANSSEN, H. & SCHULZE, H. P. (2003) Explosive limits of hydrogen/oxygen mixtures at pressures up to 200 bar. *Chemie Ingenieur Technik,* 75**,** 914-918.

SHANG, W., NUFFER, J. H., DORDICK, J. S. & SIEGEL, R. W. (2007) Unfolding of ribonuclease A on silica nanoparticle surfaces. *Nano Lett,* 7**,** 1991-5.

SHIMOMURA, M., KUWAHARA, T., IIZUKA, K. & KINOSHITA, T. (2010) Immobilization of Alcohol Dehydrogenase on Films Prepared by the Electrochemical Copolymerization of Pyrrole and 1-(2-Carboxyethyl)pyrrole for Ethanol Sensing. *Journal Of Applied Polymer Science,* 116**,** 2651-2657.

SHOMURA, Y., YOON, K. S., NISHIHARA, H. & HIGUCHI, Y. (2011) Structural basis for a [4Fe-3S] cluster in the oxygen-tolerant membrane-bound [NiFe]-hydrogenase. *Nature,* 479**,** 253-6.

SILAKOV, A., WENK, B., REIJERSE, E. & LUBITZ, W. (2009) (14)N HYSCORE investigation of the H-cluster of [FeFe] hydrogenase: evidence for a nitrogen in the dithiol bridge. *Phys Chem Chem Phys,* 11**,** 6592-9.

SONG, J., SHIN, H. & KANG, C. (2011) A Carbon Nanotube Layered Electrode for the Construction of the Wired Bilirubin Oxidase Oxygen Cathode. *Electroanalysis,* 23**,** 2941-2948.

SOUKHAREV, V., MANO, N. & HELLER, A. (2004) A four-electron O-2-electroreduction biocatalyst superior to platinum and a biofuel cell operating at 0.88 V. *Journal Of The American Chemical Society,* 126**,** 8368-8369.

STEPHENSON, M. & STICKLAND, L. H. (1931) Hydrogenase: a bacterial enzyme activating molecular hydrogen: The properties of the enzyme. *Biochem J,* 25**,** 205-14.

STRIPP, S., SANGANAS, O., HAPPE, T. & HAUMANN, M. (2009) The structure of the active site H-cluster of [FeFe] hydrogenase from the green alga Chlamydomonas reinhardtii studied by X-ray absorption spectroscopy. *Biochemistry,* 48**,** 5042-9.

SU, L., KELLY, J. B., HAWKRIDGE, F. M., RHOTEN, M. C. & BASKIN, S. I. (2005) Characterization of cyanide binding to cytochrome c oxidase immobilized in electrode-supported lipid bilayer membranes. *Journal of Electroanalytical Chemistry,* 581**,** 241-248.

SUMNER, I. & VOTH, G. A. (2012) Proton transport pathways in [NiFe]-hydrogenase. *J Phys Chem B,* 116**,** 2917-26.

SVEDRUZIC, D., BLACKBURN, J. L., TENENT, R. C., ROCHA, J. D., VINZANT, T. B., HEBEN, M. J. & KING, P. W. (2011) High-performance hydrogen production and oxidation electrodes with hydrogenase supported on metallic single-wall carbon nanotube networks. *J Am Chem Soc,* 133**,** 4299-306.

TALBERT, J. N. & GODDARD, J. M. (2012) Enzymes on material surfaces. *Colloids Surf B Biointerfaces,* 93**,** 8-19.

TASCA, F., GORTON, L., HARREITHER, W., HALTRICH, D., LUDWIG, R. & NOLL, G. (2008) Direct Electron Transfer at Cellobiose Dehydrogenase Modified Anodes for Biofuel Cells. *J. Phys. Chem. C,* 112**,** 9956-9961.

TASCA, F., GORTON, L., HARREITHER, W., HALTRICH, D., LUDWIG, R. & NOLL, G. (2009) Comparison of direct and mediated electron transfer for cellobiose dehydrogenase from Phanerochaete sordida. *Anal Chem,* 81**,** 2791-8.

TASCA, F., HARREITHER, W., LUDWIG, R., GOODING, J. J. & GORTON, L. (2011) Cellobiose Dehydrogenase Aryl Diazoniunn Modified Single Walled Carbon Nanotubes: Enhanced Direct Electron Transfer through a Positively Charged Surface. *Analytical Chemistry,* 83**,** 3042-3049.

TOGNALLI, N. G., FAINSTEIN, A., VERICAT, C., VELA, M. E. & SALVAREZZA, R. C. (2006) Exploring three-dimensional nanosystems with Raman spectroscopy: Methylene blue adsorbed on thiol and sulfur monolayers on gold. *Journal Of Physical Chemistry B,* 110**,** 354-360.

TSUJIMURA, S., FUJITA, M., TATSUMI, H., KANO, K. & IKEDA, T. (2001) Bioelectrocatalysis-based dihydrogen/dioxygen fuel cell operating at physiological pH. *Phys Chem Chem Phys,* 3**,** 1331-1335.

TSUJIMURA, S., NAKAGAWA, T., KANO, K. & IKEDA, T. (2004) Kinetic study of direct bioelectrocatalysis of dioxygen reduction with bilirubin oxidase at carbon electrodes. *Electrochemistry,* 72**,** 437-439.

VAMVAKAKI, V., FOUSKAKI, M. & CHANIOTAKIS, N. (2007) Electrochemical Biosensing systems based on carbon nanotubes and carbon nanofibers. *Analytical Letters,* 40**,** 2271-2287.

VAN DER LINDEN, E., BURGDORF, T., BERNHARD, M., BLEIJLEVENS, B., FRIEDRICH, B. & ALBRACHT, S. P. (2004) The soluble [NiFe]-hydrogenase from Ralstonia eutropha contains four

cyanides in its active site, one of which is responsible for the insensitivity towards oxygen. *J Biol Inorg Chem,* 9**,** 616-26.

VARFOLOMEYEV, S. D., YAROPOLOV, A. I. & KARYAKIN, A. A. (1993) Bioelectrocatalysis: the electrochemical kinetics of hydrogenase action. *Journal of Biotechnology,* 27**,** 331.

VERTEGEL, A. A., SIEGEL, R. W. & DORDICK, J. S. (2004) Silica nanoparticle size influences the structure and enzymatic activity of adsorbed lysozyme. *Langmuir,* 20**,** 6800-7.

VIGNAIS, P. M. & BILLOUD, B. (2007) Occurrence, classification, and biological function of hydrogenases: an overview. *Chem Rev,* 107**,** 4206-72.

VINCENT, K. A., CRACKNELL, J. A., CLARK, J. R., LUDWIG, M., LENZ, O., FRIEDRICH, B. & ARMSTRONG, F. A. (2006) Electricity from low-level H(2) in still air - an ultimate test for an oxygen tolerant hydrogenase. *Chemical Communications***,** 5033-5035.

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. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America,* 102**,** 16951-16954.

VINCENT, K. A., PARKIN, A. & ARMSTRONG, F. A. (2007) Investigating and exploiting the electrocatalytic properties of hydrogenases. *Chem Rev,* 107**,** 4366-413.

VOLBEDA, A., AMARA, P., DARNAULT, C., MOUESCA, J. M., PARKIN, A., ROESSLER, M. M., ARMSTRONG, F. A. & FONTECILLA-CAMPS, J. C. (2012) X-ray crystallographic and computational studies of the O2-tolerant [NiFe]-hydrogenase 1 from Escherichia coli. *Proc Natl Acad Sci U S A,* 109**,** 5305-10.

VOLBEDA, A., CHARON, M. H., PIRAS, C., HATCHIKIAN, E. C., FREY, M. & FONTECILLA-CAMPS, J. C. (1995) Crystal structure of the nickel-iron hydrogenase from Desulfovibrio gigas. *Nature,* 373**,** 580-7.

WACKERBARTH, H., GRUBB, M., ZHANG, J., HANSEN, A. G. & ULSTRUP, J. (2004) Long-range order of organized oligonucleotide monolayers on Au(111) electrodes. *Langmuir,* 20**,** 1647-55.

WAIT, A. F., PARKIN, A., MORLEY, G. M., DOS SANTOS, L. & ARMSTRONG, F. A. (2010) Characteristics of Enzyme-Based Hydrogen Fuel Cells Using an Oxygen-Tolerant Hydrogenase as the Anodic Catalyst. *Journal Of Physical Chemistry C,* 114**,** 12003-12009.

WALCARIUS, A. & COLLINSON, M. M. (2009) Analytical Chemistry with Silica Sol-Gels: Traditional Routes to New Materials for Chemical Analysis. *Annual Review of Analytical Chemistry,* 2**,** 121.

WANG, J. (2012) Electrochemical biosensing based on noble metal nanoparticles. *Microchimica Acta,* 177**,** 245-270.

WANG, J. T., CHEN, Q. J., LIU, X. J., QIAO, W. M., LONG, D. H. & LING, L. C. (2012a) Hard-templating synthesis of mesoporous carbon spheres with controlled particle size and mesoporous structure for enzyme immobilization. *Materials Chemistry And Physics,* 129**,** 1035-1041.

WANG, X. J., FALK, M., ORTIZ, R., MATSUMURA, H., BOBACKA, J., LUDWIG, R., BERGELIN, M., GORTON, L. & SHLEEV, S. (2012b) Mediatorless sugar/oxygen enzymatic fuel cells based on gold nanoparticle-modified electrodes. *Biosensors & Bioelectronics,* 31**,** 219-225.

WANG, Y., CHEN, K. S., MISHLER, J., CHO, S. C. & ADROHER, X. C. (2011) A review of polymer electrolyte membrane fuel cells: Technology, applications, and needs on fundamental research. *Applied Energy,* 88**,** 981.

WEN, H., BAMBHANIA, H. M. & BARTON, S. C. (2012) Carbon nanotube-modified biocatalytic microelectrodes with multiscale porosity. *Journal Of Applied Electrochemistry,* 42**,** 145-151.

WINKLER, M., HEIL, B., HEIL, B. & HAPPE, T. (2002) Isolation and molecular characterization of the [Fe]-hydrogenase from the unicellular green alga Chlorella fusca. *Biochim Biophys Acta,* 1576**,** 330-4.

WRIGHT, J. A., TURRELL, P. J. & PICKETT, C. J. (2010) The Third Hydrogenase: More Natural Organometallics. *Organometallics,* 29**,** 6146–6156.

XIAO-YU, Y., GE, T., NAN, J. & BAO-LIAN, S. (2012) Immobilisation technology: a sustainable solution for biofuel cell design. *Energy Environ. Sci.,* 5**,** 5540-5563.

XU, Z., WANG, S. L. & GAO, H. W. (2010) Effects of nano-sized silicon dioxide on the structures and activities of three functional proteins. *J Hazard Mater,* 180**,** 375-83.

YAHATA, N., SAITOH, T., TAKAYAMA, Y., OZAWA, K., OGATA, H., HIGUCHI, Y. & AKUTSU, H. (2006) Redox interaction of cytochrome c3 with [NiFe] hydrogenase from Desulfovibrio vulgaris Miyazaki F. *Biochemistry,* 45**,** 1653-62.

YAHIRO, A. T., LEE, S. M. & KIMBLE, D. O. (1964) Bioelectrochemistry.I. Enzyme Utilizing Bio-Fuel Cell Studies. *Biochimica Et Biophysica Acta,* 88**,** 375-&.

YANG, S. L., LI, G., YANG, R., XIA, M. M. & QU, L. B. (2011) Simultaneous voltammetric detection of dopamine and uric acid in the presence of high concentration of ascorbic acid using multi-walled carbon nanotubes with methylene blue composite film-modified electrode. *Journal Of Solid State Electrochemistry,* 15**,** 1909-1918.

YAO, Y. L. & SHIU, K. K. (2007) Low potential detection of glucose at carbon nanotube modified glassy carbon electrode with electropolymerized poly(toluidine blue O) film. *Electrochimica Acta,* 53**,** 278-284.

YILDIZ, H. B. & TOPPARE, L. (2006) Biosensing approach for alcohol determination using immobilized alcohol oxidase. *Biosensors & Bioelectronics,* 21**,** 2306-2310.

ZHENG, W., ZHAO, H. Y., ZHOU, H. M., XU, X. X., DING, M. H. & ZHENG, Y. F. (2010) Electrochemistry of bilirubin oxidase at carbon nanotubes. *Journal Of Solid State Electrochemistry,* 14**,** 249-254.

ANNEXES

Stabilization role of a phenothiazine derivative on the electrocatalytic oxidation of hydrogen via Aquifex aeolicus *hydrogenase at graphite membrane electrodes*

A. Ciaccafava, P. Infossi, MT. Giudici-Orticoni, E. Lojou

Langmuir, 26 (2010) 18534-18541

Langmuir
Article
pubs.acs.org/Langmuir
© 2010 American Chemical Society

Stabilization Role of a Phenothiazine Derivative on the Electrocatalytic Oxidation of Hydrogen via *Aquifex aeolicus* Hydrogenase at Graphite Membrane Electrodes

Alexandre Ciaccafava, Pascale Infossi, Marie-Thérèse Giudici-Orticoni, and Elisabeth Lojou*

Unité de Bioénergétique et Ingénierie des Protéines, UPR 9036, Institut de Microbiologie de la Méditerranée—CNRS, 31 Chemin Joseph Aiguier, 13402 Marseille Cedex 20, France

Received July 21, 2010

The [NiFe] membrane-bound hydrogenase from the microaerophilic, hyperthermophilic *Aquifex aeolicus* bacterium (*Aa* Hase) presents oxygen, carbon monoxide, and temperature resistances. Since it oxidizes hydrogen with high turnover, this enzyme is thus of particular interest for biotechnological applications, such as biofuel cells. Efficient immobilization of the enzyme onto electrodes is however a mandatory step. To gain further insight into the parameters governing the interfacial electron process, cyclic voltammetry was performed combining the use of a phenothiazine dye with a membrane electrode design where the enzyme is entrapped in a thin layer. In the absence of the phenothiazine dye, direct electron transfer (DET) for H_2 oxidation is observed due to *Aa* Hase adsorbed onto the PG electrode. An unexpected loss of the catalytic current with time is however observed. The effect of toluidine blue O (TBO) on the catalytic process is first studied with TBO in solution. In addition to the expected mediated electron transfer process (MET), TBO is demonstrated to reconnect directly some *Aa* Hase molecules possibly released from the electrode but still entrapped in the thin layer. On adsorbed TBO the two same processes occur demonstrating the ability of the TBO film to connect *Aa* Hase via a DET process. Loss of activity is however observed due to the poor stability of adsorbed TBO at high temperatures. *Aa* Hase immobilization is then studied on electropolymerized TBO (pTBO). The effect of film thickness, temperature, presence of inhibitors and pH is evaluated. Given a film thickness less than 20 nm, H_2 oxidation proceeds via a mixed DET/MET process through the pTBO film. A high and very stable H_2 oxidation activity is reached, showing the potential applicability of the bioelectrode for biotechnologies. Finally, the multifunctional roles of TBO-based matrix are underlined, including redox mediator, *Aa* Hase anchor, but also buffering and ROS scavenger capabilities to drive pH local changes and avoid oxidative damage.

1. Introduction

In a future "green" hydrogen economy, the use of biocatalysts such as hydrogenases, the enzyme that catalyzes the hydrogen conversion according to $H_2 \leftrightarrows 2H^+ + 2e^-$, emerges as a replacement of chemical catalysts in fuel cells.[1,2] Great improvements in the cell design and the environmental impact are expected thanks to the properties of the biocatalyst. The main advantage of such biofuel cells is the availability and biodegradability of the enzyme, coupled with power densities comparable to platinum catalysts at least in some hydrogen pressure conditions.[3,4] In addition, the high specificity toward H_2 can eliminate the need for a membrane separator. Two major bottlenecks have to be overcome, however, before the development of hydrogenase-based biofuel cells: most hydrogenases are oxygen sensitive and have limited lifetimes especially once immobilized onto an electrode surface. Recently, genetic manipulation allowed the O_2 sensitive [NiFe] hydrogenase from *Desulfovibrio fructosovorans* to be converted into a resistant enzyme.[5] This is however a unique example in the literature, and catalytic efficiency was proved for only several minutes. Another very attractive way is to work with naturally resistant hydrogenases. This can be achieved via the use of hydrogenases from aerobic bacteria such as *Ralstonia eutropha*.[6] Furthermore, during the past decade, a large number of "exotic" microbial species have been discovered. These organisms are a source of stable enzymes at extreme temperatures, pressures, or pH. In most of them, hydrogenases have been detected. Among these organisms, *Aquifex aeolicus* (*Aa*) is a hydrogen-oxidizing, microaerophilic bacterium growing at 85 °C.[7] A membrane-bound [NiFe] hydrogenase (*Aa* Hase) has been identified in *Aa* that is involved in a complex with a diheme cytochrome *b* anchored in the membrane.[8] Previous studies have shown that *Aa* Hase is rather stable at elevated temperatures and exhibits tolerance to oxygen and CO that makes it a good candidate for biotechnological uses.[9,10]

Various strategies have been developed, essentially applied to mesophilic hydrogenases, in view of electrode architecture able to provide efficient hydrogenase immobilization. The widely used procedure is based on simple adsorption of the enzyme onto PG electrode. In this case, given an active PG edge surface, direct interfacial electron transfer is achieved, with no need of any redox mediators. Over the past decade this concept has provided

*Corresponding author. Tel: +33 491164524. Fax: +33 491164097. E-mail: lojou@ifr88.cnrs-mrs.fr.

(1) de Lacey, A. L.; Fernandez, V. M.; Rousset, M.; Cammack, R. *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 40304.
(2) Armstrong, F. A.; Belsey, N. A.; Cracknell, J. A.; Goldet, G.; Parkin, A.; Reisner, E.; Vincent, K. A.; Wait, A. F. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 36.
(3) Karyakin, A.; Morozov, S.; Voronin, O.; Zorin, N.; Karyakina, E.; Fateyev, V.; Cosnier, S. *Ang. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 7244.
(4) Woolerton, T. W.; Vincent, K. A. *Electrochim. Acta* **2009**, *54*, 5011.
(5) Dementin, S.; Leroux, F.; Cournac, L.; de Lacey, A. L.; Volbeda, A.; Léger, C.; Burlat, B.; Martinez, N.; Champ, S.; Martin, L.; Sanganas, O.; Haumann, M.; Fernandez, V. M.; Guigliarelli, B.; Fontecilla-Camps, J. C.; Rousset, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 10156.
(6) Ludwig, M.; Cracknell, J. A.; Vincent, K. A.; Armstrong, F. A.; Lenz, O. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 465.
(7) Huber, R.; Stetter, K. O. *Methods Enzymol.* **2001**, *330*, 11.
(8) Guiral-Brugna, M; Tron, P.; Nitschke, W.; Stetter, K.; Burlat, B.; Guigliarelli, B.; Bruschi, M.; Giudici-Orticoni, M. T. *Extremophiles* **2003**, *7*, 145.
(9) Luo, X. J.; Brugna, M.; Infossi, P.; Giudici-Orticoni, M. T.; Lojou, E. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2009**, *14*, 1275.
(10) Pandelia, M.; Fourmond, V.; Tron, P.; Lojou, E.; Bertrand, P.; Léger, C.; Giudici-Orticoni, M. T.; Lubitz, W. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 6991.

important new insights on electron and proton transfer mechanisms during H_2 oxidation by "classical" mesophilic hydrogenase.[11−13] More recently, adsorption of *Aa* Hase onto electrodes was shown to provide an efficient direct interfacial electron transfer for H_2 oxidation.[9,10] In contrast to [NiFe] Hase from *Desulfovibrio fructosovorans*, it was however demonstrated that *Aa* Hase was adsorbed according to various orientations. Two populations were shown to exist at the electrode interface. The first one presented its distal FeS cluster (the surface cluster which is the entry/exit point of the electrons) at a tunnel distance from the electrode surface so that direct electron transfer (DET) could be achieved. In the second one the FeS distal cluster was too far from the electrode so that H_2 oxidation could occur only via the aid of a redox mediator. The addition of a phenothiazine dye in solution as a redox mediator was thus shown to increase hydrogen oxidation current.

Simple enzyme adsorption is however not convenient for long-term efficiency. Attempts to firmly attach hydrogenase to electrode interfaces while enhancing catalytic efficiency have used various approaches: biocomposite electrode based on clay layers[14] or carbon nanotube networks,[9,13,15,16] thiol-functionalized gold electrodes,[9,17] and finally a novel concept based on the reconstitution of the electron transfer chain into liposomes.[18] The entrapment of mesophilic hydrogenase within viologen-containing films was the only example in the literature of efficient and promising catalysis combining multilayered or electropolymerized films and mediator coimmobilisation.[3,14,19]

Nevertheless, although the immobilization process has been reported to stabilize the hydrogenase during storage,[15,20] a continuous decrease of the catalytic current was most often pointed out along with H_2 electrocatalytic oxidation. This decrease was much more pronounced at elevated temperature.[9,21] No discrimination between release of the enzyme from the interface, reorientation of the enzyme, or denaturation was possible at that time. An exception was reported based on encapsulation of *Aa* Hase in a single-walled carbon nanotube (SWCN) network.[9] In this latter case, it was supposed that favorable hydrophobic interactions in the SWCN cavities served to stabilize the enzyme. Moreover, a recent surface-enhanced IR absorption study performed on a mesophilic hydrogenase attached to thiol-modified gold electrode concluded that the current decrease with time did not result from hydrogenase leaching but was related to slow degradation of the active site, more probably by residual traces of O_2.[17]

The membrane electrode offers one possibility to revisit this process. In this configuration the enzyme is imprisoned in a thin layer between the electrode surface and a dialysis membrane, while the substrate and the redox mediator are able to diffuse through. In this work we propose a new strategy for *Aa* Hase immobilization in order to study and prevent the loss of catalytic activity with time. This is based on the combined use of a phenothiazine dye, toluidine blue O (TBO), with the membrane electrode design. H_2 oxidation by *Aa* Hase at elevated temperatures is thus explored at the membrane electrode with the phenothiazine used under three different modes, in solution, adsorbed onto the electrode, or electropolymerized. The analysis of DET versus mediated electron transfer (MET) currents allows discriminating between leaching from the electrode or irreversible degradation of the enzyme. Furthermore, thanks to the ability of TBO to form conductive electropolymerized films, the advantages of coimmobilization of *Aa* Hase with the redox mediator in terms of stability and efficiency of H_2 oxidation process are discussed. This design is shown to be suitable for biotechnological applications.

2. Experimental Section

2.1. Reagents and Instruments. *Aquifex aeolicus* membrane-bound hydrogenase (*Aa* Hase) was purified as described by Luo et al.,[9] except that Amicon PM 100 was used for the concentration step. Toluidine blue O (3-amino-7-dimethylamino-2-methyl-phenothiazinium chloride (TBO)) and hexacyanoferrate(III) ($Fe(CN)_6^{3-}$) were purchased from Sigma and Fluka, respectively. They were used without further purification. All other chemicals were reagent grade. Cytochrome c_3 from *Desulfovibrio gigas* (Dg) was prepared and purified as previously described.[22] Carboxylic acid functionalized single-walled carbon nanotubes (SWCN-CO_2H) from Sigma were used as received. According to the supplier, the SWCN-CO_2H sample has an average internal diameter of 4.5 nm and an average length of 1 μm. Stable dispersions of nanotubes were performed with the aid of sonication for 30 min. The carbon nanotube concentration in the dispersions was 1.3 mg/mL in water.

All solutions were prepared with distilled, deionized water. 4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid (HEPES) was used for hydrogenase dilution and as the supporting electrolyte at pH 7.2 and 50 mM concentration. Other buffers were used for TBO electropolymerization experiments: 25 mM Tris-HCl pH 9.5 and Tris-acetate pH 4.7.

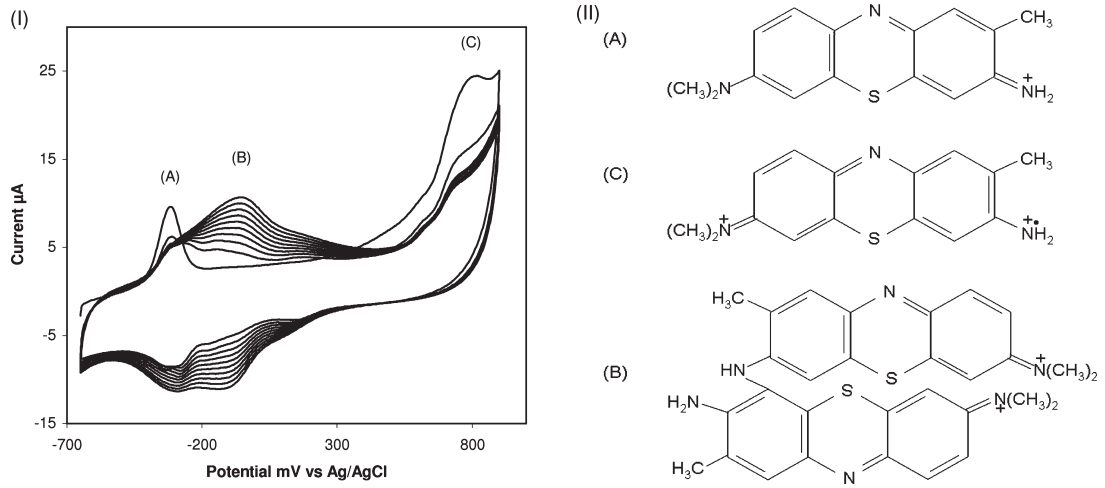
Cyclic voltammetry (CV) was done using a PARSTAT 2273 potentiostat from Princeton Applied Research (PAR). A conventional three-electrode system was used with a Ag/AgCl/NaCl (sat.) reference electrode and a gold wire as auxiliary electrode. All potentials were quoted against the Ag/AgCl reference. Prior to each experiment, the solutions were deoxygenated by bubbling with high-purity nitrogen or hydrogen. The temperature of the electrochemical cell was regulated using a water bath. The reference electrode was separated from the warmed electrolyte using a side junction maintained at room temperature.

2.2. Design of the Working Electrode. The working electrode was constructed from 3 mm rods of pyrolytic graphite (PG) inserted in Peek polymer casings from Bio-Logic SAS. Usually, the PG electrode was carefully polished on wet fine emery papers (PRESI, P800 then P1200). After polishing, the PG electrode was washed thoroughly with water, followed by sonication and rinsed again with water.

Unless specified, the membrane electrode technology was used for electrochemical measurements. Briefly, an aliquot of 1 μL of the buffer containing or not the enzyme was deposited on the freshly polished surface of the electrode. The electrode was then gently pressed against a square piece of dialysis membrane (Visking membrane − MWCO 6000−8000). A rubber ring was fitted around the electrode body so that the volume between the membrane and the electrode surface corresponded to a uniform thin layer.[23] Then, the thus-mounted membrane electrode was placed in the electrochemical cell containing the solution to be studied.

(11) Armstrong, F. A. *Photosynth. Res.* **2009**, *102*, 541.
(12) Vincent, K. A.; Parkin, A.; Armstrong, F. A. *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 4366.
(13) Lojou, E.; Luo, X. J.; Brugna, M.; Candoni, N.; Dementin, S.; Giudici-Orticoni, M. T. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2008**, *13*, 1157.
(14) Lojou, E.; Giudici-Orticoni, M. T.; Bianco, P. *J. Electroanal. Chem.* **2005**, *579*, 199.
(15) Alonso-Lomillo, M.; Rüdiger, O.; Maroto-Valiente, A.; Velez, M.; Rodriguez-Ramos, I.; Munoz, F.; Fernandez, V.; De Lacey, A. *Nano Lett.* **2007**, *7*, 1603.
(16) Hoeben, F.; Heller, O.; Albracht, S.; Dekker, C.; Lemay, S.; Heering, H. *Langmuir* **2008**, *24*, 5925.
(17) Millo, D.; Pandelia, M. E.; Utesh, T.; Wisitruangsakul, N.; Mrogonski, M. A.; Lubitz, W.; Hildebrandt, P.; Zebger, I. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 15344.
(18) Infossi P.; Lojou E.; Chauvin J. P. ; Herbette G.; Brugna M.; Giudici-Orticoni M. T. *Int. J. Hydrogen Energy* **2010**, *35*, 10778.
(19) Liu, A. R.; Wang, X.; Nakamura, C.; Miyake, J.; Zorin, N. A.; Qian, D. J. *J. Phys. Chem. C* **2008**, *112*, 1582.
(20) Morozov, S. V.; Karyakina, E. E.; Zorin, N. A.; Varfolomeyev, S. D.; Cosnier, S.; Karyakin, A. A. *Bioelectrochem.* **2002**, *55*, 169.
(21) Jones, A. K.; Lamle, S. E.; Pershad, H. R.; Vincent, K. A.; Albracht, S.; Armstrong, F. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 8505.
(22) Le Gall, J.; Mazza, G.; Dragoni, N. *Biochem. Biophys. Acta* **1965**, *99*, 30.
(23) Correira dos Santos, M. M.; Paes de Sousa, P. M.; Simoes Gonçalves, M. L.; Krippahl, L.; Moura, J. J. G.; Lojou, E.; Bianco, P. *J. Electroanal. Chem.* **2003**, *541*, 153.

Scheme 1. Electropolymerization Process of TBO[a]



[a] (I) CVs obtained at the PG electrode in 25 mM Tris-HCl buffer pH 9.5 containing 160 μM TBO, 50 mV s^{-1}; (II) proposed TBO species associated with redox signals in (I).

2.3. Adsorption of TBO. The adsorption of TBO was performed by immersion of the graphite electrode into a 160 μM aqueous TBO solution for 1 min. The electrode was then carefully rinsed with water.

2.4. Electropolymerization of TBO. The polymerization of TBO at the graphite electrode was carried out by cyclic potential sweep from −0.65 to 0.9 V at a scan rate of 50 mVs^{-1} in 160 μM TBO solution. The thus-modified PG electrode was rinsed with water for further use.

TBO electropolymerization to form poly(toluidine blue O) film (pTBO) is well documented.[24−27] Briefly, as shown in Scheme 1, cycling the PG electrode in 160 μM TBO solution from −0.65 up to +0.9 V results in the appearance of new redox waves (B) in addition to redox peaks for TBO monomer (A). Peaks B are linked to the appearance of process C. This process is due to the oxidation of the amino group of TBO to form a cation radical, initializing the electropolymerization *via* carbon−nitrogen coupling reactions to form pTBO. Peaks B which continuously increase with increasing number of cycles, are ascribed to the redox couple of the polymer. The number of cycles controlled the thickness of the film. Electropolymerization was performed in 25 mM Tris-HCl pH 9.5, unless otherwise specified. The electropolymerized PG electrode was then carefully rinsed three times with water before further use.

3. Results and Discussion

3.1. Direct Hydrogen Oxidation with *Aa* Hase Entrapped in a Thin Layer Configuration. In the previous work devoted to the electrochemistry of *Aa* Hase, it was shown that enzyme adsorption at the PG electrode followed two concomitant steps. In a first step, the enzyme in solution progressively adsorbed onto the electrode surface. This was reflected by the increase of the catalytic current for H_2 oxidation. Once adsorbed, a decrease with time in the direct catalytic current for H_2 oxidation was however recorded.[9] At the PG membrane electrode filled with 1 μL of 1 μM *Aa* Hase an H_2 dependent oxidation current occurs in the absence of any redox mediators (Figure 1). The current−potential response on the first potential scan is very similar to that previously obtained

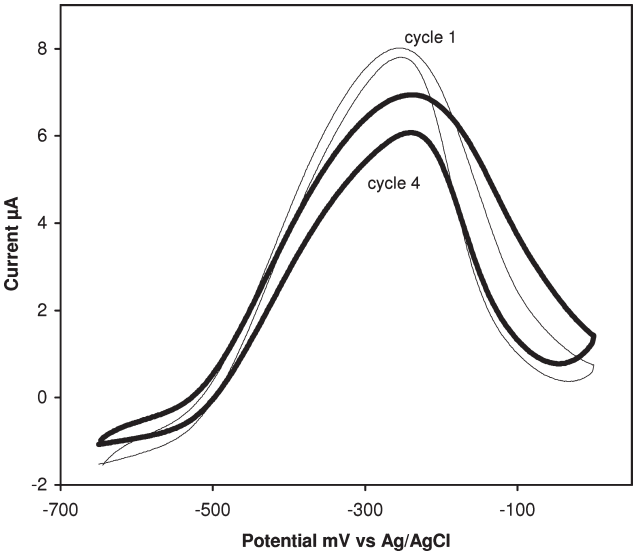


Figure 1. Catalytic oxidation of hydrogen with *Aa* Hase entrapped in a thin layer at the membrane PG electrode as a function of the CV cycle number: (fine line) first cycle, (bold line) fourth cycle; 50 mM HEPES buffer pH 7.2, 65 °C, H_2 atm, 5 mV s^{-1}.

with *Aa* Hase adsorbed at the PG electrode with no membrane,[9] or to preadsorbed *Aa* Hase at the membrane PG electrode. It is thus related to the oxidation of H_2 by the adsorbed *Aa* Hase layer that is directly connected at the electrode interface through the distal FeS cluster.

Briefly, the catalytic H_2 oxidation process starts when the potential is raised around 100 mV above the formal H^+/H_2 potential value at pH 7.2. The reversible inactivation process resulting in the peak like response occurs at potentials above −250 mV. Thus the main kinetic data shared by O_2 insensitive hydrogenases, i.e., *Ralstonia eutropha* [NiFe] membrane−bound hydrogenase and *Aa* Hase, are preserved at the membrane electrode. It can be concluded that the membrane configuration does not significantly modify the interaction between the enzyme and the electrode surface. However, from Figure 1 it is clear that the entrapment of *Aa* Hase within the membrane layer does not prevent the loss in the catalytic current. A 15% decrease in the catalytic current is already recorded after

(24) Zhou, D.; Sun, J. J.; Chen, H.; Fang, H *Electrochim. Acta* **1998**, *43*, 1803.
(25) Wang, Y.; Hu, S. *Biosens. Bioelectron.* **2006**, *22*, 10.
(26) Zhang, G.; Zhang, A.; Liu, X.; Zhao, S.; Zhang, J.; Lu, J. *J. Appl. Polym. Sci.* **2009**, *115*, 2635.
(27) Blackwell, A.; Moehlenbrock, M.; Worsham, J.; Minteer, S. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2009**, *9*, 1714.

