



Thèse de Doctorat de l'Université de Strasbourg
Ecole doctorale des Science Chimiques
Institut de Science et d'Ingénierie Supramoléculaire

Présentée par : **Yousr skhiri**

**Plateforme microfluidique d'optimisation de biocatalyseurs
pour des biopiles à combustible**

Pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université de Strasbourg

Composition du jury

Dr. Valérie TALY	Directeur de Thèse
Dr. Michael O'DONOHUE	Rapporteur
Dr. Charles BAROUD	Rapporteur
Dr. Jean Christophe BARET	Examineur
Pr. Andrew GRIFFITHS	Examineur
Dr. Thomas GRUTTER	Examineur

21 Octobre 2011

« En automne, je récoltai toutes mes peines et les enterrai dans mon jardin. Lorsque avril refleurit et que la terre et le printemps célébrèrent leurs noces, mon jardin fut jonché de fleurs splendides et exceptionnelles »

[Khalil Gibran] - Le Sable et l'écume

Remerciements

Un grand merci à Monsieur Andrew Griffiths, Professeur des Universités, Université de Strasbourg, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire de biologie chimique (UMR-CNRS 7006), pour son soutien ainsi que pour l'honneur qu'il m'a fait en acceptant d'être membre de mon jury de thèse.

Je remercie du fond du cœur Madame Valérie Taly, Chargée de Recherche au CNRS, pour m'avoir encadré dans cette thèse et m'avoir supporté dans la dernière ligne droite. Elle s'est énormément investie dans mon travail, et j'aurais beaucoup de mal à résumer en quelques mots tout ce qu'elle m'a appris scientifiquement et humainement.

J'adresse mes remerciements les plus sincères aux membres de mon jury de thèse : Monsieur Michael O'Donohue, directeur de recherche à l'INRA de Toulouse, Monsieur Charles Baroud, maître de conférences à L'Ecole Polytechnique de Paris, Monsieur Jean Christophe Baret, chercheur et chef de groupe à l'institut Max Planck en Allemagne, Monsieur Thomas Grutter, chercheur à la faculté de pharmacie d'Illkirch pour l'honneur qu'ils m'ont fait en acceptant de juger cette thèse.

Un grand merci à mes collègues de l'équipe "Valérie" : Abdel, Malika, Raphael, Zakaria, Deniz, Btisse, chaouki, Thomas, Jean-François. Merci pour votre aide précieuse, votre sympathie et votre bonne humeur.

Je ne voudrais surtout pas oublier des gens qui me sont très chers : Yannick, Estelle, Victoire, Isabelle, Linas, Sandrine, Ali, Bachir, Alex, Lucia, Jennifer et Diana.

Merci à tous les masters, thésards et post-doc du laboratoire, passés ou encore présents, avec qui j'ai pu avoir beaucoup de conversations passionnantes ainsi qu'à tous les membres de l'ISIS et de l'université Paris Descartes de l'unité UMR S775.

Pour finir, j'adresse tout mon amour à mes parents, mon frère Wassim, mon chéri Fayçal, toute ma famille et mes amis qui m'ont toujours soutenue dans cette aventure. Vous comptez plus que tout pour moi.

TABLE DES MATIERES

I.	Introduction générale.....	1
I.1	Les piles à combustibles	1
I.1.1	Les piles à combustibles chimiques	2
I.1.2	Les biopiles	4
I.1.2.1	Les limitations de l'utilisation des biopiles à enzymes.....	5
I.1.2.2	Les différents types d'enzymes anodiques et cathodiques.....	6
I.1.2.2.1	Les enzymes anodiques.....	6
I.1.2.2.2	Les enzymes cathodiques.....	7
I.1.2.3	Le transfert des électrons dans les biopiles.....	8
I.1.2.4	Les méthodes d'immobilisation des biocatalyseurs dans les biopiles.....	9
I.1.2.5	La biopile à combustible modèle.....	11
I.2	L'évolution dirigée des enzymes	12
I.2.1	Les méthodes de création de la diversité génétique	13
I.2.2	La sélection de l'activité enzymatique	15
I.3	La technologie microfluidique en gouttes.....	23
I.3.1	La création de microgouttelettes monodisperses	23
I.3.2	Les tensioactifs.....	24
I.3.2.1	Effet des tensioactifs sur la stabilité des microgouttelettes.....	25
I.3.2.2	Effet des tensioactifs sur la biocompatibilité.....	26
I.3.2.3	Les phénomènes d'échange entre les microgouttelettes.....	26
I.3.3	Les modules microfluidiques	27

I.3.4	Exemple de réactions biologiques réalisées en gouttelettes.....	29
I.3.4.1	L'expression in vitro des protéines.....	31
I.3.4.2	L'amplification de l'ADN.....	31
I.3.4.3	L'encapsulation de cellules pour mesurer l'activité catalytique des enzymes.....	32
I.4	Objectif de la thèse	33
I.5	Références bibliographiques.....	35
II.	Choix des enzymes modèles	45
II.1	Introduction.....	45
II.2	Matériel et Méthodes	50
II.2.1	Les réactifs	50
II.2.2	Les enzymes de restrictions	50
II.2.3	Les plasmides utilisés pour les clonages.....	50
II.2.4	Les souches bactériennes utilisées pour le clonage et l'expression des protéines	51
II.2.5	Les stratégies de clonage des alcool déshydrogénases dans des plasmides d'expression in vivo et in vitro	51
II.2.6	Expression in vitro des alcool déshydrogénases	53
II.2.7	Expression in vivo, extraction et purification des alcool déshydrogénases	53
II.2.8	Gel de protéines en condition dénaturante	54
II.2.9	Préparation de bactéries compétentes par voie chimique	54
II.2.10	Le test d'activité colorimétrique des alcool déshydrogénases	55
II.2.11	Le test d'activité fluorogénique des alcool déshydrogénases	55
II.2.12	Préparation de la suspension bactérienne.....	55
II.3	Résultats et discussions.....	56

II.3.1 Développement d'un test fluorescent pour la mesure de l'activité de l'alcool déshydrogénase en gouttes.....	56
II.3.2 Expression in vitro de la QEDH et de la QHEDH sans cytochrome c	57
II.3.3 Expression in vivo, extraction et purification des alcool déshydrogénases	58
II.3.4 Caractérisation de l'alcool déshydrogénase de type II sans cytochrome c	60
II.3.4.1 Les substrats spécifiques à l'alcool déshydrogénase	
II.3.4.2 Activité des alcool déshydrogénases avec différents accepteurs d'électrons	
II.3.4.3 Détermination du pH optimum des enzymes modèles pour l'oxydation d'alcools primaires et secondaires	
II.3.5 Comparaison de l'expression in vivo des QEDH et QHEDH sans cytochrome c en gouttes	63
II.4 Conclusions et perspectives	65
II.5 Références bibliographiques	66
III. Phénomène d'échange de composés entre les gouttes	70
III.1 Introduction.....	70
III.2 Matériels et méthodes	75
III.2.1 Les tensioactifs et les huiles porteuses fluorocarbonés.....	75
III.2.2 Fabrication des modules microfluidiques	77
III.2.3 Le système optique de détection de la fluorescence des microgouttelettes	77
III.3 Résultats et discussions.....	80
III.3.1 La résorufine	80
III.3.1.1 Développement de la plateforme microfluidique.....	80
III.3.1.2 Mise en évidence de l'échange de résorufine entre les gouttes.....	82
III.3.1.3 Effets de la concentration de tensioactif.....	82

III.3.1.4 Les Différentes stratégies testées pour diminuer l'échange de résorufine.....	84
III.3.1.4.1 Effet de l'ajout de biopolymères.....	84
III.3.1.4.2 Effets de l'huile porteuse.....	87
III.3.1.4.3 Effets du tensioactif.....	89
III.3.2 Le phénazine méthosulfate réduit (PMS _{red})	91
III.3.2.1 Développement de la plateforme microfluidique.....	91
III.3.2.2 Echange de la phénazine méthosulfate réduite entre les gouttes.....	93
III.3.2.3 Différentes stratégies pour diminuer l'échange de PMS _{red}	94
III.4 Conclusions et perspectives	102
III.5 Références bibliographiques.....	104
IV. Plateforme microfluidique	107
IV.1 Introduction.....	107
IV.2 Matériel et Méthodes	109
IV.2.1 La stratégie de construction du plasmide du mutant inactif de l'alcool déshydrogénase	109
IV.2.2 Détermination de la densité cellulaire des cultures bactériennes.....	110
IV.2.3 Préparation de la suspension bactérienne pour la sélection modèle	110
IV.2.4 Préparation de l'émulsion bactérienne	111
IV.2.5 Fabrication des modules microfluidiques	111
IV.2.6 Digestion des plasmides et migration sur gel d'agarose	111
IV.3 Résultats et discussions.....	111
IV.3.1 Développement d'un test fluorescent pour la détection de la laccase en gouttes	112
IV.3.2 Développement de plateformes pour la sélection de biocatalyseurs.....	112

IV.3.2.1 Plateforme pour la sélection des biocatalyseurs exprimés <i>in vitro</i>	113
IV.3.2.1 Plateforme pour la sélection des enzymes exprimées <i>in vivo</i>	116
IV.3.2.1.1 La laccase.....	117
IV.3.2.1.2 L'alcool déshydrogénase.....	118
IV.3.2.1.2.1 Etude de la faisabilité de l'expression <i>in vivo</i> et de la mesure de l'activité catalytique des enzymes en microplaque.....	121
IV.3.2.1.2.2 Quantification des enrichissements de sélection.....	122
IV.3.2.1.2.3 Validation de la plateforme microfluidique.....	124
IV.4 Conclusions et perspectives	128
IV.5 Référence bibliographie	130
V. Conclusion générale	132

Table des figures

Figure 1: Les trois grands piliers du développement durable.	1
Figure 2 : Les gammes de puissance approximatives de différentes sources d'énergie telle que des biocapteurs, des biopiles à combustibles et des batteries.	2
Figure 3 : Représentation schématique d'une pile à combustible chimique à hydrogène.....	3
Figure 4 : Un exemple d'une biopile à combustible utilisant une membrane pour séparer le compartiment anodique et cathodique.	4
Figure 5 : Représentation de la laccase ou de la bilirubine oxydase immobilisée sur une électrode et du mécanisme d'oxydation de l'oxygène en eau.....	7
Figure 6 : Les deux mécanismes de transfert des électrons dans les biopiles	8
Figure 7 : Représentation schématique des différentes techniques d'immobilisation des biocatalyseurs sur des électrodes	9
Figure 8 : Schéma d'une réaction catalytique d'oxydation d'un substrat en un produit en présence d'un médiateur grâce à un biocatalyseur immobilisé sur une électrode.....	10
Figure 9 : Les différentes étapes de l'évolution dirigée des protéines..	12
Figure 10 : Les différentes méthodes permettant d'introduire des mutations au sein d'une séquence d'ADN.....	13
Figure 11 : Mutagenèse dirigée basée sur la PCR utilisant comme amorce un oligonucléotide de synthèse.	14
Figure 12 : Exemples des méthodes de création de la diversité génétique par recombinaison : les différentes couleurs représentent des séquences différentes de gènes homologues.	15
Figure 13: Les différentes stratégies pour la sélection des enzymes.....	16
Figure 14 : Les différentes stratégies de couplage génotype-phénotype par présentation à la surface cellulaire.	17

Figure 15 : La compartimentation in vitro (IVC).....	19
Figure 16 : Sélection des ribozymes grâce au système IVC couplé à des billes de streptavidine.	20
Figure 17 : Sélection des enzymes en utilisant l'IVC en séparant les étapes de transcription et de traduction en utilisant des billes de streptavidines.	20
Figure 18 : Compartimentation in vitro (IVC) dans des doubles émulsions (d'eau-dans-l'huile-dans-l'eau) et sélection directe de microgouttelettes en fonction du signal de leur fluorescence.....	22
Figure 19 : Gouttes d'eau-dans-l'huile produite par agitation mécanique (à droite) [84] ou par un module microfluidique (à gauche)..	23
Figure 20 : Les différentes configurations microfluidiques permettant la création de microgouttelettes.	24
Figure 21 : Représentation schématique d'une goutte d'eau-dans-huile utilisée pour l'encapsulation de molécules biologiques (ADN, ARN, protéines), et / ou de cellules..	25
Figure 22 : Les différentes étapes de la fabrication des modules microfluidiques par Lithographie douce.....	27
Figure 23 : Représentation des différents modules microfluidiques élémentaires développés.	28
Figure 24 : Exemples d'applications biologiques en gouttelettes.	30
Figure 25 : Représentation de la structure tridimensionnelle de la QEDH issue de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	47
Figure 26 : Représentation du pont disulfure formé par les cystéines 105 et 106 au niveau du site actif de la QEDH de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	48
Figure 27 : Représentation de la structure tridimensionnelle de la QHEDH.	49
Figure 28 : Représentation schématique de la stratégie de clonage de la QHEDH avec et sans cytochrome <i>c in vivo</i> et <i>in vitro</i>	51
Figure 29 : Test fluorogénique pour la détection de l'activité des alcool déshydrogénases. ...	57

Figure 30: Expression <i>in vitro</i> des alcool déshydrogénases et mesure en spectrophotométrie de leur activité.	58
Figure 31: Gel en conditions dénaturantes des QEDH et QHEDH sans cytochrome c exprimées <i>in vivo</i> et purifiées.....	59
Figure 32: Pourcentage d'activité relative pour l'oxydation du 1-propanol et du 2-Octanol par la QHEDH et de la DHEDH sans cytochrome c en fonction du pH.	63
Figure 33: Suivi pendant 180 minutes de l'oxydation de l'éthanol par la QEDH et la QHEDH sans cytochrome c exprimées <i>in vivo</i> (<i>E. coli</i>).....	64
Figure 34 : Observation microscopique des gouttelettes d'eau dans huile minérale contenant du tensioactif hydrocarboné AbiEM90 stockées dans un réservoir microfluidique en PDMS.....	71
Figure 35 : Observation microscopique des gouttelettes d'eau dans l'huile perfluorocarbonée (FC40) contenant du tensioactif fluorocarboné.....	71
Figure 36 : Représentation schématique de la surface des plugs en interaction avec le tensioactif à l'interface entre la phase aqueuse et la phase huile fluorée.....	72
Figure 37 : Observation microscopique de la survie des cellules HEK293T déposées sur de l'huile perfluorée FC40 (3M) en présence de différents types de tensioactifs dont la structure de la tête hydrophile est représentée.	73
Figure 38 : Comparaison de la cinétique de l'alcool déshydrogénase en gouttes (carrés noirs) et microplaque de 96 puits (ronds bleus)..	74
Figure 39 : Structure chimique des tensioactifs fluorocarbonés.	76
Figure 40 : Structure chimique des huiles porteuses perfluorocarbonées FC40 et HFE7500. (A) Huile HFE7500 partiellement fluorée et (B) huile FC40 totalement fluorée.	77
Figure 41 : Représentation schématique de l'installation du système optique de détection de la fluorescence de la résorufine dans des microgouttelettes..	79
Figure 42 : Modules microfluidiques utilisés pour tester la fuite de la résorufine entre microgouttelettes..	81

Figure 43 : Suivi pendant 2 heures de l'échange de la résorufine entre des gouttes stabilisées avec le tensioactif EA à 0,5% (p/p) dans de l'huile HFE7500.....	82
Figure 44 : Suivi sur 2 heures de l'échange de la résorufine entre des gouttes stabilisées avec l'huile HFE7500 en présence du tensioactif EA à différentes concentrations : 0,25% ; 0,5% ; 2% ; 4% et 8%.....	84
Figure 45 : Suivi pendant 2 h de l'échange de la résorufine entre des gouttes stabilisées dans l'huile HFE 7500 en présence du tensioactif EA à 1% (p/p)..	85
Figure 46 : Mesure en microplaque de 96 puits de l'activité d'oxydation de l'éthanol par l'alcool déshydrogénase en présence de différentes concentrations de BSA.....	86
Figure 47 : Suivi pendant 2 h de l'échange de la résorufine entre des gouttes stabilisées dans l'huile HFE 7500 en présence du tensioactif EA à 1% (p/p)..	87
Figure 48 : Suivi de l'échange de la résorufine entre des gouttes stabilisées avec HFE7500 en présence du tensioactif EA et des gouttes stabilisées avec FC40 en présence du tensioactif EA pendant 2 heures.....	88
Figure 49 : Suivi sur 2 heures de l'échange de la résorufine entre des gouttes stabilisées avec HFE7500 en présence de différents tensioactifs fluorocarbonés jeffamine.....	90
Figure 50 : Plateforme microfluidique utilisée pour tester la fuite des accepteurs d'électrons entre les microgouttelettes.....	92
Figure 51 : Mesure de la fluorescence de gouttes avec et sans PMS pendant 2 heures.....	94
Figure 52 : Suivi en microplaque de 96 puits de l'oxydation de l'éthanol par l'alcool déshydrogénase en présence de PMS et en présence de PES pendant 2h.....	97
Figure 53 : Suivi en goutte et pendant 2h de l'oxydation de l'éthanol par l'alcool déshydrogénase en présence et en absence de PES.....	98
Figure 54 : Structure chimique de l'accepteur d'électrons PPS : « 3-phenazin-5-ium-5-yl propane-1-sulfonate ».....	99
Figure 55 : La mesure dans le système microfluidique de la fluorescence d'une émulsion contenant un mélange de microgouttelettes contenant ou non le PPS.	100

Figure 56 : Structure chimique de la « Rhodamine 101 » et de la « Sulforhodamine 101» et suivi dans le système microfluidique de l'échange de chacune des deux entre des microgouttelettes de 20pL.	101
Figure 57 : Quelques exemples de plateformes microfluidiques.	107
Figure 58 : Plateforme microfluidique permettant la création de microgouttelettes et leur tri selon leur fluorescence	108
Figure 59 : Test fluorogénique pour la détection de l'activité de la laccase (CotA) en gouttes.	112
Figure 60 : Les différents modules de la plateforme microfluidique pour l'expression in vitro d'une enzyme (la laccase)	114
Figure 61 : Comparaison de la cinétique de la laccase mesurée en microgouttelettes et en microplaque.	114
Figure 62 : Suivi pendant 240 min du signal de fluorescence des gouttes contenant l'alcool déshydrogénase exprimée in vitro.	115
Figure 63 : Plateforme microfluidique pour la sélection d'enzymes exprimées in vitro en gouttes.	116
Figure 64 : Plateforme microfluidique digitale pour la mesure de l'activité de la CotA (exprimée in vivo) en gouttes.	117
Figure 65 : Représentation du signal de fluorescence des gouttes.	118
Figure 66 : Plateforme microfluidique développée pour la sélection des bactéries exprimant des enzymes actives à partir d'un mélange de bactéries exprimant des enzymes actives et de bactéries exprimant des enzymes non actives.	120
Figure 67 : Suivi pendant 150 minutes de l'oxydation de l'éthanol par les enzymes actives et les enzymes inactives exprimées dans E. coli en présence du test fluorogénique.	121
Figure 68 : Suivi pendant 130 minutes de l'oxydation de l'éthanol par les enzymes des extraits périplasmique et osmotique en présence du test fluorogénique.	123
Figure 69 : Gel d'agarose 1% dans TAE de plasmides digérés avec BglII, et BamHI et HindIII.	125

Figure 69: Gel d'agarose 1% dans TAE de plasmides digérés avec BglII, et BamHI et HindIII.....126

Figure 71: Gel d'agarose 1% dans TAE de plasmides digérés avec BglII, HindIII et BamHI.128

Liste des abréviations

PAC : pile à combustible

PQQ : cofacteur pyrroloquinoline quinone (2,7,9-tricarboxypyrroloquinoline quinone)

ADH : alcool déshydrogénases

NAD : nicotinamide adénine dinucléotide

QEDH : alcool déshydrogénase de type-I

QHEDH : alcool déshydrogénase de type-II

QHEDH sans cytochrome c : alcool déshydrogénase de type-II sans la partie cytochrome c

$K'm$: affinité de l'enzyme pour son substrat

$V'max$: vitesse maximale d'oxydation de substrat

IPTG : isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside

PMS : Phénazine MéthoSulfate (accepteur d'électrons artificiel)

IVC : compartimentation *in vitro*

I. Introduction générale

I.1 Les piles à combustibles

Selon la définition proposée en 1987 par la commission mondiale sur l'environnement et le développement, le développement durable correspond à un "développement qui répond aux besoins du présent sans compromettre la capacité des générations futures à répondre aux leurs". Il se base sur trois piliers essentiels en interaction permanente : respect de l'environnement, progrès social et efficacité économique (**Figure 1**).

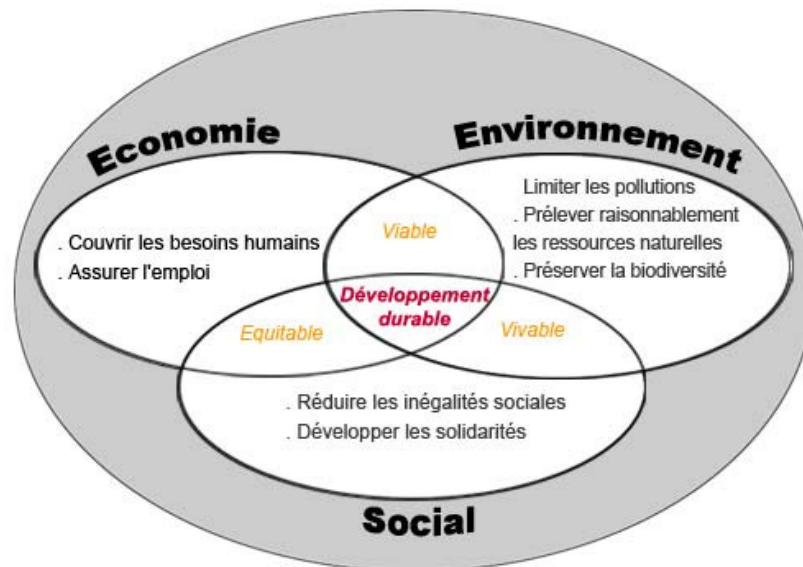


Figure 1: Les trois grands piliers du développement durable. Image issue du site <http://www.reze.fr/>

Les grands progrès qui ont vu le jour ces dernières décennies ont été accompagnés d'une augmentation constante de la demande en énergie électrique avec pour conséquence une augmentation de la température du globe dû à l'effet de serre. Pour pouvoir garantir le concept du développement durable, il devient urgent de diminuer le recours aux énergies fossiles au bénéfice d'énergies renouvelables et moins polluantes. C'est dans cette optique que de nombreux travaux de la communauté scientifique se sont axés sur le développement et l'optimisation de nouvelles sources d'énergie, les piles à combustibles, capables de convertir de l'énergie chimique en énergie électrique [1]. Ces systèmes se sont imposés dans différents domaines tels que le domaine militaire, le transport et la communication. Bien qu'ils aient connu des progrès majeurs, des efforts de recherche et de développement sont encore nécessaires pour qu'ils puissent se justifier économiquement. Deux grandes catégories de piles à combustibles peuvent être distinguées : les piles à combustibles classiques ou chimiques (que nous appellerons PAC dans le reste de ce document) et les piles à

combustibles biologiques ou biopiles. Les PAC ont la particularité de générer des puissances largement au dessus de celles des biopiles ce qui explique que les domaines d'application soient différents (**Figure 2**). En effet, les biopiles, limitées par leur faible puissance (maximum de $5\text{mW}/\text{cm}^2$ rapportés par Akermin, Ltd USA), offrent l'avantage de leur taille réduite et de leurs catalyseurs biologiques alors que les PAC visent plutôt des applications qui nécessitent de grandes puissances sans se soucier de la grande taille des systèmes (les moteurs de voitures par exemple).

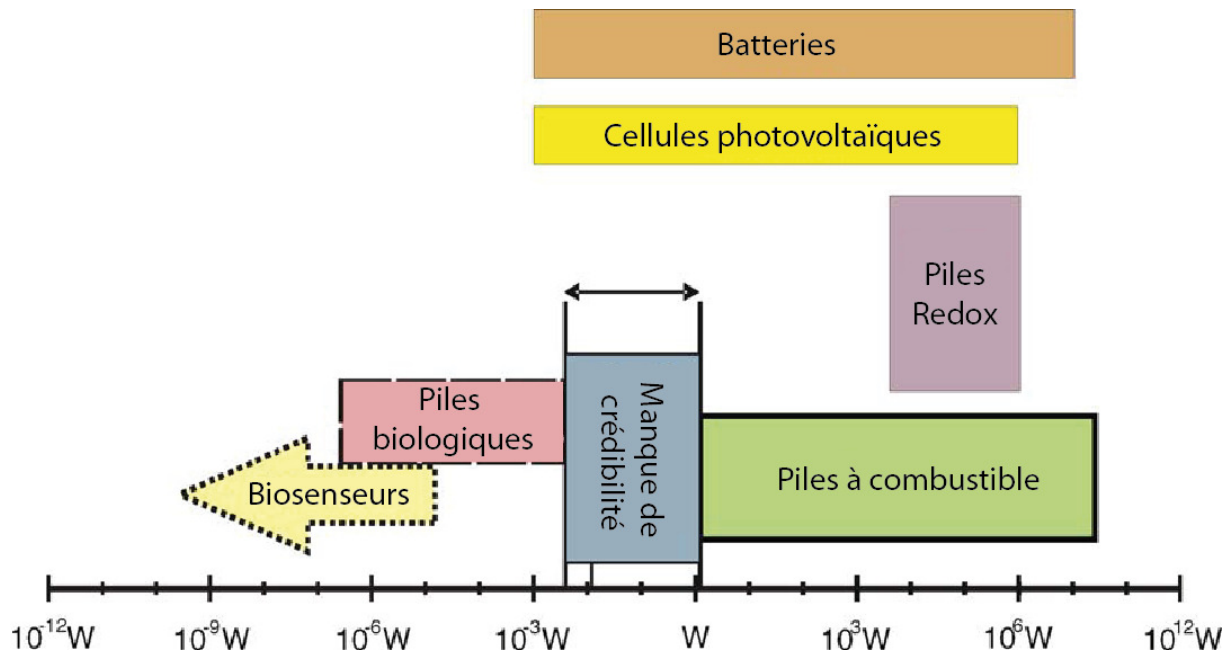


Figure 2 : Les gammes de puissance approximatives de différentes sources d'énergie telle que des biocapteurs, des biopiles à combustibles et des batteries. En comparant les différentes puissances générées par les piles, les biopiles produisent des puissances plus faibles que les piles à combustibles. De la droite vers la gauche, nous observons une diminution de la taille des systèmes ainsi qu'une diminution de la puissance générée. Image issue de la revue de Bullen et al. [1]

1.1.1 Les piles à combustibles chimiques

Les PAC, composées de deux électrodes et d'un électrolyte, sont des dispositifs électrochimiques où l'électricité est produite grâce à l'oxydation d'un combustible couplé à la réduction d'un oxydant (**Figure 3**). Au niveau des électrodes, ces réactions sont généralement catalysées par des métaux nobles et coûteux comme le platine. Sir William Grove fut le premier en 1839 à expérimenter une pile à combustibles, une cellule hydrogène-oxygène avec des électrodes en platine et de l'acide sulfurique utilisé comme électrolyte. Depuis, différentes piles à combustibles fonctionnant à différentes températures selon l'électrolyte utilisé ont été inventées. Contrairement à ce qui se passe dans les batteries

classiques, qui sont des dispositifs de stockage d'énergie, au niveau des piles à combustibles l'électricité est produite en continue tant que le combustible et l'oxydant sont fournis [1].

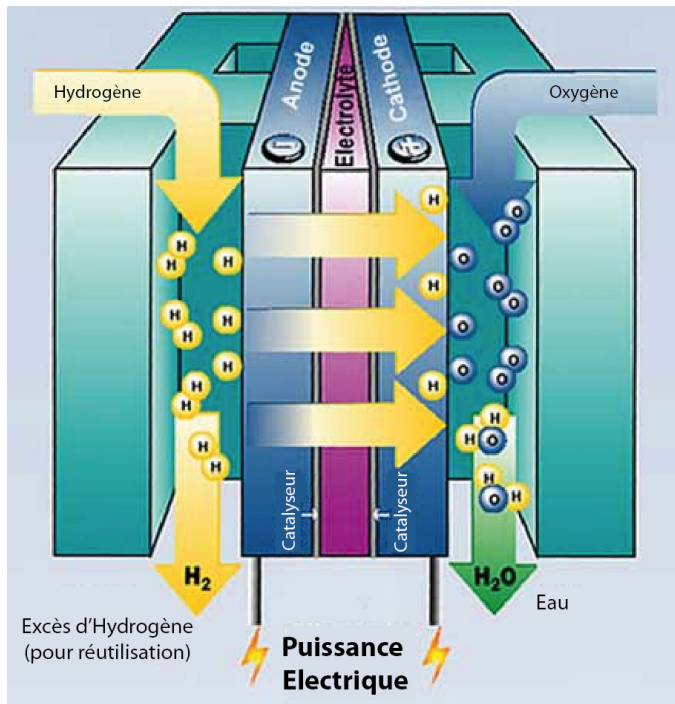


Figure 3 : Représentation schématique d'une pile à combustible chimique à hydrogène. Le combustible qui est l'hydrogène (en jaune) est oxydé par les catalyseurs anodiques libérant des électrons et de l'hydrogène. Ces électrons sont acheminés vers la cathode (les ions hydrogène passent à travers l'électrolyte) pour réduire l'oxygène qui est l'oxydant (en bleu) pour former de l'eau.

Ces piles à combustible sont en général classées selon leur température de fonctionnement. On distingue ainsi les piles à basse température et les piles à haute température (**Tableau 1**) :

- (i) Les piles fonctionnant à basses températures (entre $50^{\circ}C$ et $220^{\circ}C$) sont les piles alcalines ou AFC (*Alkaline Fuel Cell*), les piles à membrane échangeuse de protons ou PEMFC (*Proton exchange membrane fuel cells*) et les piles à acide phosphorique ou PAFC (*Phosphoric Acid Fuel Cell*).
- (ii) Les piles à hautes températures fonctionnent entre 600 et $1000^{\circ}C$: nous citons ici les piles à carbonate fondu ou MCFC (*Molten Carbonate Fuel Cell*) et les piles à oxyde solide ou SOFC (*Solid Oxide Fuel Cell*).

	Ions mobiles	Température de fonctionnement (°C)
AFC (Pile à combustible alcaline)	OH ⁻	50-200
PEMFC (Pile à combustible à membrane d'échange de protons)	H ⁺	50-100
PAFC (Pile à combustible à acide phosphorique)	H ⁺	~220
MCFC (Pile à combustible à carbonate fondu)	CO ₃ ²⁻	~650
SOFC (Pile à combustible à oxyde solide)	O ²⁻	500-1000

Tableau 1 : Les différents types de piles chimiques développées. D'après Bullen et al. [1]

1.1.2 Les biopiles

Les biopiles sont des systèmes capables de convertir l'énergie chimique en énergie électrique par le biais de catalyseurs biologiques [1]. Le concept de biopile a vu le jour en 1912 et il a fallu attendre les années 60 pour que la première biopile à glucose oxydase soit décrite par Yahiro et ses collaborateurs [2]. Selon les biocatalyseurs utilisés, deux types principaux de biopiles peuvent être distingués : les biopiles à microorganismes et les biopiles à enzymes utilisant respectivement des cellules vivantes ou des enzymes purifiées au niveau des électrodes (**Figure 4**).

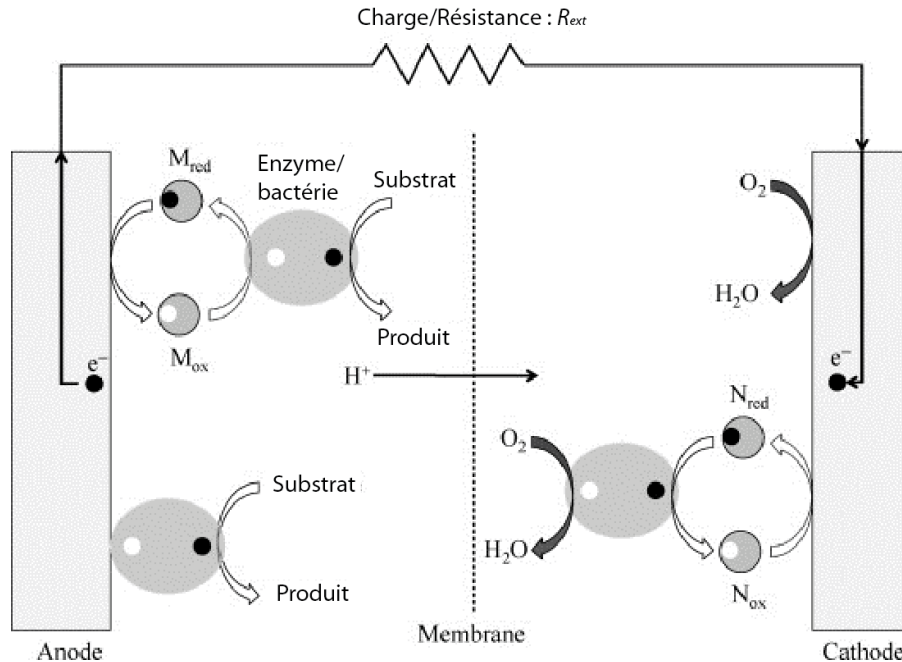


Figure 4 : Un exemple d'une biopile à combustible utilisant une membrane pour séparer le compartiment anodique et cathodique. L'oxydation du substrat est catalysée par des enzymes ou des bactéries immobilisées sur l'anode, en présence (haut) ou non de médiateurs (bas), libérant ainsi des protons et des électrons. Ces électrons sont soit transférés à l'anode. La réduction de l'oxygène à la cathode, facilitée par des médiateurs, peut avoir lieu directement sur l'électrode ou par des biocatalyseurs. Les médiateurs peuvent être libres ou immobilisés sur l'électrode pour améliorer le transfert d'électrons. Figure modifiée d'après Osman et al. [3].

Le **Tableau 2** compare les propriétés des biopiles à microorganismes et des biopiles à enzymes. Les revues de *Bullen et al.* et d'*Osman et al.* regroupent les biopiles développées ces dernières années utilisant exclusivement des microorganismes ou des enzymes comme biocatalyseurs [1,3]. Récemment, des biopiles hybrides avec des microorganismes au niveau de l'anode et des enzymes au niveau de la cathode [4] et des biopiles utilisant des organelles comme les mitochondries [5,6] ont aussi été développées. Le reste de ce document, sera focalisé essentiellement sur les biopiles à enzymes.

	Les biopiles à microorganismes	Les biopiles à enzymes
Durée de vie	Longue durée de vie (> 5ans) [7].	Durée de vie courte (7-10 jours) due à la fragilité des enzymes [8,9].
Puissance	Faible puissance due au faible transport à travers la membrane cellulaire.	Puissance plus élevée que celle des biopiles à microorganismes mais plus faible que celle des piles à combustibles chimiques [10].
Oxydation	Oxydation totale des combustibles (par exemple oxydation du glucose en CO ₂) [11]	Oxydation partielle des combustibles

Tableau 2 : Comparaison des différentes propriétés des biopiles à microorganismes et des biopiles à enzymes.

1.1.2.1 Les limitations de l'utilisation des biopiles à enzymes

Les deux problèmes majeurs des biopiles sont les faibles puissances qu'elles génèrent et leur courte durée de vie. Ces deux points sont dépendants de quatre pré-requis :

- (i) la stratégie d'immobilisation des biocatalyseurs sur les électrodes
- (ii) la vitesse de transfert des électrons vers et/ou en provenance des électrodes
- (iii) la stabilité et l'efficacité des biocatalyseurs
- (iv) la quantité d'enzymes immobilisées sur les électrodes

Afin de passer outre ces limitations et augmenter les performances des biopiles, la plupart des travaux de recherche se sont principalement axés sur le développement de nouvelles stratégies pour améliorer le transfert d'électrons [12] ainsi que sur l'optimisation des méthodes d'immobilisation des enzymes sur les électrodes [13,14]. Très peu se sont intéressés à

l'ingénierie des biocatalyseurs pour augmenter leur activité dans les conditions d'utilisation des biopiles [15].

1.1.2.2 Les différents types d'enzymes anodiques et cathodiques

Les combustibles utilisés dans le compartiment anodique sont des sucres, des alcools et du dihydrogène alors que les combustibles utilisés dans la partie cathodique sont le peroxyde d'hydrogène ou le dioxygène. Généralement ceux fonctionnant à des potentiels proches du potentiel de leurs substrats sont les plus intéressants à utiliser dans les biopiles [16].

1.1.2.2.1 Les enzymes anodiques

Les biocatalyseurs capables d'oxyder les combustibles organiques peuvent être classés en 3 groupes selon leur cofacteur :

- (i) Les déshydrogénases qui possèdent un cofacteur faiblement attaché à l'enzyme (NAD^+ (Nicotinamide Adénine Dinucléotide), NADP^+ (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate)) et qui utilisent des hèmes (cytochrome) comme accepteur d'électrons. Les Glucose déshydrogénases à NAD et les alcool déshydrogénases à NAD en sont des exemples [3].
- (ii) Les déshydrogénases PQQ dépendantes comme par exemple les alcools déshydrogénases à PQQ, les glucose déshydrogénases à PQQ et les glycérol déshydrogénases à PQQ. Le cofacteur PQQ de ces enzymes est fortement lié à l'apoenzyme d'une manière non covalente [17,18,19] mais ne nécessite pas sa régénération d'une manière continue [20,21].
- (iii) Des oxydases avec un centre redox FAD (Flavine Adénine Dinucléotide) profondément lié à l'enzyme et qui utilisent l' O_2 comme accepteur d'électrons. Comme exemple d'enzymes de cette catégorie nous citerons les glucose oxydases (GOx) [3]. L'extraction des électrons avec ce type d'enzymes est très difficile [3]. Les systèmes utilisant la GOx nécessitent généralement un médiateur, cependant il a été démontré que cette enzyme est capable de transférer les électrons directement aux électrodes constituées de nanostructures pour faciliter le transfert [22,23,24].

Un autre combustible largement utilisé dans les biopiles est le dihydrogène qui est oxydé en H^+ . Cette catalyse se fait par des hydrogénases qui ont la caractéristique d'avoir un site actif bimétallique : [FeFe] ou [NiFe] [16]. Pour les applications biopiles, les [NiFe]-hydrogénases sont considérées meilleures candidates que les [FeFe]-hydrogénases car elles sont plus actives et résistent à de fortes concentrations de dioxygène [16] telles que les enzymes [NiFe]-hydrogénases de *Ralstonia spp* qui sont actives à de hautes concentrations d' O_2 et de CO [25,26].

1.1.2.2 Les enzymes cathodiques

Les deux oxydants les plus utilisés dans les biopiles sont le dioxygène et le peroxyde d'hydrogène. Pour catalyser la réduction du dioxygène en eau avec 4 électrons ($O_2 + 4 H^+ + 4 e^- \rightarrow 2 H_2O$) (Figure 5) des oxydases à cuivre comme par exemple les laccases de champignons et de plantes [27] et les bilirubine oxydases [28] ont été utilisées. Malgré leur similitude de structure et de fonctionnement, la bilirubine oxydase est toutefois décrite comme plus intéressante que la laccase grâce à son pH optimum qui est proche de 7 (le pH optimum de la laccase est situé entre 3 et 5) et à sa tolérance aux ions Cl^- (la laccase est inhibée par les ions F^- et Cl^-) [29,30]. Quant aux biopiles à peroxyde d'hydrogène, la réduction de ce dernier se fait par des microperoxydases et des peroxydases de raifort appelées en anglais : horseradish peroxydase ou HRP» [31,32]

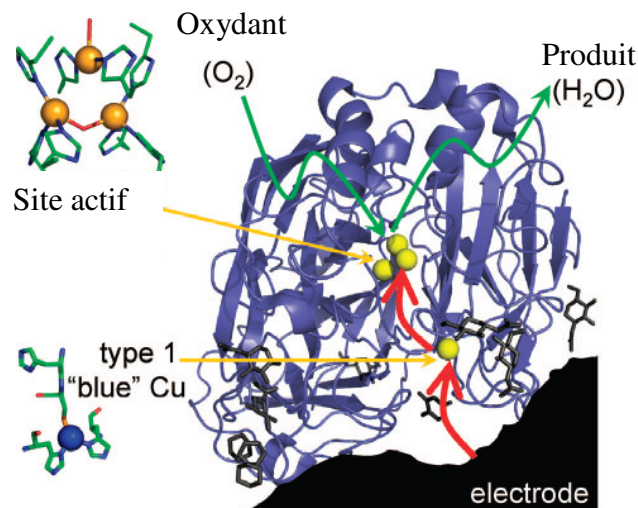


Figure 5 : Représentation de la laccase ou de la bilirubine oxydase immobilisée sur une électrode et du mécanisme d'oxydation de l'oxygène en eau. La réduction du dioxygène en eau (flèche verte) se fait au niveau d'un site actif bien enfouie dans la protéine dans lequel se trouvent 3 cuivres (en jaune) reliés par des ligands histidines. Cette réaction se fait grâce aux électrons qui arrivent en provenance de l'électrode un à un (flèches rouges) par le biais d'un centre de transfert d'électrons contenant un quatrième cuivre « bleu » et situé dans une poche hydrophobe à la surface de la protéine. D'après Cracknell et al. [16]

1.1.2.3 Le transfert des électrons dans les biopiles

Dans les biopiles, selon les biocatalyseurs utilisés, le transfert des électrons depuis et vers les électrodes peut se faire de deux manières : directement (DET : Direct Electron Transfer) (**Figure 6 panel a**) ou indirectement via un médiateur (MET : Mediated Electron Transfer) (**Figure 6 panel b**).

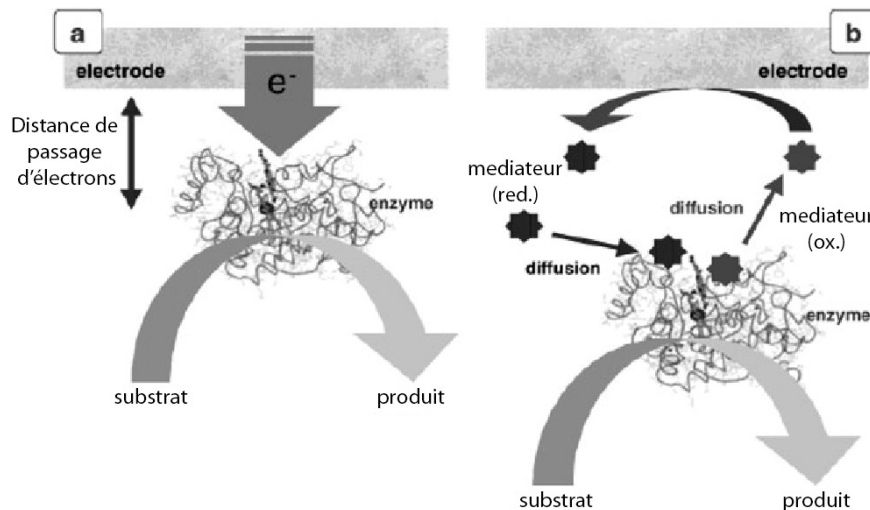


Figure 6 : Les deux mécanismes de transfert des électrons dans les biopiles : (a) transfert direct (DET) (b) transfert indirect via un médiateur (MET). D'après Moehlenbrock et al. [13]

Le transfert est dit direct dans le cas où le site actif des enzymes est proche de la surface des électrodes soit grâce à la taille réduite des molécules ou suite à quelques optimisations [33]. Un certain nombre d'enzymes ont été optimisées pour des applications biopiles avec transfert direct d'électrons, sans médiateurs, comme par exemple des hydrogénases, des glucose oxydases, des laccases, des bilirubine oxydases et des peroxydases (voir la revue d'*Osman et al.*) [3]. Dans le cas du transfert indirect, des médiateurs redox, qui sont des composés chimiques avec une activité électrochimique, échangent des électrons avec les combustibles ou les oxydants au niveau du site actif des enzymes puis diffusent vers la surface des électrodes pour y échanger les électrons. Ce processus est répété tant que les combustibles ou les oxydants sont présents dans les biopiles. La vitesse de transfert des électrons est donc étroitement liée à l'activité et à la diffusivité des médiateurs. Plusieurs études ont été consacrées à l'utilisation de médiateurs dans les biopiles [12,34]. Dans certains cas, l'utilisation de 2 médiateurs peut augmenter la performance des biopiles [35]. Pour plus de détails et d'exemples voir les revues d'*Osman et al.* et de *Bullen et al.* [1,3].

1.1.2.4 Les méthodes d'immobilisation des biocatalyseurs dans les biopiles

Il a été décrit que l'immobilisation des enzymes sur des supports permet d'augmenter leur sélectivité, d'améliorer leur stabilité à long terme ainsi que le transfert de masse du substrat [36]. Il a aussi été rapporté que l'immobilisation de biocatalyseurs peut augmenter la durée de vie des biopiles de quelques heures à quelques jours [9,37] voire quelques mois [38]. Cependant, elle peut parfois affecter la stabilité et l'activité des biocatalyseurs en plus des coûts supplémentaires qu'elle engendre. Il est donc important de bien choisir la méthode d'immobilisation pour éviter la dénaturation des enzymes et préserver leur stabilité [13]. Les différentes stratégies d'immobilisation des biocatalyseurs sur les électrodes (**Figure 7**) sont décrites dans les revues d'*Osman et al.*, de *Moehlenbrock et al.* et de *Rubenwolf et al.* [3,13,39].

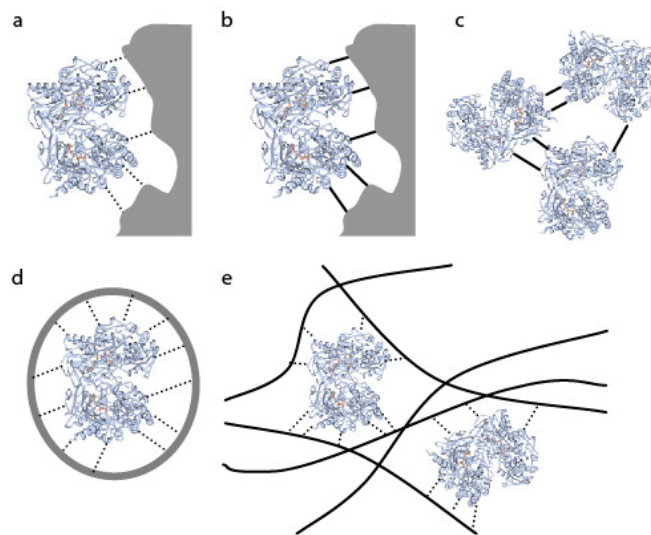


Figure 7 : Représentation schématique des différentes techniques d'immobilisation des biocatalyseurs sur des électrodes : (a) adsorption non covalente sur une électrode, (b) liaison covalente sur une électrode, (c) réticulation covalente des enzymes, (d) microencapsulation de l'enzyme dans des micelles ou dans des polymères micellaires, (e) emprisonnement des enzymes dans des polymères. D'après *Rubenwolf et al.* [39].

Pour améliorer les biopiles, de nombreux travaux se sont focalisés sur l'optimisation des interactions entre les biocatalyseurs et les électrodes ainsi que sur les méthodes d'immobilisation des enzymes, en présence ou en l'absence de médiateurs [40].

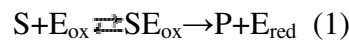
Cependant, l'efficacité des biopiles est étroitement dépendante des biocatalyseurs et plus précisément de leur constante catalytique K_{cat} . En effet, *Ikeda et al.* ont démontré que la puissance des biopiles est dépendante de l'efficacité des biocatalyseurs puisque le courant produit est lié aux K_{cat} des biocatalyseurs.

La puissance (P) est le produit du voltage de la pile (V) et du courant (I). Le voltage est dépendant de la différence du potentiel idéal de l'oxydant et du combustible et des pertes. Les pertes, appelées souvent polarisations, proviennent principalement de trois sources : la polarisation d'activation (n_{act}), la polarisation ohmique (n_{ohm}), et la polarisation de concentration (n_{conc}). Ces pertes entraînent, pour une pile de potentiel idéal E , une chute de la tension V .

$$P = V * I$$

$$V = E_{cathode} - E_{anode} - (n_{act} + n_{ohm} + n_{conc})$$

Pour mesurer le courant d'une biopile, dans laquelle les réactions catalytiques d'oxydation se font par un biocatalyseur immobilisé sur une électrode en présence d'un médiateur (**Figure 8**), deux équations sont prises en considération :



$M_{red} \rightarrow M_{ox}$ au niveau des électrodes.

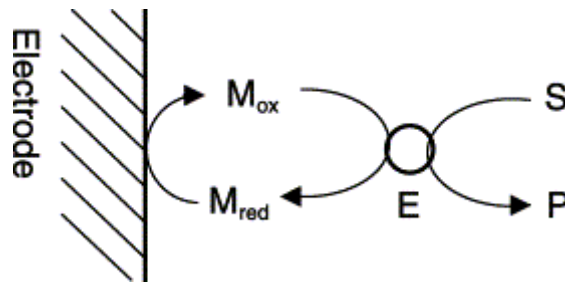


Figure 8 : Schéma d'une réaction catalytique d'oxydation d'un substrat en un produit en présence d'un médiateur grâce à un biocatalyseur immobilisé sur une électrode. E : enzyme, S : substrat, P : produit, M_{ox} et M_{red} sont respectivement les formes oxydée et réduite du médiateur qui facilite le transfert d'électrons.

La réaction enzymatique se fait avec un mécanisme ping-pong avec une vitesse v_S égale à :

$$v_S = \frac{k_{cat} [E]}{1 + K_S / [S] + K_M / [M_{ox}]}$$

k_{cat} : constant catalytique

K_S and K_M sont respectivement les constantes de Michaelis pour S et M_{ox}

[E], [S], et [M_{ox}] sont respectivement les concentrations de E, S et M_{ox}.

Le courant I_{app}, mesuré au niveau de l'électrode avec $K_S/[S] \ll 1 + K_M/[M_{ox}]$ est égal à :

$$I_{app} = FA[M]^* \sqrt{\frac{2n_S n_M D_M k_{cat} [E]}{2K_M + [M]^*}}$$

Avec F, A, [M]^{*} et D_M sont respectivement la constante de Faraday, la surface de l'électrode, la concentration du médiateur M et son facteur de diffusion. n_S et n_M sont les nombres d'électrons résultant de (1) et (2).

Donc, l'amélioration de l'efficacité des biopiles, comme nous l'avons dit plus haut, peut se faire en augmentant le K_{cat}, ce qui permet d'augmenter la fréquence de l'utilisation de l'enzyme. Par exemple, il a été décrit que les biocatalyseurs doivent avoir un K_{cat} supérieur à 100. s⁻¹ pour avoir un bon rendement énergétique au niveau de la pile [25]. L'ingénierie des enzymes par évolution dirigée ou par « rational protein design », a récemment permis d'augmenter la stabilité [41], la spécificité aux substrats, l'activité catalytique [15] ainsi que la vitesse de transfert direct d'électrons [42] de biocatalyseurs.

1.1.2.5 La biopile à combustible modèle

Un certain nombre de biopiles à éthanol ont été développées ces dernières années : *Aker et al.* par exemple ont réalisé une pile à éthanol/O₂ avec une membrane de Nafion séparant la partie anodique contenant des déshydrogénases et le compartiment cathodique (électrode recouverte de platine). Cette pile avait une durée de vie de 7 jours à 820mV pour une puissance de 2,04mW/cm² [43]. Récemment, l'équipe de Ramanaviciene a développé une pile enzymatique sans membrane qui utilise l'éthanol comme combustible et oxydant en plus du H₂O₂, des alcool déshydrogénases à PQQ et à cytochrome *c* ont été immobilisées sur l'anode et des micropéroxydases-8 de cheval (MP8) couplées à des alcool oxydases ont été greffées sur la cathode. Sa performance maximale était égale à 240mV pour une puissance de 1,5μW/cm² [44].

Notre idée, est de démontrer que l'utilisation de l'évolution dirigée des enzymes peut être utile pour améliorer les performances des biopiles. Au sein de notre laboratoire, nous avons choisi de développer une pile enzymatique à éthanol/O₂. Pour le compartiment anodique, nous avons choisi de tester et d'optimiser différentes Pyrrolo-Quinoline-Quinone-alcool déshydrogénases réalisant l'oxydation de l'éthanol en acétaldéhyde et éventuellement

en acide acétique [45]. Une fois les électrons transférés au compartiment cathodique, une laccase bactérienne extrêmophile (la CotA) se charge de la réduction du dioxygène en eau. Le passage des électrons vers la cathode génère un courant proportionnel au taux de catalyse au niveau des électrodes.

1.2 L'évolution dirigée des enzymes

Pour affiner les propriétés des enzymes ou même créer de nouvelles fonctionnalités en laboratoire, les biologistes peuvent avoir recours à l'évolution dirigée (voir la revue de Yuan *et al.* [46]). Cette stratégie, qui mime les mécanismes de l'évolution Darwinienne naturelle, consiste en la répétition de cycles de mutagenèse et de sélection (**Figure 9**) [47].

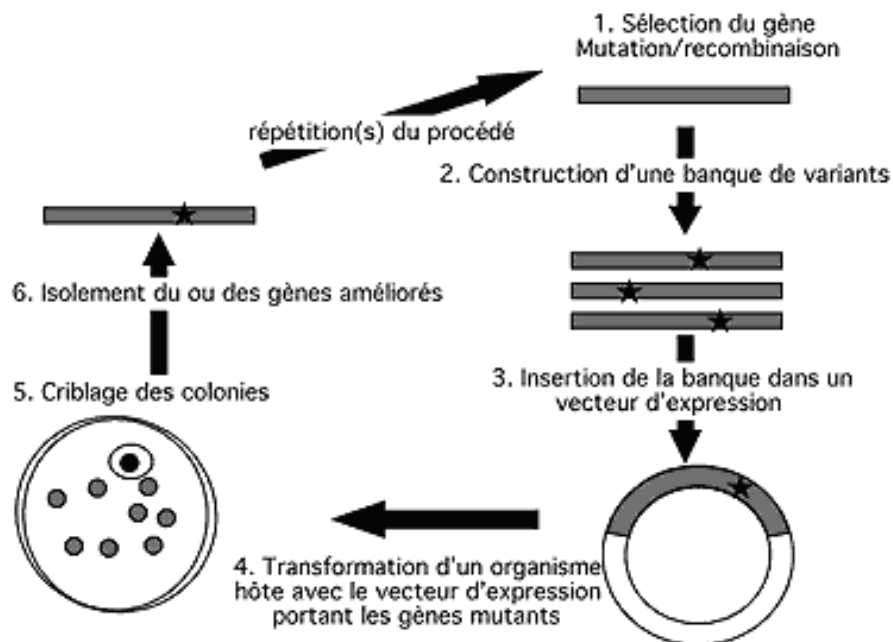


Figure 9 : Les différentes étapes de l'évolution dirigée des protéines. Une diversité génétique est tout d'abord créée. Chaque gène de la banque de mutants est par la suite traduit en protéines, pour finalement sélectionner les protéines ayant les fonctionnalités recherchées et remonter au gène codant pour elle. D'autres cycles peuvent être refaits sur ce gène muté jusqu'à obtenir le ou les variants possédant le ou les fonctions désirées. D'après la publication de Payot *et al.* [48].

1.2.1 Les méthodes de création de la diversité génétique

Plusieurs stratégies permettant de créer des banques de mutants ont été développées [46,49,50]. Elles peuvent être classées en 3 catégories : (i) mutagenèse aléatoire (ii) mutagenèse dirigée ou semi-dirigée (iii) recombinaison (**Figure 10**).

