



HAL
open science

Fonctionalisation redox et enzymatique de particules virales icosahédriques par des nanocorps, pour une bioélectrocatalyse exaltée

Racha Kassem

► To cite this version:

Racha Kassem. Fonctionalisation redox et enzymatique de particules virales icosahédriques par des nanocorps, pour une bioélectrocatalyse exaltée. Chimie-Physique [physics.chem-ph]. Université Paris Cité, 2023. Français. <NNT : 2023UNIP7188>. <tel-04654322>

HAL Id: tel-04654322

<https://theses.hal.science/tel-04654322v1>

Submitted on 19 Jul 2024

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

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



HAL Authorization

Université Paris Cité

**Ecole Doctorale de Chimie Physique et Chimie Analytique de Paris-Centre
(ED 388)**

Laboratoire d'Electrochimie Moléculaire

***Fonctionnalisation redox et enzymatique de
particules virales icosaédriques par des
nanocorps, pour une bioélectrocatalyse
exaltée***

Racha Kassem

Thèse de doctorat d'Electrochimie Moléculaire et Biologique

Dirigée par Christophe Demaille

Présentée et soutenue publiquement le 11 juillet 2023 devant un jury composé de :

Christophe Demaille	DR, CNRS	Université de Paris	Directeur de thèse
Elisabeth Lojou	DR, CNRS	Université de Marseille	Rapportrice
Christine Mousty	DR, CNRS	Université Clermont Auvergne	Rapportrice
Stéphane Arbault	DR, CNRS	Université de Bordeaux	Examineur
Laure Beven	Professeur des universités	Université de Bordeaux	Examinatrice
Thierry Michon	DR, CNRS	Université de Bordeaux	Membre invité
Christophe Ritzenthaler	DR, INRAE	Université de Strasbourg	Membre invité

Titre :

Fonctionnalisation redox et enzymatique de particules virales icosaédriques par des nanocorps, pour une bioélectrocatalyse exaltée.

Résumé :

L'objectif de cette thèse est l'étude de l'activité catalytique d'un système électro-enzymatique organisé sur des particules virales adsorbées en un réseau aléatoire sur surfaces d'électrodes. Dans le cadre de ce travail, les particules virales utilisées comme nano-gabarits ont été, pour la première fois, des particules de géométrie icosaédrique (quasi-sphérique) de ~30 nm de diamètre, celles du virus du court-noué de la vigne (Grapevine Fan Leaf Virus, GFLV). L'enzyme redox quinoprotéine glucose déshydrogénase (PQQ-GDH) et son médiateur redox ferrocène (Fc), porté par des chaînes polyéthylène glycol flexibles (PEG), ont été co-immobilisés sur les particules virales adsorbées, grâce à une stratégie d'assemblage immunologique, afin de former un nanosystème électro-enzymatique intégré oxydant le glucose. Le schéma de montage original mis au point fait appel à des nanocorps, qui présentent les mêmes propriétés de reconnaissance moléculaire que les anticorps, mais qui sont bien plus petits (5 nm contre 15 nm de diamètre). Plusieurs types de nanocorps, reconnaissant des sites distincts du GFLV, ont été conjugués à l'enzyme ou au médiateur Fc-PEG et utilisés comme autant de briques macromoléculaires régio-spécifiques pour l'assemblage sur virus. L'activité catalytique du système intégré a été étudiée à l'échelle d'ensemble par voltamétrie cyclique.

La caractérisation cinétique complète du fonctionnement enzymatique de particules virales, initialement décorées uniquement par les enzymes PQQ-GDH (en présence d'un cosubstrat redox soluble en solution), a montré que la simple immobilisation de l'enzyme sur la capsid du GFLV n'a aucun effet sur le schéma cinétique de l'enzyme, ni sur son activité catalytique. Ainsi, contrairement à ce qui est parfois rapporté pour d'autres nano-bio-échafaudages nanométriques (p.ex. des origamis d'ADN), la petite taille et la forte charge électrique des nano-échafaudages viraux ne modulent pas universellement l'activité des enzymes redox, et certainement pas celle de la PQQ-GDH.

La co-immobilisation de l'enzyme et de son cosubstrat (chaînes Fc-PEG) sur les échafaudages viraux, nous a ensuite permis d'étudier spécifiquement l'effet cinétique du confinement du cosubstrat à surface du GFLV sur l'activité de la PQQ-GDH. Nous avons constaté que la co-immobilisation induisait une exaltation enzymatique, en favorisant la coopérativité entre les deux sous-unités de l'enzyme homodimérique, via la "synchronisation"

de leur état redox. Une diminution de l'inhibition de l'enzyme par son substrat (glucose) a également été observé.

Mots clefs :

Voltammétrie cyclique, exaltation de la bioélectrocatalyse, nanogabarits viraux, nanocorps, cinétique enzymatique.

Title:

Nanobody-mediated redox and enzymatic functionalization of icosahedral viral particles for enhanced bio-electrocatalysis

Abstract:

The aim of this work is to study the catalytic activity of an electroenzymatic system organized on viral particles adsorbed in a random array on electrode surfaces. Herein, the viral particles used as nano-scaffolds were, for the first time, particles of icosahedral geometry (quasi-spherical) with a diameter of ~30 nm, those of Grapevine Fan Leaf Virus (GFLV). The redox enzyme quinoprotein glucose dehydrogenase (PQQ-GDH) and its redox mediator ferrocene (Fc), carried by flexible polyethylene glycol (PEG) chains, were co-immobilized on the adsorbed virus particles through an immunological assembly strategy to form an integrated electroenzymatic glucose-oxidizing nanosystem. The originally developed assembly scheme uses nanobodies, which have the same molecular recognition properties as antibodies, but are much smaller (5 nm vs. 15 nm in diameter). Several types of nanobodies recognizing different sites on GFLV were conjugated to the enzyme or to the Fc-PEG mediator and used as region-specific macromolecular building blocks for their assembly on the virus. The catalytic activity of the integrated system was studied at the ensemble scale by cyclic voltammetry.

A complete kinetic characterization of the enzymatic function of viral particles initially decorated only with PQQ-GDH enzymes (in the presence of a soluble redox cosubstrate) showed that simple immobilization of the enzyme on the GFLV capsid has no effect on the kinetic scheme of the enzyme, nor on its catalytic activity. Thus, contrary to what is sometimes reported for other nanoscaffolds (e.g., DNA origami), the small size and high electrical charge of viral nanoscaffolds do not universally modulate the activity of redox enzymes, and certainly not that of PQQ-GDH.

Co-immobilization of the enzyme and its cosubstrate (Fc-PEG chains) on the viral scaffolds then allowed us to specifically study the kinetic effect of cosubstrate confinement to the GFLV surface on PQQ-GDH activity. We found that co-immobilization induced enzymatic exaltation by promoting cooperativity between the two subunits of the homodimeric enzyme via "synchronization" of their redox state. A decrease in inhibition of the enzyme by its substrate (glucose) was also observed.

Keywords:

Cyclic voltammetry, nanoparticle-enhanced bioelectrocatalysis, viral nanoscaffolds, nanobodies, enzyme kinetics.

Table de matières

Chapitre I.....	9
1. Problématique et contexte bibliographique.....	9
2. Résultats antérieurs de l'équipe servant de fondations au présent travail.....	13
2.1. Explorer le fonctionnement catalytique de systèmes enzymatiques redox confinés sur nanoparticules virales.....	13
2.2. Assembler un système enzymatique redox intégré sur particules de bactériophage fd.....	14
2.3. Fonctionnement catalytique du système intégré sur particule virale : Etude à l'échelle d'ensemble par voltammétrie cyclique.....	14
2.4. Fonctionnement catalytique du système intégré sur particule virale : Etude à l'échelle de la particule virale individuelle par microscopie Mt/AFM-SECM.....	14
2.5. Fonctionnement catalytique du système intégré à l'échelle de quelques molécules d'enzymes par microscopie Mt/AFM-SECM.....	15
3. Objectifs de mon travail de thèse.....	15
Bibliographie.....	18
Chapitre II.....	25
1. Les composants moléculaires du système.....	25
1.1. Le virus GFLV : généralités, structure.....	25
1.2. Des anticorps aux nanocorps.....	27
1.3. L'enzyme glucose déshydrogénase PQQ-GDH.....	29
2. Le nanocorps à fonction enzymatique : préparation et caractérisation.....	32
2.1. Production de la protéine de fusion GDH-Nb ₇₅	33
2.2. Incorporation de la PQQ.....	36
2.3. Mesure de l'activité de la GDH-Nb ₇₅ reconstituée.....	38
3. Le nanocorps redox : préparation et caractérisation.....	40
3.1. Détermination du degré de marquage du Fc-PEG-Nb ₅₉ -GFP.....	43
Conclusion.....	46
Bibliographie.....	47
Chapitre III.....	52
1. Immobilisation du support viral sur surfaces d'or.....	52
1.1. Organisation et comptage des virus adsorbés par AFM.....	53
1.2. Imagerie AFM des GFLV adsorbés.....	54
1.3. Protection de la surface d'or par des agents bloquants de l'adsorption non spécifique des nanocorps.....	60
2. Immobilisation des enzymes PQQ-GDH sur particules virales.....	62
2.1. Caractérisation du marquage enzymatique des particules de GFLV.....	62
2.2. Quantification du nombre de PQQ-GDH décorant les particules de GFLV.....	65

Conclusion.....	67
Bibliographie.....	68
Chapitre IV.....	70
1. Analyse du fonctionnement cinétique de la glucose déshydrogénase immobilisée sur particule virale de GFLV.....	71
1.1. Analyse du potentiel à mi-hauteur des CVs catalytiques	74
1.2. Analyse du signal catalytique dans son intégralité.....	77
Conclusion.....	81
Bibliographie.....	82
Chapitre V.....	83
1. Remplacement du cosubstrat redox soluble de l'enzyme par un cosubstrat Fc-PEG confiné à la capsid du GFLV.....	84
1.1. Stratégie d'immobilisation des chaînes redox Fc-PEG sur les particules virales de GFLV... 84	
1.2. Assemblage du système intégré Fc-PEG/PQQ-GDH sur particules virales de GFLV.....	84
1.3. Quantification du nombre de chaînes Fc-PEG décorant les particules virales de GFLV.....	85
2. Activité catalytique du système intégré Fc-PEG/PQQ-GDH sur particules virales de GFLV.....	87
2.1. Caractérisation cinétique du système intégré Fc-PEG/PQQ-GDH sur GFLV	88
Conclusion.....	95
Bibliographie.....	96
Chapitre VI.....	97
Partie Expérimentale	100

Chapitre I

Introduction

1. Problématique et contexte bibliographique

Dans les cellules vivantes, de nombreuses enzymes impliquées dans les voies métaboliques sont organisées en complexes enzymatiques supramoléculaires ordonnés, organisés sur des protéines échafaudages.¹ Cette organisation à l'échelle nanométrique confère aux voies synthétiques biologiques une efficacité et une spécificité inégalées. Il est donc très tentant d'essayer de reproduire cette organisation enzymatique naturelle pour concevoir des bioréacteurs permettant la synthèse de métabolites d'importance industrielle ou médicale, mais aussi pour améliorer la sensibilité des capteurs enzymatiques.²⁻⁴ En parallèle, des études fondamentales sont également nécessaires pour essayer de comprendre comment l'organisation spatiale module l'efficacité catalytique des systèmes enzymatiques naturels échafaudés. Pour atteindre cet objectif, des systèmes enzymatiques nanométriques modèles ont été conçus et leur comportement fonctionnel a été étudié.²⁻⁴ Dans ces systèmes, les enzymes sont généralement assemblées à la surface ou à l'intérieur de supports de taille nanométriques, appelés nanosupports (« nanocarriers ») enzymatiques,⁵ qui peuvent être par exemple des nanoparticules inorganiques, des liposomes, des polymèresomes ou des origamis d'ADN.⁶ L'immobilisation conjointe de plusieurs enzymes différentes sur un seul nanosupport pour reconstituer des cascades enzymatiques est d'un intérêt particulier. Dans cette configuration, plusieurs enzymes peuvent catalyser une série de réactions en cascade. Cette organisation séquentielle est supposée être un facteur clé de l'efficacité des nano-systèmes enzymatiques naturels.⁷⁻¹¹ Plusieurs cascades enzymatiques artificielles ont été assemblées sur différents

supports et une amélioration (exaltation) de la catalyse a effectivement été observée dans certains cas.^{12,13} Cette exaltation a été initialement attribuée à un échange plus efficace des métabolites entre les enzymes de la cascade (phénomène dit de « canalisation des métabolites »).^{7,14} Cependant, il a été montré que, de manière surprenante, l'exaltation catalytique était observée même pour des systèmes enzymatiques n'impliquant *qu'un seul type d'enzyme* (et non pas une cascade).^{15,16} Cet effet a été rapporté pour de nombreux types d'enzymes,^{17,18} comprenant des hydrolases,^{19,20} des protéases^{21,22} et des oxydoréductases,^{23,24} immobilisées sur différentes particules de taille nanométrique, allant des nanoparticules d'or aux nanotubes de carbone, aux nanofeuilles de graphène et aux nanostructures d'ADN.¹⁷ Il en a été déduit que c'était en réalité l'exaltation catalytique *des enzymes individuelles* des cascades, plutôt que la canalisation des métabolites, qui expliquait les performances accrues des systèmes multienzymatiques nano-échafaudés.²⁴⁻²⁶ Ainsi, plutôt que l'organisation nanométrique en elle-même, c'est le microenvironnement local créé par la particule-support qui induit l'exaltation enzymatique.²⁶⁻²⁹

Deux mécanismes principaux ont jusqu'à présent été proposés pour expliquer, au moins en partie, cet effet du microenvironnement. Le premier est lié à la charge électrique importante des nano-supports. Il a été prouvé, par exemple, que la surface fortement chargée négativement des échafaudages d'ADN peut rendre le pH local plus acide que celui de la solution, le rapprochant ainsi du pH optimal des enzymes attachées.^{26,30} L'altération de l'environnement ionique local peut également affecter la spécificité enzymatique envers les substrats chargés,³¹ ou moduler la cinétique par un effet de la force ionique locale.^{28,29}

Le deuxième mécanisme proposé repose sur l'établissement d'interactions transitoires entre les molécules de substrat enzymatique et l'échafaudage, tel qu'initialement identifié pour des enzymes immobilisés sur des échafaudages d'ADN, ou simplement décorées par des brins d'ADN.³²⁻³⁴ Dans ces cas, il a été démontré que les interactions ADN-substrat conduisent à une augmentation de l'affinité apparente des enzymes pour leur substrat, due à une concentration de substrat plus élevée au voisinage des enzymes. De même, l'interaction d'inhibiteurs enzymatiques avec l'ADN peut entraîner une plus forte inhibition de l'enzyme.³³

Dans l'ensemble, bien que les mécanismes responsables de l'amélioration catalytique induite par les nano-échafaudages n'aient pas tous été identifiés, le rôle joué par l'échafaudage lui-même semble décisif et nécessite une étude approfondie.³⁵

Les particules virales, qui, comme l'ADN, présentent une densité de charge électrique très élevée, sont donc particulièrement intéressantes en tant que nano-échafaudages potentiellement capables de conduire à une exaltation enzymatique.³⁶⁻⁴⁴ Elles ont à ce titre été utilisées comme nanoporteurs enzymatiques, pour étudier les effets de l'échafaudage sur l'activité enzymatique. Les virus ont en outre l'intérêt d'être des particules monodispersées, d'une taille allant du nanomètre au micromètres, offrant une grande diversité de forme et une architecture hautement ordonnée permettant un assemblage spatialement contrôlé de biomolécules. Dans la littérature, on trouve de nombreuses publications où l'activité catalytique de divers types de systèmes enzymatiques supportés par des virus a été évaluée, les molécules enzymatiques étant soit attachées à la surface du virus,^{38,41,44} soit encapsulées à l'intérieur.^{37,39,40,42,43,45} Malgré toutes ces études, aucun consensus ne se dégage quant aux effets sur la catalyse de l'immobilisation des enzymes sur particules virales, car les résultats diffèrent en fonction du système considéré.³⁶ Dans de nombreux cas, les enzymes portées par les particules virales ont présenté la même activité que lorsqu'elles étaient dispersées librement dans la solution.^{37,38,41-44} Dans d'autres cas, l'activité des enzymes liées aux virus s'est trouvée soit améliorée,⁴⁰ soit inhibée.^{39,45} L'interprétation de ces variations est assez complexe car de nombreux facteurs, tels que le transport de masse du substrat vers/dans le nanosupport enzymatique ou l'encombrement macromoléculaire, peuvent simultanément moduler la vitesse de réaction globale. La question de savoir si la cinétique de Michaelis-Menten peut être appliquée pour analyser le comportement des systèmes enzymatiques à base de virus a même été soulevée.³⁶ C'est dire si des travaux fondamentaux sur le fonctionnement catalytique de nanosystèmes enzymatiques échafaudés sont encore nécessaires.

D'un point de vue plus appliqué, la possibilité d'améliorer l'activité catalytique des enzymes *oxydant le glucose*, immobilisées sur des électrodes est d'un intérêt tout particulier en bioélectrochimie. Dans ce domaine le but est de concevoir des biocapteurs électrochimiques plus sensibles, des anodes de piles à combustible biologiques et des bioréacteurs plus efficaces.^{46,47} Pour ces applications importantes, la glucose oxydase (GOx) et la glucose déshydrogénase dépendante de la pyrroloquinoline quinone (PQQ-GDH), beaucoup plus active que la GOx et insensible à l'oxygène, sont les enzymes les plus largement utilisées. Une façon prometteuse d'améliorer leur activité bioélectrocatalytique est de les immobiliser sur des surfaces d'électrodes nanostructurées.⁴⁸⁻⁵² On s'attend à ce que la maîtrise de l'architecture de la surface à l'échelle nanométrique fournisse un environnement plus favorable à l'enzyme, évitant ainsi sa dénaturation induite par l'immobilisation. De plus, cela peut également

améliorer la communication électrique entre les enzymes redox et l'électrode, notamment dans le cas où l'enzyme peut transférer directement d'électrons avec le matériau de l'électrode (cas dit « Direct Electron transfert » ou DET).^{51,52} De même, pour les systèmes dits *intégrés*,⁵³ où l'enzyme et son médiateur redox sont co-immobilisés sur la surface de l'électrode, la nanostructuration peut améliorer la vitesse à laquelle le médiateur transporte les électrons de l'électrode vers l'enzyme.

À la recherche de nanostructures offrant un microenvironnement favorable aux enzymes, des systèmes intégrés basés sur l'ADN ont notamment été développés.⁵⁴⁻⁵⁶ Des hydrogels d'ADN incorporant l'enzyme GOx et un médiateur ferrocène ont notamment été décrits.⁵⁴ Des brins d'ADN ont également été utilisés comme échafaudages biologiques pour assembler GOx et ferrocène.^{55,56}

Bien que les travaux ci-dessus aient rapporté des résultats précieux, de nouvelles stratégies de nanostructuration ou d'échafaudage doivent être conçues pour améliorer encore les performances catalytiques des électrodes enzymatiques intégrées. Il suffit pour s'en convaincre de constater que, pour presque tous les systèmes intégrés rapportés dans la littérature, le turnover enzymatique apparent, c'est-à-dire le courant généré par molécule d'enzyme, est inférieur au turnover des enzymes natives en solution. Cela peut résulter du transport d'électrons entre les relais redox qui est limitant, ou de l'inactivation partielle de l'enzyme.

Dans ce contexte, la possibilité d'utiliser des particules virales comme nanopORTEURS d'enzymes pour améliorer la réponse catalytique *des systèmes enzymatiques supportés par des électrodes* est à la fois pertinente et peu explorée. Dans des travaux pionniers, Wege et al. ont rapporté que l'adsorption de virus en bâtonnet de la mosaïque du tabac, fonctionnalisés avec la GOx, sur une électrode n'améliorait pas réellement la catalyse médiée par l'O₂, mais améliorait considérablement la quantité d'enzyme immobilisée et la réutilisabilité du capteur.^{10,57,58} La conception d'une bioanode portant un maillage aléatoire de particules de bactériophages M13 décorées avec la GOx a également été rapportée, mais dans ce cas, les particules virales étaient "minéralisées" en étant revêtues d'or afin de favoriser le transfert d'électrons directs (DET).⁴⁴

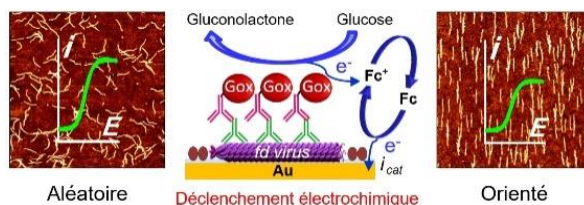
C'est dans ce cadre que l'équipe Bionano du LEM, en étroite collaboration avec l'équipe de virologistes des plantes de Thierry Michon (Equipe Biologie du Fruit et Pathologie (BFP), INRAe Bordeaux), a développé une thématique originale visant à l'exploration électrochimique multi-échelle du fonctionnement catalytique de systèmes électro-enzymatiques confinés sur nanoparticules virales.⁵⁹⁻⁶¹

La présente thèse s'inscrit dans cette thématique. Afin d'en expliciter la pertinence propre, il est tout d'abord nécessaire de présenter quelques résultats clés des travaux de l'équipe obtenus précédemment.

2. Résultats antérieurs de l'équipe servant de fondations au présent travail

2.1. Explorer le fonctionnement catalytique de systèmes enzymatiques redox confinés sur nanoparticules virales.

L'équipe a commencé par concevoir un nano-système enzymatique modèle, constitué de l'enzyme glucose oxydase confinée à la surface de particules virales de bactériophage *fd* (virions flexueux de 900 nm de longueur pour 6 nm de diamètre), fournies par le Dr. Eric Grelet du CRPP à Bordeaux.⁵⁹ Les particules virales (virions) ont été adsorbées sur électrode d'or, puis décorées par l'enzyme par réaction immunologique, en utilisant un anticorps



(IgG) primaire dirigé contre la coque protéique (capside) du virus et un IgG secondaire conjugué à l'enzyme, pour former ainsi un nanoréseau aléatoire de particules virales à enzymes. La mise au point d'un procédé de peignage moléculaire a également rendu possible la formation de réseaux de particules virales *orientées*. L'équipe a alors exploré l'influence de l'orientation des particules virales à enzyme sur leurs performances catalytiques. La microscopie AFM *in situ* a été utilisée pour suivre l'édification des nano-systèmes en surface, et la voltammétrie cyclique pour en interroger la réponse catalytique. Cette approche expérimentale originale a permis la caractérisation cinétique complète du fonctionnement des molécules d'enzymes confinées sur nano-gabarit viral. Les résultats obtenus ont montré que le confinement de l'enzyme GOx ne modifie pas son comportement cinétique, mais que l'orientation des particules virales permettait de moduler la réponse des nano-systèmes virus-enzymes, les systèmes à orientation aléatoire se montrant les plus performants. Ces effets restaient toutefois assez faibles en magnitude, se traduisant par une modulation de la constante catalytique de l'enzyme d'un modeste facteur 2.

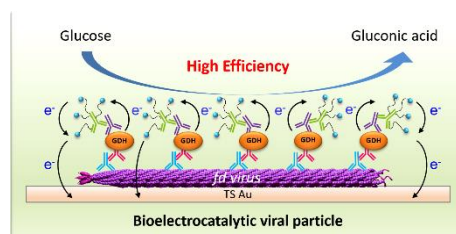
L'équipe a ensuite cherché à assembler un système plus complexe, intégrant fonctions redox et enzymatiques sur un même gabarit viral, c'est à dire un système intégré tel que défini ci-dessus.

2.2. Assembler un système enzymatique redox intégré sur particules de bactériophage fd

L'équipe a créé un système électro-catalytique intégré qui comprend une enzyme redox et son co-substrat sur le même support viral.⁶⁰ Les particules du bactériophage fd ont été décorées par un assemblage immunologique, qui inclut des anticorps conjugués à l'enzyme quinoprotéine glucose déshydrogénase (PQQ-GDH) ainsi que des anticorps redox portant des chaînes PEG terminées par des groupements ferrocène (Fc).

2.3. Fonctionnement catalytique du système intégré sur particule virale : Etude à l'échelle d'ensemble par voltammétrie cyclique.

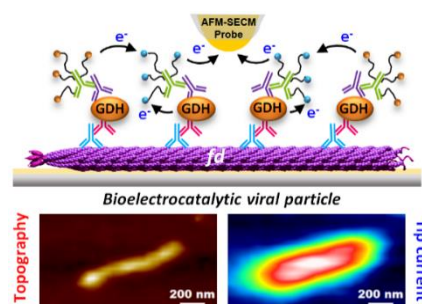
Le fonctionnement catalytique de ce système intégré sur une particule virale a été étudié à l'échelle d'ensemble par voltammétrie cyclique. Les travaux ont montré que les performances catalytiques du système intégré assemblé sur support viral étaient remarquables. Le courant catalytique par molécule d'enzyme, un indicateur de performance trop souvent négligé et pourtant le seul à être pleinement significatif, obtenu pour le système intégré Fc-PEG/PQQ GDH sur gabarit viral, dépasse de loin les valeurs rapportées dans la littérature. Ce résultat



« brut » illustre à lui seul l'intérêt de l'organisation des systèmes enzymatiques sur nano-supports pour une biocatalyse plus efficace.

2.4. Fonctionnement catalytique du système intégré sur particule virale : Etude à l'échelle de la particule virale individuelle par microscopie Mt/AFM-SECM.

L'équipe a alors cherché à caractériser le fonctionnement du système à l'échelle de son constituant élémentaire, celle de la particule virale *individuelle*.⁶¹ Elle a pour cela utilisé une microscopie à médiateur électrochimique lié, couplée à l'AFM, la microscopie Mt/AFM-SECM, qu'elle a inventée. Cette *technique d'imagerie fonctionnelle corrélative* utilise une sonde combinée, capable de détecter des forces locales (comme une sonde AFM classique) et jouant également le rôle de microélectrode, et pouvant donc interroger la surface électrochimiquement. Elle a ici permis l'adressage de particules virales individuelles, c'est à dire la mesure simultanée de leur topographie et de leur activité catalytique (sous la forme d'un courant enzymatique traversant la sonde), représentées sous la forme d'images couplées (ci-contre). Il a été ainsi possible d'étudier la *distribution statistique* de ces paramètres au sein de la population de particules virales catalytiques, mais aussi leurs corrélations croisées. Grâce à

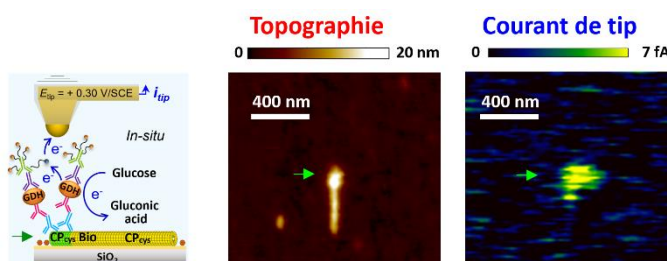


la très haute résolution de la microscopie Mt/AFM-SECM, la répartition de l'activité catalytique le long des particules virales a pu être *cartographiée*. Les images obtenues ont révélé l'occurrence d'un « point-chaud catalytique », totalement inattendu, situé au milieu des particules virales. Il a été montré que ce point-chaud pouvait s'expliquer par la propagation des électrons le long du gabarit viral, associée à leur consommation enzymatique locale. Ce mécanisme de transport de charge, résultant du couplage entre mouvement élastique des têtes ferrocène et échange d'électron isotopique entre sites redox Fc/Fc⁺, a été modélisé comme un processus diffusif 1D global, limité à la longueur de chaque particule. Le modèle de diffusion/réaction confiné sur gabarit viral développé a permis de se rendre compte de l'existence, et de la position, du point-chaud catalytique, mais aussi de relier théoriquement son intensité à l'activité enzymatique. Ainsi a-t-il été possible de quantifier le fonctionnement cinétique de l'enzyme à l'échelle de la particule virale individuelle.

2.5. Fonctionnement catalytique du système intégré à l'échelle de quelques molécules d'enzymes par microscopie Mt/AFM-SECM.

Souhaitant démontrer plus avant sa capacité à sonder le fonctionnement enzymatique à l'échelle nanométrique, l'équipe a entamé une collaboration avec la Dr. Christina Wege, biologiste de l'Université de Stuttgart et spécialiste des applications en nanotechnologie du virus de la mosaïque du Tabac (TMV, virus en bâtonnet de ~ 300 nm de long pour 18 nm de diamètre).⁶¹ Cette équipe maîtrise le processus d'auto-assemblage du virus à partir des protéines de capsid

et a été capable de fabriquer des TMV présentant un domaine terminal immunologiquement distinct du reste de leur coque protéique. Il a ainsi été possible de décorer *sélectivement*



l'extrémité de ces particules virales par le système intégré. L'imagerie Mt/AFM-SECM a alors permis de visualiser le fonctionnement de la dizaine de molécules d'enzymes occupant l'extrémité du virus. Il s'agit d'un record en termes du plus faible nombre de molécules d'enzymes interrogées par une technique d'imagerie électrochimique.

3. Objectifs de mon travail de thèse

Ce travail de thèse correspond en premier lieu à la volonté de l'équipe de franchir un pas de plus vers la maîtrise de l'organisation spatiale et du confinement des composants du système

électrocatalytique intégré sur particules virales. En effet, l'équipe avait jusqu'à présent utilisé comme supports enzymatiques des particules virales de géométrie « linéaire » (flexueux, *fd*, ou en bâtonnet, TMV), d'une taille allant de 300 à 900 nm. Aussi intéressant qu'ils soient, ces supports n'offraient, en pratique, et au mieux que deux sites distincts d'assemblage des constituants du système intégré : la capsid virale et son extrémité. Cela est bien sûr dû à la structure même de ces virus, qui ne sont constitués que de quelques protéines distinctes. Ces protéines peuvent être présentes en de nombreuses copies, telles les protéines de capsid, ou en quelques exemplaires seulement situés à l'extrémité des particules virales. Ainsi pour ces virus, non seulement seuls 2 types de sites sont offerts mais leur abondance diffère grandement. L'équipe a donc recherché de nouvelles particules virales offrant une plus grande diversité de sites d'ancrage. Le Dr. Thierry Michon a alors guidé notre choix vers le virus du court noué, ou GFLV (Grapevine fan leaf virus) un virus de la vigne dont le Dr. Christophe Ritzenthaler, du laboratoire de Biologie Moléculaire des Plantes de Strasbourg (BMP), est spécialiste. Le consortium interdisciplinaire, alliant nanotechnologie virale et électrochimie, formé par les équipes BFP et LEM, s'est donc enrichie de l'équipe BMP à l'occasion de cette thèse.

La structure du virus GFLV sera présentée en détail plus loin, il présente davantage d'exposé de très nombreux sites immunologiquement distincts à sa surface, organisés suivant une topographie 3D parfaitement connue. Sa géométrie icosaédrique (presque sphérique) diffère des supports viraux utilisés précédemment par l'équipe, offrant ainsi un moyen d'étudier l'éventuel effet d'un changement de géométrie du nanosupport sur la catalyse. La particule de GFLV est de surcroît bien plus petite que celles utilisées jusqu'à présent, puisque son diamètre n'est que 30 nm. Il en résulte un plus grand confinement spatial du système enzymatique reconstitué à sa surface, permettant d'étudier la relation entre degré de confinement et activité catalytique.

La stratégie de décoration des particules virales par le système intégré, jusqu'alors basée sur l'emploi d'anticorps (IgG), a dû être repensée pour s'adapter à la taille plus réduite de ce nouveau nanosupport. En effet, les IgG ont un diamètre de l'ordre de 15 nm, ce qui signifie qu'un nombre limité de ces molécules peut décorer des particules de GFLV, à peine plus grandes. Nous avons donc décidé d'utiliser des nanocorps, des molécules biologiques aux propriétés de reconnaissance moléculaire identiques à celles des IgG, mais d'une taille de l'ordre de 5 nm. La structure de ces biomolécules, et leur usage comme « vecteurs de décoration » des GFLV sont détaillés plus loin dans le manuscrit. Signalons néanmoins dès maintenant que le Dr. Ritzenthaler est un pionnier de la production et de la caractérisation de

nanocorps anti-GFLV, et qu'il a pu mettre à notre disposition une collection de nanocorps reconnaissant des épitopes différents, dont l'agencement spatial autour de la capsid est parfaitement connu. Par rapport aux travaux précédents de l'équipe, Il s'agit là d'un apport important en terme de maîtrise potentielle de l'agencement des composants biomoléculaires du système intégré sur un support viral.