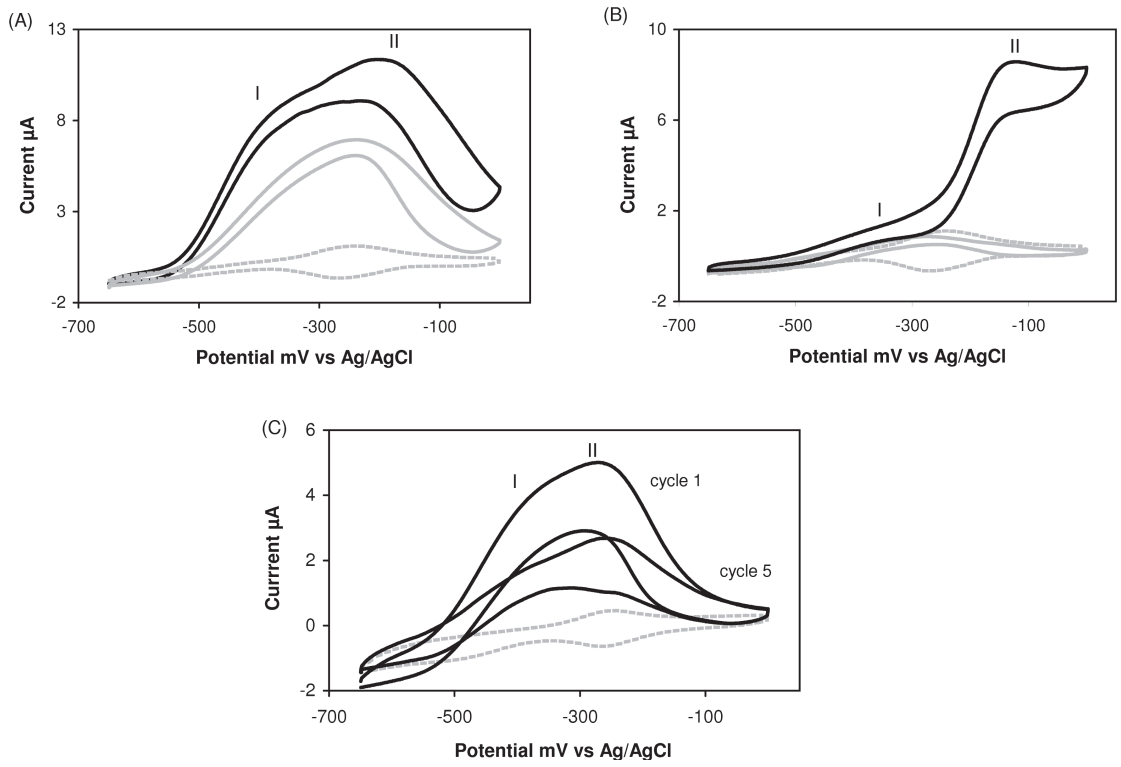


Figure 2. Direct (process I) versus TBO mediated (process II) electron transfer for H_2 oxidation via *Aa* Hase in a thin layer at the membrane PG electrode: in the presence of 16 μM TBO in buffer solution (A) at the emery polished PG electrode and (B) at the alumina polished PG electrode; (C) with adsorbed TBO as a function of the CV cycle number; 50 mM HEPES buffer pH 7.2, 65 °C, H_2 atm., 5 mV s^{-1}. Grey lines correspond to H_2 oxidation via *Aa* Hase in a thin layer at the membrane PG electrode in the absence of TBO. Dotted lines correspond to the CV signals for TBO alone at the PG membrane electrode.

only four continuous cycles. Actually the thin layer was evaluated to be around 10 μm thick.[23] It is thus understandable that the retention of *Aa* Hase in the thin layer is not a sufficient condition to ensure the DET process. However, we expected that equilibrium could have been reached in the adsorption−desorption process, if occurring, with a steady-state catalytic current. But no stable current has been observed at least for 3 h cycling. From these experiments and in agreement with the reported spectroscopic data,[17] it is demonstrated that other factors than simple release are implied in the decrease of the catalytic current with time.

3.2. Direct versus Mediated Electron Transfer Using Toluidine Blue O Redox Mediator. The oxidation of H_2 by *Aa* Hase entrapped in the thin layer configuration was further explored by using TBO as a redox mediator. It was expected that the *Aa* Hase molecules supposedly released and/or reoriented at the interface could be connected via the redox mediator. TBO's redox potential is adapted to *Aa* Hase-based reaction. TBO has been furthermore demonstrated to play a beneficial role (either as a monomer or in its electropolymerized form) in various biosensor recent applications.[24,28−32]

Addition of TBO in Solution. Figure 2A,B compares the CV curves obtained under H_2 atmosphere at 65 °C with 1 μL of 1 μM *Aa* Hase at the PG membrane electrode before and after TBO addition in solution. For these experiments, continuous cyclic voltammetry was performed at the *Aa* Hase membrane PG electrode. Before TBO addition, as described in the previous section, the catalytic current decreased within the cycles. At the end of the fifth cycle, 16 μM TBO was added in the solution. Two main features can be drawn from the comparative CV responses (Figure 2A). First, the DET process potential (process I) is negatively shifted up to 50 mV. This point will be discussed in the following paragraph. A simultaneous increase in the DET current is observed up to 30%. In other words, the system works such that some disconnected and/or new *Aa* Hases are available to exchange directly with the electrode interface. Second, a new oxidation process (process II) appears at the oxidation potential for TBO, related to H_2 oxidation mediated by TBO. However, above all a high stability of the electrochemical signal in the presence of TBO in the solution is recorded. No loss of the catalytic current is observed by cycling in the window −0.65/0 V during 3 h. TBO thus acts not only as the expected redox mediator but also plays a role in the increase and stabilization of the direct catalytic current.

To discriminate the possible roles of TBO in the direct H_2 oxidation, the influence of the graphite structure was studied by performing the same experiments but at the alumina-polished PG electrode (Figure 2B). Important features are revealed. At first, the DET process (process I) is much lower than that recorded at the emery-polished PG electrode. The addition of 16 μM TBO in the solution, allows the DET current to increase as observed with the emery-polished PG electrode. But essentially, it permits to connect many hydrogenases via the redox mediator so that the electron transfer proceeds now in the majority via the MET process. It is known that the mode of polishing affects the hydrophobicity of the surface.[33] However, we previously demonstrated that *Aa* Hase adsorption could efficiently occur both at hydrophobic or

(28) Schlereth, D. D.; Karyakin, A. A. *J. Electroanal. Chem.* **1995**, *395*, 221.
(29) Malinauskas, A.; Niaura, G.; Bloxham, S.; Ruzgas, T.; Gorton, L. *J. Colloid Interface Sci.* **2000**, *230*, 122.
(30) Zhang, M.; Gorski, W. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 2058.
(31) Yao, Y. L.; Shiu, K. K. *Electrochim. Acta* **2007**, *53*, 278.
(32) Kumar, S. A.; Chen, S. M. *Sensors* **2008**, *8*, 739.
(33) Bianco, P.; Haladjian, J. *J. Electrochem. Soc.* **1992**, *139*, 2428.

hydrophilic modified gold electrodes, with no preferential orientation.[9] In order to search for the reason of such a different behavior between emery and alumina polishing, the membrane was pulled off after running the CV curve in Figure 2B, and the PG electrode was transferred into 50 mM HEPES, pH 7.2. The resulting CV curve consisted only in a weak DET process with complete disappearance of the MET process. When TBO was added again in solution, the two DET and MET processes were enhanced describing only a small decrease in the current values (data not shown). From this experiment it must be concluded that TBO do act as an anchor for efficient *Aa* Hase orientation at the electrode. It must also be concluded that the MET current which is favored at the alumina polished-surface originates from adsorbed *Aa* Hase molecules that are oriented with the distal FeS cluster at a tunnel distance from the electrode so that DET cannot be achieved.

As can be seen in Figure 2A,B, the electron transfer process shifts from a major DET to a major MET when working at the emery and alumina-polished PG electrodes, respectively. The calculation of the kinetics constant is still an unresolved problem in the case of hydrogenase-based reactions because the amount of active enzymes which is engaged in each process is unknown. Indeed, the appearance of a non catalytic signal for hydrogenases has been successfully observed in only rare cases.[12] Assuming that one monolayer of adsorbed *Aa* Hase is involved in each process (7 pmol/cm^2), the interfacial electron transfer constant, k_{ET}, and the intermolecular electron transfer constant, k_{TBO}, can be calculated from the limiting DET and MET currents respectively.[34] Values of 160 s^{-1} and 7×10^6 $M^{-1}s^{-1}$ are obtained for k_{ET} and k_{TBO}, respectively. These values are most probably under-evaluated but reflect the high activity of *Aa* Hase adsorbed at the electrode.

TBO Adsorbed at the Electrode Surface. It is well-known that phenothiazine dyes readily adsorb onto graphite electrodes.[29] The question thus arises if the increase in available *Aa* Hases and in the stabilization of the electrocatalytic signal for H_2 oxidation could be driven by adsorbed TBO monomer. In agreement with previous reports,[29] preadsorbed TBO onto PG electrode gives well-defined cathodic and anodic peaks at $E_m = -255$ mV (Figure 2C). The process is more or less stable at 65 °C, leading to a slow progressive decrease of the redox peaks. When the electrode coated with adsorbed TBO and further modified with *Aa* Hase via the membrane configuration is run at 65 °C under H_2, DET and MET processes for H_2 oxidation occur (Figure 2C). A first conclusion is that *Aa* Hase is efficient for H_2 oxidation through a layer of adsorbed TBO. But notably, the same processes are observed whatever the mode of polishing of the electrode, namely with emery or alumina, in marked contrast with the former results obtained with TBO in solution. Two main roles played by TBO can be drawn from these experiments. First, adsorbed TBO is confirmed as an anchor for *Aa* Hases, thus explaining the increase in the DET process upon TBO addition in the solution, even on alumina-treated PG electrode where *Aa* Hase can be only weakly directly connected. These sites may be related to the aromatic rings or to the positive charges bared by the TBO molecules. Second, adsorbed TBO is still able to mediate H_2 enzymatic oxidation. No stable electrocatalytic signal can be however obtained with time. TBO monomer amounts in the film are not sufficient and stable enough to ensure a constant connection of *Aa* Hases.

3.3. Electroenzymatic Hydrogen Oxidation onto Electropolymerized Toluidine Blue Film. To enhance the number of available mediator molecules at the electrode interface, electropolymerized TBO films were next constructed. It was expected that a higher and constant amount of *Aa* Hase could be connected by this way for H_2 oxidation.

Table 1. Evolution of pTBO Film Parameters As a Function of the Number of Cycles Used for Electropolymerization

cycles	charge amount, $\mu C\ cm^{-2}$	surface concentration, $10^9\ \Gamma\ mol\ cm^{-2}$	thickness, nm
2	295	1.5	8
5	635	3.3	17
10	920	4.8	24.5
20	1130	5.9	30
40	1415	7.3	38

Stability and Electronic Conductivity of pTBO Films. The stability of the electropolymerized film was followed as a function of temperature. The pTBO-modified PG electrode was rinsed carefully with water and dipped in 50 mM HEPES buffer pH 7.2. The typical CV curves obtained on a pTBO modified electrode after 20 cycles of polymerization when the temperature is increased in the range 27−60 °C are given in Supporting Information (Figure S1). At 27 °C, two redox processes, respectively at −225 and −25 mV, characterize the CV behavior of the pTBO film. In agreement with previous works[24] the more positive couple is ascribed to the redox behavior of the polymer. The more negative couple is admitted to be due to the TBO monomer strongly adsorbed to the polymer, or a monomer-type conjugation in the polymer. The peak currents of the two redox couples are linearly proportional to the scan rates (data not shown), indicating a surface confined process occurs at the pTBO film electrode. When the temperature is increased, the monomer-like redox current continuously diminishes while the polymer redox current keeps stable. Within three hours at 60 °C, no decrease of the polymer redox signal is observed.

The diffusion of substrates and products are expected to be more efficient at thinner polymer films.[31] Conversely, the efficiency of the catalysis might increase with increasing amount of polymer serving as redox mediator and/or anchoring sites in the matrix. The number of cycles used for generating the polymerized film was thus varied from 2 to 40 cycles. In each case, the amount of charge from the integration of the redox peaks for pTBO obtained after transfer of the modified electrode in 50 mM HEPES, pH 7.2 at 65 °C was calculated. It allows the determination of the surface coverage, then the film thickness, assuming that the unit cell length for pTBO is 1 nm.[35] The values are reported in Table 1. Clearly, the charge, thus the film thickness increases with increasing cycles, taking a value of 24.5 nm after 10 cycles of electropolymerization. The film thickness tends to level off after 10 cycles.

The electronic conductivity of these films was first evaluated using $Fe(CN)_6^{3-}/Fe(CN)_6^{4-}$ and *Desulfovibrio gigas* (Dg) cytochrome c_3. These two probes were chosen because of their negative charge, which does not impede their interaction with the positive pTBO film, and their different sizes from a small redox probe to a large protein. Furthermore, Dg cytochrome c_3 is a well characterized protein which behaves as a fast reversible electrochemical system at PG electrodes, exhibiting redox potentials in the range −450/-500 mV. It is observed that $Fe(CN)_6^{3-}$ is electrochemically active in the whole range of pTBO thickness films, with no change of the redox peak currents (data not shown). Conversely, Dg cytochrome c_3 electrochemical signal is only observed for the thinnest film, ie around 15 nm. In this case, the intensity of the signal is not changed compared to the one obtained at the bare PG electrode (Supporting Information, Figure S1), indicating that weak changes in the electroactive surface occurred. Dg cytochrome c_3 is a 12 kDa

(34) Gorton, L.; Lindgren, A.; Larsson, T.; Munteanu, F. D.; Ruzgas, T.; Gazaryan, I. *Anal. Chim. Acta* **1999**, *400*, 91.

(35) Svetlicic, V.; Clavilier, J.; Zutic, V.; Chevalet, J.; Elachi, K. *J. Electroanal. Chem.* **1993**, *344*, 145.

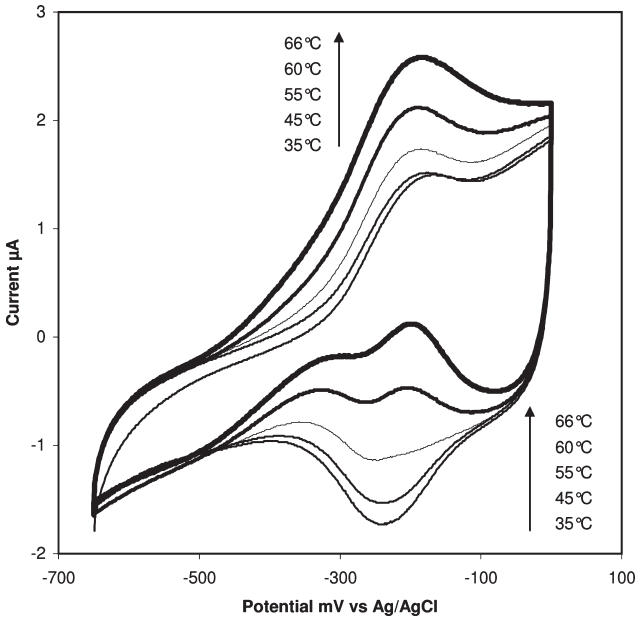


Figure 3. Temperature dependence of the CV catalytic H_2 oxidation at the MHpTBO electrode; 50 mM HEPES buffer pH 7.2, H_2 atm, 5 mV s^{-1}; the polymerization process was performed in 160 μM TBO buffer solution at pH 9.5 for 10 cycles.

protein, with dimensions in the range of a few nanometers. It is hardly possible for it to diffuse through the polymer film. Thus, given that the film thickness is less than 20 nm, the experimental data suggest that electron transfer can occur through the conducting pTBO film.

H_2 Oxidation via Aa Hase Immobilized onto the pTBO Film. Oxidation of hydrogen by *Aa* Hase entrapped within the membrane at the pTBO-modified PG electrode was followed as a function of temperature. In a first experiment, ten cycles were performed in a 160 μM TBO Tris-HCl solution pH 9.5 in the −0.65 to +0.9 V range at 50 mV/s. The electropolymerized electrode was then carefully rinsed with water. A total of 1 μL of 1 μM *Aa* Hase was then deposited on the surface of the pTBO film. The dialysis membrane was finally deposited onto the biofilm. The so-modified PG electrode, called in the following MHpTBO, was dipped in 50 mM HEPES buffer, pH 7.2 under H_2 atmosphere at temperatures from 35 to 66 °C. Figure 3 gathers the characteristic CV curves as the temperature increases. At 35 °C only the redox process for the monomer-like redox couple can be observed at E_m = −220 mV. When the temperature is progressively increased to 66 °C, the anodic current progressively increases, while the cathodic current decreases, describing the characteristic shape for a catalytic oxidation process. A high stability of the electrochemical response is observed. When turning to N_2 atmosphere, this catalytic process disappears, and only the redox process for the monomer-like form in the pTBO film is observed. These phenomena reflect H_2 oxidation via *Aa* Hase immobilized onto the MHpTBO film.

The thickness of the pTBO film is supposed to greatly affect the catalysis process, essentially by modifying the electron transfer through the redox film. This thickness was thus controlled by varying the number of cyclic scans employed for electropolymerization. The MHpTBO was dipped in 50 mM HEPES pH 7.2 under N_2 at 65 °C in order to measure the amount of charge under the pTBO redox peak, thus the film thickness, in the absence of any catalytic process. N_2 was then replaced by H_2 by flushing H_2 into buffer solution for 15 min. CV curves as shown in Figure 4A are consequently obtained.

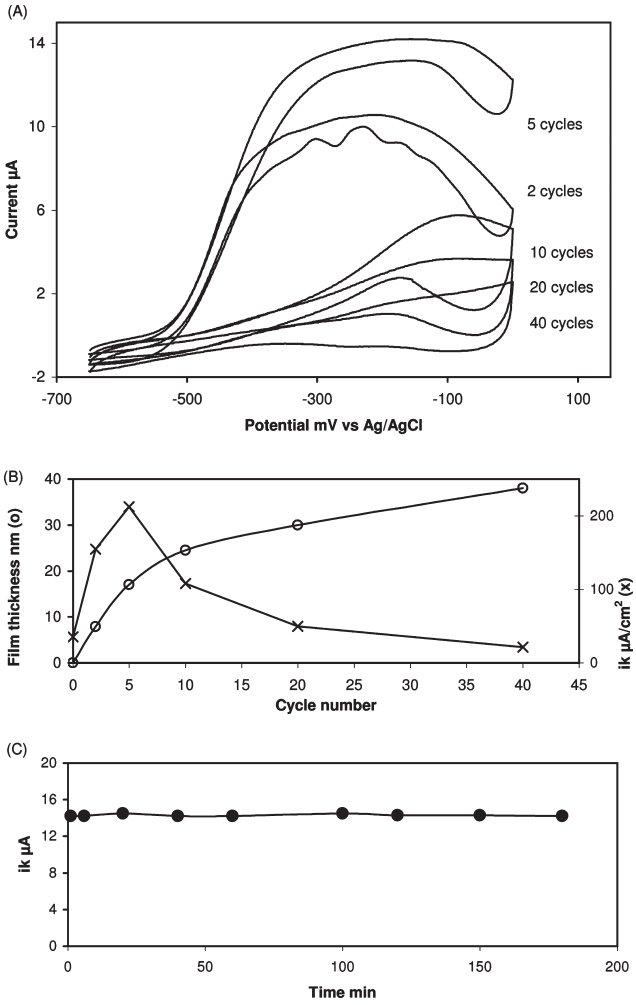


Figure 4. (A) CV catalytic H_2 oxidation at the MHpTBO electrode dependence on the number of cycles used for electropolymerization; 50 mM HEPES buffer pH 7.2, H_2 atm, 65 °C, 5 mV s^{-1}; (B) pTBO film thickness and catalytic current (ik) dependence on the cycle number; (C) Evolution of ik with time for a pTBO film realized from 5 electropolymerization cycles; the polymerization process was performed in 160 μM TBO buffer solution at pH 9.5.

Figure 4B reports the relationship between the catalytic current and the film thickness. The strong dependence of the catalytic response for H_2 oxidation by *Aa* Hase on the number of the cyclic scans in the polymerization process is pointed out. Two domains can be defined, with a transition near 5 polymerization cycles.

For the MHpTBO prepared with the lowest numbers of polymerization cycles, the anodic current progressively increases with increasing cycle number, thus film thickness, up to 5 cycles. The presence of the MHpTBO allows a catalytic current 6 times higher than recorded at the bare PG electrode after the same cycling procedure at 60 °C. Other important features can be extracted from the CV signatures: (i) compared to the bare PG electrode, the potential at which H_2 oxidation takes place is negatively shifted by 50 mV, as already observed with the addition of TBO in solution, (ii) the catalytic process recorded at the MHpTBO electrode occurs in a wide potential window describing a current plateau from −350 to −100 mV, before *Aa* Hase inactivation, and (iii) a high stability of the electrochemical signal is recorded, with no current loss or potential shift at least for 3 h (Figure 4C). These experimental results demonstrate that the pTBO film provides a very

efficient matrix for *Aa* Hase immobilization. The presence of both the pTBO and the membrane is a prerequisite to provide current stability. The current plateau over a large potential window is attributed to a mixed DET/MET process for H_2 oxidation. Indeed, due to the conductivity of the polymer film, the DET process can proceed through the pTBO film involving the anchored *Aa* Hase molecules, but at the same time, the presence of many available redox mediators at the polymer/enzyme interface allows H_2 oxidation via a MET process.

When the polymerization scans are increased from 10 to 40 cycles, the catalytic current sharply decreases. The oxidation process potential is now very close to the electrochemical signal for the monomer-like redox couple. It can thus be concluded that for pTBO films thicker than around 20 nm, H_2 oxidation via *Aa* Hase mainly proceeds according to a MET process. This is not a very efficient process, however. The lowest conductivity of thick pTBO films, as revealed in this work with the cytochrome c_3 study, can be responsible for such a result.

In order to enhance the MET current, an experiment was conducted by electropolymerizing TBO onto a PG electrode coated with SWCN-CO_2H. In previous works,[30,31] synergistic effects in the enhancement of NADH oxidation were observed when both carbon nanotubes and pTBO were employed. A bienzyme glucose biosensor was recently described using this architecture.[36] Otherwise, SWCN-CO_2H was demonstrated to be a convenient matrix for efficient *Aa* Hase immobilization.[9] In the present work, it was expected that a less compact polymer film, in addition to a higher conductivity brought by the carbon nanotubes, could favor *Aa* Hase interaction with the redox mediator inside the film. The experimental results effectively show an enhanced catalytic current for H_2 oxidation, which reaches 425 μA/cm^2 instead of 200 μA/cm^2 in the absence of SWCN-CO_2H (Supporting Information, Figure S2). However, loss of electrochemical signal with time is observed. The system thus behaves very much like the one previously described in the absence of pTBO with *Aa* Hase simply adsorbed onto SWCN-CO_2H film.[9] The increase in the catalytic signal must be mainly assigned to an enhancement of the surface area due to the carbon nanotube coating.

Effect of pH Solution for Electropolymerization on the H_2 Oxidation Process. In the preceding experiments, it was noticed that a shift of at least 50 mV toward the negative potentials was recorded for H_2 oxidation via *Aa* Hase in the presence of pTBO or TBO in solution. pTBO redox behavior is known to be pH dependent.[37] As a consequence, the catalytic properties of the pTBO film, especially toward NADH oxidation was demonstrated to be also dependent on the pH used for electropolymerization. The pH factor is of course highly crucial when working on hydrogenase systems, as oxidation of H_2 produces protons which can modify the local pH, thus affecting the overall catalytic reaction. The effect of the pH of the TBO solution used for pTBO formation on the H_2 catalytic oxidation was thus explored. The main result was that no negative shift of the catalytic process was observed when TBO polymerization was performed at a pH value of 4.7 instead of 9.5 (Supporting Information, Figure S3). The pK_a of the amino groups on TBO were evaluated to be around 5.[38] We thus propose that the negative shift observed in the oxidation potential of H_2 in the presence of pTBO, could be ascribed to the protonation of the amino groups during H_2 oxidation. One key role of the pTBO matrix would be then to maintain a local pH level.

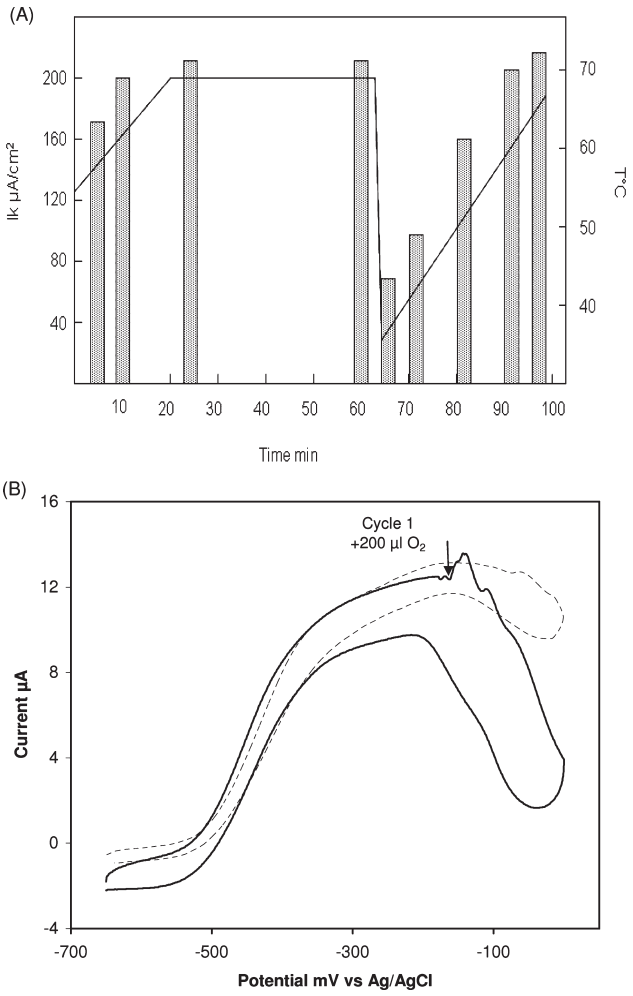


Figure 5. Responses to stress of *Aa* Hase entrapped at the membrane pTBO-modified electrode: (A) Temperature dependence of the electrocatalytic current density for H_2 oxidation, the continuous line describes the temperature profile and the columns show the values of the catalytic current along with the temperature profile. (B) Influence of O_2 addition (indicated by the arrow) on the CV catalytic oxidation of H_2 (bold line) at a sweep rate of 5 mV s^{-1}, (dotted line) catalytic current after 5 min H_2 flushing after cycle 1; 50 mM HEPES buffer pH 7.2, H_2 atm., 65 °C; the polymerization process was performed in 160 μM TBO buffer solution at pH 9.5 for 5 cycles.

Responses to Stress of Aa Hase Entrapped at the Membrane pTBO-Modified Electrode. Previous studies emphasized the remarkable tolerance of *Aa* Hase against temperature and inhibitors such as O_2 and CO. These characteristics are highly desirable in view of the use of the enzyme in biotechnological devices. *Aa* Hase thus appears as one of the best potential biocatalyst for H_2 oxidation. The question arises if such tolerances can be maintained at the pTBO film. This question has been addressed using a pTBO film obtained with the optimal 5 cyclic scans.

The evolution of the catalytic current for H_2 oxidation as a function of the temperature at the MHpTBO is shown in Figure 5A.

The catalytic current increases with increased temperatures from 27 to 70 °C. Moreover, when the temperature is decreased down to 20 °C after 1 h of storage at 70 °C, and increased again at 60 °C, the value of the catalytic current is restored. This remarkable evolution suggests a quite stable protein conformation in a wide range of temperature.

(36) Wang, W.; Wang, F.; Yao, Y.; Hu, S.; Shiu, K. K. *Electrochim. Acta* **2010**, *55*, 7055.
(37) Cai, CX .; Xue, K. H. *Talanta* **1998**, *47*, 1107.
(38) Persson, B.; Gorton, L. *J. Electroanal. Chem.* **1990**, *292*, 115.

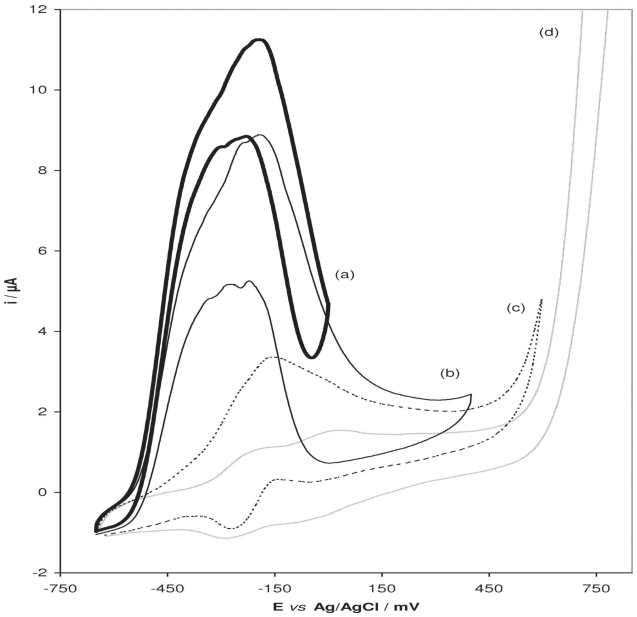


Figure 6. Anodic potential dependence of the CV catalytic H_2 oxidation via *Aa* Hase in a thin layer at the membrane PG electrode; (a) −0.65 to 0 V, (b) −0.65 to +0.4 V, (c) −0.65 to +0.6 V, (d) −0.65 to +0.9 V; 16 μM TBO in 50 mM HEPES buffer pH 7.2, 65 °C, H_2 atm, 5 mV s^{-1}.

To test O_2 resistance we used the method previously developed by Vincent et al. to investigate O_2 inhibitory effect onto [NiFe]-Hases.[39] During CV recordings at the MHpTBO electrodes, 200 μL of O_2-saturated buffer solutions were injected into the 3 mL cell solution (around 105 μM final O_2 concentration). O_2 was injected at approximately −200 mV. The CV curve given in Figure 5B (bold line) indicates that the CV current drops after O_2 exposure, but is almost recovered on the reverse scan. Furthermore, 5 min of hydrogen flushing allows a total recovering of the catalytic current for H_2 oxidation (dotted line). It can be concluded that the intrinsic tolerance against O_2 of *Aa* Hase is preserved at the MHpTBO electrode.

Essays for Entrapment of Aa Hase into the pTBO Film. Enzyme/polymer composite electrodes were classically prepared by cyclic potential sweep in the polymerization potential range in buffer containing both the dye and the enzyme. This procedure succeeded especially in the case of glucose oxidase[32] or horseradish peroxidase.[40] In this work immobilization of *Aa* Hase into the pTBO film by entrapment of the enzyme during the electropolymerization procedure failed. This is clearly demonstrated in figure 6.

Aa Hase is immobilized at the PG membrane electrode and dipped in a 16 μM TBO HEPES solution, at pH 7.2. This pH is chosen to conduct electropolymerization under soft conditions for enzyme stability. Under H_2 atmosphere at 65 °C, the typical catalytic signal for hydrogen oxidation via *Aa* Hase is obtained. A mixed DET/MET process is observed as detailed in the first part of this work. The limiting anodic potential is then progressively shifted from 0 to 0.9 V. As a consequence the catalytic oxidation signal dramatically decreases. When the limiting upper potential is above 0.5 V, only the signal of pTBO is revealed, thus indicating that *Aa* Hase is no longer efficient.

(39) Vincent, K.; Parkin, A.; Lenz, O.; Albracht, S.; Fontecilla-Camps, J.; Cammack, R.; Friedrich, B.; Armstrong, F. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 18179.
(40) Razola, S.; Ruiz, B.; Diez, N.; Mark, H.; Kauffmann, J. M. *Biosens. Bioelectron.* **2002**, *17*, 921.

4. Conclusion

In this work we have shown that H_2 oxidation process by the hydrogenase from the extremophilic bacterium *Aquifex aeolicus* is similar at a membrane electrode configuration than at a bare PG electrode. This suggests the involvement of adsorbed *Aa* Hases in the DET process at the membrane electrode. From cyclic experiments, it appears that the decrease in enzymatic activity observed with time is not simply related to enzyme leaching. Other processes might be considered, including protein denaturation or reorientation. This point is still under investigation in our laboratory, especially with the aids of surface spectroscopies. Nevertheless, we have demonstrated that the presence of a phenothiazine dye in the membrane configuration offers one solution for solving this problem. Actually, *Aa* Hase activity at the membrane PG electrode with TBO in solution shows two processes highly stable in time, i.e., direct and mediated electron transfer processes for H_2 oxidation. The MET process is not unexpected since TBO is available in excess to connect the *Aa* Hase molecules possibly released from the electrode but entrapped in the thin layer. The concomitant increase in the DET process implies that TBO acts not only as a redox mediator. On adsorbed TBO the two DET and MET processes occur, showing that the TBO film plays the role of an efficient anchor for hydrogenase immobilization. *Aa* Hase immobilization on electropolymerized pTBO film yields a high and stable H_2 oxidation activity at the membrane electrode, as long as film thickness stays below 20 nm. TBO either in solution or electropolymerized at the PG electrode induces an increase in current and a negative potential shift of about 50 mV of the DET process. Favorable contacts between amino acid residues that are exposed to solvent and TBO molecules through hydrophobic and/or electrostatic interactions might be involved in these improvements of the catalytic signal, as a consequence of *Aa* Hase anchorage. But it must be reminded that high stability of the electrochemical signal for H_2 oxidation was also recently demonstrated using *Aa* Hase encapsulation into carbon nanotube networks.[9] pTBO and carbon nanotube networks share an electron-rich surface, and this could also be a key point in the catalytic signal stability. In this latter case, the matrix would play the role of ROS scavenger, by driving oxygen trace reduction to water. Buffering capability of the polymer matrix to drive pH local changes is finally underlined. This is an important issue in view of the development of biotechnological devices, where the design of the fuel cell imposes to evacuate the H_2 oxidation products.