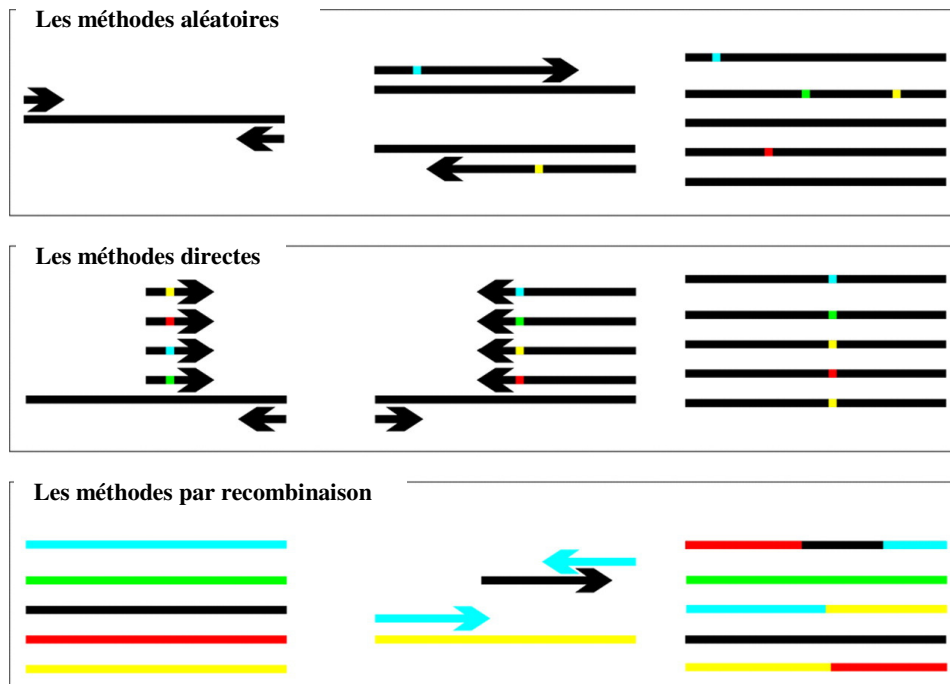


Figure 10 : Les différentes méthodes permettant d'introduire des mutations au sein d'une séquence d'ADN. (En haut) Mutagenèse aléatoire par introduction de mutations aléatoires tout au long de la séquence du gène, (au milieu) mutagenèse dirigée par introduction de mutations ponctuelles à des endroits bien précis et spécifiques du gène, (en bas) mutation par recombinaison d'une famille de gènes homologues. D'après Neylon et al. [50]

La première catégorie, la mutagenèse aléatoire, regroupe la plupart des stratégies permettant d'amplifier la séquence d'ADN en y introduisant délibérément des erreurs au hasard au sein du gène. Ces techniques peuvent utiliser des agents mutagènes physiques (par exemple irradiation UV) ou chimiques (par exemple déamination ou par alkylation) [51,52], des souches mutantes [53,54,55] telle que les bactéries commerciales *E. coli* XL1-Red déficientes pour les trois principales voies qui réparent l'ADN : mutD, mutS et mutT [49], certaines formes de mutagenèses d'insertion ou de délétion [56]. La plus populaire des méthodes de mutation est la technique error-prone PCR (Polymerase chain reaction) (epPCR) en raison de sa simplicité et sa versatilité [57]. Cette technique dérive de la PCR traditionnelle dans laquelle la fidélité de polymérase est affectée par différents moyens tels que l'utilisation d'analogues de nucléotides [58], l'utilisation de polymérases mutagènes [50] ou l'ajout d'ions manganèse [59]. La fréquence des mutations varie entre 1 et 20 nucléotides par kilobase [60]. Il a été rapporté qu'une faible fréquence de mutations augmenterait la probabilité de sélectionner le bon mutant recherché partant du principe que la majorité des mutations aléatoires sont muettes (neutres) ou délétères [61].

La deuxième catégorie, la mutagenèse dirigée, permet d'introduire volontairement des erreurs à des endroits bien choisis sur le gène. La technique la plus connue est basée sur la

PCR utilisant comme amorce des oligonucléotides synthétiques (**Figure 11**) portant une ou plusieurs mutations créées d'une manière aléatoire (des cassettes avec des mutations aléatoires) [62]. Différentes stratégies ont été développées pour introduire ces mutations [49,50,63].

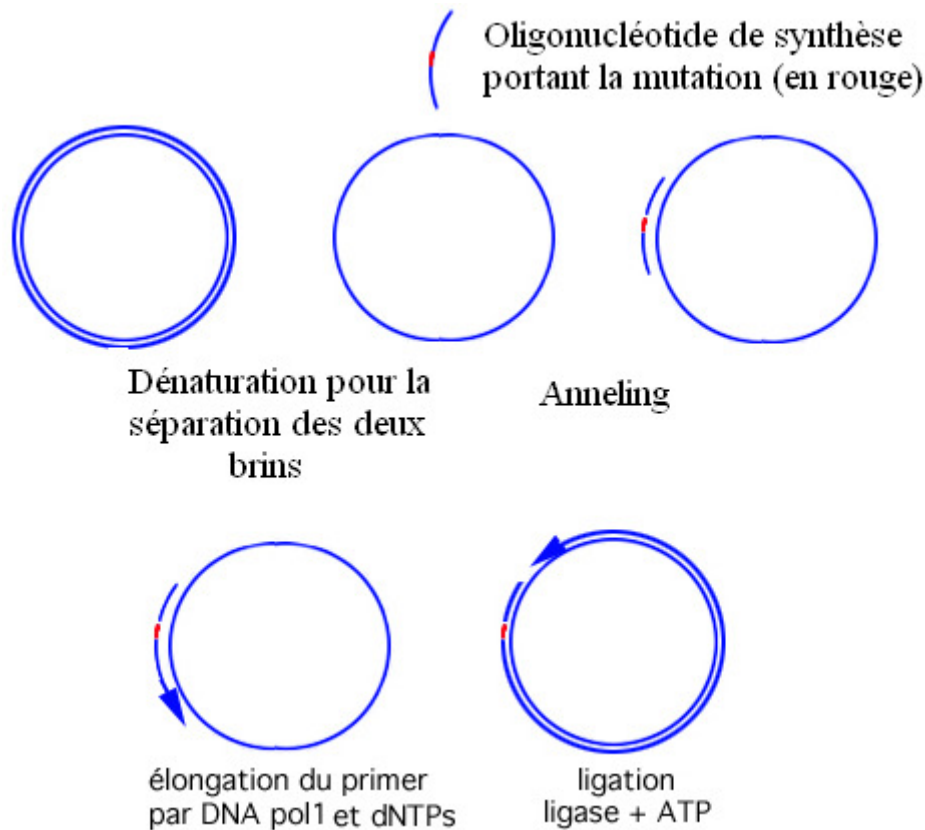


Figure 11 : Mutagenèse dirigée basée sur la PCR utilisant comme amorce un oligonucléotide de synthèse.

La troisième catégorie, la recombinaison homologue *in vitro*, est basée sur le mélange et la concaténation de fragments d'ADN provenant de séquences parentales. La technique du « DNA shuffling » ou « Gene Shuffling » (**Figure 12 à gauche**) a été la première technique développée pour la recombinaison *in vitro* de variants de gènes créés par mutagenèse aléatoire [64,65,66]. D'autres techniques ont par la suite été développées telles que la méthode « staggered extension process » plus connue sous l'appellation StEP (**Figure 12 au milieu**) [67,68] et la « random chimeragenesis on transient templates » (RACHITT) (**Figure 12 à droite**) [69,70]. Bien que différentes, ces 3 techniques se basent toutes sur l'amplification de gènes (ou de fragments de gènes) sans amorce en se basant uniquement sur l'homologie des séquences parentales de départ.

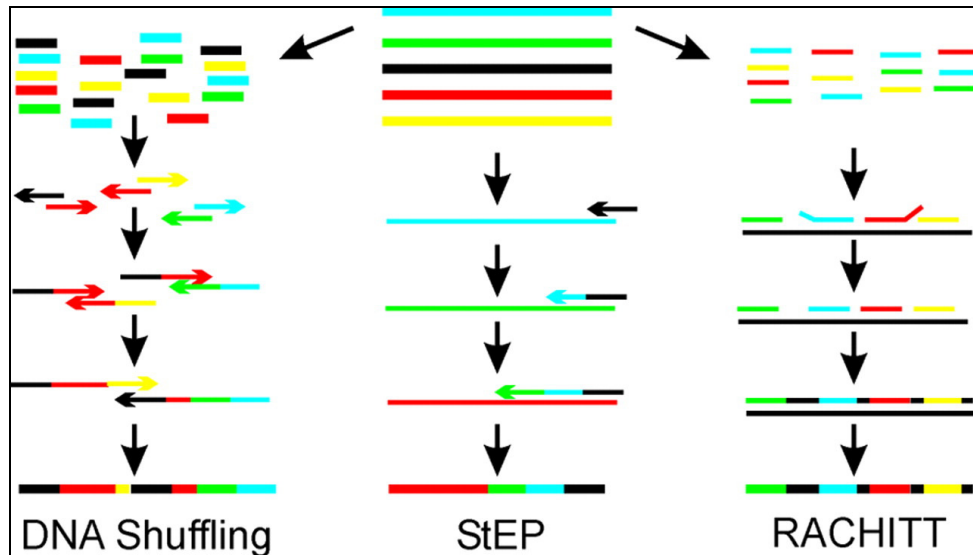


Figure 12 : Exemples des méthodes de création de la diversité génétique par recombinaison : les différentes couleurs représentent des séquences différentes de gènes homologues. (A gauche) « DNA shuffling » : les fragments d'ADN homologues sont digérés avec l'enzyme désoxyribonucléase 1 (DNase 1) aboutissant à des fragments aléatoires de 10 à 50 paires de base. Ces fragments sont chauffés jusqu'à leur séparation en deux brins puis ils sont réassociés en présence d'une ADN polymérase. Les brins d'ADN s'associent ensuite par complémentarité de bases. Une séquence plus courte, associée avec une plus longue, va amorcer la synthèse en utilisant la plus longue comme matrice, jusqu'à ce que les doubles brins d'ADN soit reconstitués. (Au milieu) « StEP » : l'ADN n'est pas fragmenté. De petits fragments viennent se mettre à la fin du brin d'ADN en formation grâce à l'utilisation d'un temps d'élongation très court (quelques secondes) et une faible température d'élongation. (A droite) « RACHITT » : Un ADN parental est utilisé comme matrice et les autres d'ADN homologues sont digérés avec l'enzyme désoxyribonucléase 1 (DNase 1) aboutissant à des fragments aléatoires. Ces derniers s'hybrident sur le brin d'ADN parental matrice puis se lient ensemble formant un nouveau brin d'ADN chimère. Figure issue de la publication de Neylon et al. [50]

1.2.2 La sélection de l'activité enzymatique

Le succès de l'évolution dirigée est essentiellement dépendant du choix de la stratégie de sélection. Contrairement à l'évolution de l'ARN catalytique, l'évolution des protéines doit impérativement s'accompagner de la sélection des gènes qui codent pour elles.

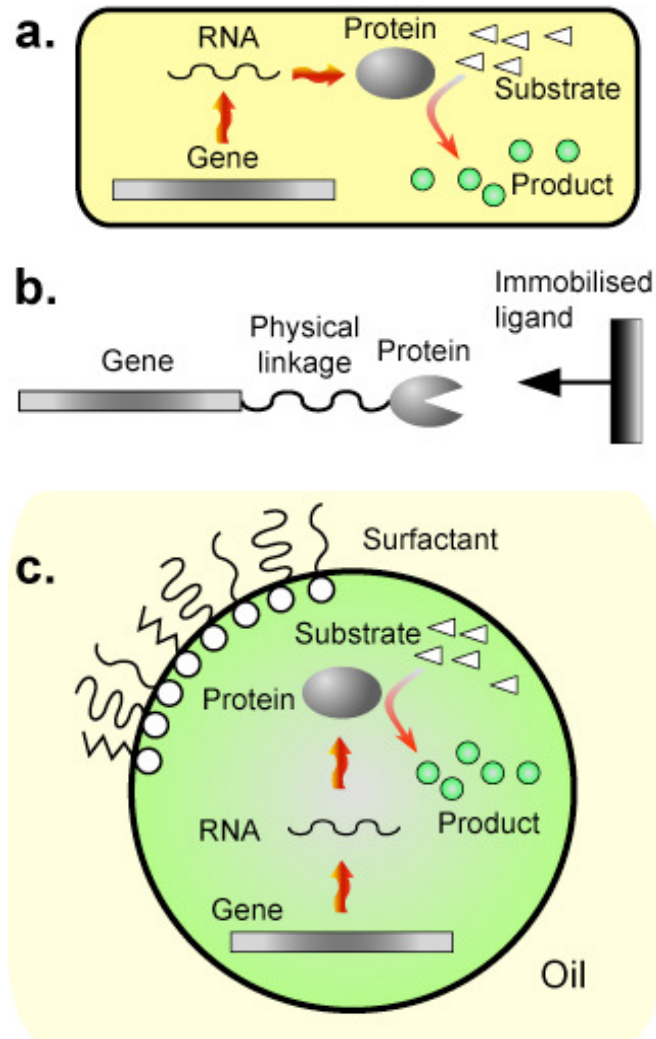


Figure 13: Les différentes stratégies pour la sélection des enzymes : (a) par compartimentation *in vivo* dans des bactéries, (b) par affinité (c) par compartimentation *in vitro* dans des gouttes d'eau-dans-huile.

Dans la nature, le génotype (la séquence d'ADN) et le phénotype (le trait fonctionnel comme par exemple l'activité catalytique ou de régulation) sont liés par compartimentation dans des cellules vivantes (**Figure 13 panel a**). Le plus souvent, la sélection *in vivo* se restreint aux fonctions qui affectent la survie des cellules et se heurte dans certains cas à la complexité de l'environnement intracellulaire. L'activité des enzymes exprimées *in vivo* est mesurée par détection des produits fluorescents ou chromophores de la réaction au sein de colonies étalées sur boîtes d'agar ou dans les extraits cellulaires sur microplaques [71,72,73]. Les obstacles majeurs de cette stratégie sont sa limite en sensibilité puisqu'elle dépend de la nature du produit à détecter et son faible débit de criblage qui est de 10^2 à 10^4 clones par jour pouvant atteindre 10^6 avec des systèmes automatisés. Il est vrai que dans certains cas ce débit peut être suffisant pour adapter des enzymes à de nouvelles conditions réactionnelles comme par exemple de nouveaux substrats, de nouvelles gammes de température ou de pH

[74,75,76,77,78,79,80,81,82]. Cependant, pour augmenter les chances d'identifier et d'isoler des enzymes avec de nouveaux phénotypes et de nouvelles propriétés, il est nécessaire d'avoir recours à des techniques de sélection à très haut-débit [83,84]. La sélection d'une banque de plus de 10^8 mutants restait un défi jusqu'à ce que le trieur de cellules à fluorescence (FACS) devienne un outil de criblage à très haut débit. A la base sa fonction principale était d'analyser les interactions protéines-ligands mais très vite il est devenu un outil capable d'analyser et de trier plus de 40,000 événements par seconde utilisé pour l'évolution dirigée des enzymes et plus précisément l'étape de sélection à très haut-débit [85,86,87,88]. La sélection avec le FACS se fait surtout par affinité [86,89,90] et parfois par catalyse dans les quelques cas où les produits fluorescents sont capables de se lier à la surface cellulaire (**Figure 14**) [91,92,93] ou de rester à l'intérieur de la cellule [94,95]. La revue de *Yan et al.* regroupe les différentes applications du FACS pour la sélection par catalyse [93].

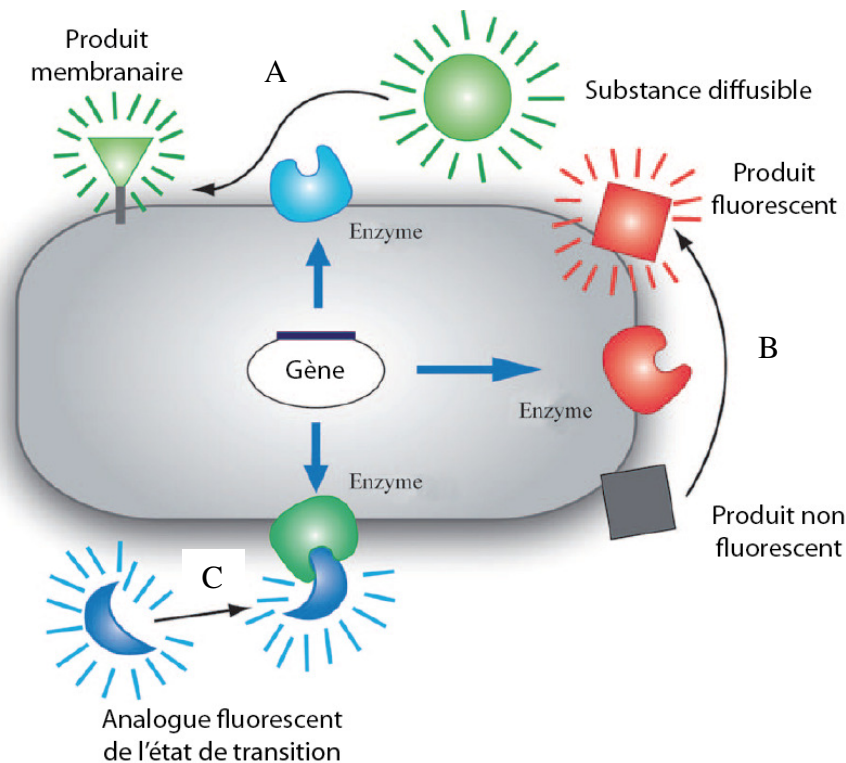


Figure 14 : Les différentes stratégies de couplage génotype-phénotype par présentation à la surface cellulaire. A) L'enzyme catalyse l'attachement d'un substrat fluorescent diffusible à la surface cellulaire d'une manière covalente ou non covalente. B) Le substrat, qui est déjà sur la surface des cellules, devient fluorescent sous l'action de l'enzyme. C) L'enzyme active se lie à un analogue fluorescent de l'état de transition. D'après *Yang et al.* [93]

Afin de passer outre les limitations des systèmes de sélection *in vivo* comme par exemple la toxicité de l'expression de certaines protéines pour la survie des cellules, des systèmes de sélection *in vitro* basés sur l'établissement d'un lien physique entre le génotype et

le phénotype (**Figure 13 panel b**) ont été développés. Ces systèmes ont aussi l'avantage de permettre la sélection des enzymes dans des conditions extrêmes telles que des pH très acides, très basiques ou de hautes températures pouvant parfois être incompatibles avec les systèmes *in vivo*. Le lien physique peut être fait par des systèmes de présentation sur des entités biologiques comme par exemple des présentations sur des phages [96,97,98,99,100,101,102,103,104], sur ribosomes [105,106], sur ARN_m [107,108] ou sur cellules [109,110]. Bien que toutes ces stratégies aient essentiellement été développées pour la sélection des enzymes en se basant sur leur affinité envers des ligands immobilisés sur des supports (**Figure 13 panel b**), des études récentes ont toutefois permis de sélectionner des enzymes par catalyse avec un seul turnover. Pour ce faire des inhibiteurs suicides capables de bloquer d'une manière irréversible les enzymes, des analogues de l'état de transition de l'enzyme (TSA) ou des ligands réactifs (**Figure 14**) ont été développés [96,97,111]. Il a aussi été possible de sélectionner par catalyse une ADN polymérase, une adénylate cyclase [101,102,103] et une métallo-béta-lactamase de *Bacillus Cereus* [104] en utilisant des linkers flexibles et des cofacteurs. Cependant, malgré le succès des systèmes de présentation dans la sélection catalytique des enzymes, le nombre de turnover lié à la difficulté de faire le lien entre le gène et le produit de la réaction enzymatique, reste toujours un défi [95]. Pour remédier à ce problème Andrew Griffiths et Dan Tawfik ont développé en 1998 un système de compartimentation *in vitro* nommé IVC inspiré du modèle de la compartimentation *in vivo* en cellules sans la complexité de l'environnement intracellulaire. Dans ce système, les composés (ADN, ARN, protéines, substrats et produits) sont compartimentés non pas dans des cellules mais dans des compartiments microscopiques d'eau-dans-l'huile formés par dispersion d'une solution aqueuse dans de l'huile (**Figure 13 panel c**). Chaque goutte contient en moyenne 1 gène et se comporte comme une cellule artificielle dans laquelle les protéines sont exprimées [112] puis leur activité mesurée [113]. Ces gouttelettes ont un diamètre qui varie entre 1 et 100µm et un volume allant de 5 femtolitre à 1 nanolitre ce qui correspond à un volume 10^4 à 10^{10} fois plus petit que le plus petit volume utilisé habituellement dans les systèmes de microplaques (2-3µl pour les plaques 1536 puits) (**Figure 15 panel a**). La préparation facile des émulsions à plus de 10^{10} gouttes/ml, la parallélisations des réactions ainsi que la miniaturisation des volumes réactionnels font du système IVC une stratégie très attractive pour l'évolution dirigée comme moyen de sélection à haut débit [95]. Voir la revue de Griffiths *et al.* qui regroupe quelques applications de l'IVC pour l'évolution de peptides, de protéines et d'ARN [114].

Au tout début du développement des systèmes IVC, la sélection par catalyse des enzymes nécessitait que le substrat soit physiquement lié au gène [112] (**Figure 15 panel b**). Dans cette stratégie, une fois la réaction catalytique réalisée, le gène au sein des gouttes (i) est lié au produit de la réaction catalytique s'il code pour une enzyme active ou (ii) est lié au substrat non modifié dans le cas où il code pour une enzyme inactive. Après avoir cassé les gouttes, les gènes liés aux produits sont récupérés et isolés par purification (par affinité à un ligand par exemple). Cette technique a été utilisée pour étudier le rôle des enzymes DNA-cytosine C5) méthyltransférase HhaI [115] et pour sélectionner des enzymes telles que des ADN méthyltransférases [116], des enzymes de restriction [117] ou des ADN polymérases [118,119].

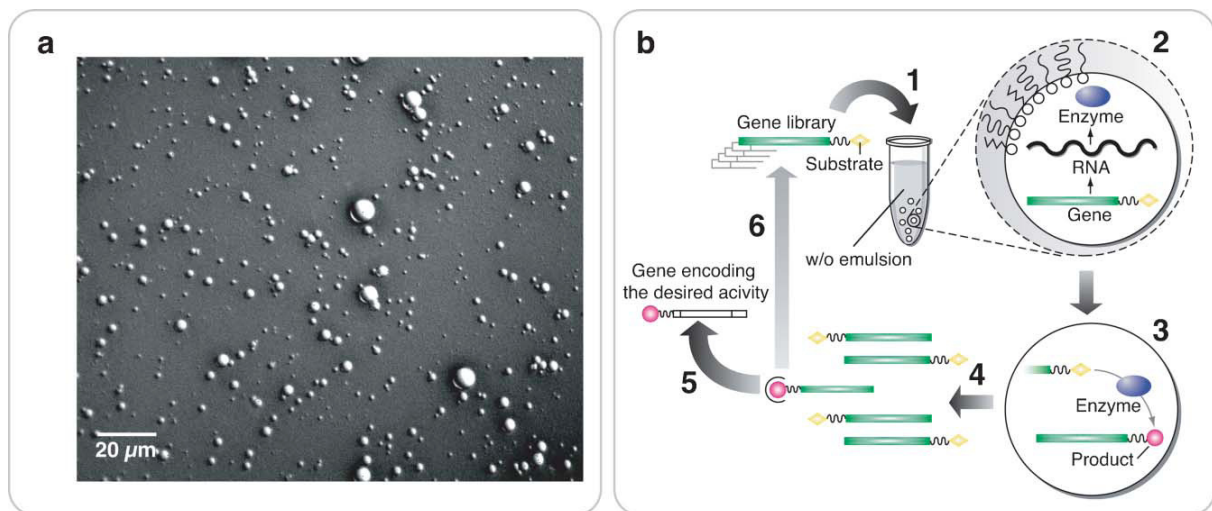


Figure 15 : La compartimentation in vitro (IVC) (a) observation microscopique d'émulsion d'eau dans de l'huile produite par agitation mécanique. (b) Sélection par catalyse dans l'IVC : (1) Une banque de gènes individuellement fusionnés au substrat est émulsionnée à hauteur de 1 gène en moyenne par goutte en présence de toute la machinerie nécessaire à l'expression des gènes in vitro. Les gènes sont exprimés (2) et quelques uns donnent des enzymes capables de convertir le substrat en produit (3). Les protéines exprimées se trouvent confinées dans la goutte pour créer un lien entre le génotype et le phénotype. Ainsi, seuls les gènes codant pour des enzymes actives voient les molécules de substrats auxquels ils sont fusionnés se convertir en produits. Les gènes sont récupérés en cassant l'émulsion (4) et seuls les gènes codant pour les enzymes actives sont récupérés (5). D'autres tours de mutagenèse et de sélection peuvent à nouveau être effectués (6) [114].

Un autre moyen pour faire le lien entre les gènes codant pour les enzymes et les produits au sein des microgouttelettes est d'utiliser des billes de streptavidines (**Figure 16**). L'intérêt de cette stratégie est que, au sein de chaque goutte, la bille est capable de coupler un seul gène avec plusieurs molécules de produits ($> 10^3$) [120]. De ce fait, la sélection ne se fait plus sur un seul turnover mais sur plusieurs. Cette technique a été utilisée avec succès pour la sélection d'enzymes [113] et de ribozymes (ARN catalytique) [121].

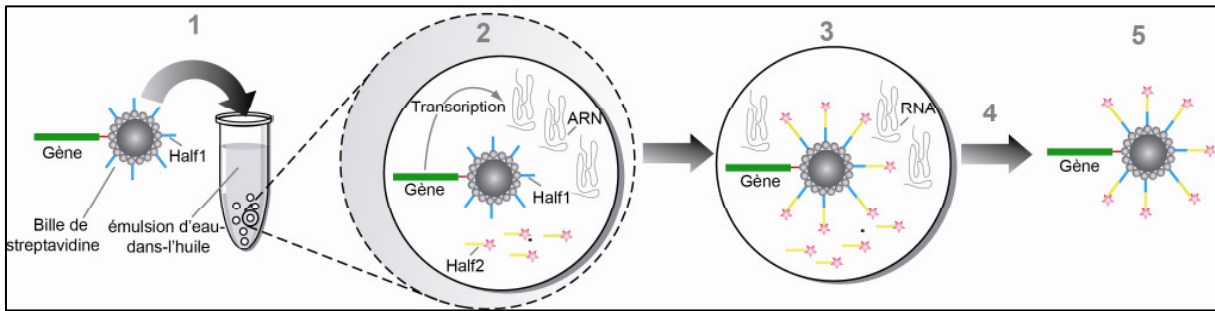


Figure 16 : Sélection des ribozymes grâce au système IVC couplé à des billes de streptavidine. (1) Les billes de streptavidine présentant à leur surface un premier type de substrat (traits bleus, Half 1) et un gène codant pour l'ARN catalytique (ribozyme ligase) sont encapsulées avec un deuxième type de substrat (traits jaunes, Half 2) et la machinerie nécessaire à l'expression *in vitro* dans des gouttes d'eau-dans-huile à hauteur d'une bille en moyenne par goutte. (2) Dans chaque goutte, les gènes sont exprimés, puis (3) les ribozymes ARN ligases actives lient les deux types de substrat ensemble ce qui rend les billes de streptavidines fluorescentes. (4) Finalement, les gouttes sont cassées et (5) les billes fluorescentes sont triées en utilisant le FAC et les gènes (codant pour les ribozymes ARN ligases actives) qui y sont liés sont amplifiés par PCR. D'autres tours de mutagenèse et de sélection peuvent à nouveau être effectués. D'après Taly et al. [120]

Ce système IVC permet aussi de découpler les étapes d'expression *in vitro* et de sélection dans le cas où elles sont incompatibles [113] (**Figure 17**).

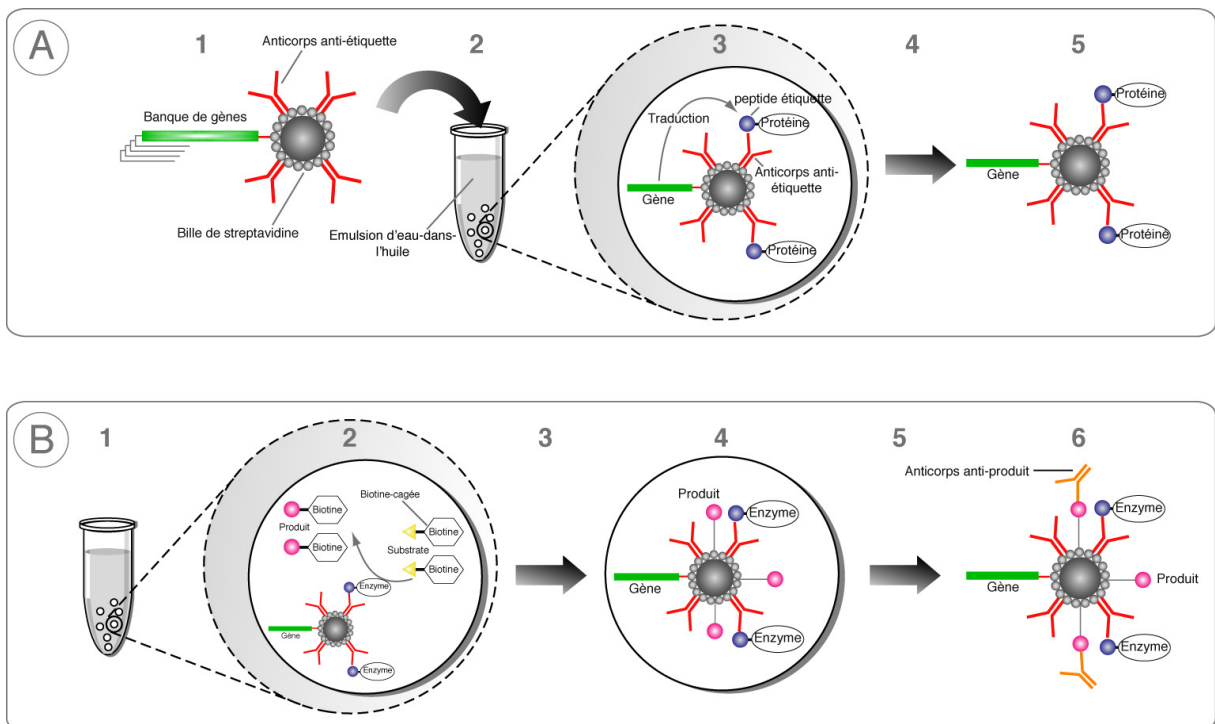


Figure 17 : Sélection des enzymes en utilisant l'IVC en séparant les étapes de transcription et de traduction en utilisant des billes de streptavidines. Cette technique se fait en deux étapes : lors de la première (panel A) une émulsion est produite avec des gouttes contenant chacune une bille de streptavidine sur laquelle sont immobilisés un gène possédant une étiquette et des anticorps reconnaissant cette étiquette. Les protéines sont exprimées et par affinité se fixent sur les anticorps reconnaissant l'étiquette sur la bille de streptavidine. Les gouttes sont cassées et les billes de streptavidines sont par la suite récupérées et encapsulées à nouveau dans des gouttes (avec en moyenne une bille par goutte) en présence de substrat fluorogénique biotinylé (panel B). Une fois que les substrats sont convertis en produits par les enzymes actives, ils sont immobilisés sur les billes de streptavidines. Après passage des gouttes les billes ayant sur leur surface les produits de la réaction enzymatique sont récupérées par des anticorps anti-produit. Les gènes codants pour les enzymes actives peuvent par la suite être soumis à un autre tour de mutagenèse et de sélection. D'après Griffiths et al. [113].

Les premiers systèmes de compartimentation *in vitro* en gouttes d'eau-dans-de-l'huile ont été développés pour sélectionner les enzymes en se basant sur le lien établi entre le gène codant pour la protéine et le produit de la réaction. Par cassage des gouttes et avec des systèmes de purification, les gènes d'intérêt étaient identifiés et récupérés. Les limitations de ces systèmes sont la nécessité de les adapter à chaque système enzymatique, de casser les gouttes, et le faible débit de sélection. Une alternative, un système de sélection IVC basé sur le tri de gouttes intactes avec le FACS a été développé [122]. Ce système, basé sur la détection de la fluorescence, utilise des systèmes fluorogéniques adaptés à un large panel d'enzymes. Une première émulsion classique d'eau-dans-de-l'huile contenant le gène, la machinerie nécessaire à l'expression de l'enzyme ainsi que le substrat fluorogénique libre est tout d'abord créée. Une phase aqueuse est par la suite rajoutée à la première émulsion formant ainsi la double émulsion d'eau-dans-de-l'huile-dans-de-l'eau. Le produit fluorescent libre dans la goutte se trouve ainsi lié au gène codant pour l'enzyme par la première émulsion. Ce système a été utilisé avec succès pour la sélection deux différentes enzymes optimisées : la sérum paraxonase (PON1) [123] et l'Ebg (evolved β -galactosidase) [84]. Pour la PON1, une banque de plus de 10^7 mutants a été transformée et exprimée dans des bactéries *E. coli*. Par la suite l'équivalent d'une bactérie par goutte a été encapsulée avec son substrat fluorogénique. Les doubles émulsions ont finalement été triées par le FACS donnant une PON1 avec une activité thiolactonase 100 fois plus grande que l'enzyme sauvage (**Figure 18 panel 1A et 2A**). Pour l'Ebg, ayant une faible activité β -galactosidase mais dont la fonction principale est inconnue, une banque de $> 10^7$ variants a été encapsulée dans des doubles émulsions avec en moyenne 1 gène par goutte avec toute la machinerie nécessaire pour l'expression *in vitro* ainsi que le substrat fluorogénique. Le tri par FACS a permis de sélectionner une Ebg avec une activité β -galactosidase accrue (**Figure 18 panel 1B et 2B**).

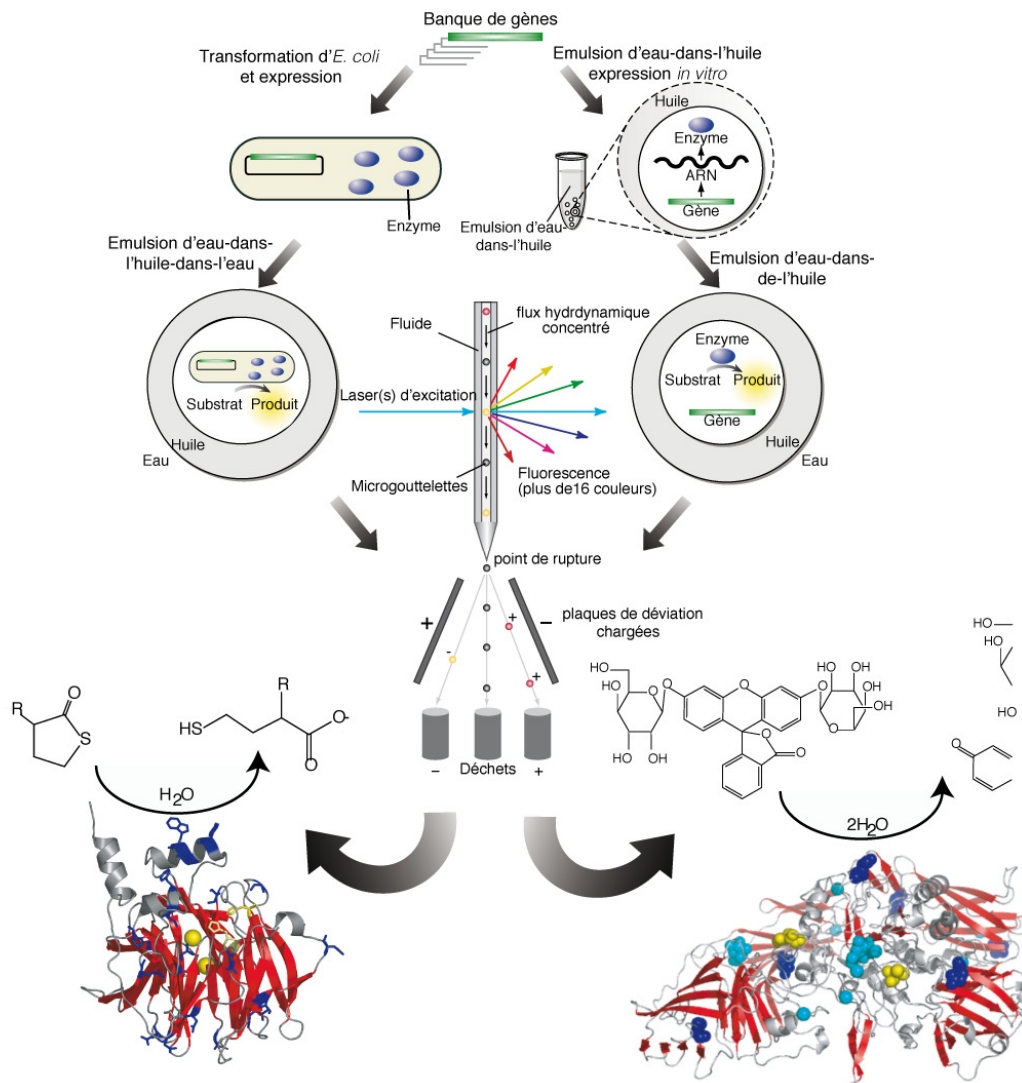


Figure 18 : Compartimentation in vitro (IVC) dans des doubles émulsions (d'eau-dans-l'huile-dans-l'eau) et sélection directe de microgouttelettes en fonction du signal de leur fluorescence (panel A) Les gènes sont tout d'abord traduits à l'intérieur des bactéries (expression in vivo). Ces dernières sont ensuite émulsionnées pour former une émulsion d'eau-dans-l'huile de sorte à avoir une bactérie par compartiment (2A). Les protéines (dans les bactéries) possédant l'activité enzymatique recherchée convertissent un substrat non fluorescent en un produit fluorescent. L'émulsion d'eau-dans-l'huile est ensuite convertie en une émulsion d'eau-dans-l'huile-dans-l'eau (3A). (panel B) Expression in vitro des protéines : Un milieu de transcription/traduction in vitro contenant une banque de gènes codant pour des enzymes mutées est émulsionné pour former une émulsion d'eau-dans-l'huile de sorte à avoir un gène par compartiment (1B). Les gènes sont transcrits et traduits à l'intérieur des microgouttelettes (2B). Les protéines possédant l'activité enzymatique recherchée convertissent un substrat non fluorescent en un produit fluorescent. L'émulsion d'eau-dans-l'huile est ensuite convertie en une émulsion d'eau-dans-l'huile-dans-l'eau (3B). Les gouttelettes fluorescentes sont séparées des gouttelettes non fluorescentes (ou de microgouttelettes contenant des fluorophores différents) à l'aide d'un trieur de cellules à fluorescence (FACS, fluorescence activated cell sorter). Les gènes provenant des microgouttelettes fluorescentes, qui codent pour des enzymes actives, sont purifiés et amplifiés par PCR et sont à nouveau soumis à d'autres cycles de sélection. Image issue de Kelly et al. [124].

Malheureusement, bien que prometteuse, la stratégie de l'IVC s'est heurtée à certaines limitations telles que la polydispersité des gouttes produites et la difficulté dans certains cas à

rajouter des composés à l'intérieur des gouttes une fois qu'elles sont créées [114]. Une alternative est de l'associer à un système microfluidique.

1.3 La technologie microfluidique en gouttes

La microfluidique permet de manipuler d'une manière contrôlée et très précise de petits volumes de fluide (10^{-5} à 10^{-10} litre) dans des canaux de quelques micromètres de diamètre. La combinaison du système microfluidique avec l'IVC permet de bénéficier de la miniaturisation contrôlée à très haut-débit [125,126].

1.3.1 La création de microgouttelettes monodisperses

L'utilisation des systèmes microfluidiques, contrairement aux systèmes classiques de création de gouttes (par extrusion ou par agitation mécanique) [84], permettent de créer des gouttes d'eau-dans-l'huile ou des gouttes d'eau-dans-l'huile-dans-l'eau de taille homogène, plus réduites que les gouttes créées en tube [127] et avec moins de 3% de polydispersité (**Figure 19**). Leur fréquence de création peut atteindre 10 à 30KHz [125,128].

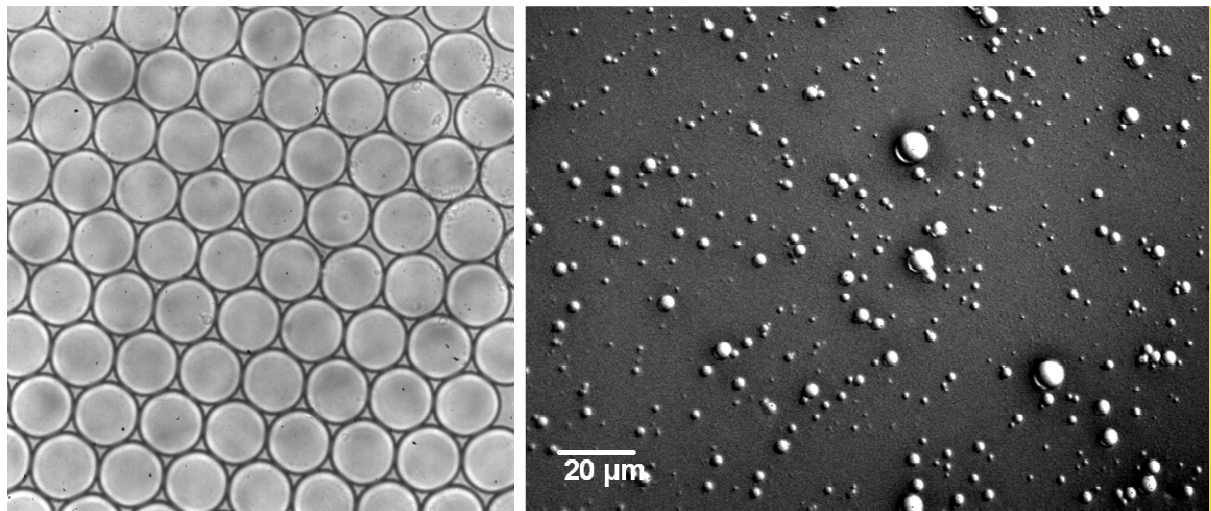


Figure 19 : Gouttes d'eau-dans-l'huile produite par agitation mécanique (à droite) [84] ou par un module microfluidique (à gauche). A droite les gouttes ont été étalées sur une lame de verre et à gauche les gouttes ont été immobilisées dans un réservoir microfluidique.

Les systèmes microfluidiques les plus utilisés pour la création des gouttes sont ceux avec des géométries en « jonction en T » [127,129,130,131] et en « jonction flow focusing » [132,133,134,135,136] (**Figure 20**). Pour les systèmes ayant une géométrie « jonction en T », la phase aqueuse est injectée perpendiculairement à la phase continue d'huile. Les gouttes sont formées grâce aux forces de cisaillement induites dans ces deux phases. Dans les systèmes ayant une géométrie en « jonction flow focusing », la phase aqueuse est injectée

dans un canal central et la phase huile dans deux canaux extérieurs perpendiculaires au premier. Ces deux phases sont ensuite poussées à circuler à travers un petit orifice qui se trouve en aval des 3 canaux. La phase continue d'huile vient exercer une pression et des contraintes visqueuses sur la phase aqueuse permettant ainsi de la « couper » à une position précise pour former les gouttelettes. Dans ces deux configurations, la taille des micro-compartiments est dictée par les flux de la phase aqueuse (contenant les composés à encapsuler) et de la phase huile, la géométrie des canaux et la viscosité de la phase aqueuse et de la phase huile (tensioactif+huile). Dans les applications où le débit est important, la géométrie en « flow focusing » est la plus adaptée et la plus adéquate. Il est possible de créer un seul ou plusieurs types de goutte grâce au système multiplexe [137,138].

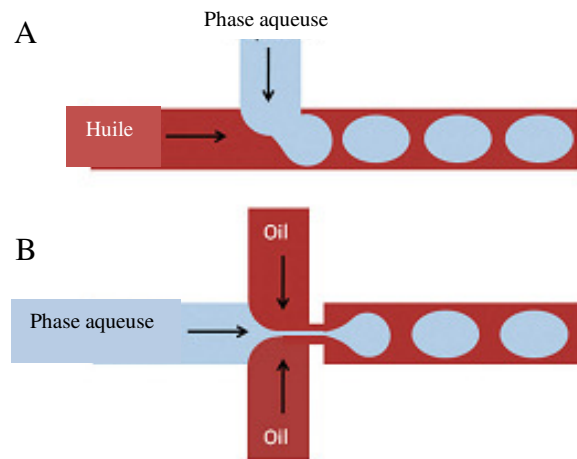


Figure 20 : *Les différentes configurations microfluidiques permettant la création de microgouttelettes. (A) création des gouttelettes dans une jonction en T (B) création des gouttes avec une configuration « flow focusing ». Cette figure est issue Casadevall i Solvas et al. [139].*

1.3.2 Les tensioactifs

La création de microgouttelettes d'eau-dans-l'huile ne nécessite pas forcément d'agents stabilisants (tensioactifs). Ces derniers sont cependant essentiels pour les stabiliser (surtout quand elles se touchent) et les étanchéifier c'est-à-dire éviter les éventuels échanges de composés entre elles. Pour optimiser au maximum les réactions biologiques ou chimiques à réaliser au sein des gouttes (**Figure 21**), il est impératif de bien choisir le tensioactif stabilisant et de bien étudier l'hydrophobicité des molécules (substrats ou produits de la réaction) [125]. Le choix du tensioactif dépend de l'huile utilisée : minérale ou perfluorée. Certaines équipes qui utilisent des huiles minérales (huiles hydrocarbonées) peuvent se fournir en un certain nombre de tensioactifs vendus dans le commerce tels que le Span 80, tween 20 et l'Abil EM [134]. Cependant, ceux qui utilisent les huiles fluorées (huile

fluorocarbonées) en raison de leur meilleure perméabilité à l'oxygène et leur faible miscibilité avec des composés organiques, le nombre de surfactants fluorés dans le commerce est limité au Krytox vendu par Dupont. Ce tensioactif est constitué d'une queue perfluoropolyether (PFPE) et d'une tête hydrophile d'acide carboxylique. Dernièrement, les travaux des scientifiques dans le domaine de la synthèse des tensioactifs fluorés se sont multipliés. Des tensioactifs, fluorés avec différentes structures chimiques et permettant d'avoir des gouttes stables et biocompatibles, ont été synthétisés et caractérisés [135,140,141].

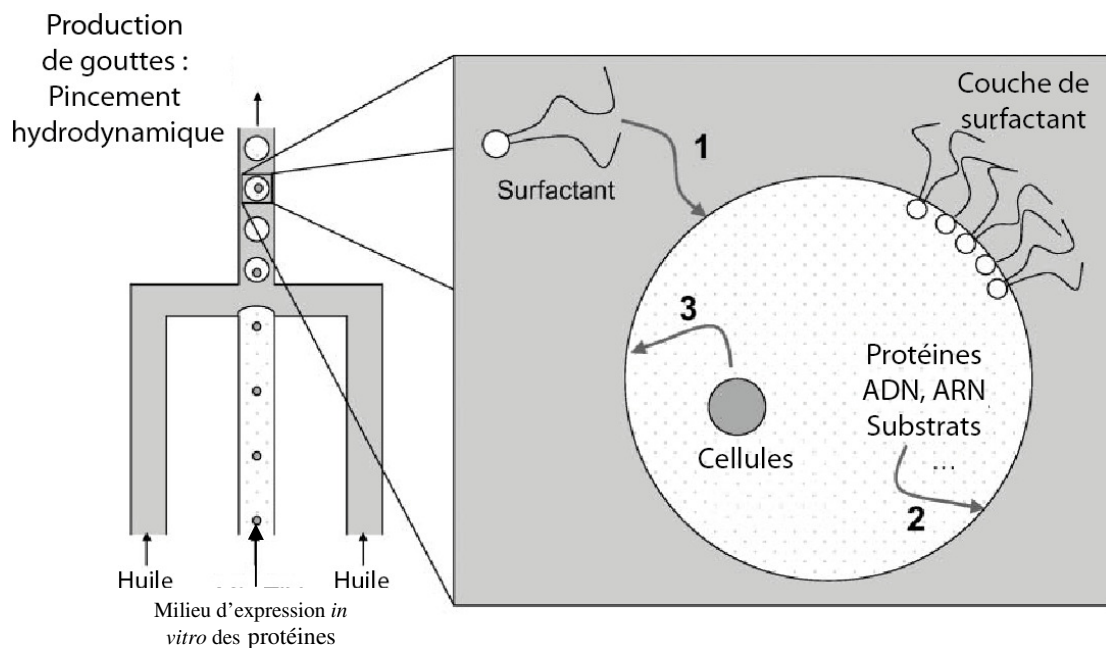


Figure 21: Représentation schématique d'une goutte d'eau-dans-huile utilisée pour l'encapsulation de molécules biologiques (ADN, ARN, protéines), et / ou de cellules. (A gauche) : Les gouttes sont générées dans un système microfluidique ayant une géométrie en « flow focusing ». (A droite) : adsorption des molécules de tensioactifs à l'interface (flèche 1), formant une couche de tensioactif qui stabilise les gouttes et empêche l'adsorption des biomolécules et des cellules à l'interface (flèches 2 et 3) [135].

1.3.2.1 Effet des tensioactifs sur la stabilité des microgouttelettes

Il a été démontré qu'un équilibre entre la longueur du groupement de la tête hydrophile et celui de la queue hydrophobe des tensioactifs avait un rôle majeur pour leur pouvoir stabilisant [125]. Les travaux de *Baret et al.* ont permis la mise au point de modules microfluidiques faisant varier la distance entre le point de création des gouttes et une chambre d'étude de leur coalescence pour étudier le temps nécessaire au tensioactif pour se placer à l'interface eau-huile et de stabiliser les microgouttelettes [133]. Ils ont observé que la stabilité des gouttes dépend de la concentration du tensioactif, qui doit être supérieure à la CMC (Concentration Micellaire Critique), et de la configuration du module microfluidique dans

lequel les gouttes sont créés [133]. *Mazutis et al.* ont, quant à eux, étudié l'effet de la concentration des tensioactifs sur la stabilisation des microgouttelettes pour mettre au point une nouvelle stratégie de fusion appelée la fusion passive [142].

1.3.2.2 Effet des tensioactifs sur la biocompatibilité

Pour que des réactions biologiques (telles que l'expression *in vitro* de protéines, l'amplification de l'ADN ou des réactions enzymatiques puissent se faire en gouttes) il est primordial que le tensioactif utilisé pour stabiliser ces dernières soit compatible avec les entités biologiques (par exemple qu'il n'inhibe pas les enzymes ou les cellules). La biocompatibilité d'un tensioactif peut par exemple être testée avec des cellules humaines, *Clausell-Tormos et al.* ont étalés des cellules humaines vivantes sur une couche de tensioactif et ont mesuré leur taux de survie au cours du temps. Ce test a été réalisé avec un certain nombre de tensioactifs, différents par le groupement hydrophile de leur tête et ayant tous la même queue PFPE (Perfluoropolyether). Seuls les tensioactifs contenant les groupements polyéthylèneglycole (PEG) et dimorpholinophosphate (DMP) étaient biocompatibles [140]. *Holtz et al.* ont synthétisé et caractérisé plusieurs tensioactifs qui varient par la longueur de leur tête hydrophile PEG. Seul le tensioactif avec $600\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ PEG et $6000\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ PFPE était le plus biocompatible et permettait l'expression *in vitro* des protéines, la croissance de levures et de cellules humaines en gouttes [135].

1.3.2.3 Les phénomènes d'échange entre les microgouttelettes

La diffusion des composés d'un compartiment à un autre dépend de leur hydrophobicité et de la composition du mélange tensioactif-huile utilisé. *Courtois et al.* en utilisant le tensioactif Abil EM90 dans de l'huile minérale, ont démontré que l'ajout de BSA (Bovine Serum albumine) permettait de réduire la fuite de fluorophore [134] probablement grâce à son pouvoir de s'adsorber à l'interface eau/huile. Cependant, la BSA peut parfois inhiber certaines réactions enzymatiques. Un autre moyen de résoudre les problèmes de fuites de composés hydrophobes est de baisser la concentration du tensioactif utilisé pour stabiliser les gouttes. En effet, l'utilisation d'un tensioactif au dessus de la CMC aboutit à la formation de micelles responsables du transport des composés d'une goutte à une autre ou d'une goutte vers l'huile porteuse [133].

1.3.3 Les modules microfluidiques

Pour la fabrication des dispositifs microfluidiques différents matériaux peuvent être utilisés tels que le verre, le silicone et le PMMA (Poly (methyl metacrylate) [143]. Cependant, grâce à ses caractéristiques avantageuses, le plus communément utilisé reste le PDMS (PolyDiMethylSiloxane) en utilisant la stratégie de la lithographie douce (**Figure 22**) [144]. En effet, ce polymère est connu comme étant un élastomère inerte, non toxique, non inflammable, élastomère, peu coûteux, biocompatible, transparent, isolant, hydrophobe et perméable au gaz. Cependant, le PDMS possède aussi certaines limitations telles que l'évaporation progressive de l'eau, l'autofluorescence [145], l'absorption des solvants organiques ainsi que sa dissolution en milieu acide ou basique [146,147]. La littérature a rapporté un large panel d'applications biologiques et chimiques dans lesquelles le PDMS a été le matériel utilisé pour la fabrication des puces microfluidiques surtout dans les cas où des cellules vivantes sont utilisées et où la perméabilité aux gaz est requise [140,148].

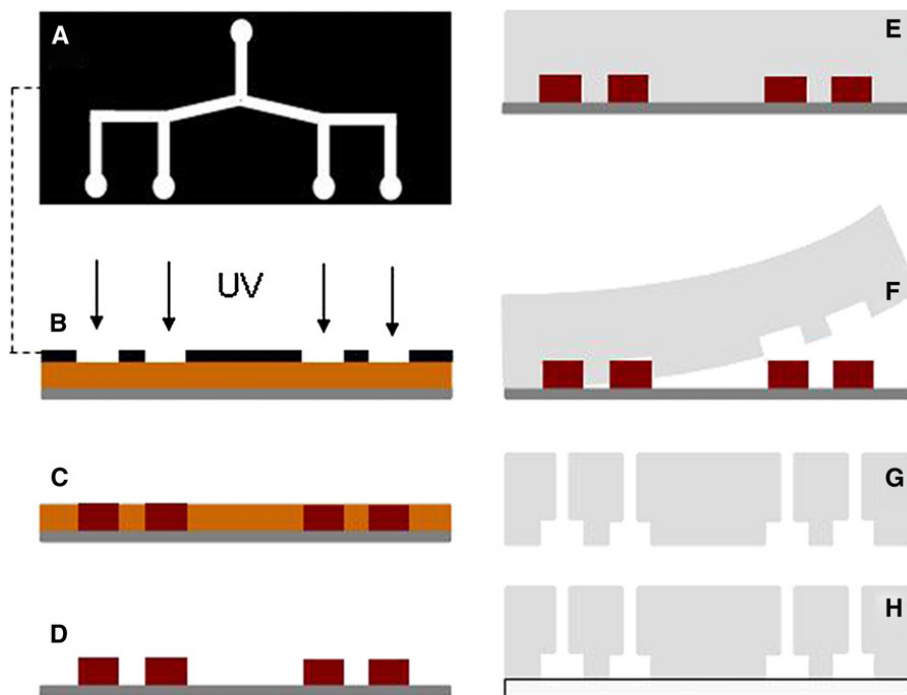


Figure 22 : Les différentes étapes de la fabrication des modules microfluidiques par Lithographie douce. Un photomasque est généré en utilisant un dessin réalisé avec le logiciel Autocad (A) le modèle est projeté sur une galette de silicium (en gris) recouvert d'un polymère photosensible (en brun clair B). L'étape suivante consiste en la polymérisation spécifique des zones exposées (en brun foncé C) et au développement (D). Le moule peut être recouvert avec un élastomère (E) généralement du polydiméthylsiloxane (PDMS en gris clair). Après cuisson, le PDMS polymérisé est décollé et retiré du moule (F). Sur ce PDMS les entrées et les sorties sont percées permettant ainsi leur connexion à des seringues via des tubulures en PTFE (G). Finalement, le polymère est collé à la surface d'une lame de verre (en lignes noires) par traitement UV au plasma (fermant ainsi les canaux par le bas (H)). Image issue de la publication de Vyawahare et al. [149]

Pour la création et la manipulation des microgouttelettes à façon au sein des canaux, un ensemble de modules microfluidiques élémentaires ont été développés et optimisés durant ces dernières années (**Figure 23**). (voir la revue de *Kintses et al.* [150])

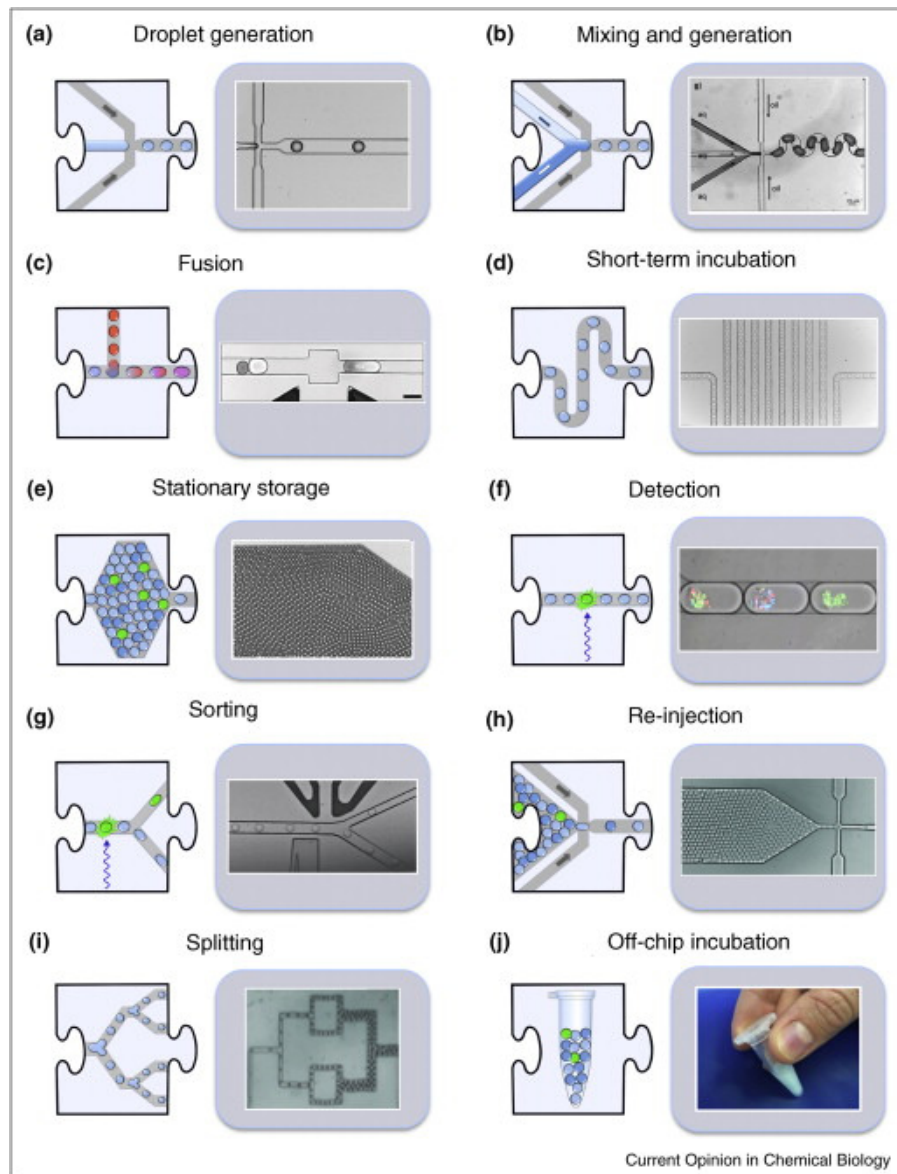


Figure 23 : Représentation des différents modules microfluidiques élémentaires développés (a) création de gouttes, (b) création des gouttes suivie du mélange de leur contenu, (c) fusion active de deux gouttes, (d) ligne de délai : incubation de gouttes, (e) stockage des gouttes sur puce dans un réservoir, (f) analyse de fluorescence, (g) tri actif de gouttes par champ électrique, (h) réinjection de gouttes, (i) division des gouttes, (j) stockage des gouttes hors puce dans un tube. Figure issue de *Kintses et al.* [150].