Ces travaux de thèse ont bien sûr bénéficié des savoir-faire développés précédemment par l'équipe, en matière d'assemblage immunologique du système intégré sur gabarits viraux adsorbés en surface d'électrode. Mais nous verrons que le changement de géométrie et de taille du virus, ainsi que le passage aux nanocorps a nécessité de reconsidérer certains de ces savoir-faire. Ces aléas nous ont empêché d'aller jusqu'à la caractérisation du fonctionnement du système à l'échelle de la particule unique (par Mt/AFM-SECM), comme nous l'espérions initialement. Nous avons pu néanmoins assembler et caractériser en détails l'activité catalytique du système intégré échafaudé sur particules de GFLV à l'échelle d'ensemble, par voltammétrie cyclique. Cela nous a permis d'explorer les effets cinétiques de l'échafaudage sur particules de GFLV de l'enzyme PQQ-GDH, initialement immobilisée seule, puis comme composante du système intégré complet.

Bibliographie

- (1) Jørgensen, K.; Rasmussen, A. V.; Morant, M.; Nielsen, A. H.; Bjarnholt, N.; Zagrobelny, M.; Bak, S.; Møller, B. L. Metabolon Formation and Metabolic Channeling in the Biosynthesis of Plant Natural Products. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2005**, *8* (3), 280–291. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2005.03.014>.
- (2) Conrado, R. J.; Varner, J. D.; DeLisa, M. P. Engineering the Spatial Organization of Metabolic Enzymes: Mimicking Nature’s Synergy. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2008**, *19* (5), 492–499. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2008.07.006>.
- (3) Tu, Y.; Peng, F.; Adawy, A.; Men, Y.; Abdelmohsen, L. K. E. A.; Wilson, D. A. Mimicking the Cell: Bio-Inspired Functions of Supramolecular Assemblies. *Chem. Rev.* **2016**, *116* (4), 2023–2078. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00344>.
- (4) Chen, R.; Chen, Q.; Kim, H.; Siu, K.-H.; Sun, Q.; Tsai, S.-L.; Chen, W. Biomolecular Scaffolds for Enhanced Signaling and Catalytic Efficiency. *Nanobiotechnology • Syst. Biol.* **2014**, *28* (0), 59–68. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2013.11.007>.
- (5) Cardinale, D.; Michon, T. *Enzyme Nanocarriers*, first.; Cardinale, D., Michon, T., Eds.; Pan Stanford Publishing: Singapore, 2016.
- (6) Cardinale, D.; Carette, N.; Michon, T. Virus Scaffolds as Enzyme Nano-Carriers. *Trends Biotechnol.* **2012**, *30*, 369-376. [https://doi.org/S0167-7799\(12\)00050-9](https://doi.org/S0167-7799(12)00050-9) [pii] 10.1016/j.tibtech.2012.04.001.
- (7) Fu, J.; Liu, M.; Liu, Y.; Woodbury, N. W.; Yan, H. Interenzyme Substrate Diffusion for an Enzyme Cascade Organized on Spatially Addressable DNA Nanostructures. *J Am Chem Soc* **2012**, *134* (12), 5516–5519. <https://doi.org/10.1021/ja300897h>.
- (8) Ngo, T. A.; Nakata, E.; Saimura, M.; Morii, T. Spatially Organized Enzymes Drive Cofactor-Coupled Cascade Reactions. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138* (9), 3012–3021. <https://doi.org/10.1021/jacs.5b10198>.
- (9) Patterson, D. P.; Schwarz, B.; Waters, R. S.; Gedeon, T.; Douglas, T. Encapsulation of an Enzyme Cascade within the Bacteriophage P22 Virus-like Particle. *ACS Chem. Biol.* **2014**, *9*, 359–365. <https://doi.org/10.1021/cb4006529>.

- (10) Koch, C.; Wabbel, K.; Eber, F. J.; Krolla-Sidenstein, P.; Azucena, C.; Gliemann, H.; Eiben, S.; Geiger, F.; Wege, C. Modified TMV Particles as Beneficial Scaffolds to Present Sensor Enzymes. *Front. Plant Sci.* **2015**, *6*, 1137. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01137>.
- (11) Besong-Ndika, J.; Wahlsten, M.; Cardinale, D.; Pille, J.; Walter, J.; Michon, T.; Mäkinen, K. Towards the Reconstitution of a Two-Enzyme Cascade for Resveratrol Synthesis on Potyvirus Particles. *Front. Plant Sci.* **2016**, *7*, 89. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00089>.
- (12) Idan, O.; Hess, H. Origins of Activity Enhancement in Enzyme Cascades on Scaffolds. *ACS Nano* **2013**, *7* (10), 8658--8665. <https://doi.org/10.1021/nn402823k>.
- (13) Lin, J. L.; Palomec, L.; Wheeldon, I. Design and Analysis of Enhanced Catalysis in Scaffolded Multienzyme Cascade Reactions. *ACS Catal.* **2014**, *4* (2), 505–511. <https://doi.org/10.1021/cs401009z>.
- (14) Wheeldon, I.; Minter, S. D.; Banta, S.; Barton, S. C.; Atanassov, P.; Sigman, M. Substrate Channelling as an Approach to Cascade Reactions. *Nat. Chem.* **2016**, *8* (4), 299–309. <https://doi.org/10.1038/nchem.2459>.
- (15) Johnson, B. J.; Russ Algar, W.; Malanoski, A. P.; Ancona, M. G.; Medintz, I. L. Understanding Enzymatic Acceleration at Nanoparticle Interfaces: Approaches and Challenges. *Nano Today* **2014**, No. 1, 102–131. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2014.02.005>.
- (16) Stueker, O.; Ortega, V. A.; Goss, G. G.; Stepanova, M. Understanding Interactions of Functionalized Nanoparticles with Proteins: A Case Study on Lactate Dehydrogenase. *Small* **2014**, *10* (10), 2006–2021. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/smll.201303639>.
- (17) Ding, S.; Cargill, A. A.; Medintz, I. L.; Claussen, J. C. Increasing the Activity of Immobilized Enzymes with Nanoparticle Conjugation. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2015**, *34*, 242–250. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2015.04.005>.
- (18) Ellis, G. A.; Díaz, S. A.; Medintz, I. L. Enhancing Enzymatic Performance with Nanoparticle Immobilization: Improved Analytical and Control Capability for Synthetic Biochemistry. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2021**, *71*, 77–90. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2021.06.021>.

- (19) Breger, J. C.; Ancona, M. G.; Walper, S. A.; Oh, E.; Susumu, K.; Stewart, M. H.; Deschamps, J. R.; Medintz, I. L. Understanding How Nanoparticle Attachment Enhances Phosphotriesterase Kinetic Efficiency. *ACS Nano* **2015**, *9*, 8491–8503. <https://doi.org/10.1021/acsnano.5b03459>.
- (20) Brown III, C. W.; Oh, E.; Hastman, D. A.; Walper, S. A.; Susumu, K.; Stewart, M. H.; Deschamps, J. R.; Medintz, I. L. Kinetic Enhancement of the Diffusion-Limited Enzyme Beta-Galactosidase When Displayed with Quantum Dots. *RSC Adv.* **2015**, *5* (113), 93089–93094. <https://doi.org/10.1039/C5RA21187E>.
- (21) Algar, W. R.; Malonoski, A.; Deschamps, J. R.; Blanco-Canosa, J. B.; Susumu, K.; Stewart, M. H.; Johnson, B. J.; Dawson, P. E.; Medintz, I. L. Proteolytic Activity at Quantum Dot-Conjugates: Kinetic Analysis Reveals Enhanced Enzyme Activity and Localized Interfacial “Hopping.” *Nano Lett.* **2012**, *12* (7), 3793–3802. <https://doi.org/10.1021/nl301727k>.
- (22) Wu, M.; Algar, W. R. Acceleration of Proteolytic Activity Associated with Selection of Thiol Ligand Coatings on Quantum Dots. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2015**, *7* (4), 2535–2545. <https://doi.org/10.1021/am507466b>.
- (23) Vranish, J. N.; Ancona, M. G.; Walper, S. A.; Medintz, I. L. Pursuing the Promise of Enzymatic Enhancement with Nanoparticle Assemblies. *Langmuir* **2018**, *34* (9), 2901–2925. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.7b02588>.
- (24) Zhao, Z.; Fu, J.; Dhakal, S.; Johnson-Buck, A.; Liu, M.; Zhang, T.; Woodbury, N. W.; Liu, Y.; Walter, N. G.; Yan, H. Nanocaged Enzymes with Enhanced Catalytic Activity and Increased Stability against Protease Digestion. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 10619. <https://doi.org/10.1038/ncomms10619>.
- (25) Klein, W. P.; Thomsen, R. P.; Turner, K. B.; Walper, S. A.; Vranish, J.; Kjems, J.; Ancona, M. G.; Medintz, I. L. Enhanced Catalysis from Multienzyme Cascades Assembled on a DNA Origami Triangle. *ACS Nano* **2019**, *13* (12), 13677–13689. <https://doi.org/10.1021/acsnano.9b05746>.
- (26) Zhang, Y.; Tsitkov, S.; Hess, H. Proximity Does Not Contribute to Activity Enhancement in the Glucose Oxidase-Horseradish Peroxidase Cascade. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 13982. <https://doi.org/10.1038/ncomms13982>.
- (27) Xiong, Y.; Huang, J.; Wang, S. T.; Zafar, S.; Gang, O. Local Environment Affects the

- Activity of Enzymes on a 3D Molecular Scaffold. *ACS Nano* **2020**, *14* (11), 14646–14654. <https://doi.org/10.1021/acsnano.0c03962>.
- (28) Lancaster, L.; Abdallah, W.; Banta, S.; Wheeldon, I. Engineering Enzyme Microenvironments for Enhanced Biocatalysis. *Chem. Soc. Rev.* **2018**, *47* (14), 5177–5186. <https://doi.org/10.1039/c8cs00085a>.
- (29) Abdallah, W.; Hong, X.; Banta, S.; Wheeldon, I. Microenvironmental Effects Can Masquerade as Substrate Channelling in Cascade Biocatalysis. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2022**, *73*, 233–239. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2021.08.014>.
- (30) Zhang, Y.; Wang, Q.; Hess, H. Increasing Enzyme Cascade Throughput by PH-Engineering the Microenvironment of Individual Enzymes. *ACS Catal.* **2017**, *7* (3), 2047–2051. <https://doi.org/10.1021/acscatal.6b03431>.
- (31) Azuma, Y.; Bader, D. L. V; Hilvert, D. Substrate Sorting by a Supercharged Nanoreactor. *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140* (3), 860–863. <https://doi.org/10.1021/jacs.7b11210>.
- (32) Lin, J. L.; Wheeldon, I. Kinetic Enhancements in DNA-Enzyme Nanostructures Mimic the Sabatier Principle. *ACS Catal.* **2013**, *3*, 560–564. <https://doi.org/10.1021/cs300766d>.
- (33) Gao, Y.; Roberts, C. C.; Zhu, J.; Lin, J.-L.; Chang, C. A.; Wheeldon, I. Tuning Enzyme Kinetics through Designed Intermolecular Interactions Far from the Active Site. *ACS Catal.* **2015**, *5* (4), 2149–2153. <https://doi.org/10.1021/acscatal.5b00130>.
- (34) Gao, Y.; Roberts, C. C.; Toop, A.; Chang, C. A.; Wheeldon, I. Mechanisms of Enhanced Catalysis in Enzyme–DNA Nanostructures Revealed through Molecular Simulations and Experimental Analysis. *ChemBioChem* **2016**, *17* (15), 1430–1436. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/cbic.201600224>.
- (35) Lancaster, L.; Abdallah, W.; Banta, S.; Wheeldon, I. Engineering Enzyme Microenvironments for Enhanced Biocatalysis. *Chem. Soc. Rev.* **2018**, *47* (14), 5177–5186. <https://doi.org/10.1039/C8CS00085A>.
- (36) Rurup, W. F.; Koay, M. S. T.; Cornelissen, J. J. L. M. Viruses as Model Nanoreactors to Study Enzyme Kinetics. In *Enzyme Nanocarriers*; Cardinale, D., Michon, T., Eds.; Pan Stanford Publishing: New York, NY, 2016; pp 105–122.
- (37) Comellas-Aragonès, M.; Engelkamp, H.; Claessen, V. I.; Sommerdijk, N. A. J. M.;

- Rowan, A. E.; Christianen, P. C. M.; Maan, J. C.; Verduin, B. J. M.; Cornelissen, J. J. L. M.; Nolte, R. J. M. A Virus-Based Single-Enzyme Nanoreactor. *Nat. Nanotechnol.* **2007**, *2* (10), 635–639. <https://doi.org/10.1038/nnano.2007.299>.
- (38) Carette, N.; Engelkamp, H.; Akpa, E.; Pierre, S. J.; Cameron, N. R.; Christianen, P. C. M.; Maan, J. C.; Thies, J. C.; Weberskirch, R.; Rowan, A. E.; Nolte, R. J. M.; Michon, T.; Van Hest, J. C. M. A Virus-Based Biocatalyst. *Nat. Nanotechnol.* **2007**, *2*, 226–229.
- (39) Fiedler, J. D.; Brown, S. D.; Lau, J. L.; Finn, M. G. RNA-Directed Packaging of Enzymes within Virus-like Particles. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2010**, *49* (50), 9648–9651. <https://doi.org/10.1002/anie.201005243>.
- (40) Minten, I. J.; Claessen, V. I.; Blank, K.; Rowan, A. E.; Nolte, R. J. M.; Cornelissen, J. J. L. M. Catalytic Capsids: The Art of Confinement. *Chem. Sci.* **2011**, *2*, 358–362. <https://doi.org/10.1039/c0sc00407c>.
- (41) Aljabali, A. A. A.; Barclay, J. E.; Steinmetz, N. F.; Lomonosoff, G. P.; Evans, D. J. Controlled Immobilisation of Active Enzymes on the Cowpea Mosaic Virus Capsid. *Nanoscale* **2012**, *4*, 5640–5645. <https://doi.org/10.1039/c2nr31485a>.
- (42) Patterson, D. P.; Schwarz, B.; El-Boubbou, K.; Van Der Oost, J.; Prevelige, P. E.; Douglas, T. Virus-like Particle Nanoreactors: Programmed Encapsulation of the Thermostable CelB Glycosidase inside the P22 Capsid. *Soft Matter* **2012**, *8*, 10158–10166. <https://doi.org/10.1039/c2sm26485d>.
- (43) Pille, J.; Cardinale, D.; Carette, N.; Di Primo, C.; Besong-Ndika, J.; Walter, J.; Lecoq, H.; van Eldijk, M. B.; Smits, F. C. M.; Schoffelen, S.; van Hest, J. C. M.; Mäkinen, K.; Michon, T.; Mäkinen, K.; Michon, T. General Strategy for Ordered Noncovalent Protein Assembly on Well-Defined Nanoscaffolds. *Biomacromolecules* **2013**, *14*, 4351–4359. <https://doi.org/10.1021/bm401291u>.
- (44) Blaik, R. A.; Lan, E.; Huang, Y.; Dunn, B. Gold-Coated M13 Bacteriophage as a Template for Glucose Oxidase Biofuel Cells with Direct Electron Transfer. *ACS Nano* **2016**, *10*, 324–332. <https://doi.org/10.1021/acsnano.5b04580>.
- (45) Patterson, D. P.; Prevelige, P. E.; Douglas, T. Nanoreactors by Programmed Enzyme Encapsulation inside the Capsid of the Bacteriophage P22. *ACS Nano* **2012**, *6* (6), 5000–5009. <https://doi.org/10.1021/nn300545z>.

- (46) Bollella, P.; Gorton, L. Enzyme Based Amperometric Biosensors. *Curr. Opin. Electrochem.* **2018**, *10*, 157–173. <https://doi.org/10.1016/j.coelec.2018.06.003>.
- (47) Meredith, M. T.; Minteer, S. D. Biofuel Cells: Enhanced Enzymatic Bioelectrocatalysis. *Annu. Rev. Anal. Chem.* **2012**, *5*, 157–179. <https://doi.org/10.1146/annurev-anchem-062011-143049>.
- (48) Holzinger, M.; Le Goff, A.; Cosnier, S. Nanomaterials for Biosensing Applications: A Review. *Front. Chem.* **2014**, *2*, 63. <https://doi.org/10.3389/fchem.2014.00063>.
- (49) Zhu, C.; Yang, G.; Li, H.; Du, D.; Lin, Y. Electrochemical Sensors and Biosensors Based on Nanomaterials and Nanostructures. *Anal. Chem.* **2015**, *87*, 230–249. <https://doi.org/10.1021/ac5039863>.
- (50) Zhao, C.; Gai, P.; Song, R.; Chen, Y.; Zhang, J.; Zhu, J.-J. Nanostructured Material-Based Biofuel Cells: Recent Advances and Future Prospects. *Chem. Soc. Rev.* **2017**, *46*, 1545–1564. <https://doi.org/10.1039/C6CS00044D>.
- (51) De Poulpiquet, A.; Ciaccafava, A.; Lojou, E. New Trends in Enzyme Immobilization at Nanostructured Interfaces for Efficient Electrocatalysis in Biofuel Cells. *Electrochim. Acta* **2014**, *126*, 104–114. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2013.07.133>.
- (52) Milton, R. D.; Wang, T.; Knoche, K. L.; Minteer, S. D. Tailoring Biointerfaces for Electrocatalysis. *Langmuir* **2016**, *32* (10), 2291–2301. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.5b04742>.
- (53) Heller, A. Electrical Wiring of Redox Enzymes. *Acc. Chem. Res.* **1990**, *23*, 128–134. <https://doi.org/10.1021/ar00173a002>.
- (54) Nguyen, K. Van; Holade, Y.; Minteer, S. D. DNA Redox Hydrogels: Improving Mediated Enzymatic Bioelectrocatalysis. *ACS Catal.* **2016**, *6* (4), 2603–2607. <https://doi.org/10.1021/acscatal.5b02699>.
- (55) Piperberg, G.; Wilner, O. I.; Yehezkeli, O.; Tel-Vered, R.; Willner, I. Control of Bioelectrocatalytic Transformations on DNA Scaffolds. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (25), 8724–8725. <https://doi.org/10.1021/ja900718m>.
- (56) Van Nguyen, K.; Giroud, F.; Minteer, S. D. Improved Bioelectrocatalytic Oxidation of Sucrose in a Biofuel Cell with an Enzyme Cascade Assembled on a DNA Scaffold. *J.*

Electrochem. Soc. **2014**, *161* (14), H930–H933. <https://doi.org/10.1149/2.0761414jes>.

- (57) Bäcker, M.; Koch, C.; Eiben, S.; Geiger, F.; Eber, F.; Gliemann, H.; Poghossian, A.; Wege, C.; Schöning, M. J.; Baecker, M.; Koch, C.; Eiben, S.; Geiger, F.; Eber, F.; Gliemann, H.; Poghossian, A.; Wege, C.; Schöning, M. J. Tobacco Mosaic Virus as Enzyme Nanocarrier for Electrochemical Biosensors. *Sensors Actuators, B Chem.* **2017**, *238*, 716–722. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2016.07.096>.
- (58) Koch, C.; Poghossian, A.; Schöning, M. J.; Wege, C. Penicillin Detection by Tobacco Mosaic Virus -Assisted Colorimetric Biosensors. *Nanotheranostics* **2018**, *2* (2), 184–196. <https://doi.org/10.7150/ntno.22114>.
- (59) Patel, A. N.; Anne, A.; Chovin, A.; Demaille, C.; Grelet, E.; Michon, T.; Taofifenua, C. Scaffolding of Enzymes on Virus Nanoarrays: Effects of Confinement and Virus Organization on Biocatalysis. *Small* **2017**, *13*, 1603163. <https://doi.org/10.1002/sml.201603163>.
- (60) Torbensen, K.; Patel, A. N.; Anne, A.; Chovin, A.; Demaille, C.; Bataille, L.; Michon, T.; Grelet, E. Immuno-Based Molecular Scaffolding of Glucose Dehydrogenase and Ferrocene Mediator on Fd Viral Particles Yields Enhanced Bioelectrocatalysis. *ACS Catal.* **2019**, *9* (6), 5783–5796. <https://doi.org/10.1021/acscatal.9b01263>.
- (61) Paiva, T. O.; Schneider, A.; Bataille, L.; Chovin, A.; Anne, A.; Michon, T.; Wege, C.; Demaille, C. Enzymatic Activity of Individual Bioelectrocatalytic Viral Nanoparticles: Dependence of Catalysis on the Viral Scaffold and Its Length. *Nanoscale* **2022**, *14* (3), 875–889. <https://doi.org/10.1039/d1nr07445h>.

Chapitre II

Les composants moléculaires de l'assemblage

Au chapitre précédent, nous avons introduit les principaux résultats obtenus par le groupe concernant les performances catalytiques du système intégré immobilisé sur des particules virales de *fd*^{1,2} et de *TMV*³, telles que sondées par voltammétrie cyclique à l'échelle d'ensemble, c'est-à-dire à l'échelle de millions de particules de *fd* ou de *TMV* décorées adsorbées sur la surface de l'électrode.

Nous avons présenté également l'objectif de ce travail qui consiste à étudier l'effet de l'utilisation d'un virus de géométrie différente et de taille inférieure à ceux utilisés précédemment pour immobiliser les composants actifs du système intégré. Comme il a été mentionné dans le chapitre précédent, nous proposons dans cette étude d'utiliser comme nanogabarits, pour la première fois, des particules virales de GFLV. De plus, nous avons opté pour un nouveau schéma de montage immunologique, faisant non plus appel à des anticorps, mais à des nanocorps. Le présent chapitre propose de présenter en détails les composants moléculaires de ce nouvel assemblage, à commencer par le virus, les nanocorps et leur fonctionnalisation enzymatique et redox.

1. Les composants moléculaires du système

1.1. Le virus GFLV : généralités, structure

En nanotechnologie, on utilise principalement deux types de particules virales : les bactériophages⁴ et les virus de plantes.⁵ Ces nanoparticules sont sans danger pour les êtres

humains, leur organisation supramoléculaire est relativement simple, et elles peuvent être modifiées génétiquement et chimiquement. De plus, elles peuvent être produites en grande quantité dans des conditions de biosécurité optimales.

Dans ce travail, nous avons sélectionné un type de virus de plante sphérique appartenant à la famille des Comoviridae du genre Nepovirus, le virus du court-noué, le GFLV.⁶

Ce virus possède un génome bipartite d'ARN à brin positif. C'est un virus icosaédrique non enveloppé d'environ 30 nm de diamètre. Il est formé de 60 sous-unités de protéine de capsid (CP) identiques de 56 kDa, disposées selon une pseudo symétrie T = 3. La résolution de la structure virale de GFLV a été déterminée à 2,7 Å (voir Figure 1).⁷

Le choix du GFLV comme nano-gabarit s'explique par sa petite taille et sa forme quasi-sphérique. La structure du GFLV permet un confinement spatial élevé pour le système enzymatique,^{8,9} ce qui peut à priori favoriser l'exaltation de l'activité bioélectrocatalytique de l'enzyme. De plus, le GFLV est unique en ce sens que sa protéine capsidiale peut accueillir des fusions N- et C-terminales, permettant l'emprisonnement, ou l'exposition, de protéines entières dans la cavité intérieure ou sur la surface externe des particules, respectivement.¹⁰

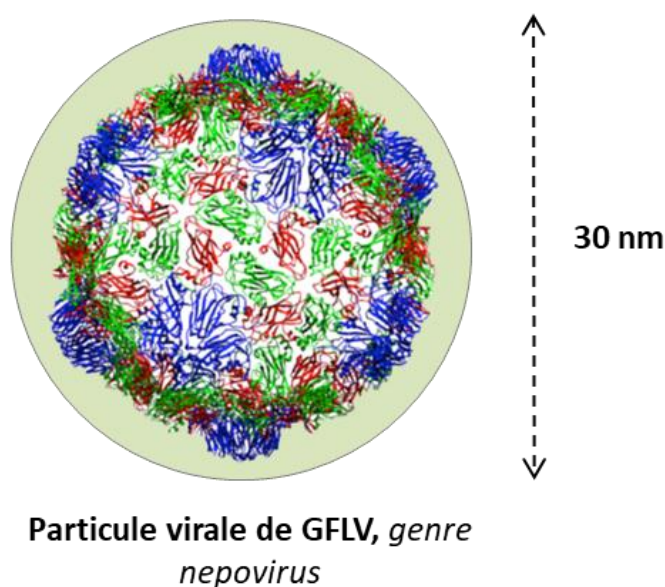


Figure 1. Présentation simplifiée d'une particule virale de GFLV.

1.2. Des anticorps aux nanocorps

Les anticorps, ou immunoglobulines, sont un groupe de glycoprotéines capables de reconnaître et de neutraliser les antigènes.^{11,12} Comme le montre la Figure 2A, il s'agit de structures canoniques d'environ 150 kDas formés de deux chaînes lourdes (CH) et de deux chaînes légères (VL) qui sont reliées par des liaisons disulfure. Chaque chaîne lourde est composée d'un domaine variable (VH) et de trois ou quatre domaines constants (CH1, CH2, CH3 et CH4). A son tour, chaque chaîne légère est également composée d'un domaine variable (VL) et d'un domaine constant (CL). Ainsi, un anticorps IgG complet est constitué de deux chaînes lourdes et deux chaînes légères, pour un total de deux VH, deux CH1, deux CH2, deux CH3, et deux CL.

Grâce aux avancées en ingénierie des protéines, de nouvelles stratégies pour le développement d'anticorps ont permis la création de molécules avec des caractéristiques spécifiques compatibles avec des applications diagnostiques ou thérapeutiques,¹³ tout en préservant la spécificité, la capacité de reconnaissance et la neutralisation des antigènes¹⁴⁻¹⁶ Les constructions recombinantes ont ainsi permis la production de différents fragments d'anticorps, tels que les fragments de type F(ab) (55 kDa), les fragments variables à chaîne unique de type scFv (25 kDa) et leurs complexes modifiés, constituant des variants, les diacorps bispécifiques et les mini-anticorps¹⁷ (voir Figure 2B).

Au début des années 1990, Hamers-Casterman et al. ont découvert que les sérums de chameaux, de dromadaires et de lamas contenaient un type particulier d'anticorps qui ne contient pas de chaîne légère (anticorps à chaîne lourde HcAb).

Ces anticorps à chaînes lourdes (HCAbs) [IgG2 et IgG3, 90 kDa], (voir Figure 2C), se caractérisent par l'absence du domaine variable et constant de la chaîne légère et du premier domaine constant CH1 dans la chaîne lourde. Ceci leur confère une architecture plus compacte que celle des IgG conventionnels.¹⁸⁻²⁰ En raison de l'absence d'un domaine VL dans les HCAbs, le domaine variable de la chaîne lourde des HCAbs ne contient qu'une seule interface d'interaction avec l'antigène formée par un seul domaine N-terminal (VHH).^{21,22}

Cette découverte d'anticorps à chaîne lourde (HcAb) chez les camélidés a ouvert la voie à une bio-ingénierie plus simple et à une production reproductible de fragments d'anticorps à petit domaine unique, les VHH, aussi appelés nanocorps (Nbs).

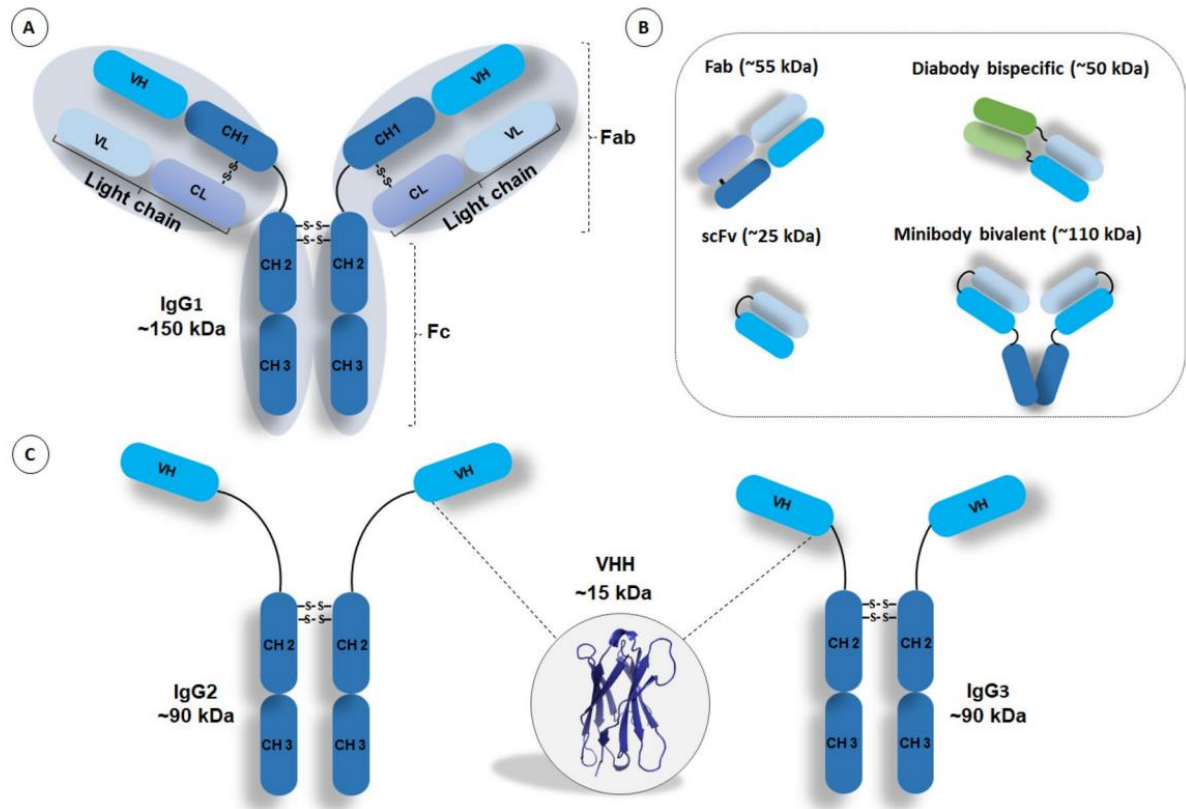


Figure 2. Représentation schématique²³ d'un anticorps conventionnel (A), de fragments dérivés d'anticorps (B) et d'un anticorps à chaîne lourde tel qu'on le trouve dans le sérum des camélidés (C). L'anticorps conventionnel se compose de deux chaînes lourdes identiques et de deux chaînes légères identiques qui sont reliées par des liaisons disulfure. Les domaines VH et VL constituent la région de liaison à l'antigène. L'anticorps à chaîne lourde uniquement (C), est dépourvu du domaine CH1 et de la chaîne légère complète. La région de liaison à l'antigène est formée par un seul domaine VHH. Les nanocorps sont basés sur ce plus petit fragment fonctionnel d'une immunoglobuline naturelle.

Malgré leur petite taille, environ 15 kDas (4 nm de longueur et 2,5 nm de largeur), les Nbs conservent une grande affinité et une grande spécificité pour la reconnaissance de l'antigène, équivalentes aux Fab des IgG conventionnels.^{20,24} Structuellement, les Nbs sont composés de feuillets β -antiparallèles stabilisées par une liaison disulfure interne.

Le Nb est donc le plus petit fragment reconnaissant un antigène connu à ce jour. Sa structure monomérique le rend très facile à cloner à partir des ARNm des lymphocytes B et à produire dans différents organismes tels que les bactéries, les levures et les plantes. Sa taille lui

permet l'accès et la reconnaissance d'épitopes non reconnus par les antigènes conventionnels. Sa composition simple chaîne le rend facile à fusionner avec différentes autres protéines sans altération de sa capacité à reconnaître l'antigène.²¹

Dans ce travail, dû à leur petite taille, les nanocorps sont considérés les candidats idéaux pour décorer efficacement les virions GFLV adsorbés à la surface avec, a priori, peu de contraintes stériques.