Acknowledgment. The authors thank Drs. M. Guiral, M. Ilbert, and G. Leroy (Bioénergetique et Ingénierie des Protéines, CNRS, Marseille, France) for helpful discussions, M. Bauzan (Fermentation Plant Unit IMM, Marseille, France) for growing the bacteria, and Région Provence-Alpes-Côte d'Azur and PIE CNRS for financial support.

Supporting Information Available: Stability and conductivity of the pTBO film (Figure S1), comparative CV curves for H_2 oxidation by *Aa* Hase at pTBO- and (pTBO+SWCN)-modified PG electrode (Figure S2), and effect of the pH used for electrolymerization on the catalytic process (Figure S3). This material is available free of charge via the Internet at http://pubs.acs.org.

Hydrogen bioelectrooxidation in ionic liquids: from cytochrome c_3 redox behavior to hydrogenase activity

A. Ciaccafava, M. Alberola, S. Hameury, P. Infossi, M.T. Giudici-Orticoni, E. Lojou

Electrochim. Acta, 56 (2011) 3359-3368

Electrochimica Acta 56 (2011) 3359–3368

Contents lists available at ScienceDirect

Electrochimica Acta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/electacta

Hydrogen bioelectrooxidation in ionic liquids: From cytochrome c_3 redox behavior to hydrogenase activity

A. Ciaccafava, M. Alberola, S. Hameury, P. Infossi, M.T. Giudici-Orticoni, E. Lojou*,[1]

Unité de Bioénergétique et Ingénierie des Protéines, UPR 9036, Institut de Microbiologie de la Méditerranée – CNRS, 31 Chemin Joseph Aiguier, 13402 Marseille Cedex 20, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 12 October 2010
Received in revised form
21 December 2010
Accepted 30 December 2010
Available online 15 January 2011

Keywords:
Ionic liquids
Cytochrome c_3
Hydrogenase
Electrochemistry
Hyperthermophile

ABSTRACT

Electrochemistry of polyheme bacterial cytochrome c_3 and catalytic oxidation of hydrogen by two different bacterial [NiFe] hydrogenases were investigated for the first time in pure room-temperature ionic liquids (RTILs) as electrolyte. Direct electrochemical response of *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough cytochrome c_3 (DvH cytc$_3$) adsorbed at a pyrolytic graphite (PG) electrode was observed in the RTILs used in this work: 1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate (BmimBF4), 1-ethyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate (EmimBF4) and 1-ethyl-3-methylimidazolium bis(trifluoromethanesulfonyl)imide (EmimNTf2). The electrochemical signal differed however from that obtained in aqueous buffer, and depended on the type of RTIL. UV–vis measurements as well as transfer experiments from aqueous buffer to RTILs or RTILs to aqueous buffer strongly suggested that the protein was not denatured in the presence of RTILs. EmimNTf2, as a hydrophobic non-water-miscible RTIL, was demonstrated to stabilize the native form of DvH cytc$_3$. Moreover it allowed an amount of electroactive DvH cytc$_3$ 30-fold higher than observed in aqueous buffer. Catalytic oxidation of H_2 via *Desulfovibrio fructosovorans* [NiFe] hydrogenase (Df Hase) mediated by DvH cytc$_3$ failed however. Further investigation suggested that Df Hase could be inhibited in the presence of RTILs. Reasons for such an inhibition were explored, including the blocking up of the substrate channels. By using hyperthermophilic [NiFe] membrane-bound hydrogenase from *Aquifex aeolicus* (Aa Hase) an efficient direct catalytic oxidation process was obtained in mixed aqueous buffer/RTILs electrolytes, although direct H_2 oxidation was not observed in pure RTIL. Chronoamperometric experiments showed that Aa Hase could afford 80% RTILs in aqueous buffer, thus giving the opportunity of future electrolytes with uncommon and variable properties for biofuel cell design.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Efficient electron transfer coupling between a protein and an electrode can help in the understanding of energetic metabolisms in biological system. Furthermore, the so-obtained bioelectrodes open large avenue for biotechnological devices in various fields, including biosensors or biofuel cells [1–3]. Bioelectrochemical devices more often proceed in aqueous media. However, the advantages of the use of non-aqueous media have been exploited, such as the use of substrates sparingly soluble in water, the efficient immobilization of a water soluble enzyme onto porous supports, or the increase in the thermal stability of enzymes [4]. Among the non-aqueous media, room-temperature ionic liquids (RTILs) (a class of solvents composed of ions liquid at room temperature) present highly attractive properties in view of their use in bioelectrochemistry. In particular, they present a wide electrochemical window, a good conductivity, a high chemical and thermal stability, and a negligible vapor pressure. Furthermore, the large diversity in RTILs composition allows varying their solvent properties [5,6]. Many reports demonstrated the increase in activity and stability of various enzymes in RTILs compared to organic solvents [6 and references herein]. Redox proteins have received much less attention than lipases and hydrolases; however, two main avenues were explored in bioelectrochemistry. The first one used RTILs as a component for electrode modification. This field has received much attention during the recent years, and many various architectures have been built including RTILs with as examples gold nanoparticles [7], carbon nanotubes [8], fullerenes [9], or carbon nanofibers [10]. In the second one, RTILs were the electrolyte in which the bioelectrochemical reactions were directly studied [11]. The electrochemistry of hemin [12], microperoxidase [13], hemoglobin [14], catalase [15], or laccase [16] was evaluated in RTILs with the molecules immobilized onto the electrode. Depending on the type of RTILs, peroxidasic activity, enzymatic oxidation of phenol, or reduction of trichloroacetic acid were successfully achieved. On the other hand, loss of Fe(III)/Fe(II) redox signal was reported for cytochrome c in RTILs [17]. No reliable

* Corresponding author. Tel.: +33 491164524; fax: +33 491164097.
E-mail addresses: lojou@ifr88.cnrs-mrs.fr, lojou@ibsm.cnrs-mrs.fr (E. Lojou).
[1] ISE member.

0013-4686/$ – see front matter © 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.electacta.2010.12.104

relationship between the capability of biocatalysis in the presence of RTILs and the class of biocatalysts can be inferred up to now.

Our group has been focusing for several years on sulfate reducing bacteria metabolism [18], and particularly on two intrinsic enzymatic reactions which could be interestingly exploited for bioanalytical applications. Sulfate-reducing bacteria have been shown to develop a metal reductase activity under anaerobiosis [19]. This reductive precipitation process allows the conception of bioreactors for heavy metals polluted environments. Desulfovibrio species metabolism involves hydrogenases, the enzyme that catalyzes the hydrogen conversion according to $H_2 \leftrightarrow 2H^+ + 2e^-$ [20]. Also the use of hydrogenases emerges in a future "green" hydrogen economy, in replacement of chemical catalysts in fuel cells [21,22]. The current advantages of enzymatic biofuel cells reside on the availability, and biodegradability of the biocatalyst, coupled to high power densities, comparable to platinum catalysts [23,24]. Hydrogenases have the added advantage of high specificity towards H_2, which can eliminate the need for a membrane separator. These two enzymatic reactions are mediated by Desulfovibrio tetraheme low-potential cytochrome c_3. *In vitro*, it has been demonstrated to efficiently reduce metals such as Fe(III), Cr(VI) or U(VI) [25]. *In vivo*, Desulfovibrio cytochrome c_3 acts as an electron shuttle between hydrogenase, and an electron transfer chain which uses oxidized sulfur compounds as terminal acceptors.

Otherwise, during the last decade, numbers of "exotic" microbial species have been discovered. These organisms are source of extremely stable enzymes at extreme temperatures, pressure or pH. In most of them, hydrogenases have been detected. Among these organisms, *Aquifex aeolicus* (Aa) is a hydrogen-oxidizing, microaerophilic bacterium growing at 85 °C [26]. A membrane-bound [NiFe] hydrogenase (Aa Hase) has been identified in Aa, that is involved in a complex with a diheme cytochrome b anchored in the membrane [27]. Previous studies have shown that Aa Hase was stable at elevated temperatures, and exhibited tolerance to oxygen and CO that makes it a good candidate for biotechnological uses such as biofuel cells [28–30]. Very recently, it was otherwise reported that the hydrogenase from *Thiocapsa roseopersicina* was stimulated by water-miscible organic solvents [31]. In addition to the high operating temperature of Aa Hase for efficient catalysis, this result prompted us to investigate the use of RTILs instead of aqueous buffer for biohydrogen technology.

In this work we aim to enlarge the knowledge of protein electrochemistry in RTILs, while exploring the possibility of enhancement of hydrogenase activity. Three different RTILs were chosen. 1-Butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate (BmimBF4) and 1-ethyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate (EmimBF4) are water-miscible RTILs, which differ on the cation size. 1-Ethyl-3-methylimidazolium bis(trifluoromethanesulfonyl)imide (EmimNTf2) presents a different anion and is water-immiscible. These RTILs were chosen because of their good conductivity and low viscosity. We report on the electrochemistry of hemin, then *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough cytochrome c_3 (DvH cytc$_3$) immobilized onto a graphite electrode in these RTILs. We show that a redox signal relative to the Fe(III)/Fe(II) transition is maintained depending on the type of RTILs, though different from the native redox signal for the polyheme protein. We take benefit of this electroactivity to investigate the capability of RTILs as electrolyte for catalytic oxidation of H_2 by hydrogenases. In a first step coimmobilisation of *Desulfovibrio fructosovorans* [NiFe] hydrogenase (Df Hase) with DvH cytc$_3$ at the graphite electrode is performed. Then, H_2 oxidation by adsorbed Aa Hase onto PG electrode is studied and shown to be highly dependant on the RTILs water content. Reasons for the inhibition of hydrogenase activity in pure RTILs are finally discussed.

2. Experimental

2.1. Reagents and instruments

BmimBF4 was from Acros Organic (Fischer Scientific, France). EmimBF4 and EmimNTf2 were from Solvionic (Toulouse, France). Their conductivity and viscosity at 25 °C have been reported in [5]. The ionic liquids were stored under N_2 in a glove box.

Glucose oxidase (Gox) from *Aspergillus niger* was purchased from Sigma. DvH cytc$_3$ [32] and Df Hase [33] were prepared and purified in our laboratory as previously described. Aa Hase was purified as described in Luo et al. [28], except that Amicon PM 100 was used for the concentration step. The MW and p*I* are (63 kDa, 4.9), (12 kDa, 10.2), (87 kDa, 7), and (103 kDa, 7) for Gox, DvH cytc$_3$, Df Hase, and Aa Hase, respectively. Iron(III) protoporphyrin(IX) chloride (hemin), was purchased from Sigma. 1 mM solutions of hemin were freshly prepared before experiment by dissolving in a 30% ethanolic aqueous solution containing 0.025 M sodium borate, pH 10, as previously described [34]. All other chemicals were reagent grade. All solutions were prepared with distilled, deionized water. 4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid (0.05 M HEPES, pH 7.2) served as the supporting electrolyte for comparison with electrochemistry in ionic liquids. The concentrations of the biological stock solutions were 1 μM and 400 μM for hydrogenases and DvH cytc$_3$ respectively.

Cyclic voltammetry (CV) and chronoamperometry were done using a PARSTAT 2273 potentiostat from Princeton Applied Research (PAR). A conventional three-electrode system was used with a Ag/AgCl/NaCl (sat.) reference electrode, and a gold wire as auxiliary electrode. All potentials were quoted against the Ag/AgCl reference. Chronamperometric experiments in mixed HEPES/RTILs electrolyte were realized by successive addition of aliquots of RTILs in 50 mM HEPES buffer under stirring. The CV curves and reported amperometric current are the average from triplicate experiments. Prior to each experiment, the solutions were deoxygenated by bubbling with high-purity nitrogen or hydrogen. Hemin and DvH cytc$_3$ studies were performed at room temperature. Df Hase and Aa Hase experiments were performed at 40 °C and 60 °C, respectively, unless otherwise specified. Temperature of the electrochemical cell was regulated using a water bath. The reference electrode was separated from the warmed electrolyte using a side junction maintained at room temperature.

UV–vis spectra were measured with a Cary 50 Bio Varian. Dried films of DvH cytc$_3$-graphite powder, and DvH cytc$_3$-graphite powder-RTIL were prepared under N_2 in a glove box by entrapping a volume of the mixtures between two quartz planar windows.

2.2. Fabrication of the working electrode

The working electrode was constructed from 3 mm rods of pyrolytic graphite (PG) inserted in Peek polymer casings from Bio-Logic SAS. The PG electrode was carefully polished on wet fine emery papers (PRESI, P800 then P1200). After polishing, the PG electrode was washed thoroughly with water, followed by sonication and rinsed again with water. 2 μl of the protein samples were deposited onto the surface of the PG electrode, and gently dried under N_2.

2.3. Structure modeling and analysis

The structural model of Aa Hase was built as previously described [28]. Channels were computed by Caver 2.0 [35]. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3, Schrödinger, LLC, was used for visualization and to compute surface electrostatic potential distribution.

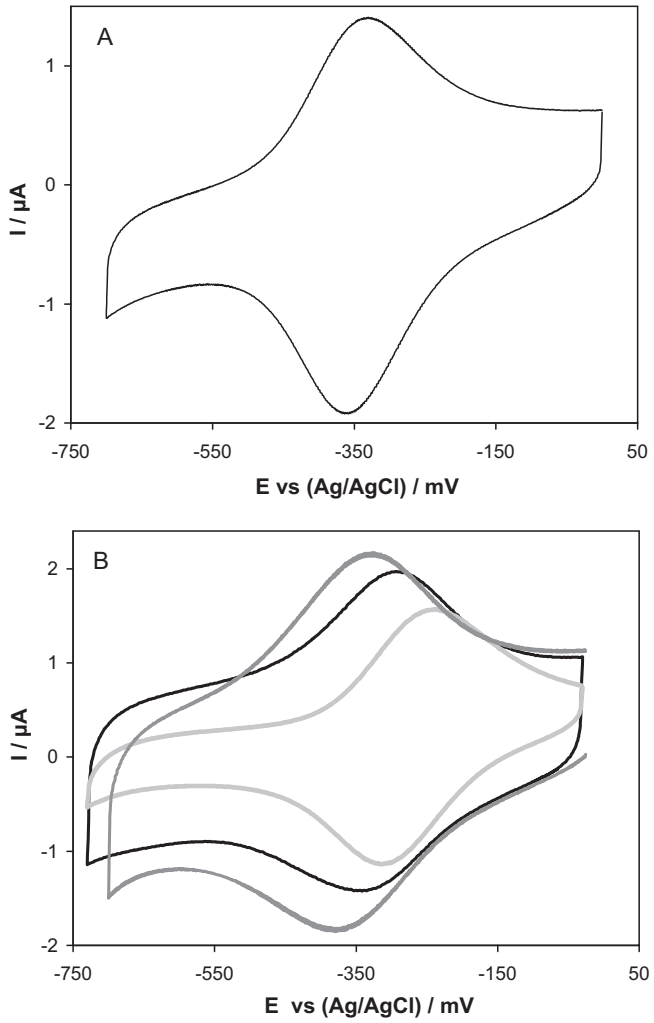


Fig. 1. Cyclic voltammograms at 20 mV s^{-1} of hemin adsorbed onto the PG electrode in (A) 50 mM HEPES, pH 7.2, and (B) RTILs: BmimBF4 (black line), EmimNTf2 (dark grey line), EmimBF4 (fine grey line).

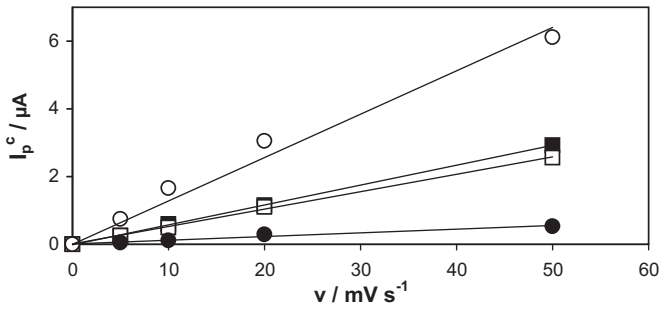


Fig. 2. Plots of cathodic peak currents vs. the scan rates for hemin (■, □) and DvH $cytc_3$ (●, ○), in HEPES buffer (plain symbols), and EmimNTf2 (empty symbols).

3. Results and discussion

3.1. Electrochemistry of adsorbed hemin in RTILs

The redox behavior of hemin linked to a gold surface has been previously studied in hexafluorophosphate-based RTILs [12]. In those conditions, a stabilization of the reduced hemin state was observed. In the present work, the immobilization of hemin has been achieved by adsorption onto PG electrodes. The resulting electrochemical behavior is expected to give a basis for the further electrochemical studies of DvH $cytc_3$ and hydrogenases. Fig. 1 compares the cyclic voltammograms for hemin adsorbed onto the PG electrode in HEPES buffer solution (Fig. 1A) and in the three RTILs, EmimBF4, BmimBF4 and EmimNTf2 (Fig. 1B).

In the four electrolytes, aqueous and RTILs-based, the hemin modified electrode yields a single well-defined and near reversible redox couple, linked to the Fe(III)/Fe(II) transition. Fig. 2 depicted the cathodic peak current dependence on the scan rate for the electrochemical signal recorded in HEPES and in EmimNTf2 as an example.

It is shown that the peak currents vary linearly with the scan rate in the range 5–100 mV s^{-1}, in line with an electron transfer process controlled by an adsorbed species. In Table 1 are summarized the characteristics of the CV signal in each electrolyte.

The Fe(III)/Fe(II) redox signal is observed at a midpoint potential of −345 mV in HEPES pH 7.2, in accordance with previous data with hemin adsorbed either on graphite [34], or on mercaptoethanol modified gold electrode [36]. In the three RTILs, hemin adsorbed onto the PG electrode also presents a single CV wave. The midpoint potentials are in the same range as observed in HEPES in EmimNTf2, with a value of −350 mV. It presents a positive shift in BmimBF4 and EmimBF4, with values of −310 and −275 mV, respectively. The midpoint potential evolution in the range HEPES < BmimBF4 < EmimBF4 is similar to previously observed potential shift with increasing ionic strength [17]. In this latter case, it was assumed that different salt-induced stabilization of the two redox states was responsible to the potential shift. The same explanation can be valid when using different RTILs. The electron transfer kinetics in RTILs is weakly slowed down as denoted by the small increase in the peak separations. The surface concentration Γ of hemin adsorbed onto the PG electrodes is quite similar in HEPES and RTILs and measures to be 2.0×10^{-9} mol cm^{-2}, 3.0×10^{-9} mol cm^{-2}, and 1.5×10^{-9} mol cm^{-2}, for HEPES and BmimBF4, EmimNTf2 and EmimBF4, respectively. On the basis of the crystallographic data of hemin (1.4 nm × 1.7 nm × 0.3 nm), and assuming that the hemin molecule adopts an orientation with the long axis parallel to the electrode surface, the theoretical monolayer coverage is estimated to be 7×10^{-11} mol cm^{-2}. This results implies that, whatever HEPES or RTILs, a multilayer of hemin participates to the electron transfer process or/and the molecules adsorb with the small axis parallel to the surface. This is in accordance with reported data obtained with hemin attached to gold electrode through aldrithiol-4 linkages [17]. But evidence is also given that no difference can be noted in surface density of hemin between HEPES and RTILs in the case of direct adsorption onto graphite.

3.2. Electrochemistry of adsorbed DvH $cytc_3$ in RTILs

DvH $cytc_3$ is a highly basic tetraheme c-type cytochrome. Previous works have shown that it behaves as a fast electrochemical system at various electrodes. The redox potentials of the four hemes were determined to be −500/−545/−555/−585 mV [37]. As many other heme proteins, DvH $cytc_3$ is prompt to adsorb onto PG electrodes. The CV curve recorded in HEPES for adsorbed DvH $cytc_3$ reveals two reversible waves, respectively at −310 and −530 mV (Fig. 3A and Table 1), in accordance with a previous report [38].

The cathodic peak current is shown to vary linearly with the scan rate as depicted in Fig. 2 for the most negative process. This typical CV signal has been the matter of discussions in the early nineties. It is now admitted that the most negative redox signal is relative to the native form of the protein. The most positive peak observed, superimposes with the potential of iron(III) protoporphyrin(IX) chloride molecule (hemin) and was thus ascribed to a

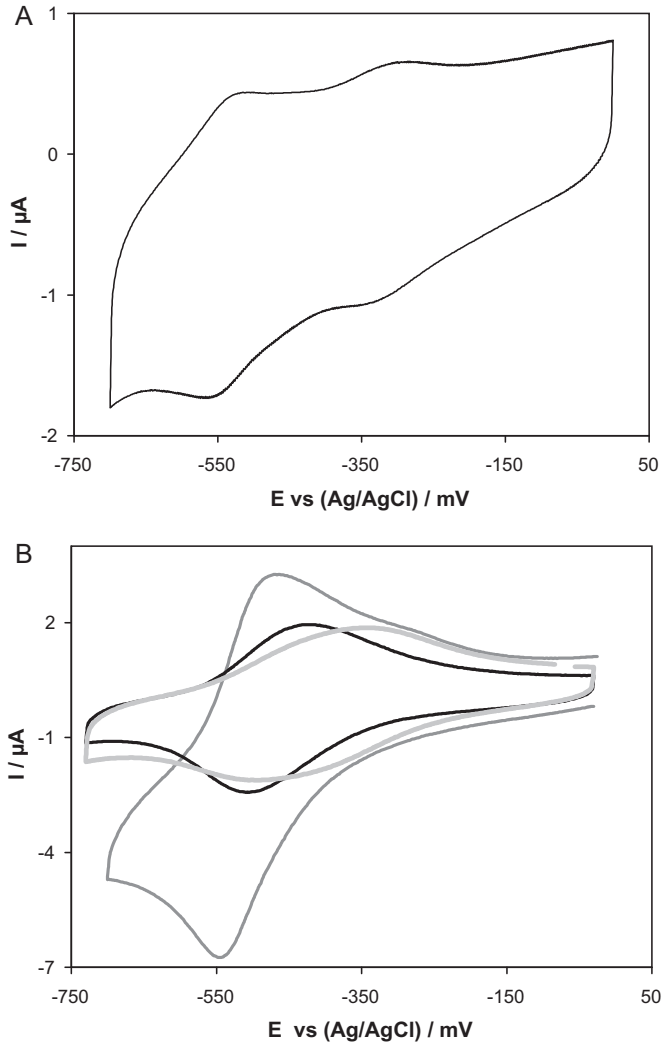
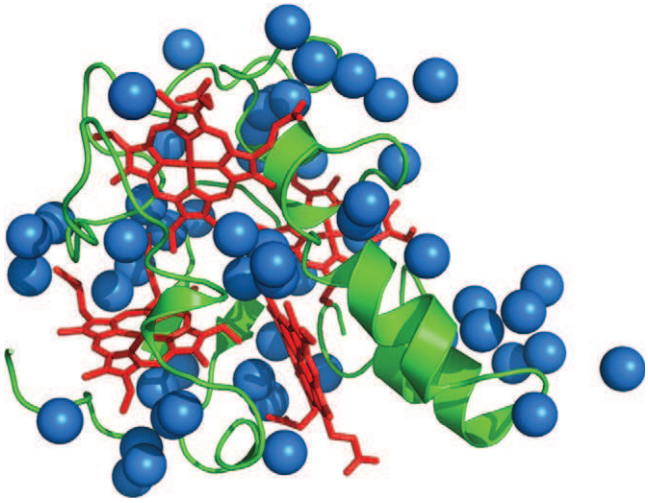


Fig. 3. Cyclic voltammograms at 20 mV s^{-1} of DvH $cytc_3$ adsorbed onto the PG electrode in (A) 50 mM HEPES, pH 7.2, and (B) RTILs: BmimBF4 (black line), EmimNTf2 (dark grey line), EmimBF4 (fine grey line).



Scheme 1. Crystallographic structure of DvH $cytc_3$ (2CTH). Protein backbone appears as green cartoon, hemes as red sticks, and water molecules as blue marine spheres.

so-called hemin-like form, probably due to partial disruption of one of the heme environment [38]. This redox signal most probably involves only the heme closer to the electrode [38].

When the PG electrode modified with adsorbed DvH $cytc_3$ is studied in pure RTILS, a very different behavior is observed, dependant of the type of RTILs (Fig. 3B and Table 1). In EmimBF4, one peak with a marked shoulder appears at potentials of −430 and −340 mV, respectively. The signal is not very stable with time, with a progressive shift towards positive potentials. The most anodic redox couple can be attributed to the hemin-like group. The second redox couple shows a 100 mV positive shift in potential compared to the CV recorded in HEPES. In BmimBF4, only one peak at a midpoint potential of −435 mV is revealed. The CV signal is quite stable with time. In EmimNTf2, the CV signal is mainly dominated by a high current wave at −510 mV. Interestingly, this signal is very similar to that previously reported in DvH $cytc_3$ buffer solution [39], with a domination of the native over the hemin-like form. In each electrolyte, the cathodic peak current varies linearly with the scan rate, and is higher than that observed in HEPES (Fig. 2).

Changes in DvH $cytc_3$ redox signal may be caused by one or more different effects such as the presence of a hydration layer in the vicinity of the heme pockets, a structural modification within the heme ligation state or in the secondary structure, or a change in electrode to heme distances by variation in the protein orientation at the electrode interface.

The different electroactive forms of DvH $cytc_3$ in BF4-based RTILs compared to EmimNTf2 reasonably originate at first from the respective hydrophobic/hydrophilic character of each RTIL. BF4-based RTILs are hydrophilic (water-miscible) while EmimNTf2 is hydrophobic (water-immiscible). Hydrophilic solvent can adsorb water and remove a hydrate shell from a protein [40]. Thus proteins are much more inactivated in hydrophilic solvents than in hydrophobic solvents, because water-miscible solvents can remove the water layer on proteins that is indispensable to maintain protein activity. Actually, the crystallographic structure of DvH $cytc_3$ exhibits 58 water molecules surrounding the protein including the heme pockets (Scheme 1). Among them, three water molecules have been reported to be co-crystallized in similar positions in all known cytochromes [41]. These water molecules were proposed to provide pathways for intra and intermolecular electron transfer processes.

This is clearly illustrated in this work, where the non-miscible RTIL EmimNTf2 is able to favor the native form of DvH $cytc_3$ at the PG electrode. The surface coverage is also indicative of the protective role of EmimNTf2 for adsorbed DvH $cytc_3$. Based on the crystallographic dimensions of DvH $cytc_3$ (2.6 nm × 3.0 nm × 3.2 nm [42]), a monolayer would correspond

Table 1
Electrochemical characteristics of hemin and DvH $cytc_3$ in 50 mM HEPES, pH 7.2 and RTILs.

Medium	Hemin		DvH cyt c_3	
	E_m vs. (Ag/AgCl)/mV	Γ/mol cm^{-2}	E_m vs. (Ag/AgCl)/mV	Γ/mol cm^{-2}
HEPES	−345	2.0×10^{-9}	−310/−530	7×10^{-11}
EmimBF4	−275	1.5×10^{-9}	−340/−430	4×10^{-10}
BmimBF4	−310	2.0×10^{-9}	−435	9×10^{-10}
EmimNTf2	−350	3.0×10^{-9}	−510	2×10^{-9}

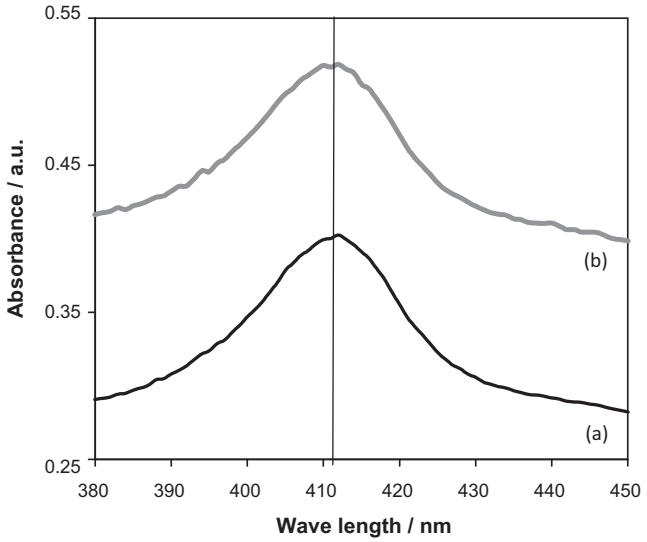


Fig. 4. UV–vis spectra of (a) DvH $cytc_3$/graphite, and (b) DvH $cytc_3$/graphite/RTIL.

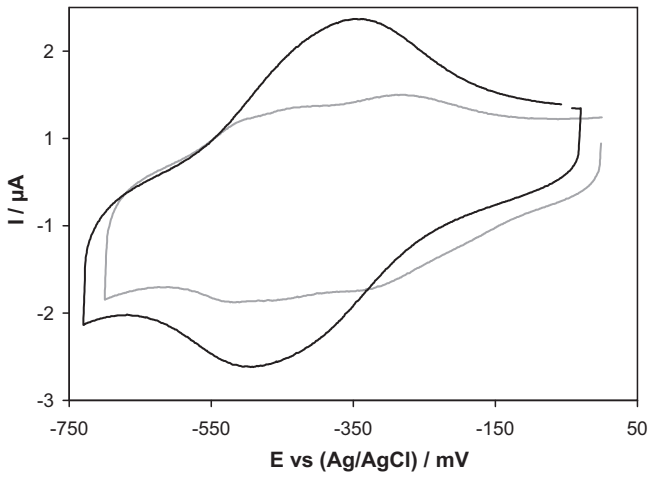


Fig. 5. Cyclic voltammograms at 20 mV s^{-1} of DvH $cytc_3$ adsorbed onto the PG electrode in (black line) EmimBF4 and (grey line) after transfer in 50 mM HEPES, pH 7.2.

to $\Gamma = 2 \times 10^{-11}$ mol cm^{-2}. From the values of the experimental surface coverage (Table 1), in all the media tested in this work multilayer protein films are thus formed. But, while BF4-based RTILs do induce an increase in surface coverage (6 and 13 times higher for EmimBF4 and BmimBF4, respectively), EmimNTf2 allows almost thirty times higher electroactive amount of DvH $cytc_3$ than HEPES. Further evidence for the predominance of the non-miscible character of EmimNTf2 to explain the electrochemical behavior of DvH $cytc_3$ is given by film transfer experiments. When a PG electrode modified with cytochrome c_3 is transferred from HEPES directly to EmimNTf2, with no drying step, no important changes of the electrochemical signal can be observed. The two waves at −310 and −530 mV characteristic of DvH $cytc_3$ in HEPES are still observed with no increase in the peak currents. In this case the maintained aqueous layer is supposed to remove the surfactant-like effect played by EmimNTf2 on DvH $cytc_3$ redox behavior, allowing typical release of the protein from the electrode interface.

Otherwise, the capacity of ions to increase or decrease the structure of water, called kosmotropicity and chaotropicity respectively, has been suggested to explain the stabilization/activation or destabilization/denaturation of proteins and enzymes [6,43]. This relationship was based on the hypothesis that the water shell of the enzyme was likely to be disorganized in the same way as the water network in the solution. Based on extensive experimental studies, it has been realized that kosmotropic anions stabilize proteins and kosmotropic cations destabilize them. Turning to the comparative effect of RTILs on protein stabilization, it was stated that the most stabilizing RTIL would be composed of a kosmotropic anion and a chaotropic cation. This rule does not match the difference we observed between the two BF4-based RTILs, however. Indeed, the most chaotropic cation, $Emim^+$, yields a higher destabilization of the electrochemical signal for $cytc_3$ DvH than the less chaotropic cation, $Bmim^+$. This is not so unexpected, since the chaotropicity order, although fitting a lot of biological molecules, failed in some others. The beneficial role of $Bmim^+$ over $Emim^+$ in the case of DvH $cytc_3$ would be more reasonably attributable to the longer hydrophobic alkyl chain in the $Bmim^+$ cation that has fewer tendencies to take away the essential water from the protein.

Despite the CV shape and evolution recorded in BF4-based RTILs DvH $cytc_3$ does not seem to undergo denaturation. UV–visible spectra were recorded on DvH $cytc_3$ immobilized on a quartz window with either graphite powder or a mix graphite powder/EmimBF4. No shift in the Soret band position at 410 nm is observed (Fig. 4).

This result suggests that no drastic modification in the heme conformational environment occurs upon contact between the protein and the RTIL. Furthermore, a film transfer experiment realized with a PG electrode modified with DvH $cytc_3$ from BF4-Based electrolyte to HEPES solution results in the appearance of the two waves at −310 and −530 mV characteristic of adsorbed DvH $cytc_3$ in HEPES (Fig. 5).