Une fois les gouttes formées, certaines réactions biologiques ou chimiques nécessitent l'addition d'un ou plusieurs composés pour les démarrer ou les arrêter. Pour ce faire, différentes stratégies de fusion entre deux gouttes ont été développées. Elles peuvent se faire d'une manière active par application d'un champ électrique sur des gouttes chargées

[151] ou non chargées [152,153,154,155], par chauffage induit par des systèmes de laser [131] ou d'une manière passive par fusion de deux gouttes non chargées dont l'une est bien stabilisée par un tensioactif et l'autre l'est faiblement [142]. Il est aussi possible d'ajouter une quantité définie de liquide au sein des gouttes préalablement formées d'une manière active [156] ou d'une manière passive en utilisant le système 'Chemistrode'[157]

Les gouttes peuvent aussi être divisées pour faire des aliquotes par exemple. Ce processus peut se faire d'une manière passive en variant la géométrie des canaux microfluidiques [158,159,160] ou d'une manière active en variant la géométrie des canaux microfluidiques et en appliquant un champ électrique [151,161], par chauffage [162] ou par radiation électromagnétiques [163].

L'incubation des microgouttelettes et de leur contenu peut se faire de différentes manières. Si le temps d'incubation nécessaire à la réaction ciblée est relativement court (< 1h) des puces contenant des lignes de délais en forme de serpent et permettant aux gouttes de rester en mouvement ont été développées [148,164]. Par contre si le temps d'incubation est de longue durée (>1h) le stockage peut se faire de manière statique sur puce, dans des réservoirs [165], des chambres [166] ou des pièges à gouttes [167] ou hors puce : dans des tubes [168], des seringues, des pipettes pasteurs [128] ou des capillaires [169].

Le tri des gouttes, qui est l'étape la plus délicate, peut se faire selon différentes stratégies : les gouttes peuvent être triées d'une manière passive selon leur taille [170] ou d'une manière active nécessitant dans ce cas un système de détection optique en amont. Le tri peut être effectué en temps réel et selon l'intensité de la fluorescence dans les gouttes, par actionnement piézoélectrique [171] ou par un système électronique nommé FADS pour « fluorescence-activated droplet sorting » [128] similaire à un système développé par *Fidalgo et al.* dans lequel les gouttes positives (ciblées) sont extraites dans un flux continu aqueux [172]. La stratégie de tri par le FADS se fait à une fréquence entre 1 et 2 Khz avec de faibles taux de faux positifs (moins de 1 dans 10^4 événements triés).

1.3.4 Exemple de réactions biologiques réalisées en gouttelettes

Des travaux récents ont rapportés que des opérations biologiques élémentaires faites habituellement dans les tubes eppendorfs comme par exemple l'amplification de l'ADN, l'expression *in vitro* et *in vivo* des protéines peuvent être réalisées dans des volumes plus petits et parfois d'une manière plus rapide grâce à la microfluidique en goutte (**Figure 24**). En effet, il est possible d'encapsuler un gène par goutte pour l'amplifier (PCR) ou pour

l'exprimer en protéine (expression *in vitro* de protéines). Cette stratégie offre aussi la possibilité de confiner des microorganismes vivants tels que des bactéries, des levures ou des cellules humaines afin de mesurer l'activité catalytique des enzymes qu'elles expriment (**Figure 24**). Cependant, pour avoir une cellule ou une molécule d'ADN par goutte il est nécessaire de contrôler la concentration de l'échantillon puisque la répartition des composés dans les gouttes suit la distribution de Poisson [128,132,140]:

$$P(X=K) = \frac{\lambda^k \exp(-\lambda)}{k!}$$

- P : La probabilité pour que les gouttes contiennent K molécules ciblées.
- K : nombre moyen de molécules ciblées par goutte
- $\lambda = n / N$ avec n : le nombre total des molécules ciblées dans l'échantillon et N : le nombre de gouttes total.

Cette loi annonce que pour avoir au maximum une molécule par goutte, entre 85% et 95% des gouttes seront vides. Malgré ce nombre important de gouttes vides perdues, la stratégie de la microfluidique en gouttes opérant à une cadence entre 100 et 1000Hz se place devant de plusieurs techniques de sélection à haut-débit [150]. Des études récentes ont toutefois réussies à passer outre cette distribution de Poisson aléatoire et augmenter le nombre de gouttes remplies. Ceci s'est fait en utilisant une méthode hydrodynamique [173,174] ou en optimisant l'espacement entre les molécules à encapsuler [175].

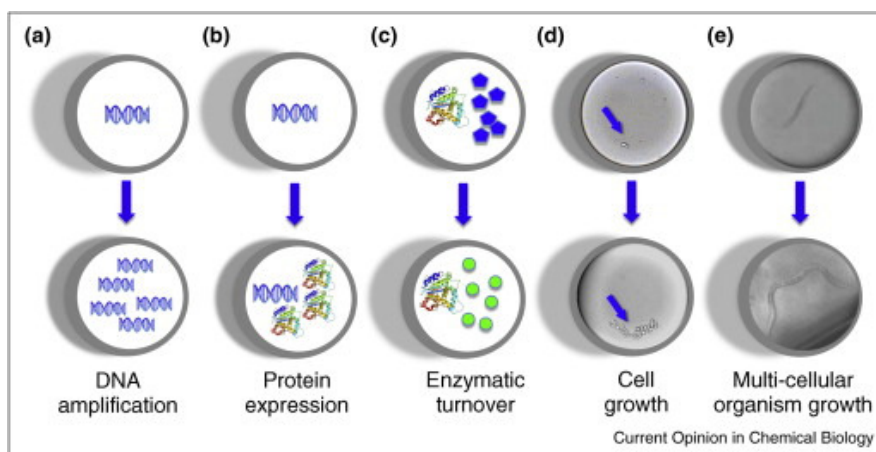


Figure 24 : Exemples d'applications biologiques en gouttelettes. (a) Amplification de l'ADN, (b) expression *in vitro* des protéines, (c) dosage de l'activité enzymatique, (d) prolifération des cellules, (e) développement d'organismes multicellulaires. Image issue de la publication de Kintses et al. [150]

1.3.4.1 L'expression in vitro des protéines

Comme mentionnée plus haut, l'étape critique dans l'évolution dirigée des protéines est l'étape de la sélection. En effet, une fois la banque de variants génétiques créée il est primordial de pouvoir l'analyser à haut-débit et efficacement en modulant selon les besoins les conditions de sélection. La microfluidique en gouttes produisant des millions de micro-compartiments, mimant des millions de cellules artificielles, permet de faire le lien génotype-phénotype. La banque de variants, diluée de façon à n'avoir qu'un gène par goutte, est encapsulée dans des gouttes en présence de la machinerie permettant l'expression *in vitro* des protéines et du substrat permettant de révéler la catalyse. L'avantage de l'expression *in vitro* de protéines en gouttes est qu'elle permet généralement l'expression de tout types de protéines même ceux qui peuvent être toxiques pour les cellules en plus du fait que les conditions de sélection telles que la température, le pH, la présence ou non de solvants peuvent être modulées à volonté. *Ditrich et al.* ont été les premiers à décrire le succès de l'expression *in vitro* de protéines au sein de gouttes en utilisant comme modèle une protéine rapporteuse, la GFP ou « green fluorescent protein » [176]. Quelques années plus tard, *Holtze et al.* ont pu détecter l'activité de l'enzyme β -galactosidase en encapsulant dans des microgouttelettes quelques centaines de gènes codant pour cette enzyme avec la machinerie nécessaire à l'expression *in vitro* et le substrat fluorogénique adéquat [135]. Dans certains cas particuliers, où les étapes d'expression *in vitro* et catalytique sont incompatibles, il est possible de les découpler en utilisant une des stratégies de fusion de gouttes mentionnées plus haut [154].

1.3.4.2 L'amplification de l'ADN

Un autre outil important pour l'évolution dirigée des protéines est la PCR. En effet, la PCR en gouttes permet de passer outre la nécessité d'encapsuler quelques centaines de gènes par goutte. Différentes stratégies et géométries microfluidiques permettant l'amplification des gènes en gouttes, grâce à un gradient de températures, ont été développées. *Schaerli et al.* ont optimisé un module microfluidique avec une géométrie radiale dans lequel la partie interne permet de réaliser l'étape de dénaturation de l'ADN et la partie périphérique assure les étapes d'hybridation et d'élongation [177]. *Kiss et al.* ont développé un module microfluidique avec une géométrie en forme de serpent dans lequel les gouttes passent par des zones permettant la dénaturation puis l'hybridation et l'élongation de l'ADN [178]. En utilisant ces deux géométries il a été possible d'effectuer 34 cycles. Il est aussi possible de

réaliser une PCR en goutte hors puce, dans des tubes Eppendorf, en utilisant un thermocycleur de paillasse [168,179]. Des travaux plus récents ont été développés pour amplifier l'ADN en goutte et à température ambiante (PCR isotherme) en utilisant la HRCA ou la « Hyperbranched Rolling Circle Amplification » [126].

1.3.4.3 L'encapsulation de cellules pour mesurer l'activité catalytique des enzymes

Les systèmes *in vivo* (bactéries, levures, virus) sont de plus en plus utilisés dans l'évolution dirigée des protéines en raison de leur capacité à surexprimer les enzymes « monoclonales ». Des travaux décrivant l'encapsulation de bactéries [180], de levures [132] et de cellules humaines [148] ont récemment été rapportés. *Huebner et al.*, ont développés un système microfluidique permettant de mesurer l'activité catalytique en gouttes d'une phosphatase alcaline, une enzyme périplasmique, exprimée dans *E.coli* avec en moyenne 10 cellules par goutte. La vitesse catalytique de cette enzyme, mesurée en gouttes, coïncidait avec celle mesurée en bulk [136]. *Baret et al.* ont mis au point une plateforme microfluidique pour la mesure en goutte de l'activité de la β -galactosidase exprimée dans *E.coli* à hauteur d'1 bactérie par goutte. Ils ont démontré la pertinence de ce système à trier des gouttes contenant des bactéries exprimant une β -gal active de gouttes contenant des bactéries exprimant une β -gal inactive [128].

1.4 Objectif de la thèse

Face à la baisse considérable des énergies fossiles et des ressources naturelles, différents types de biopiles à combustible ont été développés et optimisés. Ces systèmes sont capables de convertir l'énergie chimique en énergie électrique à partir de ressources renouvelables grâce à des catalyseurs biologiques. Les deux problèmes majeurs des biopiles sont les faibles puissances qu'elles génèrent (cela varie de 10^{-6} à 10^{-3} Watt) et leur courte durée de vie (varie de quelques jours à quelques mois). Afin de résoudre ces problèmes et augmenter les performances des biopiles, la plupart des travaux de recherche se sont principalement axés sur le développement de nouvelles stratégies pour améliorer le transfert d'électrons ainsi que sur l'optimisation des méthodes d'immobilisation des enzymes sur les électrodes. Nous pensons que l'évolution dirigée des biocatalyseurs par des cycles répétitifs de mutagenèse/sélection permettrait d'augmenter leur activité dans ce nouvel environnement que constitue la biopile. Pour la création de la banque de variants, la stratégie choisie est l'introduction de mutations artificielles et aléatoires dans le gène codant pour la protéine d'intérêt. Pour la sélection des enzymes optimisées, nous avons choisi la technique de la compartimentation *in vitro* (IVC) couplée à la microfluidique, développée au sein de notre laboratoire. Cette méthode permet de créer des gouttes d'eau-dans-huile de taille homogène (variant de 10^{-5} à 10^{-10} litre), de les manipuler à volonté, de détecter la fluorescence de leur contenu et de les trier en se basant sur cette fluorescence afin de récupérer le variant désiré.

Mon projet de thèse consiste à créer, par évolution dirigée, des biocatalyseurs spécialement adaptés à fonctionner dans les conditions de fonctionnement de biopile. Il s'intègre dans un projet plus large visant au développement et à l'optimisation d'une biopile utilisant l'éthanol comme combustible. Pour le compartiment anodique, nous avons choisi de tester et d'optimiser différentes Pyrrolo-Quinone-Quinone-alcool déshydrogénases (PQQ-ADH) réalisant l'oxydation de l'éthanol en acide acétique. Une fois les électrons transférés au compartiment cathodique, une laccase bactérienne extrémophile se charge de la réduction du dioxygène en eau. Le passage des électrons vers la cathode génère un courant proportionnel aux taux de catalyse au niveau des électrodes. Les PQQ-ADH choisies sont des enzymes bactériennes, solubles, localisées dans la partie périplasmique de la bactérie pouvant extraire quatre électrons de leur substrat pour les fournir à la chaîne respiratoire. De plus, leur cofacteur PQQ, contrairement au NAD(P), a l'avantage d'être régénéré au cours du cycle catalytique. Ces enzymes sont : la type-I dimérique ou QEDH et la type-II monomérique ou QHEDH. Les laccases choisies sont des enzymes à cuivre bactériennes, de *Bacillus subtilis*,

localisées dans la partie cytoplasmique de la bactérie. Pour la mesure de l'activité de ces enzymes cathodique et anodique en goutte, deux tests fluorogéniques différents ont été développés. Pour les PQQ-ADH, le test s'est basé sur la réduction d'une molécule fluorogénique (la résazurine) pour produire un fluorophore (la résorufine) une fois que l'éthanol est oxydé en acide acétique par les enzymes. La détection de l'activité de la laccase se fait par oxydation d'une molécule fluorogénique (l'amplexRed) pour produire un fluorophore (la résorufine), une fois l'oxygène réduit en eau par les enzymes. Par la suite, nous avons développé et optimisé deux plateformes microfluidiques de sélection des biocatalyseurs anodique et cathodique. L'une permet de sélectionner les enzymes exprimées *in vitro* en gouttes et l'autre de sélectionner les enzymes exprimées *in vivo* (*E. coli*) en gouttes. Le Dr L. Mazutis a développé au début de sa thèse dans notre laboratoire, la plateforme de sélection des PQQ-ADH exprimée *in vitro* dans les gouttes. Puis je me suis ensuite jointe à lui pour développer la plateforme de sélection des laccases exprimées *in vitro* dans les gouttes. Ce pendant, mes travaux de thèse se sont focalisés, essentiellement et dans un premier temps, sur le développement des plateformes de sélection des PQQ-ADH et la laccase exprimées *in vivo*. Après avoir réalisé les premiers travaux démontrant l'efficacité du test de la laccase exprimée *in vivo* dans les gouttes, cette partie a été confiée à Thomas Beneyton, un doctorant de notre laboratoire qui était en charge de la partie concernant l'étude des stratégies d'immobilisation des biocatalyseurs anodiques et cathodiques modèles sur différents types d'électrodes. Finalement, les deux étapes majeures de mon travail de thèse ont consisté à développer la plateforme microfluidique de sélection des PQQ-ADH exprimée *in vivo* (par exemple le contrôle des échanges entre les gouttes, le choix du tensioactif adapté au test, la stratégie de récupération des variants sélectionnés) et la validation de sa pertinence avec une sélection modèle utilisant une des deux PQQ-ADH choisie.

1.5 Références bibliographiques

- [1] R.A. Bullen, T.C. Arnot, J.B. Lakeman, F.C. Walsh, Biofuel cells and their development, *Biosens Bioelectron* 21 (2006) 2015-2045.
- [2] A.T. Yahiro, S.M. Lee, D.O. Kimble, Bioelectrochemistry. I. Enzyme Utilizing Bio-Fuel Cell Studies, *Biochim Biophys Acta* 88 (1964) 375-383.
- [3] M.H. Osman, A.A. Shah, F.C. Walsh, Recent progress and continuing challenges in bio-fuel cells. Part I: enzymatic cells, *Biosens Bioelectron* 26 (2011) 3087-3102.
- [4] S. Fishilevich, L. Amir, Y. Fridman, A. Aharoni, L. Alfonta, Surface display of redox enzymes in microbial fuel cells, *J Am Chem Soc* 131 (2009) 12052-12053.
- [5] M.N. Germain, R.L. Arechederra, S.D. Minter, Nitroaromatic actuation of mitochondrial bioelectrocatalysis for self-powered explosive sensors, *J Am Chem Soc* 130 (2008) 15272-15273.
- [6] D. Bhatnagar, S. Xu, C. Fischer, R.L. Arechederra, S.D. Minter, Mitochondrial biofuel cells: expanding fuel diversity to amino acids, *Phys Chem Chem Phys* 13 (2011) 86-92.
- [7] H. Moon, I.S. Chang, B.H. Kim, Continuous electricity production from artificial wastewater using a mediator-less microbial fuel cell, *Bioresour Technol* 97 (2006) 621-627.
- [8] S.C. Barton, J. Gallaway, P. Atanassov, Enzymatic biofuel cells for implantable and microscale devices, *Chem Rev* 104 (2004) 4867-4886.
- [9] J. Kim, H. Jia, P. Wang, Challenges in biocatalysis for enzyme-based biofuel cells, *Biotechnol Adv* 24 (2006) 296-308.
- [10] C.M. Moore, S.D. Minter, R.S. Martin, Microchip-based ethanol/oxygen biofuel cell, *Lab Chip* 5 (2005) 218-225.
- [11] D.R. Bond, D.R. Lovley, Evidence for involvement of an electron shuttle in electricity generation by *Geothrix fermentans*, *Appl Environ Microbiol* 71 (2005) 2186-2189.
- [12] A.E. Cass, G. Davis, G.D. Francis, H.A. Hill, W.J. Aston, I.J. Higgins, E.V. Plotkin, L.D. Scott, A.P. Turner, Ferrocene-mediated enzyme electrode for amperometric determination of glucose, *Anal Chem* 56 (1984) 667-671.
- [13] M.J. Moehlenbrock, S.D. Minter, Extended lifetime biofuel cells, *Chem Soc Rev* 37 (2008) 1188-1196.
- [14] H. Kudo, T. Yagi, M.X. Chu, H. Saito, N. Morimoto, Y. Iwasaki, K. Akiyoshi, K. Mitsubayashi, Glucose sensor using a phospholipid polymer-based enzyme immobilization method, *Anal Bioanal Chem* 391 (2008) 1269-1274.
- [15] Z. Zhu, C. Momeu, M. Zakhartsev, U. Schwaneberg, Making glucose oxidase fit for biofuel cell applications by directed protein evolution, *Biosens Bioelectron* 21 (2006) 2046-2051.
- [16] J.A. Cracknell, K.A. Vincent, F.A. Armstrong, Enzymes as working or inspirational electrocatalysts for fuel cells and electrolysis, *Chem Rev* 108 (2008) 2439-2461.
- [17] J.A. Duine, R.A. van der Meer, B.W. Groen, The cofactor pyrroloquinoline quinone, *Annu Rev Nutr* 10 (1990) 297-318.
- [18] P.M. Goodwin, C. Anthony, The biochemistry, physiology and genetics of PQQ and PQQ-containing enzymes, *Adv Microb Physiol* 40 (1998) 1-80.
- [19] S.Y. Reddy, T.C. Bruice, Determination of enzyme mechanisms by molecular dynamics: studies on quinoproteins, methanol dehydrogenase, and soluble glucose dehydrogenase, *Protein Sci* 13 (2004) 1965-1978.
- [20] X.C. Zhang, A. Ranta, A. Halme, Direct methanol biocatalytic fuel cell--considerations of restraints on electron transfer, *Biosens Bioelectron* 21 (2006) 2052-2057.
- [21] C. Anthony, Quinoprotein-catalysed reactions, *Biochem J* 320 (Pt 3) (1996) 697-711.

- [22] Y. Xiao, F. Patolsky, E. Katz, J.F. Hainfeld, I. Willner, "Plugging into Enzymes": nanowiring of redox enzymes by a gold nanoparticle, *Science* 299 (2003) 1877-1881.
- [23] M. Zayats, E. Katz, R. Baron, I. Willner, Reconstitution of apo-glucose dehydrogenase on pyrroloquinoline quinone-functionalized Au nanoparticles yields an electrically contacted biocatalyst, *J Am Chem Soc* 127 (2005) 12400-12406.
- [24] F. Patolsky, Y. Weizmann, I. Willner, Long-range electrical contacting of redox enzymes by SWCNT connectors, *Angew Chem Int Ed Engl* 43 (2004) 2113-2117.
- [25] K.A. Vincent, A. Parkin, F.A. Armstrong, Investigating and exploiting the electrocatalytic properties of hydrogenases, *Chem Rev* 107 (2007) 4366-4413.
- [26] K.A. Vincent, J.A. Cracknell, O. Lenz, I. Zebger, B. Friedrich, F.A. Armstrong, Electrocatalytic hydrogen oxidation by an enzyme at high carbon monoxide or oxygen levels, *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 (2005) 16951-16954.
- [27] T. Chen, S.C. Barton, G. Binyamin, Z. Gao, Y. Zhang, H.H. Kim, A. Heller, A miniature biofuel cell, *J Am Chem Soc* 123 (2001) 8630-8631.
- [28] N. Mano, J.L. Fernandez, Y. Kim, W. Shin, A.J. Bard, A. Heller, Oxygen is electroreduced to water on a "wired" enzyme electrode at a lesser overpotential than on platinum, *J Am Chem Soc* 125 (2003) 15290-15291.
- [29] T. Ikeda, K. Kano, An electrochemical approach to the studies of biological redox reactions and their applications to biosensors, bioreactors, and biofuel cells, *J Biosci Bioeng* 92 (2001) 9-18.
- [30] H. Tatsumi, K. Takagi, M. Fujita, K. Kano, T. Ikeda, Electrochemical study of reversible hydrogenase reaction of *Desulfovibrio vulgaris* cells with methyl viologen as an electron carrier, *Anal Chem* 71 (1999) 1753-1759.
- [31] A. Ramanavicius, A. Kausaite, A. Ramanaviciene, Biofuel cell based on direct bioelectrocatalysis, *Biosens Bioelectron* 20 (2005) 1962-1967.
- [32] A. Pizzariello, M. Stred'ansky, S. Miertus, A glucose/hydrogen peroxide biofuel cell that uses oxidase and peroxidase as catalysts by composite bulk-modified bioelectrodes based on a solid binding matrix, *Bioelectrochemistry* 56 (2002) 99-105.
- [33] A. Ghindilis, Direct electron transfer catalysed by enzymes: application for biosensor development, *Biochem Soc Trans* 28 (2000) 84-89.
- [34] T. Ikeda, K. Kano, Bioelectrocatalysis-based application of quinoproteins and quinoprotein-containing bacterial cells in biosensors and biofuel cells, *Biochim Biophys Acta* 1647 (2003) 121-126.
- [35] H.P. Bennetto, J.L. Stirling, K. Tanaka, C.A. Vega, Anodic reactions in microbial fuel cells, *Biotechnol Bioeng* 25 (1983) 559-568.
- [36] L. Cao, Immobilised enzymes: science or art?, *Curr Opin Chem Biol* 9 (2005) 217-226.
- [37] N. Mano, F. Mao, W. Shin, T. Chen, A. Heller, A miniature biofuel cell operating at 0.78 V, *Chem Commun (Camb)* (2003) 518-519.
- [38] C.M. Moore, N.L. Akers, A.D. Hill, Z.C. Johnson, S.D. Minter, Improving the environment for immobilized dehydrogenase enzymes by modifying Nafion with tetraalkylammonium bromides, *Biomacromolecules* 5 (2004) 1241-1247.
- [39] S. Rubenwolf, S. Kerzenmacher, R. Zengerle, F. von Stetten, Strategies to extend the lifetime of bioelectrochemical enzyme electrodes for biosensing and biofuel cell applications, *Appl Microbiol Biotechnol* 89 (2011) 1315-1322.
- [40] T.S. Wong, U. Schwaneberg, Protein engineering in bioelectrocatalysis, *Curr Opin Biotechnol* 14 (2003) 590-596.
- [41] N. Yuhashi, M. Tomiyama, J. Okuda, S. Igarashi, K. Ikebukuro, K. Sode, Development of a novel glucose enzyme fuel cell system employing protein engineered PQQ glucose dehydrogenase, *Biosens Bioelectron* 20 (2005) 2145-2150.

- [42] J. Okuda, K. Sode, PQQ glucose dehydrogenase with novel electron transfer ability, *Biochem Biophys Res Commun* 314 (2004) 793-797.
- [43] S.D. Minteer, N.L. Akers, C.M. Moore, Development of alcohol/O₂ biofuel cells using salt-extracted tetrabutylammonium bromide/Nafion membranes to immobilize dehydrogenase enzymes, *Electrochimica Acta* 50 (2005) 2521-2525.
- [44] A. Ramanavicius, A. Kausaite, A. Ramanaviciene, Enzymatic biofuel cell based on anode and cathode powered by ethanol, *Biosens Bioelectron* 24 (2008) 767-772.
- [45] A. Oubrie, H.J. Rozeboom, K.H. Kalk, E.G. Huizinga, B.W. Dijkstra, Crystal structure of quinoxinoprotein alcohol dehydrogenase from *Comamonas testosteroni*: structural basis for substrate oxidation and electron transfer, *J Biol Chem* 277 (2002) 3727-3732.
- [46] L. Yuan, I. Kurek, J. English, R. Keenan, Laboratory-directed protein evolution, *Microbiol Mol Biol Rev* 69 (2005) 373-392.
- [47] H. Tao, V.W. Cornish, Milestones in directed enzyme evolution, *Curr Opin Chem Biol* 6 (2002) 858-864.
- [48] T. Payot, F. Nachon, D. Rochu, D. Fournier, P. Masson, Optimiser les enzymes, mutagenèse et évolution dirigées, *Annales Pharmaceutiques Françaises* Vol 65, N° 2 (2007).
- [49] T.W. Wang, H. Zhu, X.Y. Ma, T. Zhang, Y.S. Ma, D.Z. Wei, Mutant library construction in directed molecular evolution: casting a wider net, *Mol Biotechnol* 34 (2006) 55-68.
- [50] C. Neylon, Chemical and biochemical strategies for the randomization of protein encoding DNA sequences: library construction methods for directed evolution, *Nucleic Acids Res* 32 (2004) 1448-1459.
- [51] D. Shortle, D. Nathans, Local mutagenesis: a method for generating viral mutants with base substitutions in preselected regions of the viral genome, *Proc Natl Acad Sci U S A* 75 (1978) 2170-2174.
- [52] J.O. Deshler, A simple method for randomly mutating cloned DNA fragments by using chemical mutagens and the polymerase chain reaction, *Genet Anal Tech Appl* 9 (1992) 103-106.
- [53] A. Greener, M. Callahan, B. Jerpseth, An efficient random mutagenesis technique using an *E. coli* mutator strain, *Methods Mol Biol* 57 (1996) 375-385.
- [54] U.T. Bornscheuer, J. Altenbuchner, H.H. Meyer, Directed evolution of an esterase: screening of enzyme libraries based on pH-indicators and a growth assay, *Bioorg Med Chem* 7 (1999) 2169-2173.
- [55] A.A. Amara, A. Steinbuchel, B.H. Rehm, In vivo evolution of the *Aeromonas punctata* polyhydroxyalkanoate (PHA) synthase: isolation and characterization of modified PHA synthases with enhanced activity, *Appl Microbiol Biotechnol* 59 (2002) 477-482.
- [56] H. Murakami, T. Hoshika, M. Sisido, Random insertion and deletion of arbitrary number of bases for codon-based random mutation of DNAs, *Nat Biotechnol* 20 (2002) 76-81.
- [57] S. Brakmann, Discovery of superior enzymes by directed molecular evolution, *Chembiochem* 2 (2001) 865-871.
- [58] M. Zaccolo, D.M. Williams, D.M. Brown, E. Gherardi, An approach to random mutagenesis of DNA using mixtures of triphosphate derivatives of nucleoside analogues, *J Mol Biol* 255 (1996) 589-603.
- [59] J.K. McCarthy, A. Uzelac, D.F. Davis, D.E. Eveleigh, Improved catalytic efficiency and active site modification of 1,4-beta-D-glucan glucohydrolase A from *Thermotoga neapolitana* by directed evolution, *J Biol Chem* 279 (2004) 11495-11502.
- [60] P.C. Cirino, K.M. Mayer, D. Umeno, Generating mutant libraries using error-prone PCR, *Methods Mol Biol* 231 (2003) 3-9.
- [61] C. Wang, M.K. Oh, J.C. Liao, Directed evolution of metabolically engineered *Escherichia coli* for carotenoid production, *Biotechnol Prog* 16 (2000) 922-926.

- [62] M.S. Horwitz, L.A. Loeb, Promoters selected from random DNA sequences, *Proc Natl Acad Sci U S A* 83 (1986) 7405-7409.
- [63] K. Miyazaki, F.H. Arnold, Exploring nonnatural evolutionary pathways by saturation mutagenesis: rapid improvement of protein function, *J Mol Evol* 49 (1999) 716-720.
- [64] J.M. Joern, DNA shuffling, *Methods Mol Biol* 231 (2003) 85-89.
- [65] W.P. Stemmer, Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling, *Nature* 370 (1994) 389-391.
- [66] W.P. Stemmer, DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: in vitro recombination for molecular evolution, *Proc Natl Acad Sci U S A* 91 (1994) 10747-10751.
- [67] H. Zhao, L. Giver, Z. Shao, J.A. Affholter, F.H. Arnold, Molecular evolution by staggered extension process (StEP) in vitro recombination, *Nat Biotechnol* 16 (1998) 258-261.
- [68] A.M. Aguinaldo, F.H. Arnold, Staggered extension process (StEP) in vitro recombination, *Methods Mol Biol* 231 (2003) 105-110.
- [69] W.M. Coco, W.E. Levinson, M.J. Crist, H.J. Hektor, A. Darzins, P.T. Pienkos, C.H. Squires, D.J. Monticello, DNA shuffling method for generating highly recombined genes and evolved enzymes, *Nat Biotechnol* 19 (2001) 354-359.
- [70] W.M. Coco, RACHITT: Gene family shuffling by Random Chimeragenesis on Transient Templates, *Methods Mol Biol* 231 (2003) 111-127.
- [71] U.T. Bornscheuer, Methods to increase enantioselectivity of lipases and esterases, *Curr Opin Biotechnol* 13 (2002) 543-547.
- [72] J.P. Goddard, J.L. Reymond, Enzyme assays for high-throughput screening, *Curr Opin Biotechnol* 15 (2004) 314-322.
- [73] J.P. Goddard, J.L. Reymond, Recent advances in enzyme assays, *Trends Biotechnol* 22 (2004) 363-370.
- [74] F.C. Christians, L. Scapozza, A. Cramer, G. Folkers, W.P. Stemmer, Directed evolution of thymidine kinase for AZT phosphorylation using DNA family shuffling, *Nat Biotechnol* 17 (1999) 259-264.
- [75] F.H. Arnold, A.A. Volkov, Directed evolution of biocatalysts, *Curr Opin Chem Biol* 3 (1999) 54-59.
- [76] H. Joo, Z. Lin, F.H. Arnold, Laboratory evolution of peroxide-mediated cytochrome P450 hydroxylation, *Nature* 399 (1999) 670-673.
- [77] F. Cedrone, T. Bhatnagar, J.C. Baratti, Colorimetric assays for quantitative analysis and screening of epoxide hydrolase activity, *Biotechnol Lett* 27 (2005) 1921-1927.
- [78] K. Liebeton, A. Zonta, K. Schimossek, M. Nardini, D. Lang, B.W. Dijkstra, M.T. Reetz, K.E. Jaeger, Directed evolution of an enantioselective lipase, *Chem Biol* 7 (2000) 709-718.
- [79] M.T. Reetz, Select protocols of high-throughput ee-screening systems for assaying enantioselective enzymes, *Methods Mol Biol* 230 (2003) 283-290.
- [80] P.A. Dalby, Optimising enzyme function by directed evolution, *Curr Opin Struct Biol* 13 (2003) 500-505.
- [81] S.V. Taylor, P. Kast, D. Hilvert, Investigating and Engineering Enzymes by Genetic Selection, *Angew Chem Int Ed Engl* 40 (2001) 3310-3335.
- [82] F. Buchholz, A.F. Stewart, Alteration of Cre recombinase site specificity by substrate-linked protein evolution, *Nat Biotechnol* 19 (2001) 1047-1052.
- [83] S. Becker, H.U. Schmoldt, T.M. Adams, S. Wilhelm, H. Kolmar, Ultra-high-throughput screening based on cell-surface display and fluorescence-activated cell sorting for the identification of novel biocatalysts, *Curr Opin Biotechnol* 15 (2004) 323-329.

- [84] E. Mastrobattista, V. Taly, E. Chanudet, P. Treacy, B.T. Kelly, A.D. Griffiths, High-throughput screening of enzyme libraries: in vitro evolution of a beta-galactosidase by fluorescence-activated sorting of double emulsions, *Chem Biol* 12 (2005) 1291-1300.
- [85] S.F. Ibrahim, G. van den Engh, High-speed cell sorting: fundamentals and recent advances, *Curr Opin Biotechnol* 14 (2003) 5-12.
- [86] K.D. Wittrup, Protein engineering by cell-surface display, *Curr Opin Biotechnol* 12 (2001) 395-399.
- [87] P.S. Daugherty, G. Chen, M.J. Olsen, B.L. Iverson, G. Georgiou, Antibody affinity maturation using bacterial surface display, *Protein Eng* 11 (1998) 825-832.
- [88] P.S. Daugherty, B.L. Iverson, G. Georgiou, Flow cytometric screening of cell-based libraries, *J Immunol Methods* 243 (2000) 211-227.
- [89] M.J. Feldhaus, R.W. Siegel, L.K. Opresko, J.R. Coleman, J.M. Feldhaus, Y.A. Yeung, J.R. Cochran, P. Heinzelman, D. Colby, J. Swers, C. Graff, H.S. Wiley, K.D. Wittrup, Flow-cytometric isolation of human antibodies from a nonimmune *Saccharomyces cerevisiae* surface display library, *Nat Biotechnol* 21 (2003) 163-170.
- [90] A.W. Nguyen, P.S. Daugherty, Evolutionary optimization of fluorescent proteins for intracellular FRET, *Nat Biotechnol* 23 (2005) 355-360.
- [91] M.J. Olsen, D. Stephens, D. Griffiths, P. Daugherty, G. Georgiou, B.L. Iverson, Function-based isolation of novel enzymes from a large library, *Nat Biotechnol* 18 (2000) 1071-1074.
- [92] M. Olsen, B. Iverson, G. Georgiou, High-throughput screening of enzyme libraries, *Curr Opin Biotechnol* 11 (2000) 331-337.
- [93] G. Yang, S.G. Withers, Ultrahigh-throughput FACS-based screening for directed enzyme evolution, *Chembiochem* 10 (2009) 2704-2715.
- [94] Y. Kawarasaki, K.E. Griswold, J.D. Stevenson, T. Selzer, S.J. Benkovic, B.L. Iverson, G. Georgiou, Enhanced crossover SCRATCHY: construction and high-throughput screening of a combinatorial library containing multiple non-homologous crossovers, *Nucleic Acids Res* 31 (2003) e126.
- [95] A. Aharoni, A.D. Griffiths, D.S. Tawfik, High-throughput screens and selections of enzyme-encoding genes, *Curr Opin Chem Biol* 9 (2005) 210-216.
- [96] A. Fernandez-Gacio, M. Uguen, J. Fastrez, Phage display as a tool for the directed evolution of enzymes, *Trends Biotechnol* 21 (2003) 408-414.
- [97] M. Widersten, B. Mannervik, Glutathione transferases with novel active sites isolated by phage display from a library of random mutants, *J Mol Biol* 250 (1995) 115-122.
- [98] S. Cesaro-Tadic, D. Lagos, A. Honegger, J.H. Rickard, L.J. Partridge, G.M. Blackburn, A. Pluckthun, Turnover-based in vitro selection and evolution of biocatalysts from a fully synthetic antibody library, *Nat Biotechnol* 21 (2003) 679-685.
- [99] H. Pedersen, S. Holder, D.P. Sutherlin, U. Schwitter, D.S. King, P.G. Schultz, A method for directed evolution and functional cloning of enzymes, *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (1998) 10523-10528.
- [100] J. Yin, J.H. Mills, P.G. Schultz, A catalysis-based selection for peroxidase antibodies with increased activity, *J Am Chem Soc* 126 (2004) 3006-3007.
- [101] H. Strobel, D. Ladant, J.L. Jestin, In vitro selection for enzymatic activity: a model study using adenylate cyclase, *J Mol Biol* 332 (2003) 1-7.
- [102] M. Fa, A. Radeghieri, A.A. Henry, F.E. Romesberg, Expanding the substrate repertoire of a DNA polymerase by directed evolution, *J Am Chem Soc* 126 (2004) 1748-1754.
- [103] G. Xia, L. Chen, T. Sera, M. Fa, P.G. Schultz, F.E. Romesberg, Directed evolution of novel polymerase activities: mutation of a DNA polymerase into an efficient RNA polymerase, *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (2002) 6597-6602.

- [104] I. Ponsard, M. Galleni, P. Soumillion, J. Fastrez, Selection of metalloenzymes by catalytic activity using phage display and catalytic elution, *Chembiochem* 2 (2001) 253-259.
- [105] T. Matsuura, A. Pluckthun, Selection based on the folding properties of proteins with ribosome display, *FEBS Lett* 539 (2003) 24-28.
- [106] J. Hanes, A. Pluckthun, In vitro selection and evolution of functional proteins by using ribosome display, *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 (1997) 4937-4942.
- [107] R.W. Roberts, J.W. Szostak, RNA-peptide fusions for the in vitro selection of peptides and proteins, *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 (1997) 12297-12302.
- [108] B. Seelig, J.W. Szostak, Selection and evolution of enzymes from a partially randomized non-catalytic scaffold, *Nature* 448 (2007) 828-831.
- [109] G. Georgiou, C. Stathopoulos, P.S. Daugherty, A.R. Nayak, B.L. Iverson, R. Curtiss, 3rd, Display of heterologous proteins on the surface of microorganisms: from the screening of combinatorial libraries to live recombinant vaccines, *Nat Biotechnol* 15 (1997) 29-34.
- [110] C. Garcia-Rodriguez, R. Levy, J.W. Arndt, C.M. Forsyth, A. Razai, J. Lou, I. Geren, R.C. Stevens, J.D. Marks, Molecular evolution of antibody cross-reactivity for two subtypes of type A botulinum neurotoxin, *Nat Biotechnol* 25 (2007) 107-116.
- [111] D. Hilvert, Critical analysis of antibody catalysis, *Annu Rev Biochem* 69 (2000) 751-793.
- [112] D.S. Tawfik, A.D. Griffiths, Man-made cell-like compartments for molecular evolution, *Nat Biotechnol* 16 (1998) 652-656.
- [113] A.D. Griffiths, D.S. Tawfik, Directed evolution of an extremely fast phosphotriesterase by in vitro compartmentalization, *EMBO J* 22 (2003) 24-35.
- [114] A.D. Griffiths, D.S. Tawfik, Miniaturising the laboratory in emulsion droplets, *Trends Biotechnol* 24 (2006) 395-402.
- [115] Y.F. Lee, D.S. Tawfik, A.D. Griffiths, Investigating the target recognition of DNA cytosine-5 methyltransferase HhaI by library selection using in vitro compartmentalisation, *Nucleic Acids Res* 30 (2002) 4937-4944.
- [116] H.M. Cohen, D.S. Tawfik, A.D. Griffiths, Altering the sequence specificity of HaeIII methyltransferase by directed evolution using in vitro compartmentalization, *Protein Eng Des Sel* 17 (2004) 3-11.
- [117] N. Doi, S. Kumadaki, Y. Oishi, N. Matsumura, H. Yanagawa, In vitro selection of restriction endonucleases by in vitro compartmentalization, *Nucleic Acids Res* 32 (2004) e95.
- [118] F.J. Ghadessy, N. Ramsay, F. Boudsocq, D. Loakes, A. Brown, S. Iwai, A. Vaisman, R. Woodgate, P. Holliger, Generic expansion of the substrate spectrum of a DNA polymerase by directed evolution, *Nat Biotechnol* 22 (2004) 755-759.
- [119] F.J. Ghadessy, J.L. Ong, P. Holliger, Directed evolution of polymerase function by compartmentalized self-replication, *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 (2001) 4552-4557.
- [120] V. Taly, B.T. Kelly, A.D. Griffiths, Droplets as microreactors for high-throughput biology, *Chembiochem* 8 (2007) 263-272.
- [121] M. Levy, K.E. Griswold, A.D. Ellington, Direct selection of trans-acting ligase ribozymes by in vitro compartmentalization, *RNA* 11 (2005) 1555-1562.
- [122] K. Bernath, M. Hai, E. Mastrobattista, A.D. Griffiths, S. Magdassi, D.S. Tawfik, In vitro compartmentalization by double emulsions: sorting and gene enrichment by fluorescence activated cell sorting, *Anal Biochem* 325 (2004) 151-157.
- [123] A. Aharoni, L. Gaidukov, S. Yagur, L. Toker, I. Silman, D.S. Tawfik, Directed evolution of mammalian paraoxonases PON1 and PON3 for bacterial expression and catalytic specialization, *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 (2004) 482-487.

- [124] B.T. Kelly, J.C. Baret, V. Taly, A.D. Griffiths, Miniaturizing chemistry and biology in microdroplets, *Chem Commun (Camb)* (2007) 1773-1788.
- [125] A.B. Theberge, F. Courtois, Y. Schaerli, M. Fischlechner, C. Abell, F. Hollfelder, W.T. Huck, Microdroplets in microfluidics: an evolving platform for discoveries in chemistry and biology, *Angew Chem Int Ed Engl* 49 (2010) 5846-5868.
- [126] L. Mazutis, A.F. Araghi, O.J. Miller, J.C. Baret, L. Frenz, A. Janoshazi, V. Taly, B.J. Miller, J.B. Hutchison, D. Link, A.D. Griffiths, M. Ryckelynck, Droplet-based microfluidic systems for high-throughput single DNA molecule isothermal amplification and analysis, *Anal Chem* 81 (2009) 4813-4821.
- [127] T. Thorsen, R.W. Roberts, F.H. Arnold, S.R. Quake, Dynamic pattern formation in a vesicle-generating microfluidic device, *Phys Rev Lett* 86 (2001) 4163-4166.
- [128] J.C. Baret, O.J. Miller, V. Taly, M. Ryckelynck, A. El-Harrak, L. Frenz, C. Rick, M.L. Samuels, J.B. Hutchison, J.J. Agresti, D.R. Link, D.A. Weitz, A.D. Griffiths, Fluorescence-activated droplet sorting (FADS): efficient microfluidic cell sorting based on enzymatic activity, *Lab Chip* 9 (2009) 1850-1858.
- [129] M.R. Bringer, C.J. Gerds, H. Song, J.D. Tice, R.F. Ismagilov, Microfluidic systems for chemical kinetics that rely on chaotic mixing in droplets, *Philos Transact A Math Phys Eng Sci* 362 (2004) 1087-1104.
- [130] L. Ying, A. Bruckbauer, D. Zhou, J. Gorelik, A. Shevchuk, M. Lab, Y. Korchev, D. Klenerman, The scanned nanopipette: a new tool for high resolution bioimaging and controlled deposition of biomolecules, *Phys Chem Chem Phys* 7 (2005) 2859-2866.
- [131] C.N. Baroud, M.R. de Saint Vincent, J.P. Delville, An optical toolbox for total control of droplet microfluidics, *Lab Chip* 7 (2007) 1029-1033.
- [132] J.J. Agresti, E. Antipov, A.R. Abate, K. Ahn, A.C. Rowat, J.C. Baret, M. Marquez, A.M. Klibanov, A.D. Griffiths, D.A. Weitz, Ultrahigh-throughput screening in drop-based microfluidics for directed evolution, *Proc Natl Acad Sci U S A* 107 (2010) 4004-4009.
- [133] J.C. Baret, F. Kleinschmidt, A. El Harrak, A.D. Griffiths, Kinetic aspects of emulsion stabilization by surfactants: a microfluidic analysis, *Langmuir* 25 (2009) 6088-6093.
- [134] F. Courtois, L.F. Olguin, G. Whyte, A.B. Theberge, W.T. Huck, F. Hollfelder, C. Abell, Controlling the retention of small molecules in emulsion microdroplets for use in cell-based assays, *Anal Chem* 81 (2009) 3008-3016.
- [135] C. Holtze, A.C. Rowat, J.J. Agresti, J.B. Hutchison, F.E. Angile, C.H. Schmitz, S. Koster, H. Duan, K.J. Humphry, R.A. Scanga, J.S. Johnson, D. Pisignano, D.A. Weitz, Biocompatible surfactants for water-in-fluorocarbon emulsions, *Lab Chip* 8 (2008) 1632-1639.
- [136] A. Huebner, L.F. Olguin, D. Bratton, G. Whyte, W.T. Huck, A.J. de Mello, J.B. Edel, C. Abell, F. Hollfelder, Development of quantitative cell-based enzyme assays in microdroplets, *Anal Chem* 80 (2008) 3890-3896.
- [137] D. Pekin, Y. Skhiri, J.C. Baret, D. Le Corre, L. Mazutis, C. Ben Salem, F. Millot, A. El Harrak, J.B. Hutchison, J.W. Larson, D.R. Link, P. Laurent-Puig, A.D. Griffiths, V. Taly, Quantitative and sensitive detection of rare mutations using droplet-based microfluidics, *Lab Chip* 11 (2011) 2156-2166.
- [138] J. Clausell-Tormos, A.D. Griffiths, C.A. Merten, An automated two-phase microfluidic system for kinetic analyses and the screening of compound libraries, *Lab Chip* 10 (2010) 1302-1307.
- [139] X. Casadevall i Solvas, A. deMello, Droplet microfluidics: recent developments and future applications, *Chem Commun (Camb)* 47 (2011) 1936-1942.
- [140] J. Clausell-Tormos, D. Lieber, J.C. Baret, A. El-Harrak, O.J. Miller, L. Frenz, J. Blouwolff, K.J. Humphry, S. Koster, H. Duan, C. Holtze, D.A. Weitz, A.D. Griffiths,

- C.A. Merten, Droplet-based microfluidic platforms for the encapsulation and screening of Mammalian cells and multicellular organisms, *Chem Biol* 15 (2008) 427-437.
- [141] J.E. Kreutz, L. Li, L.S. Roach, T. Hatakeyama, R.F. Ismagilov, Laterally mobile, functionalized self-assembled monolayers at the fluoruous-aqueous interface in a plug-based microfluidic system: characterization and testing with membrane protein crystallization, *J Am Chem Soc* 131 (2009) 6042-6043.
- [142] L. Mazutis, J.C. Baret, A.D. Griffiths, A fast and efficient microfluidic system for highly selective one-to-one droplet fusion, *Lab Chip* 9 (2009) 2665-2672.
- [143] S. Mukhopadhyay, S.S. Roy, R.A. D'Sa, A. Mathur, R.J. Holmes, J.A. McLaughlin, Nanoscale surface modifications to control capillary flow characteristics in PMMA microfluidic devices, *Nanoscale Res Lett* 6 (2011) 411.
- [144] D.C. Duffy, J.C. McDonald, O.J. Schueller, G.M. Whitesides, Rapid Prototyping of Microfluidic Systems in Poly(dimethylsiloxane), *Anal Chem* 70 (1998) 4974-4984.
- [145] A. Piruska, I. Nikcevic, S.H. Lee, C. Ahn, W.R. Heineman, P.A. Limbach, C.J. Seliskar, The autofluorescence of plastic materials and chips measured under laser irradiation, *Lab Chip* 5 (2005) 1348-1354.
- [146] J.C. McDonald, D.C. Duffy, J.R. Anderson, D.T. Chiu, H. Wu, O.J. Schueller, G.M. Whitesides, Fabrication of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane), *Electrophoresis* 21 (2000) 27-40.
- [147] J.N. Lee, C. Park, G.M. Whitesides, Solvent compatibility of poly(dimethylsiloxane)-based microfluidic devices, *Anal Chem* 75 (2003) 6544-6554.
- [148] E. Brouzes, M. Medkova, N. Savenelli, D. Marran, M. Twardowski, J.B. Hutchison, J.M. Rothberg, D.R. Link, N. Perrimon, M.L. Samuels, Droplet microfluidic technology for single-cell high-throughput screening, *Proc Natl Acad Sci U S A* 106 (2009) 14195-14200.
- [149] S. Vyawahare, A.D. Griffiths, C.A. Merten, Miniaturization and parallelization of biological and chemical assays in microfluidic devices, *Chem Biol* 17 (2010) 1052-1065.
- [150] B. Kintses, L.D. van Vliet, S.R. Devenish, F. Hollfelder, Microfluidic droplets: new integrated workflows for biological experiments, *Curr Opin Chem Biol* 14 (2010) 548-555.
- [151] D.R. Link, E. Grasland-Mongrain, A. Duri, F. Sarrazin, Z. Cheng, G. Cristobal, M. Marquez, D.A. Weitz, Electric control of droplets in microfluidic devices, *Angew Chem Int Ed Engl* 45 (2006) 2556-2560.
- [152] C. Priest, S. Herminghaus, R. Seemann, Controlled electrocoalescence in microfluidics: Targeting a single lamella, *Applied Physics Letters* 89 (2006).
- [153] M. Zagnoni, C.N. Baroud, J.M. Cooper, Electrically initiated upstream coalescence cascade of droplets in a microfluidic flow, *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys* 80 (2009) 046303.
- [154] L. Mazutis, J.C. Baret, P. Treacy, Y. Skhiri, A.F. Araghi, M. Ryckelynck, V. Taly, A.D. Griffiths, Multi-step microfluidic droplet processing: kinetic analysis of an in vitro translated enzyme, *Lab Chip* 9 (2009) 2902-2908.
- [155] M. Zagnoni, J.M. Cooper, On-chip electrocoalescence of microdroplets as a function of voltage, frequency and droplet size, *Lab Chip* 9 (2009) 2652-2658.
- [156] A.R. Abate, T. Hung, P. Mary, J.J. Agresti, D.A. Weitz, High-throughput injection with microfluidics using picoinjectors, *Proc Natl Acad Sci U S A* 107 (2010) 19163-19166.
- [157] Y. Liu, R.F. Ismagilov, Dynamics of coalescence of plugs with a hydrophilic wetting layer induced by flow in a microfluidic chemistode, *Langmuir* 25 (2009) 2854-2859.

- [158] D.R. Link, S.L. Anna, D.A. Weitz, H.A. Stone, Geometrically mediated breakup of drops in microfluidic devices, *Phys Rev Lett* 92 (2004) 054503.
- [159] D.N. Adamson, D. Mustafi, J.X. Zhang, B. Zheng, R.F. Ismagilov, Production of arrays of chemically distinct nanolitre plugs via repeated splitting in microfluidic devices, *Lab Chip* 6 (2006) 1178-1186.
- [160] H. Song, J.D. Tice, R.F. Ismagilov, A microfluidic system for controlling reaction networks in time, *Angew Chem Int Ed Engl* 42 (2003) 768-772.
- [161] L.Y. Yeo, R.V. Craster, O.K. Matar, Drop manipulation and surgery using electric fields, *J Colloid Interface Sci* 306 (2007) 368-378.
- [162] T.H. Ting, Y.F. Yap, N.T. Nguyen, T.N. Wong, J.C.K. Chai, L. Yobas, Thermally mediated breakup of drops in microchannels, *Applied Physics Letters* 89 (2006).
- [163] C.N. Baroud, M.R. de Saint Vincent, J.P. Delville, An optical toolbox for total control of droplet microfluidics, *Lab on a Chip* 7 (2007) 1029-1033.
- [164] L. Frenz, K. Blank, E. Brouzes, A.D. Griffiths, Reliable microfluidic on-chip incubation of droplets in delay-lines, *Lab Chip* 9 (2009) 1344-1348.
- [165] F. Courtois, L.F. Olguin, G. Whyte, D. Bratton, W.T. Huck, C. Abell, F. Hollfelder, An integrated device for monitoring time-dependent in vitro expression from single genes in picolitre droplets, *Chembiochem* 9 (2008) 439-446.
- [166] C.H. Schmitz, A.C. Rowat, S. Koster, D.A. Weitz, Dropspots: a picoliter array in a microfluidic device, *Lab Chip* 9 (2009) 44-49.
- [167] A. Huebner, D. Bratton, G. Whyte, M. Yang, A.J. Demello, C. Abell, F. Hollfelder, Static microdroplet arrays: a microfluidic device for droplet trapping, incubation and release for enzymatic and cell-based assays, *Lab Chip* 9 (2009) 692-698.
- [168] D. Pekin, Y. Skhiri, J.C. Baret, D. Le Corre, L. Mazutis, C.B. Salem, F. Millot, A. El Harrak, J.B. Hutchison, J.W. Larson, D.R. Link, P. Laurent-Puig, A.D. Griffiths, V. Taly, Quantitative and sensitive detection of rare mutations using droplet-based microfluidics, *Lab Chip* 11 (2011) 2156-2166.
- [169] X.Z. Niu, B. Zhang, R.T. Marszalek, O. Ces, J.B. Edel, D.R. Klug, A.J. deMello, Droplet-based compartmentalization of chemically separated components in two-dimensional separations, *Chem Commun (Camb)* (2009) 6159-6161.
- [170] Y.C. Tan, J.S. Fisher, A.I. Lee, V. Cristini, A.P. Lee, Design of microfluidic channel geometries for the control of droplet volume, chemical concentration, and sorting, *Lab Chip* 4 (2004) 292-298.
- [171] J. Shemesh, A. Bransky, M. Khoury, S. Levenberg, Advanced microfluidic droplet manipulation based on piezoelectric actuation, *Biomedical Microdevices* 12 (2010) 907-914.
- [172] L.M. Fidalgo, G. Whyte, D. Bratton, C.F. Kaminski, C. Abell, W.T. Huck, From microdroplets to microfluidics: selective emulsion separation in microfluidic devices, *Angew Chem Int Ed Engl* 47 (2008) 2042-2045.
- [173] M. Chabert, J.L. Viovy, Microfluidic high-throughput encapsulation and hydrodynamic self-sorting of single cells, *Proc Natl Acad Sci U S A* 105 (2008) 3191-3196.
- [174] J.F. Edd, D. Di Carlo, K.J. Humphry, S. Koster, D. Irimia, D.A. Weitz, M. Toner, Controlled encapsulation of single-cells into monodisperse picolitre drops, *Lab Chip* 8 (2008) 1262-1264.
- [175] A.R. Abate, C.H. Chen, J.J. Agresti, D.A. Weitz, Beating Poisson encapsulation statistics using close-packed ordering, *Lab Chip* 9 (2009) 2628-2631.
- [176] P.S. Dittrich, M. Jahnz, P. Schwille, A new embedded process for compartmentalized cell-free protein expression and on-line detection in microfluidic devices, *Chembiochem* 6 (2005) 811-814.