Dans l'idée initiale de développer un outil moléculaire pour étudier la spécificité de transmission du GFLV, le Dr Christophe Ritzenthaler a conçu une collection de 23 Nb spécifiques du GFLV,^{25,26} représentant une large diversité d'épitopes reconnus car appartenant à 11 familles différentes²⁵. Parmi ces différents Nbs, les Nbs 59 et 75 ont été ici choisis comme vecteur d'assemblage des composants macromoléculaires "actifs" du système intégré, l'enzyme PQQ-GDH et les chaînes Fc-PEG, sur les particules virales de GFLV. Ces deux nanocorps (non compétitifs) ont des épitopes différents sur le virus,²⁶ dont la distribution spatiale est parfaitement connue, ils présentent une grande affinité pour le GFLV (constante de dissociation de l'ordre de 10 nM), ce qui permet à priori leur fixation quasi-irréversible sur le virus.

1.3. L'enzyme glucose déshydrogénase PQQ-GDH

La PQQ-GDH est une enzyme homodimérique constituée de deux sous-unités de 50 kDa chacune.²⁷ Chaque monomère de GDH contient une quinone pyrroloquinoline PQQ (voir Figure 3). Cette enzyme a besoin de la présence du cofacteur PQQ pour qu'elle soit entièrement catalytiquement active. Ce cofacteur, également appelé groupe prosthétique se lie d'une façon non covalente à la protéine. L'apoenzyme est la forme inactive de l'enzyme qui ne contient pas le cofacteur PQQ, tandis que la forme active, obtenue après incorporation de PQQ, est appelée holoenzyme.

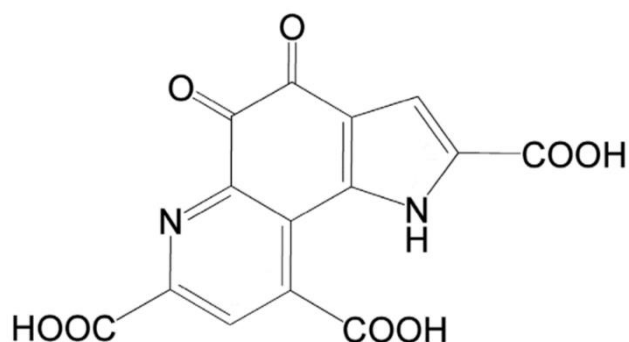


Figure 3. Groupe prosthétique PQQ de l'enzyme glucose déshydrogénase GDH

L'enzyme contient également six ions Ca^{2+} , dont quatre sont impliqués dans la dimérisation des sous-unités et les deux autres dans l'activation des deux molécules de PQQ (voir Figure 4). Cette enzyme se retrouve dans plusieurs bactéries gram-négatives, telles que *Acinetobacter calcoaceticus*.²⁸ Il existe deux types de GDH fonctionnelles qui peuvent être extraites des bactéries : la GDH soluble, ou sGDH, qui se trouve dans le cytoplasme, et la GDH liée à la membrane, ou mGDH. Dans mon travail de thèse, l'enzyme sGDH a été utilisée.

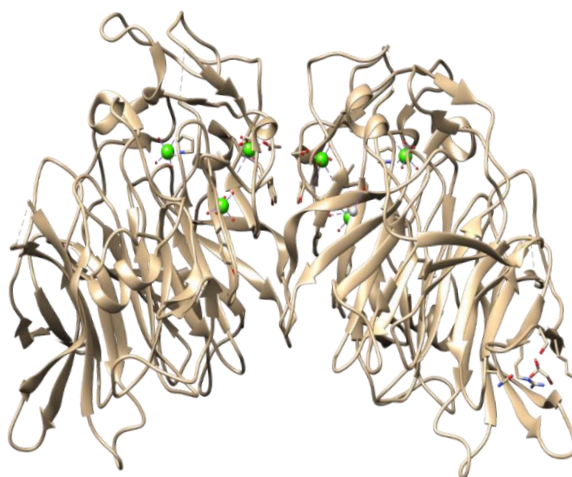


Figure 4. Diagramme en ruban de la structure globale de l'homodimère sGDH. Les ions calcium sont représentés par des sphères vertes.

La GDH présente une large spécificité pour l'oxydation des sucres aldoses (hexoses, pentoses, mono- et disaccharides) en lactones correspondantes et la réduction d'accepteurs d'électrons artificiels. Elle présente une activité catalytique particulièrement élevée envers le glucose. Dans le contexte des applications bio-électro-analytiques, il serait très souhaitable de trouver un moyen d'améliorer l'activité catalytique des enzymes d'oxydation du glucose immobilisées sur électrode, car cela pourrait être la clé pour la conception des bio-pile plus puissantes. La glucose déshydrogénase (PQQ-GDH), beaucoup plus active et insensible à l'oxygène, en comparaison avec le glucose oxydase (GOx), fait partie des enzymes redox les plus largement utilisées pour ces applications importantes.

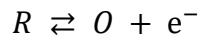
Le mécanisme d'oxydation du glucose par l'enzyme PQQ-GDH a été largement étudié au cours des dernières décennies.²⁸⁻³¹ Une analyse cinétique détaillée des réponses catalytiques électrochimiques, conduisant à une caractérisation sans ambiguïté de chaque étape individuelle du mécanisme d'oxydation du glucose par la PQQ-GDH, est rendue difficile compte tenu de

l'interférence, en plus du mécanisme de ping-pong habituel, de l'inhibition de l'enzyme par son substrat et des effets de coopérativité entre les deux sous-unités identiques de l'enzyme.

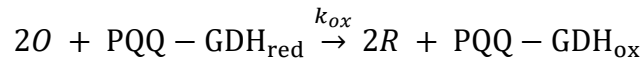
En première approche (simplifiée), le mécanisme d'oxydation du glucose par la PQQ-GDH peut être considéré comme un mécanisme de ping-pong, décrit par deux demi-réactions, complétées par la réaction d'inhibition de l'enzyme par le substrat. Globalement, le mécanisme de la réaction catalytique suit les étapes successives suivantes.

On se place dans le cas où l'enzyme est mise en œuvre avec un cosubstrat monoélectronique dont la forme active 'oxydée', O , est produite à partir de sa forme inactive (réduite), R à une électrode :

Oxydation réversible du cosubstrat redox monoélectronique à l'électrode :



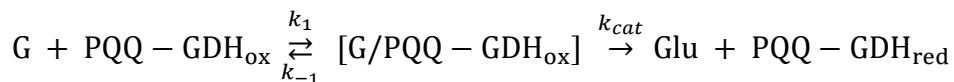
Demi-réaction oxydative de l'enzyme avec le cosubstrat oxydé :



$\text{PQQ} - \text{GDH}_{\text{red}}$ et $\text{PQQ} - \text{GDH}_{\text{ox}}$ sont respectivement les formes entièrement réduite et oxydée de l'enzyme.

k_{ox} est la constante de vitesse de second ordre pour l'oxydation de l'enzyme par son cosubstrat.

Demi-réaction réductrice de l'enzyme avec le glucose :



Où G et Glu sont respectivement le glucose et l'acide gluconique.

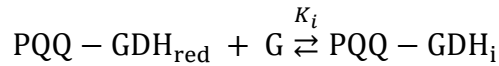
k_{cat} est la constante de vitesse catalytique de l'enzyme,

k_1 et k_{-1} sont les constantes de vitesse pour la formation/dissociation du complexe (réactif) enzyme/glucose.

La demi-réaction réductrice est cinétiquement caractérisée par k_{cat} et K_M , la constante de Michaelis-Menten de l'enzyme pour le glucose, donnée par :

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_{cat}}{k_1}$$

L'inhibition réversible de l'enzyme par le substrat (glucose) est décrite par la réaction :



où PQQ-GDH_i est la forme inhibée de l'enzyme et K_i la constante d'équilibre pour sa formation.

La loi de vitesse globale pour la GDH catalysant l'oxydation du glucose en solution, avec une forme soluble du médiateur redox monoélectronique comme cosubstrat, est donc globalement donnée par:

$$v_{EZ} = \frac{[\text{GDH}]}{\frac{1}{k_{ox}[\text{O}]} (1 + K_i C_g^0) + \frac{1}{k_{cat}} + \frac{K_M}{k_{cat} C_g^0}}$$

où v_{EZ} est la vitesse enzymatique, [GDH] et C_g^0 sont respectivement les concentrations d'enzyme et de glucose.

Si l'on considère maintenant le mécanisme de réaction de la PQQ-GDH plus en détail, il faut rappeler que la PQQ-GDH est en fait une enzyme dimérique, et que chaque monomère a un site catalytique contenant un groupe prosthétique PQQ. Cette enzyme présente une coopérativité cinétique positive. Cela signifie que la liaison du glucose à l'un des monomères accélère la réaction entre le glucose et l'autre monomère. Il a été observé que la concentration en cosubstrat module l'influence de la coopérativité sur le comportement cinétique global de la PQQ-GDH³¹. Deux situations cinétiques limites peuvent être atteintes : à faible concentration en cosubstrat, un mode non coopératif domine, tandis qu'à forte concentration, la coopérativité entre en jeu et l'enzyme adopte un mode entièrement coopératif. Heureusement, la loi de vitesse globale donnée ci-dessus peut être appliquée à ces deux modes. Seules les valeurs individuelles de k_{cat} , k_{ox} , K_M et K_i diffèrent d'un mode à l'autre³¹.

2. Le nanocorps à fonction enzymatique : préparation et caractérisation

Afin d'immobiliser l'enzyme de façon régio-sélective sur le GFLV nous avons fait le choix d'utiliser une protéine de fusion entre le Nb₇₅ et PQQ-GDH. L'extrémité N-terminale du Nb₇₅ a été liée à l'extrémité C-terminale de PQQ-GDH. Le choix du sens de la fusion a été déterminé par le sens de dimérisation des monomères de l'enzyme GDH. En effet, l'extrémité N-terminale de chaque monomère de GDH est impliquée dans la face de dimérisation de l'enzyme, une étape cruciale pour que cette dernière soit active, alors que l'extrémité C-terminale est située dans la périphérie de l'enzyme, la rendant accessible.

Pour éviter les obstacles stériques, nous avons ajouté un lien flexible avec la séquence (GGGGS)₂GGGS entre les chaînes de nanocorps et d'enzyme.

La PQQ-GDH active étant un homodimère³², la production a finalement abouti à la formation d'une apoenzyme constituée d'un dimère GDH-Linker-Nb₇₅ de 130 kDa (voir Figure 5). Il convient de souligner que la fusion a été choisie à la place de la conjugaison chimique entre la GDH et le Nb, car cette dernière méthode comporte davantage de risques de désactivation de l'enzyme.

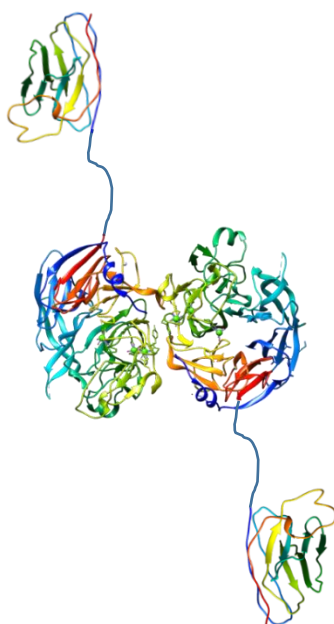


Figure 5. Diagramme en ruban de la structure globale de la protéine de fusion GDH-Nb₇₅ dimérique obtenue à la fin du processus de production.

2.1. Production de la protéine de fusion GDH-Nb₇₅

La majorité des Nb sont produits dans le périplasma d'*E. coli*³³ alors que la sGDH se trouve dans le cytoplasme.²⁸ Comme la production de la protéine GDH-Nb₇₅ résulte de la fusion de deux protéines différentes, GDH et Nb₇₅, qui sont issues de compartiments cellulaires différents, il était difficile de prédire où la protéine de fusion serait produite. C'est pourquoi nous avons décidé de réaliser deux productions distinctes, l'une dans le compartiment périplasmique et l'autre dans le compartiment cytoplasmique, afin de maximiser les chances d'obtenir une quantité suffisante de protéine de fusion GDH-Nb₇₅.

2.1.1. Production périplasmique

Pour produire la protéine de fusion GDH-Nb₇₅, cette dernière a été clonée pour présenter le signal peIB en extrémité N-terminale de la GDH et une étiquette 6His en extrémité C-terminale du Nb₇₅. La présence d'un peptide signal peIB, en amont de la séquence de la protéine, permet leur adressage vers le périplasme bactérien, favorisant leur structuration et leur repliement corrects dans cet environnement. Les fragments PCR amplifiés ont été recombinaés avec un vecteur d'expression bactérienne (pET-GG) selon la technologie Golden Gate. Des bactéries BL21(DE3) et un milieu auto inductible ont été utilisés. Les extraits périplasmiques issus de cette production ont été obtenus par choc osmotique et ont été purifiés par chromatographie d'affinité de type HisTrap, suivie d'une chromatographie d'exclusion de taille. A la sortie de cette dernière, aucun pic d'élution n'est apparu montrant que la production de la protéine GDH-Nb₇₅-6His n'est pas périplasmique.

2.1.2. Production cytoplasmique

Pour la production cytoplasmique, le peptide signal peIB a été remplacé par une méthionine dans les vecteurs d'expression, puis la protéine de fusion a été produite à partir de bactéries BL21. Les extraits cytoplasmiques ont été également purifiés par chromatographie d'affinité de type HisTrap, suivie d'une chromatographie d'exclusion. A la sortie de la chromatographie d'exclusion, la protéine de fusion GDH-Nb₇₅ a été collectée dans des fractions correspondantes aux différents pics d'élution présentés en Figure 6.

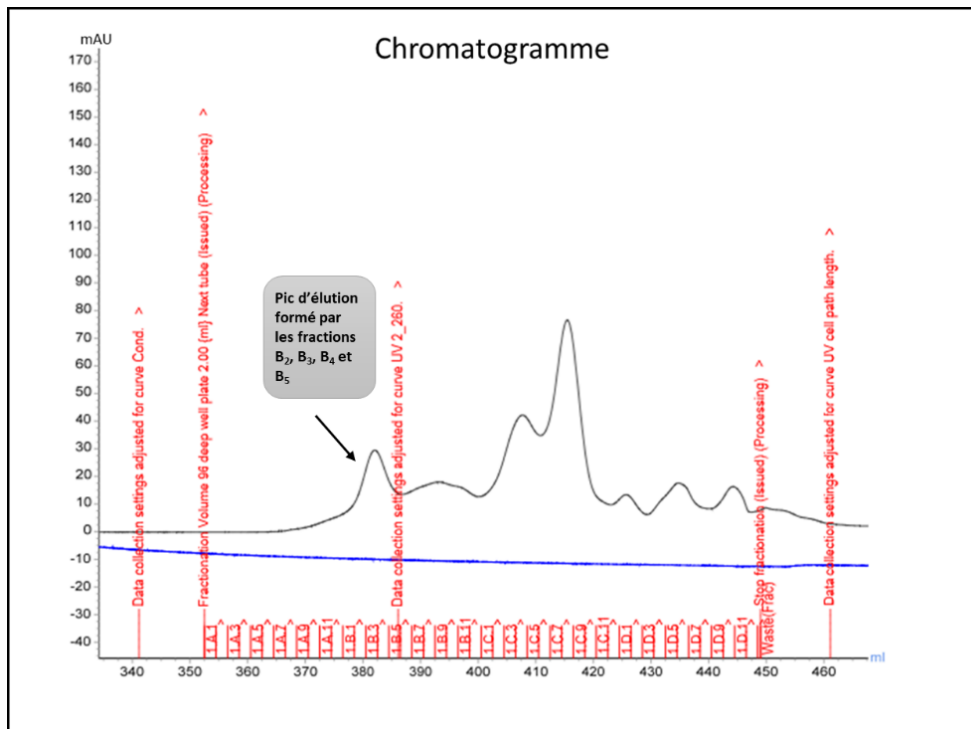


Figure 6. Spectre d'élution des protéines à la sortie de la chromatographie d'exclusion de taille, obtenu lors de la production cytoplasmique de la GDH-Nb₇₅-6His. Les barres verticales rouges correspondent aux différentes fractions récoltées.

Puisqu'en sortie de la chromatographie d'exclusion, on a obtenu plusieurs pics d'élution et donc plusieurs populations de protéines, nous avons fait un gel SDS-PAGE pour identifier les fractions qui correspondent à notre protéine d'intérêt la GDH-Nb₇₅-6His (voir Figure 7).

Sachant que le gel SDS-PAGE est un gel dénaturant, la protéine de fusion GDH-Nb₇₅ est monomérique lors de l'analyse. Et sachant que la masse moléculaire du Nb₇₅ est de 15 kDa, celle de la GDH monomérique est de 50 kDa, la masse moléculaire de la protéine cible monomérique est donc de 70 kDa. Après l'analyse du gel (voir Figure 7), les fractions B₂, B₃, B₄ et B₅, formant le premier pic élué présenté en Figure 6, montrent une bande d'environ 70 kDa, qui correspond à notre protéine d'intérêt GDH-Nb₇₅-6His. Les autres fractions présentent des bandes qui ne sont pas considérées comme pertinentes. La concentration des échantillons est mesurée par spectre UV-visible.

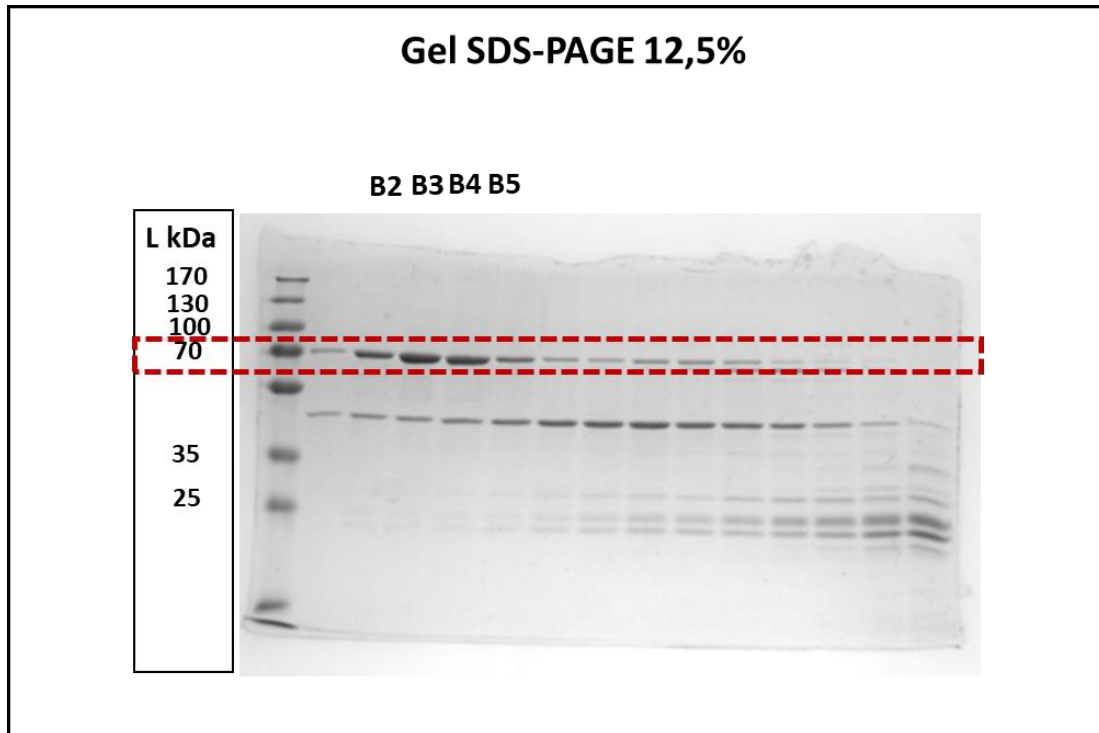


Figure 7. Analyse des fractions B₂, B₃, B₄ et B₅ contenant la GDH-Nb₇₅-6His purifiée par chromatographie d'affinité suivie d'une chromatographie d'exclusion de taille, produits à partir des bactéries BL21 ; L'échelle de poids moléculaires est reproduite à gauche du gel, en kDa. La bande 70kDa, correspondant à notre protéine d'intérêt monomérique, est encadrée en rouge.

2.2. Incorporation de la PQQ

La production cytoplasmique de la protéine de fusion GDH-Nb₇₅, a abouti à la génération de l'apoGDH-Nb₇₅ dimérique (Figure 5). La protéine de fusion est sous la forme dimérique vu la présence de Ca²⁺ dans les tampons d'élution. Cependant la souche d'E. coli utilisé pour produire la protéine de fusion GDH-Nb₇₅ ne produit pas de PQQ ni aucun autre chromophore ayant une affinité pour la protéine.³⁴ Il est donc nécessaire d'incorporer le PQQ au GDH-Nb₇₅ pour rendre l'enzyme active.

Le protocole d'incorporation, c.-à-d. de reconstitution de la forme holo de GDH-Nb₇₅ à partir de l'apoenzyme correspondante, a été légèrement modifié par rapport à celui de la littérature.^{29,30,34} L'apo-GDH-Nb₇₅ a été mélangée à un excès de PQQ dans un tampon contenant de Ca²⁺ et incubée pendant 30 minutes à température ambiante. Ensuite, l'excès de PQQ a été éliminé par centrifugation à l'aide d'une membrane Nanosep de 30 kDa.

L'apparition d'un pic à 352 nm (voir Figure 8) dans le spectre UV-visible de l'holo enzyme, confirme l'incorporation de la PQQ dans la matrice protéique. La diminution d'absorbance à 280 nm est principalement due à une perte de protéine sur la membrane Nanosep.

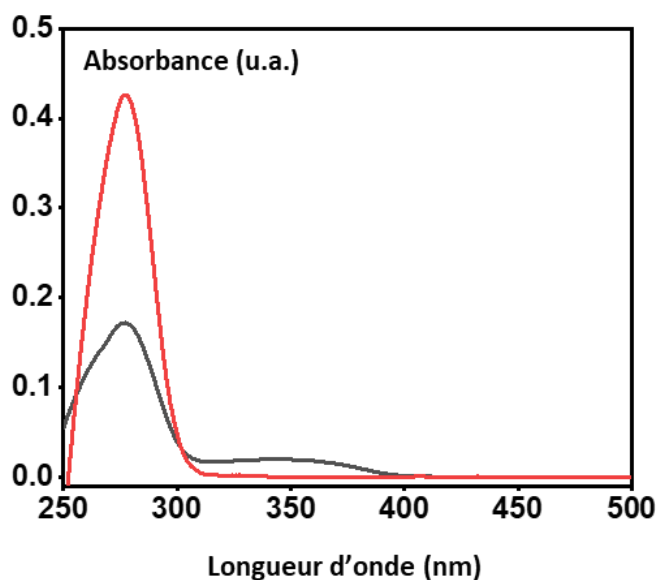


Figure 8. Spectre d'absorbance de l'apo GDH-Nb₇₅ avant incorporation de la PQQ (courbe rouge) et après incorporation de la PQQ (holo GDH-Nb₇₅, courbe noire). Spectre enregistré dans 100 mM phosphate pH 7.1

L'ajout ultérieur de glucose a conduit à une légère augmentation et à un déplacement du maximum d'absorption vers 338 nm (voir Figure 9). Ce changement est dû à la réduction de la PQQ liée à l'enzyme, qui est convertie en sa forme réduite PQQH₂. Cette dernière a en effet un maximum d'absorption à une longueur d'onde plus faible que celle de sa forme oxydée. Le changement de longueur d'onde permet donc de s'assurer de la bonne réduction de l'holoenzyme GDH par le glucose, et donc, d'une façon qualitative, de l'activité de l'enzyme. Reste à caractériser le fonctionnement enzymatique plus en détails et à le comparer à celui de l'enzyme native.

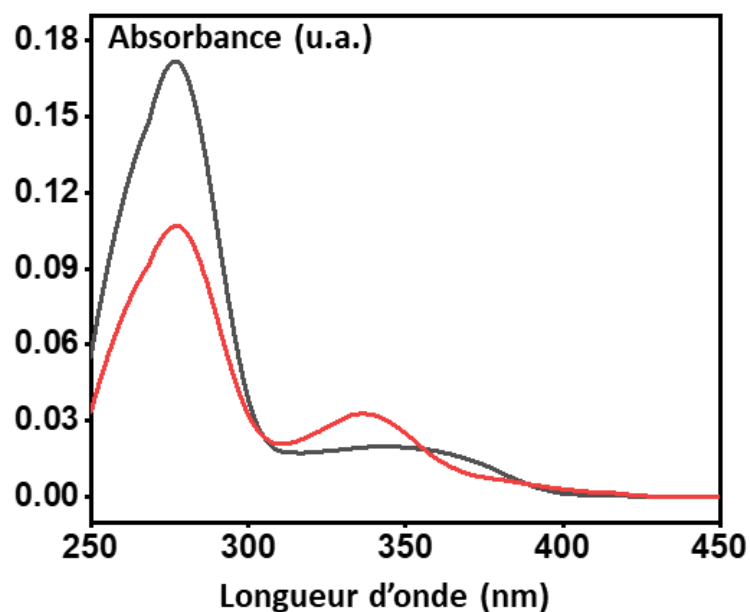


Figure 9. Spectre d'absorbance de l'holo GDH-Nb₇₅. Spectre enregistré dans 100 mM phosphate pH 7.1, la courbe en noire représente le spectre de l'holo GDH-Nb₇₅ oxydée avant ajout de 1 mM de glucose et la courbe en rouge représente le spectre de l'holo GDH-Nb₇₅ réduite après ajout de 1 mM de glucose. La perte d'absorbance à 280 nm est due à la dilution par l'injection de glucose.

2.3. Mesure de l'activité de la GDH-Nb₇₅ reconstituée

La méthode utilisée (voir Figure 10) pour vérifier l'activité de la GDH-Nb₇₅ et la comparer à celle de la GDH native, est inspirée de la littérature.²⁹

Une concentration connue de GDH-Nb₇₅ a été introduite dans une cellule spectrophotométrique contenant un mélange de deux accepteurs d'électrons, le 2,6-dichlorophénol-indophénol (DCPIP) et le méthosulfate de phénazine (PMS). L'action enzymatique a été déclenchée en introduisant du glucose dans la cellule.

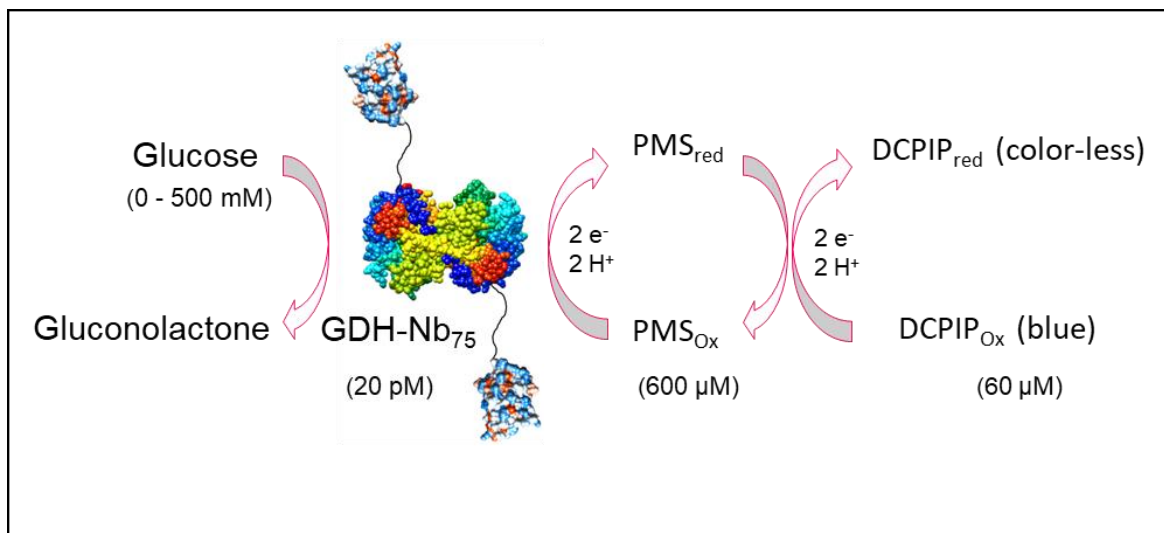


Figure 10. Schéma présentant le principe du test d'activité de l'holo GDH-Nb₇₅ en solution. Le glucose est oxydé par l'holo GDH-Nb₇₅, les électrons seront finalement acceptés par le DCPIP oxydé (DCPIP_{ox}) pour former sa forme réduite (DCPIP_{red}). La disparition de DCPIP_{ox} est suivie par spectroscopie UV visible à 600 nm.

La GDH-Nb₇₅ oxyde le glucose et les électrons sont initialement acceptés par le PMS puis finalement par le DCPIP. La conversion de ce dernier de sa forme oxydée bleue à sa forme réduite incolore a été suivie en enregistrant l'absorbance de la solution à 600 nm (voir figure 11).

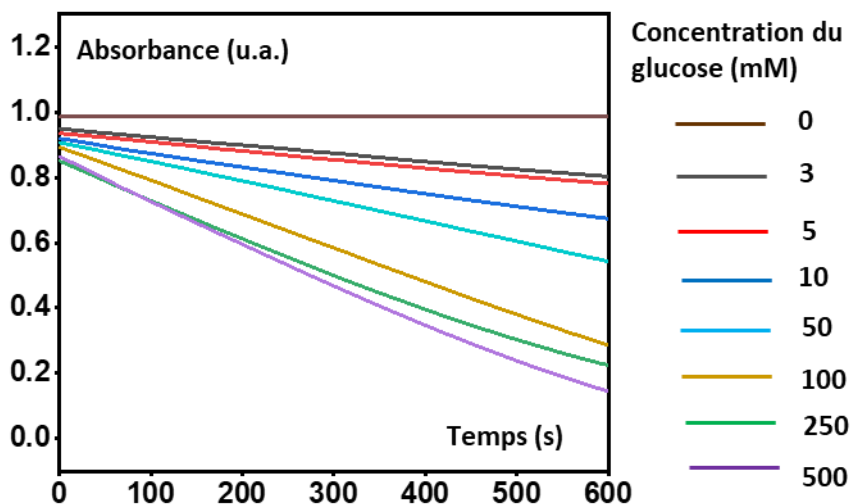


Figure 11. Test d'activité de la GDH-Nb₇₅. Décroissance de l'absorbance du DCPIP (utilisé comme accepteur d'électron) oxydé en fonction du temps, pour différentes concentrations de glucose. Concentration en enzyme utilisée 20pM, tampon phosphate pH 7 50mM, température 25°C.

La vitesse initiale de décroissance de l'absorbance est utilisée pour déterminer la vitesse enzymatique, exprimée en concentration molaire de DCPIP (et donc de glucose) converti par

seconde. Cette vitesse est alors divisée par la concentration de l'enzyme afin d'obtenir une constante de vitesse apparente de premier ordre k_{app} (en s^{-1}). En traçant cette valeur en fonction de la concentration de glucose, $[G]$, on obtient une courbe cinétique quantifiant l'activité enzymatique, voir Figure 12A.