It can thus be concluded that DvH $cytc_3$ undergoes reversible interfacial modifications in RTILs that infer on its redox behavior. A similar result was observed with cytochrome c covalently linked to a gold electrode [44], though in this case loss of Fe(III)/Fe(II) signal was observed in RTIL. It was mainly attributed to a disruption of the electron transfer at the protein/electrode interface rather than denaturation of the cytochrome c [17]. In the case of the multiheme cytochromes c_3, electrical communication between the electrode and the redox centers of the protein is established because the heme groups of the adsorbed protein act as electron relays. The intercalation of RTILs between the adsorbed molecules may induce a change in distance and orientation of the heme centers, thus a change in the interfacial electron transfer process. But we propose that the presence of four hemes in the protein allows a connection to be established with electrode whatever its orientation in RTILs.

3.3. Hydrogen enzymatic oxidation using D. fructosovorans [NiFe] hydrogenase

The persistence of a redox activity for DvH $cytc_3$ leads us to investigate its role as a redox mediator for hydrogen oxidation by hydrogenase in pure RTILs. Cytochromes c_3 have been recognized since a long time to be the physiological partner of hydrogenases, the enzyme responsible *in vivo* of the activation of hydrogen in *Desulfovibrio* species. So far, the kinetics of the intermolecular electron transfer process was quantified using electrochemistry. Due to the highly conserved secondary structure of the [NiFe] hydrogenases and one positively charged heme shared by all the cytochromes c_3, efficient catalytic activity was measured coupling one hydrogenase from one species to one cytochrome c_3 from another species [45]. Interestingly, the effect of ionic strength on the catalytic current was reported. Generally speaking low ionic strength conditions favor association of oppositely charged proteins. However, strong evidence was given on the formation of a productive complex at high salt concentrations, due to a rear-

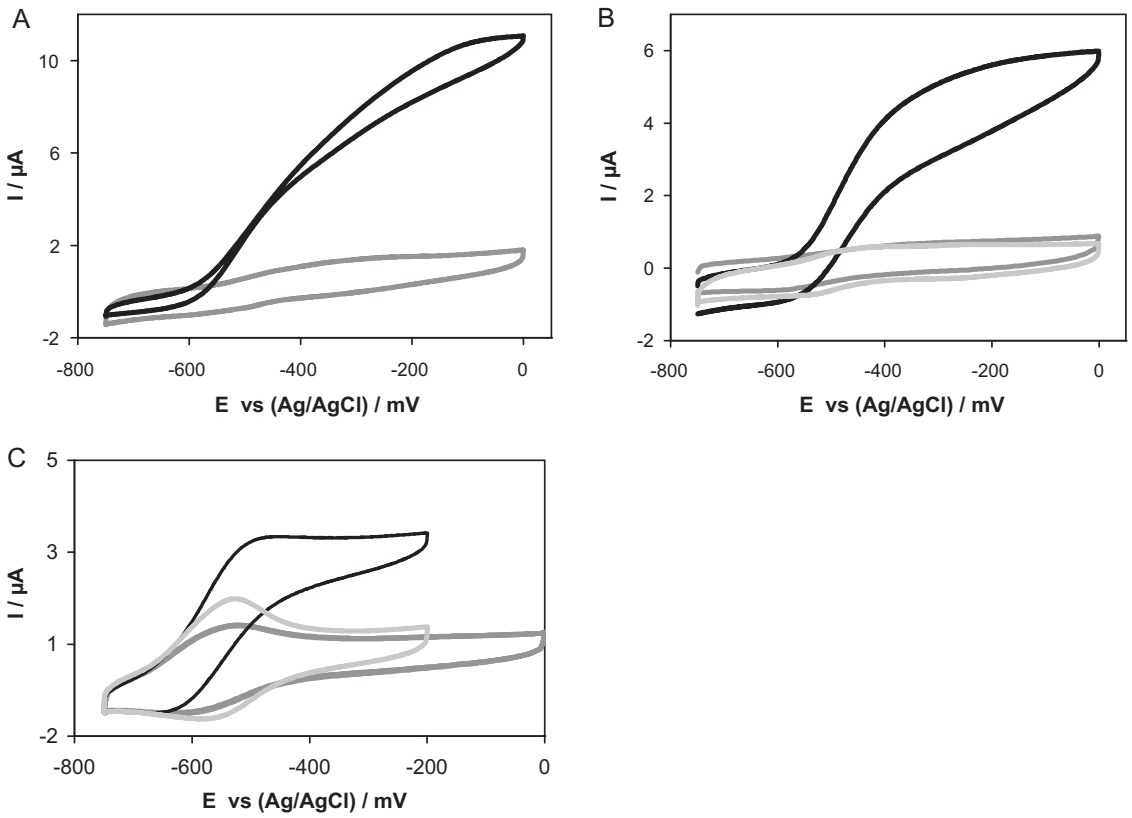


Fig. 6. Catalytic oxidation of hydrogen by Df Hase at the PG electrode, 10 mV s^{-1}, 40 °C under H_2. (A) DvH cytc$_3$ coadsorbed with Df Hase: in 50 mM HEPES pH 7.2 (black line), in EmimBF4 (grey line). (B) In 30 μM DvH cytc$_3$ solution: PG modified with adsorbed Df Hase (black line), PG modified with adsorbed Df Hase preincubated 1 min in EmimBF4 (dark grey line). (C) In 100 μM MV^{2+} solution: PG modified with adsorbed Df Hase (black line) PG modified with adsorbed Df Hase preincubated 1 min in EmimBF4 (dark grey line). The CV curves obtained at a bare PG electrode either in 30 μM DvH cytc$_3$ (B) or in 100 μM MV^{2+} (C) solutions are superimposed as fine grey lines.

rangement of the two proteins for productive electrochemical communication. Different affinities of the salt ions in the binding to the proteins accounted for the difference observed in the catalytic currents as a function of the nature of the electrolyte. Finally, it was also demonstrated that cytochromes c_3 could be coadsorbed with hydrogenase onto PG electrodes while retaining their mediator property towards H_2 oxidation.

In this work we thus have first explored the oxidation of H_2 by coadsorption of Df Hase and DvH cytc$_3$. The order by which the two adsorptions were made is crucial, since it was demonstrated that a first layer of cytochrome c_3 completely prevented the further adsorption of hydrogenase, thus the catalytic activity. This observation is very likely linked to the negative charge bared by the graphite electrode at pH 7.2, which orients DvH cytc$_3$ so that the interacting heme tends to face the electrode, thus no longer available for association with hydrogenase. Accordingly, 1 μl of Df Hase was first adsorbed onto the PG electrode, then 2 μl of DvH cytc$_3$. The resulting hydrogen catalytic oxidation is shown in Fig. 6, where the comparison between results obtained in HEPES and in EmimBF4 under H_2 is underlined.

In HEPES (Fig. 6A), the typical CV signal for adsorbed DvH cytc$_3$ described in the previous section of this paper turns into a sigmoidal wave when Df Hase is coadsorbed. This signal is characteristic for the catalytic oxidation of H_2 via Df Hase mediated by DvH cytc$_3$, according to:

$$\mathrm{Cytc3_{red}} \leftrightarrow \mathrm{Cytc3_{ox}} + e^-$$

$$\mathrm{Cytc3_{ox}} + \mathrm{Hase_{red}} \rightarrow \mathrm{Cytc3_{red}} + \mathrm{Hase_{ox}}$$

$$\mathrm{Hase_{ox}} + H_2 \rightarrow \mathrm{Hase_{red}} + 2H^+$$

The same experiment performed in RTILs allows only a sluggish electrochemical signal as revealed in Fig. 6A in the case of EmimBF4. It must be noted that the same CV behavior is observed whatever the type of RTILs used, namely EmimBF4, BmimBF4 or EmimNTf2. The increase in the working temperature up to 40 °C did not help in the appearance of any catalytic signal. After transfer of the modified electrode from RTILs to HEPES, even after prolonged time under H_2, it was not possible to recover any electrocatalytic signal. Otherwise, Df Hase is known to efficiently reduce protons in aqueous buffers at pH < 7 under N_2. Essays for enzymatic reduction of H^+ in RTILs were handled by dipping a Df Hase/DvH cytc$_3$-modified PG electrode in RTILs with increasing amount of formic acid as a proton source. No enzymatic reduction of protons could be observed however (data not shown).

Electrocatalytic oxidation of H_2 was then experimented by running the Df Hase-modified PG electrode directly in DvH cytc$_3$ solution under H_2 (Fig. 6B). This experiment is supposed to allow discriminating between inhibition of the hydrogenase itself or slow down of the intermolecular electron transfer rate due to interaction between RTIL and immobilized DvH cytc$_3$. In Fig. 6B, the catalytic wave for the enzymatic oxidation of H_2 mediated by the diffusing DvH cytc$_3$ is observed. Conversely, when the Df Hase-modified PG electrode is incubated 1 min in RTIL before running the CV experiment in DvH cytc$_3$ solution, no catalytic wave can be detected. The only electrochemical signal is the reversible wave for DvH cytc$_3$ itself. The loss of catalytic signal is not due to the irreversible inactivation of Df Hase and/or release of biomaterial from the electrode during the transfer and incubation steps, since the same procedure but with incubation in HEPES instead of RTIL allows the catalytic oxidation of H_2. These data support the assumption that RTILs have a direct and deleterious effect on hydrogenase activity itself.

In [NiFe] hydrogenases, the electrons are transferred from the active site buried into the protein moiety to the surface via a conducting line of three FeS clusters. The distal FeS cluster closest to the surface of the protein is recognized at the interacting site for the physiological partner or artificial redox partners, including the electrode. The non-accessibility of DvH $cytc_3$ to this interacting site due to a layer of RTILs surrounding the enzyme might be one reason for the inhibition of the catalytic oxidation process. We thus perform the catalytic experiment using methyl viologen (MV) as a redox mediator instead of DvH $cytc_3$ (Fig. 6C). The small size of this artificial mediator was expected to favor the accessibility to the distal FeS distal cluster despite the presence of RTILs. However, as seen in Fig. 6C, whereas MV acts as an efficient redox mediator for H_2 oxidation by Df Hase adsorbed onto PG electrode in HEPES, the same Df Hase-modified electrode preincubated 1 min in RTIL yields only the reversible electrochemical signal for MV ($MV^{2+}/MV^{\bullet+}$ couple).

3.4. Hydrogen enzymatic oxidation using [NiFe] A. aeolicus hydrogenase

The question is now to state if enzymatic H_2 oxidation will be inhibited in pure RTILs whatever the type of hydrogenase. Df Hase is issued from a mesophilic anaerobic bacterium, and is extremely sensible to environmental parameters. *Aquificales* represent the earliest branching order of the bacterial domain. During the evolution, they have acquired resistances to many inhibitors, such as oxygen and temperature. The [NiFe] hydrogenase from the hyperthermophilic bacterium *A. aeolicus* has thus been demonstrated to be tolerant to O_2 and CO, and to be able to oxidize H_2 at temperature up to 90 °C. This enzyme is then a valuable candidate to evaluate the enzymatic activity of hydrogenase in RTILs. CV experiments performed either in HEPES or in RTILs with a PG electrode modified by an adsorbed layer of Aa Hase are shown in Fig. 7.

In agreement with previous report [28], an H_2 dependant oxidation current occurs in HEPES solution, at 60 °C, in the absence of any redox mediators at a PG electrode modified with adsorbed Aa Hase. This catalytic current is related to the oxidation of H_2 by the adsorbed Aa Hase layer that is directly connected at the electrode interface through the distal FeS cluster. The direct H_2 oxidation process by Aa Hase is now well documented [28–30]. Briefly, the catalytic H_2 oxidation process starts when the potential is raised around 100 mV above the formal H^+/H_2 value at pH 7.2. An inactive/active states conversion results in the peak-like response. The formation of the inactive form of the enzyme, assigned to a Ni(III)–Fe(II) state, with hydroxide in bridging position between Ni and Fe occurs at potentials above −250 mV. The inactivation process is reversible, and on the reverse scan the electrocatalytic current increases again as the enzyme reactivates at lower potentials. As previously discussed, a decrease with time of the catalytic current is observed, most probably due to a concomitant orientation and release of some biomolecules towards the solution. This phenomenon is illustrated by the evolution with cycles of the catalytic current. When the PG Aa Hase-modified electrode is transferred to a RTIL electrolyte under H_2, whatever the type of RTIL, the remaining catalytic current just obtained for the fourth cycle in Fig. 7A in HEPES completely vanishes (Fig. 7B, grey curve). We took advantage of the stability and low vapor pressure of RTILs to try to enhance the enzymatic activity by increasing the temperature. The catalytic current could not be restored by an increase in the temperature up to 90 °C, however. When methylene blue (MB) was added into RTIL as a redox mediator, no electrochemical signal except the reversible waves for MB could be observed. This means that the vanishing of the catalytic current in RTILs is not due to a reorientation of the hydrogenase so that the distal FeS cluster would be opposite to the electrode surface, thus preventing a direct connection of the enzymes. Besides, a classical spectrometric assay was performed at

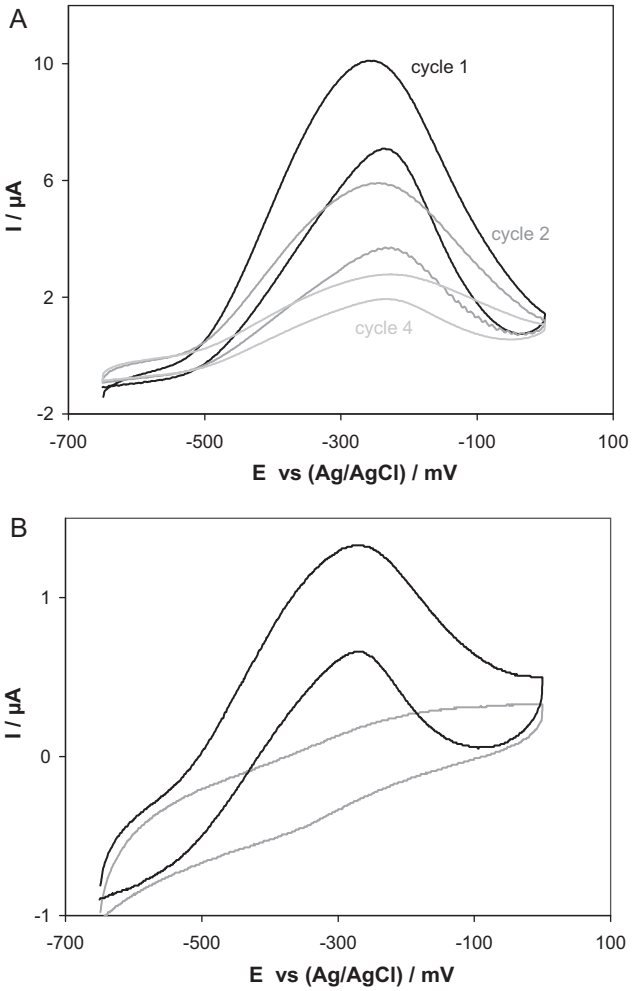


Fig. 7. Catalytic oxidation of hydrogen by Aa Hase adsorbed at the PG electrode at 10 mV s^{-1} and 60 °C under H_2. (A) Evolution of the catalytic signal with cycles between −0.65 and 0 V in 50 mM HEPES pH 7.2. (B) PG electrode modified with Aa Hase cycled in HEPES for 4 cycles and transferred in EmimBF4 (grey line), then back in HEPES 50 mM pH 7.2 (black line).

80 °C in RTIL using MV as the electron acceptor and hydrogen as the electron donor. This homogeneous catalysis experiment showed no hydrogenase activity, revealing that the immobilization step onto the electrode is not responsible for the electrochemical inactivity in RTILs.

However, contrary to the observations made with the Df Hase, when the Aa Hase-modified PG electrode is transferred from RTIL solution back to HEPES, the catalytic signal for H_2 oxidation is recovered (Fig. 7B, black curve). Identically, but contrary to the experiment realized with Df Hase, preincubation of Aa Hase in RTIL at 60 °C during 1 min before running the CV experiment in HEPES, allows a similar direct enzymatic oxidation of H_2 than recorded without pretreatment. The main conclusion is that Aa Hase does not undergo denaturation in RTILs. These results also suggest that Aa Hase could retain enzymatic activity in RTILs as a function of water ratio. Due to the non-miscibility of EmimNTf2 to water, we have shown in this work that the electrochemical behavior of DvH $cytc_3$ in RTIL can be maintained simply by keeping an aqueous layer around the protein shell. In the case of Aa Hase, the same procedure failed to obtain H_2 oxidation activity. Nevertheless, improved enzymatic activity was most often reported in the literature after addition of small amount of water in organic solvents or RTILs. Bell-shape curve was for example obtained for catalase redox peak current dependence on the water content in BmimBF4, in the range

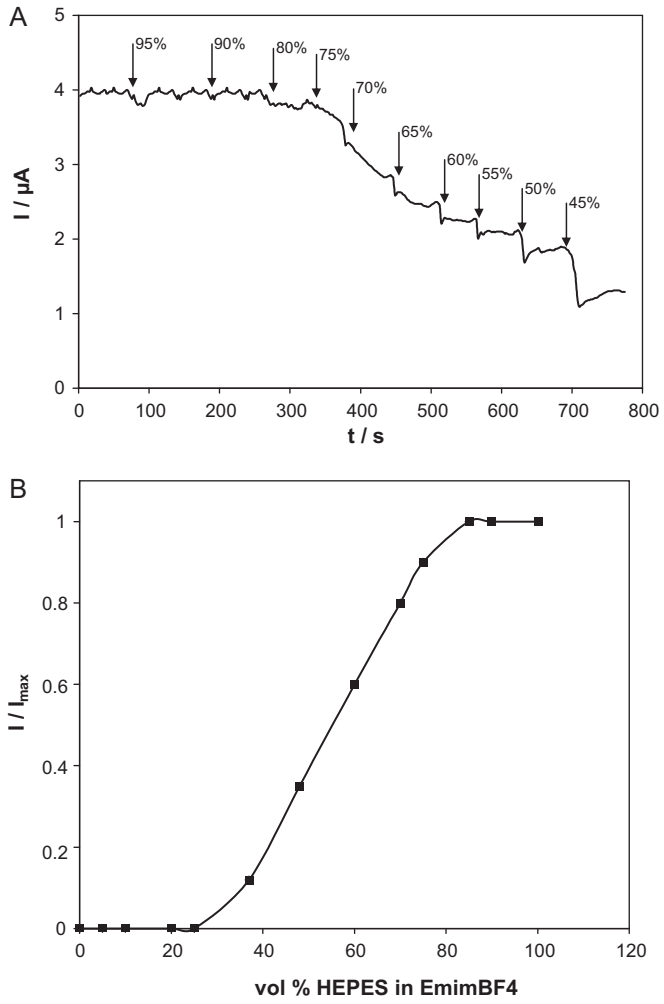


Fig. 8. (A) Chronoamperometric experiments at −0.3 V, 60 °C under H_2, at the PG electrode modified with adsorbed Aa Hase as a function of the ratio HEPES/EmimBF4; the addition of EmimBF4 is indicated by the arrows and consequently the percentage of HEPES in EmimBF4. (B) Evolution of the normalized current as a function of the percentage of HEPES buffer 50 mM pH 7.2 in EmimBF4.

2–10% [15]. It was also reported recently that catalytic activity of laccases can be stimulated in mixtures of water with $Bmim^+$-based ionic liquids [46]. Chronoamperometric measurements were thus performed at 60 °C under H_2 in mixtures of water with ionic liquid at a potential of −0.3 V at a PG electrode modified with adsorbed Aa Hase. The typical amperometric response upon the successive addition of EmimBF4 in 50 mM HEPES is given in Fig. 8A.

The corresponding currents are reported in Fig. 8B as a ratio of the measured current at each HEPES/EmimBF4 proportion to the maximum current obtained with pure HEPES. It is seen that at least 20% of HEPES in RTIL are needed to recover a catalytic activity. Beyond around 80% of HEPES in RTIL, the catalytic current is not influenced by the presence of RTILs. Catalytic currents recorded using CV experiments in 100/0, 50/50 and 10/90 HEPES/EmimBF4 mixtures (v/v) were in accordance with the results obtained by chronoamperometry.

3.5. Parameters influencing hydrogenase activity in RTILs

Several factors can affect the hydrogenase activity in RTILs. At first, solubility of H_2 in RTILs and/or reversibility of the H^+/H_2 couple are not likely to be responsible of the inhibition of the catalytic process. Indeed, in agreement with previous works [47,48], we have observed in this work that at a pre-anodized platinum electrode, a quasi-electrochemically reversible process is obtained under H_2 in RTILs.

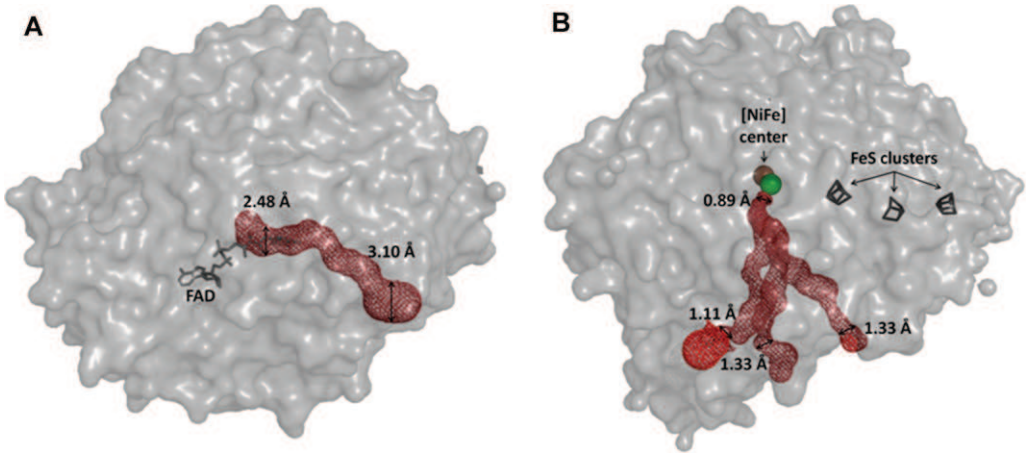
The inhibition may simply originate from denaturation of the enzyme in RTILs. We have already emphasized that it not the case for Aa Hase. But the experiments made with Df Hase-modified electrode incubated in RTILs before transfer to HEPES solution cannot rule out this hypothesis. Unfortunately, direct spectroscopic evidences, such as circular dichroism spectroscopy, of protein denaturation failed because the response due to RTILs hid that of hydrogenase.

The blocking up of the entry of the channels for H_2 diffusion towards the active site by the RTILs may be another reason for the catalytic inhibition. Actually, the range of external diameters of the gas channels in hydrogenase compares quite much less with the average diameter of EmimBF4 or EmimNTF2. One idea to prove this hypothesis would have been to incubate the hydrogenase in RTIL under CO. Aa Hase is resistant to CO, but Df Hase is known to be strongly inhibited by CO coordination to the active site. Since Df Hase cannot be reactivated upon transfer from RTIL to HEPES, it was not possible to state if CO had reached the active site using electrochemistry, however. Other methods such as EPR could bring information on the accessibility or not of CO to the active site in RTILs. Nevertheless, if the blocking effect of the gas channel is the major reason for hydrogenase inhibition, one can expect that other enzymes with bigger in size substrates, thus bigger channels or cavities could function in RTILs. Examples can be found in the literature, such as oxidation of anthracene by laccase [16], or oxidation of guaiacol by Horseradish peroxidase [49], and generally speaking enzyme-catalyzed reactions in RTILs often provide superior results than in organic solvents [50]. We have verified that the oxidation of glucose by glucose oxidase mediated by ferrocene methanol was efficient in the RTILs tested in this work (data not shown). In the case of glucose oxidase, the channel diameter is bigger and nearly constant all along the cavity (around 0.3 nm), while in the case of hydrogenase bottlenecks are present along the channels and a funnel effect appears on the path to the active site (channel diameter decreases from 0.13 nm to 0.09 nm) (Scheme 2).

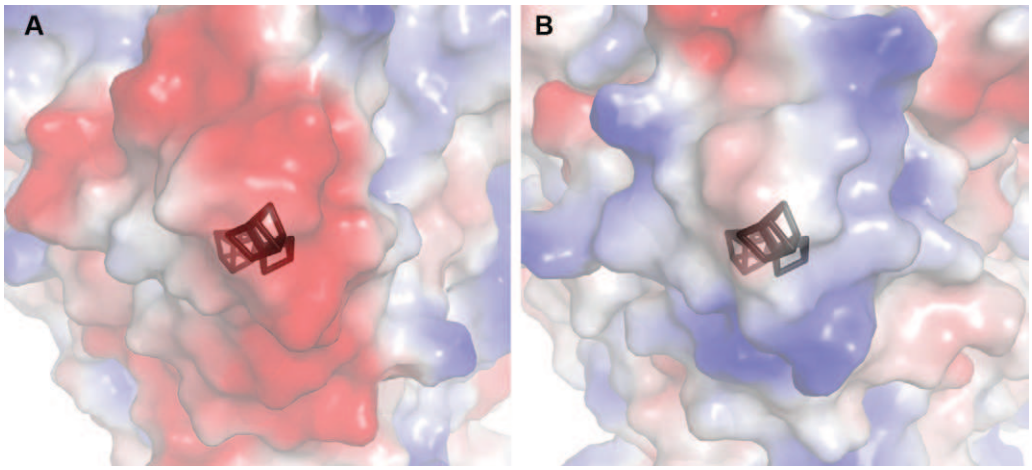
The obstruction of the channel could be thus considered less critical for glucose oxidase when compared to the size of RTILs ions, contrary to hydrogenase that has evolved to small channels in order to be highly specific to the smallest molecule, namely H_2. However, the gas channel diameter is equivalent in both Aa and Df hydrogenases. Another parameter has thus to account for the different behavior of the two hydrogenases in mixed RTILs/water media.

We have shown in the case of Aa Hase that the loss of enzymatic activity is not due to an unfavorable orientation of the enzyme at the electrode interface. No activity can be obtained either using CV or spectroscopic enzymatic assays in the presence of a redox mediator. Another possibility is the inaccessibility of the distal FeS cluster due to strong interaction with the ions that compose the RTILs. The distal FeS cluster in Df Hase is surrounded by a highly acidic patch of amino acids residues (Scheme 3A).

Thus electrostatic interactions between the cation of RTILs and the environment of the distal FeS cluster most probably play a key role in the deleterious interaction between the enzyme and the RTILs. We accordingly observed in this work a poor stability of the electrochemical signal for Desulfovibrio gigas cytochrome c_3, a tetraheme low-potential cytochrome, which presents a global negative surface charge. The effect was the most pronounced in EmimNTf2, the RTIL with the largest anion. We have otherwise tested in this work that Df Hase remains active in mixed HEPES/polar solvents (60/40, v/v) such as HEPES/ethanol, HEPES/acetonitrile or HEPES/acetone. The experimental data support the idea of the predominance of electrostatic unfavorable interactions instead of polar solvent effect on the inhibition of Df Hase.



Scheme 2. (A) Structure of glucose oxidase (1GPE), with the Flavin-Adenine Dinucleotide cofactor (FAD) depicted as black sticks, and substrate channel for glucose diffusion as red mesh. (B) Structure of *Desulfovibrio fructosovorans* [NiFe] hydrogenase (1FRF), with hydrophobic channels for gas molecule diffusion as red mesh, nickel and iron of the [NiFe] centre in green and brown spheres, respectively, and FeS cluster as black sticks.



Scheme 3. Distal FeS cluster electrostatic environment of hydrogenase from (A) *Desulfovibrio fructosovorans* and (B) *Aquifex aeolicus*. Red, white and blue colors represent negative, neutral and positive charges, respectively.

A different situation is however encountered with the membrane bound hydrogenase from the hyperthermophilic bacterium *A. aeolicus*. We have shown in this work that this hydrogenase is not denatured by RTILs, and furthermore that H_2 can be enzymatically oxidized with high efficiency and in the absence of any redox mediator in equimolar mixture of RTILs and aqueous buffer. Water-miscible ionic liquids dissolve in water, given rise to the free anion and cation components. As already mentioned in this work with DvH cytc$_3$, the trend of ions to order water structures at low concentration (kosmotropicity), could explain the more or less stabilization of enzymes, thus their activity. In a recent work, attempts to rationalize the effect of increasing amount of RTIL in water on the catalytic activity of laccase highlighted the numerous and complex interactions between the enzyme, the ionic liquid, water, substrate, product and buffer system [46]. Indeed, depending on the nature of the anion in the Bmim$^+$-based RTILs, the activation/inhibition phenomena could be referred or not to the kosmotropicity scale. Other possible mechanisms, such as formation of H-bonds between the enzyme and the ions, or electrostatic interaction between ions and amino acid side chains can account for the observed phenomena. Due to its anchoring position in the cell membrane, Aa Hase presents a very different surface amino acids composition compared to the soluble Df Hase. Up to now the crystallographic structure of Aa Hase is not resolved. But no net charged environment is present around the distal FeS cluster (Scheme 3B). Thus electrostatic interactions are less critical for FeS accessibility to mediator. Based on their relative position in the cell, it can be expected that the membrane-bound Aa Hase can afford much more hydrophobic environment than the soluble periplasmic Df Hase. Furthermore, it has been proposed that Aa Hase is anchored to the membrane, on one hand, by a b-type cytochrome and, on the other hand, by an extension of about forty five amino acids residues at the C-terminal end of the small subunit of the enzyme [28]. This extension of amino acids, not found in the periplasmic soluble Df Hase, is predicted to contain a membrane-spanning helix. The position and mobility of this helix in Aa Hase could be the key point in order to explain the activity of Aa Hase in the presence of RTILs.

4. Conclusions

In this study, we have extended the knowledge of the behavior of redox proteins and enzymes in RTILs. We have shown that the polyheme bacterial DvH cytc$_3$ can retain its electrochemical activity in RTILs. Especially, we have demonstrated that the use of non-miscible EmimNTf2 is favorable to the predominance at the electrode interface of a native form of the cytochrome c$_3$, most probably due to the retention of structural water in protein. Cytochrome c$_3$ is the physiological partner of hydrogenases from *Desulfovibrio* species. Unfortunately we have shown that H_2

oxidation by the bacterial *D. fructosovorans* [NiFe] hydrogenase is inhibited in the three RTILs we have tested. This is not the case using the hyperhermophilic [NiFe] hydrogenase from *A. aeolicus*, which is able to oxidize hydrogen with high efficiency in electrolytes composed of 80% RTILs in aqueous buffer, thus giving the opportunity of future electrolytes with uncommon and variable properties for biofuel cell design, or for bioorganic synthesis. But in order to take advantage of RTILs as electrolyte for enzymatic H_2 oxidation, most probably the issue will be to protect the enzyme in a suitable matrix or in water-in-ionic liquid microemulsion. Work is in progress in the laboratory in this way.

Acknowledgments

The authors thank Drs M.L. Cardenas, A. Cornish-Bowden, M. Guiral, M. Ilbert, and G. Leroy (Bioénergetique et Ingénierie des Protéines-CNRS – France) for helpful discussions, M. Bauzan (Fermentation Plant Unit IMM, Marseille, France) for growing the bacteria, Région Provence-Alpes-Côte d'Azur and PIE CNRS for financial supports.