- [177] Y. Schaerli, R.C. Wootton, T. Robinson, V. Stein, C. Dunsby, M.A. Neil, P.M. French, A.J. Demello, C. Abell, F. Hollfelder, Continuous-flow polymerase chain reaction of single-copy DNA in microfluidic microdroplets, *Anal Chem* 81 (2009) 302-306.
- [178] M.M. Kiss, L. Ortoleva-Donnelly, N.R. Beer, J. Warner, C.G. Bailey, B.W. Colston, J.M. Rothberg, D.R. Link, J.H. Leamon, High-throughput quantitative polymerase chain reaction in picoliter droplets, *Anal Chem* 80 (2008) 8975-8981.
- [179] P. Kumaresan, C.J. Yang, S.A. Cronier, R.G. Blazej, R.A. Mathies, High-throughput single copy DNA amplification and cell analysis in engineered nanoliter droplets, *Anal Chem* 80 (2008) 3522-3529.
- [180] J.U. Shim, L.F. Olguin, G. Whyte, D. Scott, A. Babbie, C. Abell, W.T. Huck, F. Hollfelder, Simultaneous determination of gene expression and enzymatic activity in individual bacterial cells in microdroplet compartments, *J Am Chem Soc* 131 (2009) 15251-15256.

II. Choix des enzymes modèles

II.1 Introduction

Les alcool déshydrogénases dépendantes de la pyrroloquinoline quinone (2,7,9-tricarboxypyrroloquinoline quinone) (PQQ-ADHs) sont des oxydo-réductases qui peuvent être utilisées dans différents domaines comme par exemple la fermentation du vinaigre, la production d'acides pouvant être facilement convertis en vitamine C [1,2] ou les applications analytiques incluant les biocapteurs [3] et les biopiles [4,5,6,7]. Le PQQ au niveau de ces enzymes est lié d'une manière non covalente à l'apoenzyme [8,9,10] et est régénéré au cours du cycle catalytique, ne nécessitant donc pas d'apport continu comme pour les cofacteurs de type NAD par exemple [11,12]. Contrairement aux déshydrogénases classiques, ces enzymes peuvent extraire quatre électrons de leur substrat par oxydation [13].

Les PQQ-ADHs peuvent être divisées en deux groupes en fonction de la présence ou non d'hème(s) au sein de l'enzyme. Le premier regroupe les quinoprotéines qui n'ont que le PQQ comme cofacteur comme par exemple les méthanol déshydrogénases (MDH) issues des bactéries méthylophiles, les glucoses déshydrogénases (GDH) et les alcool déshydrogénases de type-I (ADH-I) issues de différentes souches bactériennes du genre *Pseudomonas* (dont *Pseudomonas aeruginosa*). Le deuxième groupe est constitué des quinohémoprotéines qui contiennent un hème de type *c* en plus du cofacteur PQQ. Les alcool déshydrogénases de type-II (ADH-II) et type-III (ADH-III) qui se trouvent respectivement dans les bactéries du genre *Pseudomonas* et dans les bactéries capables de transformer l'alcool en acide acétique du genre *Acetobacter* et *Gluconobacter* en sont des exemples. Les ADH-I et ADH-II sont des enzymes solubles alors que les ADH-III sont des enzymes liées à la membrane cytoplasmique des bactéries [14]. Le **Tableau** résume les différents types de PQQ-ADHs en spécifiant l'espèce bactérienne dont elles sont issues.

Enzymes	Nature de l'enzyme	Sources
Quinoprotéines capables d'oxyder les alcools		
Méthanol déshydrogénase (MDH)	S	<i>Méthylotrophes</i>
ADH de type I (PQQ)		
Ethanol déshydrogénase (QEDH)	S	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
alcool déshydrogénase (ADHI)	S	<i>Pseudomonas putida</i>
1-Butanol déshydrogénase (BOH)	S	<i>Pseudomonas butanovora</i>
polypropylène glycol déshydrogénase (PPGDH)	S	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
Autres quinoprotéine capable d'oxyder les alcools (PQQ)		
Sorbose/Sorbose déshydrogénase	S	espèces <i>Gluconobacters</i>
glycérol déshydrogénase (GLDH)	M	<i>Pseudogluconobacter saccharoketogènes</i>
Quinohémoprotéines capables d'oxyder les alcools		
ADH de type II (PQQ/hème c)		
Vanillyl alcool ou polyéthylène glycol déshydrogénase (PEGDH)	S	<i>Rhodopseudomonas acidophila</i>
Ethanol déshydrogénase (QHEDH)	S	<i>Comomonas testosteroni</i>
Alcool déshydrogénase (ADHII-B)	S	<i>Pseudomonas putida</i>
Alcool déshydrogénase (ADHI-G)	S	<i>Pseudomonas putida</i>
Polyvinylalcool déshydrogénase (PVADH)	S	<i>Pseudomonas sp.</i>
Tétrahydrofurfuryl alcool déshydrogénase (THFADH)	S	<i>Ralstonia eutropha</i>
1-Butanol déshydrogénase (BDH)	S	<i>Pseudomonas butanovora</i>
ADH de type III (PQQ/hème c/3 hèmes c)		
Alcool déshydrogénase	M	<i>Acetobacter aceti</i>
Alcool déshydrogénase	M	<i>Acetobacter pasteurianus</i>
Alcool déshydrogénase	M	<i>Gluconoactobacter polyoxygènes</i>
Alcool déshydrogénase	M	<i>Acidomonas methanolicus</i>
Alcool déshydrogénase	M	<i>Gluconobacter suboxydans</i>
Autres quinohémoprotéines		
Lupanine hydroxylase (PQQ/hème c)	S	<i>Pseudomonas sp.</i>

Tableau 3 : les différents groupes d'alcool déshydrogénases à PQQ. S : soluble et M : lié à la membrane. Tableau issu de la publication de Toyama et al. [15].

Différentes quinoprotéines alcool déshydrogénases avec des substrats préférentiels ont été isolées et étudiées comme par exemple celles qui oxydent le méthanol [16,17,18], l'éthanol [19,20,21] ou le glycérol [22]. Nous nous intéresserons spécifiquement à la quinoprotéine éthanol déshydrogénase (QEDH) qui a été isolée de *Pseudomonas aeruginosa* [19,23,24,25,26]. Son étude a révélé que c'est une enzyme de type $\alpha_2\beta_2$. La première sous-unité (α) de ~60KDa correspond à la fonction ADH de l'enzyme [19,23] et la fonction de la sous-unité β (de 9KDa) est à ce jour inconnue [27]. Cependant, Diehl et al. ont montré l'expression de l'enzyme sous sa forme α_2 dans *Escherichia coli* en l'absence de la sous-unité β [23]. Comme toutes les quinoprotéines alcool déshydrogénases (ADH de type-I), la QEDH nécessite la présence d'ammoniaque ou d'amines primaires pour être active en plus de d'ions calcium et du PQQ [24,28]. Son K_m pour l'éthanol est de l'ordre de 14 μ M. La structure cristallographique de la QEDH, représentée dans la **Figure 25**, a été caractérisée par Keitel et al [29].

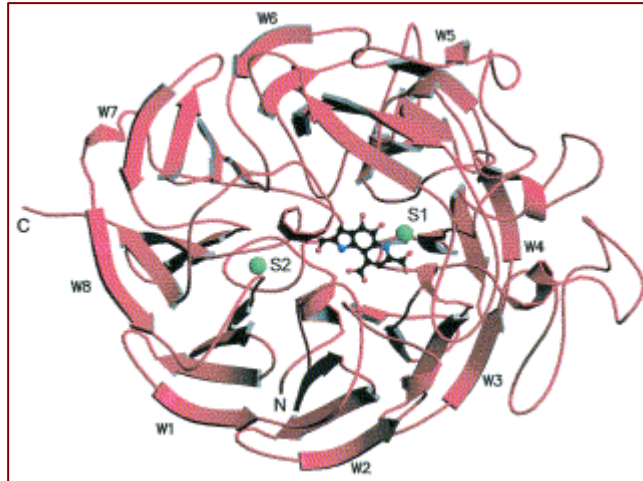


Figure 25: Représentation de la structure tridimensionnelle de la QEDH issue de *Pseudomonas aeruginosa*. L'enzyme présente un repliement de type « β -propeller » à 8 pâles (W1-W8) formées par 4 brins β antiparallèles. Le PQQ se trouve au niveau du site actif et les deux ions calcium (en vert) se trouvent respectivement sur le site de fixation du PQQ (S1) et au niveau du site de fixation N-terminal (S2). Figure issue de la publication de Keitel et al. [29].

Au niveau du site actif des quinoprotéines et des quinohémostéines alcool déshydrogénases deux cystéines adjacentes Cys105 et Cys 106 forment un pont disulfure. Bien que la fonction exacte de ce dernier demeure jusqu'à nos jours inconnu, plusieurs hypothèses ont été suggérées. Avezoux et al. et Oubrie et al. suggèrent qu'il protège le PQQ et qu'il joue un rôle dans le transfert des électrons [30,31]. Comme le montre la **Figure 6**, c'est entre ce pont et un résidu tryptophane que se trouve le complexe PQQ-Ca²⁺ [29].

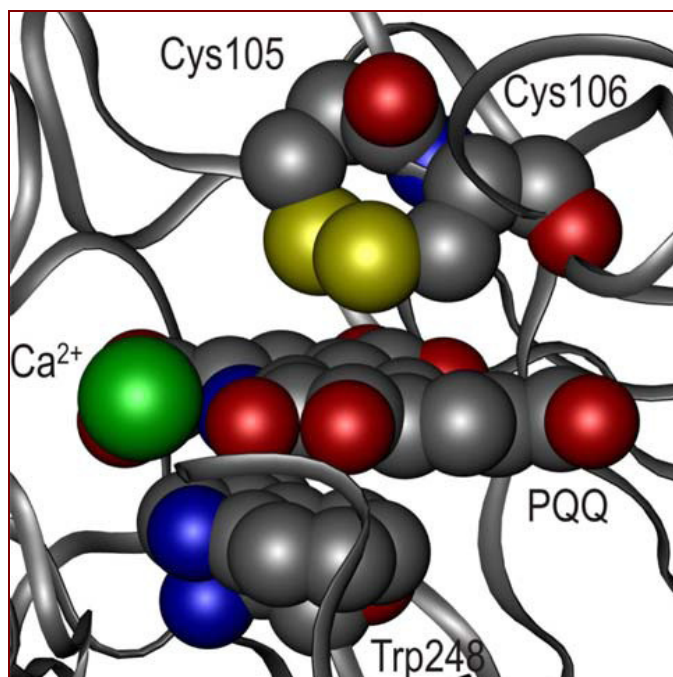


Figure 26 : Représentation du pont disulfure formé par les cystéines 105 et 106 au niveau du site actif de la QEDH de *Pseudomonas aeruginosa*. Le complexe PQQ-Ca²⁺ est formé entre le pont disulfure et un résidu tryptophane (Trp248). Figure issue de Mennenga et al. [21].

Plusieurs ADH-II ont été isolées et caractérisées comme par exemple la Tetrahydrofurfuryl Alcool Déshydrogénase (THFADH) de *Ralstonia eutropha* [32,33], les ADHII-B et ADHII-G de *Pseudomonas putida* HK5 [34,35] ou la quinohémoprotéine éthanol déshydrogénase (QHEDH) isolée de *Comamonas testosteroni*. Cette dernière enzyme a été purifiée et caractérisée par Jong et al. [36]. C'est une enzyme soluble et monomérique (~71 KDa) et contrairement à la QEDH, elle ne nécessite pas d'amines primaires pour son activation [36,37]. Son Km pour l'éthanol est de l'ordre du 5mM. Sa structure tridimensionnelle illustrée dans la **Figure 27** a été déterminée par Oubrie et al. [13]. Elle est constituée de deux domaines séparés par un linker. Le domaine N-terminal possède un repliement de type « β -propeller » et est lié à un PQQ et un ion calcium au sein de son site actif. Le domaine C-terminal est un cytochrome *c* de type-I avec un repliement en hélice alpha [38]. L'expression *in vivo* de la QHEDH dans *E. coli* a été décrite par Stroovel et al. [38]. Cependant les auteurs ont constaté que ce résultat n'était pas reproductible, c'est pour cela que cette enzyme est maintenant extraite directement de *Comamonas testosteroni* (Communication personnelle du Prof J.A. Jongejan, responsable de l'étude citée).



Figure 27 : Représentation de la structure tridimensionnelle de la QHEDH. En bleu est représenté le domaine catalytique lié au PQQ, en jaune le cytochrome *c* et en rouge le linker qui relie le cytochrome *c* et le domaine catalytique. Le PQQ et l'hème de type *c* sont représentés en modèles de type « boules et bâtonnets ». Structure issue de la publication d'Oubrie et al. [13].

Finalement, les ADH-III sont constituées de trois sous unités dont une sous-unité catalytique de type quinohémoпротеine (contenant un PQQ et un hème comme cofacteurs) et une sous unité constituée d'un cytochrome *c* contenant 3 hèmes. Ces enzymes sont liées à la membrane cytoplasmique des bactéries acétiques et sont capables d'oxyder un large panel de substrats [15,39]. Des études ont montré que ces enzymes immobilisées sur des électrodes avaient une bonne capacité à transférer les électrons sans utiliser de médiateurs [5,40]. De ce fait plusieurs biopiles à combustible ont été développées en utilisant ces enzymes [40,41,42].

Pour les travaux de ce chapitre, nous avons choisi d'étudier deux alcool déshydrogénases solubles : une de type-I (la QEDH) et une de type-II (la QHEDH). Nous avons développé les outils nécessaires pour l'expression *in vitro* et *in vivo* de ces dernières. Pour l'expression de la QHEDH, nous avons été amené à tronquer sa partie cytochrome *c* et à caractériser l'enzyme qui en a résulté (nommé dans le reste de ce chapitre « QHEDH sans cytochrome *c* »). Les deux enzymes, une fois purifiées, ont permis de développer un test fluorogénique permettant la détection de leur activité en gouttes et de réaliser les études d'électrochimie en collaboration le Pr. P. Hellwig (Laboratoire de Spectroscopie Vibrationnelle et Electrochimie des Biomolécules à l'Institut de Chimie de Strasbourg). Nous avons ensuite comparé l'expression *in vivo* et *in vitro* de la QEDH et de la QHEDH sans cytochrome *c* dans des gouttes d'eau-dans-l'huile afin de déterminer la meilleure enzyme

candidate et également valider une procédure adaptée de sélection en systèmes microfluidiques qui permettra la création de biocatalyseurs optimisés (voir **Chapitre 3**).

II.2 Matériel et Méthodes

II.2.1 Les réactifs

- Les alcools (1-pentanol, 2-butanol, éthanol, 1-butanol, 2-propanol, 1-octanol), le 1-3-butandiol, l'acétaldéhyde et l'alcool benzyle ont été achetés chez BDH (Willmar, États-Unis).
- La phénazine méthosulfate (PMS, 99%), le sodium 2, 6-dichloroindophenolate hydrate (DCIP), le N, N'-N'-tetraméthyl-p-phenylenediamine (Wurster's Blue, 99%), la résazurine, le potassium ferricyanide (III) l'éthylamine hydrochloride et l'ampicilline ont été achetés chez Sigma-Aldrich (Milwaukee, États-Unis).
- Le PQQ (Methoxatin) et l'éthylamine ont été achetés chez Fluka (Buchs, Suisse).
- L'isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) est de chez Roche (Meylan, France).
- Le Tris-HCl provient d'US Biological (Orlando, États-Unis).
- Le CaCl₂ provient de VWR (West Chester, États-Unis).
- Les amiconUltra-15, Ultracel-50kDa proviennent de Millipore (Molsheim, France).

II.2.2 Les enzymes de restrictions

- Les enzymes de restriction et la T4-DNA ligase ont été achetées chez New England Biolabs (Ipswich, États-Unis)
- L'AmpliTaQ Gold a été achetée chez Applied Biosystem (Foster City, États-Unis).

II.2.3 Les plasmides utilisés pour les clonages

- Le plasmide d'expression *in vivo* pPB10 [43] nous a été offert par le Professeur P. Barker (Université de Cambridge, Royaume-Uni).
- Les plasmides d'expression *in vitro* pIVEX2.1-MCS proviennent de Roche (Meylan, France).

II.2.4 Les souches bactériennes utilisées pour le clonage et l'expression des protéines

- Les bactéries *E. Coli* d'amplification XL10-gold ont été achetées chez Agilent technologies (Massy, France).
- Les bactéries *E. coli* d'expression C41(DE3) [44] nous ont été offertes par le Prof. Walker (The Medical Research Council Laboratory of Molecular Biology, Cambridge, Royaume-Uni).

II.2.5 Les stratégies de clonage des alcool déshydrogénases dans des plasmides d'expression *in vivo* et *in vitro*

Les clonages de la QHEDH sans cytochrome *c* dans les plasmides d'expression *in vitro* et *in vivo* ont été réalisés comme représenté dans la **Figure 28** en utilisant les amorces détaillées dans le **Tableau 4**.

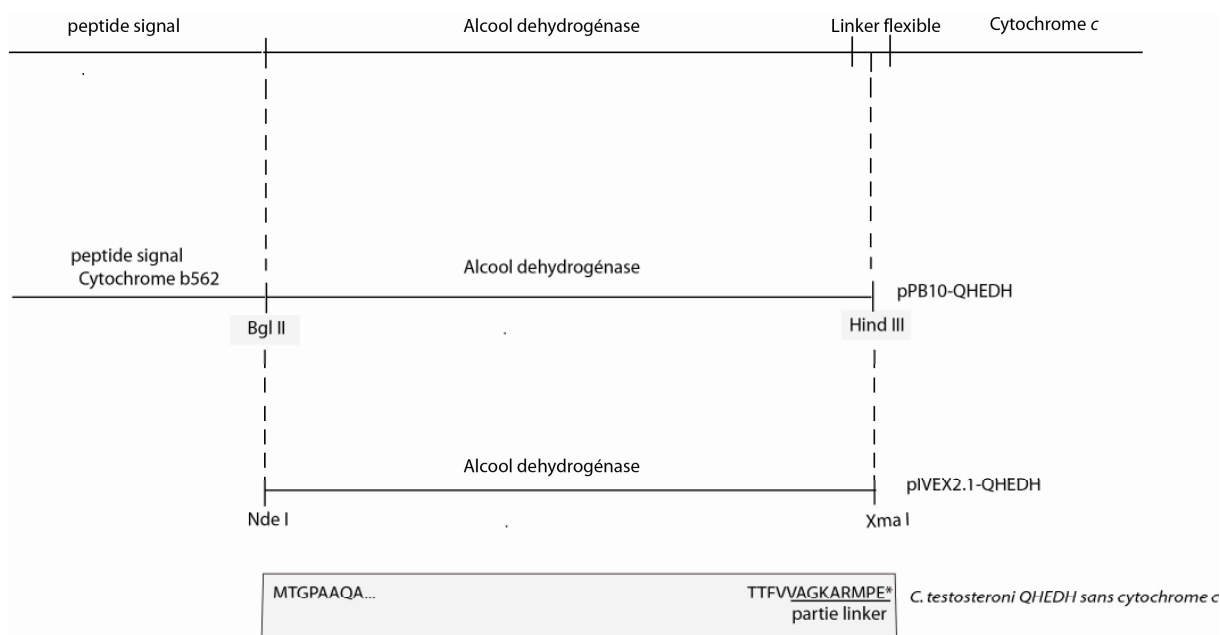


Figure 28 : Représentation schématique de la stratégie de clonage de la QHEDH avec et sans cytochrome *c* *in vivo* et *in vitro*. La ligne du haut représente la séquence codante de la QHEDH constituée d' (i) un peptide signal pour diriger la protéine vers l'espace périplasmique de la bactérie ; (ii) une séquence codante pour la sous unité ADH ; (iii) un linker flexible (iv) une séquence codante pour le cytochrome *c*. Deuxième ligne : pour le clonage dans pPB10, un vecteur d'expression *in vivo*, la séquence codante pour l'ADH et 9 acides aminés du linker flexible ont été amplifiés (en utilisant les amorces du Tableau 2) et clonés (après le peptide signal cytochrome b562) en utilisant les enzymes de restriction Bgl II et Hind III. Troisième ligne : Pour le clonage dans pIVEX2.1-MCS, un vecteur d'expression *in vitro*, la séquence codante pour l'ADH et 9 acides aminés du linker flexible ont été amplifiés (en utilisant les amorces du Tableau 2) et clonés en utilisant les enzymes de restriction NdeI et SacI. Quatrième ligne : la séquence protéique de la QHEDH sans cytochrome *c*. (*) Fin de la séquence de la protéine.

La séquence codante pour la QHEDH (représentée dans la ligne du haut de la **Figure 28**) a aussi été clonée dans pIVEX2.1-MCS et pPB10 respectivement les vecteurs d'expression *in vitro* et *in vivo*.

Enzymes	Plasmides d'expression	Amorces sens	Amorces anti-sens	Sites de restriction
QEDH	PIVEX2.1-MCS	5'- <i>TGTGACTCCATATGAA</i> <i>GGATGTGACCTGGGA</i> <i>GGACATC</i> -3'	5'- <i>TGTGACTCCCCGGGTCAGC</i> <i>GGCTGGCGGTACGGTTGTC</i> -3'	NdeI/XmaI
QEDH	pPB10	5'- <i>TGTGACTCAGATCTCA</i> <i>AGGATGTGACCTGGG</i> <i>AGGACATC</i> -3'	5'- <i>TGTGACTCAAGCTTTCAAT</i> <i>GGTGATGGTGGTGGTGC</i> <i>GGCCGCCGCGGCTGGCGG</i> <i>TACGGTTGTC</i> -3'	BglII/HindIII
QHEDH sans cytochrome c	PIVEX2.1-MCS	5'- <i>TGTGACTCCATATGAC</i> <i>CGGCCCTGCAGCGCA</i> <i>GGCT</i> -3'	5'- <i>TGTGACTCCCCGGGTTACT</i> <i>CCGGCATCCTGGCCTTGCC</i> -3'	NdeI/XmaI
QEDH sans cytochrome c	pPB10	5'- <i>TGTGACTCAGATCTCA</i> <i>CCGGCCCTGCAGCGC</i> <i>AGGCT</i> -3'	5'- <i>TGTGACTCAAGCTTCACT</i> <i>CCGGCATCCTGGCCTTGCC</i> -3'	BglII/HindIII
QHEDH	PIVEX2.1-MCS	5'- <i>TGTGACTCCATATGAC</i> <i>CGGCCCTGCAGCGCA</i> <i>GGCT</i> -3'	5'- <i>ACACTGAGCTCGAGAGTC</i> <i>CCGAACCCGGCCTACCG</i> -3'	NdeI/SacI

Tableau 4 : Séquences des amorces utilisées pour le clonage de la QEDH, la QHEDH et la QHEDH sans cytochrome c dans des plasmides d'expression *in vivo* et *in vitro*. En italique sont représentées des nucléotides qui ont été rajoutés pour optimiser la digestion par les enzymes de restriction. Souligné : sites de restriction. En rouge: la séquence codant pour l'enzyme ADH. Surligné en gris : la séquence codant pour une étiquette histidine.

II.2.6 Expression in vitro des alcool déshydrogénases

Pour les expressions *in vitro* des QEDH, QHEDH et QHEDH sans cytochrome c nous avons utilisé les protocoles fournis avec les différents kits commerciaux testés :

- Expressway *In vitro* Protein Synthesis System (Invitrogen, Carlsbad, Etats-Unis)
- EcoPro T7 system (Novagen, Darmstadt, Allemagne)
- E. coli S30 Extract system (Promega, Royaume-Uni)
- RTS 100 E. coli HY kit (Roche)
- RTS disulfide kit (Roche)
- Pure System II kit (Genepure, Shanghai, Chine)
- Pure System SS kit (Genepure, Shanghai, Chine)
- EasyXpress (Qiagen, Hilden, Allemagne).

II.2.7 Expression in vivo, extraction et purification des alcool déshydrogénases

Les fractions enzymatiques des QEDH et des QHEDH sans cytochrome c ont été extraites en modifiant les protocoles décrits par Rupp et Görisch [26], *Jong et al.* [36] et le Dr Léo James (personal communication Dr V. Taly). Les bactéries *E. coli*, chimiquement compétentes et transformées avec les plasmides pPB10 [43] contenant les gènes codant pour les QEDH ou les QHEDH sans cytochrome c, sont mises en culture dans du milieu SOC (100 µg/ml d'ampicilline) à 37°C et sous agitation (230 rpm). L'induction du promoteur a été réalisée par ajout d'isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG, concentration finale 1mM). Après expression des protéines à 30°C pendant une nuit, les bactéries ont été récupérées par centrifugation (6000 g, 20 min, 4°C) et resuspendues dans un tampon de lyse périplasmique (20% sucrose, EDTA-free protease inhibitor mix (Roche) 50 mM Tris-HCL, pH 8.0) dans un volume égal à 1/20^{ème} du volume de la culture initiale. Après incubation pendant 1 heure dans de la glace, le surnageant, que nous appelons extrait périplasmique, est récupéré par centrifugation (6000 g, 20 min, 4°C) et placé à 4°C alors que le culot cellulaire est resuspendu dans un tampon de lyse osmotique (5 mM MgSO₄). Après incubation pendant 1 heure dans de la glace, le surnageant, que nous appelons extrait osmotique, est récupéré par centrifugation

(6000 g, 20 min, 4°C) et placé à 4°C. Les deux extraits, périplasmique et osmotique, ont été concentrés dans des unités de filtration par centrifugation avec un seuil de coupure à 50KDa (AmiconUltra-15, Ultracel-50kDa (Millipore)) en présence d'un tampon constitué de 50 mM Tris-HCl pH 8.0 et 10 mM CaCl₂. Les deux enzymes ont par la suite été purifiées de ces deux extraits concentrés par chromatographie : Bio-scale mini Macro-prep HighQ (échangeuses d'anions pour les QEDH) et HighS (échangeuses de cations pour les QHEDH sans cytochrome *c*). Les colonnes ont été par la suite lavées avec 50 mM Tris-HCl pH 8.0 (volume égal à 3 volumes de la colonne) et éluées avec 50 mM Tris-HCl pH 8.0 en présence d'un gradient de NaCl de 0.25 mM à 1 mM (avec un volume égal à 5 fois le volume de la colonne). Pour chaque enzyme, les fractions actives ont été mises en évidence en utilisant le test fluorogénique (décrit plus bas) puis regroupées et concentrées avec des unités de filtration par centrifugation avec un seuil de coupure à 50KDa (AmiconUltra-15, Ultracel-50kDa (Millipore)) en présence de tampon de stockage (10 µM PQQ, 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM CaCl₂,) (~2mg/ml QEDH et 1mg/ml QHEDH sans cytochrome *c*) et finalement congelées à -80°C.

II.2.8 Gel de protéines en condition dénaturante

Pour la caractérisation de la QEDH et de QHEDH sans cytochrome *c* purifiées, nous avons utilisé l'électrophorèse sur gel Bis-Tris en condition dénaturante. Pour cela, nous avons suivi le protocole expérimental fourni par « invitrogen » en utilisant les gels précoulés « NuPAGE, Novex 10% Bis-Tris Gel 1mm * 15 well ».

II.2.9 Préparation de bactéries compétentes par voie chimique

Afin de rendre les bactéries C41 (DE3) [45] compétentes par voie chimique nous avons réalisé le protocole suivant. Nous avons incubé une culture fraîche de 100 mL d'*E. coli* à 37°C et sous agitation à 230 rpm jusqu'à atteindre une absorbance de ~0.6 à 600nm. Les cellules sont ensuite centrifugées à 4°C pendant 5 min à 2500rpm et le culot est resuspendu dans 20mL de tampon de lavage contenant 50mM de chlorure de calcium. Après incubation pendant 20 minutes dans la glace, les cellules sont à nouveau centrifugées à 4°C pendant 5 min à 2500rpm. Le culot est ensuite resuspendu dans 3mL de tampon de lavage contenant 50mM de chlorure de calcium et 450µL de glycérol. Après incubation pendant 3 heures dans la glace, les bactéries sont réparties dans des tubes à des volumes de 100µL pour être stockées à -80°C.

II.2.10 Le test d'activité colorimétrique des alcool déshydrogénases

Le test d'activité colorimétrique utilisé pour mesurer l'activité des QEDH, QHEDH et la QHEDH sans cytochrome c a été inspiré du test décrit par *Rupp et al.* [26] avec quelques optimisations. Dans une cuvette de 1mL, après avoir incubé les protéines à température ambiante pendant 10 minutes dans 500 μ L d'une solution contenant 100mM Tris-HCl pH 8.0, 10 μ M PQQ et 10mM CaCl₂, nous ajoutons un volume de la même solution contenant en plus 4 μ L de PMS à 50mM, 2 μ L de DCIP à 50mM et le substrat adéquat (quantité suffisante pour 1mL de volume réactionnel final). Pour le test d'activité de la QEDH, de l'éthylamine hydrochloride, concentration finale 10mM, est également ajouté afin de l'activer. Le volume total réactionnel est de 1mL. Les cinétiques des réactions sont mesurées avec un spectrophotofluorimètre SpectraMax M5 (Molecular Devices, CA) à 25°C en suivant la réduction du DCIP à 600nm. Les paramètres cinétiques apparents, K'_m and V'_{max} , représentant respectivement la constante de Michaelis apparente et la vitesse maximale apparente ont été déterminés par la représentation de Michaelis–Menten en utilisant le logiciel SigmaPlot 9.0.

II.2.11 Le test d'activité fluorogénique des alcool déshydrogénases

Dans une microplaque noire à fond transparent de 96 puits et à température ambiante, après incubation des protéines pendant 10 minutes dans 50 μ L d'une solution contenant 100mM Tris-HCl pH 8.0, 10 μ M PQQ et 10mM CaCl₂, nous ajoutons 1 volume de la même solution contenant en plus 400 μ M de PMS, 200 μ M de résazurine et 1% d'éthanol. Pour le test d'activité de la QEDH, de l'éthylamine hydrochloride, concentration finale de 10mM, est ajouté afin de l'activer. Les cinétiques des réactions sont mesurées avec un spectrofluorimètre SpectraMax M5 (Molecular Devices, CA) à 25°C en suivant la réduction de la résazurine en faveur de la formation de la résorufine ($\lambda_{excitation}=540$ nm and $\lambda_{émission}=590$ nm).

II.2.12 Préparation de la suspension bactérienne

Des bactéries *E. coli* C41(DE3) [45] ont été transformées avec le plasmide codant pour la QEDH et le plasmide codant pour la QHEDH sans cytochrome c. Deux cultures de 5mL de milieu LB contenant 100 μ g/mL d'ampicilline ont été inoculées avec les deux types de bactéries transformées puis incubés à 37°C pendant 14 heures et sous agitation à 230rpm. Le lendemain, deux nouvelles cultures de 5mL de LB contenant 100 μ g/mL d'ampicilline ont été

inoculées avec 50 μ L de chacun de ces deux précultures (qui ont incubés pendant la nuit) et incubées à 37°C sous agitation à 230rpm. Une fois la DO à 600nm atteint la valeur 0.6, l'IPTG est ajouté à ces deux cultures à une concentration finale de 0.1mM pour être ensuite incubées à 18°C pendant 14 heures et sous agitation à 230rpm. Après expression des protéines, les deux cultures sont centrifugées à 2000g pendant 20 minutes et à 4°C pour récupérer les bactéries. Chacun des deux culots est resuspendu dans 5mL de milieu LB contenant 100 μ g/mL d'ampicilline. Cette étape qui, permet de laver les bactéries et d'enlever les enzymes libérées par les bactéries, a été réalisée deux fois. La densité optique de chaque culture a été ajustée à une DO₆₀₀ égale à 1 puis mélangées ensemble avec différents ratio de dilution. Il a été rapporté que selon la souche bactérienne utilisée, une unité de DO est égale à une concentration de cellules viables qui varie entre 10⁵ et 10⁷ cellules par mL. Dans notre cas c'est-à-dire pour les bactéries *E. coli* C41 (DE3) [45], une unité de DO à 600nm est égale à 5*10⁸ cellules/mL (soit un λ = 7,5 cellule/goutte de 15pL). Ce nombre a été déterminé, en étalant sur boîte de LB agar contenant 100 μ g/mL d'ampicilline, 100 μ L de différentes dilutions des cultures d'*E. coli* exprimant les QHEDH actives ou inactives. Après incubation des boîtes à 37°C pendant 14 heures, le nombre de colonies a été calculé.

II.3 Résultats et discussions

II.3.1 Développement d'un test fluorescent pour la mesure de l'activité de l'alcool déshydrogénase en gouttes

Les alcool déshydrogénases à PQQ sont capables d'oxyder différents types de substrats [46]. Pour mesurer l'oxydation de l'éthanol (ou d'autres substrats) par les alcool déshydrogénases exprimées *in vivo* ou *in vitro*, nous avons développé un test fluorogénique basé sur la réduction d'un accepteur d'électrons fluorogénique (la résazurine) pour donner un produit fluorescent (la résorufine) (voir section Matériel et Méthodes). Dans ce test, les électrons résultants de l'oxydation du substrat par les alcool déshydrogénases sont transférés du PQQ réduit au PMS (accepteur d'électrons artificiel) et finalement à la résazurine qui sera convertie en résorufine (**Figure 29**). Le passage direct des électrons vers la résazurine sans intermédiaire (le PMS) n'a pas été observé (donnée non montrée).

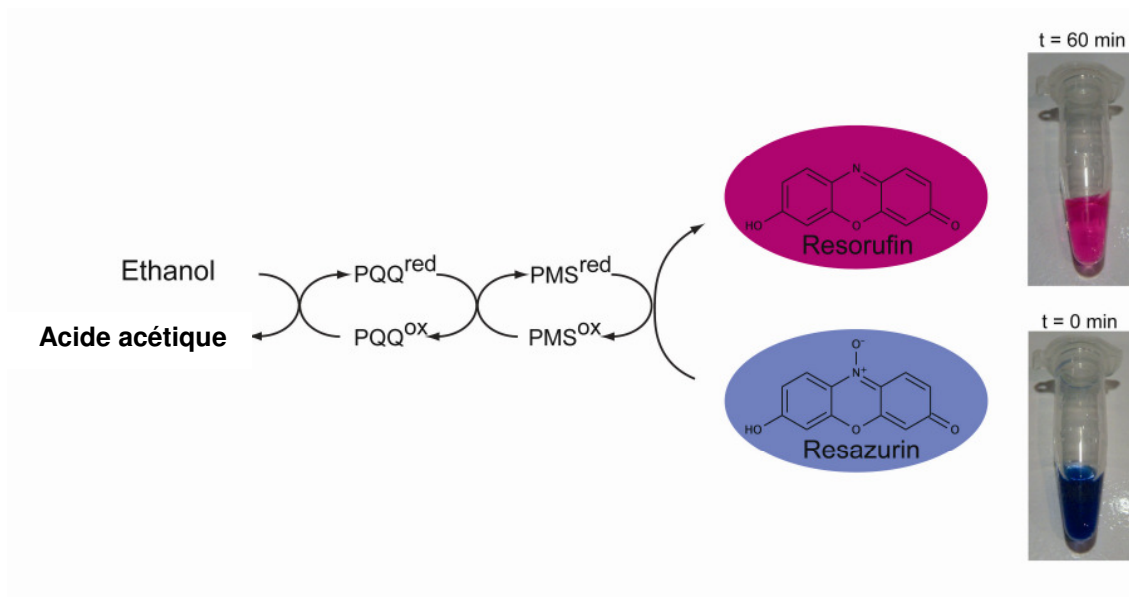


Figure 29 : Test fluorogénique pour la détection de l'activité des alcool déshydrogénases. Les électrons résultant de l'oxydation du substrat (éthanol) par les alcool déshydrogénases sont transférés du PQQ réduit au PMS (accepteur d'électrons artificiel) et finalement à la résazurine (molécule non fluorescente) qui sera converti en résorufine (molécule fluorescente).

Nous avons développé ce test car il permet de mimer les conditions réelles de la biopile que nous voulons développer grâce à l'utilisation directe du combustible (qui peut être l'éthanol ou un autre substrat) et de la résazurine qui mime l'électrode sur laquelle sont immobilisées les enzymes. L'accepteur d'électrons intermédiaire visé pour la biopile est aussi le PMS.

II.3.2 Expression *in vitro* de la QEDH et de la QHEDH sans cytochrome *c*

Parmi les kits commerciaux d'expression *in vitro* testés, ceux qui ont donné les meilleures concentrations de protéines actives (~3 mg/mL de QEDH et 1 mg/mL de QHEDH sans cytochrome *c* pour volume réactionnel de 50 μ L) sont le « RTS 100 *E. coli* Disulfide Kit » et le « EasyXpress Protein Synthesis Kit » (**Figure 30 panel B**). La mesure de l'activité des trois enzymes exprimées *in vitro* (QEDH, QHEDH sans cytochrome *c* et QHEDH) en présence du test fluorogénique a révélé que la QEDH et la QHEDH sans cytochrome *c* sont actives (**Figure 30 panel A**) alors que la QHEDH native n'est pas active (donnée non montrée). La différence d'activité entre les QEDH et les QHEDH sans cytochrome *c* s'explique par la différence de leur niveau d'expression *in vitro* (**Figure 30 panel B**). L'inactivité de la QHEDH native pourrait s'expliquer par le fait que le cytochrome *c* ne peut

s'exprimer dans *E. coli* qu'en présence de plasmides pEC86 contenant les gènes permettant sa maturation (*ccm* genes) [38,47].

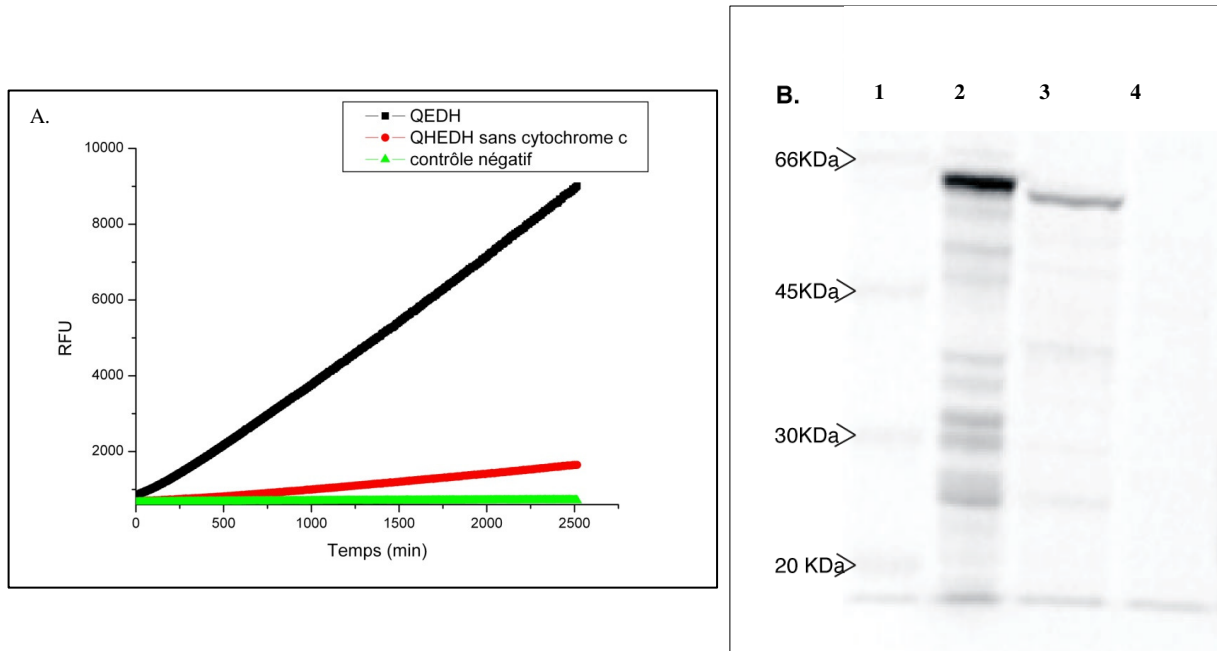


Figure 30 : Expression *in vitro* des alcool déshydrogénases et mesure en spectrophotométrie de leur activité. (A) Mesure en plaque de 96 puits de l'activité des QEDH et des QHEDH sans cytochrome *c* exprimées *in vitro* en utilisant le test fluorogénique. Le contrôle négatif représente le résultat de l'expression *in vitro* sans plasmide. (B) Gel en condition dénaturante des QEDH (puit 2) et des QHEDH sans cytochrome *c* (puit 3) exprimées *in vitro*.

Bien que l'expression *in vitro* de la QEDH et de QHEDH sans cytochrome *c* aient été réalisées avec succès en tube, les tests d'expression en gouttes d'eau-dans-l'huile avec un gène par goutte n'ont pas été fructueux (voir chapitre IV). En effet, nous avons démontré que l'expression de ces protéines *in vitro* nécessitait une étape supplémentaire d'amplification des gènes dans les microgouttelettes. Cette étape rendait la plateforme microfluidique d'expression *in vitro* des protéines très compliquée à mettre en place. En parallèle à d'autres travaux du laboratoire visant au développement d'une telle plateforme, nous avons donc exploré le développement d'une plateforme microfluidique basée sur l'expression *in vivo* de ces protéines.

II.3.3 Expression *in vivo*, extraction et purification des alcool déshydrogénases

Bien que l'expression *in vivo* de la QHEDH dans *E. coli* ait déjà été décrite une seule fois par *Stoorvogel et al.* [38], elle n'a pu être reproduite dans leur laboratoire.

L'extraction de l'enzyme se fait directement de *C. testosteroni* à cause de son faible taux d'expression dans *E. coli* (communication personnelle du Prof J.A. Jongejan avec qui travaillait Stoorvogel). Toutes nos tentatives d'expression *in vivo* de la QHEDH se sont révélés infructueux même en présence du plasmide pEC86 qui nous a été fourni par le Prof. Goerisch (Université de Berlin) (données non montrées). Comme pour l'expression *in vitro*, tronquer la partie cytochrome *c* a permis l'expression *in vivo* de cette enzyme avec succès (**Figure 31 panel B**). L'expression *in vivo* a donné une concentration de protéine égale à 1 g/L de culture pour la QEDH et 0,5g/L de culture pour la QHEDH sans cytochrome *c*.

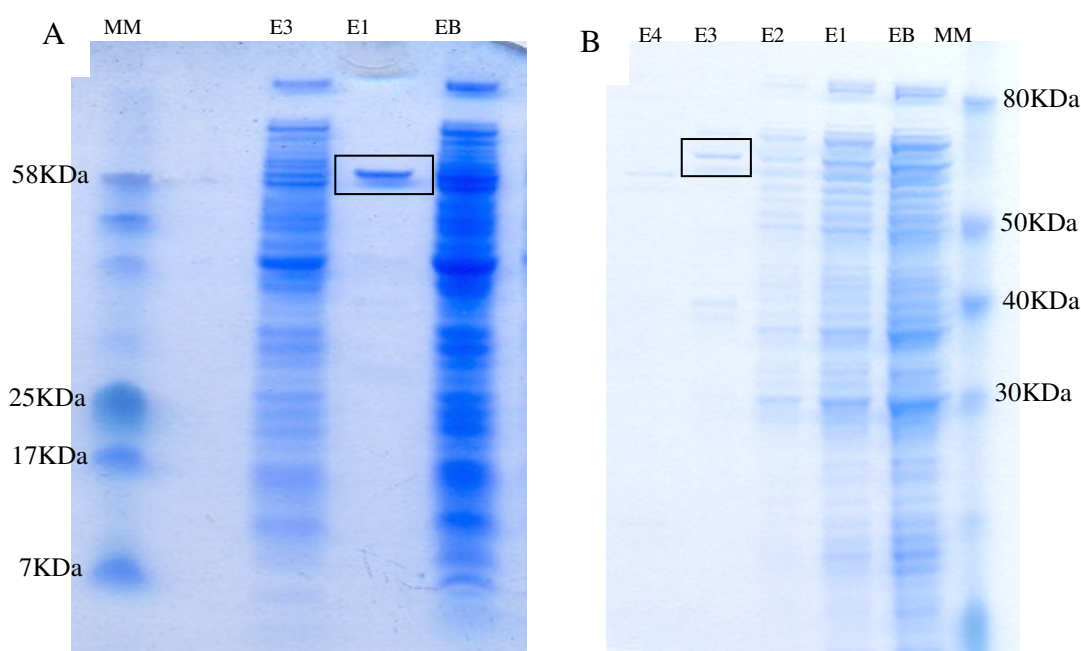


Figure 31 : Gel en conditions dénaturantes des QEDH et QHEDH sans cytochrome *c* exprimées *in vivo* et purifiées (préparé selon le protocole fourni par Invitrogen) (A) Gel des QEDH purifiées. EB : extrait brut, E1 : fraction contenant les enzymes non fixées sur la colonne de purification et correspondant à la QEDH purifiée, E3 : fraction contenant les enzymes éluées de la colonne avec 50mM Tris HCl pH8 0.25mM NaCl. (B) gel des QHEDH sans cytochrome *c*. EB : extrait brut, E1 : fraction contenant les enzymes non fixée sur la colonne, E2 : fraction contenant les enzymes non fixées sur la colonne et récupérées avec 50mM Tris HCl pH8, E3 : fraction contenant les enzymes éluées de la colonne avec 50mM Tris HCl pH8.0, 0.25mM NaCl. E4 : fraction contenant les enzymes éluées avec 50mM Tris HCl pH8.0, 0.5mM NaCl.

Une fois purifiées, nous avons utilisé ces deux enzymes pour : (i) le développement du test fluorogénique et l'étude de l'échange de ses composants entre les microgouttelettes et (ii) l'étude des différentes stratégies d'immobilisation sur les électrodes (travaux réalisés au sein du laboratoire par T. Beneyton, étudiant en thèse, et en collaboration avec le laboratoire « Spectroscopie vibrationnelle et électrochimie des biomolécules » dirigé par le Prof. P. Hellwig de la faculté de chimie à l'université de Strasbourg).

II.3.4 Caractérisation de l'alcool déshydrogénase de type II sans cytochrome c

L'expression de la QHEDH sans cytochrome *c* n'ayant jamais été réalisée auparavant, une caractérisation biochimique de cette enzyme a été réalisée. Nous avons ainsi étudié sa spécificité et son affinité pour différents substrats, son activité avec différents accepteurs d'électrons et son pH d'activité optimum.

II.3.4.1 Les substrats spécifiques à l'alcool déshydrogénase

Les paramètres catalytiques apparents K'_m et V'_{max} représentant respectivement la constante de Michaelis apparente et la vitesse maximale apparente ont été mesurés en utilisant le test fluorogénique (décrit dans la section Matériel et Méthodes). Ces paramètres ont par la suite été comparés à ceux de la QHEDH. Le **Tableau** montre que pour les alcools primaires et secondaires, quand la longueur de la chaîne augmente nous observons une augmentation du V'_{max} et une diminution du K'_m de la QHEDH sans cytochrome *c*. Cependant une faible activité en présence d'alcools secondaires a été observée (spécialement en présence de l'isopropanol). Ces résultats sont en accord avec ceux de *Groen et al.* ainsi que ceux de *Stigter et al.* Les deux enzymes, la QHEDH et la QHEDH sans cytochrome *c*, sont capables d'oxyder des alcools linéaires, des alcools secondaires cycliques, des diols ainsi que des aldéhydes. Ceci dit il semblerait que la QHEDH sans cytochrome *c* est un peu plus active que la QHEDH en présence des alcools secondaires. Ces résultats restent à confirmer avec des expériences supplémentaires.

Substrates	QHEDH (données issues des publications de Groen et al. et de Stigter et al. [37,46])		QHEDH sans cytochrome <i>c</i>	
	K _m (mM)	V _{max} (%)	K _m (mM)	V _{max} (%)
Ethanol	5	75	11.6	92
1-butanol	0.005	100	0.006	92
1-pentanol	0.005	100	0.005	100
1-octanol	0.005	95	0.001	135
Isopropanol	30	6	51	34
butan-2-ol	8	10	54	78
Butan-1,3-diol	0.28	40	3.4	65
Acetaldehyde	0.9	80	2.8	95

Tableau 5: Etude de la spécificité de la QHEDH et de la QHEDH sans cytochrome *c* vis-à-vis de différents substrats. La valeur du V_m est calculée en pourcentage et normalisée par rapport à celle du pentan-1-ol qui est fixée à 100% [37,46]. K_m : affinité de l'enzyme pour son substrat. V_{max} : vitesse maximale d'oxydation du substrat par l'enzyme.

Nous pouvons donc conclure, qu'en prenant comme référence les données de la littérature sur la QHEDH native, il semblerait que la QHEDH sans cytochrome *c* ait conservé son activité avec une légère augmentation de son activité en présence des alcools secondaires. Cependant, pour pouvoir correctement comparer ces deux enzymes il faudrait que nous arrivions à exprimer et à purifier la QHEDH native.

II.3.4.2 Activité des alcool déshydrogénases avec différents accepteurs d'électrons

Pour comparer la capacité à transférer des électrons de la QHEDH sans cytochrome *c* à celle de la QEDH et la QHEDH native, l'activité d'oxydation de l'éthanol par ces enzymes a été mesurée en présence de six accepteurs d'électrons différents en utilisant le test colorimétrique (décrit dans la section Matériel et Méthodes). Ces résultats sont regroupés dans le **Tableau 6**. Les deux types d'enzymes (la QHEDH et la QHEDH sans cytochrome *c*) sont actives en présence de tous les accepteurs d'électrons artificiels testés. Pour les deux enzymes la plus grande activité a été observée en présence du Wurster's Blue. La QHEDH sans

cytochrome *c* montre une activité légèrement plus grande que l'activité de la QHEDH en présence des 3 accepteurs d'électrons suivants : le cytochrome *c*, le PMS/cytochrome *c* et le DCIP. Contrairement à la QHEDH, qui montre une grande activité en présence du potassium ferricyanide, l'enzyme sans cytochrome *c* a une activité très faible en présence du même médiateur. Si nous comparons la QHEDH sans cytochrome *c* à la QEDH, nous observons cette dernière n'est pas active en présence du cytochrome *c*. L'activité spécifique de la QHEDH sans cytochrome *c* a été déterminée et est égale à 150 μmol de Wurster's Blue réduit/min par mg de protéine (en utilisant un coefficient d'absorption molaire égal à $10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ [19]) alors que cette activité pour la QEDH est égale 36 μmol de Wurster's Blue réduit/min par mg de protéines [37] (ce résultat est en accord avec les données de la littérature). Par conséquent, on peut voir que l'activité de la QHEDH sans cytochrome *c* est plus grande que l'activité de la QEDH en présence de tous les accepteurs d'électrons testés.

Accepteurs d'électrons	QHEDH sans cytochrome <i>c</i>	QHEDH (données issues de la publication de Stigter <i>et al.</i> [46])	QEDH
Wurster's Blue (160 μM)	100	100	100
DCIP 160 μM	34	10	2
PMS/DCIP (120 and 160 μM)	66	75	50
Cytochrome <i>c</i> de cheval (700 μM)	18	5	0
Cytochrome <i>c</i> de cheval + PMS	90	60	10
Potassium ferricyanide : $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ (700 μM)	3	100	2

Tableau 6 : Activité d'oxydation de l'éthanol (1%) de la QHEDH et de la QEDH sans cytochrome *c* en présence de différents accepteurs d'électrons. Les valeurs sont calculées en pourcentage en considérant que celle du Wurster's blue représente 100%. Abréviation= DCIP : 2,6-dichlorophénol –indophénol.

En conclusion, loin de diminuer l'activité enzymatique, la délétion de la partie cytochrome *c* de la QHEDH a donné une enzyme ayant un nouveau spectre de spécificité aux médiateurs artificiels différent à la fois de celui des enzymes de type I et de type II testées.

II.3.4.3 Détermination du pH optimum des enzymes modèles pour l'oxydation d'alcools primaires et secondaires

Les profils d'activité catalytique en fonction du pH de la QHEDH sans cytochrome c avec deux alcools (1-propanol et 2-octanol) ont été déterminés en utilisant le test colorimétrique (décrit dans la section Matériel et Méthodes) en changeant le tampon Tris HCl pH8.0 par un tampon universel (tampon universel de Britton et Robinson) (6.008 g acide citrique, 3.893 g KH₂PO₄, 1.769 g H₃BO₃, 5.266 g barbital de sodium par litre ajusté avec 2N de NaOH). Les résultats obtenus ont été comparés à ceux de la QHEDH avec les mêmes substrats et issus des travaux de *Stigter et al.* [46]. La **Figure 32** montre que les deux enzymes ont des profils d'activité catalytique en fonction du pH comparables pour les deux alcools testés. Le pH optimum pour les deux enzymes est ~8.

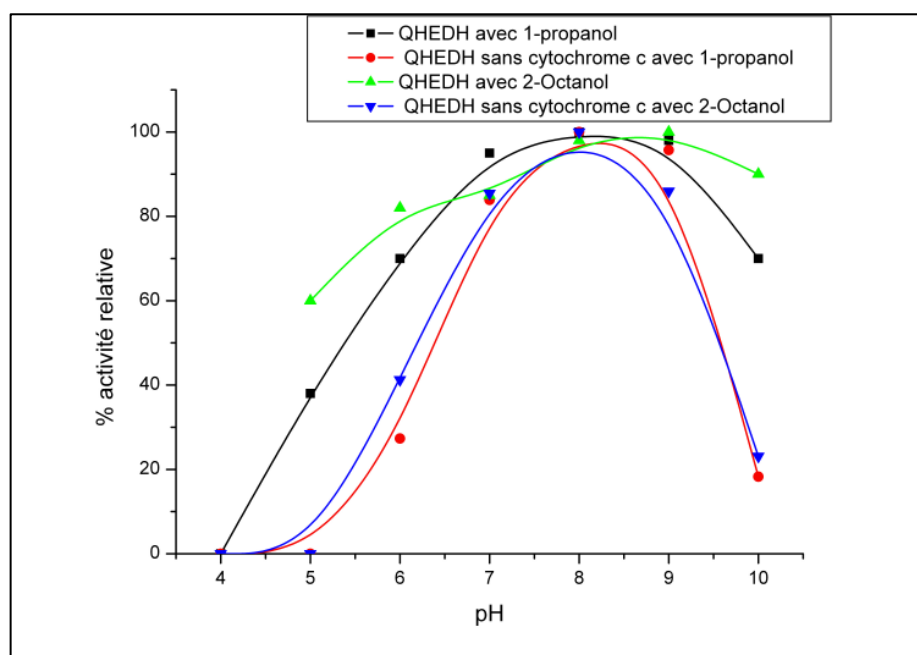


Figure 32 : Pourcentage d'activité relative pour l'oxydation du 1-propanol et du 2-Octanol par la QHEDH et de la DHEDH sans cytochrome c en fonction du pH. Les données de la QHEDH sont issues de la publication de *Stigter et al.* [46].