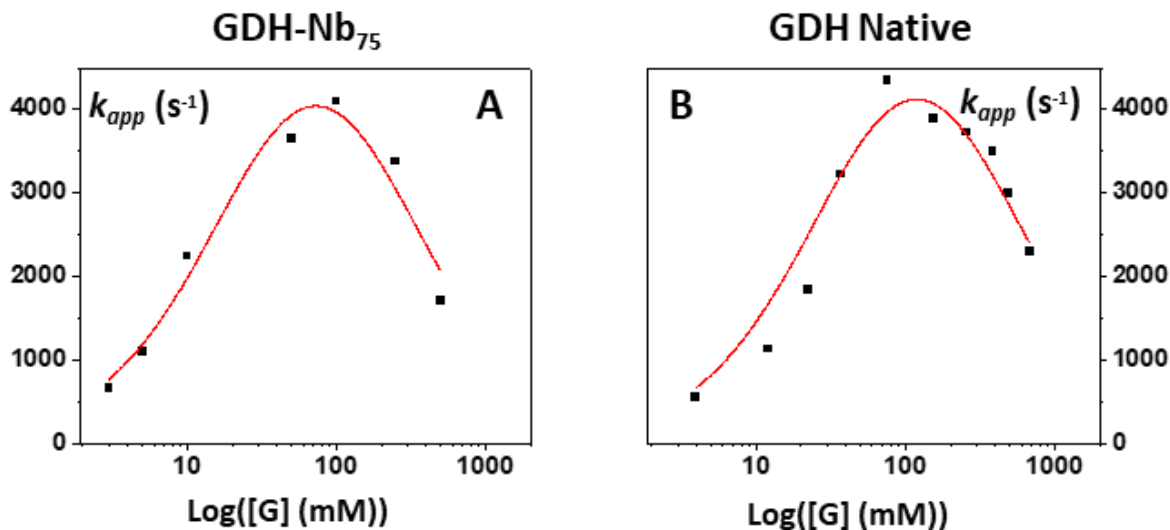


Figure 12. Test d'activité de la GDH-Nb₇₅. Courbe A et B montrant la variation de la constante de vitesse apparente de premier ordre k_{app} en fonction de la concentration de glucose, pour la GDH-Nb₇₅ et de la GDH native, respectivement. Les valeurs de k_{app} de la GDH native sont tirées de la littérature.³⁵

On peut observer que les courbes cinétiques mesurées pour la GDH-Nb₇₅, Figure 12A, et pour la PQQ-GDH native, Figure 12B,³⁵ sont similaires : elles sont toutes deux en forme de cloche (inhibition par le substrat), avec une valeur maximale de k_{app} d'environ 4000 s^{-1} , atteinte pour une concentration de glucose dans la même région d'environ 100 mM. Ce résultat montre que l'activité enzymatique de la fusion GDH-NB₇₅ est similaire à celle de la PQQ-GDH native. On en conclut que la présence du Nb₇₅ n'a pas altéré le fonctionnement de l'enzyme GDH et que celle-ci est pleinement active au sein de la protéine de fusion.

3. Le nanocorps redox : préparation et caractérisation

Des chaînes Fc-PEG ont été conjuguées chimiquement à une protéine de fusion entre le Nb₅₉ et la GFP. Ce schéma de conjugaison met en jeu une réaction de couplage covalent « type amide » entre la fonction ester activée NHS portée par la molécule, NHS-PEG-Fc, synthétisée au laboratoire, avec les amines primaires (lysines) exposées en surface des protéines.

Nous avons opté pour une fusion Nb₅₉-GFP, plutôt que simplement Nb₅₉, en tant que porteur de Fc-PEG afin de minimiser la perte potentielle des capacités de reconnaissance moléculaire de Nb₅₉ par la fixation des chaînes PEG encombrantes (rayon de Flory de 5 nm). L'idée était de diriger « statistiquement » la conjugaison chimique ciblant les amines primaires vers la GFP plutôt que vers le Nb, car ce dernier présente beaucoup moins de groupes lysine que la GFP. En effet, la structure primaire de la GFP se compose d'environ 19 résidus de lysine alors que celle du Nb ne présente que 6 lysines. Le schéma du processus de PEGylation redox du nanocorps Nb₅₉-GFP, comprenant la préparation et la purification, est reproduit en Figure 13.

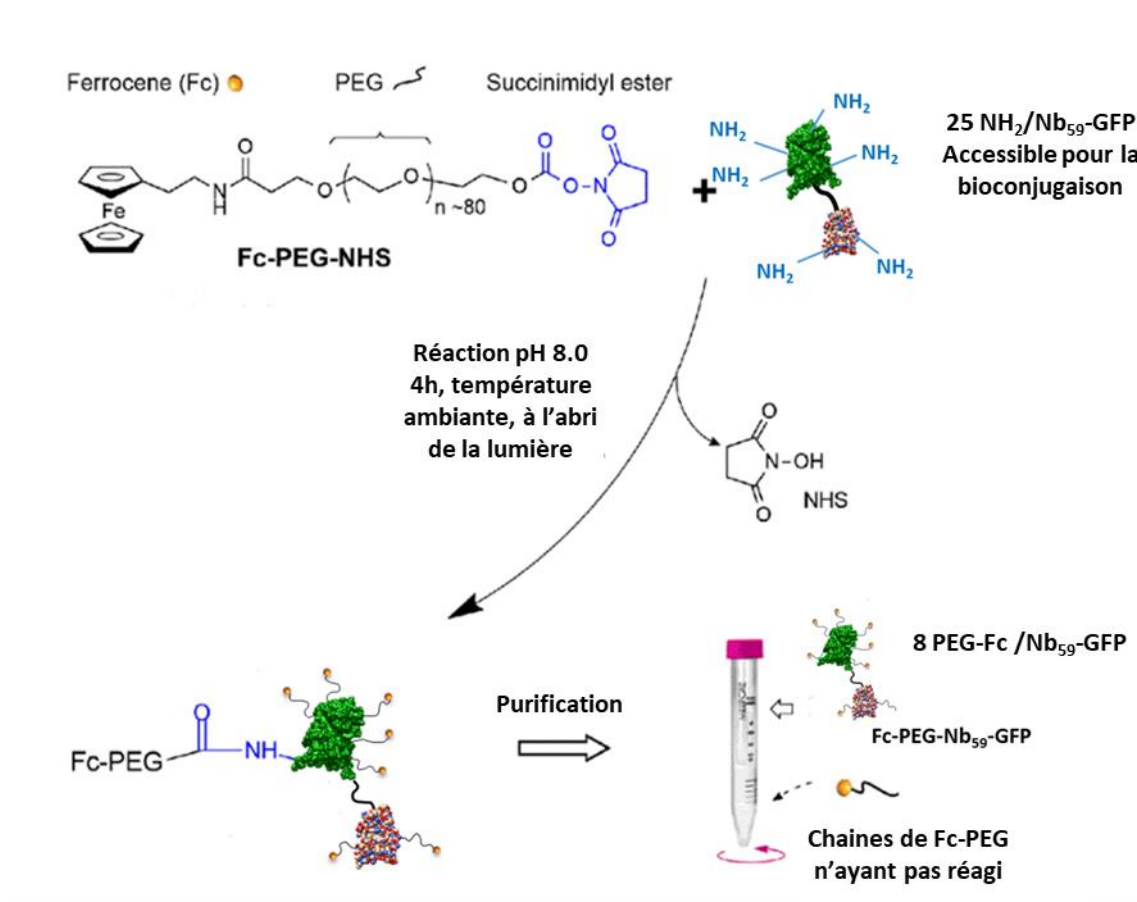


Figure 13. Représentation schématique du marquage redox du nanocorps Nb₅₉-GFP avec le dérivé Fc-PEG-NHS réactif aux amines, suivi d'une purification ultérieure.

La procédure de bioconjugaison peut être divisée en 3 étapes différentes :

- Échange de tampon du Nb₅₉-GFP à pH 8 et concentration de l'échantillon :

La solution du Nb₅₉-GFP anti GFLV a été centrifugée pour concentrer l'échantillon et le faire passer dans un tampon à pH 8, où la fonction NHS est à la fois stable et réactive.

- Réaction du Nb₅₉-GFP avec le Fc-PEG-NHS :

La solution du Nb₅₉-GFP a été mise en contact avec le Fc-PEG₃₅₀₀-NHS à température ambiante, dans l'obscurité pour 4h.

- Purification du nanocorps redox Fc-PEG-Nb₅₉-GFP :

Une fois la réaction de bioconjugaison terminée, une étape de purification a été réalisée pour séparer les molécules de Fc-PEG-Nb₅₉-GFP des chaînes Fc-PEG non attachées. Pour assurer l'élimination complète des chaînes Fc-PEG non attachées, le Fc-PEG-Nb₅₉-GFP nouvellement synthétisé a été soumis à 6 cycles de concentration/dilution sur unité de filtration ayant un seuil de coupure de 30 kDa. Après chaque étape de centrifugation, les molécules de protéines Nb₅₉-GFP marquées par Fc étaient retenues dans le concentrât, tandis que les chaînes Fc-PEG non attachées passaient librement à travers la membrane dans l'éluât. Ce dernier a été analysé par spectrophotométrie UV-visible afin de surveiller l'évolution des bandes d'absorption caractéristiques des chaînes Fc-PEG libres et des groupes NHS. L'absorbance de l'éluât a diminué progressivement après chaque étape d'ultrafiltration, ce qui démontre que les chaînes Fc-PEG libres ont été progressivement éliminées du concentrât. Après 6 cycles, les chaînes Fc-PEG n'étaient plus détectables dans l'éluât, assurant que le concentré ne contenait que du Fc-PEG-Nb₅₉-GFP, Figure 14.

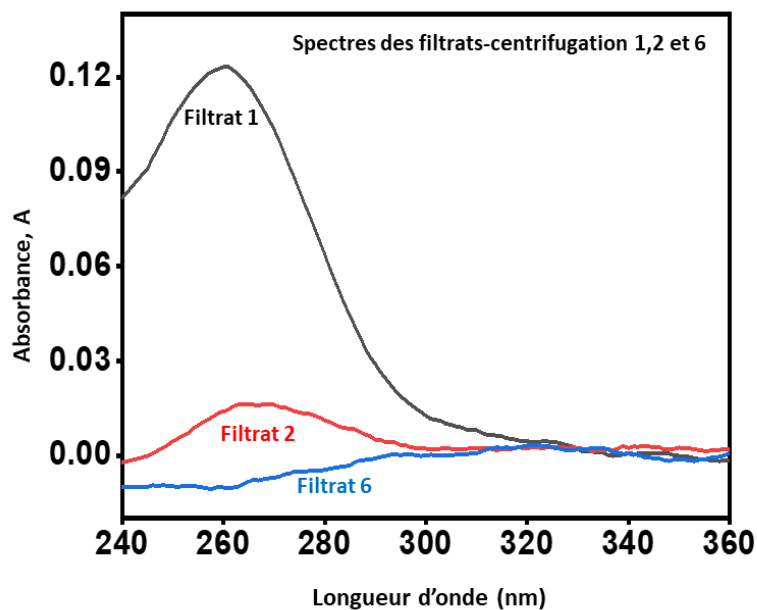


Figure 14. Spectres d'absorption UV des filtrats obtenus après chaque centrifugation lors de la purification du Fc-PEG-Nb₅₉-GFP. Les courbes noire, rouge, et bleue représentent respectivement les 1^{ème}, 2^{ème}, et 6^{ème} centrifugations.

3.1. Détermination du degré de marquage du Fc-PEG-Nb₅₉-GFP

L'analyse par spectrophotométrie UV-Vis du conjugué Fc-PEG-Nb₅₉-GFP a fourni une estimation précieuse de son degré de marquage, sachant que le Fc est non seulement une molécule redox mais également un chromophore absorbant dans l'UV proche.

- Rendement de récupération du Fc-PEG-Nb₅₉-GFP

La Figure 15 présente le spectre du Fc-PEG-Nb₅₉-GFP purifié, courbe rouge, qui est comparé à celui du Nb₅₉-GFP non marqué, représenté courbe bleue.

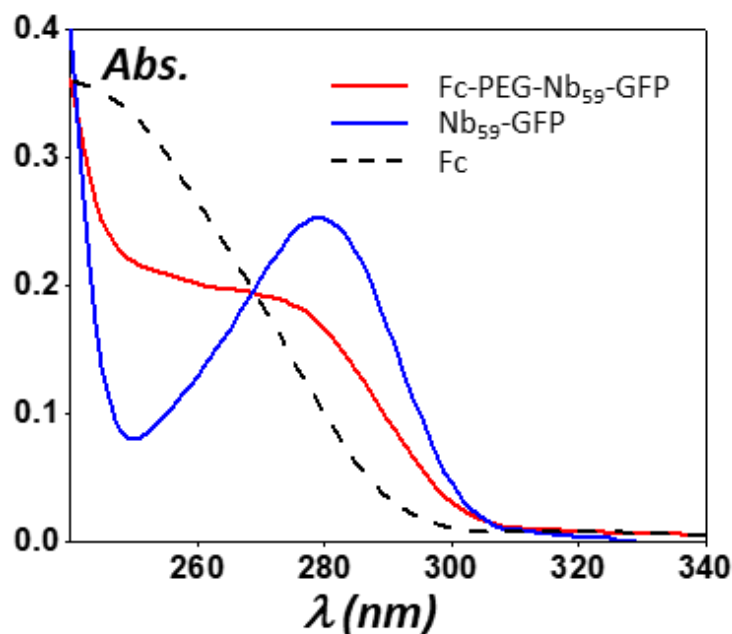


Figure 15. Spectres d'absorption UV du nanocorps Nb₅₉-GFP avant et après marquage avec des chaînes Fc-PEG₃₅₀₀. Le spectre rouge correspond au Nb₅₉-GFP initial, avec une concentration mesurée de 0.38mg/ml. Le spectre noir correspond au Fc-PEG-Nb₅₉-GFP, purifié avec un rendement d'environ 46 %, dosé à 0.247 mg/ml. L'expérience a été effectuée dans une cuve plastique stérile Brand de 1 cm avec un spectrophotomètre Agilent Cary 60 UV-visible. Tampon phosphate pH 8, 100mM.

En comparant les spectres de Fc-PEG-Nb₅₉-GFP et de Nb₅₉-GFP, il est évident que la fonctionnalisation a provoqué un changement significatif de la forme du spectre pour les longueurs d'onde < ~280 nm. Cela indique la présence d'espèces absorbantes qui n'étaient pas présentes dans Nb₅₉-GFP, à savoir les têtes de Fc et leur chaîne PEG. Pour comparaison, le spectre d'absorption du ferrocènediméthanol, un analogue des têtes de Fc, est reproduit en Figure 15 (trace en pointillés). Le spectre a été ajusté pour correspondre à une concentration de Fc 25 fois supérieure à la concentration initiale de Nb₅₉-GFP, représentant l'absorption maximale due aux têtes de Fc si toutes les 25 lysines accessibles de Nb₅₉-GFP étaient fonctionnalisées avec Fc-PEG. Même dans ce cas extrême, on peut constater que la contribution de l'absorption de Fc au spectre Fc-PEG-Nb₅₉-GFP peut être négligée pour les longueurs d'onde supérieures à 290 nm. Comme le PEG n'absorbe pas au-delà de 270 nm, la partie du spectre au-delà de 290 nm peut être directement comparée à celle de la solution initiale de Nb₅₉-GFP pour déterminer le rendement de récupération de la protéine Fc-PEG-Nb₅₉-GFP. Sa mesure est donc basée sur le rapport $A_{\text{Fc-PEG-Nb59-GFP}, 292 \text{ nm}} / A_{\text{Nb59-GFP}, 292 \text{ nm}}$. Ici un rendement de 46 % a été obtenu, indiquant une petite perte de produit sans doute lors la purification.

Pour estimer le degré de marquage N du Fc-PEG-Nb₅₉-GFP, on a utilisé la partie du spectre où l'absorption de la protéine est proche du maximum, à savoir notre choix de lecture s'est concentré sur $\lambda = 280$ nm.

En utilisant les propriétés d'additivité des absorbances définies par la loi de Beer-Lambert, et sachant également que les chaînes PEG sont transparents aux UV ($A_{\text{PEG}} \text{ à } 280 \text{ nm} \sim 0$), on peut déduire que l'absorbance du Nb₅₉-GFP marqué, $A_{\text{Fc-PEG-Nb59-GFP}, 280 \text{ nm}}$, mesurée sur le spectre rouge à 280 nm de la Figure 15, dépend de N selon l'équation suivante :

$$A_{\text{Fc-PEG-Nb59-GFP}, 280 \text{ nm}} = \text{rendement} * A_{\text{Nb59-GFP}, 280 \text{ nm}} + N * \epsilon_{\text{Fc}, 278 \text{ nm}} * C_{\text{Fc-PEG-Nb59-GFP}}$$

Ici, $A_{\text{Nb59-GFP}}$ représente l'absorbance mesurée à 280 nm pour le Nb₅₉-GFP initial (spectre bleu, Figure 15),

$\epsilon_{\text{Fc}, 280 \text{ nm}}$ correspond au coefficient d'extinction du ferrocène à 280 nm, que nous avons déterminé comme étant égal à $1175 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.³⁶

Ce calcul conduit à un nombre de Fc par Nb₅₉-GFP de $N = 8 \pm 2$.

Il convient de souligner que nous avons également cherché à moduler ce taux de marquage en variant le rapport de concentration $[\text{NHS-PEG-Fc}]/[\text{Nb}_{59}\text{-GFP}]$ durant la Fc-PEGylation. Nous avons notamment essayé de réduire le nombre de Fc-PEG par Nb₅₉-GFP, craignant que leur présence en trop grand nombre n'altère la capacité des Fc-PEG-Nb₅₉-GFP à reconnaître le virus. L'idée était que des nanocorps redox moins marqués se fixeraient en plus grand nombre sur les GFLV et qu'au final le nombre de chaînes par virus pourrait être ainsi augmenté. Nous avons donc également produit un lot de Fc-PEG-Nb₅₉-GFP portant 3 chaînes Fc-PEG par Nb. Nous avons également cherché à produire des nanocorps redox *au taux de marquage plus élevé que 8*. Le raisonnement était cette fois-ci qu'au-delà du taux de marquage moyen il existe nécessairement au sein de la population de nanocorps une dispersion statistique du taux de greffage. En deçà d'un certain seuil de greffage moyen, on peut s'attendre à ce que des nanocorps non greffés subsistent dans l'échantillon, que ceux-ci montrent plus d'affinité pour le GFLV que ceux marqués et empêchent compétitivement la fixation des nanocorps marqués sur le virus. Nous avons donc produit un lot de Fc-PEG-Nb₅₉-GFP ayant un degré de marquage de $N = 12$.

Les résultats présentés dans les chapitres suivants utilisent le lot au taux de marquage de $N = 8$ car c'est celui qui a en définitive donné les meilleurs résultats.

Conclusion

Nous avons été à même de produire et de caractériser les nanocorps à fonction redox et ceux à fonction enzymatique, que nous souhaitons utiliser comme « vecteurs » pour l'agencement régio-sélectif du système intégré sur GFLV.

L'obtention de GDH-NB₇₅ ayant une activité catalytique similaire à celle de l'enzyme native est particulièrement satisfaisante, puisqu'elle valide notre stratégie de couplage de l'enzyme avec le nanocorps par fusion. Il est probable que les capacités de reconnaissances du Nb₇₅ aient été également préservées.

La production d'un nanocorps redox est, nous semble-t-il, une première. Sa fonction finale de relais électronique entre l'électrode et l'enzyme, ainsi que l'efficacité des chaînes Fc-PEG qu'il porte comme cosubstrat redox ne pourront être testées de manière pratique que lors de son intégration dans le système organisé sur GFLV.

Ayant maintenant en main ces deux types de nanocorps nous pourrions passer à l'assemblage du système sur électrode via la mise au point d'un protocole « bottom-up », qui fait l'objet du chapitre suivant.

Bibliographie

- (1) Torbensen, K.; Patel, A. N.; Anne, A.; Chovin, A.; Demaille, C.; Bataille, L.; Michon, T.; Grelet, E. Immuno-Based Molecular Scaffolding of Glucose Dehydrogenase and Ferrocene Mediator on Fd Viral Particles Yields Enhanced Bioelectrocatalysis. *ACS Catal* **2019**, *9* (6), 5783–5796. <https://doi.org/10.1021/acscatal.9b01263>.
- (2) Paiva, T. O.; Torbensen, K.; Patel, A. N.; Anne, A.; Chovin, A.; Demaille, C.; Bataille, L.; Michon, T. Probing the Enzymatic Activity of Individual Biocatalytic Fd-Viral Particles by Electrochemical-Atomic Force Microscopy. *ACS Catal* **2020**, *10* (14), 7843–7856. <https://doi.org/10.1021/acscatal.0c01920>.
- (3) Paiva, T. O.; Schneider, A.; Bataille, L.; Chovin, A.; Anne, A.; Michon, T.; Wege, C.; Demaille, C. Enzymatic Activity of Individual Bioelectrocatalytic Viral Nanoparticles: Dependence of Catalysis on the Viral Scaffold and Its Length. *Nanoscale* **2022**, *14* (3), 875–889. <https://doi.org/10.1039/d1nr07445h>.
- (4) Huang, Y.; Chiang, C. Y.; Lee, S. K.; Gao, Y.; Hu, E. L.; De Yoreo, J.; Belcher, A. M. Programmable Assembly of Nanoarchitectures Using Genetically Engineered Viruses. *Nano Lett* **2005**, *5* (7), 1429–1434. <https://doi.org/10.1021/nl050795d>.
- (5) Steinmetz, N. F.; Evans, D. J. Utilisation of Plant Viruses in Bionanotechnology. *Org Biomol Chem* **2007**, *5* (18), 2891–2902. <https://doi.org/10.1039/b708175h>.
- (6) Belval, L.; Hemmer, C.; Sauter, C.; Reinbold, C.; Fauny, J. D.; Berthold, F.; Ackerer, L.; Schmitt-Keichinger, C.; Lemaire, O.; Demangeat, G.; Ritzenthaler, C. Display of Whole Proteins on Inner and Outer Surfaces of Grapevine Fanleaf Virus-like Particles. *Plant Biotechnol J* **2016**, *14* (12), 2288–2299. <https://doi.org/10.1111/pbi.12582>.
- (7) Schellenberger, P.; Demangeat, G.; Lemaire, O.; Ritzenthaler, C.; Bergdoll, M.; Oliéric, V.; Sauter, C.; Lorber, B. Strategies for the Crystallization of Viruses: Using Phase Diagrams and Gels to Produce 3D Crystals of Grapevine Fanleaf Virus. *J Struct Biol* **2011**, *174* (2), 344–351. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2011.02.007>.
- (8) Schellenberger, P.; Andret-Link, P.; Schmitt-Keichinger, C.; Bergdoll, M.; Marmonier, A.; Vigne, E.; Lemaire, O.; Fuchs, M.; Demangeat, G.; Ritzenthaler, C. A Stretch of 11 Amino Acids in the BB-BC Loop of the Coat Protein of Grapevine Fanleaf Virus Is

- Essential for Transmission by the Nematode *Xiphinema* Index . *J Virol* **2010**, *84* (16), 7924–7933. <https://doi.org/10.1128/jvi.00757-10>.
- (9) Schellenberger, P.; Sauter, C.; Lorber, B.; Bron, P.; Trapani, S.; Bergdoll, M.; Marmonier, A.; Schmitt-Keichinger, C.; Lemaire, O.; Demangeat, G.; Ritzenthaler, C. Structural Insights into Viral Determinants of Nematode Mediated Grapevine Fanleaf Virus Transmission. *PLoS Pathog* **2011**, *7* (5). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002034>.
- (10) Belval, L.; Marmonier, A.; Schmitt-Keichinger, C.; Gersch, S.; Andret-Link, P.; Komar, V.; Vigne, E.; Lemaire, O.; Ritzenthaler, C.; Demangeat, G. From a Movement-Deficient Grapevine Fanleaf Virus to the Identification of a New Viral Determinant of Nematode Transmission. *Viruses* **2019**, *11* (12). <https://doi.org/10.3390/v11121146>.
- (11) Williams, K. L.; Stumpf, M.; Naiman, N. E.; Ding, S.; Garrett, M.; Gobillot, T.; Vézina, D.; Dusenbury, K.; Ramadoss, N. S.; Basom, R.; Kim, P. S.; Finzi, A.; Overbaugh, J. Identification of HIV Gp41-Specific Antibodies That Mediate Killing of Infected Cells. *PLoS Pathog* **2019**, *15* (2). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007572>.
- (12) Wenzel, E. V.; Bosnak, M.; Tierney, R.; Schubert, M.; Brown, J.; Dübel, S.; Efstratiou, A.; Sesardic, D.; Stickings, P.; Hust, M. Human Antibodies Neutralizing Diphtheria Toxin in Vitro and in Vivo. *Sci Rep* **2020**, *10* (1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-57103-5>.
- (13) Schneider, D. W.; Heitner, T.; Alieke, B.; Light, D. R.; McLean, K.; Satozawa, N.; Parry, G.; Yoo, J.; Lewis, J. S.; Parry, R. In Vivo Biodistribution, PET Imaging, and Tumor Accumulation of ⁸⁶Y- and ¹¹¹In-Antimindin/RG-1, Engineered Antibody Fragments in LNCaP Tumor-Bearing Nude Mice. *Journal of Nuclear Medicine* **2009**, *50* (3), 435–443. <https://doi.org/10.2967/jnumed.108.055608>.
- (14) Pan, X.; Zhou, P.; Fan, T.; Wu, Y.; Zhang, J.; Shi, X.; Shang, W.; Fang, L.; Jiang, X.; Shi, J.; Sun, Y.; Zhao, S.; Gong, R.; Chen, Z.; Xiao, G. Immunoglobulin Fragment F(Ab')₂ against RBD Potently Neutralizes SARS-CoV-2 in Vitro. *Antiviral Res* **2020**, *182*. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2020.104868>.
- (15) Haraya, K.; Tachibana, T.; Igawa, T. Improvement of Pharmacokinetic Properties of Therapeutic Antibodies by Antibody Engineering. *Drug Metabolism and*

- Pharmacokinetics*. Japanese Society for the Study of Xenobiotics February 1, 2019, pp 25–41. <https://doi.org/10.1016/j.dmpk.2018.10.003>.
- (16) Lee, C. H.; Lee, Y. C.; Lee, Y. L.; Leu, S. J.; Lin, L. T.; Chen, C. C.; Chiang, J. R.; Fellow, P.; Tsai, B. Y.; Hung, C. S.; Yang, Y. Y. Single Chain Antibody Fragment against Venom from the Snake *Daboia Russelii Formosensis*. *Toxins (Basel)* **2017**, *9* (11). <https://doi.org/10.3390/toxins9110347>.
- (17) Holliger, P.; Hudson, P. J. Engineered Antibody Fragments and the Rise of Single Domains. *Nature Biotechnology*. September 2005, pp 1126–1136. <https://doi.org/10.1038/nbt1142>.
- (18) Vu KB, G. M. W. L. M. S. Comparison of Llama V(H) Sequences from Conventional and Heavy Chain Antibodies. *Mol Immunol* **1997**, *34*, 1121–1131.
- (19) Siontorou, C. G. Nanobodies as Novel Agents for Disease Diagnosis and Therapy. *International Journal of Nanomedicine*. November 1, 2013, pp 4215–4227. <https://doi.org/10.2147/IJN.S39428>.
- (20) Arbabi-Ghahroudi, M. Camelid Single-Domain Antibodies: Historical Perspective and Future Outlook. *Front Immunol* **2017**, *8* (NOV). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01589>.
- (21) Muyldermans, S. Nanobodies: Natural Single-Domain Antibodies. *Annual Review of Biochemistry*. June 2013, pp 775–797. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-063011-092449>.
- (22) Harmsen, M. M.; Ruuls, R. C.; Nijman, I. J.; Niewold, T. A.; Frenken, L. G. J.; De Geus, B. *Llama Heavy-Chain V Regions Consist of at Least Four Distinct Subfamilies Revealing Novel Sequence Features*; 2000; Vol. 37. www.elsevier.com/locate/molimm.
- (23) Brilhante-da-Silva, N.; de Oliveira Sousa, R. M.; Arruda, A.; dos Santos, E. L.; Marinho, A. C. M.; Stabeli, R. G.; Fernandes, C. F. C.; Pereira, S. dos S. Camelid Single-Domain Antibodies for the Development of Potent Diagnosis Platforms. *Molecular Diagnosis and Therapy*. Adis July 1, 2021, pp 439–456. <https://doi.org/10.1007/s40291-021-00533-7>.
- (24) De Genst, E.; Silence, K.; Decanniere, K.; Conrath, K.; Loris, R.; Rg Kinne, J.; Muyldermans, S.; Wyns, L. *Molecular Basis for the Preferential Cleft Recognition by*

Dromedary Heavy-Chain Antibodies; PNAS, 2006; Vol. 103.
www.pnas.org/doi/10.1073/pnas.0505379103.

- (25) Hemmer, C.; Djennane, S.; Ackerer, L.; Hleibieh, K.; Marmonier, A.; Gersch, S.; Garcia, S.; Vigne, E.; Komar, V.; Perrin, M.; Gertz, C.; Belval, L.; Berthold, F.; Monsion, B.; Schmitt-Keichinger, C.; Lemaire, O.; Lorber, B.; Gutiérrez, C.; Muyldermans, S.; Demangeat, G.; Ritzenthaler, C. Nanobody-Mediated Resistance to Grapevine Fanleaf Virus in Plants. *Plant Biotechnol J* **2018**, *16* (2), 660–671. <https://doi.org/10.1111/pbi.12819>.
- (26) Designed Research; I, B. P. K. O.; Performed Research; I, S. G. O.; First, O. L. Structural Basis of Nanobody Recognition of Grapevine Fanleaf Virus and of Virus Resistance Loss. **2020**, *117* (20), 10848–10855. <https://doi.org/10.1073/pnas.1913681117/-/DCSupplemental>.
- (27) Cleton-Jansen, A.-M.; Goosen, N.; Vink, K.; van de Putte, P. *Cloning, Characterization and DNA Sequencing of the Gene Encoding the Mr 50000 Quinoprotein Glucose Dehydrogenase from Acinetobacter Calcoaceticus*; Springer-Verlag, 1989; Vol. 217.
- (28) Laura B. Zimmerman. Pyrroloquinoline Quinone (PQQ) Labeling Moieties for the Sensitive Detection of Biomolecules, University of Michigan, 2010.
- (29) Stines-Chaumeil, C.; Mavré, F.; Kauffmann, B.; Mano, N.; Limoges, B. Mechanism of Reconstitution/Activation of the Soluble PQQ-Dependent Glucose Dehydrogenase from *Acinetobacter Calcoaceticus*: A Comprehensive Study. *ACS Omega* **2020**, *5* (4), 2015–2026. <https://doi.org/10.1021/acsomega.9b04034>.
- (30) Zhang, L.; Miranda-Castro, R.; Stines-Chaumeil, C.; Mano, N.; Xu, G.; Mavré, F.; Limoges, B. Heterogeneous Reconstitution of the PQQ-Dependent Glucose Dehydrogenase Immobilized on an Electrode: A Sensitive Strategy for PQQ Detection down to Picomolar Levels. *Anal Chem* **2014**, *86* (4), 2257–2267. <https://doi.org/10.1021/ac500142e>.
- (31) Durand, F.; Limoges, B.; Mano, N.; Mavré, F.; Miranda-Castro, R.; Savéant, J. M. Effect of Substrate Inhibition and Cooperativity on the Electrochemical Responses of Glucose Dehydrogenase. Kinetic Characterization of Wild and Mutant Types. *J Am Chem Soc* **2011**, *133* (32), 12801–12809. <https://doi.org/10.1021/ja204637d>.

- (32) Lisdat, F. PQQ-GDH – Structure, Function and Application in Bioelectrochemistry. *Bioelectrochemistry* **2020**. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2020.107496>.
- (33) Caroline Hemmer. Développement et Utilisation de Nanobodies Dirigés Contre Le Grapevine Fanleaf Virus (GFLV) En Lutte Antivirale et Comme Biocapteur in Planta, Université de Strasbourg, 2016.
- (34) Olsthoorn, A. J. J.; Duine, J. A. Production, Characterization, and Reconstitution of Recombinant Quinoprotein Glucose Dehydrogenase. *Apoenzyme of Acinetobacter Calcoaceticus*; **1996**; Vol. 336.
- (35) Durand, F.; Stines-Chaumeil, C.; Flexer, V.; André, I.; Mano, N. Designing a Highly Active Soluble PQQ-Glucose Dehydrogenase for Efficient Glucose Biosensors and Biofuel Cells. *Biochem Biophys Res Commun* **2010**, 402 (4), 750–754. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.10.102>.
- (36) Chennit, K. Combiner Nanopuces et Microscopie Électrochimique à Force Atomique à Médiateur Lié Pour l’adressage de Biomacromolécules Individuelles, Thèse de Doctorat de l’Université Paris Diderot - Paris 7, 2018.

Chapitre III

Assemblage et caractérisation du système enzymatique formé par les enzymes PQQ-GDH immobilisées sur particules de GFLV

Au chapitre précédent, nous avons présenté au lecteur les différentes composantes du système intégré. Nous avons notamment introduit les nano-gabarits à base de particules virales de GFLV. Deux types de nanocorps ont été conjugués à l'enzyme ou au médiateur Fc-PEG pour l'assemblage régio-spécifique des composants macromoléculaires actifs sur le virus, le GDH-Nb₇₅ et le Fc-PEG-Nb₅₉-GFP.