References

[1] A.L. Eckermann, D.J. Feld, J.A. Shaw, T.J. Meade, Coord. Chem. Rev. 254 (2010) 1769.
[2] A.K. Sarma, P. Vatsyayan, P. Goswami, S.D. Minteer, Biosens. Bioelectron. 24 (2009) 2313.
[3] I. Iavnov, T. Vidakovic-Koch, K. Sundmacher, Energies 3 (2010) 803.
[4] S.V. Muginova, A.Z. Galimova, A.E. Polyakov, T.N. Shekhovtsova, J. Anal. Chem. 65 (2010) 331.
[5] P. Hapiot, C. Lagrost, Chem. Rev. 108 (2008) 2238.
[6] H. Zhao, J. Chem. Technol. Biotechnol. 85 (2010) 891.
[7] W. Sun, P. Qin, R. Zhao, K. Jiao, Talanta 80 (2010) 2177.
[8] C. Xiao, X. Chu, B. Wu, H. Pang, X. Zhang, J. Chen, Talanta 80 (2010) 1719.
[9] W. Zhilei, L. Zaijun, S. Xiulan, F. Yinjun, L. Junkang, Biosens. Bioelectron. 25 (2010) 1434.
[10] Q.L. Sheng, J.B. Zheng, X.D. Shang-Guan, W.H. Lin, Y.Y. Li, R.X. Liu, Electrochim. Acta 55 (2010) 3185.
[11] D. Wei, A. Ivaska, Anal. Chim. Acta 607 (2008) 126.
[12] D.L. Compton, J.A. Laszlo, J. Electroanal. Chem. 520 (2002) 71.
[13] J.A. Laszlo, D.L. Compton, J. Mol. Catal. B: Enzym. 18 (2002) 109.
[14] S.F. Wang, T. Chen, Z.L. Zhang, X.C. Shen, Z.X. Lu, D.W. Pang, K.Y. Wong, Langmuir 21 (2005) 9260.
[15] S.F. Wang, T. Chen, Z.L. Zhang, D.W. Pang, K.Y. Wong, Electrochem. Commun. 9 (2007) 1709.
[16] G. Hinckley, V.V. Mozhaev, C. Budde, Y.L. Khmelnitsky, Biotechnol. Lett. 24 (2002) 2083.
[17] C.M. DiCarlo, D.L. Compton, K.O. Evans, J.A. Laszlo, Bioelectrochemistry 68 (2006) 134.
[18] M. Czjzek, F. Guerlesquin, M. Bruschi, R. Haser, Structure 4 (1996) 395.
[19] D.R. Lovley, Annu. Rev. Microbiol. 47 (1993) 263.
[20] A. Brandis, R.K. Thauer, J. Gen. Microbiol. 126 (1981) 249.
[21] A.L. de Lacey, V.M. Fernandez, M. Rousset, R. Cammack, Chem. Rev. 107 (2007) 40304.
[22] F.A. Armstrong, N.A. Belsey, J.A. Cracknell, G. Goldet, A. Parkin, E. Reisner, K.A. Vincent, A.F. Wait, Chem. Soc. Rev. 38 (2009) 36.
[23] A. Karyakin, S. Morozov, O. Voronin, N. Zorin, E. Karyakina, V. Fateyev, S. Cosnier, Angew. Chem. Int. Ed. 46 (2007) 7244.
[24] T.W. Woolerton, K.A. Vincent, Electrochim. Acta 54 (2009) 5011.
[25] E. Lojou, P. Bianco, J. Electroanal. Chem. 471 (1999) 96.
[26] R. Huber, K.O. Stetter, Methods Enzymol. 330 (2001) 11.
[27] M. Guiral-Brugna, P. Tron, W. Nitschke, K. Stetter, B. Burlat, B. Guigliarelli, M. Bruschi, M.T. Giudici-Orticoni, Extremophiles 7 (2003) 145.
[28] X.J. Luo, M. Brugna, P. Infossi, M.T. Giudici-Orticoni, E. Lojou, J. Biol. Inorg. Chem. 14 (2009) 1275.
[29] M. Pandelia, V. Fourmond, P. Tron, E. Lojou, P. Bertrand, C. Léger, M.T. Giudici-Orticoni, W. Lubitz, J. Am. Chem. Soc. 132 (2010) 6991.
[30] A. Ciaccafava, P. Infossi, M.T. Giudici-Orticoni, E. Lojou, Langmuir (2010), doi:10.1021/la103714n.
[31] L.T. Serebryakova, N.A. Zorin, A.A. Karyakin, Enzyme Microb. Technol. 44 (2009) 329.
[32] J. LeGall, G. Moura, N. Dragoni, Biochim. Biophys. Acta 99 (1965) 385.
[33] C. Hatchikian, A. Traore, V. Fernandez, R. Cammack, Eur. J. Biochem. 187 (1990) 635.
[34] P. Bianco, J. Haladjian, K. Draoui, J. Electroanal. Chem. 279 (1990) 305.
[35] P. Medek, P. Benes, J. Sochor, J. WSCG 15 (2007) 107.
[36] L. Gorton, A. Lindgren, T. Larsson, F.D. Munteanu, T. Ruzgas, I. Gazaryan, Anal. Chim. Acta 400 (1999) 91.
[37] P. Bianco, J. Haladjian, Biochimie 76 (1994) 605.
[38] J. Haladjian, K. Draoui, P. Bianco, Electrochim. Acta 36 (1991) 1423.
[39] E. Lojou, P. Bianco, M. Bruschi, Electrochim. Acta 43 (1998) 2005.
[40] M.E. Diaz-Garcia, M.J. Valencia-Gonzalez, Talanta 42 (1995) 1763.
[41] P. Simoes, P.M. Matias, J. Morais, K. Wilson, Z. Dauter, M.A. Carrondo, Inorg. Chim. Acta 273 (1998) 213.
[42] E. Lojou, P. Bianco, J. Electroanal. Chem. 557 (2003) 37.
[43] M. Bekhouche, B. Doumèche, L.J. Blum, J. Mol. Catal. B: Enzym. 65 (2010) 73.
[44] D.L. Compton, J.A. Laszlo, J. Electroanal. Chem. 553 (2003) 187.
[45] K. Draoui, P. Bianco, J. Haladjian, F. Guerlesquin, M. Bruschi, J. Electroanal. Chem. 313 (1991) 201.
[46] S. Shipovskov, H.Q.N. Gunaratne, K.R. Seddon, G. Stephens, Green Chem. 10 (2008) 806.
[47] D.S. Silvester, L. Aldous, C. Hardacre, R.G. Compton, J. Phys. Chem. B 11 (2007) 500.
[48] D.S. Silvester, K.R. Ward, L. Aldous, C. Hardacre, R.G. Compton, J. Electroanal. Chem. 618 (2008) 53.
[49] D. Das, A. Dasgupta, P.K. Das, Tetrahedron Lett. 48 (2007) 5635.
[50] M. Moniruzzaman, K. Nakashima, N. Kamiya, M. Goto, Biochem. Eng. J. 48 (2010) 295.

Electrochemistry, AFM and PM-IRRAS spectroscopy of immobilized hydrogenase: role of a trans-membrane helix on enzyme orientation for efficient H_2 oxidation

A. Ciaccafava, P. Infossi, M. Ilbert, M. Guiral, S. Lecomte, MT. Giudici-Orticoni, E. Lojou

Angew. Chem. Int. Ed., 51(2012)953-956

Enzyme Catalysis

DOI: 10.1002/anie.201107053

Electrochemistry, AFM, and PM-IRRA Spectroscopy of Immobilized Hydrogenase: Role of a Hydrophobic Helix in Enzyme Orientation for Efficient H_2 Oxidation**

*Alexandre Ciaccafava, Pascale Infossi, Marianne Ilbert, Marianne Guiral, Sophie Lecomte, Marie Thérèse Giudici-Orticoni, and Elisabeth Lojou**

Nickel–iron hydrogenase ([NiFe] Hase) catalyzes hydrogen splitting into protons and electrons, and is a potential biocatalyst in fuel cells.[1] Three FeS clusters aligned as a conductive wire drive electrons from the [NiFe] active site to the surface of the enzyme, where the redox partner (including the electrode) binds. Direct enzyme connection gave access to thermodynamic and kinetic data of enzymatic reactions through direct electron transfer (DET). Mediated electron transfer (MET) allowed recreation of the physiological electron-transfer chain, and/or connection of unfavorably oriented enzymes.[2–6] Previous work demonstrated that DET or MET processes for H_2 oxidation by a soluble, O_2-sensitive [NiFe] Hase from *Desulfovibrio* species could be controlled by electrostatic interaction.[7] The presence of an acidic patch of amino acids, coupled to a dipole moment pointing towards the distal FeS cluster (positioned at the surface of the enzyme), allowed orientation of the enzyme, which turned upside down as a function of the charge on the electrochemical interface.

Recently, we reported on the electrochemistry of membrane-bound *Aquifex aeolicus* (*Aa*) [NiFe] Hase, which exhibits outstanding resistance to O_2, CO, and heat.[8–10] Efficient immobilization of this Hase was achieved on graphite electrodes, in aqueous electrolytes and ionic liquids, by encapsulation in carbon nanotube networks, or connection to a redox polymer.[11,12] In contrast to the soluble, O_2-sensitive [NiFe] Hase, no specific orientation could be obtained by electrostatic interaction for *Aa* Hase, and thus control of the electron-transfer process was not possible. A model structure accordingly put forward a very different environment of the distal FeS cluster, with no charged amino acid patch, in accordance with the membrane anchorage.[12] We analyze herein H_2 oxidation by *Aa* Hase immobilized on self-assembled monolayers (SAMs) on gold electrodes as a function of both the length and the nature of the thiol derivative (see SI 1 and SI 2 in the Supporting Information). For the first time, AFM and polarization modulation infrared reflection adsorption (PM-IRRA) studies are reported for understanding *Aa* Hase orientation and its consequences for electron-transfer process in H_2 oxidation.

Positively charged 4-aminothiophenol ($ArNH_2$) and negatively charged 6-mercaptohexanoic acid (C_5COOH) SAMs both yield DET and MET processes for H_2 oxidation (Figure 1 a and b), and neither process is favored over the other. A mixed process was similarly observed for H_2 oxidation at charged short-chain alkanethiols, which are known to be more disordered.[8] This strongly suggests that electroenzymatic H_2 oxidation is linked to multiple orientations of Hase on top of the charged SAMs, and not to Hase present inside possible SAM defects. The lipophilic methylene blue (MB) molecule

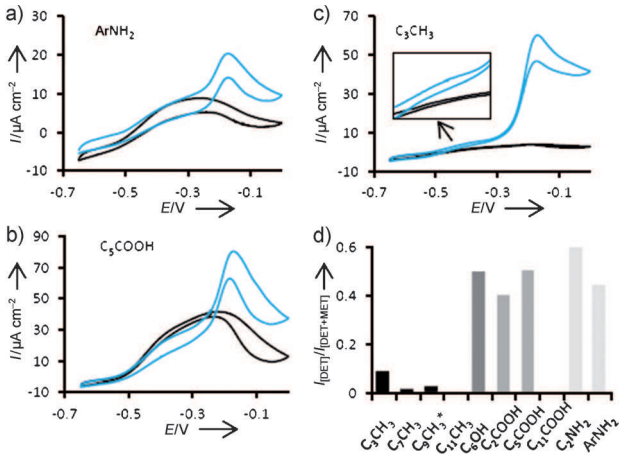


Figure 1. Cyclic voltammograms (CV) for H_2 oxidation via *Aa* Hase on SAM gold electrodes before (black lines) and after (blue lines) addition of 10 µM MB. a) $ArNH_2$, b) C_5COOH, c) C_3CH_3, d) $I_{DET}/I_{(DET+MET)}$ ratio relative to *Aa* Hase orientation as a function of SAM properties (*: from reference [2]). The inset in c) focuses on the potential range −0.55 to −0.3 V and shows the increase in DET current after MB addition. Potentials are given versus Ag/AgCl reference electrode. 5 mVs^{-1}, 50 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES), pH 6.8, 60°C, H_2 atm.

[*] A. Ciaccafava, P. Infossi, Dr. M. Ilbert, Dr. M. Guiral, Dr. M. T. Giudici-Orticoni, Dr. E. Lojou
Bioénergétique et Ingénierie des Protéines
Institut de Microbiologie de la Méditerranée—CNRS
31 Chemin Aiguier, 13009 Marseille (France)
E-mail: lojou@ifr88.cnrs-mrs.fr
Dr. S. Lecomte
Chimie et Biologie des Membranes et Nanoobjets
CNRS-Université Bordeaux 1
2 rue Robert Escarpit, 33607 Pessac (France)

[**] Financial support by Région Provence-Alpes-Côte d'Azur, Programme Interdisciplinaire Energie CNRS and ANR Bioénergie. We thank Dr. A. Ronda and NanoTecMat technological facility for atomic force microscopy (AFM) experiments, Dr. S. Canaan and S. Robert for TLC experiments, and M. Bauzan for growing the bacteria. PM-IRRA = polarization modulation infrared reflection adsorption.

Supporting information for this article is available on the WWW under http://dx.doi.org/10.1002/anie.201107053.

© 2012 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

can be incorporated into SAMs.[13] Thus, when the end-charged alkyl chain contains more than 11 methylene groups (see SI 3 in the Supporting Information), H_2 oxidation proceeds only through a MET process, in agreement with Marcus-theory long-range ET.[14]

Adsorption of *Aa* Hase on a 1-butanethiol (C_3CH_3) hydrophobic SAM mimicking the physiological environment unexpectedly results in a majority MET process (Figure 1c). This process is stable at least for one day, and the rate constant between *Aa* Hase and MB is calculated to be 78 s^{-1}. Only a weak DET process for H_2 oxidation is observed, which shows a 50% increase after addition of MB (inset of Figure 1c). The same phenomenon occurred when Toluidine Blue O was used as redox polymer matrix,[12] and is related to MB, which is incorporated in the SAM layer. Indeed, comparing the respective length of the C_3CH_3 SAM layer and MB molecule, MB can anchor *Aa* Hase at the top of the SAM in a favorable orientation for an enhanced DET process.

The $I_{DET}/I_{(DET+MET)}$ ratios obtained with *Aa* Hase adsorbed on the various SAMs (Figure 1d) highlight two distinct behaviors. On charged and neutral hydrophilic surfaces, H_2 oxidation proceeds as a mixed DET + MET process, with almost equivalent current for DET and MET processes, providing that the number of CH_2 groups in the alkyl chain is less than ten. The $I_{DET}/I_{(DET+MET)}$ ratio takes a value of around 0.5. Conversely, on hydrophobic SAMs, the MET process is largely favored, even for short alkyl chains. The $I_{DET}/I_{(DET+MET)}$ ratio is now 0.08 for C_3CH_3 SAM, a value close to that obtained in our previous work on 1-decanethiol (C_9CH_3) SAM electrodes, and far lower than that obtained at charged SAM electrodes.[8] We have thus demonstrated that favoring of MET versus DET process for H_2 oxidation at hydrophobic SAM electrodes is not related to the length, but to SAM hydrophobicity.

Immobilization of *Aa* Hase on hydrophobic C_3CH_3 SAM was examined by AFM (Figure 2). A homogeneous distribution of spheres with a mean height of 3 nm and a lateral dimension of 30 nm is observed. This gold plate exhibits an MET current characteristic for H_2 oxidation. The image features are in accordance with data collected by De Lacey et al. and are attributed to one monolayer of *Aa* Hase, the size of which is close to 5 nm.[15]

PM-IRRAS is a very sensitive method for characterizing chemical groups at the electrode surface. For the first time, it has been used to characterize Hase orientation (Figure 3). The adsorption of *Aa* Hase on the SAMs is indicated by the appearance of amide I and II bands at 1661 and 1545 cm^{-1}, respectively. The position of the former band indicates that the secondary structure of the Hase is mainly α-helix, in agreement with 40% α-helix and 15% β-sheets given by a homologous structure.[16] The shape of the amide I band of *Aa* Hase adsorbed on hydrophilic or hydrophobic surfaces, as well as on an attenuated total reflectance Ge crystal (see SI 4 in Supporting Information) is similar. Both hydrophilic and hydrophobic surfaces thus adsorb *Aa* Hase without modification of its secondary structure. However, the orientations of *Aa* Hase on the hydrophilic (Figure 3a) and hydrophobic (Figure 3b) surfaces differ. The amide I/amide II band-area ratios are clearly different, namely, 6.5 and 4 for hydrophilic and hydrophobic surfaces, respectively. Based on previously published simulation models, we evaluated the orientation of the α-helix axis of *Aa* Hase adsorbed on SAMs by assuming that 1) all amide groups have a helical secondary structure, and 2) all helices are tilted at a similar angle to the normal of the interface.[17,18] The angle of the α-helix is around 25° for adsorption on hydrophilic surfaces and 40° for hydrophobic surfaces. We conclude that observation of an MET versus a DET + MET process for H_2 electrocatalytic oxidation according to the hydrophobicity of the surface is linked to a different orientation of *Aa* Hase. Hence, the angle obtained for

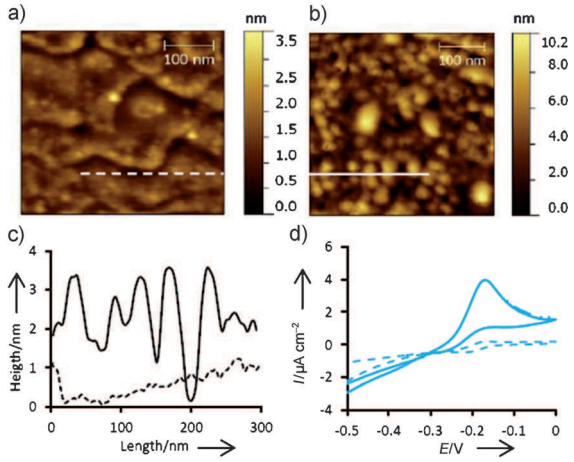


Figure 2. Noncontact-mode AFM topographic image of C_3CH_3-modified gold(111) plate a) before and b) after incubation in 1 μM *Aa* Hase. c) *z*-axis profiles of a) (dotted line) and b) (plain line). d) CV on C_3CH_3-modified gold(111) plate for 10 μM MB (dotted line) and for H_2 oxidation by *Aa* Hase in the presence of 10 μM MB (plain line). Potentials are given versus Ag/AgCl reference electrode. 5 mVs^{-1}, 50 mM HEPES, pH 6.8, 60°C, H_2 atmosphere.

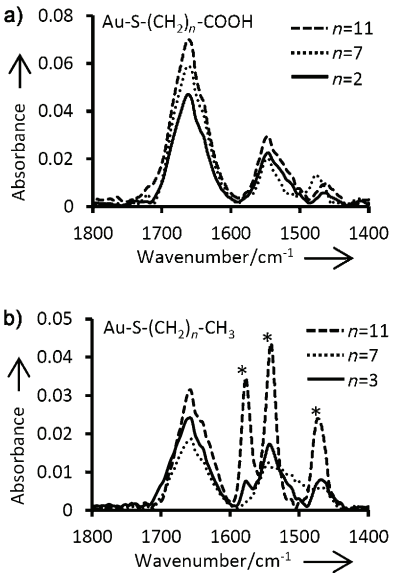


Figure 3. PM-IRRAS of *Aa* Hase on a) Au–$S(CH_2)_nCOOH$ and b) Au–$S(CH_2)_nCH_3$ surfaces. * Thin bands at 1577 and 1541 cm^{-1} are detected in addition to the amide II band (at 1542 cm^{-1}), and could be assigned to CO_3^- or HCO_3^-.

© 2012 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

hydrophilic SAMs corresponds to a mean of multiple orientations of *Aa* Hase, while that obtained on hydrophobic SAMs is linked to a preferential orientation with the distal FeS cluster far from the electrochemical interface.

The *Aa* Hase was solubilized from the cell membrane fractions with dodecyl maltoside (DDM) neutral detergent. Although the concentration steps at the end of the purification remove the excess of detergent, it is hardly conceivable that no DDM remains surrounding the enzyme, while preserving its integrity. Thin layer chromatography (Figure 4) confirmed that diluted enzyme solution (1 μM)

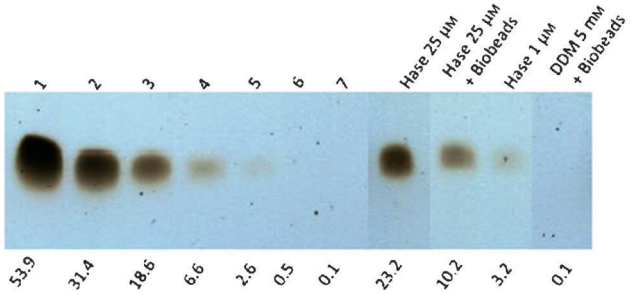
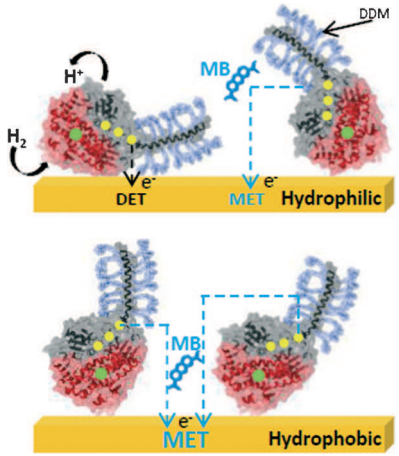


Figure 4. TLC for quantification of DDM surrounding *Aa* Hase; lanes 1 to 7: DDM calibration spots for 20, 10, 5, 2, 1, 0.2, and 0.02 mM DDM; values at the bottom correspond to the absorbance at 440 nm of each spot.

contains around 1 mM DDM. The detergent is strongly bound to the enzyme, since after treatment with Biobeads only part of the DDM is removed, in marked contrast to free DDM in solution. By mass spectrometry, a trans-membrane helix situated less than 15 Å from the distal FeS cluster is identified on solubilized *Aa* Hase.[8] It is composed of hydrophobic amino acid residues and is likely surrounded by DDM molecules, turning the domain in the vicinity of the FeS distal cluster hydrophilic. Consequently, we propose that this helix plays a key role in the orientation of hydrogenase on SAM interfaces. On hydrophobic interfaces, the FeS distal cluster remains at a distance from the electrode at which electron-transfer tunneling can not take place. On the other hand, the DDM-induced hydrophilicity of the helix, in addition to the absence of a charged patch in close proximity to the distal FeS cluster, prevents any specific orientation of the enzyme on hydrophilic electrochemical interfaces.

In summary, the efficiency toward H_2 oxidation of immobilized *Aa* Hase depends on the hydrophobicity of the electrochemical interface. An innovative combination of electrochemistry, AFM, and PM-IRRAS demonstrates no preferential orientation of the enzyme on hydrophilic interfaces, while hydrophobic surfaces favor one orientation with the distal FeS cluster far from the electrochemical interface. This specific orientation is driven by the presence of a trans-membrane helix surrounded by neutral detergent, and by the absence of charged residues in the close vicinity of the distal FeS cluster. Thus, on charged or hydrophilic interfaces, H_2 oxidation proceeds through both DET and MET processes, while on hydrophobic surfaces, H_2 can only be oxidized by a redox mediator (Scheme 1).



Scheme 1. The trans-membrane helix surrounded by DDM in the close vicinity of the distal FeS cluster in *Aa* Hase controls the electron-transfer process for H_2 oxidation. Yellow and green spheres represent FeS clusters and [NiFe] active center, respectively.

The results obtained in this work demonstrate that hydrophilic surfaces are beneficial for high performance of a future bioelectrode. High current densities at low overpotential can be reached by enzymes directly connected to the electrode, but the bioelectrode can also be run thanks to a mediated process at potentials at which Hases would be inactivated. Electrode materials are needed that allow efficient encapsulation of both the enzyme and the redox mediator, while facilitating mass transfer. Work is in progress to design such electrodes.

Received: October 5, 2011
Published online: December 15, 2011

Keywords: electrochemistry · enzymes · IR spectroscopy · membrane protein · monolayers

[1] B. Friedrich, J. Fritsch, O. Lenz, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2011**, *22*, 358–364.
[2] E. Lojou, *Electrochim. Acta* **2011**, *56*, 10385–10397.
[3] D. Millo, P. Hildebrandt, M. Pandelia, W. Lubitz, I. Zebger, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 2680–2683; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 2632–2634.
[4] M. Sezer, S. Frielingsdorf, D. Millo, N. Heidary, T. Utesch, M. A. Mroginski, B. Friedrich, P. Hildebrandt, I. Zebger, I. M. Weidinger, *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115*, 10368–10374.
[5] S. Dementin, B. Burlat, V. Fourmond, F. Leroux, P. P. Liebgott, A. Abou Hamdan, C. Leger, M. Rousset, B. Guigliarelli, P. Bertrand, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 10211–10221.
[6] E. Reisner, F. Armstrong, *Methods Mol. Biol.* **2011**, *743*, 107–117.
[7] E. Lojou, X. Luo, M. Brugna, N. Candoni, S. Dementin, M. T. Giudici-Orticoni, *J. Biol. Inorg. Chem.* **2008**, *13*, 1157–1167.
[8] X. Luo, M. Brugna, P. Infossi, M. T. Giudici-Orticoni, E. Lojou, *J. Biol. Inorg. Chem.* **2009**, *14*, 1275–1288.
[9] M. Pandelia, V. Fourmond, P. Tron-Infossi, E. Lojou, P. Bertrand, C. Leger, M. T. Giudici-Orticoni, W. Lubitz, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 6991–7004.
[10] M. E. Pandelia, P. Infossi, M. T. Giudici-Orticoni, W. Lubitz, *Biochemistry* **2010**, *49*, 8873–8881.

 © 2012 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

[11] A. Ciaccafava, M. Alberola, S. Hameury, P. Infossi, M. T. Giudici-Orticoni, E. Lojou, *Electrochim. Acta* **2011**, *56*, 3359 – 3368.
[12] A. Ciaccafava, P. Infossi, M. T. Giudici-Orticoni, E. Lojou, *Langmuir* **2010**, *26*, 18534 – 18541.
[13] D. Grumelli, L. Mendez De Leo, C. Bonazzola, V. Zamlynny, E. Calvo, R. Salvarezza, *Langmuir* **2010**, *26*, 8226 – 8232.
[14] D. Khoshtariya, T. Dolidze, M. Shushanyan, K. Davis, D. Waldeck, R. van Eldik, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 2757 – 2762.
[15] C. Gutiérrez-Sánchez, D. Olea, M. Marques, V. Fernández, I. Pereira, M. Vélez, A. De Lacey, *Langmuir* **2011**, *27*, 6449 – 6457.
[16] E. Goormaghtigh, V. Cabiaux, J. M. Ruysschaert in *Physicochemical Methods in the Study of Biomembranes* (Eds.: H. Hilderson, G. Ralson), Plenum, New York, **1994**, pp. 405 – 450.
[17] D. Blaudez, J. M. Turlet, J. Dufourcq, D. Bard, T. Buffeteau, B. Desbat, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **1996**, *92*, 525 – 530.
[18] O. Cornut, B. Desbat, J. M. Turlet, J. Dufourcq, *Biophys. J.* **1996**, *70*, 305 – 312.

 © 2012 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

A friendly detergent for H_2 oxidation by Aquifex aeolicus membrane-bound hydrogenase immobilized on graphite and SAM-modified gold electrodes

A. Ciaccafava, A. De Poulpiquet, P. Infossi, S. Robert, R. Gadiou, M.T. Giudici-Orticoni, S. Lecomte, E. Lojou

Electrochimica Acta, 82 (2012) 115-125

Electrochimica Acta 82 (2012) 115–125

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Electrochimica Acta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/electacta

A friendly detergent for H_2 oxidation by *Aquifex aeolicus* membrane-bound hydrogenase immobilized on graphite and Self-Assembled-Monolayer-modified gold electrodes

A. Ciaccafava [a], A. De Poulpiquet [a], P. Infossi [a], S. Robert [b], R. Gadiou [c], M.T. Giudici-Orticoni [a], S. Lecomte [d], E. Lojou [a,*]

[a] *Unité de Bioénergétique et Ingénierie des Protéines, Institut de Microbiologie de la Méditerranée – CNRS – Aix-Marseille-University, 31 Chemin Joseph Aiguier, 13402 Marseille Cedex 20, France*
[b] *Laboratoire d'Enzymologie Interfaciale et de Physiologie de la Lipolyse, Institut de Microbiologie de la Méditerranée – CNRS – Aix-Marseille-University, 31 Chemin Joseph Aiguier, 13402 Marseille Cedex 20, France*
[c] *Institut de Sciences des Matériaux de Mulhouse, CNRS, 15, rue Jean Starcky, 68057 Mulhouse Cedex, France*
[d] *Chimie et Biologie des Membranes et Nanoobjets, CNRS – Université Bordeaux 1, Allée de Saint Hilaire, 33600 Pessac, France*

ARTICLE INFO

Article history:
Received 22 December 2011
Received in revised form 6 March 2012
Accepted 7 March 2012
Available online 16 March 2012

Keywords:
Hydrogenase
Electrochemistry
IR spectroscopy
Detergent
Self Assembled Monolayer

ABSTRACT

Immobilization of membrane bound enzymes onto electrodes is of great interest for studying physiological electron transfer processes and for biotechnological devices. Hydrogenases are the key enzymes for hydrogen metabolism in many microorganisms. Due to the high efficiency and specificity they develop for H_2 oxidation, research in the last 5 years has aimed towards their use as biocatalysts for H_2/O_2 biofuel cells to replace platinum-based bioanodes. We demonstrate in this work that the O_2-, CO- and T°-resistant membrane-bound [NiFe] hydrogenase purified from the hyperthermophilic bacterium *Aquifex aeolicus* can be efficiently immobilized onto electrodes. Both pyrolytic graphite (PG) and hydrophobic Self-Assembled-Monolayers (SAMs) on gold electrodes are used for hydrogenase immobilization. According to the chemistry and structure of the electrochemical interface, a different process for H_2 oxidation is observed, from direct to mediated electron transfer process. To gain new insight in the catalytic process, a quantification of the remaining detergent surrounding the membrane protein is performed. Adsorption isotherms of hydrogenase are determined as a function of the electrode material and the amount of detergent. Competitive adsorption of free detergent and hydrogenase is demonstrated coupling electrochemistry and Polarization Modulation Infrared Reflexion Adsorption Spectroscopy (PM-IRRAS). The efficiency of the enzymatic process is then analyzed according to the tiny interaction between the lipophilic redox mediator (methylene blue), the detergent, the enzyme and the electrochemical interface.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Better design and characterization of the interface between an electrode and biological objects such as proteins and enzymes are challenging for a fundamental understanding of inter and intramolecular electron transfer in various environments. In the last years significant research has allowed a molecular level control of enzyme immobilization at suitable interfaces [1–6]. The main idea was that an electrochemical interface that mimics the physiological environment could provide an optimized electron transfer, since both the orientation and the stability of the enzyme could be optimized. Thanks to the close complementarities of two scientific fields, *i.e.* electrochemistry and biochemistry, electrochemical interfaces were built as friendly partners of enzymes, very much like physiological partners. On the other hand enzymes were engineered so that they can fit electrochemical interfaces. Bioelectrochemistry has consequently evolved over the years, from the direct connection at electrodes of small redox proteins with solvent exposed active sites, to huge redox enzymes with multiple cofactors. Direct enzyme connection has facilitated the measurement of thermodynamic and kinetic parameters through direct electron transfer processes (DET), while mediated electron transfer processes (MET) allowed to recreate a part of a physiological electron transfer chain, or to catalytically activate unfavourable oriented enzymes [2,7]. These improved understandings have applicative incidence in biotechnological devices such as biosensors or biofuel

* Corresponding author. Tel.: +33 491164524; fax: +33 491164097.
E-mail address: lojou@ifr88.cnrs-mrs.fr (E. Lojou).

0013-4686/$ – see front matter © 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.electacta.2012.03.034

cells that rely on electrochemical interface/enzyme efficient interaction.

Hydrogenase (Hase), the enzyme that catalyzes the hydrogen conversion according to $H_2 \rightleftarrows 2H^+ + 2e^-$, has by the way received much attention because it emerges as a replacement of chemical catalysts in fuel cells [2,8–10]. The main advantage of such biofuel cells is the availability and biodegradability of the enzyme, coupled to power densities comparable to platinum catalysts at least in some hydrogen pressure conditions [11,12]. Various types of Hases are considered, differing in the metal content of the active site, their activity towards H_2 uptake or evolution, and their localization in the bacterial cells. [NiFe] Hases from the group 1 [13] are still the most studied and are mainly notable for their H_2 oxidation activity. They all share a similar structure, composed of two subunits with a molecular weight around 100 kDa. The active [NiFe] centre where hydrogen is cleaved is buried in the large subunit. The small subunit harbours three FeS clusters less than 15 Å from each other. These clusters are aligned as a conductive wire that drives the electrons from the active site to the surface of the enzyme, where the redox partners (including the electrode) are expected to bind for accepting electrons. The cluster close to the surface of the enzyme is the distal cluster.

Recently, we reported on the electrochemistry of a membrane-bound [NiFe] Hase purified from *Aquifex aeolicus* (*Aa*), a hydrogen-oxidizing, microaerophilic bacterium growing at 85 °C [14]. *Aa* Hase is involved in a complex with a diheme cytochrome *b* anchored in the membrane, coupling H_2 oxidation to O_2 reduction. Efficient *Aa* Hase immobilization was shown using adsorption onto pyrolytic graphite electrode (PG) [15,16], in buffer electrolytes and room temperature ionic liquids [17], encapsulation into carbon nanotube networks [15], adsorption onto various Self-Assembled-Monolayers (SAMs) modified gold electrode [1,2], or connection to a redox polymer [18]. Using electrochemistry and spectroscopies, *Aa* Hase was demonstrated to be stable at elevated temperatures, and to exhibit tolerance to oxygen and CO, two major bottlenecks to be overcome before the development of hydrogenase-based biofuel cells [15,16]. Molecular basis of these remarkable properties have been searched. They are currently thought to rely on a unique FeS cluster close to the active site [19,20].

Electrochemistry of immobilized proteins, including hydrogenases, mainly concerns soluble enzyme, however. Generally speaking, far less report has been published on membrane proteins, despite their central role in many bioenergetic processes (human genome is constituted of 30% membrane proteins). This is essentially because membrane proteins are more difficult to purify and manipulate experimentally than soluble proteins. Future challenge is thus to build electrochemical interfaces able to bind membrane proteins in their native state while preserving their enzymatic activity. Remarkable works have been already reported that reconstituted biomembrane-like environment onto electrodes. Various oxidases, including cytochrome *c* and ubiquinol, were integrated in tethered bilayer lipid membranes in functional and integral forms [21,22]. In a recent work De Lacey and coworkers [23] succeeded in the immobilization of a [NiFeSe] Hase post-transcriptionally modified by a lipidic tail opposite to the distal FeS cluster for its association with the cytoplasmic membrane. Attachment of a phospholipid bilayer on top of the Hase layer immobilized on a gold electrode was proved to stabilize the enzyme, thus enhance the direct H_2 oxidation. But in the whole, the behaviour of detergents needed to extract and solubilize the membrane proteins onto the electrochemical interface is often eluded. Exception is made with the works involving soluble and membrane proteins such as myoglobin, horseradish peroxidase or cytochrome *c* oxidase, that use a coating of neutral or cationic surfactants onto a glassy carbon electrode to increase the electron transfer rate [24–27]. A recent work emphasized the necessity to study the role of detergent in the formation of uniform layer of Photosystem I onto SAMs in view of bio-hybrid solid-state electronic or photovoltaic devices [28]. Demonstration was made that detergent play an intricate role in tuning PS I-PS I interactions through PS I-detergent colloidal chemistry. Thereby, PS I aggregation/de-aggregation was controlled by a complex process which relied on protein/detergent concentrations and inter-protein distances.