II.3.5 Comparaison de l'expression in vivo des QEDH et QHEDH sans cytochrome c en gouttes

Pour pouvoir utiliser le système microfluidique en gouttes pour la sélection des alcool déshydrogénases (voir le Chapitre IV), un des pré-requis est de choisir un modèle enzymatique dont l'activité peut être mesurée en microgouttelettes d'eau-dans-l'huile. La

plateforme microfluidique de sélection que nous avons développée est basée sur la mesure en gouttes de l'activité des alcool déshydrogénases exprimées *in vivo* (dans *E. coli*) puisque la plateforme basée sur l'expression *in vitro* ne pouvait se faire avec un gène par goutte. Avant de réaliser les tests en microgouttelettes, des tests préliminaires en microplaque de 96 puits ont été réalisés pour nous permettre de choisir laquelle des deux enzymes est la meilleure candidate capable d'être exprimée *in vivo* et détectée en gouttes. Pour ce faire, deux suspensions bactériennes ont été préparées comme décrit dans la section Matériel et Méthodes. Chaque culture est diluée de sorte à avoir environ une bactérie par goutte de 15pL avec un $\lambda = 0,1$. Puis un volume de 100 μ L est prélevé de chaque type de culture et sont déposés dans une microplaque de 96 puits. Un volume d'isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) est ensuite ajouté de sorte à avoir une concentration finale de 0,1mM d'IPTG. Après incubation à température ambiante pendant 14h, les activités de la QEDH et de la QHEDH sans cytochrome *c* exprimées dans les bactéries sont mesurées en utilisant le test fluorogénique décrit plus haut (dans la section Matériel et Méthodes).

Les résultats, représentés dans la **Figure 33**, montrent que la QHEDH sans cytochrome *c* est nettement plus active que la QEDH et font d'elle l'enzyme anodique modèle que nous avons choisi pour l'évoluer afin qu'elle fonctionne dans les conditions de notre biopile à éthanol.

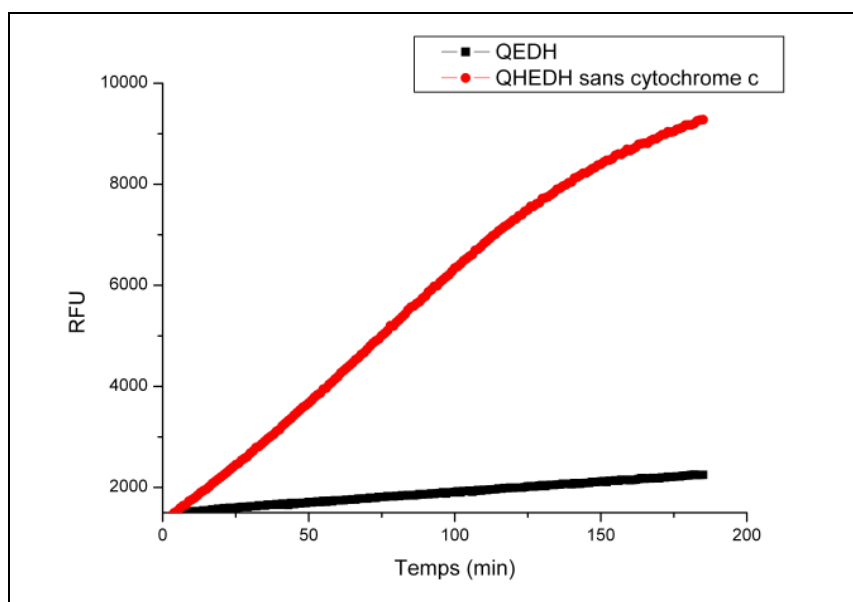


Figure 33 : Suivi pendant 180 minutes de l'oxydation de l'éthanol par la QEDH et la QHEDH sans cytochrome *c* exprimées *in vivo* (*E. coli*). L'expression *in vivo* des enzymes est réalisée dans une microplaque de 96 puits pendant 14 heures à 37°C. La mesure de l'activité se fait en présence du test fluorogénique en utilisant un spectrofluorimètre.

L'étape suivante est de s'assurer que les composés du test fluorogénique, basé sur la réduction de la résazurine et permettant la détection de l'activité de la QHEDH sans cytochrome *c*, restent confinés au sein des gouttes.

II.4 Conclusions et perspectives

Dans ce chapitre de la thèse, nous nous sommes intéressés à deux alcool déshydrogénases à PQQ comme cofacteur solubles et capables d'oxyder l'éthanol en acide acétique [13]. La première est une enzyme de type I (la QEDH) issue de *pseudomonas aeruginosa*, dimérique et nécessitant de l'éthylamine pour son activation. La deuxième est une enzyme de type II (la QHEDH) issue de *Comamonas testosteroni*, monomérique, contenant un cytochrome *c* et ne nécessite pas d'ajout d'éthylamine pour son activation. Pour l'expression *in vivo* et *in vitro* de cette dernière, nous étions amenés à lui enlever son cytochrome *c*. Les études que nous avons effectuées sur cette nouvelle enzyme ont montré qu'il semblerait qu'elle a le même profil que l'enzyme native. Ces résultats doivent être confirmés car la comparaison de ces deux enzymes s'est basée sur les données de la QHEDH native issues de la littérature. Nous avons aussi observé que la nouvelle enzyme sans cytochrome *c* est plus active, en gouttes et en microplaque, que la QEDH. Par conséquent, nous avons considéré que cette enzyme était la meilleure candidate pour l'adapter, par évolution dirigée, à fonctionner dans les conditions de la biopile à éthanol que nous voulons construire.

Des études visant à optimiser l'immobilisation de cette nouvelle enzyme sans cytochrome *c* sur différents types d'électrode sont en cours de développement en collaboration avec le laboratoire « Spectroscopie vibrationnelle et électrochimie des biomolécules » dirigé par le Prof. P. Hellwig de la faculté de chimie à l'université de Strasbourg).

Différentes banques de la QHEDH sans cytochrome *c*, contenant différents taux de mutations (de 1 à 10 mutations par Kbase) sont en cours de construction par mutagenèse aléatoire. Une fois que la plateforme microfluidique de sélection en gouttes sera validée avec une sélection modèle, nous passerons à la sélection de cette banque de mutants (voir **Chapitre IV**). Nous pourrions aussi envisager d'utiliser d'autres stratégies pour créer d'autres types de banque de la QEDH sans cytochrome *c* par exemple en utilisant la stratégie du « family-shuffling » impliquant différentes alcool déshydrogénases homologues ou la méthode

CLERY, qui permet de créer des protéines mosaïques de manière aléatoire, développée et brevetée en thèse par mon encadrant Dr V. Taly

II.5 Références bibliographiques

- [1] K. Matsushita, H. Toyama, M. Yamada, O. Adachi, Quinoproteins: structure, function, and biotechnological applications, *Appl Microbiol Biotechnol* 58 (2002) 13-22.
- [2] A. Saeki, G. Theeragool, K. Matsushita, H. Toyama, N. Lotong, O. Adachi, Development of thermotolerant acetic acid bacteria useful for vinegar fermentation at higher temperatures, *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 61 (1997) 138-145.
- [3] E.J. D'Costa, I.J. Higgins, A.P. Turner, Quinoprotein glucose dehydrogenase and its application in an amperometric glucose sensor, *Biosensors* 2 (1986) 71-87.
- [4] V. Laurinavicius, J. Razumiene, B. Kurtinaitiene, I. Lapenaite, I. Bachmatova, L. Marcinkeviciene, R. Meskys, A. Ramanavicius, Bioelectrochemical application of some PQQ-dependent enzymes, *Bioelectrochemistry* 55 (2002) 29-32.
- [5] T. Ikeda, D. Kobayashi, F. Matsushita, T. Sagara, K. Niki, Bioelectrocatalysis at Electrodes Coated with Alcohol-Dehydrogenase, a Quinohemoprotein with Heme-C Serving as a Built-in Mediator, *Journal of Electroanalytical Chemistry* 361 (1993) 221-228.
- [6] O. Adachi, D. Moonmangmee, H. Toyama, M. Yamada, E. Shinagawa, K. Matsushita, New developments in oxidative fermentation, *Appl Microbiol Biotechnol* 60 (2003) 643-653.
- [7] R.A. Bullen, T.C. Arnot, J.B. Lakeman, F.C. Walsh, Biofuel cells and their development, *Biosens Bioelectron* 21 (2006) 2015-2045.
- [8] J.A. Duine, R.A. van der Meer, B.W. Groen, The cofactor pyrroloquinoline quinone, *Annu Rev Nutr* 10 (1990) 297-318.
- [9] P.M. Goodwin, C. Anthony, The biochemistry, physiology and genetics of PQQ and PQQ-containing enzymes, *Adv Microb Physiol* 40 (1998) 1-80.
- [10] S.Y. Reddy, T.C. Bruice, Determination of enzyme mechanisms by molecular dynamics: studies on quinoproteins, methanol dehydrogenase, and soluble glucose dehydrogenase, *Protein Sci* 13 (2004) 1965-1978.
- [11] X.C. Zhang, A. Ranta, A. Halme, Direct methanol biocatalytic fuel cell--considerations of restraints on electron transfer, *Biosens Bioelectron* 21 (2006) 2052-2057.
- [12] C. Anthony, Quinoprotein-catalysed reactions, *Biochem J* 320 (Pt 3) (1996) 697-711.
- [13] A. Oubrie, H.J. Rozeboom, K.H. Kalk, E.G. Huizinga, B.W. Dijkstra, Crystal structure of quinohemoprotein alcohol dehydrogenase from *Comamonas testosteroni*: structural basis for substrate oxidation and electron transfer, *J Biol Chem* 277 (2002) 3727-3732.
- [14] K. Matsushita, K. Takahashi, O. Adachi, A novel quinoprotein methanol dehydrogenase containing an additional 32-kilodalton peptide purified from *Acetobacter methanolicus*: identification of the peptide as a MoxJ product, *Biochemistry* 32 (1993) 5576-5582.
- [15] H. Toyama, F.S. Mathews, O. Adachi, K. Matsushita, Quinohemoprotein alcohol dehydrogenases: structure, function, and physiology, *Arch Biochem Biophys* 428 (2004) 10-21.
- [16] C. Anthony, L.J. Zatman, Microbial Oxidation of Methanol - Prosthetic Group of Alcohol Dehydrogenase of *Pseudomonas Sp M27* - a New Oxidoreductase Prosthetic Group, *Biochemical Journal* 104 (1967) 960-&.
- [17] C. Anthony, L.J. Zatman, Microbial Oxidation of Methanol - Purification and Properties of Alcohol Dehydrogenase of *Pseudomonas Sp M27*, *Biochemical Journal* 104 (1967) 953-&.
- [18] C. Anthony, L.J. Zatman, Microbial Oxidation of Methanol - Alcohol Dehydrogenase of *Pseudomonas Sp M27*, *Biochemical Journal* 96 (1965) 808-&.

- [19] H. Gorisch, M. Rupp, Quinoprotein ethanol dehydrogenase from *Pseudomonas*, *Antonie Van Leeuwenhoek* 56 (1989) 35-45.
- [20] J.J. Stezowski, H. Gorisch, Z. Dauter, M. Rupp, A. Hoh, R. Englmaier, K. Wilson, Preliminary X-ray crystallographic study of quinoprotein ethanol dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*, *J Mol Biol* 205 (1989) 617-618.
- [21] B. Mennenga, C.W. Kay, H. Gorisch, Quinoprotein ethanol dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*: the unusual disulfide ring formed by adjacent cysteine residues is essential for efficient electron transfer to cytochrome c550, *Arch Microbiol* 191 (2009) 361-367.
- [22] H. Toyama, A. Fujii, K. Matsushita, E. Shinagawa, M. Ameyama, O. Adachi, Three distinct quinoprotein alcohol dehydrogenases are expressed when *Pseudomonas putida* is grown on different alcohols, *J Bacteriol* 177 (1995) 2442-2450.
- [23] A. Diehl, F. von Wintzingerode, H. Gorisch, Quinoprotein ethanol dehydrogenase of *Pseudomonas aeruginosa* is a homodimer--sequence of the gene and deduced structural properties of the enzyme, *Eur J Biochem* 257 (1998) 409-419.
- [24] A. Mutzel, H. Gorisch, Quinoprotein Ethanol Dehydrogenase - Preparation of the Apo-Form and Reconstitution with Pyrroloquinoline Quinone and Ca²⁺ or Sr²⁺ Ions, *Agricultural and Biological Chemistry* 55 (1991) 1721-1726.
- [25] B. Groen, J. Frank, Jr., J.A. Duine, Quinoprotein alcohol dehydrogenase from ethanol-grown *Pseudomonas aeruginosa*, *Biochem J* 223 (1984) 921-924.
- [26] M. Rupp, H. Gorisch, Purification, crystallisation and characterization of quinoprotein ethanol dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*, *Biol Chem Hoppe Seyler* 369 (1988) 431-439.
- [27] J.M. Schrover, J. Frank, J.E. van Wielink, J.A. Duine, Quaternary structure of quinoprotein ethanol dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa* and its reoxidation with a novel cytochrome c from this organism, *Biochem J* 290 (Pt 1) (1993) 123-127.
- [28] J.A. Duine, J. Frank, J.A. Jongejan, Enzymology of quinoproteins, *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 59 (1987) 169-212.
- [29] T. Keitel, A. Diehl, T. Knaute, J.J. Stezowski, W. Hohne, H. Gorisch, X-ray structure of the quinoprotein ethanol dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*: Basis of substrate specificity, *Journal of Molecular Biology* 297 (2000) 961-974.
- [30] A. Oubrie, E.G. Huizinga, H.J. Rozeboom, K.H. Kalk, G.A. de Jong, J.A. Duine, B.W. Dijkstra, Crystallization of quinohaemoprotein alcohol dehydrogenase from *Comamonas testosteroni*: crystals with unique optical properties, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 57 (2001) 1732-1734.
- [31] A. Avezoux, M.G. Goodwin, C. Anthony, The role of the novel disulphide ring in the active site of the quinoprotein methanol dehydrogenase from *Methylobacterium extorquens*, *Biochem J* 307 (Pt 3) (1995) 735-741.
- [32] G. Zarnit, T. Schrader, J.R. Andreesen, Catalytic and molecular properties of the quinohemoprotein tetrahydrofurfuryl alcohol dehydrogenase from *Ralstonia eutropha* strain Bo, *Journal of Bacteriology* 183 (2001) 1954-1960.
- [33] G. Zarnit, T. Schrader, J.R. Andreesen, Degradation of tetrahydrofurfuryl alcohol by *Ralstonia eutropha* is initiated by an inducible pyrroloquinoline quinone-dependent alcohol dehydrogenase, *Applied and Environmental Microbiology* 63 (1997) 4891-4898.
- [34] H. Toyama, Z.W. Chen, M. Fukumoto, O. Adachi, K. Matsushita, F.S. Mathews, Molecular cloning and structural analysis of quinohemoprotein alcohol dehydrogenase ADH-IIIG from *Pseudomonas putida* HK5, *J Mol Biol* 352 (2005) 91-104.

- [35] H. Toyama, T. Fujii, N. Aoki, K. Matsushita, O. Adachi, Molecular cloning of quinohemoprotein alcohol dehydrogenase, ADH IIB, from *Pseudomonas putida* HK5, *Biosci Biotechnol Biochem* 67 (2003) 1397-1400.
- [36] G.A. de Jong, A. Geerlof, J. Stoorvogel, J.A. Jongejan, S. de Vries, J.A. Duine, Quinohaemoprotein ethanol dehydrogenase from *Comamonas testosteroni*. Purification, characterization, and reconstitution of the apoenzyme with pyrroloquinoline quinone analogues, *Eur J Biochem* 230 (1995) 899-905.
- [37] B.W. Groen, M.A. van Kleef, J.A. Duine, Quinohaemoprotein alcohol dehydrogenase apoenzyme from *Pseudomonas testosteroni*, *Biochem J* 234 (1986) 611-615.
- [38] J. Stoorvogel, D.E. Kraayveld, C.A. Van Sluis, J.A. Jongejan, S. De Vries, J.A. Duine, Characterization of the gene encoding quinohaemoprotein ethanol dehydrogenase of *Comamonas testosteroni*, *Eur J Biochem* 235 (1996) 690-698.
- [39] P. Raspor, D. Goranovic, Biotechnological applications of acetic acid bacteria, *Crit Rev Biotechnol* 28 (2008) 101-124.
- [40] A. Ramanavicius, K. Habermuller, E. Csoregi, V. Laurinavicius, W. Schuhmann, Polypyrrole-entrapped quinohemoprotein alcohol dehydrogenase. Evidence for direct electron transfer via conducting-polymer chains, *Anal Chem* 71 (1999) 3581-3586.
- [41] A. Ramanavicius, A. Kausaite, A. Ramanaviciene, Biofuel cell based on direct bioelectrocatalysis, *Biosens Bioelectron* 20 (2005) 1962-1967.
- [42] A. Ramanavicius, A. Kausaite, A. Ramanaviciene, Enzymatic biofuel cell based on anode and cathode powered by ethanol, *Biosens Bioelectron* 24 (2008) 767-772.
- [43] P.D. Barker, E.P. Nerou, S.M. Freund, I.M. Fearnley, Conversion of cytochrome b562 to c-type cytochromes, *Biochemistry* 34 (1995) 15191-15203.
- [44] B. Miroux, J.E. Walker, Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels, *J Mol Biol* 260 (1996) 289-298.
- [45] L.O. Martins, C.M. Soares, M.M. Pereira, M. Teixeira, T. Costa, G.H. Jones, A.O. Henriques, Molecular and biochemical characterization of a highly stable bacterial laccase that occurs as a structural component of the *Bacillus subtilis* endospore coat, *J Biol Chem* 277 (2002) 18849-18859.
- [46] E.C.A. Stigter, J.P. vanderLugt, W.A.C. Somers, Enantioselective oxidation of secondary alcohols by quinohaemoprotein alcohol dehydrogenase from *Comamonas testosteroni*, *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* 2 (1997) 291-297.
- [47] E. Arslan, H. Schulz, R. Zufferey, P. Kunzler, L. Thony-Meyer, Overproduction of the *Bradyrhizobium japonicum* c-type cytochrome subunits of the *cbb3* oxidase in *Escherichia coli*, *Biochem Biophys Res Commun* 251 (1998) 744-747.

III. Phénomène d'échange de composés entre les gouttes

III.1 Introduction

Ces dernières années, la stratégie de la microfluidique en microgouttelettes est devenue un puissant outil de sélection à très haut-débit (voir *Theberge et al.* pour une revue récente [1]). En effet, elle permet de miniaturiser et d'automatiser différentes réactions biologiques et chimiques telles que le criblage d'inhibiteurs [2,3], la détection d'anomalies prénatales [4], l'expression *in vitro* de protéines [5], l'amplification de l'ADN [5], la mesure de cinétiques enzymatiques [6,7], l'évolution dirigée des enzymes [8,9,10], la cristallographie des protéines [11,12] ou la synthèse de petites molécules [13,14]. Cependant, pour que les microgouttelettes puissent compartimenter efficacement ces différentes réactions trois pré-requis sont nécessaires : les gouttelettes doivent (i) être stables, (ii) être biocompatibles avec le test biologique ou chimique choisi et (iii) permettre aux constituants de ces tests de rester confinés afin de garantir l'indépendance et la compartimentation des réactions. Ces propriétés sont contrôlées par la structure des molécules tensioactives (partie hydrophobe et hydrophile), l'huile porteuse (huile hydrocarbonée ou fluorocarbonée) et la nature chimique des molécules contenues dans les gouttelettes (en particulier leur degré de solubilité dans l'eau).

Pour stabiliser les gouttes et selon l'huile utilisée des tensioactifs hydrocarbonés [15,16,17,18,19] ou fluorocarbonés [20,21,22] ont été utilisés. La durée de la stabilité des gouttes est liée à la concentration et à la nature du tensioactif. En effet, *Courtois et al.* ont observé qu'en utilisant le tensioactif hydrocarboné AbileM90 à 1% dans de l'huile minérale les gouttes n'étaient pas stables, en augmentant à 2% les gouttes étaient stables et le restaient pendant 4h alors qu'à 3% les gouttes restaient stables 6h (**Figure 34**). Au bout de 24h, les gouttes ne sont plus stables et adhèrent les unes aux autres car l'huile minérale est absorbée par le PDMS [18].

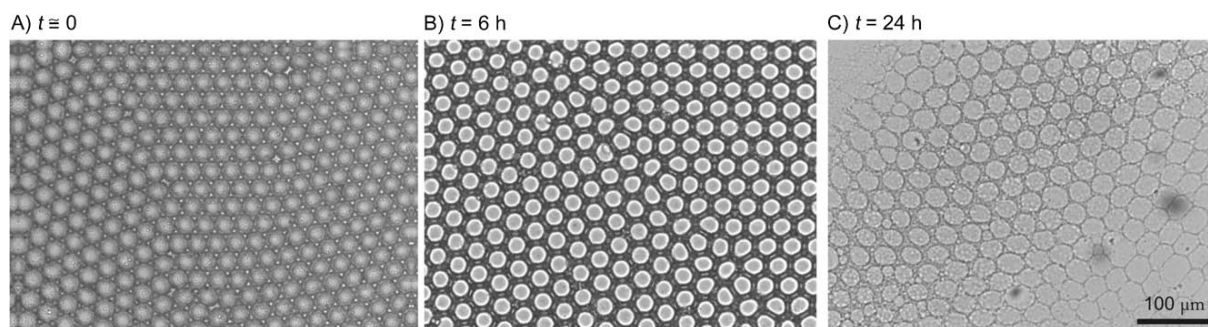


Figure 34 : Observation microscopique des gouttelettes d'eau dans huile minérale contenant du tensioactif hydrocarboné AbilEM90 stockées dans un réservoir microfluidique en PDMS. (A) Les gouttelettes fraîchement stockées dans le réservoir $t=0$. (B) Après 6h, les gouttes adhèrent les unes aux autres car l'huile minérale est absorbée par le PDMS. (C) Après 24h, les gouttes sont agrégées. D'après Courtois et al. [18].

Contrairement aux huiles hydrocarbonées, les huiles fluorocarbonées, qui sont à la fois hydrophobes et lipophobes, ne sont pas absorbées par le PDMS [23]. Les huiles fluorées permettent aussi une bonne solubilité des gaz (très important, par exemple, pour la survie des cellules en gouttes) [7,20]. Contrairement aux tensioactifs hydrocarbonés, les fluorocarbonés permettent également une meilleure stabilisation des microgouttelettes au cours du temps [24]. En effet, comme le montre la **Figure 35**, les gouttes créées avec un tensioactif fluorocarboné en présence d'une huile fluorée (FC40) et stockées dans un module microfluidique étaient stables et monodisperses jusqu'à 3 jours [24].

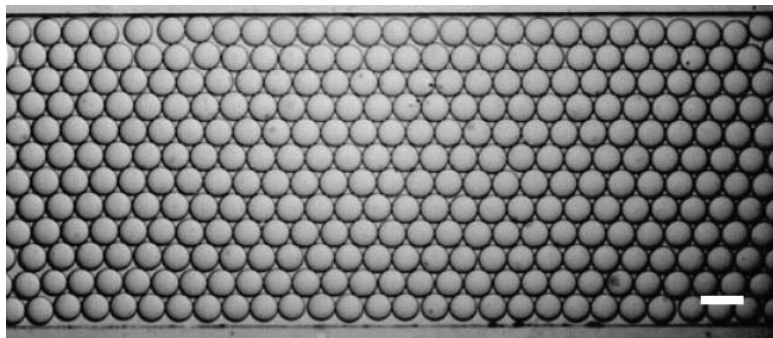


Figure 35 : Observation microscopique des gouttelettes d'eau dans l'huile perfluorocarbonée (FC40) contenant du tensioactif fluorocarboné. Après une incubation de 3 jours dans un canal microfluidique en PDMS, les gouttelettes sont toujours stables et monodisperses. Barre d'échelle : 100µm. D'après Holtze et al. [24].

Comme mentionné plus haut, les tensioactifs fluorocarbonés sont composés d'une tête hydrophile et d'une queue fluorée. Leur compatibilité avec les biomolécules est dépendante de la nature du groupement de leur tête ainsi que de la charge de cette dernière [1,25]. Pour ceux qui sont chargés, comme par exemple les tensioactifs comportant un ou plusieurs groupements de type carboxylates, leur groupement de tête forme une couche à l'interface eau-huile capable d'interagir avec les biomolécules de charges opposées. En

adhérant à cette interface chargée, ces dernières se dénaturent et deviennent inactives [24]. Comme alternative, *Holtze et al.* ainsi que *Roach et al.* proposent d'utiliser des tensioactifs dont le groupement de tête est non-ionique (OEG (Oligo-Ethylène-Glycol) ou PEG (Poly-Ethylène-Glycol), solubles dans l'eau et capables de former une couche inerte à l'interface eau-huile [20,24] (**Figure 36**).

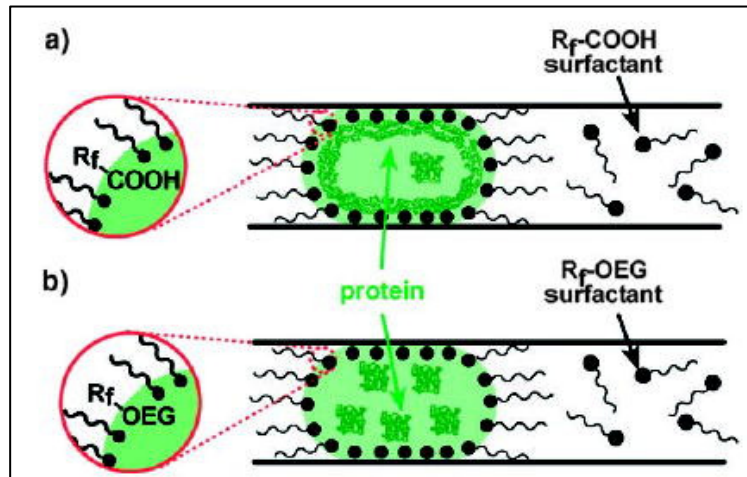


Figure 16 : Représentation schématique de la surface des plugs en interaction avec le tensioactif à l'interface entre la phase aqueuse et la phase huile fluorée. a) Le tensioactif avec la tête polaire COOH forme une interface non inerte responsable de l'adsorption des protéines. b) Le tensioactif avec la tête apolaire Oligo-Ethylène-Glycol (OEG) forme une interface biocompatible et inerte. D'après *Roach et al.* [20].

Les travaux de *Clausell et al.*, représentés dans la **Figure 37**, ont confirmé la biocompatibilité des tensioactifs fluorocarbonés à tête non-ionique en testant la survie de cellules humaines (HEK293T et Jurkat) en présence de tensioactifs fluorocarbonés à tête polaire ou non polaire. Ils ont observé que seules les cellules qui étaient en présence de tensioactifs à tête non ionique ont survécu et proliféré. Ainsi, les auteurs ont démontré que des cellules de type HEK293T encapsulées dans des gouttes de 660 pL pouvaient proliférer (pour des incubations allant jusqu'à 14 jours) et être remises en culture ensuite [25].

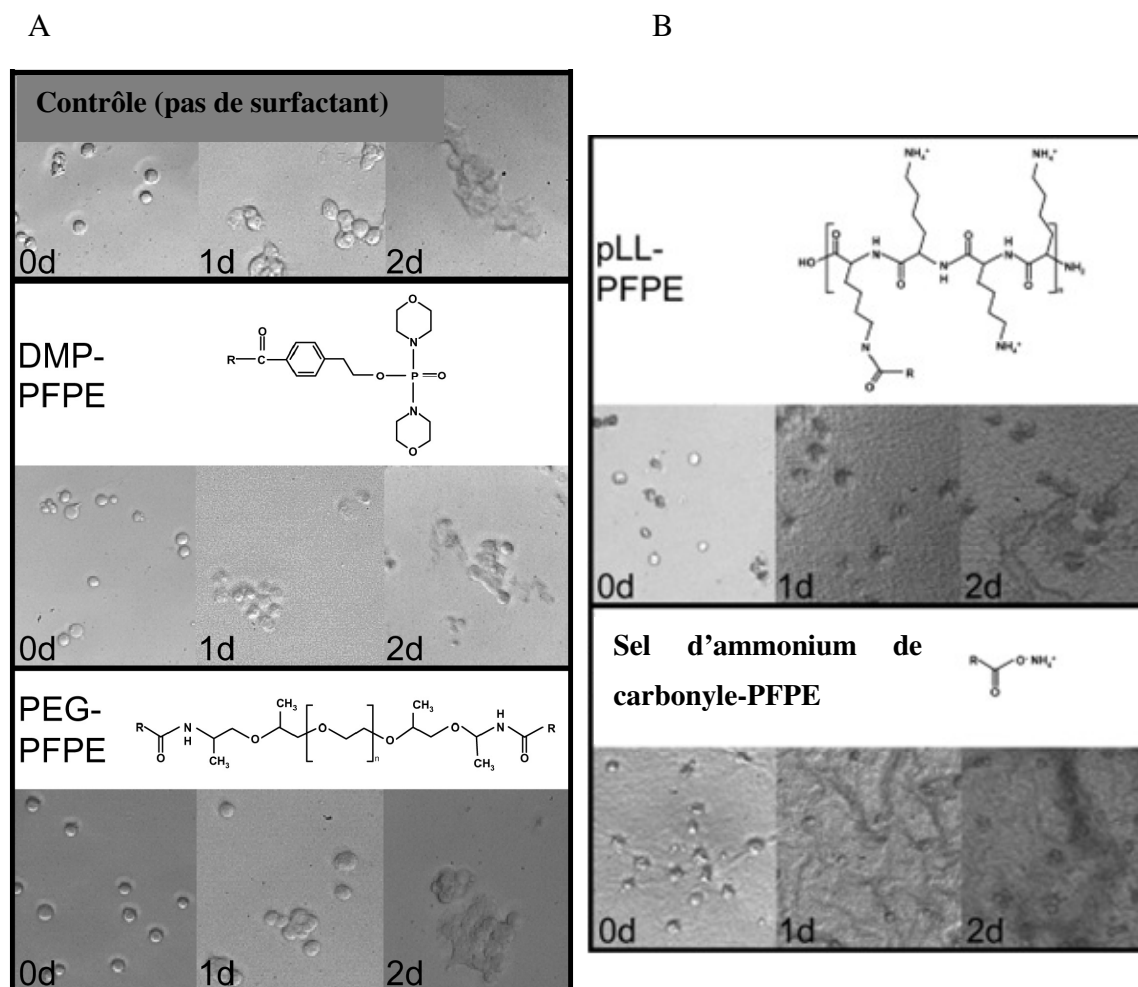


Figure 37 : Observation microscopique de la survie des cellules HEK293T déposées sur de l'huile perfluorée FC40 (3M) en présence de différents types de tensioactifs dont la structure de la tête hydrophile est représentée. (A) Les cellules survivent ce qui signifie que les tensioactifs fluorocarbonés à tête apolaire testés ici sont biocompatibles. (B) Les cellules meurent et les tensioactifs fluorocarbonés à tête ionique testés sont donc non-biocompatibles. PFPE : perfluoropolyether (Krytox), PEG : polyéthylène glycole, DMP : Dimorpholinophosphate, PLL : poly-L-lysine. D'après Clausell et al. [25].

Pour le transport des composés entre les gouttes, les études qui ont été réalisées sur des gouttes d'eau-dans-l'huile [21,26,27,28] et des gouttes d'eau-dans-l'huile-dans-l'eau [29,30,31] immobilisées ont permis d'établir deux mécanismes, les molécules : (i) diffusent dans l'huile porteuse [27,29,32,33] ou/et (ii) sont transportés par les micelles qui se détachent de l'interface [26,29,30,32,34]. Cette partie sera développée dans le reste de ce chapitre.

Afin de pouvoir utiliser le système de la microfluidique en gouttes pour la sélection d'alcool déshydrogénase optimisées, il est impératif de vérifier au préalable la faisabilité du test enzymatique développé en gouttes. Le Dr Linas Mazutis, qui a fait sa thèse dans notre

laboratoire, a montré que l'activité de l'alcool déshydrogénase mesurée en gouttes de 10pL était inférieure à celle mesurée en microplaques (**Figure 38**) [35].

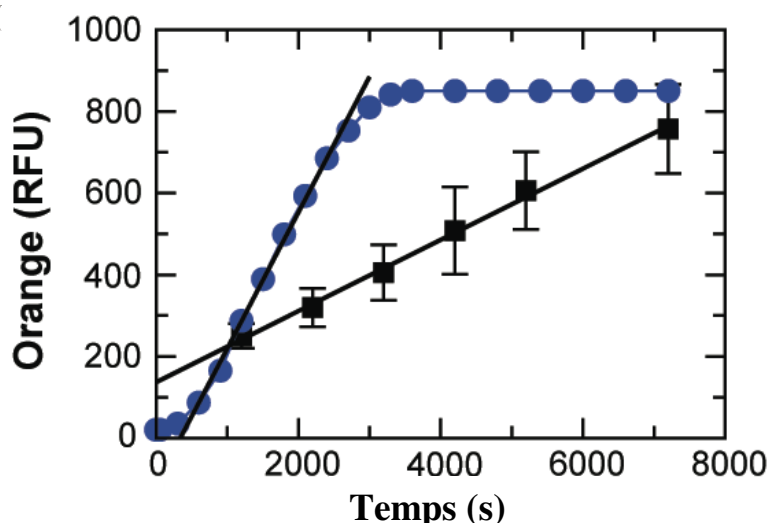


Figure 38 : Comparaison de la cinétique de l'alcool déshydrogénase en gouttes (carrés noirs) et microplaque de 96 puits (ronds bleus). Les pentes de la réaction enzymatique, réalisées dans les mêmes conditions, en microplaque et en gouttes sont respectivement égales à 0.33 et 0.087. Données issues de la thèse de Linas Mazutis [35].

Cette faible activité peut s'expliquer par deux phénomènes : (i) le surfactant a un effet inhibiteur sur l'alcool déshydrogénase ou (ii) un ou plusieurs substrats ou produits de la réaction enzymatique fuient de la goutte.

Dans ce chapitre de la thèse, nous avons étudié la faisabilité et l'efficacité du test fluorogénique de l'alcool déshydrogénase en gouttes. Nous avons, dans un premier temps, confirmé et complété les résultats obtenus par le Dr Mazutis en mettant en évidence la fuite d'au moins deux composants du test enzymatique choisi (la résorufine et la forme réduite du PMS, accepteur d'électrons intermédiaire, voir **Figure 29**) rendant impossible la détection de gouttelettes contenant des variants d'intérêt. Par la suite, ces phénomènes ont été étudiés et différentes stratégies ont été testées et validées pour limiter la fuite de composés entre les compartiments.

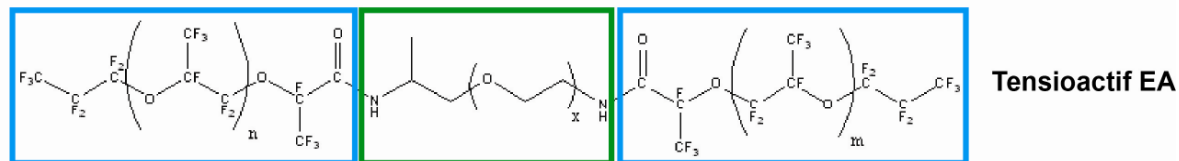
III.2 Matériels et méthodes

- Les tubes PTFE : (poly-tetrafluoroethylene) dont le diamètre interne est de 0.56 mm et l'externe est de 1.07 mm ont été achetés de chez Fisher Bioblock.
- La BSA, la solution de caséine à 5%, la Rhodamine 101, la Sulforhodamine 101, la résorufine ainsi que tous les accepteurs d'électrons intermédiaires testés ont été achetées chez Sigma Aldrich.
- L'huile HFE7500 et l'huile FC40 ont été achetées chez 3M.

III.2.1 Les tensioactifs et les huiles porteuses fluorocarbonés

Pour les tests entre les gouttes de fuite de la résorufine et des accepteurs d'électrons réduits, deux surfactants, dont les structures sont représentées dans la **Figure 6**, ont été testés. Le premier type représenté dans la (**Figure 39 panel A**) est un tensioactif avec une tête hydrophile formée par un groupement Poly-Ethylène-Glycol (PEG) et une queue fluorée formée par un groupement Krytox appelé aussi perfluoropolyether (PFPE). Ce tensioactif que nous appellerons « le tensioactif EA » dans le reste de ce document, a été caractérisé par Holtze et ses collaborateurs [24] et nous a été fourni par Raindance Technologie (Lexington, MA, USA). Le deuxième type est composé d'une queue fluorée formée par 1, 2 ou 3 molécules de krytox en plus d'une tête hydrophile formée par une chaîne longue de Jeffamine de poids moléculaire de respectivement 600g/mol, 900g/mol, 1000g/mol, 2000g/mol ou 3000g/mol (**Figure 39 panel B**). Ces tensioactifs que nous appellerons « les tensioactifs Jeff » dans le reste de ce document ont été synthétisés dans notre laboratoire par le Dr E. Mayot et le doctorant JF. Bartolo (en thèse sous la direction du Dr V. Taly).

A



B

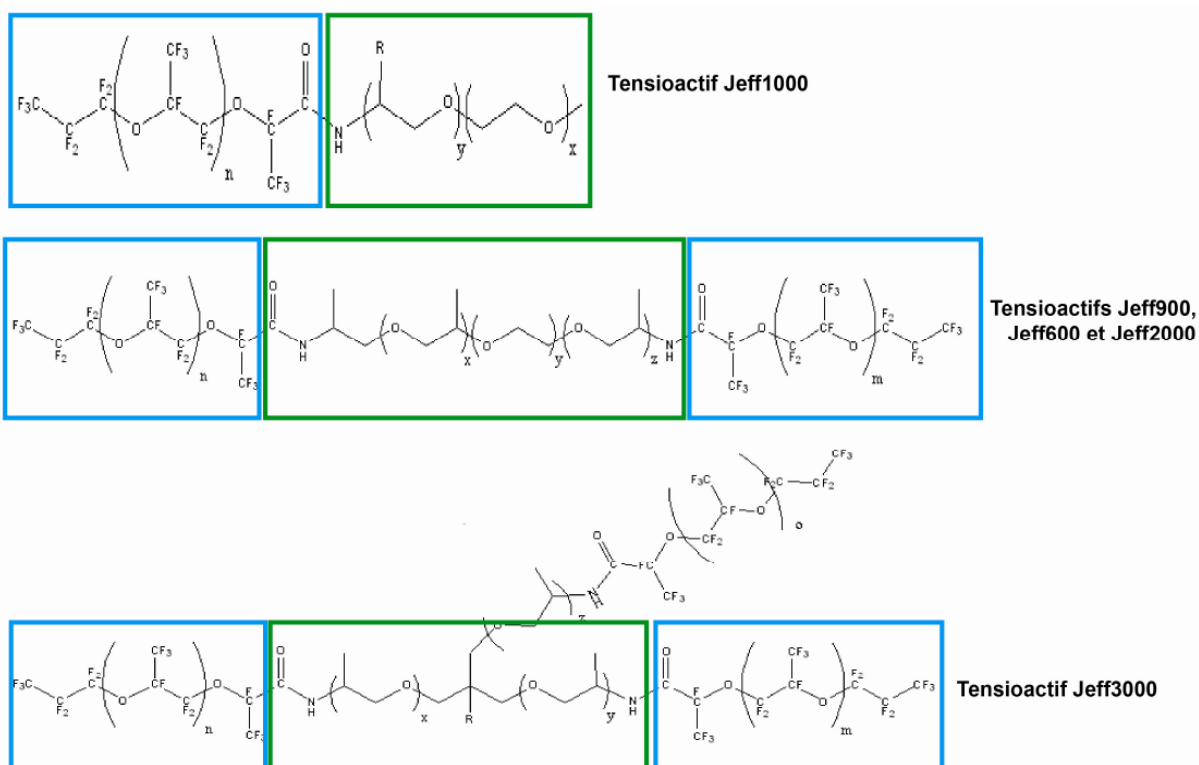


Figure 39 : Structure chimique des tensioactifs fluorocarbonés. (A) Le tensioactif EA (B) les différents types de tensioactifs possédant une tête hydrophile de type Jeffamine. (Cadre bleu) Molécule de krytox (Cadre vert) Tête hydrophile du tensioactif qui est un PEG pour le tensioactif EA et un groupement Jeffamine pour le tensioactif Jeff.

Les huiles porteuses perfluorocarbonés utilisées pour les tests de fuite sont les huiles FC40 et HFE7500 (3M, Etats-Unis) dont les structures chimiques sont représentées dans la **Figure 40**. L'huile FC40 est totalement fluorée alors que l'huile HFE7500 n'est que partiellement.

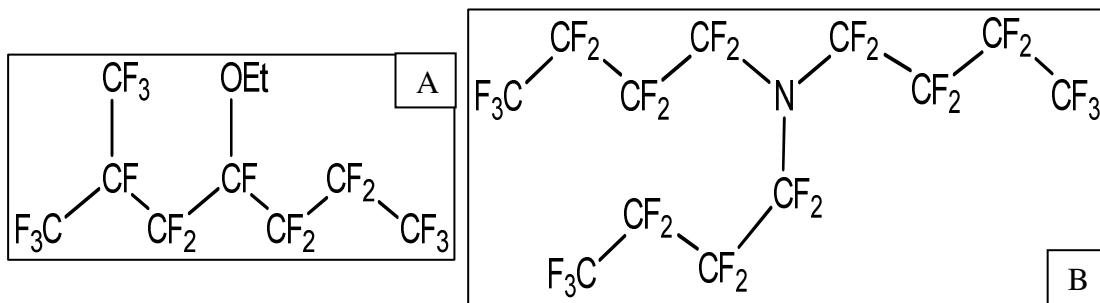


Figure 40 : Structure chimique des huiles porteuses perfluorocarbonées FC40 et HFE7500. (A) Huile HFE7500 partiellement fluorée et (B) huile FC40 totalement fluorée.

III.2.2 Fabrication des modules microfluidiques

Pour la fabrication des modules microfluidiques en poly-diméthylsiloxane (PDMS) nous avons utilisé la stratégie de lithographie douce. Un moule de SU-8 (MicroChem Corp) a été fabriqué sur une galette de silicone (Siltronix) par exposition aux rayons UV (MJB3 contact mask aligner; SUSS MicroTec) à travers un masque photolithographique (Selba SA) et par développement (SU-8 developer; MicroChem Corp). Par la suite, un agent de polymérisation (Sylgard 184 silicone elastomer kit; Dow Corning Corporation) a été ajouté au PDMS à une concentration finale de 10% (p/p). Cette solution a été mélangée et étalée sur le moule, déposée dans une boîte de pétri, à une hauteur de ~10mm. Après quelques minutes de dégazage et quelques heures de polymérisation à 65°C, le PDMS a été décollé soigneusement du moule et les entrées/sorties ont été trouées avec une pince à biopsie « Harris Uni-Core » de 0.75mm de diamètre (Electron Microscopy Sciences) et nettoyées avec de l'azote sous pression. Le PDMS a été collé, du côté contenant les structures microfluidiques, sur une lame de verre de microscope 76 *26 *1 mm (Paul Marienfeld GmbH & Co. KG) en les pressant ensemble suite à leur exposition à un plasma d'oxygène (PlasmaPrep 2 plasma oven; GaLa Instrumente GmbH). Finalement, les canaux microfluidiques sont nettoyés avec de l'azote sous pression après les avoir recouverts d'un revêtement de surface hydrophobe en utilisant du silane : 1H, 1H, 2H, 2H-perfluorodécyltrichlorosilane (97 %, ABCR, Karlsruhe, Allemagne).

III.2.3 Le système optique de détection de la fluorescence des microgouttelettes

Le montage optique représenté dans la Figure 41 est composé d'un microscope Leica monté sur une plateforme capable d'amortir les vibrations (Thorlabs GmbH). Deux

lasers, un laser 532 nm (CrystaLaser CL2000; 50 mW, L532) et un laser 488 nm (Spectra-Physics Cyan; 20 mW; L488) sont combinés grâce à un miroir dichroïque (D1 = Di01-R488-25x36; Semrock) et un jeu de miroirs (M = BB1-E02; Thorlabs GmbH). Les faisceaux de laser ont été montés, en présence d'une combinaison de lentilles (CL = LJ1878L2-A + LJ1653L1-A; Thorlabs GmbH) de 25mm de diamètre, de sorte à avoir une ligne de $\sim 10 \times \sim 150 \mu\text{m}$. A l'intérieur du microscope, la lumière du laser est réfléchiée dans un plan LD Neofluar 40x/0.55 sur l'objectif du microscope puis dirigée via un canal sur le système microfluidique posé sur le microscope. Une caméra Guppy (Allied Vision) a été installée sur la partie supérieure du microscope pour la prise de films et de photos lors de la manipulation des microgouttelettes. Les lumières émises des gouttes fluorescentes sont capturées par l'objectif du microscope pour prendre le même chemin que les faisceaux des lasers. Elles sont ensuite séparées du faisceau du laser par un séparateur dichroïque de faisceaux ayant une longueur d'onde 488/532/638 nm (D2 = Di01-T488/532/638-25x36x5.0; Semrock) et passent à travers un filtre 488 nm et 532 nm (C = NF01-488U-25 + NF01-532U; Semrock). La lumière fluorescente est décomposée en deux composantes, vert et orange, grâce à un miroir dichroïque (D3 = FF562-Di02-25x36). Chaque composant est ensuite filtré à travers un ensemble de filtres et de lentilles (B = FF01-625/26 [Semrock] + AC254-030-A1 [Thorlabs GmbH] C = FF01-514/30 [Semrock] + AC254-030-A1 [Thorlabs GmbH]) et collecté dans deux tubes photomultiplicateurs H5784-20 (Hamamatsu Photonics; PMTg et PMTo). L'acquisition et le contrôle de données (DAQ) ont été effectués par une carte « PCI-7831R Multifunction Intelligent DAQ » exécutant un programme écrit dans LabView 8.2 (National Instruments). Le tube photomultiplicateur renvoie sur le logiciel Labview une tension U en fonction du gain G appliqué au PMT. Afin de pouvoir comparer les différentes valeurs de U obtenues pour différents gain, nous avons défini l'unité de fluorescence relative (RFU) calculée grâce à la formule suivante : $U/G^{7.2}$ avec U et G en volts. La valeur de l'exposant 7.2 nous a été fournie par le fabricant du PMT et a été vérifiée expérimentalement.

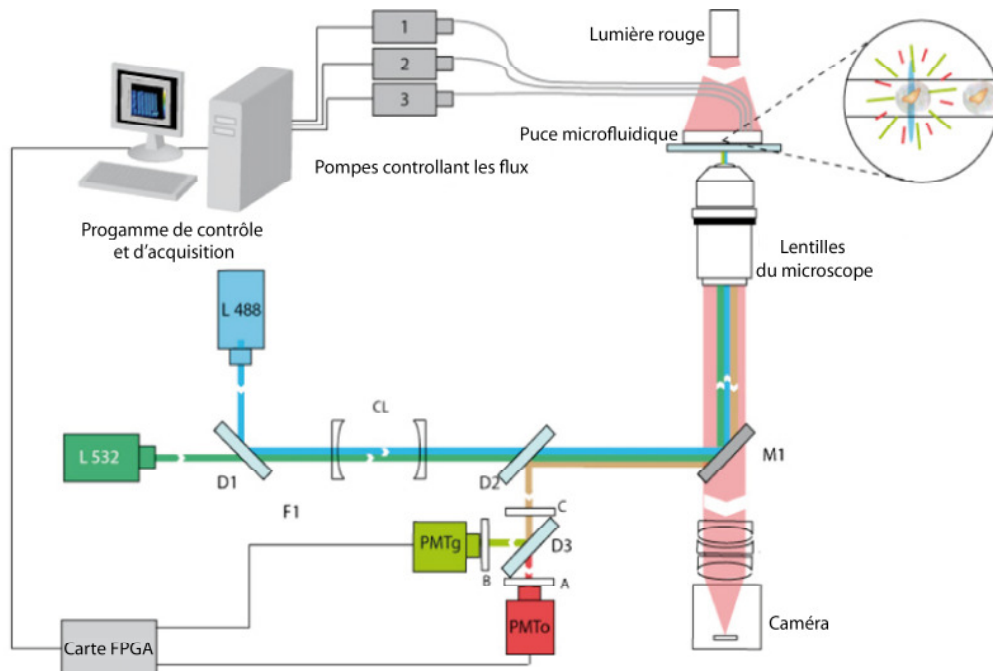


Figure 41 : Représentation schématique de l'installation du système optique de détection de la fluorescence de la résorufine dans des microgouttelettes. L'excitation du fluorophore se fait par un laser bleu L488nm focalisé au niveau des canaux microfluidiques et l'émission est mesurée au niveau du PMT bleu. Figure issue de la publication de Baret et al. [36].

III.3 Résultats et discussions

Pour confirmer les observations du Dr. Mazutis sur la possibilité de fuite des composés du test fluorogénique de l'alcool déshydrogénase (QEDH) entre les gouttes, nous avons créé deux types de gouttes stabilisées avec 1% de tensioactif EA (p/p) dans de l'huile HFE7500 : un type contenant les QEDH avec les composés du test fluorogénique et l'autre type ne contenant que les composants du test fluorogénique (mais sans enzyme). Ces deux populations contiennent également une concentration différente de fluoresceine (5 μ M pour les gouttes contenant l'ensemble des composants du test et 50 μ M pour l'autre type de gouttes). Ces gouttes ont été collectées pendant ~ 60 minutes dans une seringue puis réinjectées dans un second module microfluidique pour détecter leur fluorescence (données non montrées). Cette analyse a montré que les deux populations de gouttelettes présentaient les différences de signaux de « fluorescence verte » attendus (indiquant les deux concentrations de fluoresceine) mais présentaient le même niveau de « fluorescence rouge » (indiquant une concentration équivalente de résorufine, produit final de notre test enzymatique, dans les deux types de gouttelettes) (données non montrées). Ce test nous a permis de confirmer l'hypothèse de la fuite de un ou plusieurs composés du test fluorogénique de la QEDH. Seule la fuite du PMS_{red} (forme réduite de la phénazine méthosulfate) et/ ou la fuite de la résorufine produite suite à la réduction de la résazurine peuvent expliquer ces résultats (voir **Figure 29**).

III.3.1 La résorufine

III.3.1.1 Développement de la plateforme microfluidique

Pour étudier le transport de la résorufine entre des gouttes, nous avons développé la plateforme microfluidique schématisée dans la **Figure 42** et qui est composée de deux modules différents. Le premier permet de créer une émulsion composée de deux types de gouttelettes alors que le deuxième permet de les réinjecter et d'analyser leur fluorescence. Dans un premier temps, une émulsion composée d'un mélange de gouttes contenant 1 μ M de résorufine et de gouttes contenant 100 μ M de résorufine, a été produite (**Figure 42 panel A**). Ces gouttelettes sont collectées dans une tubulure en PTFE (poly-tetrafluoroethylene) pendant ~60 minutes et immédiatement réinjectées. Le débit de la phase huile (huile HFE7500 ou huile FC40) est ajusté de sorte que les gouttes réinjectées soient suffisamment espacées dans le canal microfluidique pour permettre l'analyse de leur fluorescence (**Figure 42 panel B**).

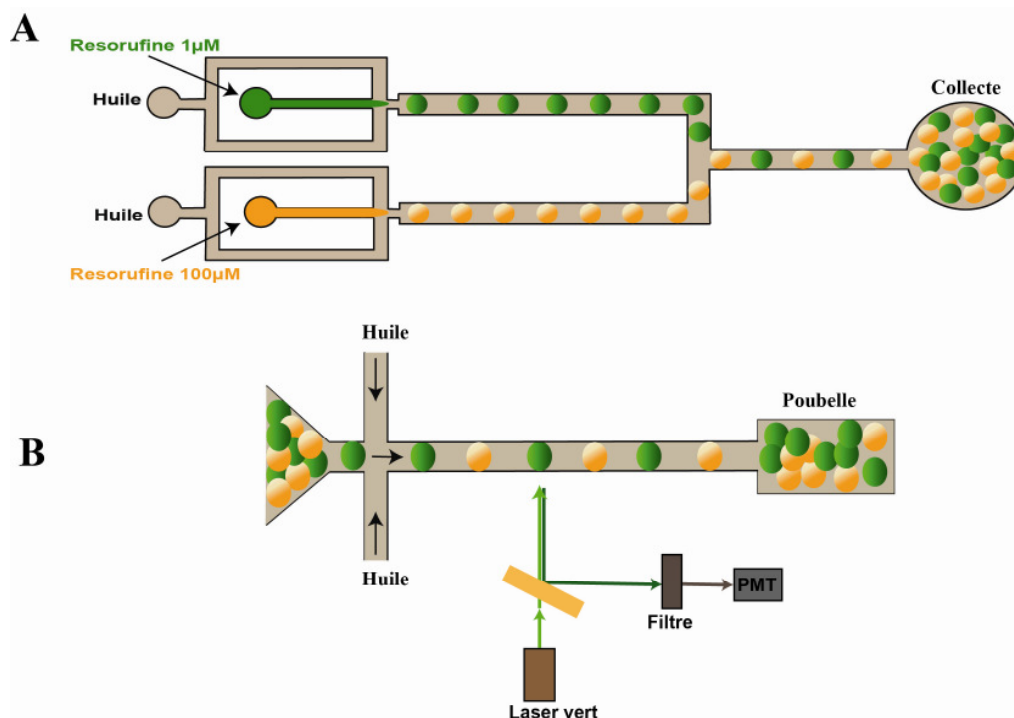


Figure 42 : Modules microfluidiques utilisés pour tester la fuite de la résorufine entre microgouttelettes. (A) Le module microfluidique de création d'une émulsion composée d'un mélange de gouttes contenant $1\mu\text{M}$ de résorufine et de gouttes contenant $100\mu\text{M}$ de résorufine. (B) Le module microfluidique de réinjection des gouttes pour les analyser.

III.3.1.2 Mise en évidence de l'échange de résorufine entre les gouttes

Pour démontrer l'échange de la résorufine entre les microgouttelettes d'eau-dans-l'huile, deux types de gouttes de 20 pL ont été créés : un contenant $100\mu\text{M}$ de résorufine et l'autre $1\mu\text{M}$ de résorufine (**Figure 42 panel A**). Pour les stabiliser, nous avons utilisé $0,5\%$ (p/p) de tensioactif EA dans de l'huile HFE7500. Les débits des deux phases aqueuses étaient de $50\mu\text{L/h}$ et celles des deux phases huiles étaient de $200\mu\text{L/h}$. Cette émulsion a été collectée pendant 60 minutes dans une tubulure en PTFE puis réinjectée immédiatement dans un deuxième module microfluidique pour analyser leur fluorescence pendant 120 minutes (**Figure 42 panel B**). Le débit de l'émulsion réinjectée était de $20\mu\text{L/h}$ et celle de la phase huile qui permettait d'espacer les gouttelettes était de $120\mu\text{L/h}$. Les résultats, représentés dans la **Figure 43**, montrent deux populations « dont le niveau de fluorescence » se rapprochent l'une de l'autre au cours du temps. La population de gauche correspond aux gouttes contenant $1\mu\text{M}$ de résorufine et celle de droite correspond aux gouttes contenant $100\mu\text{M}$ de résorufine. A $t=0$, ces deux populations sont bien distinctes et après 120 minutes elles sont presque confondues. La diminution de la fluorescence des gouttes à $100\mu\text{M}$ en faveur de

l'augmentation de celles contenant $1\mu\text{M}$ s'explique par une fuite de la résorufine des gouttes fortement concentrées vers les moins concentrées jusqu'à atteindre un état d'équilibre.