Dans ce chapitre, notre objectif est de décrire l'assemblage des composants du système, jusqu'à l'immobilisation du GDH-Nb₇₅ uniquement. Ceci nous permettra d'obtenir un système enzymatique sur gabarit GFLV, dont l'activité catalytique sera étudiée au chapitre suivant. La décoration des virus par le Fc-PEG-Nb₅₉-GFP, aboutissant au système intégré final sera abordé ultérieurement.

1. Immobilisation du support viral sur surfaces d'or

Pour être visualisés par des techniques à sonde locale telles que l'AFM, les virus doivent être déposés sur un substrat suffisamment plat et solidement ancrés.^{1,2} L'équipe a déjà déposé des virus du genre Potyvirus sur plusieurs types de surfaces planes, ils ont pu être imagés avec succès par AFM à l'air et in situ.³⁻⁸ Dans le cas présent, la caractérisation électrochimique de

particules redox nécessite un substrat conducteur, et donc des surfaces en or ultra plates ont été choisies.

1.1. Organisation et comptage des virus adsorbés par AFM

Pour former des réseaux aléatoires de particules de GFLV, nous avons utilisé des surfaces d'électrodes d'or « template-stripped » (TS). Celles-ci sont formées en évaporant de l'or sur une surface de mica, sur laquelle plusieurs petites lames de verre sont ensuite collées. En séparant ces lames du mica, on expose alors la surface d'or initialement en contact avec le mica, qui présente une rugosité extrêmement faible, dans la gamme du nanomètre (voir partie expérimentale). Dans le cas présent les surfaces d'or ainsi fraîchement exposées ont été fonctionnalisées par une couche auto-assemblée de cystéamine, qui, exposant de nombreux groupement NH_3^+ , confère à l'électrode une charge positive de surface (Figure 1).

Des particules virales de GFLV dans un tampon phosphate à pH 7, ont alors été mises en contact avec la surface d'or TS portant la couche de cystéamine auto-assemblée (voir Figure 1). La charge négative portée par les particules virales de GFLV (pHi calculé de 6.24) favorise l'adsorption spontanée et irréversible des virions sur la surface.

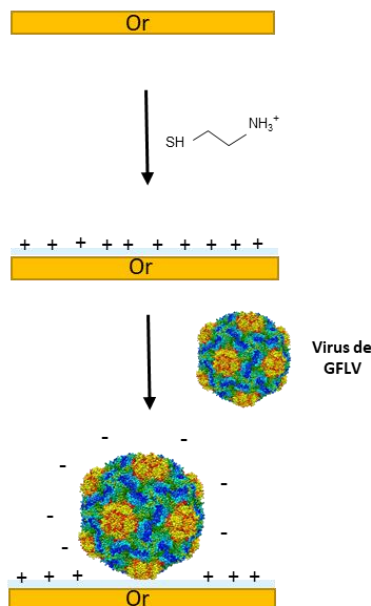


Figure 1. Adsorption du GFLV sur surfaces d'or TS cystéaminées.

1.2. Imagerie AFM des GFLV adsorbés.

Se pose maintenant la question de la vérification de la présence des virus sur la surface. Pour répondre de façon expérimentale à cette question nous avons eu recours à l'imagerie AFM. Il est courant d'utiliser cette technique de microscopie pour examiner des films minces sur des surfaces solides, car elle permet d'obtenir une résolution latérale suffisante pour visualiser des objets nanométriques.

Dans des expériences préliminaires, mais primordiales, nous avons utilisé l'imagerie AFM en mode tapping *à l'air*. Les raisons de ce choix sont que l'imagerie AFM à l'air est plus simple qu'en solution, et de surcroît le séchage de la surface peut contribuer à un meilleur ancrage des particules virales. C'est tout du moins l'expérience qu'avait l'équipe de par ses études utilisant des virus linéaires *fd* et TMV. Notons qu'il est nécessaire, pour une bonne imagerie, d'écranter les charges positives couvrant le substrat d'or, en y adsorbant de l'Albumine de Sérum Bovin (BSA), après l'immobilisation du virus. La petite taille de cette molécule fait qu'elle ne gêne en rien l'acquisition de l'image.

Comme on le voit en Figure 2, l'image topographique AFM acquise à l'air d'une surface portant GFLV/BSA montre bien des objets individuels qu'on peut assigner à des particules virales. On note que leur hauteur apparente n'est que de 5-7 nm, pour un diamètre nominal de virus de 30 nm. Cependant, on sait que lorsque l'AFM est utilisée pour visualiser des nano-objets mous, tels que les anticorps⁹ et virus,^{10,11} il est fréquent d'observer une hauteur sous-estimée, causée par la compression des objets par la pointe. Néanmoins, ici c'est surtout la forme non-sphérique (en « croissant ») des particules visibles sur l'image AFM qui est intrigante et laisse à penser que le GFLV se détériore lors du séchage de la surface. Ce comportement contraste avec celui des virus linéaires dont l'équipe avait l'habitude, qui eux résistaient parfaitement à cette étape.⁶⁻⁸

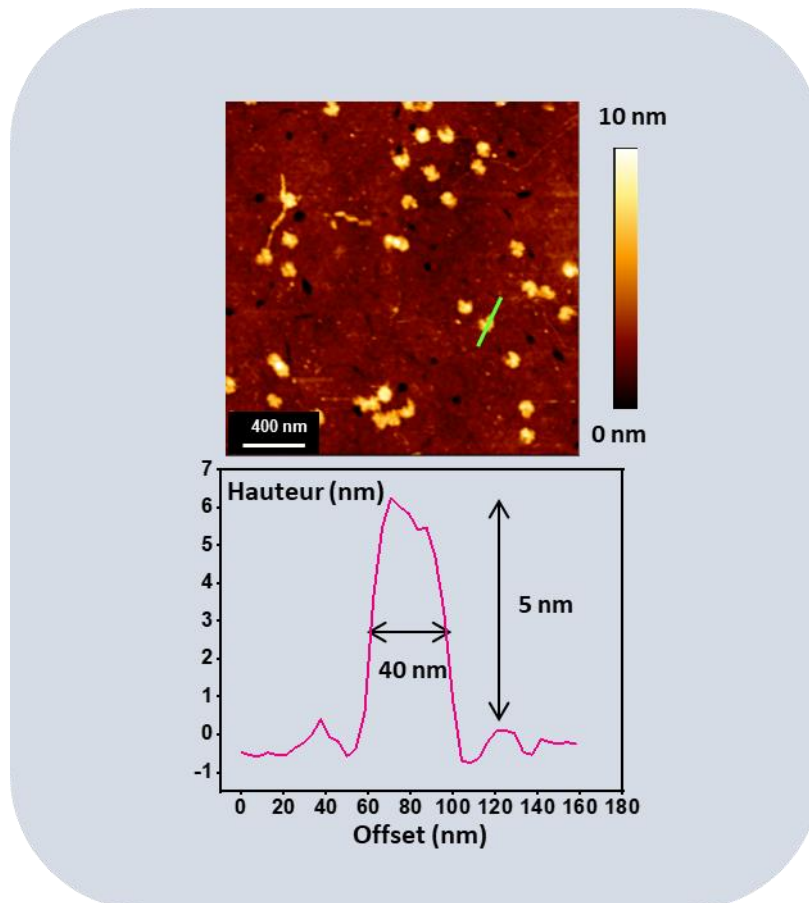


Figure 2. Image AFM en mode tapping à l'air d'une surface d'or TS cystéaminée portant GFLV et BSA. Image acquise avec un tip commerciale MultiG 75 kHz.

Abandonnant l'idée du séchage, nous avons utilisé l'imagerie AFM tapping in situ (i.e. en solution aqueuse) dans du tampon PO_4 (10mM, pH = 7) pour évaluer l'adsorption de ces nanoparticules virales sur les surfaces d'or fonctionnalisées par la cystéamine (puis BSA). Pour procéder à l'imagerie, nous avons utilisé d'une part des sondes AFM (tips) commerciales en nitrure de silicium, et d'autre part des tips d'or fabriquées au laboratoire (voir partie expérimentale). Ces deux types de sondes ont en commun une faible constante de raideur, de l'ordre de 0.1 N/m.

Avec la tip commerciale, des images telles que celle présentée en Figure 3A ont été systématiquement obtenues. Elles laissent uniquement apparaître la topographie de la surface d'or, montrant que le virus est chassé par la tip. A contrario, avec la tip d'or fabriquée au laboratoire, des images comme celle reproduite en Figure 3B sont obtenues.

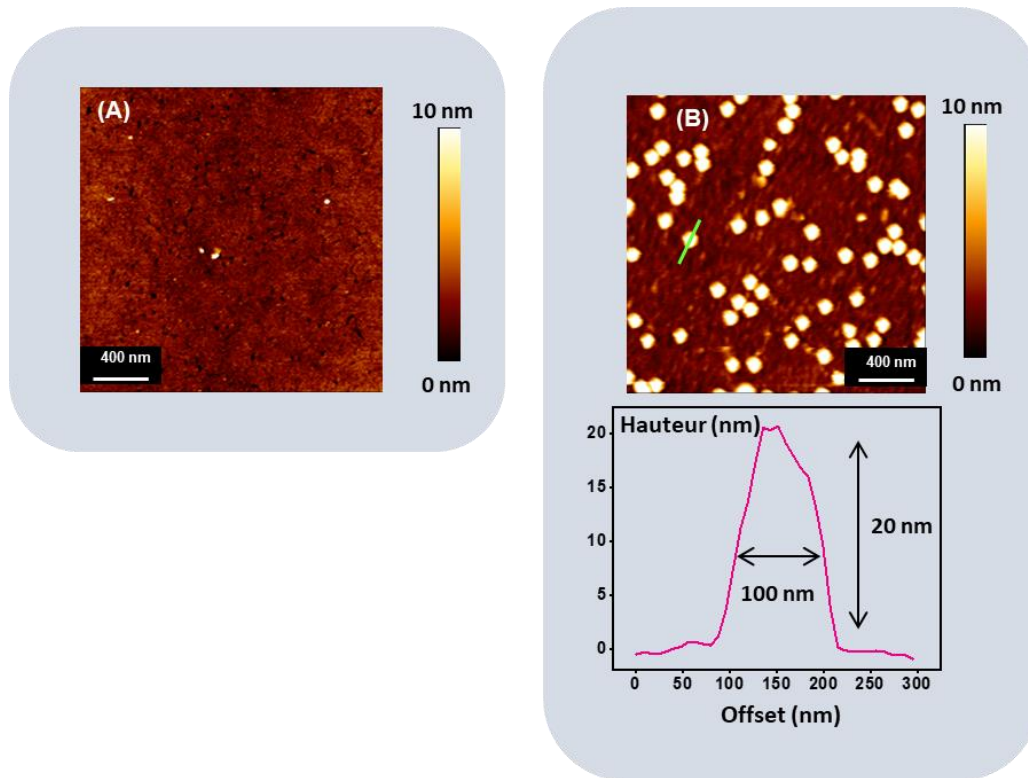


Figure 3. Image AFM en mode tapping in-situ d'une surface d'or TS cystéaminée portant GFLV et BSA. Image acquise avec (A) une tip commerciale. (B) Une tip d'or faite maison

La structure du virus y paraît intacte, puisque les particules virales ont une hauteur apparente de 20 nm. La largeur apparente des particules virales (~100 nm) est surestimée en raison de l'effet de convolution de la pointe, commun à toutes les techniques d'AFM. Dans le cas d'une pointe AFM sphérique de rayon R_{tip} imageant un objet cylindrique de rayon R_0 , la largeur apparente de l'objet, w , est donnée par l'expression suivante (voir Figure 4) :

$$W = 4\sqrt{R_{tip}R_0}$$

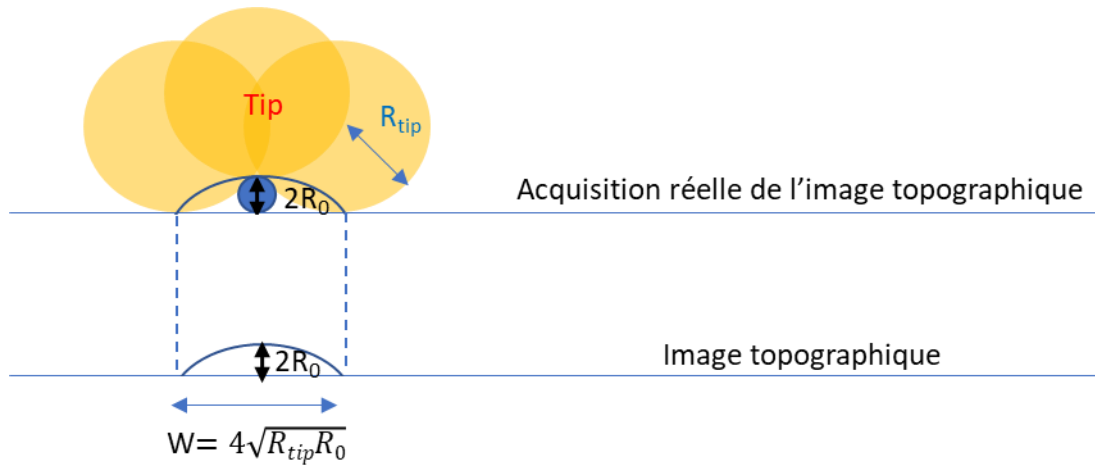


Figure 4. Schéma représentatif de l'effet de convolution lié à la pointe. En admettant que le virus est un objet cylindrique non compressible de rayon R_0 , la largeur apparente du virus w s'obtient à l'aide de la formule $w = 4\sqrt{R_{tip}R_0}$ où R_{tip} représente le rayon de la pointe.

Ainsi, en considérant que le rayon des sondes AFM que nous avons utilisées est de 20-40 nm, on s'attend à une largeur de la particule de GFLV se situant entre 100-120 nm, ce qui est en bon accord avec la largeur mesurée en Figure 3B. Ces résultats valident clairement l'usage des sondes d'or « faites maison », pour toutes nos études ultérieures en AFM in-situ.

A partir de l'analyse de plusieurs images AFM réalisées en utilisant ces tips d'or, une couverture surfacique égale à 18 particules/ μm^2 a été déterminée.

Avant d'utiliser cette configuration en routine pour « compter » les particules de GFLV, il nous faut nous assurer que la tip d'or fabriquée au laboratoire permet de bien détecter **toutes** les particules virales en surface. C'est-à-dire qu'elle n'en chasse pas certaines (les plus faiblement ancrées), comme le faisait de manière drastique la pointe du commerce. Afin de répondre à cette question, nous avons traité la surface une fois le virus adsorbé avec un agent fixant, le glutaraldéhyde. Ce dernier est capable de former des liaisons covalentes avec les groupements NH_2 disponibles en surface (ceux à la périphérie du virus et aussi ceux de la cystéamine). Etant homobifonctionnel, le glutaraldéhyde peut ainsi lier entre eux des NH_2 voisins. Si ceux-ci sont portés par le virus, ce dernier devient plus rigide par réticulation. Une liaison entre les NH_2 de la cystéamine et ceux du virus peut également se former, renforçant l'ancrage du virus sur la surface. Le virus est ainsi rendu moins susceptible d'être altéré par la pointe ou déplacé par celle-ci.

La Figure 5 montre une image AFM des particules virales ainsi réticulées par le glutaraldéhyde. On voit que leur aspect sphérique est conservé et leur hauteur est de l'ordre de 20 nm comme attendu. On voit que leur nombre est beaucoup plus grand que celui des virus non traités au glutaraldéhyde (50 particules/ μm^2 pour une même concentration de virus utilisée). On peut alors conclure que pour imager le virus d'une façon représentative et reproductible, il faut traiter les surfaces par le glutaraldéhyde.

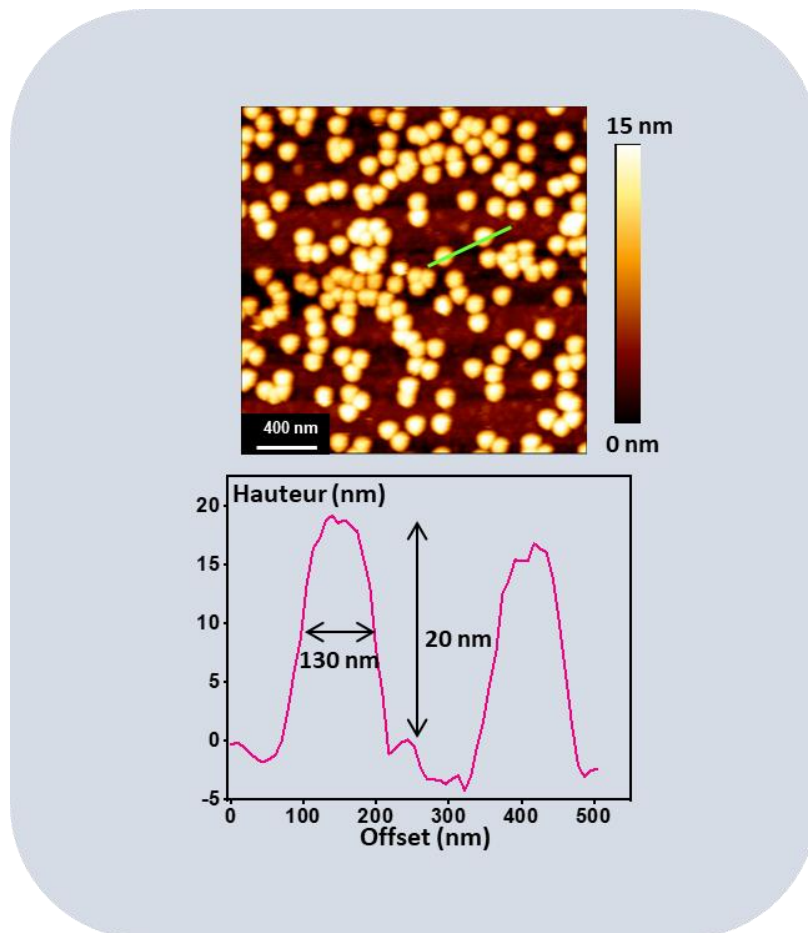


Figure 5. Image AFM en mode tapping in-situ d'une surface d'or TS cystéaminée portant GFLV et BSA traitée au glutaraldéhyde. Image acquise avec (A) une tip commerciale. (B) Une tip d'or faite maison

Finalement, toujours parce qu'elle est plus simple à mettre en oeuvre, nous avons voulu savoir si le traitement au glutaraldéhyde rendait les virus (et leur ancrage) suffisamment robustes pour être maintenant imageable en AFM mode tapping à l'air. L'image topographique correspondante est présentée en Figure 6, elle est à comparer à celle d'une surface portant des virus réticulés et imagés in situ, reproduite en Figure 5. On voit que cette fois ci, même à l'air les virus conservent leur forme, et que leur couverture surfacique (50 particules/ μm^2) est restée

la même, montrant qu'ils ne sont pas relargués par le séchage. Les virus paraissent peu large en raison de la grande finesse des pointes commerciales.

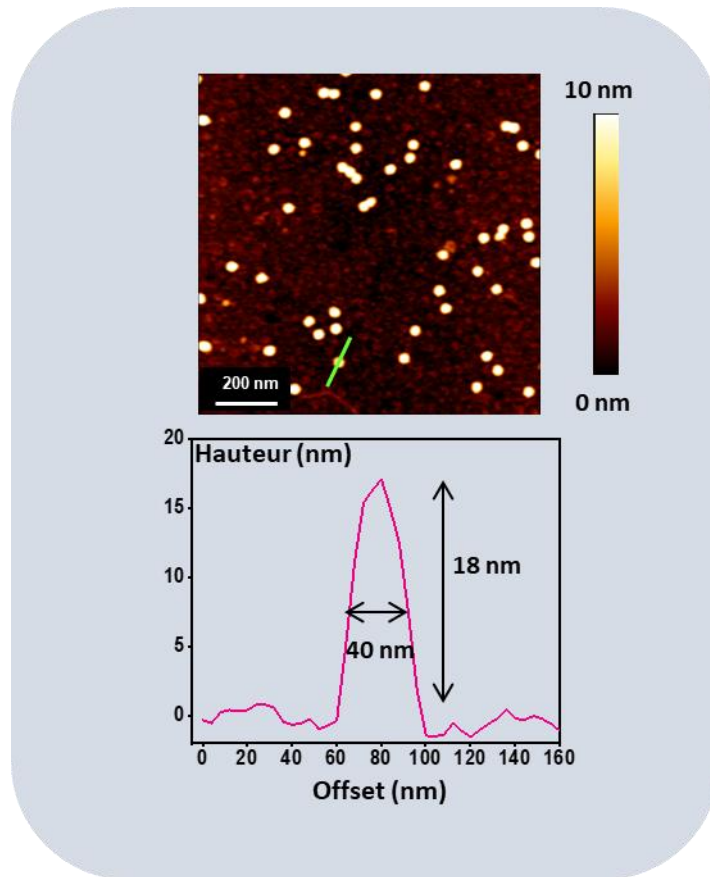


Figure 6. Image AFM en mode tapping à l'air d'une surface d'or TS cystéaminée portant GFLV et BSA traités au glutaraldéhyde. Image acquise avec un tip commerciale MultiG 75 kHz

Ainsi la réticulation de la surface par le glutaraldéhyde permet-elle de visualiser la présence des virus en surface mais aussi d'obtenir leur couverture de manière fiable par simple comptage. Cependant, notons dès maintenant que, comme le traitement au glutaraldéhyde est susceptible de compromettre la reconnaissance ultérieure des GFLV par les nanocorps, il ne sera possible d'imager les surfaces qu'en toute dernière étape de l'assemblage. Aussi est-il utile de construire en premier lieu une isotherme d'adsorption, consistant à relier la couverture du virus en surface, γ_{vir} , à la concentration en particules virales dans la solution d'adsorption.

Nous avons ainsi pu établir l'isotherme caractérisant l'adsorption du virus GFLV sur ces surfaces de façon reproductible (voir Figure 7). A partir de cette courbe nous pourrions aisément

contrôler la couverture surfacique du virus à partir de sa concentration dans la solution d'adsorption.

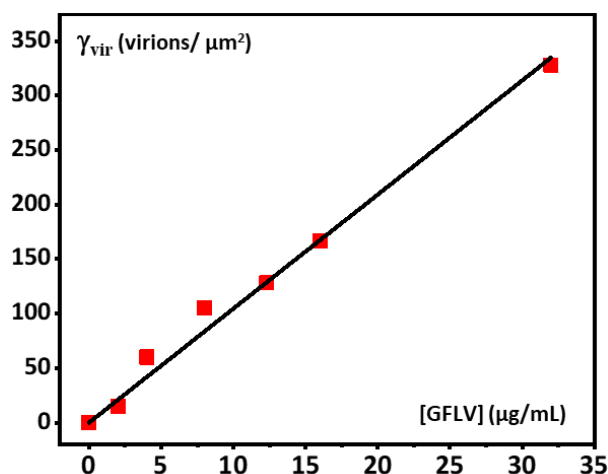


Figure 7. Isotherme d'adsorption du GFLV sur surfaces d'or TS cystéaminée telle que mesurée par comptage sur images AFM tapping à l'air.

1.3. Protection de la surface d'or par des agents bloquants de l'adsorption non spécifique des nanocorps

Outre le problème d'immobilisation du virus, les méthodes d'immunomarquage sur surface, pour « douces » et pratiques qu'elles soient, requièrent cependant que l'adsorption *non-spécifique* des nanocorps sur la surface d'or soit inhibée aussi complètement que possible. Ces adsorptions non souhaitées se produisent lorsque les nanocorps s'adsorbent directement à la surface d'or, plutôt que sur les particules de GFLV, en raison de forces physiques ou chimiques non spécifiques. Ce problème peut être quantitativement important car de nombreux sites d'adsorption sont laissés libres sur la surface, entre les particules de GFLV.

Ainsi, pour éviter ce phénomène, les sites d'adsorption de la surface sont typiquement saturés par une protéine ou une molécule n'interférant pas avec la réaction d'immunomarquage. Dans ce contexte, la BSA (Albumine de Sérum Bovin), qui est une protéine de blocage couramment utilisée vu sa bonne capacité de blocage et sa faible réactivité croisée avec la plupart des échantillons, a été testée. Les résultats révèlent que cette protéine ne permet pas un blocage total, car environ 13 % des adsorptions restent non spécifiques. Notons qu'il s'agit là d'une difficulté supplémentaire par rapport aux travaux antérieurs de l'équipe, qui utilisaient

des anticorps dont l'adsorption non-spécifique sur surface d'or cystéaminée était très efficacement bloqué par la BSA ! Cette différence s'explique sans doute par la taille plus faible des nanocorps, qui accèdent plus facilement à des sites d'adsorption laissés libres entre les molécules de BSA.

En réponse à cette inefficacité, d'autres agents de blocage ont été testés, notamment la gélatine de poisson et la caséine. La gélatine de poisson est une alternative courante à la BSA, mais elle s'est avérée dans notre cas présent inefficace, car environ 19 % des adsorptions restent non spécifiques. Elle a également influencé l'adsorption des virus sur la surface d'or, conduisant ainsi à une couverture virale moins importante et non reproductible. Sans doute la gélatine de poisson déplace-t-elle une partie des GFLV adsorbés. De plus, une fois que l'enzyme est immobilisée sur le virus dans les étapes ultérieures, le courant catalytique par virus obtenu en utilisant ce type de blocage est anormalement faible.

Concernant la caséine, bien qu'elle soit plus efficace que les deux autres agents testés, elle n'est pas idéale, car malgré qu'elle ait montré un taux d'adsorption non spécifique plus faible, d'environ 2 %, elle a également influencé négativement l'adsorption virale sur la surface, conduisant à une couverture virale moins importante et non reproductible.

En somme, les résultats de ces tests montrent que plusieurs agents de blocage classiques et protocoles ont été soit jugés incompatibles avec l'assemblage de l'ensemble GFLV, soit fournissant une protection insuffisante contre l'adsorption non spécifique des protéines ultérieurement utilisées dans le processus d'assemblage. D'où l'importance de choisir un agent de blocage approprié pour minimiser les interactions non spécifiques.

Dans notre cas nous sommes revenus à la BSA, tout en la complétant par une protéine de blocage de taille similaire ou inférieure à celle des nanocorps, pour bien bloquer tous les sites accessibles sur la surface. Nous avons ainsi observé que la meilleure protection contre les adsorptions non spécifiques était obtenue par l'adsorption séquentielle de l'albumine de sérum de bovine (BSA) et de B₂-GFP. Cette protéine est une fusion génétique entre le domaine de liaison à l'ARN double brin de la protéine B₂ du « Flock House virus » et la protéine fluorescente verte (GFP), elle a été sélectionnée ici uniquement pour sa grande solubilité, sa petite taille (36 kDa) et, comme nous l'avons montré, sa propriété de blocage supérieure.¹²

2. Immobilisation des enzymes PQQ-GDH sur particules virales.

La surface a ensuite été incubée avec le conjugué GDH-Nb₇₅ fait maison.

La concentration et le temps d'exposition ont été choisis de manière à ce que la couverture en GDH-Nb₇₅ atteigne la saturation (15 µg/ml, ~ 2 h).

2.1. Caractérisation du marquage enzymatique des particules de GFLV

Nous avons examiné la surface d'or portant les virus GFLV à capsid marquée par voltammétrie cyclique. Pour se faire, la surface a été montée en tant qu'électrode de travail dans une cellule électrochimique à trois électrodes standards remplie de tris 50 mM, pH = 7,5. Des voltammogrammes cycliques ont ensuite été enregistrés en balayant le potentiel de l'électrode, E , de + 0 à + 0,35 V/SCE et retour, après que le ferrocènediméthanol (Fc) et le glucose (G) aient été ajoutés séquentiellement à la cellule, Figure 8A.

Une concentration très faible (3 µM) de ferrocènediméthanol a été sélectionnée initialement, car il est connu que l'activité enzymatique de PQQ-GDH immobilisé sur l'électrode est plus facile à mettre en évidence dans ce cas.¹³ Le CV enregistré en l'absence de glucose, $i_o(E)$, est la somme du courant dû à la diffusion du Fc et du signal de fond capacitif de l'électrode (Figure 8A, tracé rouge). Après correction du signal capacitif enregistré dans une solution contenant uniquement le tampon, le CV diffusif du Fc a été obtenu (encart en Figure 8A). Il présentait la paire de pics de courant attendue, centrée autour du potentiel standard du ferrocènediméthanol ($E^\circ = 0,230 \pm 5 \text{ mV/SCE}$),¹⁴ et séparée par ~60 mV. Ces caractéristiques sont typiques d'une espèce subissant un transfert électronique rapide avec l'électrode en or.

Lors de l'ajout de glucose à la solution, le courant a considérablement augmenté en intensité et a développé une forme en S bien définie (courbe bleue en Figure 8A). Ce comportement témoigne de la survenue d'un cycle électro-catalytique à l'électrode. La forme oxydée de ferrocènediméthanol, le ferrocénium (Fc⁺), produite lors du balayage anodique du potentiel de l'électrode, est utilisée comme cosubstrat par les molécules de GDH portées par le virion pour oxyder le glucose en gluconolactone (GL), Figure 8B. L'observation d'un signal en forme de S garantit que le courant reflète uniquement l'activité enzymatique, sans interférence avec la diffusion du cosubstrat¹⁵. Nous avons vérifié qu'en absence de ferrocènediméthanol dans la solution, aucun courant catalytique n'a été enregistré, démontrant que Fc⁺ était nécessaire pour transporter les électrons de l'électrode à l'enzyme PQQ-GDH.

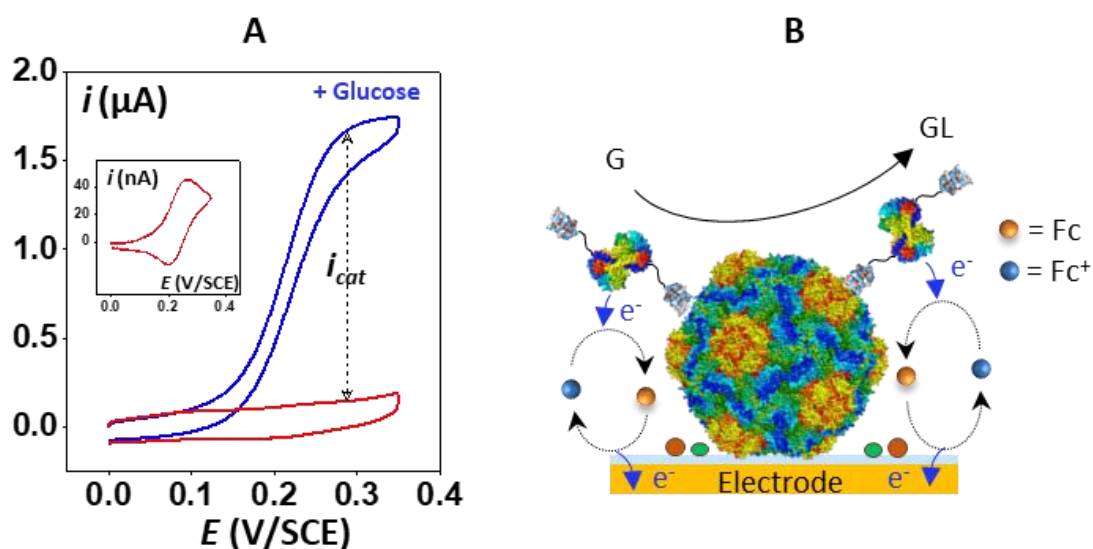


Figure 8. (A) Voltammogrammes cycliques enregistrés sur une électrode en or TS portant des particules de GLFV décorées par la protéine de fusion GDH-Nb₇₅, en présence de 3 μM de ferrocènediméthanol (Fc), à la fois avant (courbe rouge) et après (courbe bleue) l'injection de glucose (G) jusqu'à une concentration de 3 mM. L'encart montre le voltammogramme avant ajout de glucose, corrigé du courant de fond capacitif. (B) Schéma des particules décorées et du cycle catalytique déclenché par l'injection de glucose : l'enzyme convertit le glucose en gluconolactone (GL) en utilisant la forme oxydée du ferrocènediméthanol (Fc^+) produite par l'électrode comme cosubstrat rédox. Tampon Tris-HCl pH 7,5 à 50 mM. Vitesse de balayage du potentiel = 20 mV/s. T = 25 °C.

L'intensité du courant de plateau catalytique, $i_{cat,pl}$, défini comme l'intensité du courant de plateau du voltammogramme, i_{pl} , corrigé de la faible intensité enregistrée en absence de glucose, augmente lorsque la couverture de virus décorés sur la surface augmente (Figure 9).