Taking benefit of the membrane anchorage of *Aa* Hase, we performed experiments in order to immobilize *Aa* Hase in a physiological-like environment. At first, insertion into liposomes of the complex of *Aa* Hase with the membrane cytochrome *b* has been proved to stabilize the enzyme while allowing an efficient mediated H_2 oxidation [29]. Second, adsorption of *Aa* Hase on hydrophobic modified gold electrodes was tested based on the assumption that hydrophobic interactions could drive the physiological orientation of the enzyme, hence the electron transfer process [15]. It was however shown that MET against DET process was largely favoured [1,2]. Combining electrochemistry, AFM and Polarization Modulation Infrared Reflexion Adsorption Spectroscopy (PM-IRRAS), we demonstrated that H_2 oxidation process at SAM electrodes was controlled by a physiological trans-membrane helix, positioned in the close vicinity of the distal FeS cluster and surrounded by detergent, dodecyl maltoside (DDM). DDM concentration is however difficult to control in the different purification steps, and is likely to vary from a purification to another. It was assumed that the formation of dynamic complexes between the surfactant and the protein, as well as with the electrode, may help the favourable orientation for direct electrochemistry on proteins. But the exact role of surfactant on protein and enzyme electrochemistry is still ambiguous. In this work, we investigate the influence of a neutral detergent, dodecyl maltoside (DDM), on H_2 oxidation by immobilized *Aa* Hase. Chemical and structural characteristics of PG and SAM electrodes, that can present strong affinity for detergent, are first described. Then the electrochemical process for H_2 oxidation by *Aa* Hase is explored at PG electrodes, then at hydrophobic SAM electrodes in the presence of DDM either added in *Aa* Hase solution or as a coating on the electrode. Two batches of *Aa* Hase are considered which differ in DDM content. We demonstrate using electrochemistry and PM-IRRAS a drastic dependence on H_2 oxidation of detergent concentration according to the procedure used for detergent coating, as well as a competitive interaction between free DDM or hydrogenase with the electrochemical interface that controls H_2 oxidation.

2. Experimental

2.1. Reagents

All solutions were prepared with distilled, deionized water. 4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid (HEPES) was used for hydrogenase dilution and as the supporting electrolyte at pH 6.8 and 50 mM concentration. Chloroform (purity > 99%) was purchased from Sigma. For SAM preparation, 1-Butanethiol (C_3CH_3), 1-Octanethiol (C_7CH_3), 1-Dodecanethiol ($C_{11}CH_3$), were purchased from Sigma–Aldrich and diluted in ethanol to 5 mM. *n*-Dodecyl α-D-maltoside (DDM) was purchased from Sigma–Aldrich and diluted in HEPES buffer. Deuterated DDM was purchased from Affimetrix Inc. (Maumee, OH, USA) and used for spectroscopic measurements (PM-IRRAS). Only the alkyl part of the DDM was deuterated. Bio-Beads were purchased from Bio-Rad. For detergent removal they were first washed with ethanol, then ethanol was replaced by HEPES buffer 50 mM pH 6.8 by washing the Bio-Beads five times. All other chemicals were used without further purification.

2.2. Purification of Aa membrane bound hydrogenase

A. aeolicus membrane-bound hydrogenase (*Aa* Hase) was purified as described by Luo et al. [15], except that Amicon PM 100 was used for the concentration step. A fraction of DDM detergent used for the solubilization of *Aa* Hase from the membrane extract is removed during the washing procedure through Amicon PM 100. Further removing of DDM can be achieved by treatment with Bio-Beads. Two *Aa* Hase batches (batch A as used in [1] and batch B) were studied which differ in the duration of Bio-Beads treatment, thus in the final DDM content.

Hydrogenase activity assays were performed at 80 °C by the hydrogen consumption assay using methyl-viologen as the electron acceptor and hydrogen as the electron donor as described in Ref. [14]. The hydrogen-dependant reduction rate of methyl viologen was followed spectrophotometrically at 604 nm using a Cary winUV50 with Peltier effect.

2.3. DDM quantification

DDM in the enzyme solutions was quantified using thin layer chromatography (TLC). For calibration, 10 μL of accurately diluted aliquots from a DDM standard solution (20 mM) was applied with a Camag Linomat IV sample applicator (up to 100 μL syringe). Protein sample solutions were applied on the same TLC silica gel $60F_{254}$ plate from Merck. Plates were developed in chloroform–methanol–ammonium hydroxide–water (65:25:4:1, v/v/v/v) as a mobile phase. The TLC were revealed by charring the plate after spaying them with a mixture of (50:50, v/v) of saturated copper acetate solution in water and 85.5% phosphoric acid. Densitometric measurements were acquired by scanning plates at 440 nm with a Camag TLC scanner II. Evaluation was *via* peak areas with linear regression using D-2000 Merck integrator.

2.4. Electrochemistry experiments

Cyclic voltammetry (CV) was done using a PARSTAT 2273 potentiostat from Princeton Applied Research (PAR). A conventional three-electrode system was used with a Ag/AgCl/NaCl (sat.) reference electrode, and a gold wire as auxiliary electrode. All potentials were quoted against the Ag/AgCl reference. Prior to each experiment, the solutions were deoxygenated by bubbling with high-purity nitrogen or hydrogen. Temperature of the electrochemical cell was regulated using a water bath. The reference electrode was separated from the warmed electrolyte using a side junction maintained at room temperature. The currents intensities are the average of at least three replicate.

2.5. Design of the working electrode

The graphite working electrode was constructed from 3 mm rods of pyrolytic graphite (PG) inserted in Peek polymer casings from Bio-Logic SAS. The PG electrode was carefully polished on wet fine emery papers (PRESI, P800 then P1200). After polishing, the PG electrode was washed thoroughly with water, then ethanol, followed by sonication and rinsed again with water.

The membrane electrode technology was used for some electrochemical measurements. Briefly, an aliquot of 1 μL of the buffer containing or not the enzyme was deposited on the freshly polished surface of the electrode. The electrode was then gently pressed against a square piece of dialysis membrane (Visking membrane – MWCO 6000–8000). A rubber ring was fitted around the electrode body so that the volume between the membrane and the electrode surface corresponded to a uniform thin layer [30,31]. Then, the thus-mounted membrane electrode was placed in the electrochemical cell containing the solution to be studied.

Coating of DDM on the PG electrode was achieved by depositing 2 μL of a chloroform solution containing DDM at various concentrations on the electrode surface which was then dried under nitrogen to evaporate the chloroform.

Polycrystalline gold electrodes from Materials Mates ($S = 0.0785\ cm^2$) were used as gold wires inserted in Peek polymer casings. They were polished with 0.05 μm alumina slurry (ESCIL, Lyon, France), and cleaned by electrochemical cycling in 0.05 M H_2SO_4 solution between −300 mV and +1500 mV at $150\ mV\ s^{-1}$ until reproducible voltammograms were obtained. They were carefully cleaned by water washing. The electrodes were then immersed in thiolated compounds solutions for 12 h to generate self-assembled monolayers (SAMs). The modified electrodes were rinsed in ethanol, then water. *Aa* Hase (usually 1 μM in 50 mM HEPES buffer pH 6.8) was physically adsorbed to the SAM layer at the gold electrode by soaking the gold modified electrodes in *Aa* Hase solution during 45 min at 4 °C under nitrogen atmosphere.

2.6. Texture and chemistry of the pyrolytic graphite electrode

In order to study the texture of the surface of the electrode at the micrometer scale, we used a confocal laser scanning 3D microscope ZEISS LSM 700. Images with a width of 128 μm were taken with a spatial resolution of 0.25 μm and a vertical resolution of 0.5 μm. The texture of the electrode at the nanometer scale was studied with an atomic force microscope. Surface roughness measurements were done with a Dimension 3000 scanning probe microscope (Digital Instrument). A silicon cantilever was used for all measurements. The spring constant of the cantilever was 20–100 N/m. The surface morphology of 10 μm × 10 μm and 5 μm × 5 μm spots near the centre of each sample were typically observed by the tapping mode of the scanning probe microscope. SEM imaging of the electrode surface was performed with a FEI Quanta 400 apparatus. The images were obtained in low vacuum conditions and the samples were not metalized.

Contact angle measurements were carried out using a video capture apparatus (Krüss G2) with 1 μL of high-purity water drops. Contact angle values were determined as a function of time and the initial value was determined. Measurements were made on both sides of the drop and were averaged.

In order to investigate the surface chemistry of the electrodes, temperature programmed desorption with mass spectrometry analysis (TPD-MS) was performed (data not shown). This method allows a quantitative analysis of the functional groups present on the surface and has been successfully used to study the surface chemistry of carbon materials [32]. The samples were out gassed under secondary vacuum, and then heated at a constant heating rate of $10\ K\ min^{-1}$ up to 900 °C. The species resulting from the decomposition of the surface groups, mainly CO, CO_2, H_2O and H_2, were analyzed by mass spectrometry. Depending on their decomposition temperature, the different kinds of surface groups can be identified (*e.g.* carboxyls at low temperature, ethers and quinones at high temperature).

2.7. PM-IRRA spectroscopy on gold electrodes

The samples (gold mirror) were placed at room temperature in the external beam of FT-IR instrument on a Nicolet Nexus 870 FT-IR spectrometer (Madison, WI) and the reflected light was focused on a nitrogen cooled (77 K) HgCdTe (MCT) detector (SAT, Poitiers). The optimal value of the angle of incidence for the detection was 75° relative to the optical axis normal to the interface. A ZnSe grid polarized and a ZnSe photoacoustic modulator to modulate the incident beam between p and s polarizations are placed prior the sample. The detector output is sent to a two-channel electronic device that generates the sum and the difference interferograms. The infrared

spectra were recorded at 8 cm^{-1} resolution, with co-addition of six hundred scans. Using a modulation of polarization enabled us to perform rapid analyses of the sample after treatment in various solutions without purging the atmosphere or requiring a reference spectrum.

The gold samples were prepared using the same procedure as for electrochemistry. First, the gold mirrors were placed in solution of 5 mM of thiols (C_3CH_3, C_7CH_3 or $C_{11}CH_3$) during 12 h. Then, the thiol-modified gold mirrors were rinsed with ethanol, dried with nitrogen flow, and deposited in buffered solution containing 1 μM *Aa* Hase at 4 °C during 2 h. At the end the gold mirrors were rinsed with buffer and dried and the PM-IRRAS spectrum was recorded. We recorded at least two spectra on the same mirror and we prepared at least two samples with each SAM. To evaluate the effect of addition of DDM on the *Aa* Hase adsorption, two series of experiments have been done. Either the gold mirrors were placed first in 5×CMC deuterated DDM solution for 2 h and after deposited in 1 μM *Aa* Hase solution, or the mirrors were placed in solution containing solution of both 1 μM *Aa* Hase and DDM (5×CMC).

3. Results and discussion

3.1. DDM quantification in Aa Hase solutions

DDM is used for extraction of *Aa* Hase from the cell membrane fractions. From that solubilization procedure it has been demonstrated using mass spectrometry [1] that the trans-membrane helix, which serves as a physiological membrane anchor for the two subunits of *Aa* Hase, is present on the extracted protein. This trans-membrane helix is highly hydrophobic and likely covered by DDM. TLC was used to quantify the amount of lipids and detergent present in batch A, and batch B for which a strong treatment by Bio-Beads was done (Fig. 1).

As shown on the TLC plate, lipids are present in *Aa* Hase solutions (Fig. 1A). One lipid has been clearly identified as phosphatidylglycerol (PG). Contrary to the findings by Lenz and coworkers on the hetero-trimer (the two sub-units of Hase and the cytochrome *b*) of the membrane-bound hydrogenase from *Ralstonia eutropha* [33], no phosphatidylethanolamine (PE) can be found. Future works have to be done in order to identify all the lipids present within *Aa* Hase, as well as to know whether the absence of PE can be linked to the hyperthermophily. In addition to lipids, TLC reveals the presence of DDM in both batches, although the amount greatly differs. Fig. 1B gathers the calibration curve for free DDM and the quantification of DDM in *Aa* Hase solutions. The amount of DDM is expressed as a function of DDM critical micellar concentration (CMC), which is 0.18 mM at 25 °C. Despite the washing procedure performed at the end of the enzyme purification steps which uses a 100 kDa membrane supposed to eliminate much of the free detergent, this quantification highlights a high remaining amount of DDM in batch A. We showed previously [1] that DDM quantification in progressive diluted *Aa* Hase solutions follows an evolution close to linearity, at least in the 0.1–100 μM range. At 1 μM, which is usually the concentration used for the electrochemical experiments, batch A solution contains around 3×CMC of DDM. This batch was further treated by Bio-Beads before electrochemical studies leading to a 50% DDM removal. It was demonstrated that Bio-Beads treatment of DDM solutions in the same experimental conditions allowed 25×CMC of DDM to be completely removed. This suggests that some DDM molecules remain strongly adsorbed onto *Aa* Hase molecules. Conversely, batch B which has been treated with Bio-Beads for a longer duration at the end of the purification steps contains around 0.1×CMC of DDM for 1 μM *Aa* Hase, thus 30 times less DDM than in batch A, and far less the CMC.

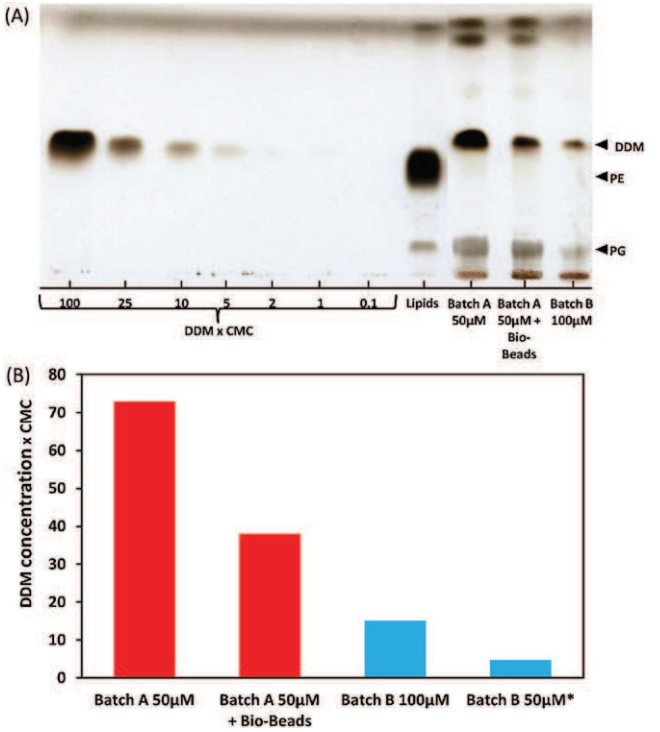


Fig. 1. TLC for DDM quantification and lipid identification in *Aa* Hase solutions: (A) On the left side: diluted DDM samples from 100 to 0.1×CMC. On the right side, pure lipids PE and PG for identification of *Aa* Hase bounded lipids and *Aa* Hase samples; (B) DDM quantification in *Aa* Hase samples obtained from densitometric area integration of DDM calibration spots from TLC experiment. Red bars correspond to batch A and blue bars to batch B. (*) Value is extrapolated *via* linear regression. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

It is difficult to discriminate between the detergent that surrounds the protein and especially the trans-membrane helix, and that one present in solution. But from the great amount of detergent that has been quantified, free micelles are expected to be present in high *Aa* Hase concentrations in addition to DDM that protects the trans-membrane helix. When diluted in pure HEPES, batch A solutions less than around 350 nM and batch B solutions less than around 10 μM will contain DDM at a concentration inferior to the CMC, however. It can thus be suspected that dilution of *Aa* Hase with HEPES buffer will have an impact on the enzyme aggregation/de-aggregation process or on stability depending on the batch. Otherwise, such a huge DDM concentration in the enzyme solutions, although necessary for *Aa* Hase extraction and purification, raises the question of the conditions in which the detergent would be detrimental or beneficial to *Aa* Hase electroactivity.

3.2. Structure and physico-chemical properties of the electrochemical interfaces for efficient Aa Hase immobilization

PG and SAM-modified gold electrodes have been previously demonstrated to be efficient platforms for *Aa* Hase immobilization [1–15]. Because the structure of electrodes obviously influence enzyme immobilization then the electron transfer process, especially when detergent is present, characteristics of PG and SAM electrodes at the molecular level have been first collected.

3.2.1. PG electrodes

Hase electrochemistry is classically performed at PG electrodes, which is admitted to present available chemical and structural characteristics for an efficient enzyme immobilization. The PG surface cannot be seen as a smooth and chemically inert surface on

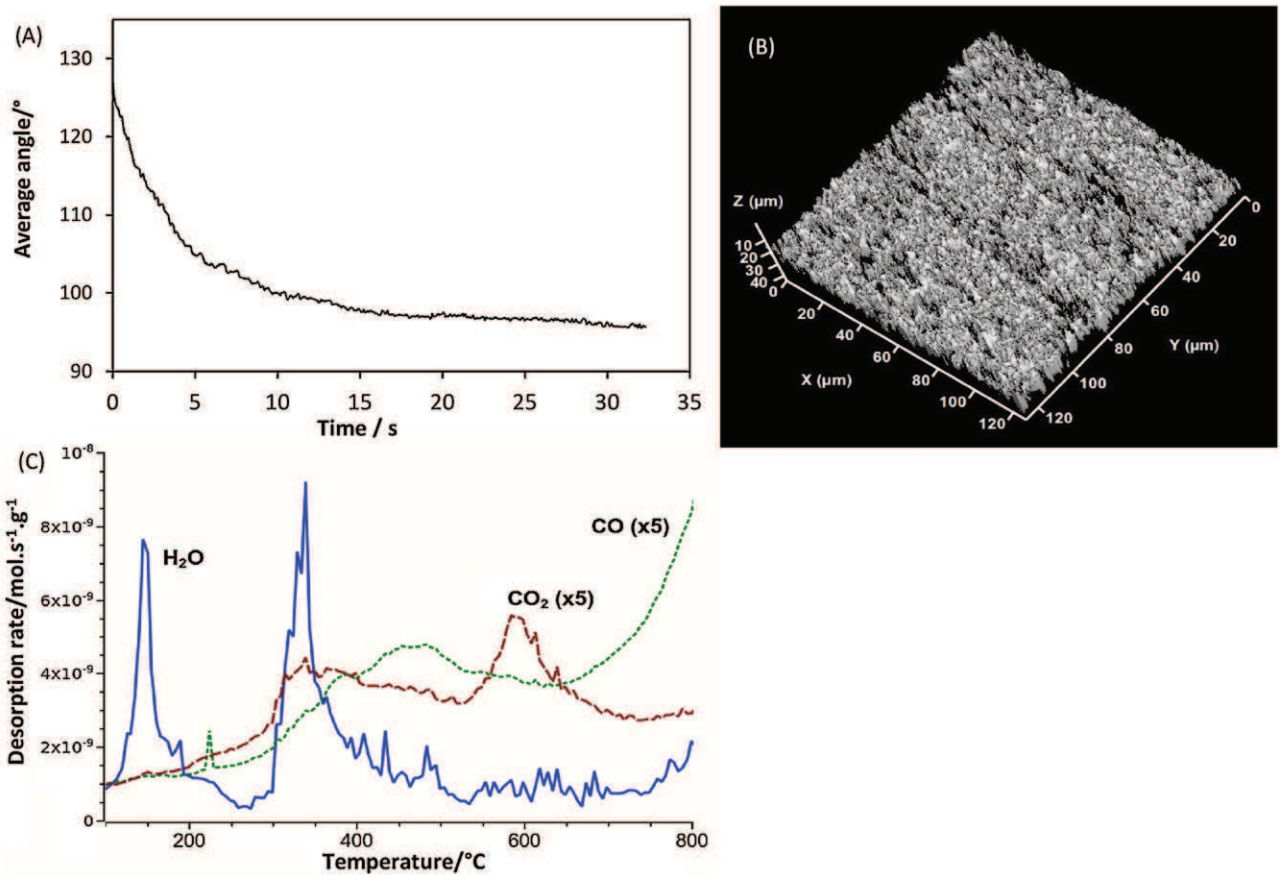


Fig. 2. PG electrode characteristics: (A) Contact angle of a 1 µL water droplet on the surface of the PG electrode as a function of time; (B) 3D reconstruction of the PG surface from the confocal analysis; (C) desorption rate of water and carbon oxide resulting from the decomposition of surface groups as a function of temperature (CO and CO_2 signals have been multiplied by 5 for clarity).

which the enzyme adsorbs. In order to obtain accurate data on the surface of our PG electrode, we have first performed contact angle measurements on the PG surface (Fig. 2A). The initial value of the contact angle is 127.5°, demonstrating that the PG surface can be considered hydrophobic. However, picture of the PG surface using confocal microscopy clearly put forwards pores of micrometer sizes, that can efficiently anchor *Aa* Hase (Fig. 2B).

In addition, the polishing procedure of the PG electrode is known to induce charges on the surface, such as oxo species (ketons, carboxylic acids and phenolic groups) [34]. This was investigated by TPD-MS (Fig. 2C). The analysis shows that a significant amount of surface groups are present on the electrode surface. Desorption of water is observed at 150 °C, which corresponds to desorption of water trapped in the electrode, and at 350 °C. This last peak results from deshydratation reactions between neighbour phenols and carboxyl groups to form anhydrides, lactones and ethers. A first, low intensity peak of decomposition of CO_2 is observed below 400 °C, showing the presence of a small amount of carboxyl groups. Then, a wide peak of desorption occurs between 400 °C and 800 °C. The amount of CO is larger than the one of CO_2: 2.2×10^{-6} mol/g *vs.* 1.7×10^{-6} mol/g. This indicates the presence of thermally stable functions which decompose at increasing temperatures: anhydrides, lactones, phenols, ethers and then ketons. The total amount of these species is then 3.9×10^{-6} mol/g. This value is low but significant since it should be related to a very low surface electrode area (0.07 cm^2). The PG surface is thus complex, with multiple possibilities of interactions, from hydrophobic to electrostatic, and additionally the possibility of enzyme encapsulation into the surface microporosity.

3.2.2. Methyl-terminated alkanethiol SAM electrodes

The structure of methyl-terminated alkanethiol SAM layers on gold electrodes has been the subject of numerous studies. It is admitted that long-chain alkanethiols form close-packed and well-ordered SAMs on gold electrodes, in which electron transfer must proceed through bond-tunnelling. Short-chain alkanethiols are however preferred for bioelectrochemistry because they can behave as less blocking interfaces, due to more pronounced disorder. PM-IRRA spectroscopy is a very sensitive technique to characterize the chemical groups present at the surface of a reflective material as a gold substrate [35]. PM-IRRAS was used at first to characterize the SAM layers (Fig. 3).

The adsorption of the alkanethiol SAMs can be followed by signature of the CH_2 chain and the CH_3 terminal. The vibrations of CH_2 chains are recorded at 2925 cm^{-1} and 2852 cm^{-1} for ν_{as} and ν_s, respectively. The CH_3 antisymmetric stretching mode and the CH_3 symmetric mode on hydrophobic surfaces ($HS(CH_2)_nCH_3$, with $n = 3$, 7 and 11) are observed at 2880 cm^{-1} and 2964 cm^{-1}, respectively, in agreement with previous reports [36]. As expected, the absorbance ratio (CH_2/CH_3) increases with the length of the alkyl chain (see Fig. 3).

Capacitance and desorption measurements of the SAMs were then performed because of the experimental conditions used in this work, *i.e.* high temperature, H_2 atmosphere and low applied potentials. Double layer capacitances for alkyl thiol covered gold electrodes were obtained in buffer electrolyte in a potential range where no faradic reaction was involved. From a value of 30 µF/cm^2 for the bare gold electrode, the double-layer capacitance decreased down to values of 6, and 3 µF/cm^2 respectively at the C_3CH_3, and

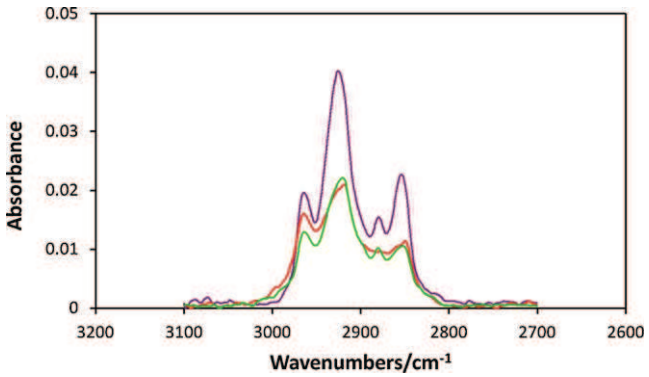


Fig. 3. PM-IRRAS spectra of C_3CH_3 (red line), C_7CH_3 (green line), $C_{11}CH_3$ (purple line) SAM layers on gold in the range of the C—H stretching modes. The spectra were recorded at room temperature. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

$C_{11}CH_3$ gold modified electrodes, indicative of the formation of the SAM layers. These capacitance values agree with reported values for other closed-packed SAMs [37]. We also controlled the stability of the SAMs after incubation under H_2 at 60 °C by typical control of the SAM desorption upon reduction in KOH 500 mM [38]. SAM desorption resulted in two reductive peaks at low potentials. For example, the C_3CH_3 SAM layer desorbed at negative potentials giving rise to two desorption processes at −0.93 and −1.1 V (data not shown). The charge for the processes after 30 min at 60 °C under H_2 gave a surface coverage of $(9 \pm 0.5) \times 10^{-10}$ mol/cm^2, in agreement with previous results [39,40]. It is known that Au—S bond reduction potentials depend on the length of the alkyl chain and the type of terminal groups [41]. Actually, the shorter the length of the thiolates, the less ordered the SAM layers, the higher the desorption potential [4,42]. Otherwise, incubation of the SAMs under H_2 can yield Au—S reduction [43]. Again, the shorter the alkyl chain the faster the reductive reaction. The binding of proteins has also been demonstrated to change the desorption potentials of the alkanethiol layers, and possibly to affect the structure of the SAMs. The changes depend however on the adsorbed molecule, since either positive potential shift for streptavidine or fibrinogen [38] or negative potential shift for azurin [40] have been described. The desorption potentials of the SAM layers are nevertheless below the potential window typically used for *Aa* Hase electrochemical tests (*i.e.* −0.65 to 0 V *vs.* Ag/AgCl), explaining why in our experimental conditions, we observe a high stability in the catalytic current for *Aa* Hase immobilized at SAM electrodes [1].

3.3. DDM coating on PG and SAM electrodes

DDM is an amphiphilic molecule prompted to be adsorbed on PG electrodes and hydrophobic SAM layers through hydrophobic interactions. Surfactant layers have been furthermore reported previously to act as a promoter for orientation of proteins and enhancement of the electron transfer process [25]. The structure of the surfactant layer is questionable, although previous reports demonstrated the formation of a monolayer of surfactant on hydrophobic surfaces [44]. It was reported that as a function of the length of the alkyl chain carried by the surfactant, the surfactant layer can shift from a discontinuous structure made from hemicylinders, to a homogeneous flat layer [45]. In this work, DDM at a concentration higher than its CMC was first coated on the PG electrode. A dialysis membrane was fitted around the electrode body so that eventual leaching of the DDM is avoided. The electrochemical

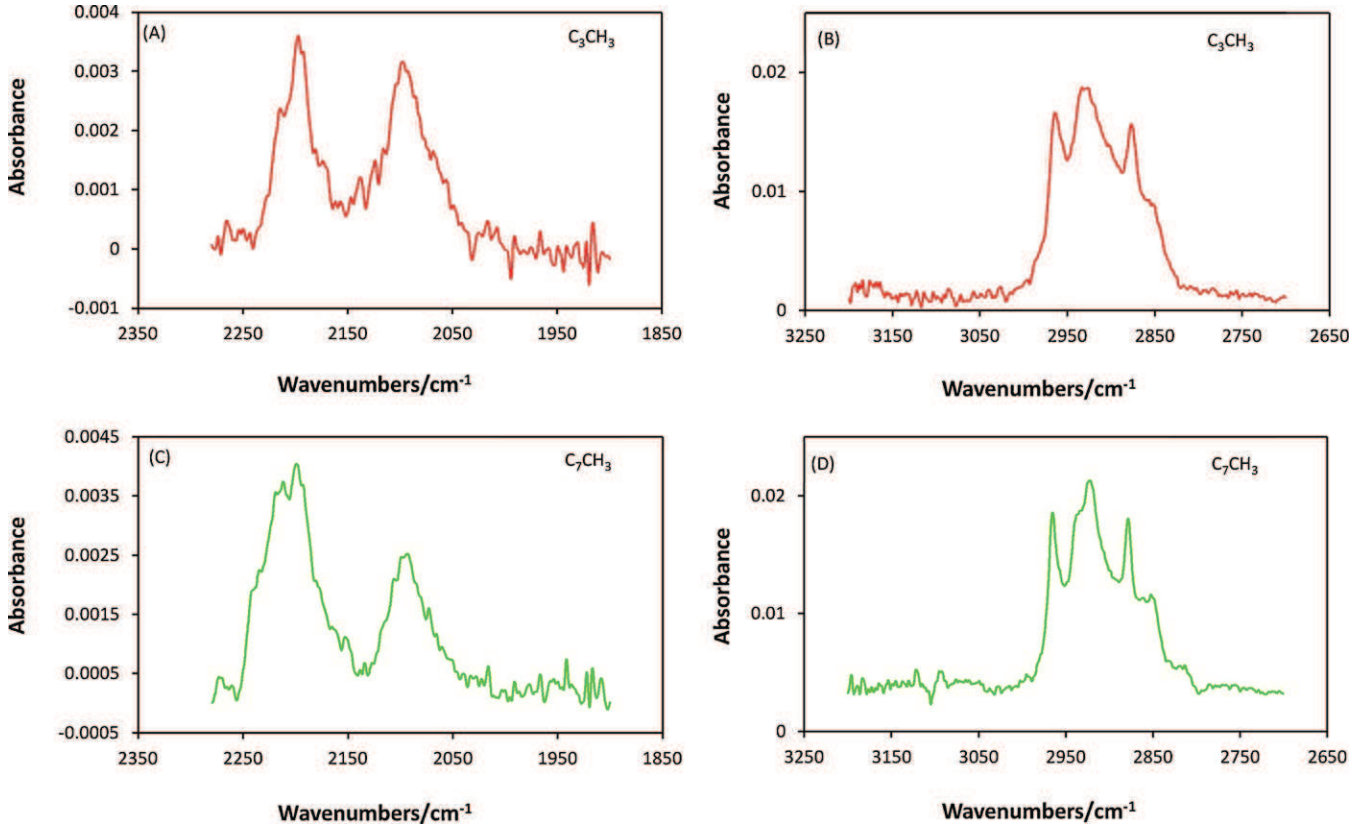


Fig. 4. PM-IRRAS spectra of deuterated DDM adsorbed on C_3CH_3 ((red line) a and b) and C_7CH_3 ((green line) c and d) surfaces in the range of the C—H stretching modes (b and d) (2700–3100 cm^{-1}) and in the range of the C–D stretching modes (a and c) (1900–2280 cm^{-1}). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

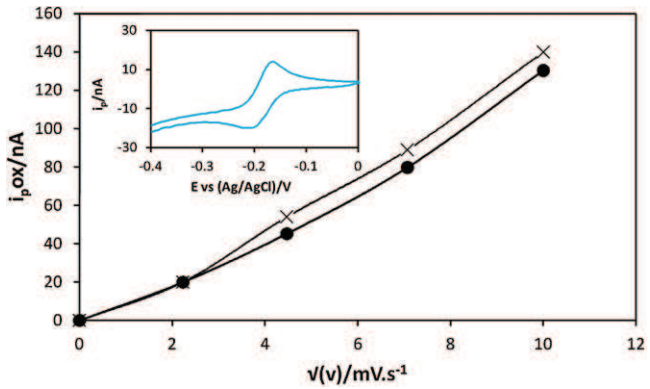


Fig. 5. Oxidation peak current dependence on scan rate for 10 μM MB at the C_3CH_3 SAM electrode before (×) and after (●) incubation in DDM. Incubation of the SAM was performed in 5×CMC of DDM for 2 h. Inset: CV for 10 μM MB at the C_3CH_3 SAM electrode after incubation in DDM. CV recorded at 5 mV s^{-1} in 50 mM HEPES buffer pH 6.8.

behaviour of small redox probes, such as MB was unchanged in the absence or presence of DDM coating, at least using DDM concentrations less than 5×CMC (data not shown).

In contrast with PG electrodes, the SAM layers bear only hydrophobic functions. An intercalation of DDM hydrophobic tail into the hydrophobic SAM chains could be furthermore expected. The interaction of DDM with the SAMs was revealed by PM-IRRAS, using deuterated DDM (Fig. 4).

Hydrophobic C_3CH_3 and C_7CH_3 SAM layers were incubated in 5×CMC of deuterated DDM for 2 h. Two bands at 2180 and 2100 cm^{-1} are revealed by PM-IRRAS, assigned to the ν_{as} and ν_s vibration of the CD_2 group, respectively. The bands relative to the vibration of the CH_2 chains of the SAM are not strongly perturbed. We thus conclude that the adsorption of DDM is only on the surface of the SAMs. Electrochemical experiments were carried out to check the influence of DDM on the redox behaviour of small probes. MB was already demonstrated in a previous work to present a mixed adsorption/diffusion behaviour at SAM electrodes, because some MB molecules can be entrapped in the SAM layer [1]. Actually, incubation of a hydrophobic SAM electrode in DDM solution at a concentration inferior to the CMC has no effect on the redox behaviour of MB. C_3CH_3 SAM layer was further incubated in 5×CMC of DDM as performed for PM-IRRAS studies. The electrochemical behaviour of 10 μM MB was compared to that obtained at the SAM electrode with no incubation in DDM. As shown in Fig. 5, the peak current for MB oxidation follows almost the same evolution with the scan rate whatever the presence or not of DDM on the SAM layer. The same results were obtained for longer alkyl chains. Although DDM is present on the SAM layers, small redox probes such as MB behave in the same manner as through the SAM layer with no DDM.

3.4. H_2 oxidation by DDM enriched *Aa* Hase immobilized onto electrodes (batch A)

3.4.1. H_2 oxidation process according to the electrode structure

H_2 oxidation process by immobilization of *Aa* Hase from batch A was compared on PG (Fig. 6A) and previously described C_3CH_3 SAM [1] electrodes. After *Aa* Hase adsorption, CV curves were recorded at 60 °C under H_2 before and after methylene blue (MB) addition in solution as a redox mediator.