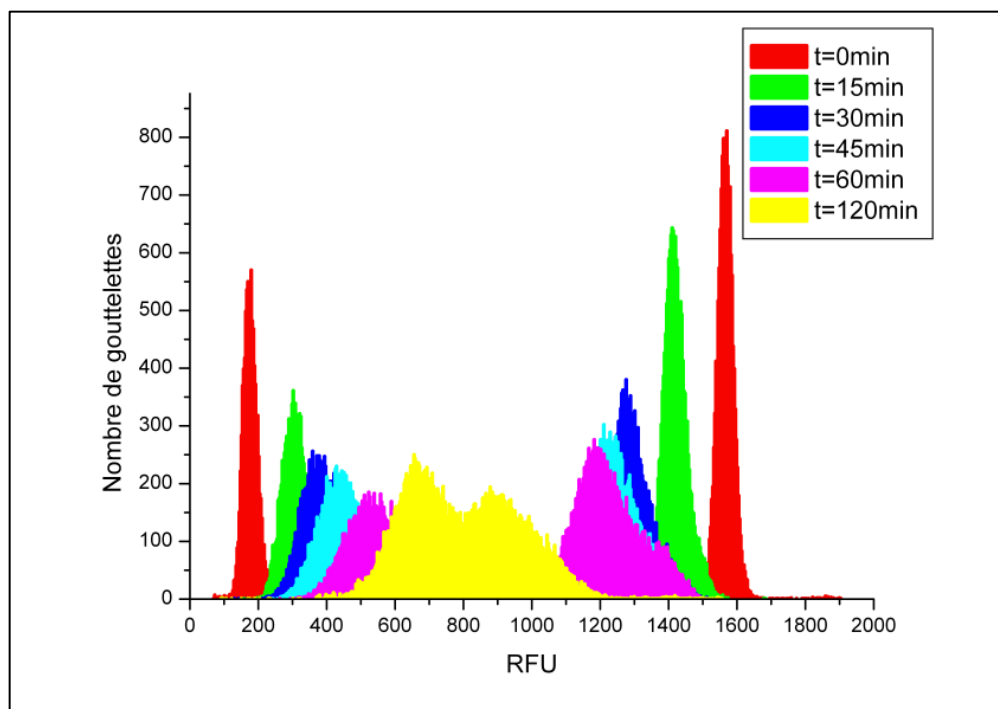


Figure 43 : Suivi pendant 2 heures de l'échange de la résorufine entre des gouttes stabilisées avec le tensioactif EA à 0,5% (p/p) dans de l'huile HFE7500.

Les étapes suivantes se sont essentiellement axées sur la caractérisation de ce phénomène de fuite entre les gouttelettes et sur la recherche de moyens permettant de le limiter. Ces travaux s'inscrivent dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe du Dr JC. Baret (Max-Planck Institute for Dynamics and Self-organization, Goettingen, Germany).

III.3.1.3 Effets de la concentration de tensioactif

Pour étudier l'effet de la concentration de tensioactif EA sur l'échange de la résorufine entre les microgouttelettes, nous avons, à nouveau, utilisé la plateforme microfluidique décrite dans la **Figure 42**. Pour cela, différentes émulsions ont été créées en faisant varier à chaque fois la concentration du tensioactif EA dans l'huile HFE7500 de 0,25% à 8% (p/p). Chaque émulsion est constituée d'un mélange de gouttes contenant $100\mu\text{M}$ de résorufine et de gouttes contenant $1\mu\text{M}$ de résorufine. Les débits des phases aqueuses et de la phase huile que nous avons utilisés pour créer ces gouttes de 20pL sont regroupés dans le **Tableau 7**.

Concentration (%) du tensioactif EA dans l'huile HFE 7500 (p/p)	Débit de la phase aqueuse contenant 100µM de résorufine (µL/h)	Débit de la phase aqueuse contenant 1µM de résorufine (µL/h)	Débit de la phase huile (1) (µL/h)	Débit de la phase huile (2) (µL/h)
0,25	50	50	200	200
0,5	50	50	200	200
2	50	50	280	280
4	50	50	320	320
8	50	50	400	400

Tableau 7 : Les différents débits des phases dispersées et continues utilisées pour créer des microgouttelettes de 20pL de volume en fonction de la concentration du tensioactif EA dans l'huile HFE7500 utilisée.

Pour caractériser l'échange entre les gouttes, nous nous sommes basés sur le calcul d'un paramètre α pour chaque concentration de tensioactif EA dans l'huile HFE7500 utilisée.

Ce paramètre α est donnée par l'équation suivante :

$$\alpha = \log (RFU_{\max} / RFU_{\min}) / \log (RFU_{0\max} / RFU_{0\min})$$

RFU_{\max} et RFU_{\min} représentent respectivement l'intensité de la fluorescence des gouttes à haute concentration et à faible concentration de résorufine au cours du temps alors que $RFU_{0\max}$ et $RFU_{0\min}$ représentent respectivement l'intensité de la fluorescence des gouttes à haute concentration et à faible concentration de résorufine à $t=0$. Le temps $t=0$ est défini comme le temps auquel nous mesurons la fluorescence des premières gouttes réinjectées. A $t=0$, le paramètre α est égal à 1. S'il y a échange de résorufine entre les deux types de gouttes, α tend vers 0. Ceci s'explique par une diminution de la fluorescence des gouttes contenant initialement une importante concentration de résorufine en faveur d'une augmentation de la fluorescence des gouttes contenant initialement une faible concentration de résorufine (tend vers un état d'équilibre de la concentration des deux types de gouttes). Les résultats obtenus sont représentés dans la **Figure 44**. Ils montrent que pour les concentrations élevées de tensioactif (4% et 8%), l'échange de résorufine entre les gouttes est très rapide, le paramètre α tend vers 0 au bout de 60min alors que pour des concentrations moins élevées (2%, 0,5% et 0,25%) cet échange est moins rapide. En effet, le paramètre α commence à tendre vers 0 au bout de 120 min. La vitesse de l'échange de résorufine entre les gouttes est dépendante de la concentration de tensioactif utilisée, elle est donc micellaire.

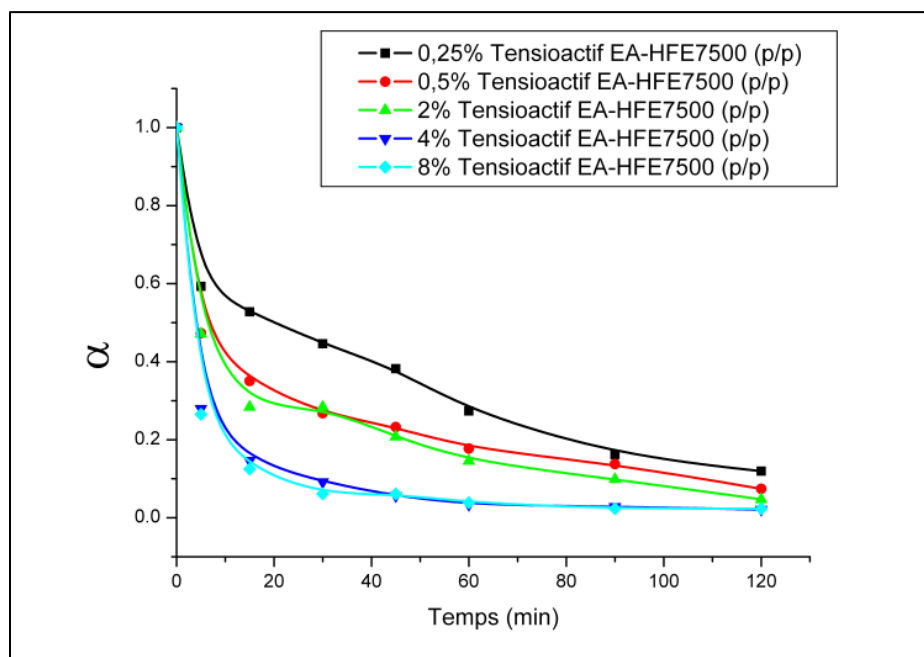


Figure 44 : Suivre sur 2 heures de l'échange de la résorufine entre des gouttes stabilisées avec l'huile HFE7500 en présence du tensioactif EA à différentes concentrations : 0,25% ; 0,5% ; 2% ; 4% et 8%. Avec $\alpha = \log(RFU_{max}/RFU_{min}) / \log(RFU_{0max}/RFU_{0min})$.

Ces travaux font l'objet d'une publication, en cours de préparation, en collaboration avec l'équipe du Dr JC. Baret (Max-Planck Institute for Dynamics and Self-organization, Goettingen, Germany). Des analyses quantitatives sont en cours pour permettre de relier les cinétiques d'échange de molécules aux grandeurs physico-chimiques des tensioactifs telles que les concentrations micellaires en solution.

III.3.1.4 Les Différentes stratégies testées pour diminuer l'échange de résorufine

III.3.1.4.1 Effet de l'ajout de biopolymères

Pour résoudre le problème de l'échange de résorufine entre les gouttes, la première stratégie que nous avons choisie était d'ajouter des biopolymères au sein des microgouttelettes. L'albumine de sérum bovin (ASB plus connue sous le nom de BSA en anglais) était celui que nous avons testé dans un premier temps. Pour étudier l'effet de la BSA sur l'échange de résorufine entre les gouttes, nous avons utilisé encore une fois la plateforme microfluidique décrite dans la Figure 42 pour créer différentes émulsions. Chacune est formée d'un mélange de deux types de gouttes de 20pL stabilisées avec le tensioactif EA dans l'huile HFE7500 à 1% (p/p) : un type contenant 100 μ M de résorufine

avec ou sans BSA et l'autre type $1\mu\text{M}$ de résorufine avec ou sans BSA. Les concentrations de BSA testées variaient entre 1mg/mL et 50mg/mL . Sur la **Figure 45** nous avons représenté les résultats que nous avons obtenus avec 25mg/mL et 50mg/mL de BSA. Pour les concentrations inférieures à 25mg/mL , nous n'avons observé aucun effet sur la fuite de fluorophore entre les gouttes (données non montrées).

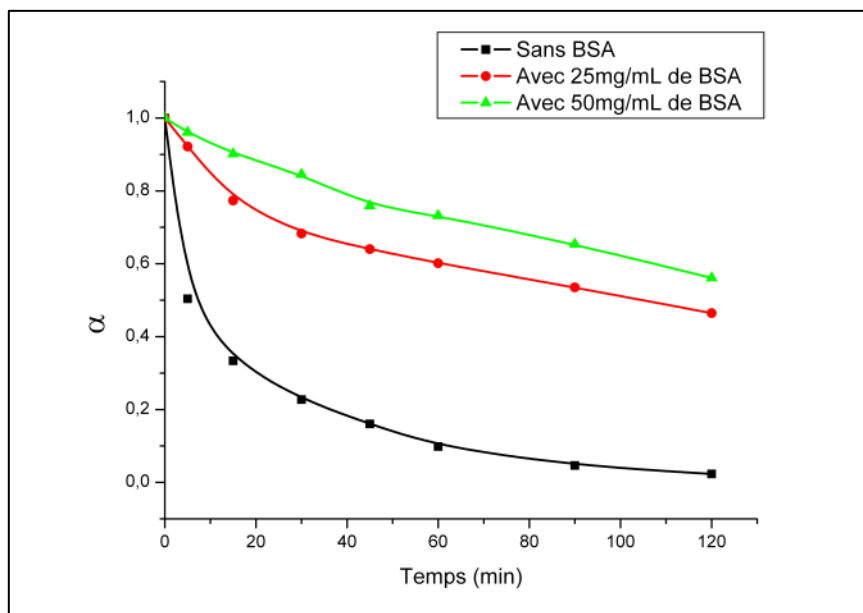


Figure 45 : Suivi pendant 2 h de l'échange de la résorufine entre des gouttes stabilisées dans l'huile HFE 7500 en présence du tensioactif EA à 1% (p/p). En absence de BSA (carrés noirs), en présence de 25mg/mL de BSA (ronds rouges) et en présence de 50mg/mL de BSA (triangles verts). Avec $\alpha = \log(RFU_{\text{max}}/RFU_{\text{min}}) / \log(RFU_{\text{max}}/RFU_{\text{min}})$.

Pour les gouttes sans BSA la fuite de résorufine entre les gouttes est rapide, le paramètre α tend vers 0 après ~ 120 minutes (état d'équilibre des concentrations des deux types de gouttes) (**Figure 45**). Cependant, l'ajout de 25mg/mL ou de 50mg/mL de BSA a considérablement diminué la vitesse de l'échange de fluorophore entre les gouttes. En effet, en présence de 25mg/mL de BSA, la valeur de α est égale à ~ 0.5 après 120 minutes ce qui signifie que nous n'avons que $\sim 50\%$ de fuite. En présence de 50mg/mL de BSA, la valeur de α est égale à ~ 0.6 après 120 minutes ce qui signifie que nous n'avons que $\sim 40\%$ de fuite. Ce phénomène peut s'expliquer par la capacité de la BSA à s'adsorber à l'interface eau-huile et à y former un biofilm. Ces résultats sont en accord avec les travaux de *Courtois et al.* qui ont réussi à diminuer la fuite d'un analogue de la fluorescéine (3-O-Méthylfluoresceine) en ajoutant 5% (p/v) soit 50mg/mL de BSA au sein de leurs gouttes (la fuite a diminué de 45% à 3% au bout de 7 heures). Ces derniers utilisent une huile minérale en présence d'un tensioactif hydrocarboné Abil EM 90 à 3% (p/p) [19]. Des travaux plus anciens ont aussi rapporté la capacité des biopolymères tels que la BSA à stabiliser les doubles émulsions d'eau-dans-

l'huile-dans-l'eau et à éviter la fuite des composés qu'elles contiennent grâce à leur grande capacité à former des complexes au niveau de l'interface eau-huile [31,37].

Nous avons ensuite étudié l'effet de l'ajout de ces différentes concentrations de BSA (de 1mg/mL à 50mg/mL) sur l'activité de l'alcool déshydrogénase (ADH) purifiée en utilisant le test fluorogénique décrit dans le **Chapitre II**. Ce test a été réalisé en microplaque à 96 puits (comme décrit dans la section Matériel et Méthodes du **Chapitre II**) et les mesures ont été faites à 25°C grâce à un spectrofluorimètre SpectraMax M5 (Molecular Devices, CA). Les résultats de la **Figure 46** montrent que l'ajout de la BSA a un effet inhibiteur sur l'activité de l'ADH. Cette inhibition qui est directement liée à la concentration de BSA utilisée peut s'expliquer par deux phénomènes : soit (i) par inhibition directe de l'enzyme soit (ii) par complexations à la résazurine limitant ainsi sa réduction soit au PMS. Ce résultat est en accord avec les travaux de *Kusuda et al.* qui ont déjà démontré et étudié la capacité de la BSA à se complexer aux polyphénols naturels [38].

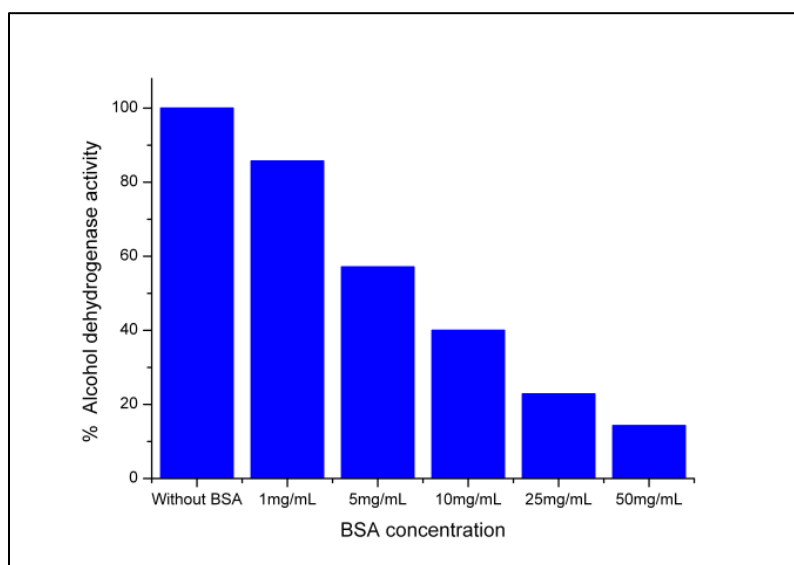


Figure 46 : Mesure en microplaque de 96 puits de l'activité d'oxydation de l'éthanol par l'alcool déshydrogénase en présence de différentes concentrations de BSA. Ce test a été réalisé en présence de 100mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM CaCl₂, 5 mM Ethylamine, 10 μM PQQ, 400 μM PMS, 200 μM resazurine et 1% éthanol.

En conclusion, bien que l'ajout de la BSA permette de diminuer considérablement la fuite de la résorufine entre les microgouttelettes, elle s'avère n'être pas compatible avec le test fluorogénique de l'alcool déshydrogénase en gouttes. Par conséquent, nous avons cherché un moyen, autre que l'ajout de BSA dans les gouttes, pour limiter la fuite de résorufine. Nous avons dans un deuxième temps, testé l'ajout d'un autre biopolymère, la caséine, au sein des

gouttes pour étudier son effet sur le phénomène d'échange du fluorophore. Nous avons utilisé encore une fois la plateforme microfluidique décrite dans la **Figure 42** pour créer différentes émulsions. Chacune est formée d'un mélange de deux types de gouttes de 20pL stabilisées avec le tensioactif EA dans l'huile HFE7500 à 1% (p/p) : un type contenant 100 μ M de résorufine avec ou sans caséine et l'autre type 1 μ M de résorufine avec ou sans caséine. Les concentrations de caséine testées variaient entre 1mg/mL et 25mg/mL. Sur la **Figure 47** nous avons représenté les résultats que nous avons obtenus avec 25mg/mL de caséine. Pour les concentrations inférieures à 25mg/mL, nous n'avons observé aucun effet sur la fuite de fluorophore entre les gouttes (données non montrées).

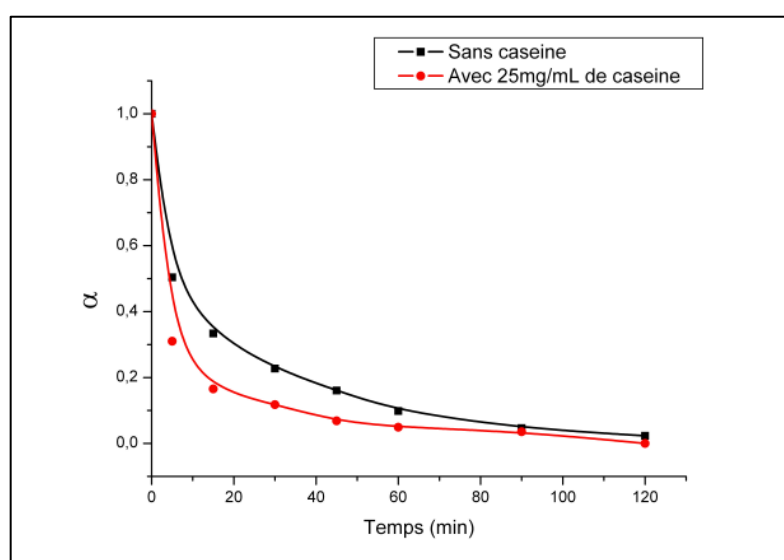


Figure 47 : Suivi pendant 2 h de l'échange de la résorufine entre des gouttes stabilisées dans l'huile HFE 7500 en présence du tensioactif EA à 1% (p/p). En absence de caséine (carrés noirs), en présence de 25mg/mL de caséine (ronds rouges). Avec $\alpha = \log(RFU_{max}/RFU_{min}) / \log(RFU_{0max}/RFU_{0min})$.

Les résultats de la **Figure 47** montrent que pour les gouttes sans caséine la fuite de résorufine entre les gouttes est rapide, le α tend vers 0 après ~120 minutes (état d'équilibre des concentrations des deux types de gouttes). L'ajout de 25mg/mL de caséine a tendance à légèrement augmenter la vitesse d'échange de la résorufine entre les gouttes. Par conséquent, nous avons cherché un moyen, autre que l'ajout de BSA ou de la caséine dans les gouttes, pour limiter la fuite de résorufine.

III.3.1.4.2 Effets de l'huile porteuse

La seconde stratégie que nous avons testée pour diminuer la fuite de la résorufine entre les gouttes était de remplacer l'huile porteuse HFE7500 partiellement fluorée par l'huile

FC40 qui est totalement fluorée. Pour cela, nous avons utilisé la plateforme microfluidique décrite dans la **Figure 42** pour créer 2 émulsions différentes. Une des émulsions est stabilisée avec l'huile porteuse FC40 en présence du tensioactif EA à 4% (p/p) alors que l'autre est stabilisée avec l'huile porteuse HFE7500 en présence du tensioactif EA à 4% (p/p) (au dessous de cette concentration les gouttelettes ne sont pas stables). Chaque émulsion est constituée d'un mélange de deux types de gouttes de 20pL contenant 100μM de résorufine pour l'un et 1μM de résorufine pour l'autre. Les résultats, illustrés dans la **Figure 48**, montrent que l'utilisation de l'huile FC40 diminue considérablement la fuite du fluorophore entre les gouttes. En effet, nous observons qu'au bout de 120 minutes et en présence de 4% de tensioactif EA dans FC40, la valeur de α est égale à ~0.6 (40% de fuite) alors qu'elle tend vers 0 (fuite totale entre les gouttes) au bout de ~60 minutes et en présence de 4% de tensioactif EA dans HFE. Même à une concentration de 0,25% de tensioactif EA dans HFE 7500, la fuite de résorufine entre les gouttes est plus rapide que celle en présence de 4% de tensioactif EA dans FC40, le α est égal à 0,1 (90% de fuite) après 120 minutes. Il s'avère donc que l'huile fluorée FC40 est meilleure candidate que l'huile HFE7500 puisque son utilisation en présence du tensioactif EA a permis de diminuer la fuite de la résorufine entre les gouttes pendant 2 heures.

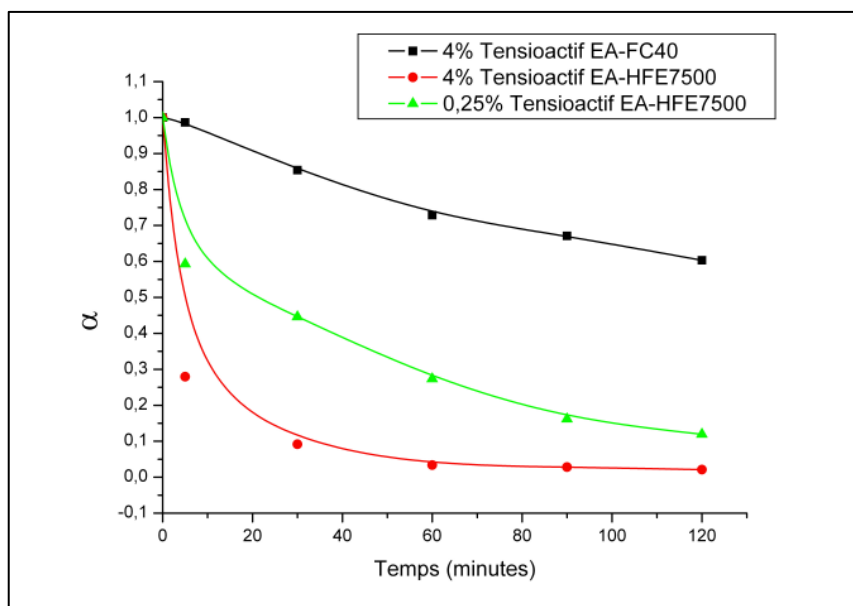


Figure 48 : Suivi de l'échange de la résorufine entre des gouttes stabilisées avec HFE7500 en présence du tensioactif EA et des gouttes stabilisées avec FC40 en présence du tensioactif EA pendant 2 heures. Avec $\alpha = \log(RFU_{max}/RFU_{min}) / \log(RFU_{\sigma max}/RFU_{\sigma min})$

Jusque là, nous avons étudié l'échange de la résorufine entre les gouttes pendant 2 heures. Ce temps était suffisant parce qu'il correspondait au temps du test enzymatique de

l'alcool déshydrogénase en gouttes. Cependant, comme décrit dans le **Chapitre IV**, l'étape de production de l'ADH par *Escherichia coli* en gouttes se fait toute la nuit à température ambiante et donc il est primordial que les gouttes stabilisées avec 4% de FC40 en présence du tensioactif EA soient stables pendant leur incubation. Nous avons créé des gouttes de 20pL contenant l'alcool déshydrogénase en présence de son test fluorogénique décrit dans le **Chapitre II**. Ces gouttes, stabilisées avec 4% (p/p) de tensioactif EA dans l'huile FC40, sont collectées dans une seringue. Après une incubation à température ambiante pendant une nuit, l'émulsion n'était plus stable (données non montrées). Par conséquent, nous avons étudié l'effet de l'huile HFE 7500 sur la stabilité des gouttes sur une nuit. Pour cela, nous avons créé des gouttes de 20pL contenant l'alcool déshydrogénase en présence de son test fluorogénique. Ces gouttes, stabilisées avec 1% (p/p) de tensioactif EA dans l'huile HFE7500, sont collectées dans une seringue. Après une incubation à température ambiante pendant une nuit, l'émulsion était encore stable (données non montrées). Nous pouvons donc conclure que bien que l'utilisation de l'huile totalement fluorée FC40 permette de diminuer la fuite de la résorufine entre les gouttes, nous ne pouvons l'utiliser du fait qu'elle ne permet pas de stabiliser les gouttes sur toute une nuit. Par conséquent, nous ne pouvons utiliser que l'huile HFE7500 partiellement fluorée.

III.3.1.4.3 Effets du tensioactif

La troisième stratégie que nous avons choisie pour remédier au problème de fuite de la résorufine entre les gouttes était de changer de tensioactif. L'idée est d'utiliser l'huile fluorée HFE7500 mais en remplaçant le tensioactif EA par un des 5 tensioactifs Jeff synthétisés dans notre laboratoire par le Dr. E. Mayot et le doctorant JF. Bartolo (**Figure 39**). Pour cela, nous avons encore une fois utilisé la plateforme microfluidique décrite dans la **Figure 9** pour créer 5 émulsions différentes. Chacune, formée par un mélange de gouttes à 100 μ M et 1 μ M de résorufine, est stabilisée par un type différent de tensioactif Jeff. La dilution de ces tensioactifs dans l'huile HFE7500 est ajustée de telle sorte à avoir les 5 émulsions stabilisées avec la même concentration, en prenant en considération le nombre de molécules de krytox utilisées pour chaque surfactant jeff (c'est-à-dire 1 krytox pour le jeff1000, 2 krytox pour les jeff600, jeff900 et jeff2000 et 3 krytox pour le jeff3000). Les résultats représentés sur la **Figure 49** montrent que la fuite de la résorufine est très rapide entre les gouttes stabilisées avec HFE7500 en présence des tensioactifs jeff3000 et 2000 : le paramètre α tend vers 0 au bout de ~30 minutes (fuite totale et état d'équilibre des concentrations des gouttes). En présence du tensioactif Jeff1000 et Jeff 600 la fuite du

fluorophore est à peu près similaire à celle en présence des des tensioactifs jeff3000 et 2000. Cependant si nous comparons la fuite de la résorufine en présence du tensioactif Jeff900 avec celle en présence du tensioactif EA, nous remarquons que la première est moins rapide que la deuxième. En effet, avec le tensioactif Jeff900 la valeur de α est égale à $\sim 0,3$ après 120 minutes alors qu'elle est égale à $\sim 0,1$ avec le tensioactif EA.

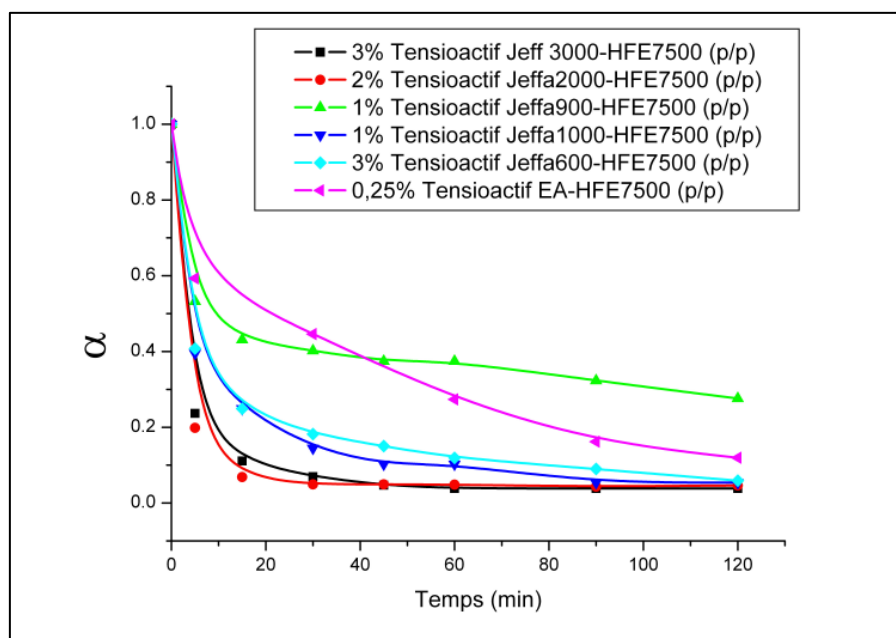


Figure 49 : Suivre sur 2 heures de l'échange de la résorufine entre des gouttes stabilisées avec HFE7500 en présence de différents tensioactifs fluorocarbonés jeffamine. Avec $\alpha = \log(RFU_{max}/RFU_{min}) / \log(RFU_{0max}/RFU_{0min})$

Pour s'assurer de la stabilité sur la nuit des gouttes produites en présence de 1% d'huile HFE 7500 et du tensioactif Jeff900, nous avons encore une fois créé des gouttes de 20pL contenant l'alcool déshydrogénase en présence de son test fluorogénique. Après une incubation à température ambiante pendant une nuit, l'émulsion était encore stable. Il s'avère donc que l'utilisation de l'huile HFE7500 en présence du tensioactif Jeff900 soit la meilleure combinaison pour diminuer la fuite de la résorufine entre les gouttes tout en les gardant stables pendant toute une nuit.

Pour conclure, après avoir démontré et étudié l'échange de la résorufine entre des gouttes d'eau-dans-l'huile, nous avons testé différentes stratégies afin de déterminer celle qui permet d'avoir un compromis conciliant en même temps trois paramètres. Ces derniers sont la stabilité des gouttes pendant toute la durée du test, la biocompatibilité du tensioactif et l'huile fluorée utilisés avec le test de l'alcool déshydrogénase et le minimum d'échange possible de la résorufine, produit de la réaction enzymatique, entre les gouttes.

III.3.2 Le phénazine méthosulfate réduit (PMS_{red})

III.3.2.1 Développement de la plateforme microfluidique

Pour l'étude de l'échange de la forme réduite des accepteurs d'électrons intermédiaires entre les microgouttelettes, nous avons utilisé la plateforme microfluidique représentée dans la **Figure 50**. Le problème de ces médiateurs pour nous est que, contrairement à la résorufine, ils ne sont pas fluorescents. Par conséquent, nous avons choisi d'utiliser le test fluorogénique de l'alcool déshydrogénase décrit dans la **Figure 29** dans lequel la réduction de la résazurine en résorufine (produit fluorescent) ne se fait qu'en présence de la forme réduite des accepteurs d'électrons intermédiaires. Pour ce test, nous nous sommes placés dans des conditions où la fuite de résorufine est minimale et connue. Comme schématisé dans la **Figure 50**, une émulsion composée de deux types de gouttes a tout d'abord été réalisée dans un double créateur de gouttes (**Figure 50 panel A**). Pour les stabiliser, nous avons utilisé, 4% (p/p) de tensioactif EA dans de l'huile FC40. Nous avons utilisé l'huile FC40 au lieu de l'huile HFE7500 pour nous mettre dans les conditions minimales de fuite de la résorufine. Le premier type contient les enzymes ainsi que tous les composés du test fluorogénique (c'est-à-dire l'éthanol, le PQQ, le PMS et la résazurine) alors que le deuxième type ne contient que l'éthanol, le PQQ et la résazurine. Les débits des deux phases aqueuses étaient de 50 μ L/h et celui de la phase huile était de 400 μ L/h. Ces gouttes ont été collectées dans une tubulure en PTFE pendant ~60 minutes puis réinjectées immédiatement dans le deuxième module de la plateforme (**Figure 50 panel B**) pour les analyser avec le même système de détection utilisé pour étudier la fuite de la résorufine.

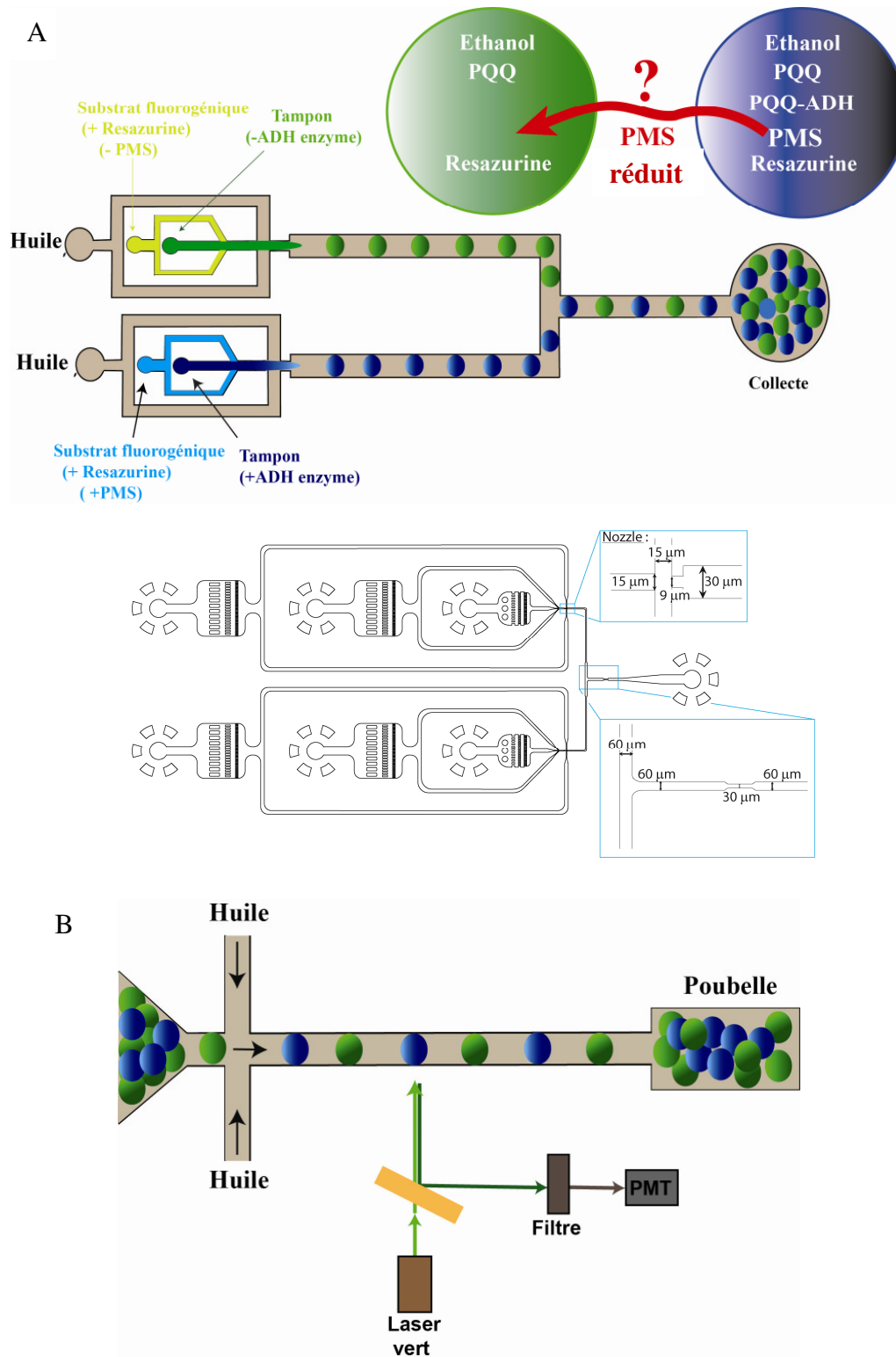


Figure 50 : Plateforme microfluidique utilisée pour tester la fuite des accepteurs d'électrons entre les microgouttelettes. (A) Le module microfluidique de création de deux types de gouttes. (B) le module microfluidique de réinjection des gouttes pour les analyser.

III.3.2.2 Echange de la phénazine méthosulfate réduite entre les gouttes

Après avoir réussi à diminuer le transport de la résorufine entre les microgouttelettes, nous avons cherché à savoir s'il y avait aussi échange ou non de l'accepteur d'électrons intermédiaire, le PMS, entre les gouttes. Pour cela, nous avons utilisé la plateforme microfluidique décrite dans la **Figure 10** pour créer une émulsion contenant un mélange de deux types de gouttes de 20pL. Ces deux types de gouttes contiennent :

Premier type de gouttes :

- Tampon Tris HCl pH8 (50mM)
- Alcool déshydrogénase
- Ethylamine (5mM)
- PMS (400 μ M)
- Résazurine (200 μ M)
- Ethanol (1%)
- CaCl₂ (10mM)
- PQQ (10 μ M)

Deuxième type de gouttes

- Tampon Tris HCl pH8 (50mM)
- Résazurine (200 μ M)
- Ethanol (1%)
- CaCl₂ (10mM)
- PQQ (10 μ M)

Cette émulsion a été collectée pendant ~60 minutes dans une tubulure en PTFE puis réinjectée dans le module microfluidique représenté dans la **Figure 50 panel B** afin d'être analysées grâce au système optique décrit dans la **Figure 41**. Les résultats illustrés dans la **Figure 51 panel A** montrent que les gouttes sans enzyme ni PMS augmentent en fluorescence presque à la même vitesse que les gouttes contenant l'ensemble des réactifs. L'augmentation de la fluorescence des gouttes sans enzymes ni PMS ne peut s'expliquer que par une fuite du PMS_{red} des gouttes contenant l'ensemble des réactifs après oxydation de l'éthanol puisque la réduction de la résazurine permettant la formation de la résorufine ne peut se faire qu'en sa présence. Pour confirmer ce résultat nous avons réalisé un test contrôle dans lequel les deux types de gouttes décrits ci-dessus ont été créés séparément l'un de l'autre et déposés dans deux puits d'une microplaque de 96 puits que nous avons recouverts d'une couche d'huile minérale. La fluorescence des deux types de gouttes a été mesurée pendant 120 minutes grâce à un spectrofluorimètre SpectraMax 5 ($\lambda_{\text{excitation}}= 540\text{nm}$ et $\lambda_{\text{émission}}= 590\text{nm}$). Les résultats, représentés dans la **Figure 51 panel B**, montrent que seules les gouttes contenant enzyme et

PMS_{red} augmentent en fluorescence. Les résultats représentés dans les panels A et B, prouvent clairement qu'il y a échange du PMS_{red} entre les microgouttelettes.

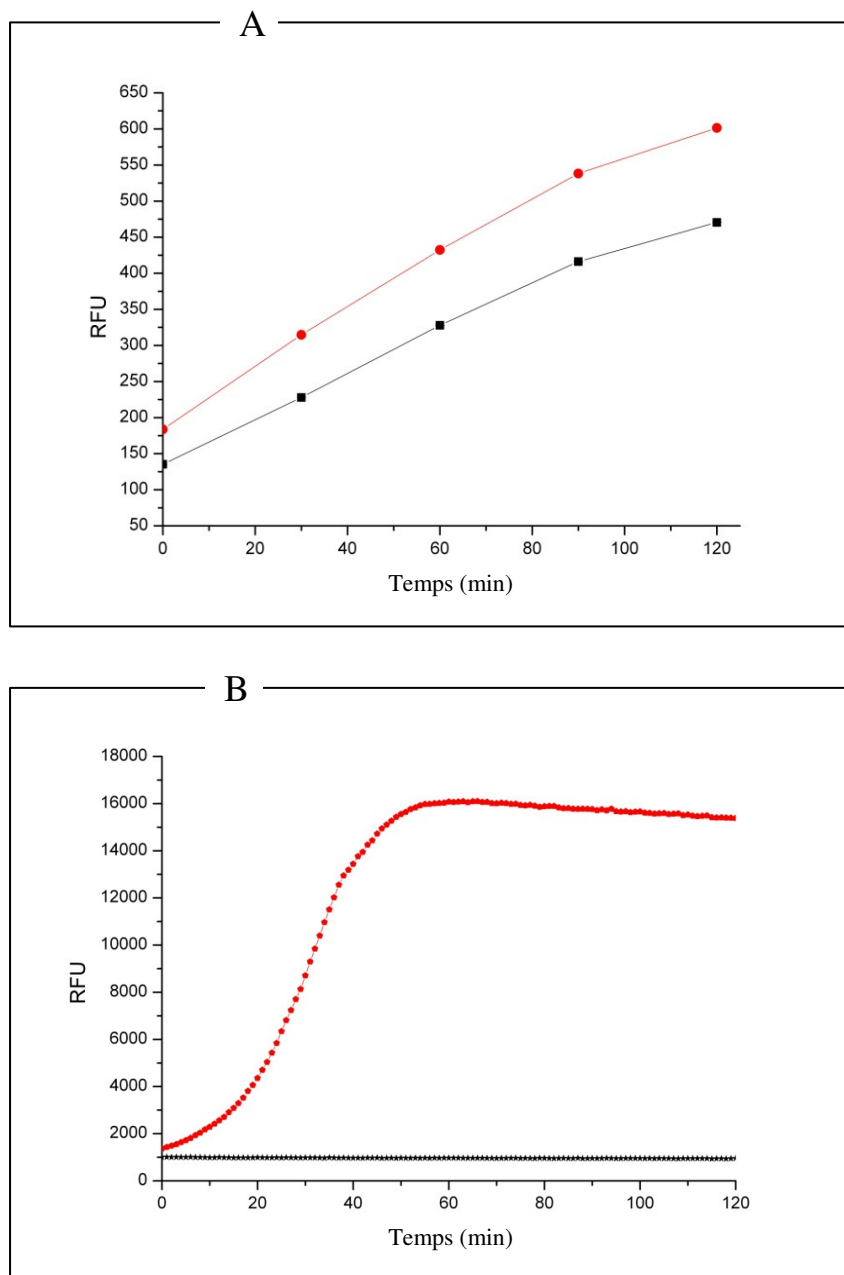


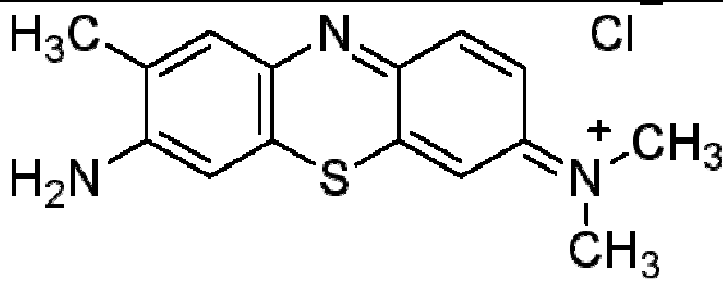
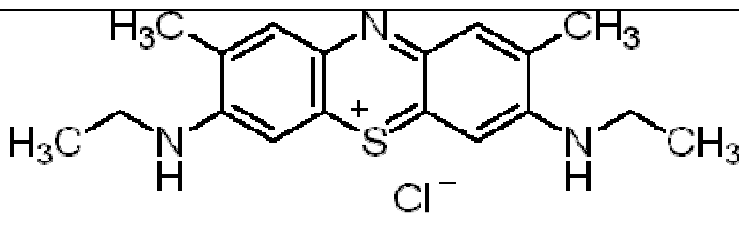
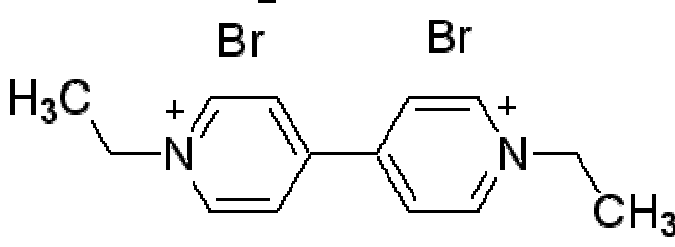
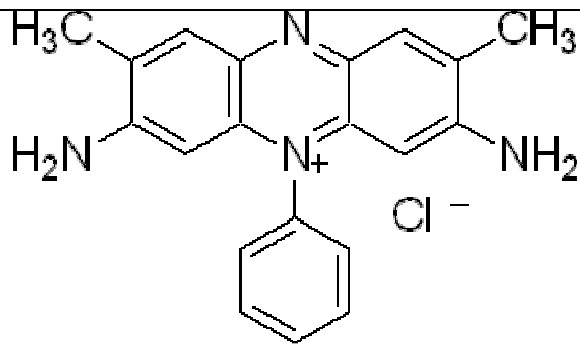
Figure 51 : Mesure de la fluorescence de gouttes avec et sans PMS pendant 2 heures. (A) les deux types de gouttes sont analysés en même temps au sein d'une même émulsion. (B) les deux types de gouttes sont analysés séparément comme contrôle. (En noir) gouttes sans PMS et (en rouge) gouttes avec PMS.

III.3.2.3 Différentes stratégies pour diminuer l'échange de PMS_{red}

Pour résoudre le problème de fuite du PMS_{red} des gouttes, notre première stratégie était de trouver un autre accepteur d'électrons qui soit capable de jouer le rôle de médiateur intermédiaire dans le test fluorogénique de la QEDH en acceptant les électrons du PQQ pour

Chapitre III : Phénomène d'échange de composés entre gouttes

les transférer à la résazurine. Pour cela différentes molécules commerciales, regroupées dans le **Tableau 8**, ont été testées en microplaque de 96 puits.

Nom de l'accepteur d'électrons intermédiaire	Structure chimique
Toluidine Blue O	
New Méthylène Blue N	
Ethylène viologène dibromide	
Safranine T	

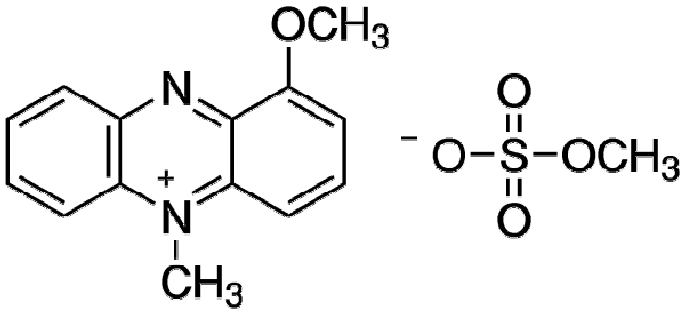
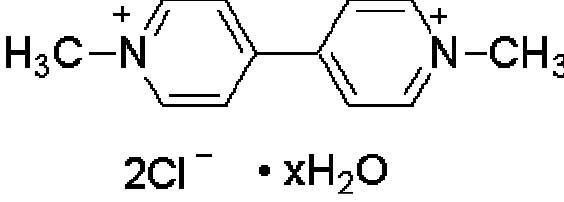
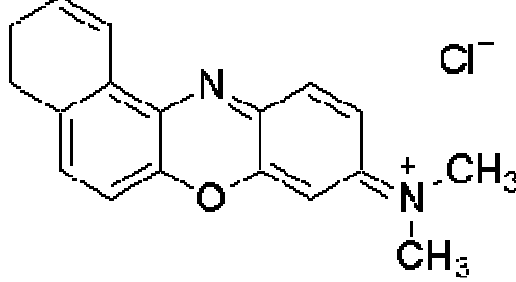
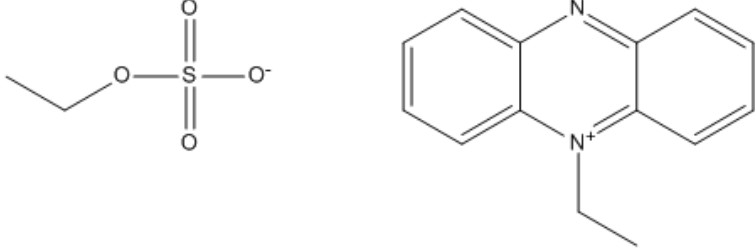
<p>1-Methoxy-5-Methylphenazinium MethylSulfate (MMPMS)</p>	
<p>Methyl viologène dichloride hydrate</p>	
<p>Meldola's blue</p>	
<p>phénazine éthosulfate (PES)</p>	

Tableau 8 : Les différents accepteurs d'électrons commerciaux testés avec l'alcool déshydrogénase en présence du test fluorogénique de l'alcool déshydrogénase.

De toutes les molécules commerciales testées, seule la phénazine éthosulfate (PES) permettait de remplacer le PMS pour détecter l'activité catalytique de la QEDH (**Figure 52**). En effet, toutes ces molécules à l'exception du PES n'étaient pas capable de transférer les électrons du PQQ vers la rsaurine pour la réduire afin qu'elle soit convertie en résorufine.

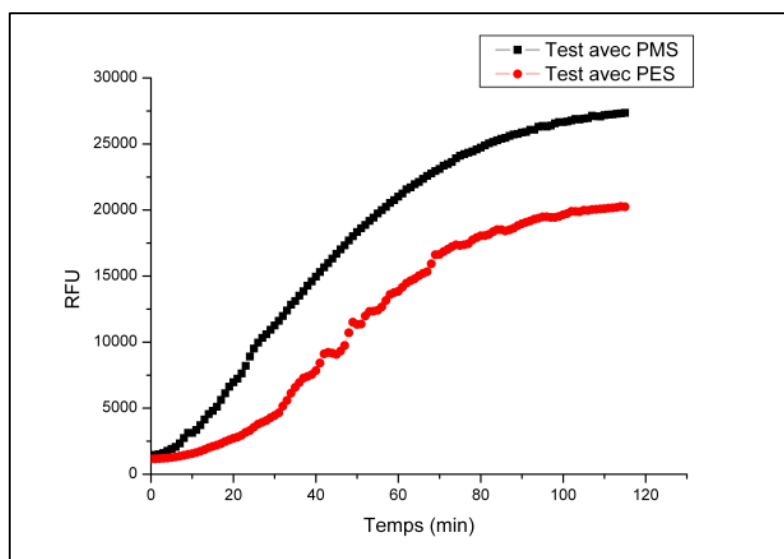


Figure 52 : Suivi en microplaque de 96 puits de l'oxydation de l'éthanol par l'alcool déshydrogénase en présence de PMS et en présence de PES pendant 2h. Cinétiques de l'alcool déshydrogénase en présence du PMS (Courbe noire) et en présence du PES (courbe rouge).

L'échange du PES entre deux types de gouttes a par la suite été évalué, de la même manière que pour le PMS, grâce à une émulsion contenant un mélange de deux types de gouttes de 20pL. Ces deux types de gouttes contiennent :

Premier type de gouttes :

- Tampon Tris HCl pH8 (50mM)
- Alcool déshydrogénase
- Ethylamine (5mM)
- PES (400 μ M)
- Résazurine (200 μ M)
- Ethanol (1%)
- CaCl₂ (10mM)
- PQQ (10 μ M)

Deuxième type de gouttes

- Tampon Tris HCl pH8 (50mM)
- Résazurine (200 μ M)
- Ethanol (1%)
- CaCl₂ (10mM)
- PQQ (10 μ M)

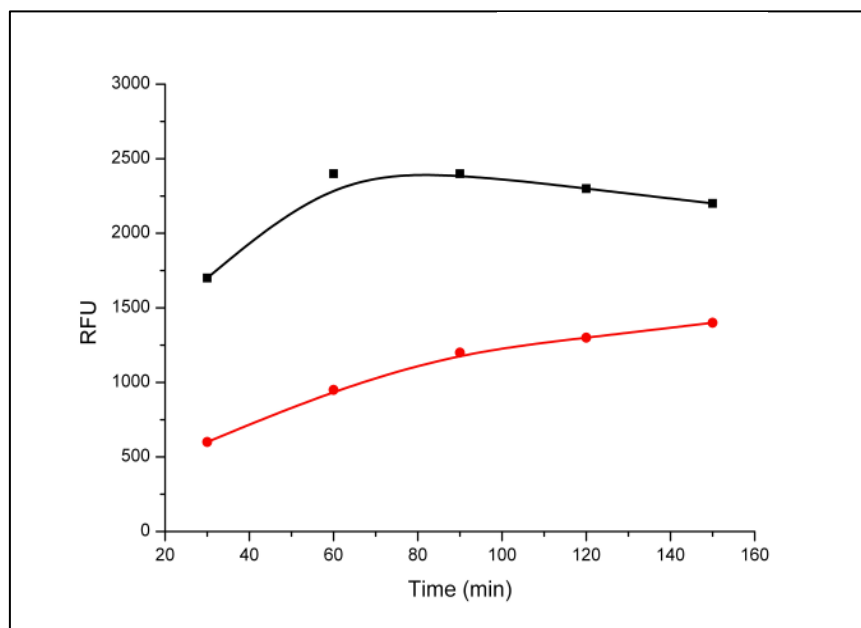


Figure 53 : Suivi en goutte et pendant 2h de l'oxydation de l'éthanol par l'alcool déshydrogénase en présence et en absence de PES. Mesure de la fluorescence d'une émulsion contenant deux types de gouttes : gouttes contenant l'ensemble des réactifs du test enzymatique dont le PES (courbe noire) et gouttes contenant l'ensemble des réactifs du test enzymatique sans le PES (courbe rouge).

Les résultats de la mesure de la fluorescence de l'émulsion avec le mélange des gouttes avec enzyme et PES et des gouttes sans enzyme ni PES ont montré qu'il y a fuite de PES mais qu'elle est moins importante que pour le PMS (**Figure 53**). Nous avons toutefois continué à chercher une autre stratégie qui permettrait de diminuer cet échange entre les gouttes. Comme deuxième alternative, nous avons décidé, en collaboration avec les Dr A. el Harrak et E. Mayot, d'augmenter l'hydrophilicité du PMS en remplaçant chimiquement son groupement méthyle par un groupement hydrophile (un groupement sulfonate). En nous basant sur les travaux d'*Otto S. Wolfbeis et al.*, nous avons synthétisé le composé « 3-phenazin-5-ium-5-yl propane-1-sulfonate » (**Figure 54**) que nous appellerons PPS dans le reste de ce document.

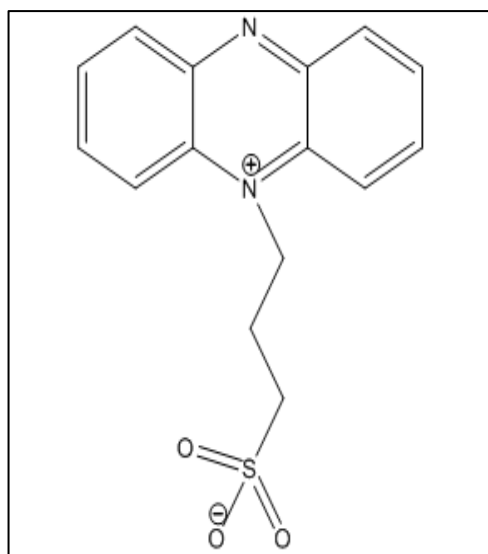


Figure 54 : Structure chimique de l'accepteur d'électrons PPS : « 3-phenazin-5-ium-5-yl propane-1-sulfonate ».

Après avoir démontré l'efficacité du test fluorogénique en présence du PPS à la place du PMS (données non montrées), l'échange du PPS entre gouttes a été testé, en suivant la même stratégie utilisée pour le PMS et le PES, grâce à une émulsion contenant un mélange de deux types de gouttes de 20pL. Ces deux types de gouttes contiennent :

Premier type de gouttes :

- Tampon Tris HCl pH8 (50mM)
- Alcool déshydrogénase
- Ethylamine (5mM)
- PPS (400μM)
- Résazurine (200μM)
- Ethanol (1%)
- CaCl₂ (10mM)
- PQQ (10μM)

Deuxième type de gouttes

- Tampon Tris HCl pH8 (50mM)
- Résazurine (200μM)
- Ethanol (1%)
- CaCl₂ (10mM)
- PQQ (10μM)

La mesure de la fluorescence de l'émulsion avec le mélange des gouttes avec enzyme et PPS et des gouttes sans enzyme ni PPS a montré que seules les gouttes contenant enzyme et PPS augmentent en fluorescence (**Figure 55**). La légère augmentation de la fluorescence des gouttes sans enzyme ni PPS est probablement due à la fuite de la résorufine. Ce test a été

effectué sur des gouttes stabilisées avec 4% (p/p) de tensioactif EA dans l'huile FC40, le même résultat a été obtenu en utilisant 1% (p/p) de tensioactif Jeff900 dans l'huile HFE7500 (données non montrées). Ce résultat est en accord avec les travaux récents de *Woronoff et al.* au sein de notre laboratoire, qui ont pu démontrer eux aussi que greffer un groupement sulfonate sur un composé très hydrophobe contenant la coumarine comme groupement fluoré, permettait de diminuer son hydrophobicité diminuant ainsi son échange entre les gouttes [39].