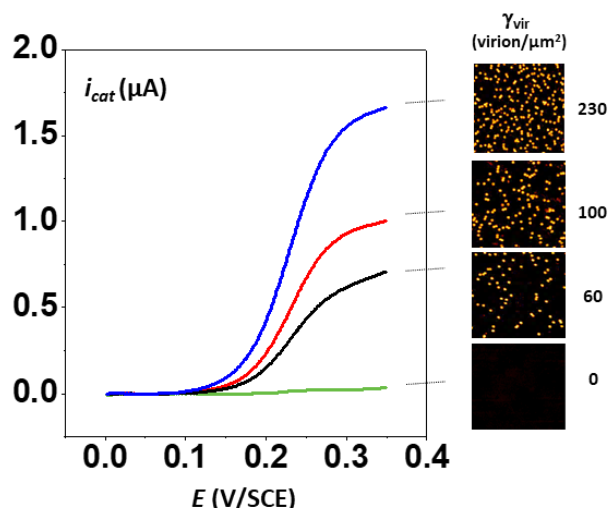


Figure 9. Voltammogrammes enregistrés en présence de 3 μM de Fc et 3 mM de glucose à une électrode en or TS portant des particules virales de GFLV décorées par la protéine de fusion GDH-Nb₇₅ à différentes densités de couverture de surface, γ_{vir} , comme indiqué. Les densités de couverture virale ont été déterminées en comptant les virions à partir des images AFM, comme indiqué. Tampon Tris-HCl pH 7,5 à 50 mM. Vitesse de balayage du potentiel = 20 mV/s. T = 25 °C.

Plus précisément, une relation linéaire d' $i_{cat, pl}$ avec γ_{vir} a été obtenue, avec une valeur d'ordonnée à l'origine très faible (Figure 10). Ce résultat confirme que l'enzyme était *sélectivement* immobilisée sur les particules de GFLV adsorbées sur la surface par reconnaissance moléculaire de la capsid du virus par GDH-Nb₇₅, avec un très faible niveau d'adsorption non spécifique de la protéine de fusion sur la surface de l'électrode

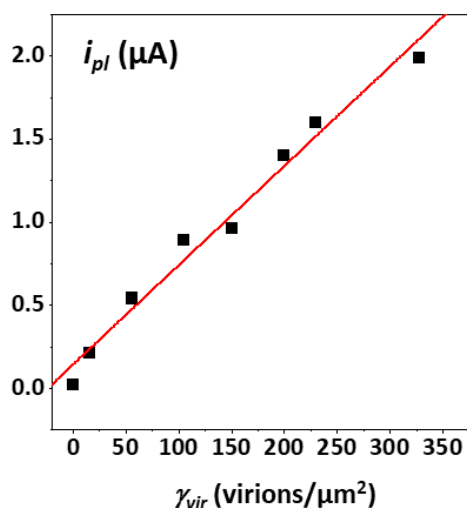


Figure 10. Dépendance de l'intensité du courant de plateau catalytique, $i_{cat, pl}$, en fonction de la couverture en particules de GFLV décorées par GDH-Nb₇₅, γ_{vir} . Courant mesuré dans une solution tampon contenant 3 μM de Fc et 3 mM de glucose.

Tout au long de ce travail, nous avons périodiquement testé l'activité catalytique du système par CV afin d'étudier sa stabilité lors du stockage. Le système était conservé à 4 °C dans une solution contenant 1 mg/mL de BSA et 0,01% (p/v) de NaN₃. Nous avons observé que le plateau catalytique obtenu par CV diminuait de quelques 10% au bout de trois jours de stockage du système (voir Figure 11). Le système peut donc être considéré comme parfaitement stable à l'échelle de temps de nos caractérisations.

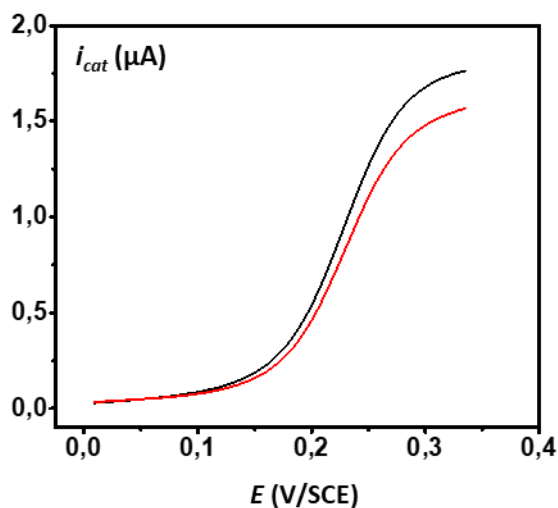


Figure 11. Test de stabilité du système. Voltammogrammes enregistrés en présence de 3 μM de Fc et 3 mM de glucose sur une électrode en or TS portant des particules virales de GFLV décorés par la protéine de fusion GDH-Nb₇₅. Courbe noire : voltammogramme enregistré le même jour de la construction du système. Courbe rouge : Voltammogramme enregistré 3 jours après la construction (électrode stockée à 4°C). Tampon Tris-HCl pH 7,5 à 50 mM. Vitesse de balayage du potentiel = 20 mV/s. T = 25 °C

2.2. Quantification du nombre de PQQ-GDH décorant les particules de GFLV

La quantification du nombre de molécules d'enzyme décorant chaque particule a été réalisée en dosant spectrophotométriquement la quantité de cofacteur PQQ de l'enzyme relargué des surfaces d'or portant des réseaux de particules de GFLV décorées. Sachant que chaque enzyme contient deux molécules de PQQ, la quantité de molécules PQQ-GDH initialement présentes sur chaque surface (N_{GDH}) a été obtenue en divisant simplement la quantité de PQQ dosée par un facteur 2. Cette procédure a été appliquée à plusieurs surfaces d'or différant par leur couverture virale. La quantité de PQQ-GDH a ensuite été convertie en une couverture globale de GDH (γ_{GDH}), pour chaque surface ($\gamma_{GDH} = N_{GDH} / S$, où S est la surface géométrique de l'électrode). En Figure 12, γ_{GDH} est porté en fonction de γ_{vir} , on voit que γ_{GDH} augmente linéairement avec γ_{vir} .

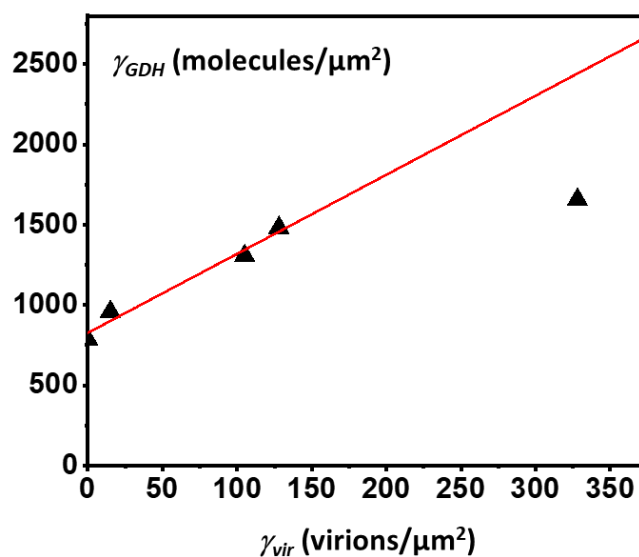


Figure 12. Dépendance de la couverture de la surface en GDH, γ_{GDH} , en fonction de celle en particules de GFLV décorées par GDH-Nb₇₅, γ_{vir} .

Le nombre moyen de molécules de GDH immobilisées par virion de GFLV est donné par la pente de cette variation linéaire, soit 5 ± 1 GDH par virion. Ce nombre est plutôt faible si l'on considère que 60 épitopes de Nb₇₅ sont présents sur chaque particule de GFLV.¹⁶ Un tel résultat est en partie la conséquence de l'immobilisation des virions à la surface de l'or et d'une étape de blocage supplémentaire qui empêche inévitablement l'accès de la GDH-Nb₇₅ aux épitopes cachés (c'est-à-dire ceux engagés dans les interactions de la surface de l'or activées par la cystéamine de la GFLV). Il est également possible que les étapes d'immobilisation conduisent à une dénaturation partielle des virions, entraînant la perte de sites de liaison pour GDH-Nb₇₅. On ne peut pas non plus exclure que la GDH-Nb₇₅ ait une capacité réduite à se lier à la GFLV par rapport au Nb₇₅ natif/non fusionné. La formation de l'immunocomplexe Nb₇₅-GFLV exige que l'extrémité N-terminale du nanocorps soit orientée vers la capsid du virus,¹⁶ ce qui peut avoir été partiellement entravé ici par la présence de GDH à cette extrémité. Si c'est le cas, cet effet pourrait être atténué en augmentant la longueur de l'élément de liaison séparant les deux protéines dans la fusion.

Nous notons également, à partir de la Figure 12, que la relation linéaire entre γ_{GDH} et γ_{vir} est caractérisée par une ordonnée à l'origine non nulle, ce qui peut indiquer soit un décalage de mesure systématique, soit la présence de traces de contaminant PQQ dans les échantillons, ou encore de molécules de GDH contenant du PQQ adsorbées de manière non spécifique sur la surface. Dans ce dernier cas, les molécules de GDH adsorbées seraient nécessairement

catalytiquement inactives, car en l'absence de virus, aucune catalyse n'a été enregistrée (Figure 10). Elles ne seraient donc d'aucune importance pour le reste de l'étude.

Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons exposé les premières étapes de l'assemblage du système intégré. Nous avons tout d'abord procédé à l'immobilisation du virus sur une surface en or. Ensuite, nous avons effectué un blocage de la surface en utilisant de la BSA-B₂GFP. Une fois la surface correctement bloquée, nous avons procédé à l'immobilisation de la GDH-Nb₇₅. Parallèlement, nous avons utilisé un cosubstrat soluble en solution (le ferrocène Fc) pour évaluer le bon fonctionnement du système construit.

Les résultats obtenus sont encourageants, ouvrant la possibilité d'une étude cinétique approfondie du fonctionnement de la GDH échafaudée sur particules de GFLV

Bibliographie

- (1) Baclayon, M.; Wuite, G. J. L.; Roos, W. H. Imaging and Manipulation of Single Viruses by Atomic Force Microscopy. *Soft Matter*. November 7, 2010, pp 5273–5285. <https://doi.org/10.1039/b923992h>.
- (2) Kuznetsov, Y. G.; McPherson, A. Atomic Force Microscopy in Imaging of Viruses and Virus-Infected Cells. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **2011**, *75* (2), 268–285. <https://doi.org/10.1128/mmbr.00041-10>.
- (3) Torrance, L.; Andreev, I. A.; Gabrenaite-Verhovskaya, R.; Cowan, G.; Mäkinen, K.; Taliansky, M. E. An Unusual Structure at One End of Potato Potyvirus Particles. *J Mol Biol* **2006**, *357* (1), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.12.021>.
- (4) Obraztsova, E. A.; Kalinina, N. O.; Taliansky, M. E.; Gabrenaite-Verkhovskaya, R.; Makinen, K.; Yaminsky, I. V. Atomic Force Microscopy of Potato Virus A. *Colloid Journal* **2008**, *70* (2), 199–201. <https://doi.org/10.1134/s1061933x08020129>.
- (5) Kiselyova, O. I.; Yaminsky, I. V.; Karpova, O. V.; Rodionova, N. P.; Kozlovsky, S. V.; Arkhipenko, M. V.; Atabekov, J. G. AFM Study of Potato Virus X Disassembly Induced by Movement Protein. *J Mol Biol* **2003**, *332* (2), 321–325. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(03\)00835-0](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(03)00835-0).
- (6) Torbensen, K.; Patel, A. N.; Anne, A.; Chovin, A.; Demaille, C.; Bataille, L.; Michon, T.; Grelet, E. Immuno-Based Molecular Scaffolding of Glucose Dehydrogenase and Ferrocene Mediator on Fd Viral Particles Yields Enhanced Bioelectrocatalysis. *ACS Catal* **2019**, *9* (6), 5783–5796. <https://doi.org/10.1021/acscatal.9b01263>.
- (7) Paiva, T. O.; Torbensen, K.; Patel, A. N.; Anne, A.; Chovin, A.; Demaille, C.; Bataille, L.; Michon, T. Probing the Enzymatic Activity of Individual Biocatalytic Fd-Viral Particles by Electrochemical-Atomic Force Microscopy. *ACS Catal* **2020**, *10* (14), 7843–7856. <https://doi.org/10.1021/acscatal.0c01920>.
- (8) Paiva, T. O.; Schneider, A.; Bataille, L.; Chovin, A.; Anne, A.; Michon, T.; Wege, C.; Demaille, C. Enzymatic Activity of Individual Bioelectrocatalytic Viral Nanoparticles:

- Dependence of Catalysis on the Viral Scaffold and Its Length. *Nanoscale* **2022**, *14* (3), 875–889. <https://doi.org/10.1039/d1nr07445h>.
- (9) San Paulo, A.; García, R. High-Resolution Imaging of Antibodies by Tapping-Mode Atomic Force Microscopy: Attractive and Repulsive Tip-Sample Interaction Regimes. *Biophys J* **2000**, *78* (3), 1599–1605. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(00\)76712-9](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(00)76712-9).
- (10) Knez, M.; Sumser, M. P.; Bittner, A. M.; Wege, C.; Jeske, H.; Hoffmann, D. M. P.; Kuhnke, K.; Kern, K. Binding the Tobacco Mosaic Virus to Inorganic Surfaces. *Langmuir* **2004**, *20* (2), 441–447. <https://doi.org/10.1021/la035425o>.
- (11) Xu, X.; Carrasco, C.; De Pablo, P. J.; Gomez-Herrero, J.; Raman, A. Unmasking Imaging Forces on Soft Biological Samples in Liquids When Using Dynamic Atomic Force Microscopy: A Case Study on Viral Capsids. *Biophys J* **2008**, *95* (5), 2520–2528. <https://doi.org/10.1529/biophysj.108.132829>.
- (12) Monsion, B.; Incarbone, M.; Hleibieh, K.; Poignavent, V.; Ghannam, A.; Dunoyer, P.; Daeffler, L.; Tilsner, J.; Ritzenthaler, C. Efficient Detection of Long DsRNA in Vitro and in Vivo Using the DsRNA Binding Domain from FHV B2 Protein. *Front Plant Sci* **2018**, *9*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00070>.
- (13) Zhang, L.; Miranda-Castro, R.; Stines-Chaumeil, C.; Mano, N.; Xu, G.; Mavré, F.; Limoges, B. Heterogeneous Reconstitution of the PQQ-Dependent Glucose Dehydrogenase Immobilized on an Electrode: A Sensitive Strategy for PQQ Detection down to Picomolar Levels. *Anal Chem* **2014**, *86* (4), 2257–2267. <https://doi.org/10.1021/ac500142e>.
- (14) Zevenbergen, M. A. G.; Wolfrum, B. L.; Goluch, E. D.; Singh, P. S.; Lemay, S. G. Fast Electron-Transfer Kinetics Probed in Nanofluidic Channels. *J Am Chem Soc* **2009**, *131* (32), 11471–11477. <https://doi.org/10.1021/ja902331u>.
- (15) Bourdillon, C.; Demaille, C.; Gueris, J.; Moiroux, J.; Saveant, J. M. A Fully Active Monolayer Enzyme Electrode Derivatized by Antigen-Antibody Attachment. *J Am Chem Soc* **1993**, *115* (26), 12264–12269. <https://doi.org/10.1021/ja00079a005>.
- (16) Designed Research; I, B. P. K. O.; Performed Research; I, S. G. O.; First, O. L. Structural Basis of Nanobody Recognition of Grapevine Fanleaf Virus and of Virus Resistance Loss. **2020**, *117* (20), 10848–10855. <https://doi.org/10.1073/pnas.1913681117/-/DCSupplemental>

Chapitre IV

Etude cinétique du système non-intégré formé par les enzymes PQQ-GDH immobilisées sur particules de GFLV

Au chapitre précédent, nous avons présenté au lecteur les premières étapes de l'assemblage du système intégré, allant jusqu'à l'immobilisation sélective de la GDH-Nb₇₅ sur les particules de GFLV.

Dans la suite nous qualifierons ce système, comprenant l'enzyme mais pas (encore) le médiateur immobilisé, de « non-intégré ».

L'étude de son fonctionnement cinétique constitue un pré-requis indispensable à celui du système intégré final. En effet cette étude, objet du présent chapitre, permet d'évaluer *spécifiquement* l'effet de l'immobilisation de l'enzyme sur son fonctionnement catalytique. Elle nécessite l'utilisation du médiateur soluble ferrocènediméthanol.

Une fois que nous aurons mis en évidence la présence (ou l'absence) de modulation du fonctionnement de l'enzyme par sa simple immobilisation sur GFLV, nous pourrons nous intéresser à l'effet de la co-immobilisation du cosubstrat sur l'activité enzymatique. Cela fera l'objet d'un chapitre à venir.

1. Analyse du fonctionnement cinétique de la glucose déshydrogénase immobilisée sur particule virale de GFLV

Nous avons mené une caractérisation cinétique approfondie de l'activité enzymatique de la PQQ-GDH immobilisée sur particule virale de GFLV, en enregistrant la réponse électrocatalytique de plusieurs surfaces en or portant des particules de GFLV décorées par des GDH-Nb₇₅, en présence de ferrocènediméthanol, pour une large gamme de concentrations de glucose. La Figure 1 présente l'ensemble de CV catalytiques enregistrés sur deux de ces surfaces, soit en présence d'une faible (3 μM , Figures 1(A) et 1(B)) soit en présence d'une forte (300 μM , Figures 1(C) et 1(D)) concentration en ferrocènediméthanol, $[\text{Fc}]_b$. Ces concentrations largement différentes ont été choisies de manière à permettre a priori l'observation des deux régimes catalytiques de la PQQ-GDH. À faible concentration de médiateur, cette enzyme est connue pour se comporter de manière non-coopérative, c'est-à-dire que chacune de ses deux sous-unités fonctionne de manière indépendante. Alors qu'à forte concentration de médiateur, l'enzyme fonctionne de manière coopérative, c'est-à-dire que la liaison d'une molécule de glucose au site actif d'une sous-unité améliore l'activité de l'autre¹.

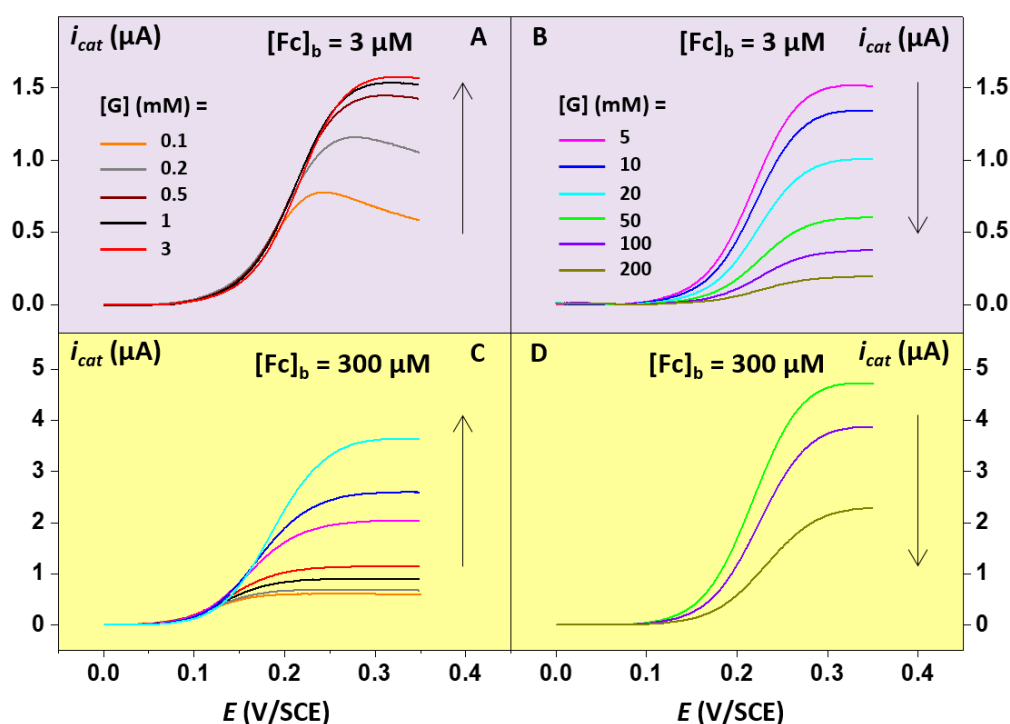


Figure 1. Voltamogrammes catalytiques, i_{cat} vs. E , d'électrodes d'or portant des particules de GFLV décorées par GDH-Nb₇₅, enregistrés en présence de ferrocènediméthanol (Fc) à 3 μM (A, B) ou à 300 μM (C,D), pour différentes concentrations en glucose, $[G]$, telles qu'indiquées. En (A), (B), $\gamma_{vir} = 280$ virions/ μm^2 en (C), (D) $\gamma_{vir} = 40$ virions/ μm^2 . Tampon Tris-HCL pH = 7,5 à 50 mM. Vitesse de balayage du potentiel = 20 mV/s. T = 25 °C.

En Figure 1(A), on peut voir que, dans le cas de la faible concentration en ferrocènediméthanol, l'intensité du CV catalytique a rapidement augmenté lorsque la concentration de glucose, [G], est passée de 0,1 mM à 3 mM. Pour [G] = 0,1 mM et 0,2 mM, le CV présente un pic large, plutôt qu'un plateau, en raison de l'épuisement partiel du glucose (c'est-à-dire de sa consommation importante par l'enzyme) à la surface de l'électrode pendant la durée du CV. Cependant, la forme en S attendue a pu être observée pour [G]= 0,5 mM et plus. Pour [G] > 3 mM, le courant de plateau a diminué après chaque ajout de glucose, reflétant le phénomène connu d'inhibition de la PQQ-GDH par son substrat, Figure 1B.

Dans le cas de la concentration élevée en ferrocènediméthanol, on a observé que le courant plateau de la CV catalytique augmentait avec [G], jusqu'à une concentration de [G] ~20 mM, après quoi il diminuait lors de l'ajout de glucose, Figure 1C et 1D. Il convient de noter qu'en raison de la forte activité de la PQQ-GDH en mode coopératif, une couverture virale relativement faible de $\gamma_{\text{vir}} = 40$ virions/ μm^2 a dû être utilisée dans ce cas afin d'éviter l'épuisement du glucose par la réaction enzymatique rapide.

L'analyse de la dépendance des signaux CV en fonction de la concentration de glucose peut fournir des informations quantitatives concernant la cinétique de l'enzyme supportée par la GFLV. Plusieurs observables peuvent être choisies pour cette analyse, la plus simple étant l'intensité du courant du plateau catalytique $i_{\text{cat},\text{pt}}$. La dépendance de $i_{\text{cat},\text{pt}}$ en fonction de la concentration en glucose, à la fois pour $[\text{Fc}]_{\text{b}} = 3 \mu\text{M}$ et $[\text{Fc}]_{\text{b}} = 300 \mu\text{M}$, est illustrée en Figure 2A et 2B, respectivement.

Les graphiques montrent que la variation de $i_{\text{cat},\text{pt}}$ vs. [G] suit un profil en cloche, qui est typique d'une enzyme inhibée par son substrat. Cependant, il est également évident que le pic de ce profil est situé dans différentes régions de concentration de glucose en fonction de la concentration en ferrocènediméthanol. L'inhibition est observée à une concentration de glucose plus faible pour $[\text{Fc}]_{\text{b}} = 3 \mu\text{M}$ que pour $[\text{Fc}]_{\text{b}} = 300 \mu\text{M}$. La largeur du pic est également plus grande dans le premier cas que dans le second. Ces caractéristiques sont qualitativement similaires à celles typiques de la réponse électrocatalytique de la GDH-PQQ en solution¹

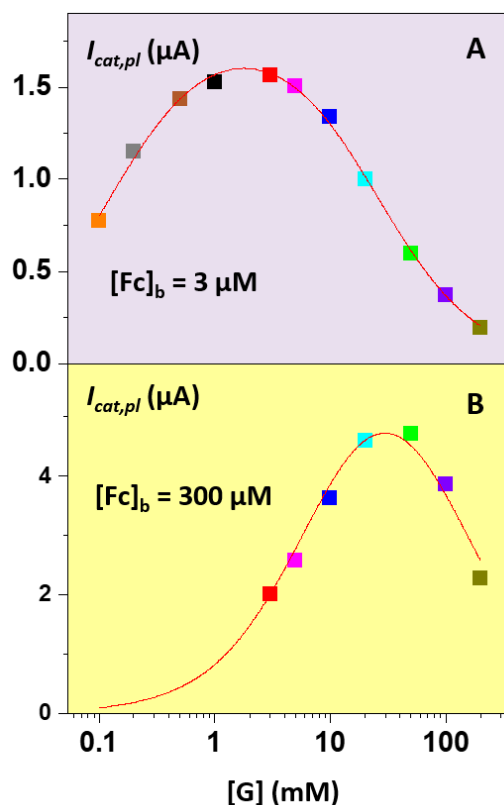


Figure 2. Caractérisation cinétique du système non-intégré composé de PQQ-GDH assemblé sur des particules de GFLV avec utilisation du cosubstrat Fc soluble en solution. Variation du courant de plateau catalytique, $i_{cat,pl}$, en fonction de la concentration de glucose, [G]. (A) et (B) : concentration de ferrocène en solution de $3\mu\text{M}$ et de $300\mu\text{M}$, respectivement.

Pour extraire des informations quantitatives relatives à la cinétique de l'enzyme, il convient de rappeler que dans une configuration où l'enzyme est immobilisée sur une surface d'électrode et interrogée à l'aide d'un cosubstrat redox soluble, le courant catalytique est simplement proportionnel à la vitesse enzymatique², de sorte qu'ici³

$$i_{cat} = 2Fn_{GDH} / \left[\frac{1}{k_{ox}[Fc^+]_{ez}} (1 + K_i[G]) + \frac{1}{k_{cat}} + \frac{K_M}{k_{cat}[G]} \right] \quad (1)$$

Où F est la constante de Faraday, n_{GDH} est la quantité molaire d'enzyme interrogée, avec S la surface de l'électrode d'or utilisée. $[Fc^+]_{ez}$ est la concentration de Fc^+ telle que « vue » par l'enzyme. Du fait de la diffusion rapide du médiateur sur la distance de quelques dizaines de nanomètres séparant l'enzyme de la surface de l'électrode $[Fc^+]_{ez}$, équivaut à la concentration en Fc^+ à l'électrode, $[Fc^+]_e$. $[G]$ est la concentration de glucose en solution. k_{cat} est la constante catalytique de l'enzyme, K_M la constante de Michaelis pour le glucose, k_{ox} la constante de vitesse

de deuxième ordre correspondant à l'oxydation de l'enzyme par Fc^+ et K_i la constante d'équilibre de l'inhibition de l'enzyme par son substrat le glucose.

Cette équation cinétique est valable à la fois en mode coopératif et non-coopératif, ne se différenciant que par la valeur des constantes cinétiques individuelles¹.

Étant donné qu'au moment où le courant catalytique atteint son plateau, la concentration du ferrocénium à l'électrode est égale à la concentration de ferrocédiméthanol en solution, c'est-à-dire $[\text{Fc}^+]_e = [\text{Fc}]_b$, l'équation (1) peut a priori être ajustée aux données expérimentales $i_{cat,pl}$ vs. $[\text{G}]$ présentées en Figure 2 (A) et (B). Il est ainsi possible de reproduire la forme en cloche des courbes expérimentales (tracés rouges), sur la base de 4 paramètres d'ajustement, à savoir k_{ox} , k_{cat} , K_M , K_i , n_{GDH} étant connu indépendamment. Ce résultat fournit une indication qualitative que la PQQ-GDH immobilisée sur GFLV suit le même schéma cinétique qu'en solution. Cependant, étant donné que le nombre de paramètres d'ajustement est trop élevé, plusieurs combinaisons de valeurs (k_{ox} , k_{cat} , K_M , K_i) peuvent reproduire également bien les données. Il n'est donc pas possible d'obtenir les valeurs individuelles de ces constantes cinétiques en analysant la variation $i_{cat,pl}$ en fonction de la concentration de glucose. Nous avons donc considéré une autre observable, jamais jusqu'à présent utilisée pour l'analyse de la cinétique de PQQ-GDH : le potentiel à mi-hauteur du CV catalytique, $E_{1/2}$.

1.1. Analyse du potentiel à mi-hauteur des CVs catalytiques

Le potentiel à mi-hauteur du CV catalytique, $E_{1/2}$, montre une forte dépendance vis-à-vis de la concentration de glucose, à la fois à une faible et à forte concentration en Fc, Figure 3.

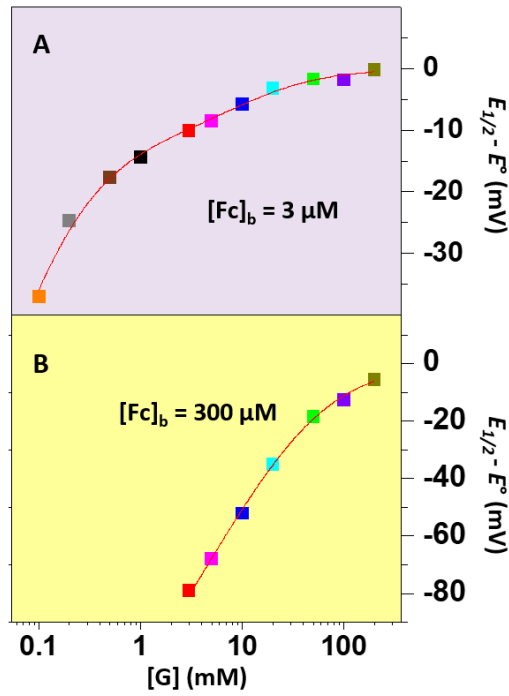


Figure 3. Caractérisation cinétique du système non-intégré composé de PQQ-GDH assemblé sur des particules de GFLV avec utilisation du cosubstrat Fc soluble en solution. Variation du potentiel à mi-hauteur des CVs catalytiques, $E_{1/2}$, en fonction de la concentration de glucose, [G]. (A) et (B) : concentration en ferrocène en solution de $3\mu\text{M}$ et de $300\mu\text{M}$, respectivement.

L'analyse de cette variation nécessite que l'équation cinétique (1) soit explicitement reliée au potentiel d'électrode, E . Cela est rendu possible par le fait que le ferrocendiméthanol est une espèce redox échangeant rapidement et de manière réversible un seul électron avec les électrodes métalliques, de sorte que la concentration de Fc^+ à l'électrode est simplement liée au potentiel d'électrode par la loi de Nernst :

$$[\text{Fc}^+]_e = [\text{Fc}]_b / (1 + \exp[-F(E - E^0)/RT]) \quad (2)$$

Par conséquent, l'expression théorique de $E_{1/2}$ peut être dérivée de l'équation (1)

$$E_{1/2} = E^0 - \frac{RT}{F} \ln\{1 + k_{ox}[\text{Fc}]_b(1 + K_M/[G])/[k_{cat}(1 + K_i[G])]\} \quad (3)$$

Cette expression nous a permis de reproduire de manière satisfaisante les variations expérimentales de $E_{1/2}$ vs [G], en utilisant uniquement 3 paramètres ajustables, à savoir (k_{ox}/k_{cat}), K_M et K_i , tant pour les concentrations faibles qu'élevées de Fc, tracés rouges en Figure 3A et B. Il convient de noter que, outre la réduction du nombre de paramètres, l'intérêt potentiel de considérer $E_{1/2}$ plutôt que $i_{cat,pl}$ pour l'analyse de la réponse cinétique de PQQ-GDH est que l'ajustement ne nécessite pas que la couverture enzymatique soit connue. Les ensembles de

valeurs d'ajustement que nous avons ainsi obtenues sont regroupés dans les colonnes I et II du Tableau 1, pour les concentrations faibles et élevées de Fc, respectivement. Ces valeurs doivent être comparées aux données présentées en colonnes III et IV, qui correspondent au comportement cinétique de la PQQ-GDH en solution, en mode non-coopératif et coopératif, respectivement.