Briefly, at the PG electrode, direct H_2 catalytic oxidation occurs (DET process) in accordance with previous results [2]. The direct catalytic H_2 oxidation process starts when the potential is raised around 100 mV above the formal H^+/H_2 value at pH 6.8. Contrary to the O_2-sensitive [NiFe] hydrogenases, no activation process at

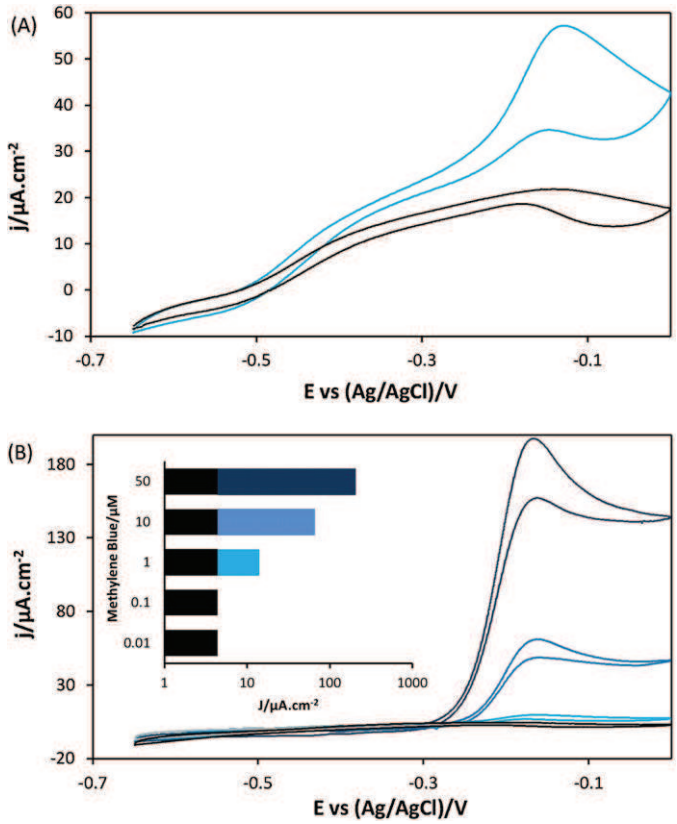


Fig. 6. (A) CV of H_2 oxidation *via Aa* Hase from batch A immobilized on the membrane PG electrode without (black line) and with (blue line) 10 μM MB; (B) CV of H_2 oxidation *via Aa* Hase immobilized on hydrophobic C_3CH_3 SAM layer using increasing MB concentrations from 10 nM to 50 μM (light to dark blue lines). Inset: histogram showing the evolution of the DET and MET current densities as a function of MB concentration. CV recorded at 5 mV s^{-1} in 50 mM HEPES buffer pH 6.8 at 60 °C under H_2 atm. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

low potential is required. The classical reversible inactivation process results in the peak like response and occurs at potentials above −250 mV. Conversely, a very weak DET process was previously observed at the hydrophobic SAM electrode [1]. After addition of methylene blue (MB), the mediated oxidation of H_2 (MET process) occurs at the potential for the redox mediator at both electrodes (Fig. 6A and [1]). This MET process involves hydrogenases that are not in direct connection with the electrode, thus still active for H_2 oxidation with the aid of the redox mediator. For the C_3CH_3 SAM electrode, a small increase in the DET current was concomitantly noticed [1]. This was proposed to be linked to hydrogenase oriented at the electrode by the mean of surface-anchored MB. This DET contribution no longer increases by further increase in MB concentration, while MET catalytic currents can be largely increased (Fig. 6B). Notably, compared to the PG electrode, MET is largely favoured at the hydrophobic SAM electrode. The ratio $I_{DET}/I_{(DET+MET)}$ in the presence of 10 μM MB is at least 0.4 for the PG electrode, but can reach 0.8 depending on the polishing procedure. It is only 0.08 for the hydrophobic SAM electrodes.

In summary, the structure of the PG electrode, which exhibits hydrophobic and hydrophilic zones, and microsize porosity allows multiple orientations of *Aa* Hase, then mixed (DET + MET) process for H_2 oxidation. At the hydrophobic SAM electrode, the MET process is mainly favoured. This suggests that only a small proportion of hydrogenase is orientated with the FeS distal cluster in direct connection with the SAM electrode. This is in agreement with the presence of a hydrophilic domain on the trans-membrane helix at a

close distance from the distal FeS cluster, because of the protection of this hydrophobic helix by detergent molecules.

3.4.2. Adsorption isotherms at hydrophobic SAM electrodes

To gain more insights in the immobilization process on the hydrophobic SAM electrodes, adsorption isotherms were constructed on the electrodes based on the measurement of the catalytic current at 60 °C under H_2 atmosphere after adsorption of increasing concentrations of *Aa* Hase. For these experiments, pure 50 mM HEPES buffer served for enzyme dilution. Kinetic of *Aa* Hase adsorption on electrodes was first investigated. Incubation time of 45 min was chosen as an optimized duration to reach equilibrium. The ratio of the MET current (i_k) *vs.* the current for MB alone (i_{Diff}) was analyzed at the SAM electrodes as a function of *Aa* Hase concentration. Fig. 7A gathers the results obtained using two hydrophobic SAMs with different lengths.

The shape of the adsorption isotherm is quite similar with the two SAMs. Two domains are clearly observed. For the lowest *Aa* Hase concentrations (<250 nM), the MET current keeps a very weak value close to 0. For higher *Aa* Hase concentrations, the MET current increases with increasing *Aa* Hase concentration and reaches a plateau above 500 nM *Aa* Hase, for which enzyme saturation is supposed to occur. In a study devoted to azurin adsorption on methyl-terminated SAMs, Chi et al. demonstrated a small increase in protein coverage with increasing chain length [40]. As examples, azurin coverage was twice on C_9CH_3 than on C_4CH_3, reaching a value for a monolayer of 4×10^{-12} pmol cm^{-2}. Even if it is impossible in our case to link this concentration to a real concentration of active hydrogenase, because of absence of non catalytic signal, our results suggest that a similar amount of electroactive *Aa* Hase is immobilized whatever the alkane chain length. Accordingly, PM-IRRAS experiments performed on *Aa* Hase adsorbed on SAM layers also suggested that *Aa* Hase amount did not strongly differ according to the alkane chain length (data not shown).

However, despite the similar amount of *Aa* Hase whatever the chain length, the MET current dramatically decreases with increasing thiol length. This is clearly shown in Fig. 7B that shows the catalytic activity for H_2 oxidation using *Aa* Hase adsorbed on SAMs built from $SH(CH_2)_nCH_3$ alkane thiols, with $n = 3$, 7, 11 onto gold electrodes. The decrease in MET current with methyl terminated chain length is explained by the tiny interaction of MB within the SAMs [46]. MB has been shown in this work to be electroactive whatever the length of the alkyl chain, describing a mixed diffusion–adsorption controlled process. Encapsulation of some MB molecules into the SAMs was also proved by film transfer experiments. After one night incubation of the C_3CH_3 SAM layer in MB solution, washing and transfer to *Aa* Hase solution, the so-modified electrode exhibited a clear MET catalytic current (data not shown). Generally speaking, electron transfer to/from adsorbed redox species or homogeneous redox probes through non defective SAM occurs *via* tunnelling process. It is well known however that shorter thiol chains induce more disordered, thus less blocking SAMs, allowing electron transfer *via* diffusion through pinholes and other defect sites, at least for small lipophilic redox probes such as MB [37,46,47]. Moreover, for short alkyl chain length, MB incorporation has been shown to be reversible, while longer chains induce an irreversible entrapment of MB inside the SAM layer [42]. Consequently, the entrapped MB in SAM layers formed by long alkyl thiol chains, although still electroactive, would stay at a distance far from the top of the SAM layer, thus ineffective for the catalytic process.

3.4.3. Effect of exogenous DDM addition

One way to study the influence of large amount of detergent in enzyme solution, is to follow the evolution of the catalytic electrochemical signal after addition of exogenous DDM. In a first set

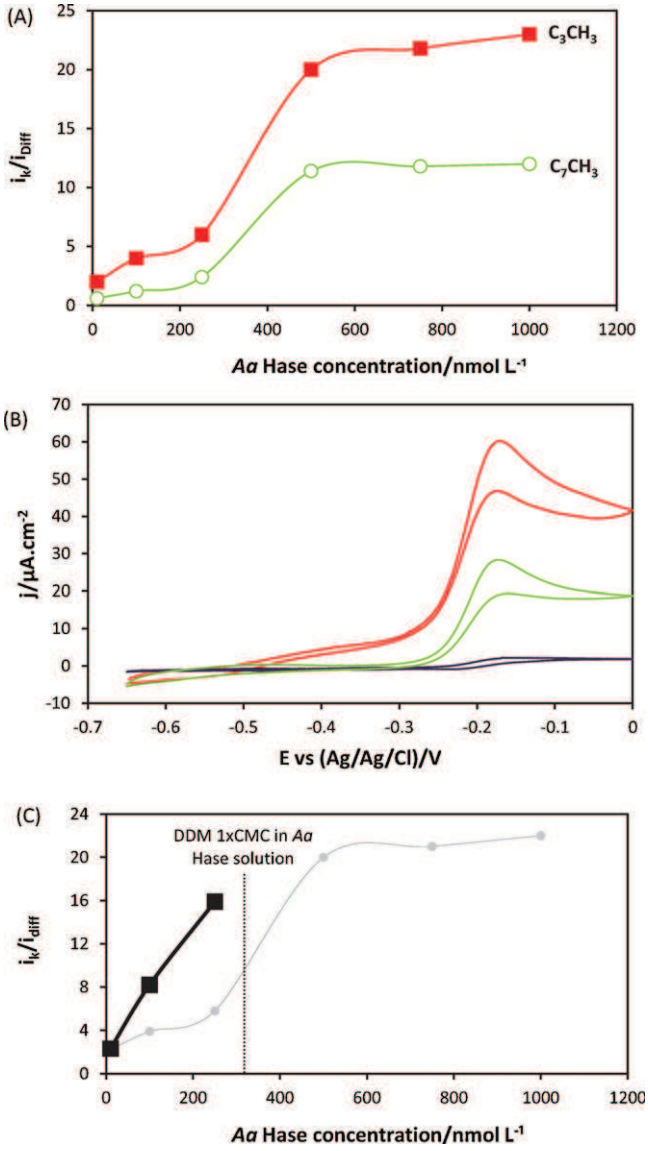


Fig. 7. Adsorption isotherms of *Aa* Hase from batch A on hydrophobic SAM electrodes: (A) Ratio of mediated catalytic (i_k) on MB peak (i_{Diff}) currents against increasing *Aa* Hase concentration immobilized on C_3CH_3 (■) and C_7CH_3 (○) SAM electrodes. For C_7CH_3, (i_k/i_{Diff}) ratio is multiplied 3 times for better visualization; (B) dependence of the MET current density on the length of the SAM, C_3CH_3 (red line), C_7CH_3 (green line), $C_{11}CH_3$ (mauve line), in the presence of 10 µM MB; (C) ratio of mediated catalytic (i_k) on MB peak (i_{Diff}) currents at low *Aa* Hase concentrations immobilized on C_3CH_3 after 0.1×CMC of DDM addition; the dotted line corresponds to *Aa* Hase concentration which contains 1×CMC of DDM (evolution of the current before DDM addition is superimposed in grey for comparison). CV recorded at 5 mV s^{-1} in 50 mM HEPES buffer pH 6.8 at 60 °C under H_2 atm. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

of experiments, 1 µM *Aa* Hase was incubated with DDM in the 0–50×CMC range, and a small drop of this solution was dried on the PG electrode. It is shown that the catalytic current presents a decrease of 37% and 20% for DET and MET respectively for 10×CMC of DDM, and 86% and 80% for DET and MET respectively for 50×CMC of DDM. Recovery of the catalytic process cannot be observed with time. In these experimental conditions, the large amount of exogenous DDM most probably diminishes the electroactive surface available for *Aa* Hase adsorption.

Conversely, at the SAM electrode, the inefficiency of the lowest *Aa* Hase concentrations for H_2 oxidation (see Fig. 7A) is hardly related to DDM passivation because of the very low DDM

concentration. A different mechanism, such as DDM depletion in enzyme solutions can be responsible of MET decrease. In order to precise the role of detergent in H_2 enzymatic process, adsorption isotherms were repeated by diluting *Aa* Hase in HEPES buffer containing DDM, and compared with the isotherms obtained with dilution of *Aa* Hase in HEPES buffer. The effect of exogenous DDM on H_2 oxidation by *Aa* Hase immobilized on hydrophobic SAM electrodes was followed by CV experiments at 60 °C under H_2. Fig. 7C shows the evolution of the MET current for low *Aa* Hase concentrations diluted in 0.1×CMC DDM and adsorbed on C_3CH_3 SAM layer. In comparison with the adsorption isotherm obtained before DDM addition (Fig. 7A) the MET current shows an increase for *Aa* Hase concentrations below 400 nM. In Fig. 7C, a dotted line has been drawn which represents *Aa* Hase concentration where DDM exists under the CMC upon Hase dilution in pure HEPES buffer. Clearly, addition of exogenous DDM is necessary below the CMC value in order to recover enzymatic activity. Enzyme conformation or presence of DDM on the SAM layer can be taken into account to explain the increase in catalytic activity. Exogenous DDM/*Aa* Hase competitive adsorption on the SAM has been thus followed by PM-IRRAS. Deuterated DDM has been added in *Aa* Hase solutions in the same experimental conditions as used in electrochemistry. The absence of the bands characteristic of deuterated DDM and the occurrence of an unmodified amide I band for the adsorption of *Aa* Hase which has been incubated with DDM demonstrate that exogenous DDM is not present at the SAM layer and do not displace the hydrogenase molecules (data not shown). Thus, exogenous DDM does not take part to a specific orientation of *Aa* Hase molecules at the surface of the SAM layer. The increase in H_2 efficiency at low enzyme concentration in the presence of added DDM can rather be explained by taking into account enzyme reversible aggregation. This type of aggregation might be due to native protein monomers that self-associate to form reversible, but catalytically inefficient oligomers [48]. This mechanism is expected to be favoured in solutions where DDM concentration is lower than its CMC.

Free DDM at a concentration beyond CMC, as in the case of the experiments with PG electrode, or for the SAMs with *Aa* Hase concentrations superior to 400 nM, prevents enzyme aggregation. But it is understandable that the coating of a mixed solution of DDM and *Aa* Hase on the PG electrode decreases the amount of available *Aa* Hase, then decreases the current density.

3.5. H_2 oxidation by low DDM-content Aa Hase immobilized onto electrodes (batch B)

Adsorption isotherms were constructed on PG electrodes based on the measurement of the catalytic current at 60 °C under H_2 atmosphere upon adsorption of increasing concentrations of batch B. For that purpose, a freshly prepared *Aa* Hase was used. Kinetics of batch B adsorption on PG electrode was first investigated. Saturation occurred within 30 s with no variation in the catalytic current for longer durations up to 1 h. Fig. 8A shows the evolution of the DET current as a function of *Aa* Hase concentration. A typical Frumkin isotherm is obtained that reaches saturation above 1 μM. High current densities (around 100 μA cm^{-2}) are reached despite the low DDM content of batch B.

For comparison with the adsorption isotherm recorded with batch A, 0.1×CMC of DDM in HEPES was used in a second experiment as buffer for batch B dilution. The effect of exogenous DDM on H_2 oxidation by *Aa* Hase immobilized on PG electrode was followed again by CV experiments at 60 °C under H_2. Only weak differences in the isotherm profiles can be observed in comparison with the adsorption isotherm obtained before DDM addition (Fig. 8A). This is not unexpected considering that batch B contains DDM at a concentration far below the CMC (<0.4×CMC) in the whole *Aa* Hase concentration range we studied. DDM concentration

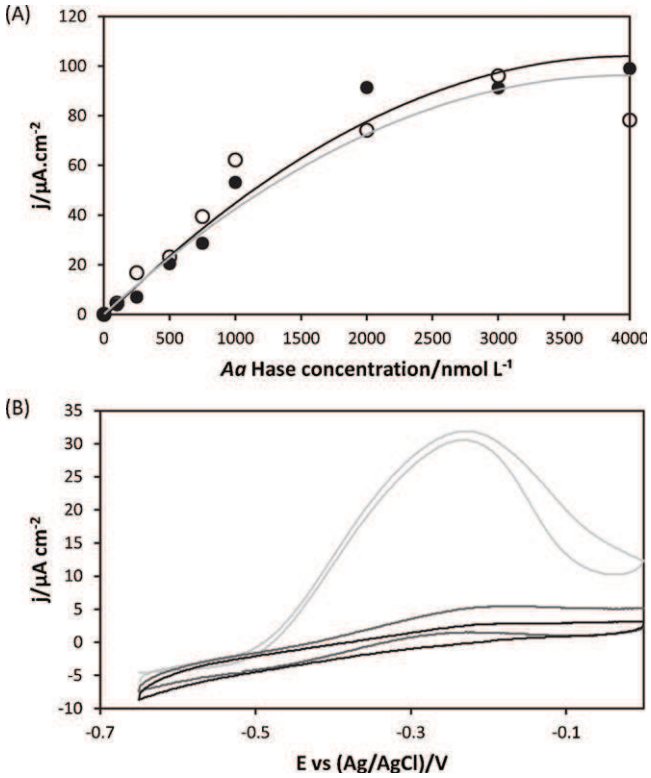


Fig. 8. H_2 oxidation by *Aa* Hase from batch B. (A) Evolution of the DET current density for H_2 oxidation at the PG electrode as a function of freshly prepared *Aa* Hase concentration (●), and after incubation of freshly prepared *Aa* Hase in the presence of exogenous 0.1×CMC of DDM (○); (B) CV for H_2 oxidation by non-freshly prepared *Aa* Hase immobilized at the bare (light grey), 20×CMC of DDM-coated (dark grey) and 50×CMC of DDM-coated (black) membrane PG electrode. CV recorded at 5 mV s^{-1} in 50 mM HEPES buffer pH 6.8 at 60 °C under H_2 atm.

was also varied for 2 μM *Aa* Hase in the range 0.1–2×CMC. Again and more surprisingly, no variation in the catalytic current can be observed. Two main conclusions can be drawn from these experiments. Freshly prepared *Aa* Hase is highly efficient towards H_2 oxidation even if DDM is present under the CMC. This suggests that the trans-membrane helix is protected by DDM, even at low DDM concentration in the enzyme solution. Second, it must be concluded that hydrogenase (already surrounded with small quantities of DDM) has much more affinity towards PG surface than free DDM, either as monomers (when added below the CMC) or as micelles (when added beyond the CMC).

The DDM depletion has however a strong effect on *Aa* Hase stability. In particular, it was demonstrated in this work, that enzyme stability in time and against temperature stresses (freezing, thawing steps for example) was greatly increased by the addition of small amount of DDM. This was revealed by the evolution of the enzymatic activity for H_2 oxidation both using electrochemistry and spectrophotometry. As an example, the addition of only 0.1×CMC of DDM in batch B allows a stable enzymatic activity within 2 days. In the same duration, batch B without exogenous DDM lost 25% efficiency towards H_2 oxidation. This effect is not specific to PG electrode. Indeed, immobilization of a non-freshly prepared batch B on hydrophobic SAM electrode showed a 35% increase in the MET current after incubation of *Aa* Hase with 0.1×CMC DDM. These results strongly suggest that in case of depletion of DDM, *Aa* Hase can aggregate in a non efficient conformation for H_2 electrocatalytic oxidation. Interestingly the aggregation process is reversible, and low amount of DDM are sufficient to enhance the amount of available active *Aa* Hase.

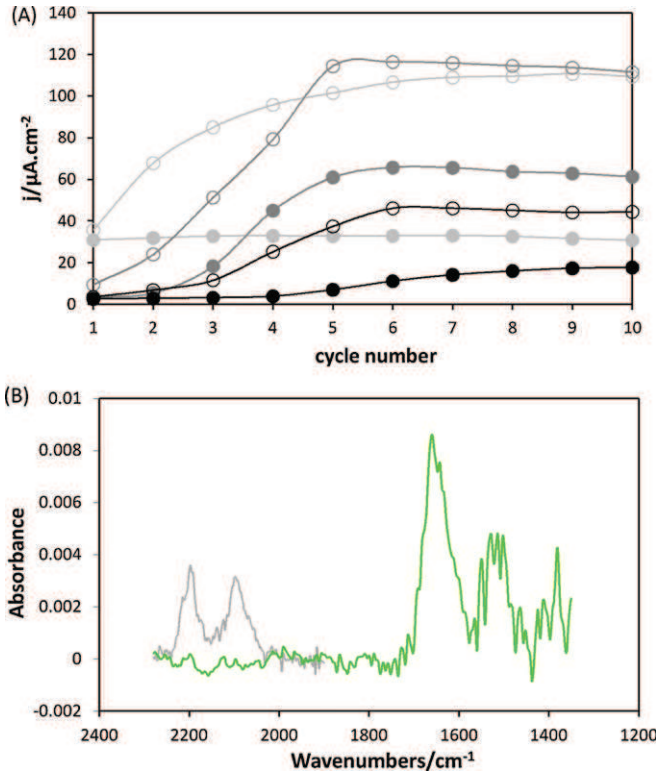


Fig. 9. (A) Catalytic current density as a function of the cycle number at the PG membrane electrode for non-freshly prepared *Aa* Hase from batch B before (plain symbols) and after 10 µM MB addition (empty symbols) at the bare (light grey), 20×CMC of DDM-coated (dark grey), 50×CMC of DDM-coated (black) membrane PG electrode. CV recorded at 5 mV s^{-1} in 50 mM HEPES buffer pH 6.8 at 60 °C under H_2 atm; (B) PM-IRRAS spectra recorded after immersion in *Aa* Hase solution of the gold mirrors analyzed in (Fig. 4). All the spectra were recorded at room temperature (for comparison PM-IRRAS spectrum for deuterated DDM as in Fig. 4 has been superimposed in grey).

To test the effect of higher amount of DDM on H_2 oxidation by batch B non-freshly prepared *Aa* Hase, the PG electrode was coated with DDM and placed in *Aa* Hase solution for adsorption. Various DDM concentrations in the range 0.1–50×CMC were explored. A dialysis membrane was fitted around the electrode body so that DDM eventually leached from the electrode could stay in its vicinity. Fig. 8B compares the electrocatalytic signal for H_2 oxidation by *Aa* Hase which is adsorbed onto the bare and high concentration-DDM coated membrane PG electrodes. First, the catalytic current obtained at the bare PG electrode is twice less than obtained using the freshly prepared *Aa* Hase, confirming the weak stability with time of batch B. Second, a dramatic decrease in the direct catalytic current as a function of the concentration of DDM is observed. No DET signal can be observed with DDM concentration beyond 20×CMC. The question is whether this decrease is related to a passive DDM layer or to orientation of *Aa* Hase on the DDM coating so that the distal FeS cluster would be rejected far from the electrode interface. To address this question, MB was added into the solution. Surprisingly, a mixed (DET + MET) process was progressively recovered, very much like the signal obtained with no DDM layer (data not shown).

It was thus suspected that some adsorption competition between free DDM, *Aa* Hase and MB could occur at the electrochemical interface. H_2 oxidation by *Aa* Hase adsorbed on the PG electrode coated with high DDM concentration was thus recorded using continuous voltametric cycling. In Fig. 9A is gathered the comparative evolution of the catalytic current densities at the bare, 20×CMC of DDM-coated and 50×CMC of DDM-coated PG electrodes before and after MB addition in solution.

As can be seen, when *Aa* Hase is adsorbed onto the bare PG electrode the current is stable over ten cycles, *i.e.* around 45 min. Using DDM-coated PG electrodes, the catalytic current increases after 2 cycles and 4 cycles for the 20×CMC and 50×CMC coatings, respectively. The coating made with 50×CMC of DDM does not allow to recover the current obtained at the bare PG electrode, probably because of a partial passivation of the electrode. 20×CMC of DDM coating yields an interesting phenomenon, however. In addition to the continuous increase of the current with time, a higher current density than recorded at the bare PG electrode is reached, which compares with that obtained using a freshly prepared *Aa* Hase (see Fig. 8A).

PM-IRRAS was used to evaluate *Aa* Hase adsorption on the electrode in the presence of high DDM concentration already present at the interface (Fig. 9B). A SAM electrode previously incubated in 5×CMC of DDM and further exposed to *Aa* Hase solution, clearly shows the occurrence of the amide I and amide II bands, fingerprints of *Aa* Hase, as already described before [1]. Interestingly, Fig. 9B clearly highlights the concomitant decrease of the two bands at 2180 and 2100 cm^{-1} previously assigned to deuterated DDM (see Fig. 4). Similar PM-IRRAS spectra were recorded for both C_3CH and C_7CH_3 hydrophobic surfaces.

Hydrophobic SAM and PG surfaces present a different hydrophobicity, so that the conclusion is not straight forward. But the experimental data strongly suggest that *Aa* Hase has a great affinity for the electrochemical interface, and is able to remove exogenous DDM from the interface. Consequently, some DDM molecules can interact with aggregated DDM depleted *Aa* Hase in the vicinity of the PG membrane electrode, enhancing the amount of available *Aa* Hase for H_2 oxidation, as seen in Fig. 9A for the 20×CMC of DDM-coating. Furthermore, we have shown in this work that MB diffusion to the interface is not affected by the DDM layer, because MB is a charged lipophilic molecule. We have also demonstrated that dyes such as MB are strongly adsorbed onto PG electrodes [18]. As can be seen in Fig. 9A, the intricate interaction between DDM, *Aa* Hase, MB and the PG surface, leads to an increase in the current recovery kinetics in the presence of MB. We thus propose, that in addition to *Aa* Hase molecules that are able to remove some DDM molecules from the surface, MB molecules diffuse through the DDM layer, adsorb onto the PG surface, then also remove DDM molecules from the surface and allow supplemental direct and mediated *Aa* Hase connection.

4. Conclusions

We have investigated the immobilization of the membrane-bound [NiFe] hydrogenase from the hyperthermophilic bacterium *A. aeolicus* on pyrolytic graphite electrodes and alkanethiol SAM gold electrodes. Although both electrodes present a hydrophobic surface, microporosity of the PG electrode against the smooth surface of the SAM yields different processes for H_2 oxidation after *Aa* Hase adsorption. A mixed (DET + MET) catalytic current is obtained at the PG electrode while MET current is favoured at the hydrophobic SAM electrode, driven by the DDM-surrounded transmembrane helix. The quantification of the amount of detergent in pure *Aa* Hase reveals great amount of DDM which is likely to be present as free micelles in enzyme solution. This study highlights for the first time the role of detergent in the electrocatalytic process, which is most often under estimated. It is shown that detergent is necessary in order to stabilize the enzyme, avoid enzyme reversible aggregation and retain the catalytic efficiency. DDM layer alone on the electrode is however not able to orient *Aa* Hase for an efficient electron transfer process. Also the coating on the electrode of a mixed solution of *Aa* Hase and DDM, yields a decrease in enzymatic efficiency, probably because of electrode passivation. But, except in

the presence of amounts of DDM far above the CMC, it is demonstrated coupling PM-IRRAS and electrochemistry that *Aa* Hase has much more affinity than free DDM for the electrode. The protein preferentially adsorbs onto electrode and is even able to remove some pre-adsorbed DDM molecules. Consequently, the catalytic activity is not affected by the DDM amount, providing a quantity around the CMC value is present in protein solution to prevent enzyme aggregation and protect the hydrophobic trans-membrane helix. Further optimization of the bioelectrode is forthcoming, by taking benefit of the detergent-surrounded helix for stabilization of the enzyme on modified electrodes.

Acknowledgements

The authors thank Drs. M. Guiral and M. Ilbert (BIP, Marseilles, France) for fruitful discussions, M. Bauzan (Fermentation Plant Unit IMM, Marseilles, France) for growing the bacteria, J. Dentzer (IS2M, Mulhouse, France) for graphite characterization, Région Provence-Alpes-Côte d'Azur, Programme Interdisciplinaire Energie CNRS and ANR Bioénergie for financial support.

References

[1] A. Ciaccafava, P. Infossi, M. Ilbert, M. Guiral, S. Lecomte, M.T. Giudici-Orticoni, E. Lojou, Angew. Chem. Int. Ed. 51 (2012) 953, doi:10.1002/anie.201107053.
[2] E. Lojou, Electrochim. Acta 56 (2011) 10385.
[3] T. Nöll, G. Nöll, Chem. Soc. Rev. 40 (2011) 3564.
[4] M. Frasconi, F. Mazzei, T. Ferri, Anal. Bioanal. Chem. 398 (2010) 1545.
[5] J.A. Cracknell, K.A. Vincent, F.A. Armstrong, Chem. Rev. 108 (2008) 2439.
[6] E. Lojou, P. Bianco, J. Electroceram. 16 (2006) 79.
[7] R. Ludwig, W. Harreither, F. Tasca, L. Gorton, Chem. Phys. Chem. 11 (2010) 2674.
[8] B. Friedrich, J. Fritsch, O. Lenz, Curr. Opin. Biotechnol. 22 (2011) 358.
[9] P.D. Tran, V. Artero, M. Fontecave, Energy Env. Sci. 3 (2010) 727.
[10] A. Wait, A. Parkin, G. Morley, L. dos Santos, F. Armstrong, J. Phys. Chem. C 114 (2010) 12003.
[11] T. Woolerton, K.A. Vincent, Electrochim. Acta 554 (2009) 5011.
[12] A. Karyakin, S. Morozov, O. Voronin, N. Zorin, E. Karyakina, V. Fateyev, S. Cosnier, Angew. Chem. Int. Ed. 46 (2007) 7244.
[13] P.M. Vignais, B. Billoud, J. Meyer, FEMS Microbiol. Rev. 25 (2001) 455.
[14] M. Guiral-Brugna, P. Tron, W. Nitschke, K. Stetter, B. Burlat, B. Guigliarelli, M. Bruschi, M.T. Giudici-Orticoni, Extremophiles 7 (2003) 145.
[15] X.J. Luo, M. Brugna, P. Infossi, M.T. Giudici-Orticoni, E. Lojou, J. Biol. Inorg. Chem. 14 (2009) 1275.
[16] M. Pandelia, V. Fourmond, P. Tron, E. Lojou, P. Bertrand, C. Léger, M.T. Giudici-Orticoni, W. Lubitz, J. Am. Chem. Soc. 132 (2010) 6991.
[17] A. Ciaccafava, M. Alberola, S. Hameury, P. Infossi, M.T. Giudici-Orticoni, E. Lojou, Electrochim. Acta 56 (2011) 3359.
[18] A. Ciaccavafa, P. Infossi, M.T. Giudici-Orticoni, E. Lojou, Langmuir 26 (2010) 18534.
[19] M. Pandelia, W. Nitschke, P. Infossi, M.T. Giudici-Orticoni, E. Bill, W. Lubitz, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 108 (2011) 6097.
[20] Y. Shomura, K.-S. Yoon, H. Nishihara, Y. Higuchi, Nature 479 (2011) 253.
[21] S.A. Weiss, R.J. Bushby, S.D. Evans, P.J. Henderson, L.J. Jeuken, Biochem. J. 417 (2009) 555.
[22] D. Svhach, Ch. Nowak, R.B. Gennis, Sh. Ferguson-Miller, W. Knoll, D. Walz, R.L.C. Naumann, J. Electroanal. Chem. 649 (2010) 268.
[23] C. Gutierrez-Sanchez, D. Olea, M. Marques, V.M. Fernandez, I.A. Pereira, M. Velez, A.L. De Lacey, Langmuir 27 (2011) 6449.
[24] A.F. Nassar, Z. Zhang, V. Chynwat, H. Frank, J.F. Rusling, K. Suga, J. Phys. Chem. 99 (1995) 11013.
[25] C.-Y. Lee, A.M. Bond, Langmuir 26 (2010) 5243.
[26] J. Rajbongshi, D. Kumar Das, S. Mazumbar, Electrochim. Acta 55 (2010) 4174.
[27] K. Chattopadhyay, S. Mazumdar, Bioelectrochemistry 53 (2000) 17.
[28] D. Mukherjee, M. May, B. Khomami, J. Colloid Interface Sci. 358 (2011) 477.
[29] P. Infossi, E. Lojou, J.P. Chauvin, G. Herbette, M. Brugna, M.T. Giudici-Orticoni, Int. J. Hydrogen Energy 35 (2010) 10778.
[30] M. Correira dos Santos, P. Paes de Sousa, M. Simoes Goncalves, L. Krippahl, J. Moura, E. Lojou, P. Bianco, J. Electroanal. Chem. 541 (2003) 153.
[31] E. Lojou, P. Bianco, Electroanalysis 16 (2004) 1113.
[32] J.C. Rietsch, J. Dentzer, A. Dufour, F. Schnell, L. Vidal, P. Jacquemard, R. Gadiou, C. Vix-Guterl, Carbon 47 (2009) 85.
[33] S. Frielingsdorf, T. Schubert, A. Pohlmann, O. Lenz, B. Friedrich, Biochemistry 50 (2011) 10836.
[34] C. Blanford, F. Armstrong, J. Solid State Electrochem. 10 (2006) 826.
[35] C.M. Pradier, Y.J. Chabal, Biointerface Characterization by Advanced IR Spectroscopy, Elvesier Ed., 2011.
[36] M.D. Porter, T.B. Bright, D.L. Allara, C.E.D. Chidsey, J. Am. Chem. Soc. 109 (1987) 3559.
[37] F. Ceccet, M. Marcaccio, M. Margotti, F. Paolucci, S.S. Rapino, P. Rudolf, J. Phys. Chem. B 110 (2006) 2241.
[38] S. Choi, J. Chae, Microfluid. Nanofluid. 7 (2009) 819.
[39] O. Rüdiger, C. Gutierrez-Sanchez, D. Olea, I. Pereira, M. Velez, V. Fernandez, A. DeLacey, Electroanalysis 22 (2010) 776.
[40] Q. Chi, J. Zhang, J. Andersen, J. Ulstrup, J. Phys. Chem. B 105 (2001) 4669.
[41] M. Anderson, R. Baltzersen, J. Colloid Interface Sci. 263 (2003) 516.
[42] D. Grumelli, L.P. Mendez De Leo, C. Bonazzola, V. Zamlynny, E.J. Calvo, R. Salvarezza, Langmuir 26 (2010) 8226.
[43] J. Gorham, B. Smith, D.H. Fairbrother, J. Phys. Chem. C 111 (2007) 374.
[44] H. Oskarsson, K. Holmberg, J. Colloid Interface Sci. 301 (2006) 360.
[45] L. Grant, F. Tiberg, W. Ducker, J. Phys. Chem. B 102 (1998) 4288.
[46] N.G. Tognalli, A. Fainstein, C. Vericat, M.E. Vela, R.C. Salvarezza, J. Phys. Chem. B 110 (2006) 354.
[47] G. Benitez, C. Vericat, S. Tanco, F. Remes Lenicov, M. Castez, M. Vela, R. Salvarezza, Langmuir 20 (2004) 5030.
[48] J. Philo, T. Arakawa, Curr. Pharmaceut. Biotechnol. 10 (2009) 348.