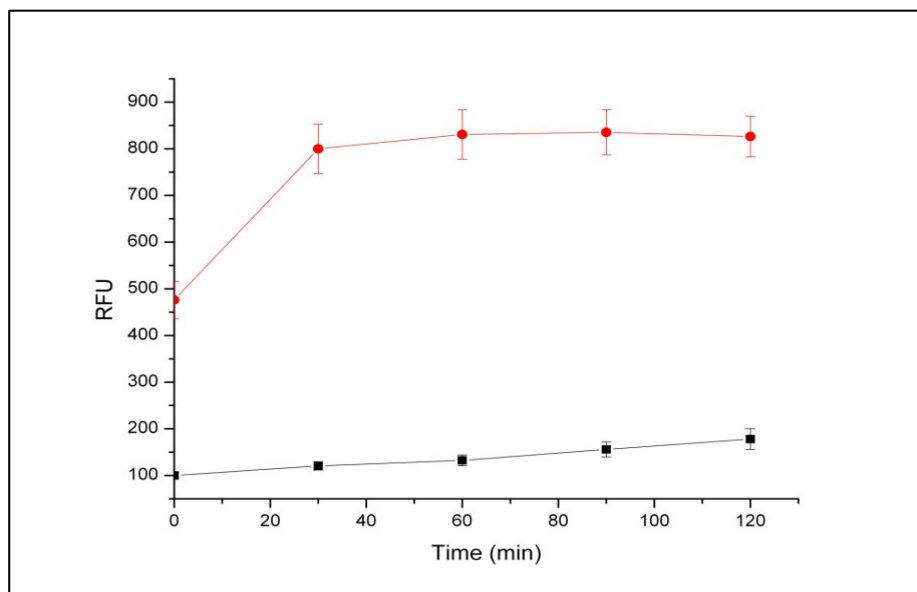


Figure 55: La mesure dans le système microfluidique de la fluorescence d'une émulsion contenant un mélange de microgouttelettes contenant ou non le PPS. (En rouge) suivi de la fluorescence des gouttes contenant du PPS (en noir) suivi de la fluorescence des gouttes ne contenant pas de PPS.

En conclusion, il a été possible de résoudre le problème de l'échange de l'accepteur d'électrons intermédiaire sous sa forme réduite, le PMS_{red} , entre les microgouttelettes en diminuant son hydrophobicité par greffage d'un groupement sulfonate. Afin de confirmer ces résultats, nous avons aussi observé le rôle de ce groupement avec les fluorophores commerciaux pour diminuer leur fuite entre les gouttes. Nous avons choisi dans le commerce deux fluorophores : un non sulfoné « Rhodamine 101 » et l'autre sulfoné « Sulforhodamine 101 » dont les structures sont représentées dans la **Figure 56 panel A et B** respectivement. La fuite de chacun de ces deux composés entre des gouttes de 20pL a été testée en utilisant la plateforme microfluidique décrite dans la **Figure 50** en suivant le même protocole expérimental utilisé pour tester la fuite de la résorufine. Pour chaque fluorophore, nous avons représenté sur la **Figure 56 panel C**, les résultats des échanges dans un mélange de gouttes contenant une forte concentration de fluorophore et des gouttes contenant une faible concentration de fluorophore. Théoriquement, s'il y a échange de fluorophore entre les

gouttes la valeur de α diminue jusqu'à tendre vers 0 ce qui correspond à l'état d'équilibre des concentrations des deux types de gouttes en terme de fluorescence. Par contre s'il n'y a pas d'échange de fluorophore, ce rapport ne diminue pas et reste constant et égal à 1. Les résultats expérimentaux de la **Figure 22 panel C** montrent qu'il y a un échange rapide de la « Rhodamine 101 » entre les gouttes faiblement et fortement concentrées. En effet, la valeur de α tend vers 0 au bout de ~60 minutes. Alors que pour la « Sulforhodamine 101 », la valeur de α n'a pas diminué et est restée constante pendant 120 minutes. L'absence d'échange de la « Sulforhodamine 101 » entre les gouttes est probablement due à la présence du groupement sulfonate.

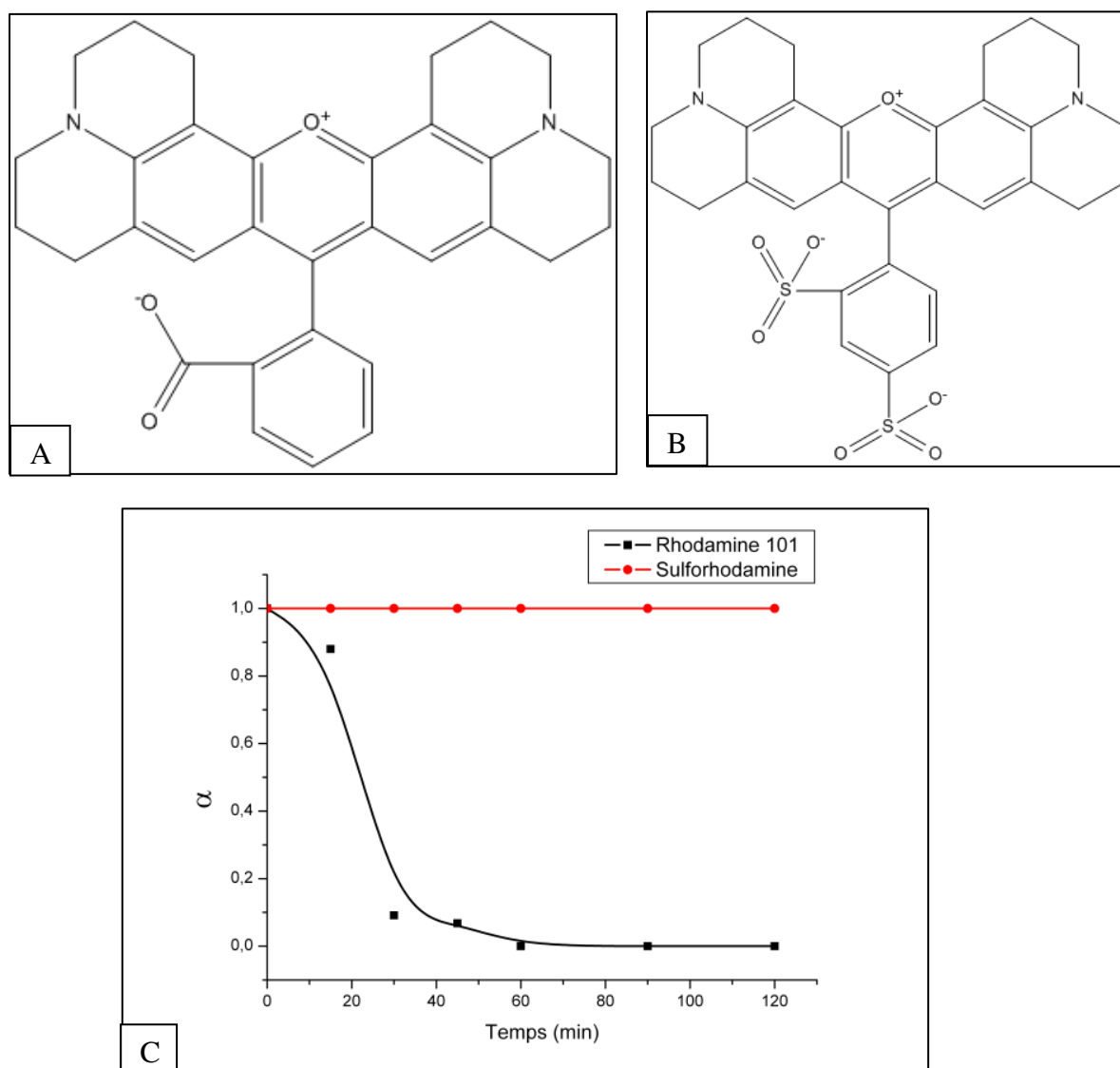


Figure 56 : Structure chimique de la « Rhodamine 101 » et de la « Sulforhodamine 101 » et suivi dans le système microfluidique de l'échange de chacune des deux entre des microgouttelettes de 20pL. (A) Structure chimique de Rhodamine 101 (B) Structure chimique de la sulforhodamine 101 (C) suivi de l'échange de chacun de ces deux fluorophores dans un mélange de deux types de gouttes fortement et faiblement concentrées en fluorophore. Avec $\alpha = \log(RFU_{max}/RFU_{min}) / \log(RFU_{0max}/RFU_{0min})$.

En conclusion, l'ajout d'un groupement sulfonate sur une molécule hydrophobe permet de diminuer fortement leur échange entre les gouttes d'eau dans de l'huile.

III.4 Conclusions et perspectives

En conclusion, nous avons démontré dans ce chapitre qu'il est possible de réduire l'échange de molécules (fluorescentes ou non) entre des gouttes d'eau-dans-l'huile. En effet, nous avons réussi dans ces travaux à diminuer l'échange de la résorufine, produit de la réduction de la résazurine, et du PMS (sous sa forme réduite) entre des gouttes. Puisque ces deux composés sont les produits de la réaction catalytique couplée à l'oxydation de l'éthanol par l'alcool déshydrogénase, il était impératif qu'ils demeurent confinés dans les gouttes pendant la durée du test afin de permettre la détection de l'activité enzymatique et la sélection des variants actifs en goutte.

Nous nous sommes intéressés dans un premier temps à la fuite de la résorufine. Après avoir démontré l'échange de cette molécule entre des gouttes d'eau-dans-l'huile, nous avons étudié et caractérisé la nature de cet échange. En variant la concentration du tensioactif utilisé pour stabiliser les gouttes, il s'est avéré que la fuite de la résorufine était micellaire. Différentes stratégies ont, ensuite, été testées pour résoudre ce problème. L'ajout de la BSA dans les gouttes, à des concentrations égales à 25mg/mL ou 50mg/mL, a permis de diminuer la fuite mais était, cependant, incompatible avec le test fluorogénique de l'alcool déshydrogénase. L'utilisation d'une huile totalement fluorocarbonée a permis de diminuer considérablement l'échange de la résorufine entre les gouttes cependant il ne permettait pas de garder ces gouttes stables pendant toute la durée du test. Le test de différents types de tensioactifs fluorés a, finalement, permis de trouver un candidat, qui utilisé avec une partiellement fluorocarbonée, permettait d'avoir une stabilité des gouttes pendant la durée du test, une biocompatibilité avec le test biologique et un minimum d'échange de la résorufine. Ces travaux qui ont permis de développer, en collaboration avec le Dr JC Baret, un modèle mathématique expliquant l'échange de résorufine entre les gouttes, font l'objet d'une publication en cours de préparation dont le titre est : « Dynamics of molecular transport in emulsions ».

Dans un deuxième temps, nous avons démontré la fuite du PMS sous sa forme réduite entre les gouttes. Différentes stratégies ont, ensuite, été testées pour résoudre ce problème. La première idée était de remplacer le PMS par une autre molécule. De tous les accepteurs d'électrons commerciaux testés avec l'alcool déshydrogénase, en présence du test

fluorogénique basé sur la réduction de résazurine, seule la phénazine éthosulfate (PES) était efficace. En testant l'échange de ce composé entre les gouttes, il s'est avéré que lui aussi fuyait mais moins que le PMS. En diminuant l'hydrophobicité du PMS par modification de sa structure chimique avec un groupement sulfonate, nous avons finalement réussi à synthétiser un nouveau composé qui est le PPS, capable de transférer les électrons du PQQ à la résazurine pour qu'elle soit réduite et de rester compartimentée dans les gouttes d'eau-dans-l'huile.

Nous avons réussi, dans cette étude, à diminuer l'échange de la résorufine entre les gouttes sur une période de 2 heures, dans des conditions qui nous permettent de garder les gouttes stables et biocompatibles avec notre test biologique. Il serait, cependant, intéressant pour d'autres applications biologiques de trouver une stratégie qui diminuerait la fuite de ce composé sur une période plus longue. Nous pourrions par exemple établir des collaborations avec des laboratoires de chimistes qui, selon leur spécialité, pourront développer un moyen permettant de diminuer l'hydrophobicité de la résorufine ou de synthétiser de nouveaux tensioactifs fluorocarbonés.

III.5 Références bibliographiques

- [1] A.B. Theberge, F. Courtois, Y. Schaerli, M. Fischlechner, C. Abell, F. Hollfelder, W.T. Huck, Microdroplets in microfluidics: an evolving platform for discoveries in chemistry and biology, *Angew Chem Int Ed Engl* 49 (2010) 5846-5868.
- [2] E. Brouzes, M. Medkova, N. Savenelli, D. Marran, M. Twardowski, J.B. Hutchison, J.M. Rothberg, D.R. Link, N. Perrimon, M.L. Samuels, Droplet microfluidic technology for single-cell high-throughput screening, *Proc Natl Acad Sci U S A* 106 (2009) 14195-14200.
- [3] J. Clausell-Tormos, A.D. Griffiths, C.A. Merten, An automated two-phase microfluidic system for kinetic analyses and the screening of compound libraries, *Lab Chip* 10 (2010) 1302-1307.
- [4] Y.M. Lo, R.W. Chiu, Noninvasive prenatal diagnosis of fetal chromosomal aneuploidies by maternal plasma nucleic acid analysis, *Clin Chem* 54 (2008) 461-466.
- [5] L. Mazutis, A.F. Araghi, O.J. Miller, J.C. Baret, L. Frenz, A. Janoshazi, V. Taly, B.J. Miller, J.B. Hutchison, D. Link, A.D. Griffiths, M. Ryckelynck, Droplet-based microfluidic systems for high-throughput single DNA molecule isothermal amplification and analysis, *Anal Chem* 81 (2009) 4813-4821.
- [6] L. Frenz, K. Blank, E. Brouzes, A.D. Griffiths, Reliable microfluidic on-chip incubation of droplets in delay-lines, *Lab Chip* 9 (2009) 1344-1348.
- [7] H. Song, D.L. Chen, R.F. Ismagilov, Reactions in droplets in microfluidic channels, *Angew Chem Int Ed Engl* 45 (2006) 7336-7356.
- [8] A. Aharoni, L. Gaidukov, S. Yagur, L. Toker, I. Silman, D.S. Tawfik, Directed evolution of mammalian paraoxonases PON1 and PON3 for bacterial expression and catalytic specialization, *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 (2004) 482-487.
- [9] E. Mastrobattista, V. Taly, E. Chanudet, P. Treacy, B.T. Kelly, A.D. Griffiths, High-throughput screening of enzyme libraries: in vitro evolution of a beta-galactosidase by fluorescence-activated sorting of double emulsions, *Chem Biol* 12 (2005) 1291-1300.
- [10] J.J. Agresti, E. Antipov, A.R. Abate, K. Ahn, A.C. Rowat, J.C. Baret, M. Marquez, A.M. Klibanov, A.D. Griffiths, D.A. Weitz, Ultrahigh-throughput screening in drop-based microfluidics for directed evolution, *Proc Natl Acad Sci U S A* 107 (2010) 4004-4009.
- [11] B. Zheng, J.D. Tice, R.F. Ismagilov, Formation of Arrayed Droplets by Soft Lithography and Two-Phase Fluid Flow, and Application in Protein Crystallization, *Adv Mater* 16 (2004) 1365-1368.
- [12] B. Zheng, J.D. Tice, L.S. Roach, R.F. Ismagilov, A droplet-based, composite PDMS/glass capillary microfluidic system for evaluating protein crystallization conditions by microbatch and vapor-diffusion methods with on-chip X-ray diffraction, *Angew Chem Int Ed Engl* 43 (2004) 2508-2511.
- [13] A.B. Theberge, G. Whyte, M. Frenzel, L.M. Fidalgo, R.C. Wootton, W.T. Huck, Suzuki-Miyaura coupling reactions in aqueous microdroplets with catalytically active fluororous interfaces, *Chem Commun (Camb)* (2009) 6225-6227.
- [14] L. Frenz, A. El Harrak, M. Pauly, S. Begin-Colin, A.D. Griffiths, J.C. Baret, Droplet-based microreactors for the synthesis of magnetic iron oxide nanoparticles, *Angew Chem Int Ed Engl* 47 (2008) 6817-6820.
- [15] J.M. Girardet, G. Humbert, N. Creusot, V. Chardot, S. Campagna, J.L. Courthaudon, J.L. Gaillard, Dilational rheology of mixed beta-casein/Tween 20 and beta-casein (f114-169)/Tween 20 films at oil-water interface, *Journal of Colloid and Interface Science* 243 (2001) 515-522.
- [16] J.M. Girardet, G. Humbert, N. Creusot, V. Chardot, S. Campagna, J.L. Courthaudon, J.L. Gaillard, Dilational rheology of mixed beta-casein/tween 20 and beta-casein (f114-

- 169)/tween 20 films at oil-water interface (vol 243, pg 515, 2001), *Journal of Colloid and Interface Science* 245 (2002) 219-219.
- [17] S.E. Euston, H. Singh, P.A. Munro, D.G. Dalgleish, Competitive Adsorption between Sodium Caseinate and Oil-Soluble and Water-Soluble Surfactants in Oil-in-Water Emulsions, *Journal of Food Science* 60 (1995) 1124-1131.
- [18] F. Courtois, L.F. Olguin, G. Whyte, D. Bratton, W.T. Huck, C. Abell, F. Hollfelder, An integrated device for monitoring time-dependent in vitro expression from single genes in picolitre droplets, *Chembiochem* 9 (2008) 439-446.
- [19] F. Courtois, L.F. Olguin, G. Whyte, A.B. Theberge, W.T. Huck, F. Hollfelder, C. Abell, Controlling the retention of small molecules in emulsion microdroplets for use in cell-based assays, *Anal Chem* 81 (2009) 3008-3016.
- [20] L.S. Roach, H. Song, R.F. Ismagilov, Controlling nonspecific protein adsorption in a plug-based microfluidic system by controlling interfacial chemistry using fluorosurfactants, *Anal Chem* 77 (2005) 785-796.
- [21] Y. Bai, X. He, D. Liu, S.N. Patil, D. Bratton, A. Huebner, F. Hollfelder, C. Abell, W.T. Huck, A double droplet trap system for studying mass transport across a droplet-droplet interface, *Lab Chip* 10 (2010) 1281-1285.
- [22] J.C. Baret, F. Kleinschmidt, A. El Harrak, A.D. Griffiths, Kinetic aspects of emulsion stabilization by surfactants: a microfluidic analysis, *Langmuir* 25 (2009) 6088-6093.
- [23] J.N. Lee, C. Park, G.M. Whitesides, Solvent compatibility of poly(dimethylsiloxane)-based microfluidic devices, *Anal Chem* 75 (2003) 6544-6554.
- [24] C. Holtze, A.C. Rowat, J.J. Agresti, J.B. Hutchison, F.E. Angile, C.H. Schmitz, S. Koster, H. Duan, K.J. Humphry, R.A. Scanga, J.S. Johnson, D. Pisignano, D.A. Weitz, Biocompatible surfactants for water-in-fluorocarbon emulsions, *Lab Chip* 8 (2008) 1632-1639.
- [25] J. Clausell-Tormos, D. Lieber, J.C. Baret, A. El-Harrak, O.J. Miller, L. Frenz, J. Blouwolff, K.J. Humphry, S. Koster, H. Duan, C. Holtze, D.A. Weitz, A.D. Griffiths, C.A. Merten, Droplet-based microfluidic platforms for the encapsulation and screening of Mammalian cells and multicellular organisms, *Chem Biol* 15 (2008) 427-437.
- [26] M.Y. Koroleva, E.V. Yurtov, Water mass transfer in W/O emulsions, *J Colloid Interface Sci* 297 (2006) 778-784.
- [27] S. Bjerregaard, H. Pedersen, H. Vedstesen, C. Vermehren, I. Soderberg, S. Frokjaer, Parenteral water/oil emulsions containing hydrophilic compounds with enhanced in vivo retention: formulation, rheological characterisation and study of in vivo fate using whole body gamma-scintigraphy, *Int J Pharm* 215 (2001) 13-27.
- [28] S.K. Mehta, G. Kaur, K.K. Bhasin, Analysis of Tween based microemulsion in the presence of TB drug rifampicin, *Colloids Surf B Biointerfaces* 60 (2007) 95-104.
- [29] M. Hai, S. Magdassi, Investigation on the release of fluorescent markers from w/o/w emulsions by fluorescence-activated cell sorter, *J Control Release* 96 (2004) 393-402.
- [30] Y. Sela, S. Magdassi, N. Garti, Release of Markers from the Inner Water Phase of W/O/W Emulsions Stabilized by Silicone-Based Polymeric Surfactants, *Journal of Controlled Release* 33 (1995) 1-12.
- [31] K. Pays, J. Giermanska-Kahn, B. Pouligny, J. Bibette, F. Leal-Calderon, Double emulsions: how does release occur?, *J Control Release* 79 (2002) 193-205.
- [32] J. Bibette, F.L. Calderon, P. Poulin, Emulsions: basic principles, *Reports on Progress in Physics* 62 (1999) 969-1033.
- [33] M. Hai, K. Bernath, D. Tawfik, S. Magdassi, Flow cytometry: a new method to investigate the properties of water-in-oil-in-water emulsions, *Langmuir* 20 (2004) 2081-2085.

- [34] J. Cheng, J.F. Chen, M. Zhao, Q. Luo, L.X. Wen, K.D. Papadopoulos, Transport of ions through the oil phase of W(1)/O/W(2) double emulsions, *J Colloid Interface Sci* 305 (2007) 175-182.
- [35] L. Mazutis, Droplet-based microfluidics for protein evolution, Université de Strasbourg, 2009.
- [36] J.C. Baret, Y. Beck, I. Billas-Massobrio, D. Moras, A.D. Griffiths, Quantitative cell-based reporter gene assays using droplet-based microfluidics, *Chem Biol* 17 (2010) 528-536.
- [37] N. Garti, A. Aserin, Y. Cohen, Mechanistic Considerations on the Release of Electrolytes from Multiple Emulsions Stabilized by Bsa and Nonionic Surfactants, *Journal of Controlled Release* 29 (1994) 41-51.
- [38] M. Kusuda, T. Hatano, T. Yoshida, Water-soluble complexes formed by natural polyphenols and bovine serum albumin: evidence from gel electrophoresis, *Biosci Biotechnol Biochem* 70 (2006) 152-160.
- [39] G. Woronoff, A. El Harrak, E. Mayot, O. Schicke, O.J. Miller, P. Soumillion, A.D. Griffiths, M. Ryckelynck, New generation of amino coumarin methyl sulfonate-based fluorogenic substrates for amidase assays in droplet-based microfluidic applications, *Anal Chem* 83 (2011) 2852-2857.

IV. Plateforme microfluidique

IV.1 Introduction

Ces dernières années, plusieurs plateformes microfluidiques pour différentes applications telles que l'évolution dirigée des protéines [1], l'expression *in vitro* des protéines [2], la détection de biomarqueurs cellulaires de surface [3] et le criblage d'inhibiteurs [4,5] ont été développées (voir **Figure 57**). *Kintsjes et al.* comparent ces plateformes à un jeu de puzzle dans lequel les différents modules microfluidiques unitaires (correspondant aux différentes pièces du puzzle) sont assemblés selon les opérations élémentaires requises [6].

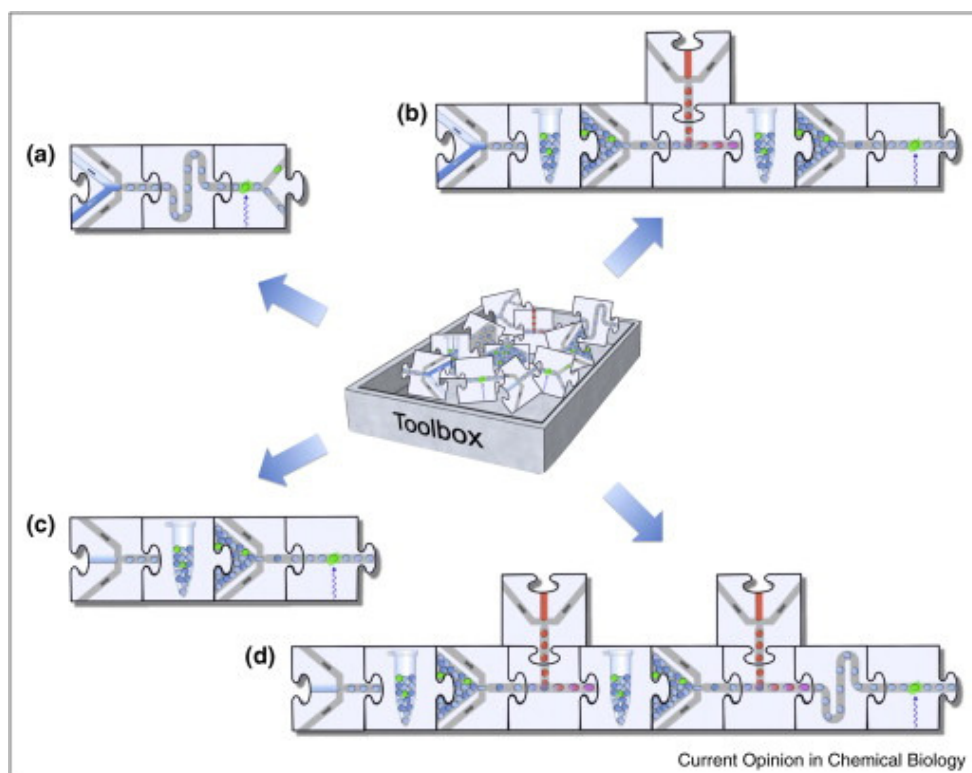


Figure 57 : Quelques exemples de plateformes microfluidiques.

(a) Sélection à très haut débit de peroxydases optimisées exprimées dans des levures. Grâce à un module de création de gouttes, une banque de peroxydases présentées à la surface de levures est compartimentée dans des gouttes avec le substrat fluorogénique spécifique pour avoir au maximum une cellule par goutte. Un second module avec une ligne de délai de 5 min, permet à la réaction enzymatique de se faire dans les gouttes. Finalement les gouttes sont réinjectées dans un module microfluidique qui permet de les trier selon l'intensité de leur fluorescence [1]. (b) Expression *in vitro* d'une

enzyme (la laccase). Tout d'abord, un module microfluidique de création de gouttes permet d'encapsuler les gènes codant pour la laccase avec la machinerie nécessaire à l'expression *in vitro*. Ces petites gouttes sont collectées hors puce et incubées 37°C. Puis au niveau d'un second, des gouttes créées sur puce et contenant le substrat fluorogénique sont fusionnées avec les gouttes précédemment formées et contenant les protéines exprimées *in vitro*. Les gouttelettes résultantes de la fusion sont réinjectées dans un dernier module pour les analyser une à une grâce à un système de laser-PMT. L'intensité de la fluorescence est directement proportionnelle à l'activité catalytique des laccases exprimées *in vitro* [2]. (c) Détection de bio-marqueurs cellulaires de surface : les cellules porteuses de protéines de surface ont été marquées avec des anticorps couplés à une enzyme. Une émulsion a été créée en encapsulant dans des gouttes, ces cellules en présence du substrat fluorogénique de l'enzyme. Ces gouttes ont été incubées hors puce puis réinjectées afin d'analyser la fluorescence de leur contenu [3]. (d) Criblage d'inhibiteurs : Une émulsion contenant des gouttes avec différentes dilutions de cytotoxines étiquetées avec des fluorophores a été créée. Ces gouttes ont été réinjectées, fusionnées une à une avec des gouttes contenant des cellules puis incubées hors puce. Cette émulsion a été réinjectée, fusionnée une à une avec des gouttes contenant un colorant permettant de mesurer la viabilité des cellules, incubées sur puce dans une ligne de délai pour finalement être analysées afin de mesurer la survie cellulaire et d'identifier les inhibiteurs grâce aux étiquettes fluorescentes [4].

Comme nous l'avons déjà mentionné, dans l'évolution dirigée des enzymes, l'efficacité de l'étape de sélection est dépendante, d'une part, de l'étanchéité et de la biocompatibilité du compartiment assurant le lien entre le phénotype et le génotype et d'autre part de la robustesse du système permettant de trier ces micro-compartiments à haut-débit. *Baret et al.* ont développé un système microfluidique basé sur le tri de gouttelettes contenant des cellules bactériennes en se basant sur leur activité enzymatique à une vitesse allant jusqu'à 400 événements/seconde (appelé FADS ou Fluorescent activated Droplet Sorting). Ce module exploite une jonction de tri asymétrique et la diélectrophorèse pour déplacer des microgouttelettes dans un canal de collecte (**Figure 58 panel (d)**). Afin de valider ce système, des suspensions contenant un mélange de cellules *E. coli*, exprimant soit une β -galactosidase active soit un variant inactif de cette enzyme, ont été encapsulées avec un substrat fluorogénique dans des gouttes de 12 pL (**Figure 58 panel (a)**). Après collecte et incubation de l'émulsion pendant 14h à 20°C (**Figure 58 panel (b)**), les gouttelettes ont été réinjectées dans le module de tri pour être triées (**Figure 58 panel (c)**).

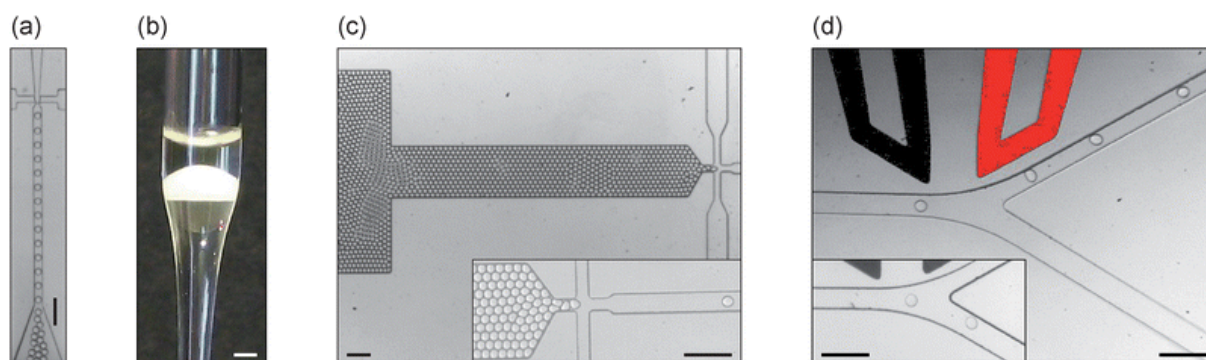


Figure 58: Plateforme microfluidique permettant la création de microgouttelettes et leur tri selon leur fluorescence. (a) Module microfluidique de géométrie flow-focusing pour la création de gouttes contenant des bactéries ayant exprimées des β -galactosidases actives ou des bactéries ayant exprimées des β -galactosidase inactives. (b) Pipette pasteur dans laquelle l'émulsion a été stockée. (c) Réinjection des gouttes monodisperses dans un module microfluidique de tri, au début l'émulsion est dense puis les gouttes sont espacées grâce à la phase huile. (d) Au niveau de la jonction de tri et en l'absence de champ électrique, les gouttes sont véhiculées naturellement vers un des deux canaux. Une fois le champ appliqué, les gouttes négatives circulent dans le même canal alors que les positives sont déviées vers le deuxième canal. Figure issue de Baret et al. [7].

Les gouttes présentant une importante fluorescence ont été collectées et leur contenu étalé sur boîte de pétri contenant du milieu LB en présence d'un substrat colorimétrique (X-gal ou 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside ($C_{14}H_{15}BrClNO_6$)) de l'enzyme. Ainsi les bactéries exprimant la β -galactosidase active sont bleues et les autres sont blanches. Ce test colorimétrique permet de facilement évaluer le taux d'enrichissement expérimental en cellules exprimant les enzymes actives (η_{exp}) entre la population initiale et la population triée. Les auteurs ont démontré que les valeurs expérimentales η_{exp} sont comparables aux valeurs théoriques η_m

obtenues en utilisant l'équation (1) suivante qui permet de calculer l'enrichissement théorique (**Tableau 9**):

$$\eta_m = 1/1 - e^{\varepsilon \lambda / (1+\varepsilon)}$$

λ = le nombre initial de cellules par goutte

ε = le ratio initial des bactéries exprimant les enzymes actives et des bactéries exprimant les enzymes inactives.

λ	ε_0	Number of droplets		ε_1	η_m	η_{exp}
		Analyzed	Sorted			
0.021	0.1	$\sim 4 \times 10^4$	10	>213	524	>2130
0.016	1	$\sim 1 \times 10^5$	100	>537	125	>537
0.16	0.01	$\sim 2 \times 10^5$	20	1.35	631	135
0.2	0.1	$\sim 6 \times 10^4$	100	7	55	70
0.15	1	$\sim 2 \times 10^5$	1000	16.1	14	16
1.6	0.01	$\sim 1 \times 10^5$	100	0.294	64	30
0.91	0.1	$\sim 2 \times 10^5$	1000	0.553	13	6

Tableau 9 : Tableau récapitulatif des enrichissements théoriques et expérimentaux obtenus par Baret et al. [7]

IV.2 Matériel et Méthodes

IV.2.1 La stratégie de construction du plasmide du mutant inactif de l'alcool déshydrogénase

Nous avons construit un plasmide portant un gène codant pour la QHEDH sans cytochrome *c* inactive en utilisant un protocole qui consiste à insérer des bases au sein de la séquence du gène pour décaler le cadre de lecture (au milieu de la séquence du gène). Ce procédé entraîne la survenue d'un codon stop conduisant ainsi à la synthèse d'une protéine non active. Pour se faire, le plasmide portant le gène codant pour la QHEDH sans cytochrome *c* a été digéré avec l'enzyme de restriction « BamHI » (cette enzyme permet de couper le gène d'intérêt en deux fragments de taille identique). Des plasmides à bouts francs ont été obtenus en les incubant à 12°C pendant 15 minutes en présence de T4 DNA polymérase (2U) et de dNTPs (concentration finale = 500µM). Pour arrêter la réaction, la solution a été chauffée pendant 20 minutes à 75°C en présence d'EDTA à une concentration finale de 10mM. L'ADN a par la suite été purifié et ligué en l'incubant à 22°C pendant 2 heures en présence de 1U de T4 DNA ligase et de 5% de PEG 4000. Les plasmides obtenus ont été transformés dans les bactéries *E. Coli* d'amplification XL-10 Gold. Ces dernières ont été étalées sur boîte de LB agar (avec 100 µg/mL d'ampicilline) et incubées pendant une nuit à 37°C. Cinq colonies ont été repiquées et mises en culture dans 3 mL de milieu LB en présence de 100µg/mL d'ampicilline. Après incubation à 37°C pendant une nuit sous agitation, les cinq types de plasmides ont été isolés puis digérés avec les trois enzymes de

restrictions BamHI, BglIII et HindIII. Le plasmide, qui n'est plus digéré par BamHI, représente le plasmide codant pour les mutants inactifs QHEDH sans cytochrome *c*. Dans le reste de ce document, nous appellerons la QHEDH sans cytochrome *c*, la QHEDH tronquée active et le mutant inactif QHEDH sans cytochrome *c*, la QHEDH tronquée inactive.

IV.2.2 Détermination de la densité cellulaire des cultures bactériennes

Il a été rapporté que selon la souche bactérienne utilisée, une unité de DO est égale à une concentration de cellules viables qui varie entre 10^5 et 10^7 cellules par mL [8]. Afin de déterminer la relation entre la densité optique des cultures bactériennes des cellules utilisées dans ce travail (bactéries *E. coli* C41 (DE3) [9]), 100 μ L de dilutions successives de cultures de ces cellules exprimant les QHEDH actives ou inactives ont été étalées sur des boîtes de LB agar. Après incubation des boîtes à 37°C pendant 14 heures, le nombre de colonies a été déterminé. Nous avons ainsi établi qu'une unité de DO à 600nm était égale à $5 \cdot 10^8$ cellules/mL (soit un nombre de cellule par goutte (λ) de 7,5 cellule/goutte de 15pL pour 1mL de culture à DO₆₀₀).

IV.2.3 Préparation de la suspension bactérienne pour la sélection modèle

Des bactéries *E. coli* C41(DE3) (compétentes à 10^7 cellules/ μ g) (voir la section Matériel et Méthodes du **Chapitre II** pour la préparation des cellules compétentes) [9] à un volume de 100 μ L ont été transformées avec 100ng du plasmide codant pour la QHEDH active ou le plasmide codant pour la QHEDH inactive. Deux cultures de 5mL de milieu LB contenant 100 μ g/mL d'ampicilline ont été inoculées avec les deux types de bactéries transformées puis incubés à 37°C pendant 14 heures et sous agitation à 230rpm. Le lendemain, deux nouvelles cultures de 5mL de LB contenant 100 μ g/mL d'ampicilline ont été inoculées avec 50 μ L de chacune de ces deux précultures et incubées à 37°C sous agitation. Une fois que la DO à 600nm a atteint la valeur 0.6, l'IPTG a été ajouté à ces deux cultures à une concentration finale de 0.1mM, puis ces cultures ont été incubées à 18°C pendant 14 heures et sous agitation. Après expression des protéines, les deux cultures ont été centrifugées à 2000g pendant 20 minutes à 4°C afin de récupérer les bactéries. Chacun des deux culots a été resuspendu dans 5mL de milieu LB contenant 100 μ g/mL d'ampicilline. Cette étape, permettant de laver les bactéries et d'enlever les enzymes libérées par les bactéries dans le milieu extracellulaire, a été réalisée deux fois. Chaque culture a ensuite été diluée pour obtenir une concentration cellulaire de $5 \cdot 10^8$ cellules/mL.

IV.2.4 Préparation de l'émulsion bactérienne

Chaque suspension bactérienne est diluée et compartimentée dans des gouttes de 15 pL de volume ($\lambda=0.1$) en présence d'IPTG (0.1mM). Nous avons préparé 3 solutions : deux phases aqueuses et une phase huile. Une des deux phases aqueuses contient la solution de bactéries *E. coli* exprimant les protéines actives et inactives et l'autre contient 0.2mM d'IPTG. La phase huile consiste en de l'huile HFE7500 (3M, St. Paul, Minnesota, Etats unis) contenant 1% (p/p) de tensioactif jeff900. Ces trois solutions sont chargées dans trois seringues de 1mL et injectées dans le module microfluidique de création de microgouttelettes à des débits de 50 μ L/h pour les phases aqueuses et 400 μ L/h pour la phase continue. Les microgouttelettes générées sont ensuite acheminées à travers une tubulure en PTFE et collectées dans une seringue de 1mL (Hamilton).

IV.2.5 Fabrication des modules microfluidiques

Pour la fabrication des modules microfluidiques en poly-diméthylsiloxane (PDMS) nous avons utilisé la stratégie de lithographie douce [10] décrite dans la section Matériel et Méthodes du **Chapitre III**.

IV.2.6 Digestion des plasmides et migration sur gel d'agarose

Les différents ADN ont été digérés par les enzymes de restriction BglII, HindIII et BamHI de la compagnie New England Biolabs (NEB). Le mélange de réaction était constitué de 1 μ l (100ng) d'ADN, 0.5 μ l de chaque enzyme (correspondant à 10U pour BamHI et HindIII et 5U pour BglII, 1 μ l de tampon NEB2, 7 μ l d'eau stérile. La réaction a eu lieu durant 2h à 37°C. Par la suite, les digestions ont été migrées sur gel d'agarose 1% (1g agarose et 50 μ g de bromure d'éthidium dans 100ml de tampon TAE 1X) à 100 volts durant 30 minutes. L'exposition aux rayons ultraviolets a révélé les bandes dont la longueur des fragments a été comparée à l'échelle de poids moléculaires.

IV.3 Résultats et discussions

Les résultats obtenus avec la plateforme d'expression *in vitro* ont été réalisés en collaboration avec le Dr L. Mazutis qui a fait sa thèse dans notre laboratoire. Pour la plateforme d'expression *in vivo*, nous avons obtenus les premiers résultats présentés, puis le doctorant T. Beneyton au sein de notre laboratoire, a réalisé les optimisations nécessaires pour le développement d'une plate-forme de sélection de variants optimisés.

IV.3.1 Développement d'un test fluorescent pour la détection de la laccase en gouttes

A ce jour, les laccases utilisées étaient des laccases de champignons, souvent membranaires. Nous avons choisi pour la partie cathodique de la biopile à éthanol que nous voulons construire, la laccase de *Bacillus subtilis* [9]. Cette enzyme bactérienne soluble est incluse dans les spores formées par cet organisme en réponse à un stress environnemental. C'est une enzyme de type extrêmophile, très stable, résistante à des variations de conditions extérieures importantes (telle que la température, la pression ou le pH) et à de nombreux produits chimiques. Pour la sélection de cette enzyme en gouttes, nous avons développé un test fluorogénique basé sur l'oxydation, en présence d'oxygène, d'un composé non fluorescent (l'AmplexRed) pour donner un produit fluorescent (la résorufine) (**Figure 59**) [2,11]. De ce fait, la sélection de la CotA en gouttes se fait avec le même substrat (oxydant) qui va être utilisé dans la biopile : l'oxygène.

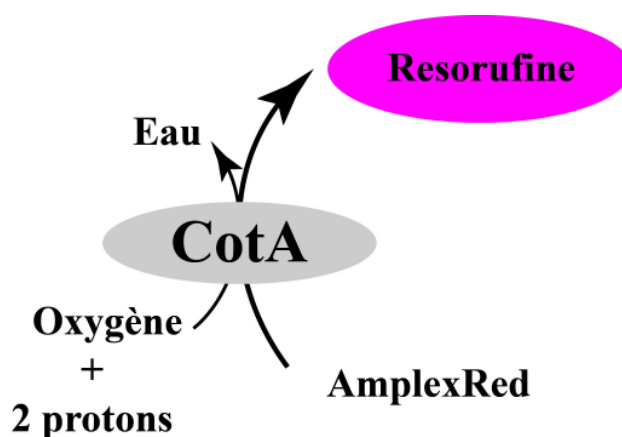


Figure 59 : Test fluorogénique pour la détection de l'activité de la laccase (CotA) en gouttes. En présence de l'oxygène, la CotA converti l'AmplexRed (molécule fluorogénique) en résorufine (molécule fluorescente).

IV.3.2 Développement de plateformes pour la sélection de biocatalyseurs

Pour l'étape de sélection de la banque de variants, que nous voulons créer par mutagenèse aléatoire, nous avons développé dans notre laboratoire deux types de plateformes microfluidiques. Le premier type permet de sélectionner les biocatalyseurs exprimées *in vitro* en gouttes et l'autre type permet de sélectionner les enzymes exprimées *in vivo* en gouttes. Ces deux systèmes ont été validés en réalisant des expériences modèles avec les biocatalyseurs modèles sous une forme active ou inactive afin de déterminer celle qui s'avère la plus efficace et la plus adéquate pour l'évolution dirigée des biocatalyseurs modèles (la laccase et l'alcool déshydrogénase). La sélection *in vitro* constitue la dernière partie du travail du Dr L. Mazutis (avec qui j'ai collaboré) alors que la sélection *in vivo*, utilisant des bactéries, constitue mon travail de thèse (principalement pour la

partie concernant l'alcool déshydrogénase) ainsi que le travail de thèse du doctorant T. Beneyton (pour la partie concernant la laccase).

IV.3.2.1 Plateforme pour la sélection des biocatalyseurs exprimées *in vitro*

Nous avons développé une plateforme microfluidique (détaillée dans la **Figure 60**) permettant de sélectionner les laccases exprimées *in vitro* dans les gouttes. Cette plateforme a la particularité de découpler l'expression *in vitro* des biocatalyseurs avec la détection de leur activité catalytique en gouttes. En effet, pour la laccase il n'est pas possible de réaliser en même temps son expression et son analyse. L'intérêt de cette plateforme pour l'évolution dirigée des enzymes est qu'elle permet de compartimenter au maximum un gène par goutte c'est-à-dire un seul variant génétique par goutte. D'un point de vue expérimental, dans la première étape nous utilisons un module de création de gouttes permet de compartimenter, en présence d'une solution d'expression *in vitro* (IVT), le plasmide portant le gène codant pour la laccase (**Figure 60 panel a**). Ces gouttelettes de 2 pL de volume sont incubées hors puce pendant 6 heures à température ambiante. Dans la seconde étape, cette émulsion contenant les protéines exprimées *in vitro* est réinjectée dans un deuxième dispositif microfluidique et où les gouttelettes sont fusionnées avec des gouttelettes produites sur puce, de 10pL de volume, contenant les différents constituants du test fluorogénique décrit plus haut (**Figure 60 panel b**). Après coalescence des gouttes grâce à un champ électrique, ces dernières sont collectées hors puce. Après incubation à +30°C, l'émulsion est réinjectée dans un module microfluidique de détection de fluorescence et l'activité catalytique de la laccase est détectée en utilisant le système optique décrit dans le **Chapitre III (Figure 60 panel c)**.

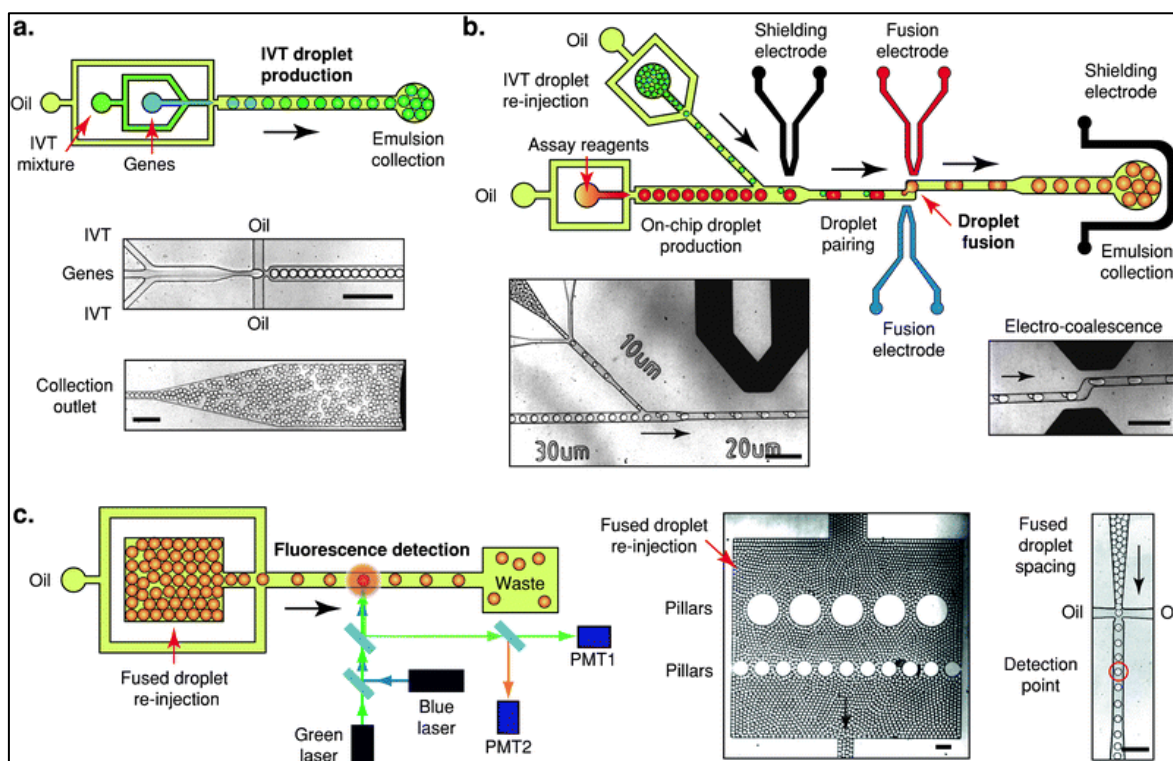


Figure 60 : Les différents modules de la plateforme microfluidique pour l'expression *in vitro* d'une enzyme (la laccase). (a) Un module microfluidique de création de gouttes permettant d'encapsuler les gènes de la laccase avec une solution d'expression *in vitro* (IVT). Ces petites gouttes de 2pL sont collectées hors puce et incubées à 37°C, (b) Un module microfluidique qui, par le biais d'un champ électrique, permet de fusionner des gouttes créées sur puce contenant le substrat fluorogénique avec les petites gouttes précédemment formées contenant les protéines exprimées *in vitro*. (c) Après incubation à +30°C hors puce des gouttelettes résultant de la fusion, elles sont réinjectées dans un module de détection pour être analysées une à une grâce à un système de laser. L'intensité de la fluorescence est directement proportionnelle à l'activité catalytique des laccases exprimées *in vitro*. Représentation issue de Mazutis et al. [2].

Le signal de fluorescence des gouttes représentant la quantité de résorufine en gouttes et permettant alors de mesurer l'activité catalytique de la laccase, montre que la protéine a pu être exprimée *in vitro* en microgouttelettes et que sa vitesse réactionnelle est similaire à celle mesurée en microplaque de 96 puits (voir **Figure 61**).

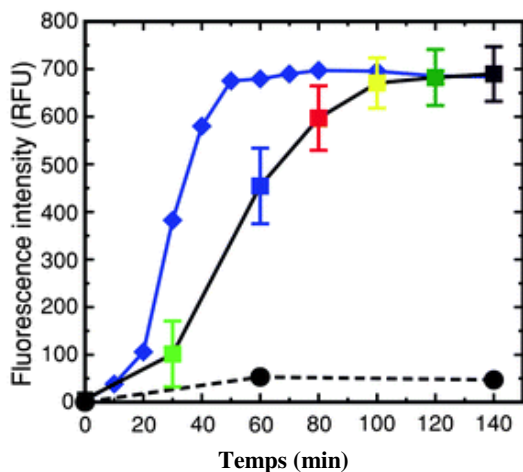


Figure 61 : Comparaison de la cinétique de la laccase mesurée en microgouttelettes et en microplaque. Ligne continue noire : gouttes résultante de la fusion des gouttes contenant le gène de la laccase avec des gouttes contenant le système d'expression *in vitro*. Ligne en pointillée noire : gouttes résultante de la fusion des gouttes ne contenant pas le gène de la laccase et de gouttes contenant le système d'expression *in vitro*. Ligne continue bleue : Mesure de la cinétique de la laccase exprimée *in vitro* en microplaque de 96 puits (dans les mêmes conditions qu'en gouttelettes). D'après Mazutis et al. [2].

La plateforme décrite dans la **Figure 60** a aussi été utilisée pour réaliser l'expression *in vitro* de l'alcool déshydrogénase. Comme pour l'expression de la laccase, les deux étapes d'expression *in vitro* et de mesure de l'activité catalytique (en présence du test fluorogénique basé sur la réduction de la résazurine et décrit dans le **Chapitre II**) ont été réalisées l'une à la suite de l'autre. Les résultats illustrés dans la **Figure 62** et mesurant l'oxydation de l'éthanol par les alcools déshydrogénases exprimée *in vitro* en gouttes pendant 3 heures, montrent l'efficacité et la faisabilité de l'expression *in vitro* en gouttes de l'alcool déshydrogénase.

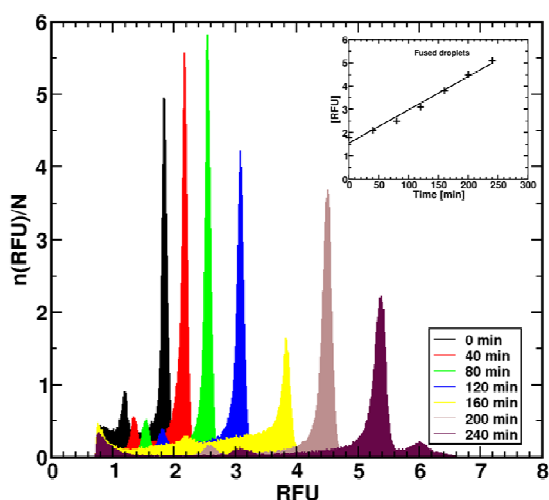


Figure 62 : Suivi pendant 240 min du signal de fluorescence des gouttes contenant l'alcool déshydrogénase exprimée *in vitro*. Chaque pic représente la mesure de l'intensité de la fluorescence des gouttes contenant l'alcool déshydrogénase exprimée *in vitro* en présence de son substrat fluorogénique à un temps t qui varie de 0 à 240 min. Travaux réalisés par Dr L. Mazutis.

En conclusion, une plateforme microfluidique d'expression *in vitro* d'enzymes en gouttes a été développée et validée avec la laccase et l'alcool déshydrogénase qui sont les deux biocatalyseurs modèles. Cette dernière a la particularité de coupler en gouttes l'expression *in vitro* des enzymes avec la détection de leur activité catalytique (en présence du test fluorogénique adéquat) grâce au système de fusion. Ces deux étapes, qui sont incompatibles l'une avec l'autre, ont pu être réalisées successivement et dans un volume 10^5 fois plus petit que le plus petit volume d'une microplaque. Cependant, la réussite de cette expression *in vitro* a nécessité d'encapsuler ~ 5000 gènes/goutte pour l'expression de l'alcool déshydrogénase et ~ 1000 gènes/goutte pour l'expression de la laccase. L'expression *in vitro* en gouttes de ces deux enzymes avec ~ 1 gène/goutte était non fructueuses (données non montrées). Par conséquent, afin de pouvoir utiliser cette plateforme pour l'évolution dirigée des biocatalyseurs, il est primordial d'encapsuler au maximum 1 gène par goutte et d'ajouter une étape supplémentaire d'amplification de l'ADN. Cette procédure a été largement décrite en systèmes microfluidique (voir [12,13,14,15] et les travaux, auxquels j'ai participé, décrits dans Pekin *et al.* [16]). Cependant, la plateforme correspondante deviendrait alors plus complexe et comporterait, comme indiquée dans la **Figure 63**, trois étapes. Une première étape permettrait l'amplification de l'ADN codant pour la laccase ou l'alcool déshydrogénase en gouttes. Une

deuxième étape permettrait l'expression *in vitro* des enzymes enclenchée par une fusion des gouttes contenant les gènes amplifiés avec des gouttes contenant le système d'expression *in vitro*. Une troisième étape permettrait la mesure de l'activité catalytique des enzymes exprimées en fusionnant les gouttes contenant les enzymes exprimées *in vitro* avec les composants du test fluorogénique. Nous avons donc décidé, d'explorer une stratégie alternative visant au développement d'une plateforme utilisant des cellules bactériennes pour l'expression de nos biocatalyseurs modèles (la laccase et l'alcool déshydrogénase).

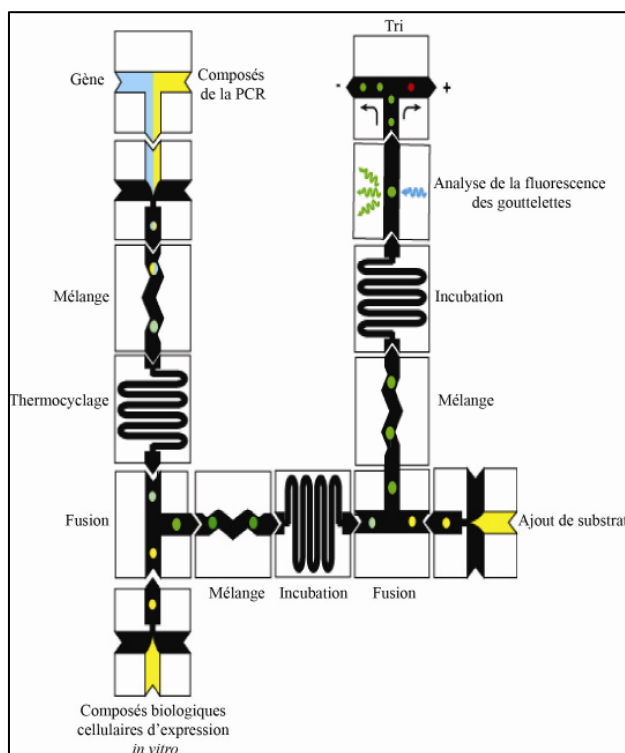


Figure 63 : Plateforme microfluidique pour la sélection d'enzymes exprimées *in vitro* en gouttes. Une émulsion constituée de gouttes contenant les gènes codants pour les alcools déshydrogénases (ADH) et les composés nécessaires pour l'amplification de l'ADN, est créée. Chaque goutte contient au maximum un gène. Après amplification des gènes dans les gouttes, chaque goutte est fusionnée avec une autre goutte contenant les composants biologiques cellulaires nécessaires pour l'expression *in vitro* des protéines. Après expression *in vitro* des protéines, chaque goutte est fusionnée avec une autre goutte contenant les constituants du test fluorogénique permettant la mesure de l'activité des protéines exprimées. La vitesse de la réaction enzymatique est déterminée par la mesure de la fluorescence de chaque goutte. Les gouttes dont la vitesse catalytique est au dessus d'une certaine valeur fixée, seront triées à part (gouttes en rouge). Ces dernières seront finalement cassées pour récupérer l'ADN et le caractériser. Les schémas utilisés pour les différents modules sont ceux créés par la société RainDance Technologies, Lexington, MA, USA.