	GFLV-supported PQQ-GDH Fc cosubstrate in solution		PQQ-GDH in solution Fc cosubstrate in solution	
	[Fc] _b = 3 μM	[Fc] _b = 300 μM	Non-cooperative	Cooperative
	E _{1/2} analysis	E _{1/2} analysis	Literature values, reference ⁴	
K_M (mM)	0.45 ± 0.2	50 ± 20	0.27 ± 0.05	4.7 ± 0.3
K_i (M ⁻¹)	127 ± 55	30 ± 15	52 ± 6	127 ± 20
k_{ox}/k_{cat} (M ⁻¹)	1.9 ± 0.7 × 10 ⁵	0.4 ± 0.2 × 10 ⁴	1.3 ± 0.45 × 10 ⁵	5.5 ± 0.45 × 10 ⁴
$k_{ox}[Fc]_{e2}/k_{cat}$	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
k_{ox} (M ⁻¹ s ⁻¹)	N.A.	N.A.	1.9 ± 0.3 × 10 ⁸	3.3 ± 0.6 × 10 ⁸
k_{cat} (s ⁻¹)	N.A.	N.A.	1.5 ± 0.3 × 10 ³	6 ± 1 × 10 ³
	I	II	III	IV

Tableau 1. Constantes cinétiques de la PQQ-GDH dans ses modes cinétiques coopératifs et non-coopératifs, pour l'enzyme libre (valeurs de la littérature) ou pour l'enzyme sur particules de GFLV, déterminées ici à partir de l'analyse de E_{1/2} des CV catalytiques.

En comparant les valeurs présentées dans les colonnes I et III, on peut constater que l'analyse de E_{1/2} à faible concentration de Fc a donné une valeur de K_M en bon accord avec la valeur typiquement faible rapportée pour le mode non-coopératif de PQQ-GDH en solution. En revanche, la valeur de K_i obtenue était de 2 à 3 fois supérieure à la valeur mesurée en solution rapportée dans la littérature. Cependant, la comparaison de ces valeurs est moins significative en raison de la marge d'erreur significative sur notre mesure de K_i à partir de l'analyse de E_{1/2}. En revanche, la valeur que nous avons obtenue pour le rapport k_{ox} / k_{cat} correspondait étroitement à la valeur typique du mode non-coopératif de PQQ-GDH en solution.

Les valeurs des constantes cinétiques mesurées à partir de l'analyse de $E_{1/2}$ à concentration de Fc élevée (colonne II) sont clairement distinctes de celles mesurées à faible concentration. En particulier, la valeur de K_M est significativement plus élevée et celle du rapport k_{ox} / k_{cat} est plus faible, à haute concentration qu'à faible concentration en Fc.

Les valeurs obtenues dans le premier cas tendent vers celles typiques du mode coopératif (colonne IV) sans les atteindre complètement, peut-être en raison d'une concentration de Fc encore insuffisante.

À ce stade, nous avons montré que la mesure facile et immédiate du potentiel à mi-hauteur du signal catalytique permet une comparaison rapide entre les paramètres cinétiques typiques de PQQ-GDH en solution et ceux de la PQQ-GDH immobilisée sur particules de GFLV. Nos résultats semblent indiquer que la cinétique de cette enzyme n'est ni affectée négativement, ni améliorée, par son immobilisation sur GFLV, du moins lorsque qu'un médiateur rédox soluble est utilisé. Cependant, une analyse complète du comportement cinétique de PQQ-GDH nécessite que les valeurs individuelles des constantes cinétiques k_{ox} et k_{cat} soient déterminées, ce qui ne peut être réalisé à partir de mesures de $E_{1/2}$. Nous nous sommes donc tournés vers un traitement de données plus complet, que nous avons introduit précédemment², et qui consiste à analyser le signal catalytique dans son intégralité.

1.2. Analyse du signal catalytique dans son intégralité.

Cette méthode repose sur le fait que la concentration du cosubstrat détectée par l'enzyme confinée en surface, c'est-à-dire la concentration de Fc^+ à l'électrode, varie de manière continue tout au long de l'acquisition du CV et est liée au potentiel de l'électrode par la loi de Nernst, équation (2). Ainsi, la variation du courant catalytique en fonction du potentiel de l'électrode traduit-elle la dépendance de la cinétique de l'enzyme en fonction de la concentration en cosubstrat.

En réécrivant l'équation (1) sous forme de l'inverse du courant catalytique, on obtient :

$$\frac{1}{i_{cat}} = \frac{1}{2Fn_{GDH}} \times \left[\frac{1+K_i[G]}{k_{ox} [Fc^+]_e} + \frac{1}{k_{cat}} \left(1 + \frac{K_M}{[G]} \right) \right] \quad (4)$$

La loi de Nernst permet de calculer $[Fc^+]_e$ pour n'importe quel point des voltammogrammes catalytiques, en connaissant le potentiel de l'électrode. Cela permet de représenter les voltammogrammes catalytiques présentés en Figure 1, enregistrés à différentes

concentrations de glucose, dans un format $1/i_{cat}$ vs $[Fc^+]_e$ comme présenté en Figures 4(A) et 4(B), pour $[Fc]_b = 3 \mu M$ et $300 \mu M$, respectivement.

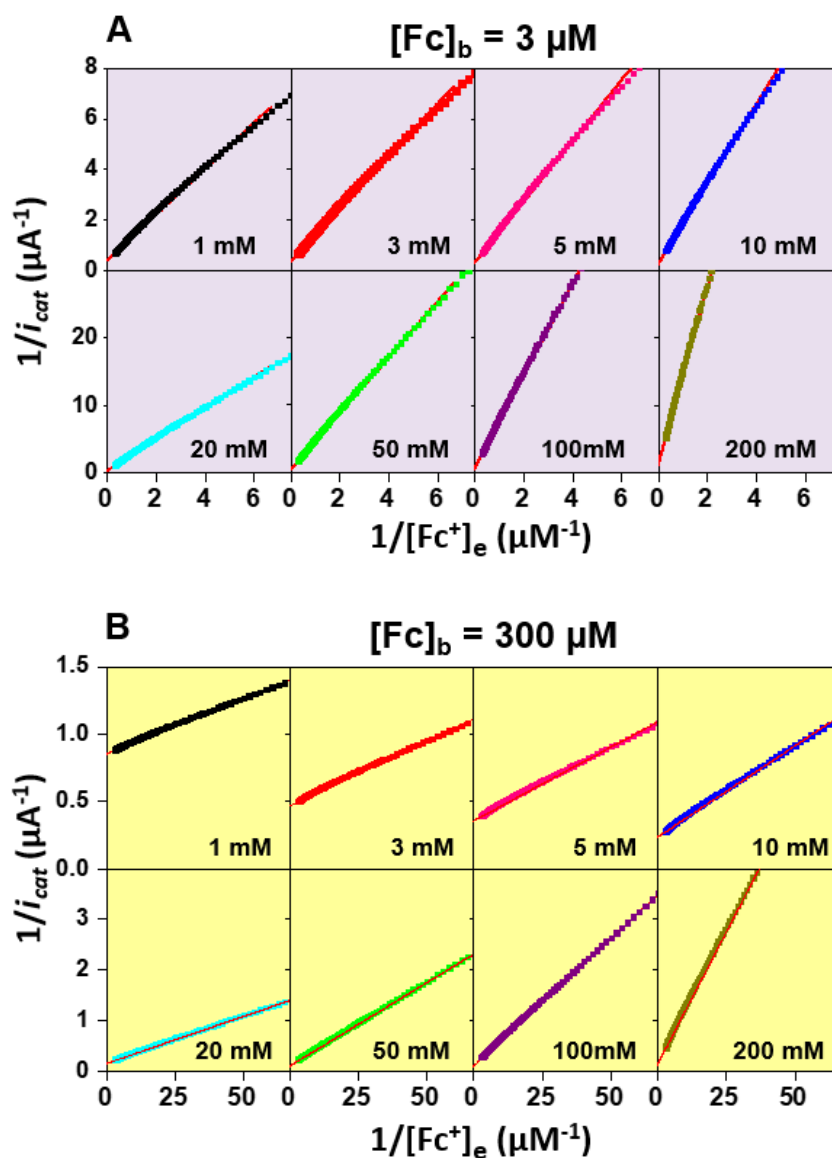


Figure 4. Caractérisation cinétique du système non-intégré composé de PQQ-GDH assemblé sur des particules de GFLV, avec utilisation du cosubstrat Fc soluble en solution. Graphes dits « primaires », où l'inverse de $i_{cat}(E)$ est porté en fonction de l'inverse de la concentration en cosubstrat à l'électrode, $[Fc^+]_e$, telle que calculée à partir de l'équation de Nernst, pour les diverses concentrations en glucose indiquées. (A) et (B) : concentration en ferrocène en solution de $3 \mu M$ et de $300 \mu M$, respectivement.

Comme prédit par l'équation 4, ces graphiques dits « primaires », montrent une variation linéaire de $1/i_{cat}$ en fonction de $[Fc^+]_e$, validant ainsi notre méthode d'analyse. Les expressions théoriques de la pente, s_1 , et de l'ordonnée à l'origine, o_1 , des lignes sont données par :

$$s_1 = \frac{1}{2Fn_{GDH}} \times \left[\frac{1+K_i[G]}{k_{ox}} \right] \quad (5)$$

$$o_1 = \frac{1}{2Fn_{GDH}} \times \left[\frac{1}{k_{cat}} \left(1 + \frac{K_M}{[G]} \right) \right] \quad (6)$$

Comme prévu à partir des équations précédentes, les pentes des graphiques expérimentaux $1/i_{cat}$ vs $[Fc^+]_e$ augmentent, et leur ordonnée à l'origine diminuent, à mesure que la concentration de glucose augmente (Figure 4(A) et 4(B)).

Les valeurs expérimentales de s_1 et o_1 ont été respectivement tracées en fonction de $[G]$ et de $1/[G]$ dans des "graphiques secondaires" reproduits en Figures 5 ci-dessous.

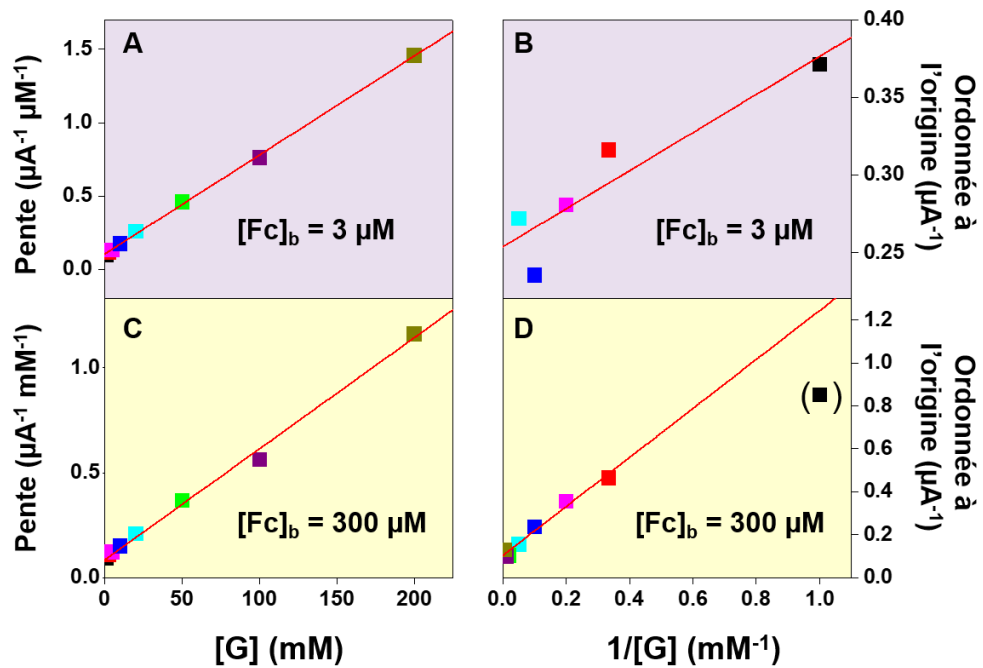


Figure 5. Caractérisation cinétique du système non-intégré composé de PQQ-GDH assemblé sur les particules de GFLV. Graphiques dits « secondaires ». (A) et (C) : Variation de la pente des graphiques primaires en fonction de la concentrations de glucose, $[G]$, pour une concentration de ferrocène en solution de $3\mu M$ et de $300 \mu M$ respectivement. (B) et (D) : Variation de l'ordonnée à l'origine des graphiques primaires en fonction de l'inverse des concentrations de glucose, $1/[G]$, pour une concentration de ferrocène en solution de $3\mu M$ et de $300\mu M$ respectivement.

Dans chaque cas, les variations linéaires décrites par les équations (5) et (6) ont été observées. La pente et l'ordonnée à l'origine des graphiques s_1 vs $[G]$ ont donné les valeurs de $\frac{1}{2Fn_{GDH}} \times \left[\frac{K_i}{k_{ox}} \right]$ et $\frac{1}{2Fn_{GDH}} \times \left[\frac{1}{k_{ox}} \right]$, à partir desquelles la valeur de K_i a pu être immédiatement obtenue.

De même, la pente et l'ordonnée à l'origine des graphiques o_1 vs $1/[G]$ ont fourni les valeurs de $\frac{1}{2Fn_{GDH}} \times \left[\frac{K_M}{k_{cat}} \right]$ et $\frac{1}{2Fn_{GDH}} \times \left[\frac{1}{k_{cat}} \right]$, à partir desquelles la valeur de K_M a été déduite.

Avec les valeurs de K_i et de K_M en main, les valeurs individuelles de k_{ox} et de k_{cat} ont pu être obtenues à partir des pentes des graphiques secondaires. Cela a nécessité d'estimer n_{GDH} à partir de la couverture virale et du nombre moyen de 5 molécules de GDH par GFLV. En fin de compte, bien que la méthode d'analyse de l'intégralité des CV puisse sembler complexe, elle présente l'avantage de permettre la détermination des valeurs individuelles de toutes les constantes cinétiques de l'enzyme PQQ-GDH portée par les particules de GFLV. Ces valeurs sont rapportées dans les colonnes I et II du Tableau 2, respectivement pour les cas de faible et forte concentration en Fc. Ces valeurs permettent de quantifier l'impact potentiel de l'échaffaudage des enzymes sur la catalyse.

	PQQ-GDH sur GFLV Cosubstrat Fc en solution		PQQ-GDH en solution cosubstrat Fc en solution	
	[Fc] _b = 3 μM	[Fc] _b = 300 μM	Non-cooperative	Cooperative
	Analyse complète du CV	Analyse complète du CV	Valeurs de la Littérature, référence ⁴	
K_M (mM)	0.35 ± 0.15	10 ± 2	0.27 ± 0.05	4.7 ± 0.3
K_i (M ⁻¹)	60 ± 50	50 ± 15	52 ± 6	127 ± 20
k_{ox}/k_{cat} (M ⁻¹)	3.0 ± 1.0 × 10 ⁵	1.2 ± 0.4 × 10 ⁴	1.3 ± 0.45 × 10 ⁵	5.5 ± 0.45 × 10 ⁴
$k_{ox}[Fc]_{ez}/k_{cat}$	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
k_{ox} (M ⁻¹ s ⁻¹)	2.4 ± 1.0 × 10 ⁸	2.4 ± 1.3 × 10 ⁸	1.9 ± 0.3 × 10 ⁸	3.3 ± 0.6 × 10 ⁸
k_{cat} (s ⁻¹)	0.8 ± 0.3 × 10 ³	2 ± 1 × 10 ⁴	1.5 ± 0.3 × 10 ³	6 ± 1 × 10 ³
	I	II	III	IV

Tableau 2. Constantes cinétiques de la PQQ-GDH dans ses modes cinétiques coopératifs et non-coopératifs, pour l'enzyme libre (valeurs de la littérature) ou pour l'enzyme sur particules de GFLV, déterminées ici à partir de l'analyse complète des CV catalytiques.

En comparant les données présentées en colonnes I et III, il apparaît que toutes les constantes cinétiques caractérisant l'activité de la PQQ-GDH à faible concentration de Fc sont très proches de celles typiques du mode non-coopératif de cette enzyme en solution.

Les constantes cinétiques individuelles enregistrées à une concentration élevée de Fc pour la PQQ-GDH immobilisée sur GFLV (Colonne II) sont également proches de celles du régime coopératif (Colonne IV), bien que l'accord ne soit pas aussi bon que pour le cas de faible concentration de Fc. En particulier, la valeur de k_{cat} enregistrée pour la PQQ-GDH immobilisée sur GFLV semble être environ 3 fois supérieure à celle de l'enzyme en solution. Cependant, étant donné que les valeurs de K_M et K_i apparaissent respectivement 2 fois plus élevées et plus basses que les valeurs de référence en solution, il semble raisonnable de conclure que, compte tenu des incertitudes expérimentales, les constantes de vitesse mesurées pour la PQQ-GDH, qu'elle soit immobilisée sur GFLV ou libre en solution, sont les mêmes.

Conclusion

La caractérisation du fonctionnement cinétique des particules virales décorées par des GDH-Nb₇₅, prouve d'une manière concluante que l'immobilisation de la PQQ-GDH sur la capsid du GFLV n'a aucun effet sur le schéma cinétique de cette enzyme, ni sur son activité catalytique (qui n'a pas été altérée, ni diminuée, ni augmentée). En effet, malgré l'environnement hautement confiné et chargé, expérimenté par l'enzyme lorsqu'elle est fixée sur l'échafaudage du GFLV, aucun effet cinétique n'a été observé. Ce résultat suffit à prouver que la petite taille et la charge électrique des nano-échafaudages viraux ne modulent pas universellement l'activité des enzymes redox, et certainement pas celle de la PQQ-GDH.

Au-delà de son intérêt spécifique, l'étude cinétique détaillée ci-dessus constitue une étape préalable indispensable à la prochaine étape de notre étude, car elle nous permet maintenant désormais d'étudier *spécifiquement* l'effet du remplacement d'un cosubstrat redox soluble par un cosubstrat confiné à la capsid du GFLV sur l'activité de la PQQ-GDH.

Bibliographie

- (1) Durand, F.; Limoges, B.; Mano, N.; Mavr , F.; Miranda-Castro, R.; Savéant, J. M. Effect of Substrate Inhibition and Cooperativity on the Electrochemical Responses of Glucose Dehydrogenase. Kinetic Characterization of Wild and Mutant Types. *J Am Chem Soc* **2011**, *133* (32), 12801–12809. <https://doi.org/10.1021/ja204637d>.
- (2) Bourdillon, C.; Demaille, C.; Gueris, J.; Moiroux, J.; Saveant, J. M. A Fully Active Monolayer Enzyme Electrode Derivatized by Antigen-Antibody Attachment. *J Am Chem Soc* **1993**, *115* (26), 12264–12269. <https://doi.org/10.1021/ja00079a005>.
- (3) Zhang, L.; Miranda-Castro, R.; Stines-Chaumeil, C.; Mano, N.; Xu, G.; Mavr , F.; Limoges, B. Heterogeneous Reconstitution of the PQQ-Dependent Glucose Dehydrogenase Immobilized on an Electrode: A Sensitive Strategy for PQQ Detection down to Picomolar Levels. *Anal Chem* **2014**, *86* (4), 2257–2267. <https://doi.org/10.1021/ac500142e>.
- (4) Klein, W. P.; Thomsen, R. P.; Turner, K. B.; Walper, S. A.; Vranish, J.; Kjems, J.; Ancona, M. G.; Medintz, I. L. Enhanced Catalysis from Multienzyme Cascades Assembled on a DNA Origami Triangle. *ACS Nano* **2019**, *13* (12), 13677–13689. <https://doi.org/10.1021/acsnano.9b05746>.

Chapitre V

Assemblage et caractérisation du système intégré Fc-PEG/PQQ-GDH immobilisés sur particules de GFLV

Au précédent chapitre, nous avons présenté les principaux résultats de l'étude cinétique de l'enzyme PQQ-GDH immobilisée sur des particules virales de GFLV, tout en utilisant un cosubstrat soluble en solution. L'objectif de cette caractérisation était de déterminer si l'immobilisation de la PQQ-GDH sur la capsid du GFLV pouvait affecter le schéma cinétique de cette enzyme et son activité catalytique.

Les résultats de cette étude ont montré que l'utilisation de cet échafaudage n'a eu aucun effet sur l'activité catalytique de l'enzyme PQQ-GDH, malgré un environnement hautement confiné et chargé, expérimenté par l'enzyme. Cette découverte prouve que la petite taille et la forte charge électrique (pH_i calculé de 6.24) des nano-échafaudages viraux ne modulent pas universellement l'activité des enzymes redox et certainement pas celle de la PQQ-GDH.

Ces résultats ont donc ouvert la voie à une nouvelle étape de notre étude, qui vise à étudier l'effet du remplacement d'un cosubstrat redox soluble par un cosubstrat confiné à la capsid du GFLV sur l'activité de la PQQ-GDH. Nous voulons savoir si ce remplacement peut améliorer la catalyse de manière significative.

Pour réaliser cette étude, comme expliqué précédemment nous avons décidé d'utiliser un Nb₅₉ fusionné à la GFP pour immobiliser les chaînes Fc-PEG sur GFLV. Nous avons ensuite étudié l'activité catalytique de ce système intégré en utilisant la voltammétrie cyclique.

1. Remplacement du cosubstrat redox soluble de l'enzyme par un cosubstrat Fc-PEG confiné à la capsid du GFLV

1.1. Stratégie d'immobilisation des chaînes redox Fc-PEG sur les particules virales de GFLV

Comme expliqué précédemment, afin de fixer les chaînes redox Fc-PEG sur le petit échafaudage GFLV de manière contrôlée, nous avons utilisé un nanocorps différent de celui utilisé pour immobiliser l'enzyme PQQ-GDH. Nous avons choisi le nanocorps 59 parmi les différentes familles de nanocorps anti-GFLV décrites dans la littérature.

Les chaînes Fc-PEG ont été conjuguées au Nb₅₉-GFP anti GFLV, en mettant en jeu une réaction de couplage covalent « type amide » entre la fonction ester activée NHS portée par une chaîne PEG redox, NHS-Fc-PEG, avec les amines primaires (lysine) exposées en surface par la protéine.

La caractérisation par spectroscopie UV du conjugué Fc-PEG-Nb₅₉-GFP a indiqué un rendement de décoration d'environ 8 chaînes Fc-PEG par fusion Nanocorps-GFP (voir chapitre 2).

1.2. Assemblage du système intégré Fc-PEG/PQQ-GDH sur particules virales de GFLV

La première étape de la construction du système intégré consiste à immunomarquer le virus immobilisé par les Fc-PEG-Nb₅₉-GFP. La seconde étape est l'immunomarquage du virus par les GDH-Nb₇₅. L'expérience précédente de l'équipe, relative à la décoration de particules virales par des anticorps-Fc PEGylés, a montré que l'immobilisation des anticorps redox sur surface nécessite un temps long, typiquement toute une nuit à température ambiante. C'est pourquoi, afin d'éviter une éventuelle perte d'activité de l'enzyme, qui pourrait être significative dans ces conditions, nous avons choisi d'exposer la surface d'abord au Fc-PEG-Nb₅₉-GFP puis au GDH-Nb₇₅.

La concentration et le temps d'exposition ont été choisis de manière à ce que la couverture de Fc-PEG-Nb₅₉-GFP et de GDH-Nb₇₅ atteigne la saturation (16 µg/ml ~ 12 h pour le Fc-PEG-Nb₅₉-GFP et 15 µg/ml, ~ 2 h pour la GDH-Nb₇₅).

1.3. Quantification du nombre de chaînes Fc-PEG décorant les particules virales de GFLV

Les électrodes portant des particules de GFLV décorées avec les enzymes PQQ-GDH et les chaînes redox Fc-PEG, ont été caractérisées à l'aide de la voltammétrie cyclique à vague carrée (SWV), en l'absence de glucose. Les signaux obtenus ont montré un pic large, situé à un potentiel proche du potentiel standard des têtes Fc liés aux chaînes PEG ($E^\circ \sim 0,15$ V/SCE), Figure 1, tracé rouge. On note qu'aucun pic de ce type n'a été observé lorsqu'une électrode bloquée avec le mélange BSA/B₂-GFP, ne portant pas de particules virales, a été exposée au Fc-PEG-Nb₅₉-GFP (Figure 1, tracé noir en pointillé).

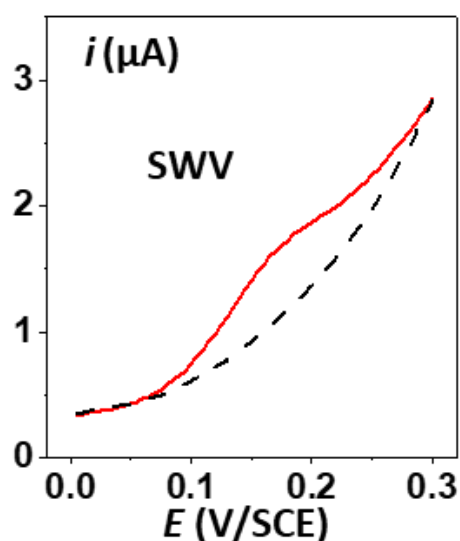


Figure 1. Réponse électrochimique, en l'absence de glucose, du système intégré Fc-PEG/PQQ-GDH assemblé sur des particules de GFLV à l'aide de nanocorps. Signal de voltammétrie à vague carrée (SWV) enregistré sur une électrode portant des GFLV décorés par des Nb₅₉-GFP Fc-PEGylés et GDH-Nb₇₅, enregistré dans le tampon seul, courbe rouge. La courbe pointillée noire a été enregistrée sur une électrode bloquée avec BSA/B₂-GFP, ne portant pas de GFLV, qui a été exposée aux deux nanocorps. Paramètres SWV : amplitude 25 mV, fréquence 25 Hz, incrément 5mV

Ces résultats indiquent que les chaînes Fc-PEG ont été sélectivement immobilisées sur le virus, via l'assemblage immunologique du Fc-PEG-Nb₅₉-GFP (Figure 3B). La quantité de chaînes Fc-PEG présentes en surface, et finalement par particule GFLV, est difficile à estimer à partir du signal SWV, qui ne dépend pas analytiquement de manière simple de ce paramètre. Nous nous sommes donc tournés vers la voltammétrie cyclique, qui est une technique électrochimique plus quantitative, pour caractériser la réponse des GFLV décorés par le Fc-PEG.

Une courbe typique de voltammétrie cyclique enregistrée à une surface d'or portant des particules virales de GFLV décorées est présentée en Figure 2, trait noir. Le signal de CV est largement dominé par le courant capacitif de l'électrode, dont la contribution était minimisée par la technique SWV. On peut néanmoins deviner la présence d'une paire de pics, situés aux environs de ~ 0.17 V/SCE, c'est-à-dire proche de la valeur attendue pour les têtes Fc. Afin de mieux visualiser le pic de la vague anodique il est possible de soustraire du CV le courant de fond capacitif enregistré à une électrode non exposée à la solution virale, mais aux bloquants BSA/B₂-GFP, courbe verte. La courbe soustraite, en rouge en Figure 2, laisse apparaître un pic suffisamment bien défini pour estimer, à partir de son intégration, la couverture en surface de Fc-PEG (Γ_{Fc}), qui est de l'ordre de ~ 2 pmol/cm².

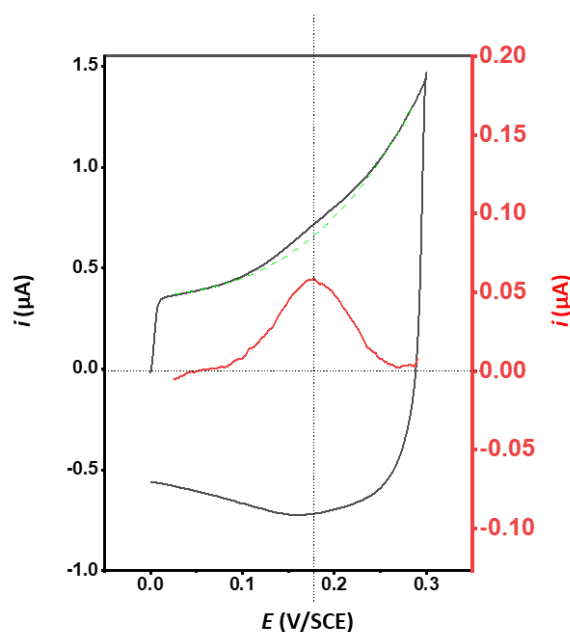


Figure 2. Réponse électrochimique, en l'absence de glucose, du système intégré Fc-PEG/PQQ-GDH assemblé sur des particules virales de GFLV à l'aide de nanocorps. Signal de voltammétrie cyclique enregistré sur une électrode portant des GFLV décorés par des Nb₅₉-GFP Fc-PEGylés et GDH-Nb₇₅, enregistré dans le tampon seul, courbe noire. La courbe en pointillés verts a été enregistrée sur une électrode bloquée avec BSA/B₂-GFP, ne portant pas de GFLV, qui a été exposée aux deux nanocorps. La courbe rouge représente le CV corrigé du courant de fond de la surface décorée avec des GFLV, obtenu en soustrayant le signal en pointillés du signal en noir. Signaux enregistrés dans 50 mM du tampon phosphate pH 7, vitesse de balayage 200 mV/s.

Concomitamment aux mesures électrochimiques, les surfaces d'or portant les particules de GFLV décorées ont été imagées in situ par AFM en mode tapping afin d'évaluer la couverture virale sur la surface. Les mesures AFM ont donné une valeur de 130 particules de virus/μm².

En utilisant la couverture en GFLV, nous avons pu convertir la couverture surfacique de Fc (Γ_{Fc}) en un nombre de chaînes Fc-PEG par GFLV et qui est égal à 56 Fc-PEG/GFLV. En considérant qu'il y avait 8 chaînes Fc-PEG par Fc-PEG-Nb₅₉-GFP, nous avons finalement pu estimer qu'en moyenne, 7 nanocorps marqués Fc-PEG-Nb₅₉-GFP décorent chaque particule de GFLV. Ce nombre semble assez faible compte tenu du grand nombre de copies de l'épitope (60) que Nb₅₉ peut reconnaître sur la capsid virale. Un tel résultat peut s'expliquer soit par l'encombrement de la chaîne Fc-PEG qui limite la reconnaissance du GFLV par le Fc-PEG-Nb₅₉-GFP, soit l'altération de l'extrémité N-terminale du Nb₅₉.

2. Activité catalytique du système intégré Fc-PEG/PQQ-GDH sur particules virales de GFLV.

Lorsque du glucose a été introduit dans la solution tampon où se trouve la surface d'or portant les particules virales de GFLV décorées à la fois par le GDH-Nb₇₅ et le Fc-PEG-Nb₅₉-GFP, le CV a fortement augmenté en intensité et a acquis la forme en S typique des signaux catalytiques, Figure 3A, courbe bleue. Un tel changement montre que, comme représenté en Figure 3B, les têtes de ferrocène oxydées jouent efficacement le rôle de cosubstrat redox pour les molécules de PQQ-GDH supportées par le virus, et transportent les électrons libérés par l'oxydation du glucose vers l'électrode. Un tel processus de transport d'électrons implique un mouvement Brownien aléatoire de la chaîne Fc-PEG, couplé à un échange d'électrons entre les têtes Fc transitoirement voisines.^{1,2} Notez qu'en absence de virus à la surface, seul un très faible signal catalytique a été détecté (Figure 3A, ligne en pointillés). Ce signal est dû à la quantité négligeable de GDH-Nb₇₅ et de Fc-PEG-Nb₅₉-GFP adsorbées de manière non spécifique sur l'électrode, qui est indétectable en absence de catalyse.