An outstanding bioanode for an innovative powerful and mediatorless H_2/O_2 biofuel cell

A. Ciaccafava, A. De Poulpiquet, V. Techer, M.T. Giudici-Orticoni, S. Tingry, C. Innocent, E. Lojou

Electrochemistry communications, 23 (2012) 25-28

Electrochemistry Communications 23 (2012) 25–28

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Electrochemistry Communications

journal homepage: www.elsevier.com/locate/elecom

An innovative powerful and mediatorless H_2/O_2 biofuel cell based on an outstanding bioanode

A. Ciaccafava [a], A. De Poulpiquet [a], V. Techer [b], M.T. Giudici-Orticoni [a], S. Tingry [b], C. Innocent [b], E. Lojou [a,*]

[a] Unité de Bioénergétique et Ingénierie des Protéines, Institut de Microbiologie de la Méditerranée, AMU, CNRS, 31 Chemin Joseph Aiguier, 13402 Marseille Cedex 20, France
[b] Institut Européen des Membranes, UMR 5635 (CNRS-ENSCM-UM2), Université Montpellier 2, Place E. Bataillon, F-34095, Montpellier, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 25 May 2012
Received in revised form 12 June 2012
Accepted 26 June 2012
Available online 4 July 2012

Keywords:
Hydrogenase
Enzymatic biofuel cell
Hydrogen
Carbon nanotube
Bilirubin oxidase
Direct electron transfer

ABSTRACT

A H_2/O_2 biofuel cell based on a hyperthermophilic O_2-tolerant hydrogenase and bilirubin oxidase was designed by one step covalent immobilization of the enzymes on functionalized carbon nanotubes. Under pure H_2 and O_2 saturated buffer solutions and no redox mediator, the biofuel cell delivers power densities up to 300 μW cm^{-2} at 0.6 V with an open circuit voltage of 1.1 V. These performances, which are demonstrated to be dependent on hydrogenase characteristics at high potentials, are the best ever obtained. Promising stability of the biofuel cell during 24 h of continuous use has been obtained, which allows considering this device as an alternative power supply for small portable applications.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Enzymatic biofuel cells are promising alternative and renewable power sources. Devices based on enzymatic glucose oxidation and oxygen reduction have been widely studied for implantable and microelectronics applications [1–6]. Biofuel cells based on hydrogen oxidation have received much less attention although meaningful for many portable applications, essentially because of the extreme oxygen sensitivity of hydrogenase, the key enzyme for H_2 oxidation. During the last years, four membrane-bound hydrogenases have been discovered from aerobic or extremophilic organisms (*Ralstonia eutropha* [7], *Escherichia coli* (*E. coli*) [8], *Hydrogenovibrio marinus* [9], *Aquifex aeolicus* (Aa) [10,11]), that belong to the [NiFe]-hydrogenase family and have been demonstrated to oxidize H_2 in the presence of oxygen. The crystallographic structure of three of them has been resolved, showing that an uncommon [4Fe–3S] cluster proximal to the active site prevents deleterious oxygen attack. Due to this outstanding property, development of H_2/O_2 biofuel cells can be now considered.

Extensive studies on the understanding of the catalytic mechanisms for H_2 oxidation by [NiFe] hydrogenases immobilized on graphite and gold electrodes have allowed the definition of the parameters that help direct electron transfer [12]. In our group, original use of a hyperthermophilic hydrogenase from Aa (mbHI) allowed the increase in the catalytic current for H_2 oxidation on a large range of temperature up to 70 °C. Attempts to enhance the number of electrically connected mbHI succeeded by the use of coatings of chemically oxidized single-walled carbon nanotubes (SWCNT) [13]. Otherwise, direct connection on carbon nanotube-modified electrode of blue copper proteins such as bilirubin oxidase for oxygen reduction is widely documented [14]. We thus can envision mbHI coupled to bilirubin oxidase in a H_2/O_2 biofuel cell where both cathode and anode are modified with carbon nanotube coatings.

Very recently, a biofuel cell device based on *E. coli* hydrogenase and fed with an 80/20 hydrogen-air gas mixture has been elaborated in F.A. Armstrong's group using pyrene-carbon nanotube coatings as electrode materials. This fuel cell exhibited around 120 μW cm^{-2} power density at room temperature [15]. Herein we describe an innovative H_2/O_2 biofuel cell based on mbHI able to operate under pure H_2 aqueous solutions at various temperatures in the anodic compartment and pure O_2 in the cathodic one. As far as we know, this biofuel cell displays the highest power density ever reported with H_2 as a fuel. The temperature effect on the power density of this biofuel cell from 25 to 80 °C is investigated. The influence of bioanode characteristics at high potentials on the performance of the device is discussed and allows to determine the regime in which it efficiently operates.

2. Experimental

2.1. Methods and instrumentation

Bilirubin oxidase (BOD) from *Myrothecium verrucaria* was a gift from Amano Enzyme Inc. (Nagoya, Japan) and mbHI was purified as described in [13]. Electrochemical experiments were performed using an Autolab PGSTAT 128N. The pyrolytic graphite electrode (PG)

* Corresponding author. Tel.: +33 491164524.
E-mail address: lojou@imm.cnrs.fr (E. Lojou).

1388-2481/$ – see front matter © 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.
doi:10.1016/j.elecom.2012.06.035

from Bio-logic was the working electrode. All current densities are calculated using geometrical area of the PG electrode (A = 0.07 cm^2). The biofuel cell parameters were examined in 50 mM 4-(2-Hydroxyethyl) piperazine-1-ethanesulfonic acid (Hepes) buffer, pH 6.8 under 100% H_2 and 100% O_2 for anode and cathode respectively, separated by a Nafion® membrane (Nafion® 117 from DUPONT — USA). Each half-cell was independently thermoregulated. The cell current and voltage were measured by polarization curves, after stabilization of the system. Current densities were measured at −0.25 V or +0.1 V for mbHI and BOD, respectively. Normalized current density j/j_0 was obtained by dividing the current at each time by the current at initial time. Scan rate is 3.33 mV s^{-1}.

2.2. Design of the bioelectrodes

SWCNT (from Sigma) functionalization with carboxylic groups (SWCNT–COOH) was realized as described in Lojou et al. [16] and diluted in Milli-Q water. 10 µL of SWCNT–COOH was dropped onto PG electrode until complete drying. SWCNT–COOH modified PG electrode was dipped in a 40 mM/10 mM *N*-(3-Dimethylaminopropyl)-*N′*-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC)/*N*-Hydroxysuccinimide (NHS) solution, for one hour. Then 8 µL of mbHI 5 µM or BOD 20 µM was deposited on it and left to dry under N_2 stream on the bench for covalent attachment.

3. Results and discussion

3.1. Covalent binding of the enzymes on SWCNT–COOH coated PG electrodes

The advantage of carbon nanotube coating on H_2 oxidation by mbHI was reported before [13]. In this work we took benefit of the carboxylic functions carried by the nanotubes, and of the knowledge that mbHI and BOD can achieve direct electron transfer on negatively charged electrodes. Covalent attachment of the enzymes was thus performed to prevent instability of the system.

Polarization curves of the bioanode at 60 °C under 100% H_2 and biocathode at 25 °C under 100% O_2 were compared with and without SWCNT–COOH coatings (Fig. 1A). In all cases catalytic currents were obtained in the absence of any redox mediator, although very weak in the case of BOD on bare PG. H_2 enzymatic oxidation current exhibits a classical decrease at potentials higher than −200 mV, due to the formation of an inactive but reversible state of the [NiFe] mbHI active site [10]. As expected, great enhancement of anodic and cathodic currents was obtained on SWCNT–COOH coatings, leading to at least 35 and 300 fold increase for mbHI and BOD, respectively. Denaturating SDS-PAGE gels were used to assess the optimal concentration of the EDC/NHS linker from 4/1 mM, 40/10 mM to 400/100 mM. The appropriate EDC/NHS concentration that avoids enzyme aggregation, i.e. 40/10 mM, yields great stabilization of the catalytic currents. The loss drops dramatically from 25% and 60% for BOD and mbHI respectively, to less than 10%.

3.2. Temperature effect

MbHI is a hyperthermophilic hydrogenase with an optimal activity at a temperature of 85 °C. The current density delivered by the biofuel cell at a potential of 0.65 V was followed as a function of the temperature, which was independently controlled in the anodic and cathodic compartments (Fig. 1B). The cell current density follows an expected evolution with temperature up to 60 °C/40 °C values. A decrease in the current density value and in the stability of the current with time is recorded for higher temperatures. MbHI has been shown to be stable at high temperature when immobilized on carbon nanotube layers [13] and able to resist to various temperature stresses. As expected for a mesophilic enzyme, BOD was shown in this work to lose half of its activity above 50 °C, being responsible for the

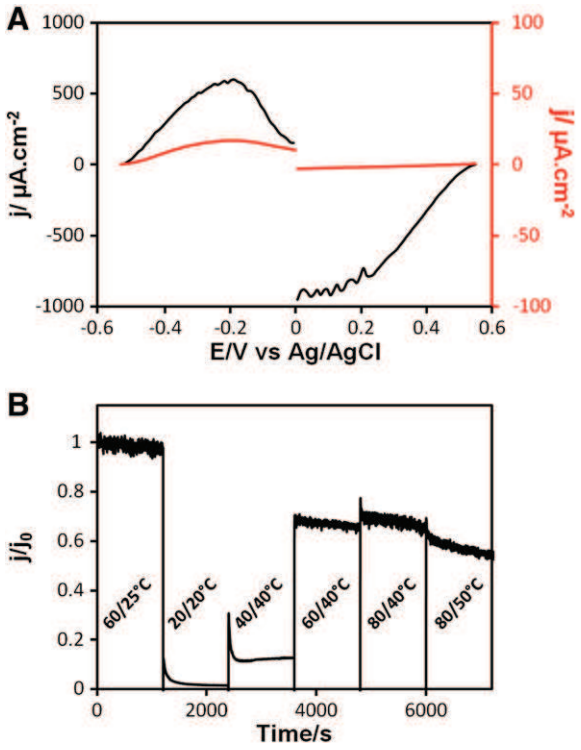


Fig. 1. (A) Polarization curves for SWCNT–COOH modified (black lines) *vs* bare PG (red lines) bioanode and biocathode. (B) Chronoamperometry at 0.65 V of the biofuel cell as a function of temperature in each half cell (T_a/T_c). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

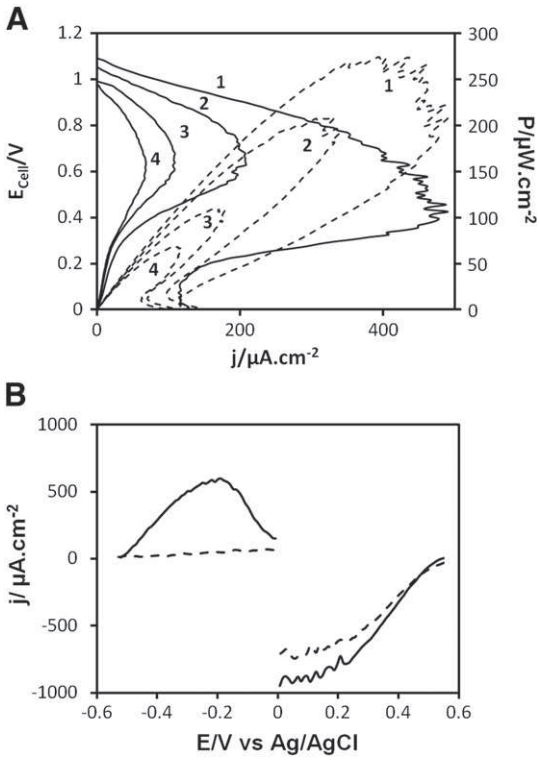


Fig. 2. (A) Evolution of four consecutive cell power measurements (dashed lines) obtained from polarization curves (black lines). (B) Polarization curves for SWCNT–COOH modified PG bioanode and biocathode after the first (black lines) and the fourth (dashed lines) power cell measurement. Temperatures of the anodic and cathodic compartments are 60 and 25 °C, respectively.

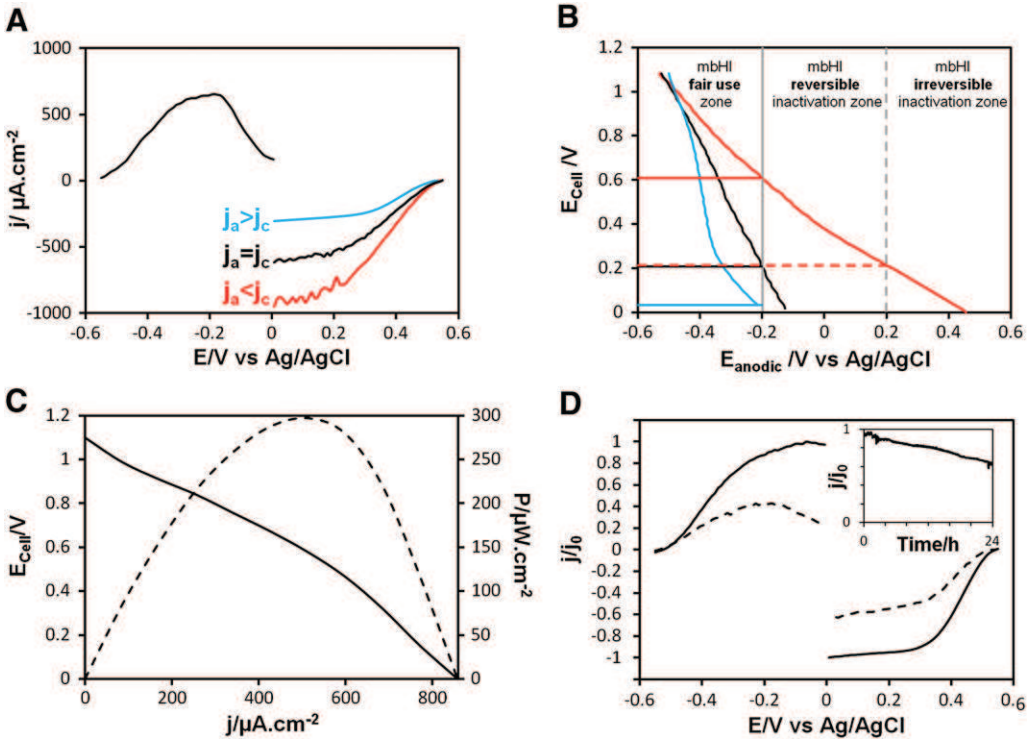


Fig. 3. (A) Polarization curves for SWCNT–COOH modified PG bioanodes and biocathodes obtained in three configurations: $j_a > j_c$ (blue curve, [BOD] = 2 µM), $j_a = j_c$ (black curve, [BOD] = 20 µM), and $j_a < j_c$ (red curve, [BOD] = 100 µM). (B) Cell potential dependence with anodic potential as a function of j_a/j_c ratio. (C) Biofuel cell potential (black line) and power density (dashed line) *vs* current density in the case of an equilibrated system ($j_a = j_c$). (D) Polarization curves before (black lines) and after (dashed lines) 24 h of continuous chronoamperometry at 0.65 V (inset). Temperatures of the anodic and cathodic compartments are 60 and 25 °C, respectively.

decrease in cell current density at high temperature in the cathodic compartment.

3.3. Influence of the bioanode characteristics on the biofuel cell performance

The performance of the H_2/O_2 biofuel cell corresponding to Fig. 1A is reported in Fig. 2A. The initial open circuit voltage (OCV) is 1.1 V. Power density reaches a maximum value of 270 µW cm^{-2} at 0.6 V. But cell potential and power density display an uncommon evolution versus current density. Furthermore, a marked decrease in maximum power density upon repetitive polarization sequences is observed. Concomitantly the original OCV of the fuel cell was not restored (classically it decreased to 0.96 V) even after applying a negative potential, known to favor hydrogenase reactivation [15]. Polarization curves of each half cell reveal that mbHI is no longer efficient for H_2 oxidation, whereas BOD still reduces O_2 with high current densities (Fig. 2B). These features were similar with the findings by Armstrong et al. who demonstrated that in the presence of O_2 excess in the biofuel cell, *E. coli* hydrogenase ready state was not reactivated [17]. In our case however, all experiments are realized under 100% H_2 in the anodic compartment. MbHI is known to be reversibly inhibited at potentials higher than −200 mV [10], but we also previously pointed out that irreversible inactivation of mbHI occurred at potentials higher than +200 mV [18]. The uncommon evolution of cell potential and power density can be thus related to hydrogenase behavior upon cell polarization, in case of anodic limitation. To assess this hypothesis, BOD concentration at the biocathode was changed, so that the ratio between the anodic (j_a) and cathodic (j_c) currents can be tuned. Fig. 3A shows three different typical configurations in which the anodic current is either less, equal or superior to the cathodic ones. For each case, the cell potential has been reported as a function of the anodic potential (Fig. 3B). Clearly, when the anode limits the cell performance ($j_a < j_c$), the anode potential reaches values up to +400 mV, for which mbHI irreversible inactivation occurs. Conversely, when either cathode is limiting ($j_a > j_c$), or the full system is equilibrated ($j_a = j_c$), then the anode potential keeps values under −0.1 V. In those cases OCV at 1.1 V is fully restored within less than one minute after consecutive polarization scans. A potential zone can thus be defined for operating the H_2/O_2 biofuel cell taking into account the potential at which mbHI is reversibly inhibited ($E_{anode} > -200$ mV) and the potential at which it is irreversibly inactivated ($E_{anode} > +200$ mV). Actually, when $j_a = j_c$, the cell potential and power density display a typical evolution with current density. The power density takes a maximum value of 300 µW cm^{-2} at 0.6 V (Fig. 3C), far above the cell with no SWCNT, and the SWCNT device with no enzyme (1 and 2 µW cm^{-2}, respectively). This biofuel cell exhibits more than 60% of the initial current density after 24 h of continuous measurement at 0.65 V (Fig. 3D).

4. Conclusion

In this work, an innovative H_2/O_2 biofuel cell based on a hyperthermophilic O_2-tolerant hydrogenase and bilirubin oxidase is electrochemically characterized. The one-step grafting of the enzymes on the carboxylic-functionalized carbon nanotubes allows enhanced stability of the bioelectrodes and high mediatorless current densities. We demonstrate that the limitation of our H_2/O_2 biofuel cell performance is influenced by the anodic potential. We define a zone independent of the relative electrode performance in which the biofuel cell can run at its highest power density. Consequently, the power density delivered in the fair use zone (300 µW cm^{-2} at 0.6 V with an OCV of 1.1 V) is the best result reported until now with biofuel cell supplied with gas saturated solutions, and represents a promising alternative to fuel cells for small portable applications.

Acknowledgments

The authors thank P. Infossi, Drs M. Guiral, and M. Ilbert (BIP, Marseilles, France) for the fruitful discussions, M. Bauzan (IMM, Marseilles, France) for growing the bacteria, and Région Provence-Alpes-Côte d'Azur, Programme Interdisciplinaire Energie CNRS and ANR Bioénergie for the financial support.

References

[1] A. Zebda, C. Gondran, A. Le Goff, M. Holzinger, P. Cinquin, S. Cosnier, Nature Communications 2 (2011) 270.
[2] E. Nazaruk, M. Karaskiewicz, K. Zelechowska, J.F. Biernat, J. Rogalski, R. Bilewicz, Electrochemistry Communications 14 (2012) 67.
[3] F. Durand, C.H. Kjaergaard, E. Suraniti, S. Gounel, R.G. Hadt, E.I. Solomon, N. Mano, Biosensors and Bioelectronics 35 (2012) 140.
[4] A. Zebda, L. Renaud, M. Cretin, C. Innocent, R. Ferrigno, S. Tingry, Sensors and Actuators B: Chemical 149 (2010) 44.
[5] M. Zafar, N. Beden, D. Leech, C. Sygmund, R. Ludwig, L. Gorton, Analytical and Bioanalytical Chemistry 402 (2012) 2069.
[6] S.D. Minteer, B.Y. Liaw, M.J. Cooney, Current Opinion in Biotechnology 18 (2007) 228.
[7] J. Fritsch, P. Scheerer, S. Frielingsdorf, S. Kroschinsky, B. Friedrich, O. Lenz, C.M.T. Spahn, Nature 479 (2011) 249.
[8] A. Volbeda, P. Amara, C. Darnault, J.-M. Mouesca, A. Parkin, M.M. Roessler, F.A. Armstrong, J.C. Fontecilla-Camps, Proceedings of the National Academy of Sciences 10 (2012) 5305.
[9] Y. Shomura, K.-S. Yoon, H. Nishihara, Y. Higuchi, Nature 479 (2011) 253.
[10] M. Pandelia, V. Fourmond, P. Tron, E. Lojou, P. Bertrand, C. Léger, M.T. Giudici-Orticoni, W. Lubitz, Journal of the American Chemical Society 132 (2010) 6991.
[11] A. Ciaccafava, P. Infossi, M. Ilbert, M. Guiral, S. Lecomte, M.T. Giudici-Orticoni, E. Lojou, Angewandte Chemie International Edition 51 (2012) 953.
[12] E. Lojou, Electrochimica Acta 56 (2011) 10385.
[13] X.J. Luo, M. Brugna, P. Infossi, M.T. Giudici-Orticoni, E. Lojou, Journal of Biological Inorganic Chemistry 14 (2009) 1275.
[14] C. Lau, E.R. Adkins, R.P. Ramasamy, H.R. Lukarift, G.R. Johnson, P. Atanassov, Advanced Energy Materials 2 (2012) 162.
[15] S. Krishnan, F.A. Armstrong, Chemical Science 3 (2012) 1015.
[16] E. Lojou, X.J. Luo, N. Candoni, M. Brugna, S. Dementin, M.T. Giudici-Orticoni, Journal of Biological Inorganic Chemistry 13 (2008) 1157–1167.
[17] A.F. Wait, A. Parkin, G.M. Morley, L. Dos Santos, F.A. Armstrong, Journal of Physical Chemistry C 114 (2010) 12003.
[18] A. Ciaccavafa, P. Infossi, M.T. Giudici-Orticoni, E. Lojou, Langmuir 26 (2010) 18534.

Curriculum vitae

PUBLICATIONS

1. Langmuir, 26 (2010) 18534-18541
A. Ciaccafava, P. Infossi, MT. Giudici-Orticoni, E. Lojou
Stabilization role of a phenothiazine derivative on the electrocatalytic oxidation of hydrogen via Aquifex aeolicus *hydrogenase at graphite membrane electrodes*

2. Electrochim. Acta, 56 (2011) 3359-3368
A. Ciaccafava, M. Alberola, S. Hameury, P. Infossi, M.T. Giudici-Orticoni, E. Lojou
Hydrogen bioelectrooxidation in ionic liquids: from cytochrome c_3 redox behavior to hydrogenase activity

3. Acta Crystallographica Section F-Structural Biology an Crystallization Communications, 67 (2011) 922-925
A. Ciaccafava, A. Lartigue, P. Mansuelle, S. Jeudy, C. Abergel
Preliminary crystallographic analysis of a possible transcription factor encoded by the mimivirus L544 gene

4. Angew. Chem. Int. Ed., 51(2012)953-956
A. Ciaccafava, P. Infossi, M. Ilbert, M. Guiral, S. Lecomte, MT. Giudici-Orticoni, E. Lojou
Electrochemistry, AFM and PM-IRRAS spectroscopy of immobilized hydrogenase: role of a trans-membrane helix on enzyme orientation for efficient H_2 oxidation

5. Electrochemistry communications, 23 (2012) 25-28
A. Ciaccafava, A. De Poulpiquet, V. Techer, M.T. Giudici-Orticoni, S. Tingry, C. Innocent, E. Lojou
An outstanding bioanode for an innovative powerful and mediatorless H_2/O_2 biofuel cell

6. Electrochimica Acta, 82 (2012) 115-125
A. Ciaccafava, A. De Poulpiquet, P. Infossi, S. Robert, R. Gadiou, M.T. Giudici-Orticoni, S. Lecomte, E. Lojou
A friendly detergent for H_2 oxidation by Aquifex aeolicus membrane-bound hydrogenase immobilized on graphite and SAM-modified gold electrodes

7. Adv. Microbial. Physiol., 61 (2012) 125-194
M. Guiral, L. Prunetti, C. Aussignargues, **A. Ciaccafava**, P. Infossi, M. Ilbert, E. Lojou, M.T. Giudici-Orticoni
The hyperthermophilic bacterium Aquifex aeolicus: from respiratory pathways to extremely resistant enzymes and biotechnological applications

8. Electroanalysis, (2012) accepté
A. De Poulpiquet, **A. Ciaccafava**, K. Szot, B. Pillain, P. Infossi, M. Guiral, M. Opallo, MT. Giudici-Orticoni, E. Lojou
Exploring properties of an hyperthermophilic membrane-bound hydrogenase at carbon nanotube modified electrodes for a powerful H_2/O_2 biofuel cell

9. Int. J. Hyd. Energ., (2012) soumis

K. Szot, A. De Poulpiquet, **A. Ciaccafava**, M. Jonsson-Niedziolka, J. Niedziolka-Jonsson, F. Marken, E. Lojou, M. Opallo
Carbon nanoparticulate films as effective scaffolds for mediatorless bioelectrocatalytic hydrogen oxidation

CHAPITRE DE LIVRES

1. Recent Progress in Carbon Nanotube Research / Book 1, ISBN 980-953-307-536-0, (2012), "Carbon nanotube-enzyme biohybrids in a green hydrogen economy",
Anne De Poulpiquet, **Alexandre Ciaccafava**, Saïda Benomar, Marie-Thérèse Giudici-Orticoni and Elisabeth Lojou

DISTINCTIONS

- PRIX DES TECHNIQUES INNOVANTES POUR L'ENVIRONNEMENT, ADEME-POLLUTEC (2012)

COMMUNICATIONS ORALES

CONGRÈS INTERNATIONAUX

1. XXI International Symposium on Bioelectrochemistry and Bioenergetics, Cracow, Poland, 8th-12th May, (2011)
A.Ciaccafava, P. Infossi, MT. Giudici-Orticoni, E. Lojou
Role of the hydrophobic anchor on H_2 oxidation by immobilized membrane-bound hydrogenase from Aquifex aeolicus

2. 63rd Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry, Prague, Czech republic, 19-24 August (2012)
A.Ciaccafava, A. De Poulpiquet, S. Lecomte, M. Baaden, MT. Giudici-Orticoni, E. Lojou
Dye-functionalized carbon nanotube networks for efficient H_2 oxidation by an O_2- and CO-resistant membrane-bound hydrogenase

CONGRES NATIONAUX

3. GDR BioH2 , Carry-Le Rouet (France), 8-10 Novembre (2010)
A. Ciaccafava, P. Infossi, MT. Giudici-Orticoni, E. Lojou
Hydrogen bioelectrooxidation in ionic liquids: from cytochrome c_3 redox behavior to hydrogenase activity

4. BCP8, 8ème Journée Scientifique Interface Biologie-Chimie-Physique, Marseille, 5 Décembre (2011)

A. Ciaccafava, P. Infossi, M.T. Giudici-Orticoni, E. Lojou
Role of the hydrophobic anchor on H_2 Oxidation by Immobilized membrane-bound Hydrogenase from Aquifex aeolicus

COMMUNICATIONS AFFICHÉES

CONGRÈS INTERNATIONAUX

1. 4th International Meeting of the Institute of Metals in Biology in Grenoble, Villars de Lans, 25-28 septembre (2010)
A. Ciaccafava, P. Infossi, M.T. Giudici-Orticoni, E. Lojou
How to improve stable immobilization of Aquifex aeolicus hydrogenase for H_2 electrocatalytic oxidation?

CONGRES NATIONAUX

2. BCP7, 7ème Journée Scientifique Interface Biologie-Chimie-Physique, Marseille, 6 Décembre (2010)
A. Ciaccafava, P. Infossi, M.T. Giudici-Orticoni, E. Lojou
Rôle Multifonctionnel d'une matrice polymère redox pour l'oxydation de l'hydrogène par une hydrogenase hyperthermophile

Les hydrogénases sont les enzymes responsables de la conversion de l'hydrogène dans de nombreux microorganismes. De part leur efficacité et spécificité vis-à-vis de l'oxydation de l'hydrogène, elles apparaissent comme des biocatalyseurs potentiels dans des procédés type biopile à combustible. Dans cet objectif, nous avons étudié l'immobilisation fonctionnelle sur diverses électrodes de l'hydrogénase membranaire tolérante à l'oxygène extraite de la bactérie hyperthermophile *Aquifex aeolicus*.

Par une approche couplée d'électrochimie, de microscopie et de spectroscopie, il est montré que l'orientation de l'hydrogénase sur une électrode n'est pas contrôlée par des interactions électrostatiques mais hydrophobes. Ce contrôle est lié à l'environnement spécifique du cluster FeS, dernier relais électronique en surface de l'enzyme. En particulier, l'hélice trans-membranaire hydrophobe entourée de détergent est démontrée comme impliquée dans le processus d'immobilisation. Cette orientation spécifique induit la nécessité d'un médiateur redox pour l'oxydation de l'hydrogène sur une interface hydrophobe. A contrario, l'hydrogénase adopte une multitude d'orientations sur surfaces chargées. Dans ces conditions, non seulement une connexion directe efficace des enzymes est obtenue, mais aussi l'augmentation du courant global par médiation de l'oxydation de l'hydrogène.

La définition des paramètres optimaux d'immobilisation de l'hydrogénase, a permis de développer de nouvelles interfaces électrochimiques propres à l'augmentation des courants, et à la stabilisation des films protéiques. En couplant une biocathode basée sur la bilirubin oxidase pour la réduction de l'oxygène, une biopile H_2/O_2 a été construite basée à l'anode sur l'hydrogénase d'*Aquifex aeolicus*. Les paramètres limitant les performances de la biopile ont été étudiés, et ont montré une limitation anodique en potentiel, et cathodique en température. L'optimisation de ces paramètres a permis le développement de la biopile H_2/O_2 la plus performante connue à ce jour. Elle développe des densités de puissance de 300 $\mu W/cm^2$, ce qui ouvre la voie en terme d'alimentation électrique de petits appareils portables ou stationnaires.

Mots clé : Hydrogénase ; Hyperthermophile ; Orientation ; Protéine membranaire; Électrochimie ; PM-IRRAS ; Détergent ; Oxydation de l'Hydrogène; Biopile à combustible

---

Hydrogenases are the key enzymes for hydrogen conversion in many microorganisms. They present high specificity and efficiency towards hydrogen oxidations. Consequently, they appear as attracting biocatalysts in view of the development of biofuel cells. Within that goal, we have studied in this work the functional immobilization of oxygen-tolerant [NiFe] hydrogenase from the hyperthermophilic bacterium *Aquifex aeolicus*.

Using electrochemistry, microscopy and spectroscopy, including PM-IRRAS, it is demonstrated that hydrogenase orientation on electrode interface is not controlled by electrostatic interactions but by hydrophobic interactions. The control of the orientation is driven by the environment of the FeS cluster located at the surface of the enzyme, and which acts as the last electron relay. The hydrophobic trans-membrane helix which is surrounded by neutral detergent is directly involved in the immobilization process. This specific orientation on hydrophobic interface induces the need for a redox mediator in order to achieve hydrogen oxidation. Conversely, hydrogenase adopts multiple orientations on charged interfaces. As a consequence, a direct and efficient connexion of enzymes is obtained, but also the increase in oxidation current is obtained due the mediated electrocatalysis.

The determination of the best parameters for hydrogenase immobilization has allowed to develop new electrochemical interfaces, with increased current densities for hydrogen oxidation, and increased bioelectrode stability. By coupling a biocathode based on bilirubin oxidase for oxygen reduction, a H_2/O_2 biofuel cell has been built with Aquifex aeolicus hydrogenase as the bioanode. Anodic potentials and cathodic temperature have been shown to limit the performances of the biofuel cell. The optimized parameters have allowed the design of the highest performant H_2/O_2 biofuel ever obtained. It delivers power densities in the range of 300 $\mu W/cm^2$. This opens new avenue towards electrical supply for small portable or stationary devices.

Key words : Hydrogenase ; Hyperthermophile ; Orientation ; Membrane protein; Electrochemistry ; PM-IRRAS ; Detergent ; Hydrogen oxidation; Biofuel cell