IV.3.2.2 Plateforme pour la sélection des enzymes exprimées *in vivo*

La possibilité de réaliser des tests sur cellules entières peut constituer une alternative intéressante aux sélections totalement *in vitro* puisque certaines protéines ne s'expriment pas efficacement *in vitro*. De plus l'amplification des plasmides d'intérêt dans les bactéries permet d'avoir de multiples copies du gène évitant ainsi la nécessité d'une étape supplémentaire d'amplification avant expression *in vitro* (comme décrite plus haut **Figure 63**). Ces multiples copies sont ensuite exprimées dans la bactérie conduisant à des quantités de protéines supérieures à ce que l'on obtiendrait en gouttelettes.

IV.3.2.2.1 La laccase

Afin d'étudier l'efficacité du test de la laccase en gouttes, la plateforme décrite dans la **Figure 64** a été développée. Une émulsion constituée d'un mélange de deux types de gouttes, de 15pL de volume, contenant des bactéries *E. coli* exprimant la laccase, le test fluorogénique et 5μM de fluorescéine pour l'un, et des bactéries *E. coli* n'exprimant pas la laccase, le test fluorogénique et 50μM de fluorescéine pour l'autre a été créé. Pour stabiliser ces gouttes nous avons utilisé 2% (p/p) de tensioactif EA dans l'huile HFE7500. Les débits des quatre phases aqueuses étaient de 50μL/h et le débit des deux phases huile était de 200μL/h. Cette émulsion a été collectée pendant ~60 minutes dans une seringue via une tubulure en PTFE puis réinjectée immédiatement dans un deuxième module microfluidique pour analyser la fluorescence de chaque microgouttelette.

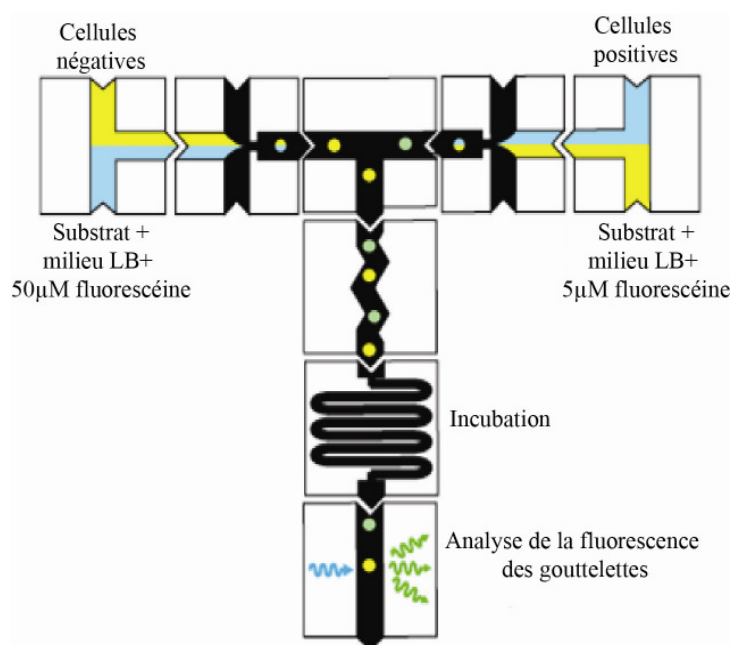


Figure 64 : Plateforme microfluidique digitale pour la mesure de l'activité de la CotA (exprimée *in vivo*) en gouttes. Une émulsion constituée d'un mélange de deux types de gouttes, de 15pL de volume, contenant des bactéries *E. coli* exprimant la CotA, le test fluorogénique et 5μM de fluorescéine pour l'un, et des bactéries *E. coli* n'exprimant pas la CotA, le test fluorogénique et 50μM de fluorescéine pour l'autre ont été créés. Le signal de fluorescence de ces gouttes est ensuite analysé. Les schémas utilisés pour les différents modules sont ceux créés par la société RainDance Technologies, Lexington, MA, USA.

Les résultats quantitatifs et qualitatifs illustrés dans la **Figure 65** montrent que les deux populations de gouttes peuvent être facilement distinguées. En effet, les gouttes avec un faible signal de fluorescéine (en vert pour le codage) et correspondantes aux gouttes contenant des bactéries *E. coli* (au maximum une bactérie par goutte à l'encapsulation) exprimant la laccase, ont un signal fort en résorufine (en rouge) et les gouttes avec un fort signal de fluorescéine (en vert), correspondantes aux gouttes contenant des bactéries *E. coli* n'exprimant pas la laccase, ont un signal faible en résorufine (en rouge). Ce résultat confirme que seules les bactéries *E. coli* exprimant la laccase sont capables de convertir l'AmplexRed en résorufine au sein de gouttelettes. Cette conversion se fait d'une manière très rapide (30 min), par conséquent la fuite de la résorufine n'est pas problématique dans ce cas (données non montrées, voir **Chapitre III**).

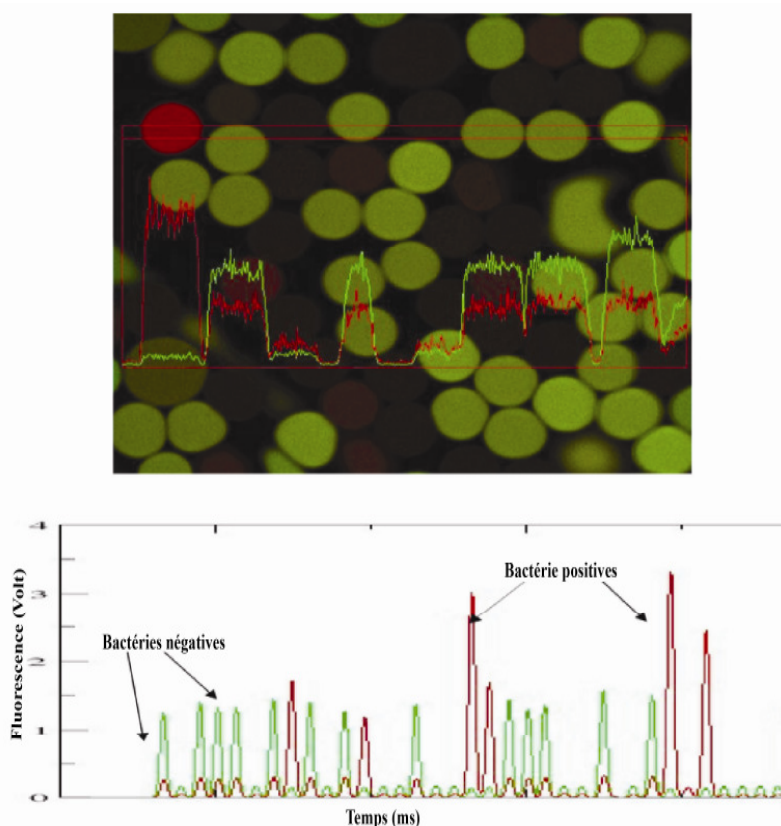


Figure 65 : Représentation du signal de fluorescence des gouttes. (En haut) Les gouttes avec un haut signal de fluorescéine correspondant aux gouttes contenant des bactéries *E. coli* n'exprimant pas la laccase (couleur verte) ne contiennent pas de résorufine (couleur rouge) et les gouttes avec un faible signal de fluorescéine correspondant aux gouttes contenant des bactéries *E. coli* exprimant la laccase montrent la présence de résorufine avec la couleur rouge. (En bas) chaque pic représente une goutte. Quand les gouttes contiennent des bactéries *E. coli* exprimant la laccase, le signal de la résorufine est haut (couleur rouge) et le signal de la fluorescéine (couleur verte) est faible (gouttes positives). Quand les gouttes contiennent des bactéries *E. coli* n'exprimant pas la laccase, le signal de la résorufine est bas et le signal de la fluorescéine est haut (gouttes négatives).

En conclusion, dans ces travaux, nous avons développé un test fluorogénique permettant de détecter l'activité de la laccase en gouttes puis nous avons démontré l'efficacité, avec un bruit de fond bas, de détecter l'activité de bactéries *E. coli* exprimant la laccase en gouttes. Le développement de la plateforme de tri et la sélection des mutants créés par mutagenèse aléatoire constituent une partie des travaux de thèse du doctorant T. Beneyton.

IV.3.2.2.2 L'alcool déshydrogénase

Les travaux préliminaires réalisés sur la laccase, nous ont permis de développer une plateforme (détaillée dans la **Figure 66**) permettant de sélectionner l'alcool déshydrogénase exprimées *in vivo* (*E. coli*). Cette plateforme a la particularité de découpler l'expression *in vivo* des biocatalyseurs et la détection de leur activité catalytique en gouttes, deux étapes qui sont réalisés successivement et indépendamment l'une de l'autre. L'intérêt de cette plateforme pour l'évolution dirigée des enzymes est qu'elle permet de compartimenter une bactérie par goutte c'est-à-dire un

variant génétique par goutte. L'induction de ces bactéries en gouttes nous permet d'avoir une surexpression de protéines par goutte. D'un point de vue expérimental, dans la première étape nous utilisons un module de génération de gouttes qui permet de compartimenter en présence de l'IPTG, une solution contenant les bactéries transformées avec le plasmide portant le gène codant pour les protéines actives et les bactéries transformées avec le plasmide portant le gène codant pour les protéines inactives, à hauteur d'une bactérie par goutte. Ces gouttelettes de 15pL de volume sont incubées hors puce (dans une seringue) pendant 14 heures à température ambiante (**Figure 66 panel B**) afin de permettre la croissance des bactéries en gouttes et l'expression des protéines. Dans la seconde étape, cette émulsion contenant les protéines exprimées *in vivo* est réinjectée dans un deuxième dispositif microfluidique (**Figure 66 panel C**). Par la suite, nous avons utilisé un système microfluidique d'injection à haut-débit (nommé pico-injecteur), développé par *Abate et al.* [17] (et implémenté dans notre laboratoire par le Dr F. Coldren et dans le projet d'optimisation des biocatalyseurs pour les biopiles par le doctorant T. Beneyton) afin d'ajouter les constituants du test fluorogénique (décrit dans le **Chapitre II**) à chacune des gouttes réinjectées (**Figure 66 panel D**). Une fois l'activité catalytique des enzymes exprimées dans les bactéries détectée au sein des gouttes, en utilisant le système optique décrit dans le **Chapitre III**, le dispositif microfluidique de tri (le FADS) développé par *Baret et al.* [7] est utilisé pour séparer les gouttes positives contenant les bactéries exprimant les protéines actives des gouttes négatives (vides ou contenant les bactéries exprimant les protéines inactives) (**Figure 66 panel E**).

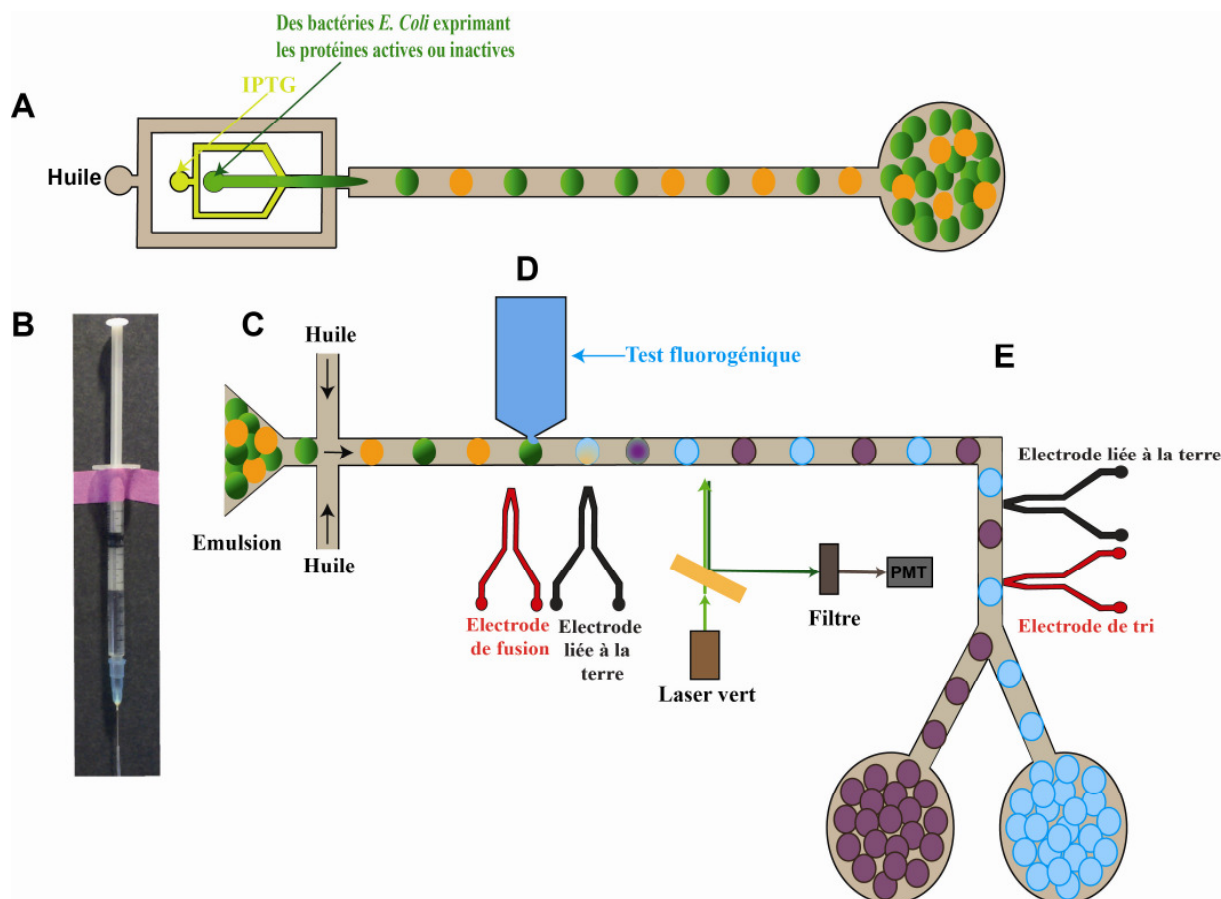


Figure 66 : Plateforme microfluidique développée pour la sélection de bactéries exprimant des variants génétiques optimisées d'Alcool déshydrogénase. (A) Module microfluidique permettant la création de microgouttelettes de 15pL. (B) L'émulsion est collectée en seringue pour l'expression in vivo des protéines. (C) Les gouttelettes sont réinjectées dans un deuxième module microfluidique. (D) Les composants du test fluorogénique sont ajoutés à chaque goutte. (E) Les gouttes sont analysées une à une et triées selon leur niveau de fluorescence.

Nous avons développé cette plateforme microfluidique dans le but de l'utiliser pour la sélection d'une banque de mutants de l'alcool déshydrogénase créée par mutagenèse aléatoire. Cependant, pour valider sa pertinence nous avons choisi de l'utiliser pour une sélection modèle en utilisant une alcool déshydrogénase active et une alcool déshydrogénase inactive (voir la section Matériel et Méthodes de ce Chapitre pour la procédure d'inactivation de l'enzyme). L'idée est de vérifier si à partir d'un mélange de bactéries transformées avec le plasmide portant le gène codant pour les enzymes actives et de bactéries transformées avec le plasmide portant le gène codant pour des enzymes inactives, nous arrivons à trier et à récupérer les bactéries exprimant les protéines actives.

IV.3.2.2.2.1 Etude de la faisabilité de l'expression *in vivo* et de la mesure de l'activité catalytique des enzymes en microplaque

Nous avons testé, dans un premier temps, l'efficacité de l'expression *in vivo* de l'alcool déshydrogénase en microplaque de 96 puits noire à fond clair. Pour se faire, nous avons exprimé *in vivo* les enzymes actives et inactives comme décrit dans la section Matériel et Méthode puis, un volume de 100µL a été prélevé de chacun des deux types de culture et a été déposé dans deux puits indépendants d'une microplaque de 96 puits. Nous avons ajouté un volume IPTG à une concentration de 0,2mM. Après incubation à température ambiante pendant 14 heures, l'oxydation de l'éthanol par les alcool-déshydrogénases exprimées *in vivo* a été mesurée en utilisant le test fluorogénique basé sur la réduction de la résazurine décrit dans le **Chapitre II**. Les résultats, représentés dans la **Figure 67**, montrent que dans la solution contenant des bactéries *E. coli* exprimant les enzymes actives *E. coli* ainsi que dans celle contenant, la résazurine est réduite pour former la résorufine. La faible réduction de la résazurine par les bactéries *E. coli* exprimant les enzymes inactives (nommée bruit de fond) s'explique par le fait que le test fluorogénique, basé sur la réduction de la résazurine est aussi un test de viabilité cellulaire [18]. Nous avons observé une vitesse de réduction de la résazurine 5 fois supérieure dans les tests contenant des bactéries exprimant des enzymes actives. Nous avons estimé (grâce aux travaux réalisés précédemment dans le laboratoire) que cette différence était suffisante pour distinguer l'alcool déshydrogénase active exprimée *in vivo* en gouttes.

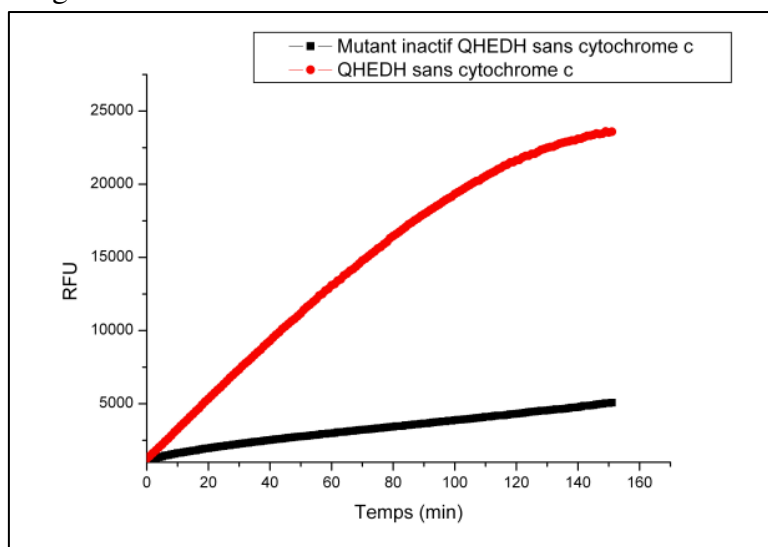


Figure 67 : Suivi pendant 150 minutes de l'oxydation de l'éthanol par les enzymes actives et les enzymes inactives exprimées dans bactéries *E. coli* en présence du test fluorogénique. L'expression des enzymes a été réalisée dans une microplaque de 96 puits noire à fond clair pendant 14 heures à température ambiante et l'activité mesurée grâce à un spectrofluorimètre. (Tracé rouge) *E. coli* exprimant les protéines actives. (Tracé noir) *E. coli* exprimant les protéines inactives.

IV.3.2.2.2.2 Quantification des enrichissements de sélection

Dans un deuxième temps, nous avons développé une stratégie pour la récupération et la quantification des bactéries exprimant l'alcool déshydrogénase active de celles exprimant l'alcool déshydrogénase inactive. Généralement cette étape peut se faire de différentes manières. Elle peut se faire par récupération des gènes d'intérêts triés en réalisant une PCR sur colonies (la température de dénaturation est généralement suffisante pour casser les gouttes dans lesquelles se trouvent les bactéries et lyser ces dernières afin de libérer l'ADN et amplifier les gènes d'intérêt). Dans ce cas il est essentiel que le gène codant pour la protéine active et le gène codant pour la protéine inactive aient la même taille pour éviter tout risque de biais de la PCR [19] (par exemple l'amplification préférentielle de certains gènes dont, en particulier, les fragments courts ou riches en G et C). Ces gènes sont par la suite digérés avec des enzymes de restriction spécifiques afin de les distinguer [20].

Les essais de récupération par PCR sur colonies en augmentant la température et le temps de dénaturation (due au fait que le gène est riche en bases G et C) et en ajoutant un agent permettant de fragiliser la membrane bactérienne (DodécylSulfate de Sodium ou SDS) se sont révélés infructueuses (données non montrées).

La seconde stratégie testée a consisté à développer un test colorimétrique, spécifique à l'enzyme ciblée, sur boîte de LB agar. Ce test permet de colorer les bactéries exprimant l'enzyme active avec une couleur différente de celle des bactéries exprimant l'enzyme inactive [7]. Nos tentatives, inspirées du test fluorogénique décrit dans le **Chapitre 2**, ont également été infructueuses puisqu'ils étaient peu reproductibles ou complètement négatifs (données non montrées). Nous avons testé, en présence ou non d'accepteur d'électrons intermédiaire (le PMS), différents accepteurs d'électrons tels que la résazurine, le Triphenyl Tetrazolium Chloride (TTC), le sel de tétrazolium MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium) ou le XTT (2,3-bis[2-méthoxy-4-nitro-5-sulfophényl]-2H-tétrazolium-5-carboxyanilide inner salt). De plus le point faible de ces tests est leur faible échelle dynamique. En effet, ces tests colorimétriques sont qualitatifs et ne permettent d'avoir qu'une réponse oui/non [7].

Comme alternative, nous avons choisi d'extraire les protéines et de les identifier avec le test fluorogénique (ces deux protocoles sont décrits dans le **Chapitre II**). Pour cela, nous avons préparé deux boîtes LB agar contenant 100 µg/ml ampicilline avec dans l'une des clones de bactéries *E. Coli* transformées avec les plasmides de l'enzyme active et dans l'autre des clones de bactéries *E. Coli* transformées avec des plasmides de l'enzyme non active. Par la suite, un clone est

piqué de chaque boîte et mis en culture à 37°C et sous agitation à 230 rpm pendant 14 heures dans 1 mL de milieu LB contenant des concentrations finales de 0,1 mM IPTG et 100 µg/ml ampicilline à 25°C. Les deux types de bactéries sont ensuite récupérés, individuellement, par centrifugation (6000 g, 20 min, 4°C) et chacun resuspendu dans 50µL de tampon de lyse périplasmique (20% sucrose, EDTA-free protease inhibitor mix (Roche) 50 mM Tris-HCL, pH 8.0). Après incubation pendant 1 heure dans de la glace, les surnageants, que nous appelons extraits périplasmiques, sont récupérés par centrifugation des deux solutions (6000 g, 20 min, 4°C) et placé à 4°C. L'oxydation de l'éthanol par les enzymes de ces deux extraits a été mesurée, en présence du test fluorogénique décrit dans le **Chapitre II**, en microplaque de 96 puits grâce à un spectrofluorimètre. Les résultats obtenus et illustrés dans la **Figure 68**, montrent que la résazurine est réduite en résorufine uniquement dans les extraits périplasmiques contenant les enzymes actives.

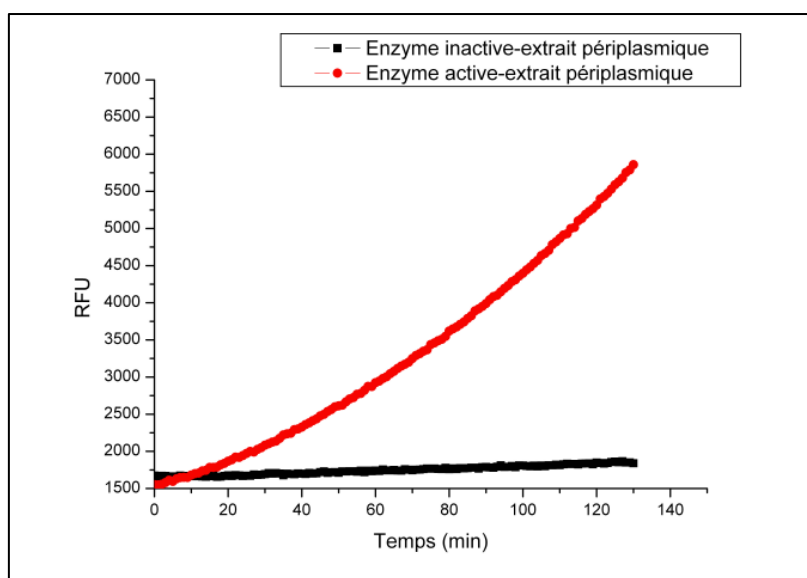


Figure 68: Suivi pendant 130 minutes de l'oxydation de l'éthanol par les enzymes des extraits périplasmique et osmotique en présence du test fluorogénique. A partir d'un clone, l'expression des enzymes a été réalisée pendant une nuit et à température ambiante dans un tube Eppendorf (dans 1 mL de milieu LB en présence de 0,1mM IPTG et 100 µg/ml ampicilline) et la mesure de l'activité des protéines en spectrofluorimètre dans une microplaque de 96 puits noire à fond clair. (En noir et vert) Extrait périplasmique et osmotique des clones bactériens exprimant les enzymes inactives. (En bleu) Extrait osmotique du clone exprimant l'enzyme active. (En rouge) Extrait périplasmique du clone exprimant l'enzyme inactive.

En conclusion, différentes stratégies permettant de quantifier l'enrichissement en bactéries exprimant l'alcool déshydrogénase active ont été testées sur les bactéries exprimant l'alcool déshydrogénase active ou une version inactive de l'enzyme. Cependant seule la stratégie de l'extraction périplasmique des enzymes (en présence de 20% de sucrose) et la mesure de leur activité catalytique grâce au test fluorogénique (tous les deux décrits dans le **Chapitre II**), permettait de facilement distinguer et compter les clones exprimant les enzymes actives de ceux exprimant les enzymes inactives.

IV.3.2.2.2.3 Validation de la plateforme microfluidique

Pour démontrer la pertinence de la plateforme microfluidique que nous avons développée, nous avons choisi de la tester avec 3 différentes ϵ de bactéries transformées avec le plasmide portant le gène codant pour l'enzyme active dans des bactéries transformées avec le plasmide portant le gène codant pour l'enzyme inactive. Ces ϵ (le ratio initial des bactéries exprimant les enzymes actives et des bactéries exprimant les enzymes inactives) sont 0.1, 0.02 et 0.01. Ainsi, pour $\epsilon=0.1$ et un nombre initial de cellule par goutte λ de 0.1, sur 100 gouttes, 1 goutte contient une bactérie exprimant l'enzyme active, 9 gouttes contiennent chacune une bactérie exprimant l'enzyme inactive et 90 gouttes sont vides. Nous considérons que cette plateforme est validée si le taux d'enrichissement expérimental est \sim égal au taux d'enrichissement théorique « η » en se basant sur l'équation (1) de ce **Chapitre**.

Nous avons voulu vérifier si $\epsilon=0.1$, 0.02 ou 0.01 avant et après encapsulation des bactéries avec l'IPTG en gouttes est conservé. Pour cela, nous nous sommes basés sur le fait que le plasmide portant le gène codant pour l'enzyme active soit digéré par 3 enzymes de restrictions (BglII, HindIII et BamHI) alors que dans le plasmide portant le gène codant pour l'enzyme inactive, le site de restriction BamHI est absent (le plasmide est digéré uniquement avec BglII et HindIII).

(i) Avant encapsulation dans les gouttes

Pour vérifier si le ratio ϵ est conservé avant encapsulation des bactéries dans les gouttes, nous avons utilisé le protocole expérimental pour la préparation des cultures bactériennes (positives et négatives) décrit dans la section Matériel et Méthodes. Par la suite, trois cultures de 1 mL contenant du LB (avec 100 μ g/mL ampicilline) constituées de $\lambda=0.1/15$ pL et $\epsilon=0.1$, 0.02 ou 0.01 ont été préparées puis mises en culture à 37°C et sous agitation à 230 rpm dans 10 mL de milieu LB (avec 100 μ g/mL ampicilline). Les ADN, correspondant à chaque ratio, ont ensuite été extraits et digérés avec les 3 enzymes de restriction. Les résultats illustrés dans la **Figure 69**, montrent que les $\epsilon=0.1$, 0.02 et 0.01, de bactéries positives dans les négatives, ont bien été conservés. En effet, nous avons pris comme référence les puits 1 et 2 correspondant respectivement au plasmide portant le gène codant pour la protéine active et au plasmide portant le gène codant pour la protéine inactive, tous les deux digérés avec les 3 enzymes de restriction. Le puit 3, correspondant au plasmide extrait de la solution bactérienne dont le $\epsilon=0.1$ et digéré, montre un profil identique au plasmide portant le gène codant pour la protéine inactive digérés et une légère bande, correspondante au plasmide

positifs, qui disparaît petit à petit dans les plasmides extraits des de la solution bactérienne dont les $\varepsilon=0.02$ et $\varepsilon=0.01$ (respectivement puits 4 et 5).

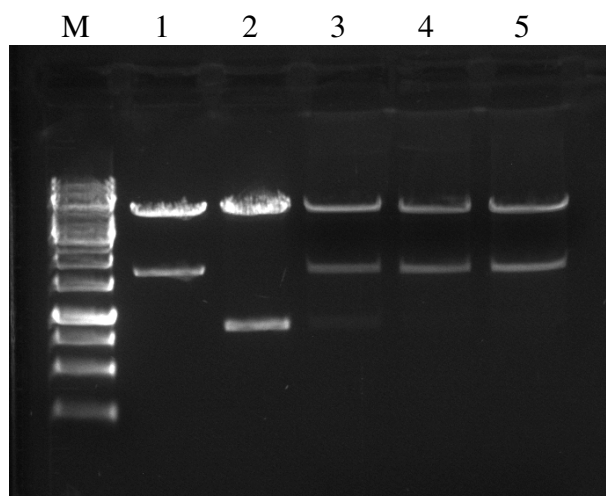


Figure 69 : Gel d'agarose 1% dans TAE de plasmides digérés avec *BglII*, et *BamHI* et *HindIII* (1) : Plasmide portant le gène codant pour la protéine inactive. (2) : Plasmide portant le gène codant pour la protéine active. (3) Plasmides extraits du mélange 1/10 (v/v) contenant des bactéries transformées avec les plasmides portant le gène codant pour la protéine active dans des bactéries transformées avec les plasmides portant le gène codant pour la protéine inactive.

(ii) Après encapsulation dans les gouttes

Pour vérifier si l' ε est conservé après encapsulation des bactéries dans les gouttes, nous avons commencé par contrôler l' $\varepsilon=0.1$. La préparation des deux cultures bactériennes et leur encapsulation dans les gouttes ont été réalisées selon les protocoles décrits dans la section Matériel et Méthodes de ce chapitre. Deux émulsions ont été collectées dans deux seringues indépendantes et incubées à température ambiante pendant 14h. Après expression des enzymes dans les bactéries au sein des gouttes, une des deux émulsions a été mise en culture dans 10mL de LB (ampicilline) à 37°C et sous agitation pendant 14h (nous l'appellerons S1). L'autre émulsion a été réinjectée dans le module représenté dans la **Figure 66 panel C**. Dans ce module, une phase huile, avec un débit de 500 μ L/h contenant de l'huile HFE 7500, permettait d'espacer les gouttes qui étaient réinjectées avec un débit de 50 μ L/h. A ces dernières nous rajoutons, grâce au module représenté dans la **Figure 66 panel D**, les composés du test fluorogénique (décrit dans le **Chapitre II**) en utilisant un champ électrique égal à 200 mV. Cette émulsion est collectée et immédiatement mise en culture dans 10mL de LB (avec 100 μ g/mL ampicilline) à 37°C et sous agitation pendant 14h (nous l'appellerons S2). Ensuite Les ADN de S1 et de S2 ont été extraits et digérés avec les 3 enzymes de restriction. Les résultats illustrés dans la **Figure 70**, montrent que l' $\varepsilon=0.1$ de bactéries positives dans les négatives n'a pas été conservé. En effet, le profil des plasmides digérés issus de S1 (puit 1) et de S2 (puit 2) sont identiques au profil des plasmides positifs digérés (puit 3). En conclusion au lieu

d'avoir dans la solution bactérienne dont l' $\epsilon=0.1$ une majorité de plasmides négatifs, nous avons au contraire une majorité de plasmides positifs.

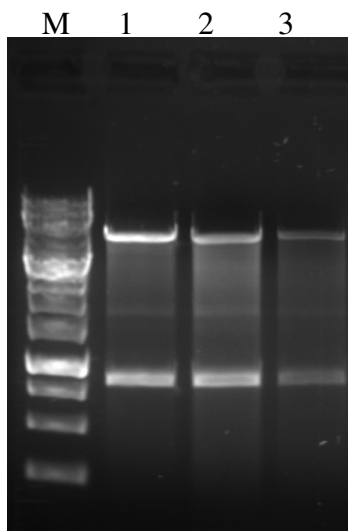


Figure 70 : Gel d'agarose 1% dans TAE de plasmides digérés avec BglII, HindIII et BamHI. (1) plasmide extrait de la solution S1. (2) Plasmide extrait de la solution S2. (3) Plasmide portant le gène codant pour la protéine active.

Notre première hypothèse était qu'un évènement de recombinaison des séquences codant pour les enzymes inactives au sein des cellules (dû probablement ici à un avantage pour les bactéries *E. coli* exprimant l'enzyme active). Cette hypothèse est cependant en désaccord avec nos résultats montrant que le test réalisé, avec des bactéries exprimant des enzymes négatives seules, ne montre pas ce phénomène. Notre seconde hypothèse était que les cellules exprimant l'alcool déshydrogénase sous sa forme active présentent un avantage sélectif dans les conditions du test en microgouttelettes. Pour vérifier cette hypothèse nous avons réalisé l'ensemble des tests regroupés dans le **Tableau 10**.

Condition du test (en goutte ou hors goutte)	Induction avec 0.2mM d'IPTG	Mélange cellules positives/ négatives avec un ratio $\epsilon=0.1$	Test fluorogénique	Résultat observé après extraction et digestion des plasmides avec les 3 enzymes
Hors goutte	oui	oui	oui	Pas de problème
En goutte	oui	oui	oui	Problème : que des positifs
En goutte	non	oui	non	Pas de problème
Hors goutte	oui	oui	non	Pas de problème
En goutte	oui	oui	non	Problème : que des positifs

Tableau 10 : Récapitulatif des différents tests effectués sur le mélange de bactéries contenant le plasmide portant le gène codant pour l'enzyme active et de bactéries contenant le plasmide portant le gène codant pour l'enzyme inactive.

D'après les résultats obtenus dans le **Tableau 10**, il paraît que c'est l'association de la présence de l'IPTG et de l'encapsulation en gouttes des bactéries contenant le plasmide portant le gène codant pour la protéine inactive, qui soit la cause de l'avantage sélectif que présentent les cellules exprimant l'enzyme active et qui se trouvent être les seules sélectionnées durant la phase d'incubation des gouttelettes. Ce phénomène inexplicable peut être due à un élément toxique dans la goutte qui inhiberait la croissance des bactéries négatives et l'induction des protéines inactives. Nous pouvons aussi imaginer que ce problème est due au tensioactif et l'huile fluorocarbonée que nous utilisons pour stabiliser les gouttes. Nous sommes cependant entrain de trouver une explication plausible à ce processus inattendu.

Pour résoudre ce problème, nous avons utilisé comme cellules négatives des cellules transformées avec un plasmide vide pPB10 (ne contenant aucune séquence d'ADH). Des bactéries *E. coli* transformées avec le plasmide vide pPB10 (bactéries négatives) ou le plasmide pPB10 portant le gène codant pour les QHEDH avec cytochromes *c* (bactéries positives) ont été mises en culture séparément à 37°C et sous agitation. Une fois que la DO_{600} ait atteint la valeur de 0.6, deux cultures d'1mL contenant du LB en présence de 100µg/mL amplicilline (avec $\lambda=0.1/15\text{pL}$ et $\varepsilon=0.1$) ont été préparées. Une des deux cultures a été mise en culture, à 37°C pendant 14h et sous agitation à 230 rpm, dans 10mL de milieu LB (avec 100µg/mL amplicilline) (nous l'appelons S5). La deuxième culture a été encapsulée, en présence de l'IPTG, dans des gouttes en utilisant le module microfluidique représenté dans la **Figure 66 panel A**. Les débits des deux phases aqueuses (le milieu LB (contenant les bactéries + 100µg/mL d'ampicilline) et l'IPTG) sont égaux à 50µL/h chacune. Le débit de la phase huile, constituée de 1% (p/p) de tensioactif jeff900 dans l'huile HFE7500, est de 400µL/h. L'émulsion a été collectée dans une seringue et incubée à température ambiante pendant 14h. Après expression *in vivo* des enzymes au sein des gouttes, l'émulsion a été mise en culture dans 10mL de milieu LB contenant 100µg/mL d'ampicilline à 37°C et sous agitation pendant 14h (nous l'appellerons S6). Les plasmides de S5 et S6 ont été extraits et les résultats de leur digestion, avec les 3 enzymes de restrictions, sont représentés dans les puits 3 et 4 de la **Figure 71**. Si nous prenons comme référence les puits 1 et 2, correspondant respectivement au plasmide pPB10 et au plasmide des QHEDH sans cytochrome *c* digérés avec les trois enzymes de restriction, nous constatons que pour l' $\varepsilon=0.1$ nous avons bien une majorité de plasmides négatifs.

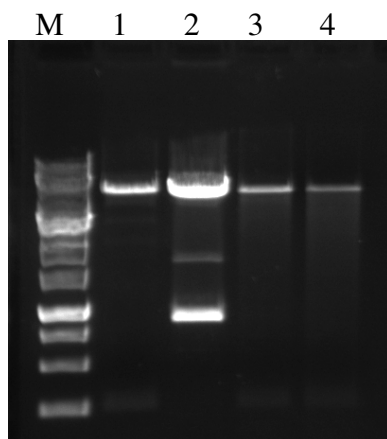


Figure 71 : Gel d'agarose 1% dans TAE de plasmides digérés avec *BglII*, *HindIII* et *BamHI*. (1) : Plasmide pB10 vide. (2) : Plasmide portant le gène codant pour la protéine active. (3) Plasmide de la solution S5. (4) Plasmide de la solution S6.

Il semblerait donc que c'est l'association de la présence de l'IPTG et de l'encapsulation en gouttes des bactéries contenant le plasmide portant le gène codant pour la protéine inactive ou pour la protéine active, qui soit la cause de l'avantage sélectif que présentent les cellules exprimant l'enzyme active. La validation de la plateforme *in vivo* avec une sélection modèle n'a pas encore pu être réalisée mais le sera prochainement. Cette sélection sera réalisée avec des bactéries contenant le plasmide portant le gène codant pour l'alcool déshydrogénase active et un plasmide vide (ne contenant aucun gène d'intérêt).

IV.4 Conclusions et perspectives

Pour conclure, nous avons développé, dans ce chapitre, deux types de plateformes microfluidique pour la sélection de l'alcool déshydrogénase et de la laccase. Le premier type permet de sélectionner les enzymes exprimées *in vitro*. Elle est composée d'une première étape permettant l'expression *in vitro* des enzymes en gouttes suivie d'une deuxième étape permettant de mesurer l'activité catalytique des enzymes exprimée en présence d'un test fluorogénique adéquat. Les résultats ont montré que, pour que l'expression *in vitro* puisse se faire dans les gouttes, il était nécessaire d'avoir au départ ~5000 gènes/goutte pour l'alcool déshydrogénase et ~1000 gènes/goutte pour la laccase. Or, pour pouvoir utiliser cette stratégie, dans la sélection de banques de mutants, il est primordial que l'expression *in vitro* en goutte se fasse avec au maximum ~1 gène/goutte au départ. Cette condition nécessite alors l'ajout d'une étape supplémentaire d'amplification de l'ADN en gouttes. Des travaux et des optimisations supplémentaires sont requis pour mettre au point cette plateforme de sélection *in vitro*. Comme alternative plus simple, nous avons développé une plateforme microfluidique pour la sélection de biocatalyseurs exprimées *in vivo*. Elle est composée d'une première étape permettant l'expression des enzymes dans des bactéries *E. coli* en gouttes et d'une deuxième étape permettant de mesurer l'activité catalytique de

ces enzymes en présence du test fluorogénique adéquat. Des travaux préliminaires ont permis de mettre au point un test fluorométrique (pour l'analyse de l'activité en goutte) et colorimétrique (pour la quantification de l'enrichissement après tri) pour la laccase. La réalisation d'une plateforme pour la sélection de la laccase (ainsi que la sélection modèle et la sélection de banque de mutants) a constitué une partie des travaux de thèse du doctorant T. Beneyton. La validation de cette plateforme avec une sélection modèle de l'alcool déshydrogénase n'a pas encore pu être réalisée mais le sera prochainement. Nous avons démontré qu'à priori il était possible de valider sa pertinence en utilisant un plasmide portant le gène codant pour l'alcool déshydrogénase active et un plasmide vide (comme négatif). Cette alternative est actuellement en cours de développement. Une fois que la plateforme sera validée avec cette stratégie, elle sera utilisée pour la sélection d'une ou plusieurs banques de mutants de l'alcool déshydrogénase afin de trouver le mutant le plus adapté au nouvel environnement que constitue la biopile à éthanol.

IV.5 Référence bibliographie

- [1] J.J. Agresti, E. Antipov, A.R. Abate, K. Ahn, A.C. Rowat, J.C. Baret, M. Marquez, A.M. Klibanov, A.D. Griffiths, D.A. Weitz, Ultrahigh-throughput screening in drop-based microfluidics for directed evolution, *Proc Natl Acad Sci U S A* 107 (2010) 4004-4009.
- [2] L. Mazutis, J.C. Baret, P. Treacy, Y. Skhiri, A.F. Araghi, M. Ryckelynck, V. Taly, A.D. Griffiths, Multi-step microfluidic droplet processing: kinetic analysis of an in vitro translated enzyme, *Lab Chip* 9 (2009) 2902-2908.
- [3] H.N. Joensson, M.L. Samuels, E.R. Brouzes, M. Medkova, M. Uhlen, D.R. Link, H. Andersson-Svahn, Detection and analysis of low-abundance cell-surface biomarkers using enzymatic amplification in microfluidic droplets, *Angew Chem Int Ed Engl* 48 (2009) 2518-2521.
- [4] E. Brouzes, M. Medkova, N. Savenelli, D. Marran, M. Twardowski, J.B. Hutchison, J.M. Rothberg, D.R. Link, N. Perrimon, M.L. Samuels, Droplet microfluidic technology for single-cell high-throughput screening, *Proc Natl Acad Sci U S A* 106 (2009) 14195-14200.
- [5] J. Clausell-Tormos, A.D. Griffiths, C.A. Merten, An automated two-phase microfluidic system for kinetic analyses and the screening of compound libraries, *Lab Chip* 10 (2010) 1302-1307.
- [6] B. Kintses, L.D. van Vliet, S.R. Devenish, F. Hollfelder, Microfluidic droplets: new integrated workflows for biological experiments, *Curr Opin Chem Biol* 14 (2010) 548-555.
- [7] J.C. Baret, O.J. Miller, V. Taly, M. Ryckelynck, A. El-Harrak, L. Frenz, C. Rick, M.L. Samuels, J.B. Hutchison, J.J. Agresti, D.R. Link, D.A. Weitz, A.D. Griffiths, Fluorescence-activated droplet sorting (FADS): efficient microfluidic cell sorting based on enzymatic activity, *Lab Chip* 9 (2009) 1850-1858.
- [8] J.-C. AUGUSTIN, Modélisation de la croissance microbienne et gestion de la sécurité sanitaire des aliments, (2005).
- [9] L.O. Martins, C.M. Soares, M.M. Pereira, M. Teixeira, T. Costa, G.H. Jones, A.O. Henriques, Molecular and biochemical characterization of a highly stable bacterial laccase that occurs as a structural component of the *Bacillus subtilis* endospore coat, *J Biol Chem* 277 (2002) 18849-18859.
- [10] D.C. Duffy, J.C. McDonald, O.J. Schueller, G.M. Whitesides, Rapid Prototyping of Microfluidic Systems in Poly(dimethylsiloxane), *Anal Chem* 70 (1998) 4974-4984.
- [11] M. Zhou, Z. Diwu, N. Panchuk-Voloshina, R.P. Haugland, A stable nonfluorescent derivative of resorufin for the fluorometric determination of trace hydrogen peroxide: applications in detecting the activity of phagocyte NADPH oxidase and other oxidases, *Anal Biochem* 253 (1997) 162-168.
- [12] M.M. Kiss, L. Ortoleva-Donnelly, N.R. Beer, J. Warner, C.G. Bailey, B.W. Colston, J.M. Rothberg, D.R. Link, J.H. Leamon, High-throughput quantitative polymerase chain reaction in picoliter droplets, *Anal Chem* 80 (2008) 8975-8981.
- [13] L. Mazutis, A.F. Araghi, O.J. Miller, J.C. Baret, L. Frenz, A. Janoshazi, V. Taly, B.J. Miller, J.B. Hutchison, D. Link, A.D. Griffiths, M. Ryckelynck, Droplet-based microfluidic systems for high-throughput single DNA molecule isothermal amplification and analysis, *Anal Chem* 81 (2009) 4813-4821.
- [14] Y. Schaerli, R.C. Wootton, T. Robinson, V. Stein, C. Dunsby, M.A. Neil, P.M. French, A.J. Demello, C. Abell, F. Hollfelder, Continuous-flow polymerase chain reaction of single-copy DNA in microfluidic microdroplets, *Anal Chem* 81 (2009) 302-306.
- [15] N.R. Beer, B.J. Hindson, E.K. Wheeler, S.B. Hall, K.A. Rose, I.M. Kennedy, B.W. Colston, On-chip, real-time, single-copy polymerase chain reaction in picoliter droplets, *Anal Chem* 79 (2007) 8471-8475.
- [16] D. Pekin, Y. Skhiri, J.C. Baret, D. Le Corre, L. Mazutis, C. Ben Salem, F. Millot, A. El Harrak, J.B. Hutchison, J.W. Larson, D.R. Link, P. Laurent-Puig, A.D. Griffiths, V. Taly,

Quantitative and sensitive detection of rare mutations using droplet-based microfluidics, *Lab Chip* 11 (2011) 2156-2166.

- [17] A.R. Abate, T. Hung, P. Mary, J.J. Agresti, D.A. Weitz, High-throughput injection with microfluidics using picoinjectors, *Proc Natl Acad Sci U S A* 107 (2010) 19163-19166.
- [18] E.M. Czekanska, Assessment of cell proliferation with resazurin-based fluorescent dye, *Methods Mol Biol* 740 (2011) 27-32.
- [19] E. Mastrobattista, V. Taly, E. Chanudet, P. Treacy, B.T. Kelly, A.D. Griffiths, High-throughput screening of enzyme libraries: in vitro evolution of a beta-galactosidase by fluorescence-activated sorting of double emulsions, *Chem Biol* 12 (2005) 1291-1300.
- [20] L. Granieri, J.C. Baret, A.D. Griffiths, C.A. Merten, High-throughput screening of enzymes by retroviral display using droplet-based microfluidics, *Chem Biol* 17 (2010) 229-235.

V. Conclusion générale

Au cours de ce travail de thèse, nous avons essayé de développer les outils nécessaires pour créer, par évolution dirigée, des enzymes spécialement adaptées à fonctionner dans ce nouvel environnement que constitue la biopile à éthanol que nous voulons réaliser. Nous avons choisi, pour le compartiment anodique, différentes alcool déshydrogénases à PQQ réalisant l'oxydation de l'éthanol en acide acétique et pour le compartiment cathodique, une laccase bactérienne extrémophile capable de réduire le dioxygène en eau.

Pour la sélection de ces enzymes, le système de compartimentation *in vitro* (goutte d'eau-dans-l'huile), développé au sein de notre laboratoire, couplé au système microfluidique a été choisi. Pour cela, nous avons mis au point deux types de plateformes microfluidiques, l'un permettant de sélectionner des enzymes exprimées *in vitro* en gouttes et l'autre de sélectionner des enzymes exprimées dans des bactéries au sein des gouttes. Pour pouvoir détecter les enzymes cathodiques et anodiques en goutte, nous avons développé deux tests fluorogéniques, basés directement, sur le combustible ou l'oxydant utilisé dans la biopile.

Dans la première partie de ce travail, nous nous sommes intéressés à deux types d'enzymes anodiques PQQ-ADH, une de type I dimérique et nécessitant de l'éthylamine pour être activée et l'autre de type II monomérique contenant un cytochrome *c* en plus de son cofacteur (PQQ) (ne nécessite pas d'éthylamine pour son activation). Les difficultés que nous avons rencontrées pour l'expression *in vitro* et *in vivo* de l'enzyme de type II, nous ont amenés à lui enlever son cytochrome *c*. Les caractérisations de cette nouvelle enzyme et de l'enzyme de type I, en gouttes et en microplaque, ont révélé que la première était plus active que la seconde. Par conséquent, nous avons conclu que l'enzyme de type II sans cytochrome *c* était la meilleure candidate pour être évoluée, en utilisant le système microfluidique en gouttes, à fonctionner dans les conditions de la biopile.

Dans la deuxième partie de cette thèse, nous avons étudié le phénomène d'échange de composés entre les gouttes. En testant un mélange de gouttes contenant des alcools déshydrogénases actives ou inactives en présence du test fluorogénique adéquat développé, nous étions incapables de les distinguer. Ce phénomène nous a incités à étudier la fuite de deux composés du test fluorogénique, la résorufine et le PMS (sous sa forme réduite), dont la

fuite serait problématique pour la sélection en gouttes. Après avoir mis en évidence la fuite de ces deux composés, différentes stratégies ont été adoptées et testées pour diminuer ce dernier. Après plusieurs tentatives non fructueuses, la fuite de la résorufine a été diminuée en utilisant une huile partiellement fluorocarbonée avec un tensioactif avec tête contenant un groupement Jeffamine. Quant au PMS, pour réduire son échange entre les gouttes, nous avons été amenés à diminuer son hydrophobicité par modification de sa structure chimique.

Finalement, nous avons testé les deux plateformes microfluidiques développées pour la sélection des biocatalyseurs. Nous avons démontré que l'expression de la laccase et de l'alcool déshydrogénase *in vitro* se faisait en gouttes mais nécessitait au départ l'encapsulation de plus qu'un gène par goutte (≥ 1000 gènes/goutte). Ce pendant, une des conditions du processus d'évolution des enzymes est d'avoir un seul variant génétique par goutte. Une étape supplémentaire d'amplification d'ADN en goutte devrait se rajouter à cette plateforme pour qu'elle puisse être un système de sélection dans l'évolution dirigée des enzymes. Pour passer outre ce problème et ce besoin d'amplification de gène, la plateforme de sélection d'enzymes exprimées dans des bactéries en gouttes serait une alternative plus simple. Des travaux préliminaires, démontrant l'efficacité et la faisabilité de la sélection de la laccase *in vivo* en gouttes, ont permis au doctorant T. Beneyton d'optimiser cette plateforme et de la valider avec une sélection modèle (en utilisant une laccase active et une inactive) et éventuellement la sélection d'une banque de variants. Les études effectuées sur l'alcool déshydrogénase ont démontré qu'il nous était impossible de valider la plateforme avec une sélection modèle utilisant des bactéries transformées avec un plasmide portant le gène codant pour l'enzyme active ou des bactéries transformées avec un plasmide portant le gène codant pour l'enzyme inactive. Nous avons cependant démontré qu'une alternative à ce phénomène inexplicé serait de valider la plateforme en utilisant comme négatif pour la sélection modèle un plasmide vide ne portant aucun gène. Une fois la plateforme validée avec cette stratégie, nous réaliserons la sélection d'une banque de mutants créée par mutagenèse aléatoire.

Plateforme microfluidique d'optimisation de biocatalyseurs pour des biopiles à combustible

Pour faire face à la baisse considérable des énergies fossiles et des ressources naturelles, différents types de biopiles à combustible ont été développés et optimisés. Ces systèmes sont capables de convertir l'énergie chimique en énergie électrique à partir de ressources renouvelables grâce à des catalyseurs biologiques. Les deux problèmes majeurs des biopiles sont les faibles puissances qu'elles génèrent et leur courte durée de vie. Afin de résoudre ces problèmes et augmenter les performances des biopiles, la plupart des travaux de recherche se sont principalement axés sur le développement de nouvelles stratégies pour améliorer le transfert d'électrons ainsi que sur l'optimisation des méthodes d'immobilisation des enzymes sur les électrodes. Nous pensons que l'évolution dirigée des biocatalyseurs par des cycles répétitifs de mutagenèse/sélection permettrait d'augmenter leur activité dans ce nouvel environnement que constitue la biopile. Pour la création de la banque de variants, la stratégie choisie est l'introduction de mutations artificielles et aléatoires dans le gène codant pour la protéine d'intérêt. Pour la sélection des enzymes optimisées, nous avons choisi la technique de la compartimentation *in vitro* (IVC) couplée à la microfluidique, développée au sein de notre laboratoire. Cette méthode permet de créer des gouttes d'eau-dans-huile de taille homogène, de les manipuler à volonté, de détecter la fluorescence de leur contenu et de les trier en se basant sur cette fluorescence afin de récupérer le variant désiré. Mon projet de thèse consiste à créer, par évolution dirigée, des biocatalyseurs spécialement adaptés à fonctionner dans les conditions de fonctionnement de biopile. Pour le compartiment anodique, nous avons choisi de tester et d'optimiser différentes Pyrrolo-Quinone-Quinone-alcool déshydrogénases (PQQ-ADH) réalisant l'oxydation de l'éthanol en acide acétique. Une fois les électrons transférés au compartiment cathodique, une laccase bactérienne extrémophile se charge de la réduction du dioxygène en eau. Le passage des électrons vers la cathode génère un courant proportionnel aux taux de catalyse au niveau des électrodes. Pour la mesure de l'activité de ces enzymes cathodique et anodique en goutte, deux tests fluorogéniques différents ont été développés. Pour les PQQ-ADH, le test s'est basé sur la réduction d'une molécule fluorogénique (la résazurine) pour produire un fluorophore (la résorufine) une fois que l'éthanol est oxydé en acide acétique par les enzymes. Par la suite, nous avons développé et optimisé deux plateformes microfluidiques de sélection des biocatalyseurs anodique et cathodique. L'une permet de sélectionner les enzymes exprimées *in vitro* en gouttes et l'autre de sélectionner les enzymes exprimées *in vivo* en gouttes. Mes travaux de thèse se sont focalisés, essentiellement sur le développement de la plateforme microfluidique de sélection des PQQ-ADH exprimée *in vivo* et plus précisément sur le contrôle des échanges de composés entre les gouttes, le choix du tensioactif adapté au test, la stratégie de récupération des variants sélectionnés et la validation de sa pertinence avec une sélection modèle utilisant les PQQ-ADH.

Droplet based microfluidic for the optimization of biocatalysts for their use in biofuel cells

To cope with the dramatic decline of fossil fuels and natural resources, different types of biofuel cell have been developed and optimized. These systems are capable of converting chemical energy into electrical energy from renewable resources by biological catalysts. The two major problems which limit their application are the small amount of power they generate and their short-lived. Our goal is to build a functional biofuel cell using enzymes as redox catalysts at the anode (Pyrrolo-Quinone-Quinone-alcohol dehydrogenases, PQQ-ADH) and the cathode (laccase). To achieve this goal the key points are a high catalytic activity of these enzymes at high ethanol concentrations, broad pH and temperature variations and their stability at the interface with the electrodes. These are conditions under which the natural enzyme will never evolve *in vivo*. Hence, we are aiming to apply *in vitro* protein evolution methods in combination with digital microfluidics to create better catalysts for the "green energy" production. Digital microfluidics is a novel and promising high-throughput screening technique which can emulsify samples in droplets of a volume as small as ~1pL. These tiny droplets can mimic artificial cells allowing expressing the genes of interest and test for their enzymatic activity. Even more important, digital microfluidics allows droplets fusion, content mixing, incubations, signal detection and sorting of positives variants separately. In addition, with being a very powerful high-throughput technique, our approach will procure an unprecedented level of control over the directed evolution experiments. For a successful evolution of ADH and laccase using digital microfluidics, the following challenges need to be addressed (before performing directed evolution of the catalysts): 1. Synthesis and detailed characterisation of surfactants used in digital microfluidic experiments (*emulsion stability, leakage and biological compatibility*). 2. Creation of a reliable microfluidic chip allowing to detect and sort the droplets containing highly active biocatalysts. 3. Controlling the leakage of compounds between droplets. 4. Optimisation of the recovery strategy selected variants and validate its relevance with a model selection of PQQ-ADH.