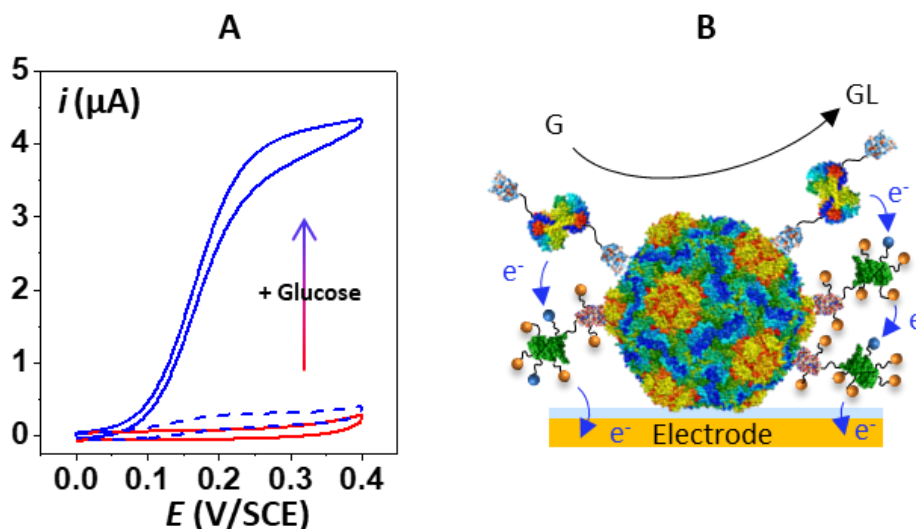


Figure 3. Réponse électrocatalytique du système intégré Fc-PEG/PQQ-GDH assemblé sur des particules virales de GFLV à l'aide de nanocorps. (A) Voltammogramme catalytique enregistré sur une électrode portant des virions GFLV décorés à la fois par Nb₅₉-GFP Fc-PEGylé et GDH-Nb₇₅, enregistré avant (courbe rouge) et après (courbe bleue) l'injection de glucose dans la cellule, jusqu'à une concentration de 20 mM. La courbe pointillée bleue a été enregistrée dans ces dernières conditions, sur une électrode bloquée avec BSA, ne portant pas de GFLV, qui a été exposée aux deux nanocorps. Vitesse de balayage = 20 mV/s. (B) Schéma de l'oxydation du glucose catalysée par l'enzyme PQQ-GDH médiée par son cosubstrat Fc-PEG, immobilisés sur des particules virales de GFLV.

Après avoir démontré que le système intégré Fc-PEG/PQQ-GDH était capable de fonctionner efficacement sur les virions de GFLV, nous avons pu explorer les caractéristiques cinétiques de cet assemblage.

2.1. Caractérisation cinétique du système intégré Fc-PEG/PQQ-GDH sur GFLV

L'évolution des voltammogrammes catalytiques, i_{cat} v.s. E , enregistrés sur une électrode portant des particules de GFLV décorées par le système intégré Fc-PEG/PQQ-GDH, en fonction de la concentration de glucose injecté dans la cellule électrochimique, est présentée en Figure 4A et 4B.

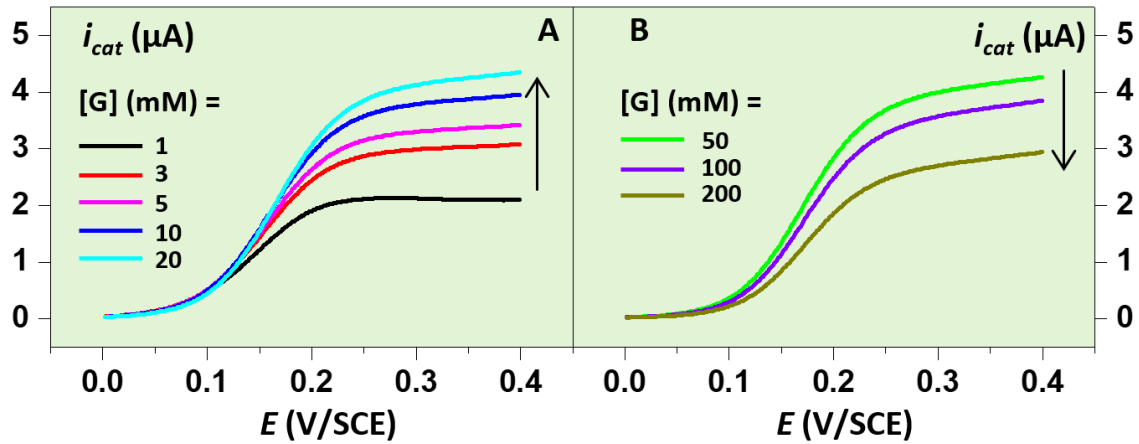


Figure 4. Caractérisation cinétique du système intégré Fc-PEG/PQQ-GDH assemblé sur des particules de GFLV. (A), (B) : CV catalytiques enregistrées sur une électrode en or portant le système intégré supporté par GFLV pour les différentes concentrations de glucose indiquées.

On peut observer que l'intensité du courant catalytique de plateau, $i_{cat,pl}$, a augmenté à mesure que la concentration de glucose ajouté était augmentée jusqu'à environ 20 mM, puis a diminué avec l'ajout de glucose supplémentaire. Par conséquent, une courbe en forme de cloche i_{cat} vs. $[G]$ a été obtenue, Figure 5. L'équation (1) permet de reproduire cette variation de manière satisfaisante, en utilisant paramètre ajustables $k_{ox}[Fc^+]_{ez}$, k_{cat} , K_M , K_i :

$$i_{cat} = 2Fn_{GDH} / \left[\frac{1}{k_{ox}[Fc^+]_{ez}} (1 + K_i[G]) + \frac{1}{k_{cat}} + \frac{K_M}{k_{cat}[G]} \right]$$

Où $[Fc^+]_{ez}$ est la concentration en forme active du médiateur (ferrocenium) au niveau de l'enzyme.

Ceci montre que dans le système intégré, l'oxydation du glucose catalysée par PQQ-GDH suit le même schéma cinétique qu'en solution. Cependant, comme expliqué précédemment, un tel ajustement ne peut pas fournir des valeurs individuelles des constantes cinétiques.

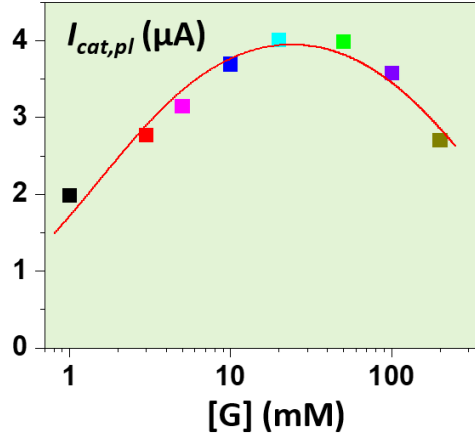


Figure 5. Caractérisation cinétique du système intégré Fc-PEG/PQQ-GDH assemblé sur des particules de GFLV. Variation du courant de plateau catalytique, $i_{cat,pl}$ des CV catalytiques en fonction de la concentration de glucose utilisée.

La dépendance du potentiel à mi-hauteur des CVs catalytiques, $E_{1/2}$, avec la concentration en glucose peut fournir plus d'informations. Cependant, contrairement à l'utilisation d'un médiateur soluble de ferrocène, la concentration de Fc^+ telle que perçue par l'enzyme, $[Fc^+]_{ez}$, n'est pas directement connue, car elle dépend du mécanisme complexe de transport électronique de Fc^+ par sauts d'électrons tout au long de la capsid de GFLV (Figure 3B). Cependant, en supposant un transfert électronique Nernstien à l'électrode, on peut écrire :

$$[Fc^+]_{ez} = [Fc]_{ez} / (1 + \exp[-F(E - E^0)/RT]) \quad (7)$$

Où E^0 est le potentiel standard des têtes de ferrocène.

$[Fc]_{ez}$ est la concentration des têtes de ferrocène au voisinage de l'enzyme à l'équilibre (lorsqu'aucun courant ne circule). La valeur de $[Fc]_{ez}$ est difficile à évaluer car elle nécessite des hypothèses sur l'arrangement spatial exact des chaînes Fc-PEG autour du GFLV^{2,3}.

Cependant, l'équation (3), dérivée au chapitre précédent, peut encore être utilisée pour ajuster les données $E_{1/2}$ vs. $[G]$, en remplaçant simplement $[Fc]_b$ par $[Fc]_{ez}$ et en utilisant K_M , K_i et le rapport $k_{ox} [Fc]_{ez}/k_{cat}$ comme paramètres ajustables.

$$E_{\frac{1}{2}} = E^0 - \frac{RT}{F} \ln \left\{ 1 + k_{ox}[Fc]_{ez} \left(1 + \frac{K_M}{[G]} \right) / [k_{cat}(1 + K_i[G])] \right\}$$

Un bon ajustement de la courbe théorique sur les points expérimentaux est obtenu, Figure 6.

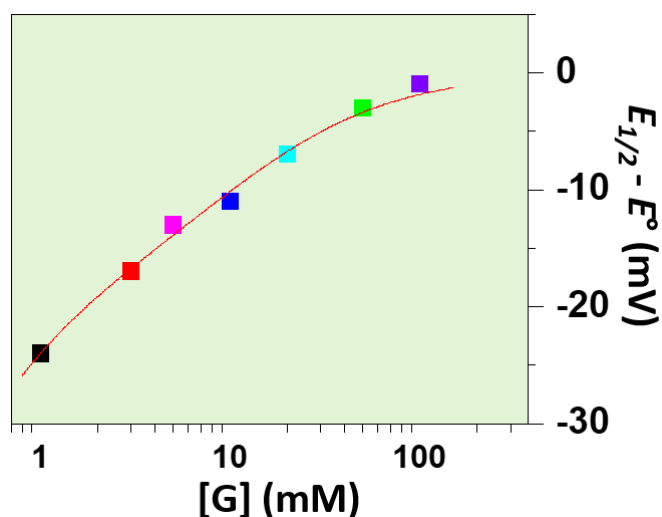


Figure 6. Caractérisation cinétique du système intégré Fc-PEG/PQQ-GDH assemblé sur des particules de GFLV. Variation du potentiel à mi-hauteur, $E_{1/2}$, des CV catalytiques en fonction de la concentration de glucose utilisée.

Les meilleures valeurs d'ajustement sont assemblées dans le Tableau 1, Colonne III. Les valeurs ainsi estimées pour K_M et K_i se situent entre celles typiques du régime coopératif et non coopératif de PQQ-GDH, de sorte qu'aucune conclusion ne peut être tirée de ces paramètres concernant le régime adopté par PQQ-GDH supporté par GFLV.

	PQQ-GDH en solution cosubstrat Fc en solution		Système intégré Fc-PEG/PQQ-GDH sur particules de GFLV
	Mode non-coopératif	Mode coopératif	
	Valeurs de la littérature, référence ⁴		
K_M (mM)	0.27 ± 0.05	4.7 ± 0.3	1.5 ± 0.6
K_i (M^{-1})	52 ± 6	127 ± 20	65 ± 55
k_{ox}/k_{cat} (M^{-1})	1.3 ± 0.45 $\times 10^5$	5.5 ± 0.45 $\times 10^4$	N.A.
$k_{ox}[Fc]_{e2}/k_{cat}$	N.A.	N.A.	0.80 ± 0.24
k_{ox} ($M^{-1}s^{-1}$)	1.9 ± 0.3 $\times 10^8$	3.3 ± 0.6 $\times 10^8$	N.A.
k_{cat} (s^{-1})	1.5 ± 0.3 $\times 10^3$	6 ± 1 $\times 10^3$	N.A.
	I	II	III

Tableau 1. Constantes cinétiques de la PQQ-GDH dans ses modes cinétiques coopératifs et non coopératifs et dans les différentes configurations indiquées. Valeurs de la littérature comparées à celle mesurées ici pour le système intégré à partir de l'analyse du potentiel de demi-vague du voltammogramme catalytique.

Cela souligne la nécessité de déterminer complètement les constantes cinétiques individuelles, ce qui ne peut être réalisé qu'avec une analyse détaillée de l'ensemble de la vague de CV catalytique. Cela nécessite tout d'abord une légère réorganisation de l'équation (1), pour tenir compte de la définition de $[Fc^+]_{ez}$ pour le système intégré (équation (2)), ce qui donne :

$$\frac{1}{i_{cat}} = \frac{1}{2Fn_{GDH}} \times \left[\frac{1+K_i[G]}{k_{ox}[Fc]_{ez}} (1 + \exp[-F(E - E^0)/RT]) + \frac{1}{k_{cat}} \left(1 + \frac{K_M}{[G]} \right) \right] \quad (8)$$

Comme le suggère cette expression, la réciproque du courant catalytique $1/i_{cat}(E)$, mesuré tout au long des voltammogrammes catalytiques, a été tracée en fonction du terme $1+\exp[(-F(E-E^0))/(RT)]$. Les tracés expérimentaux en résultants, construits pour différentes concentrations de glucose, sont présentés en Figure 7.

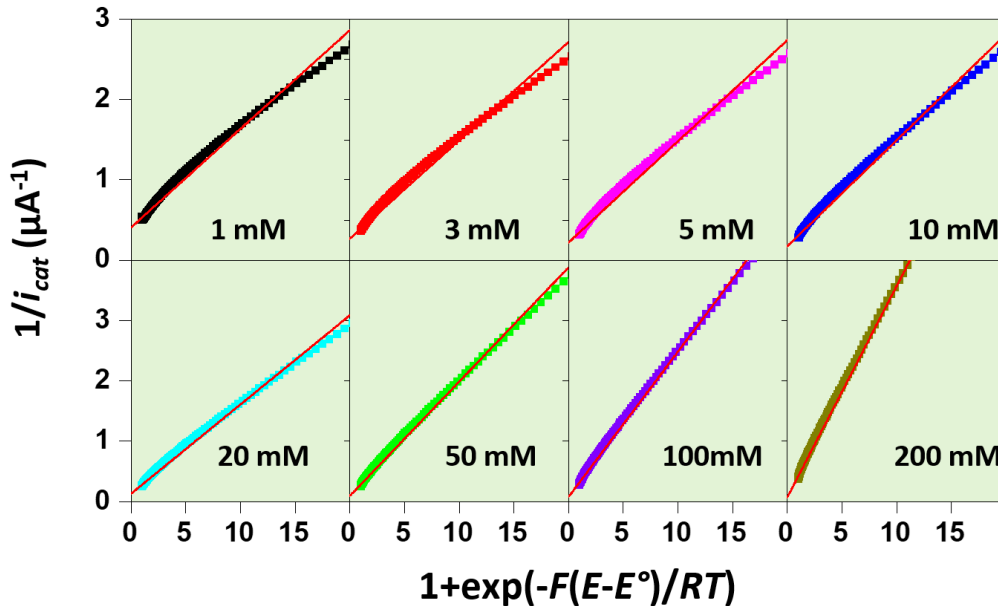


Figure 7. Caractérisation cinétique du système intégré Fc-PEG/PQQ-GDH assemblé sur des particules de GFLV. Graphiques dits primaires montrant la réciproque du courant catalytique, $1/i_{cat}(E)$, en fonction du terme $1+\exp(F(E-E^0)/RT)$, pour les concentrations de glucose indiquées.

On observe qu'ils sont linéaires, comme prédit par l'équation (4), validant ainsi qualitativement notre analyse. Comme prévu, leur pente augmente et leur ordonnée à l'origine diminue avec l'augmentation de la concentration de glucose. Les pentes, S_1 , et les origines, O_1 , de ces tracés primaires sont reportées en fonction de la concentration de glucose, ou de son inverse, en Figure 8A et 8B, respectivement. Dans les deux cas, des variations linéaires sont obtenues, comme prédit par l'équation (4). Le rapport de la pente sur l'ordonnée à l'origine de chacun de ces deux tracés secondaires donne immédiatement les valeurs de K_i et K_M , respectivement. Le rapport des pentes respectives des deux tracés secondaires donne la valeur du paramètre global

$k_{ox}[Fc]_{ez}/k_{cat}$. Enfin, en prenant $n_{GDH} = 5$, on peut estimer la valeur de k_{cat} à partir de l'ordonnée à l'origine de la variation de O_1 vs $1/[G]$.

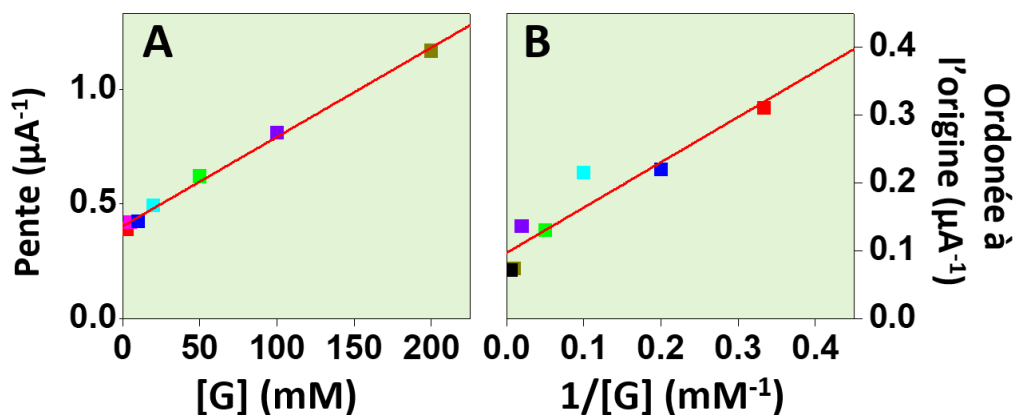


Figure 8. Caractérisation cinétique du système intégré Fc-PEG/PQQ-GDH assemblé sur les particules de GFLV. Graphiques dit secondaires montrant : (A) La variation de la pente des graphiques primaires en fonction des concentrations de glucose, $[G]$. (B) La variation de l'ordonnée à l'origine des graphiques primaires en fonction de l'inverse des concentrations de glucose, $1/[G]$.

Les valeurs individuelles ainsi obtenues pour les constantes cinétiques caractérisant l'activité de PQQ-GDH dans le système intégré supporté par les particules GFLV sont collectées dans la colonne III du Tableau 2.

On peut tout d'abord remarquer que la valeur de K_M pour le système supporté par GFLV est très proche de celle typique du mode coopératif de PQQ-GDH en solution (Colonne III par rapport à la Colonne II). La valeur de k_{cat} est clairement plus élevée que celle attendue pour le mode non coopératif, étant proche, bien que légèrement plus faible, que celle du mode coopératif.

	PQQ-GDH en solution cosubstrat Fc en solution		Système intégré Fc-PEG/PQQ-GDH sur particules de GFLV
	Mode non-coopératif	Mode coopératif	
	Valeurs de la littérature, référence ⁴		Analyse complète
K_M (mM)	0.27 ± 0.05	4.7 ± 0.3	4.4 ± 1.5
K_i (M^{-1})	52 ± 6	127 ± 20	9.7 ± 2.4
k_{ox}/k_{cat} (M^{-1})	1.3 ± 0.45 $\times 10^5$	5.5 ± 0.45 $\times 10^4$	N.A.
$k_{ox}[Fc]_{ez}/k_{cat}$	N.A.	N.A.	1.0 ± 0.2
k_{ox} ($M^{-1}s^{-1}$)	1.9 ± 0.3 $\times 10^8$	3.3 ± 0.6 $\times 10^8$	N.A.
k_{cat} (s^{-1})	1.5 ± 0.3 $\times 10^3$	6 ± 1 $\times 10^3$	4 ± 1 $\times 10^3$
	I	II	III

Tableau 2. Constantes cinétiques de la PQQ-GDH dans ses modes cinétiques coopératifs et non coopératifs et dans les différentes configurations indiquées. Valeurs de la littérature comparées à celle mesurées ici pour le système intégré à partir de l'analyse complète du voltammogramme catalytique.

Par conséquent, l'adoption du régime coopératif par la PQQ-GDH dans le système intégré peut être attribuée au confinement à l'échelle nanométrique des têtes de Fc à proximité de l'enzyme.

Le mécanisme de cet exemple particulièrement clair de modulation de l'activité enzymatique par le nano-échafaudage peut être compris en considérant la spécificité de la coopérativité pour une enzyme redox : Le confinement du cosubstrat ferrocène autour de l'enzyme augmente la probabilité que les deux unités catalytiques de GDH soient simultanément dans le même état d'oxydation (oxydé), ce qui est une condition nécessaire pour leur action coopérative envers le glucose. À noter que nous avons observé un phénomène similaire lorsque le système intégré Fc-PEG/PQQ-GDH était supporté sur des particules de phages *fd* ou de TMV, de géométrie linéaire, mais pas lorsqu'il était directement assemblé sur des électrodes planes³. Cela montre que l'exaltation enzymatique est spécifiquement due au confinement du système sur la capsid de particules virales présentant (au moins) une dimension dans la plage nanométrique d'environ 10 nm. La forme exacte de la particule semble avoir peu d'importance.

En examinant à nouveau le Tableau 2, on peut observer que la valeur de K_i obtenue pour le système intégré supporté par GFLV est significativement plus petite que celle correspondant

aux modes non coopératif et coopératif de GDH. Nous avons précédemment observé le même effet pour le système intégré Fc-PEG/PQQ-GDH, qu'il soit supporté sur des capsides virales ou assemblé en monocouche sur des électrodes, mais pas pour la GDH portée par un virus utilisant un médiateur soluble. Par conséquent, on peut conclure que l'inhibition par le substrat est minimisée par la co-immobilisation du médiateur et de l'enzyme, et non pas uniquement par le nano-échafaudage.

Conclusion

Nous avons mis au point un protocole original pour l'assemblage guidé par des nanocorps de systèmes enzymatiques basés sur la GDH sur la capsid d'une particule virale icosaédrique de GFLV immobilisée sur une surface d'électrode. Cette configuration permet une analyse simple et approfondie de la réponse cinétique des systèmes enzymatiques échafaudés par des particules virales par voltammétrie cyclique. En sélectionnant des observables appropriés, des constantes cinétiques individuelles de l'enzyme peuvent être déterminées. Cette méthodologie a été utilisée pour étudier les effets cinétiques du nano-échafaudage sur l'activité de la PQQ-GDH. Les résultats indiquent que l'immobilisation de l'enzyme sur des particules virales seules ne suffit pas à exalter l'activité enzymatique, malgré la petite taille (~20 nm) et la nature chargée des particules de GFLV, deux paramètres qui sont généralement censés favoriser un tel effet. Cependant, la co-immobilisation de l'enzyme et de son cosubstrat (chaînes Fc-PEG) sur des nano-échafaudages viraux induit une exaltation enzymatique, en favorisant la coopérativité entre les deux sous-unités de l'enzyme homodimérique via la "synchronisation" de leur état redox. Une diminution de l'inhibition du substrat a également été observée, mais semble être un avantage intrinsèque du système intégré plutôt que du nano-échafaudage.

Bibliographie

- (1) Anne, A.; Demaille, C.; Moiroux, J. Elastic Bounded Diffusion and Electron Propagation: Dynamics of the Wiring of a Self-Assembly of Immunoglobulins Bearing Terminally Attached Ferrocene Poly(Ethylene Glycol) Chains According to a Spatially Controlled Organization. *J Am Chem Soc* **2001**, *123*, 4817–4825. <https://doi.org/10.1021/ja004050f>.
- (2) Torbensen, K.; Patel, A. N.; Anne, A.; Chovin, A.; Demaille, C.; Bataille, L.; Michon, T.; Grelet, E. Immuno-Based Molecular Scaffolding of Glucose Dehydrogenase and Ferrocene Mediator on Fd Viral Particles Yields Enhanced Bioelectrocatalysis. *ACS Catal* **2019**, *9* (6), 5783–5796. <https://doi.org/10.1021/acscatal.9b01263>.
- (3) Anne, A.; Demaille, C.; Moiroux, J. Elastic Bounded Diffusion and Electron Propagation: Dynamics of the Wiring of a Self-Assembly of Immunoglobulins Bearing Terminally Attached Ferrocene Poly(Ethylene Glycol) Chains According to a Spatially Controlled Organization. *J Am Chem Soc* **2001**, *123* (20), 4817–4825. <https://doi.org/10.1021/ja004050f>.
- (4) Zhang, L.; Miranda-Castro, R.; Stines-Chaumeil, C.; Mano, N.; Xu, G.; Mavr e, F.; Limoges, B. Heterogeneous Reconstitution of the PQQ-Dependent Glucose Dehydrogenase Immobilized on an Electrode: A Sensitive Strategy for PQQ Detection down to Picomolar Levels. *Anal Chem* **2014**, *86*, 2257–2267. <https://doi.org/10.1021/ac500142e>.

Chapitre VI

Conclusion et Perspectives

A l'issue de ce travail de thèse nous avons atteint un certain nombre d'objectifs que nous nous étions fixés, réussissant à pousser plus loin le concept d'assemblage du système intégré Fc-PEG/PQQ-GDH sur des nano-soutports viraux. Nous avons exploré l'emploi de nanoparticules virales présentant une géométrie quasi-sphérique, différente de celle, linéaire, des virus utilisés précédemment comme soutports. Nous avons également miniaturisé le système, en utilisant des particules de 30 nm de diamètre, là où les virions linéaires étaient caractérisés par une longueur de plusieurs centaines de nanomètres.

Le degré de définition du système, en termes d'agencement spatial de ses composants redox et enzymatiques, a également été grandement amélioré. En effet, dans les travaux précédents, ces composants, étaient portés par des anticorps polyclonaux, reconnaissant à priori un ensemble (non-défini) d'épitopes sur la capsid. Il en résultait une « couverture » homogène et non localisée, du virus par des anticorps conjugués à l'enzyme. Un *empilement* d'anticorps permettait ensuite d'immobiliser les chaînes Fc-PEG, là encore indistinctement tout le long virus. A contrario, dans ce travail de thèse, l'emploi de nanocorps dirigés contre certains domaines bien précis de la capsid nous a permis d'organiser les composants selon des positions prédéterminées (épitopes), directement à la surface du virus (sans empilement).

Ce changement de géométrie, d'organisation et d'échelle nous a permis d'évaluer, par comparaison, l'impact de ces paramètres structurels sur le fonctionnement du système intégré sur particules virales. Nous avons pu mettre en évidence que l'exaltation catalytique de la PQQ-GDH au sein du système intégré, que nous avons montré être spécifique à son organisation sur

particules virales, était un phénomène indépendant de la nature exacte des particules virales, puisque observé pour le bactériophage *fd*, le *TMV* et le *GFLV*. Ce phénomène présente un mécanisme original, lié à la nature redox de l'enzyme, ainsi qu'à sa propriété de coopérativité vis-à-vis de son substrat. Notons qu'il s'agit d'un des très rares cas où le mécanisme responsable d'une exaltation catalytique a pu être ainsi identifié.

Certains résultats sont malheureusement également venus contrarier nos objectifs initiaux. Ainsi nous espérions être à même de fixer plus de nanocorps, porteurs soit d'enzyme soit de chaînes Fc-PEG, sur les *GFLV*. Nous espérions ainsi atteindre une activité catalytique par particule virale suffisante pour interroger des particules individuelles par microscopie Mt/AFM-SECM. Hélas, pour le système réalisé, le courant généré par chaque particule, qu'on peut estimer en divisant simplement le courant catalytique mesuré en CV par le nombre de particules globales interrogées, est d'un peu moins de 1 fA, ce qui reste trop faible pour nos mesures Mt/AFM-SECM, pourtant parmi les plus sensibles au monde.

Comme indiqué dans le manuscrit il serait sans doute possible d'immobiliser un plus grand nombre de nanocorps porteur de la GDH en allongeant la longueur de la chaîne peptidique liant l'enzyme au nanocorps, afin de favoriser sa bonne orientation pour reconnaître le *GFLV*. Mais c'est surtout sur la conception du nanocorps redox que devraient, si nous en avons le temps, porter nos efforts. Il serait souhaitable d'abandonner la fonctionnalisation du nanocorps par le Fc-PEG-NHS, non régio-sélective, et de concevoir une stratégie alternative, plus « biologique » et spécifique. Nous pensons notamment à l'emploi de nanocorps génétiquement conçus pour présenter une longue chaîne peptidique flexible, remplaçant avantageusement la chaîne PEG, et terminée par une cystéine. Un ferrocène maléimide, synthétisé au laboratoire par Alexandra Pastour, pourrait alors être utilisé pour marquer l'extrémité de la chaîne. Alternativement, nous pourrions penser à une telle chaîne peptidique seule, fonctionnalisée de la même manière, mais portant à son autre extrémité un marqueur spyttag (une petite séquence peptidique), destinée à se lier à la protéine spycatcher fusionnée avec un nanocorps anti-*GFLV*. Pour ne rien cacher au lecteur, cette dernière stratégie, conçue en interaction avec les Drs. Michon et Ritzenthaler est à ce jour assez avancée. Elle fournira peut-être des résultats présentables pour la soutenance.

Enfin à l'avenir, l'équipe entend explorer l'emploi d'un autre type de bio-support que les virus pour des systèmes electrocatalytiques complexes : les origamis d'ADN. Ces nano-échafaudages offrent un contrôle spatial inégalé et *programmable* du positionnement de biomolécules. Les résultats obtenus seront intéressants à comparer à ceux rapportés ici,

notamment dans la mesure où ils mettront en évidence l'effet d'un changement de la nature même du nano-support sur les performances catalytiques du système

Partie Expérimentale

1. Produits chimiques et solutions

Le réactif Fc-PEG₃₅₀₀-NHS ester utilisé pour le marquage PEG-Fc du nanocorps Nb₅₉-GFP anti GFLV était un produit synthétisé précédemment par le groupe Bionano (LEM), tel que décrit précédemment¹.

L'agent de blocage albumine sérique bovine (BSA) provenait de Jackson ImmunoResearch Laboratories (Royaume-Uni).

Le méthosulfate de phénazine (PMS) a été obtenu auprès d'Alfa Aesar.

Le 2,6-dichlorophénolindophénol (DCPIP), le 1,1-ferrocènediméthanol, l'hydrochlorure de cystéamine et tous les autres produits chimiques de qualité analytique étaient des produits Sigma-Aldrich et ont été utilisés tels quels. Toutes les solutions ont été préparées avec de l'eau doublement désionisée (résistivité de 18,2 MΩ cm⁻¹, TKA Micro-Pure UV). Deux solutions tampons ont été utilisées pour l'assemblage de surface : tampon phosphate à 10 mM à pH 7 (tampon phosphate), et tampon Tris-HCl à 50 mM à pH 7,5 (tampon Tris). Le tampon phosphate a été utilisé pour la préparation de la solution de virus GFLV, et celle du nanocorps redox Fc-PEG-Nb₅₉-GFP. Le tampon Tris a été utilisé pour préparer la solution du nanocorps GDH-Nb₇₅, ainsi que comme milieu d'imagerie pour les expériences AFM in situ. Toutes les solutions de nanocorps ont été préparées avec 1 mg/ml de BSA et 0,5 mg/ml de B2-GFP. Toutes les solutions de protéines contenaient 0.01 % (p/v) d'azide de sodium (NaN₃) comme conservateur. Veuillez noter que les solutions mères de glucose dans le tampon Tris ont été laissées mutaroter pendant la nuit.

2. Matériel biologique

2.1. Particules virales de GFLV

Les suspensions de virus GFLV ont été fournies par le Dr Christophe Ritzenthaler, Institut de biologie moléculaire des plantes, CNRS, Strasbourg. Les virus GFLV ont été cultivés et purifiés comme décrit dans l'article de Belval et al. 2016².

2.2. La protéine de fusion GDH-Nb₇₅

La production de la protéine de fusion GDH-Nb₇₅ a nécessité l'utilisation du vecteur d'expression bactérien pETcyto. Les bactéries BL21(DE3) ainsi qu'un milieu auto-inducteur ont été utilisés pour la production. Les extraits cytoplasmiques ont été purifiés en utilisant une chromatographie d'affinité HisTrap, suivie d'une chromatographie par exclusion de taille. La

production a permis la génération de GDH-Nb₇₅ sous forme dimérique en raison de la présence de Ca²⁺ dans les tampons d'élution. Cependant, l'enzyme était dans sa forme Apo, ce qui signifie qu'elle était dépourvue de son cofacteur PQQ, qui était absent du milieu de culture et de purification.

2.2.1. Le vecteur d'expression bactérien « pETcyto »

Le vecteur d'expression bactérien pETcyto dérivé de pET-22b(+) (Novagen) a été modifié pour être compatible avec la technique de clonage Golden Gate en supprimant le site SapI indésirable unique et en ajoutant une cassette CmR-ccdB. Pour ce faire, le site SapI original de pET-22b(+) a été modifié par une substitution unique introduite par mutagenèse PCR en utilisant la polymérase Phusion (ThermoFisher Scientific) avec les amorces #595-596, ce qui a donné pETΔSapI. La cassette CmR-ccdB a été amplifiée à partir du vecteur pEAQ-HT (Sainsbury et al, 2009) en utilisant les amorces #588-589, digérée avec NdeI-XhoI et introduite dans pETΔSapI linéarisé par NdeI-XhoI par clonage classique. Le plasmide résultant, pETcyto, a été utilisé pour la suite du clonage Golden Gate et l'expression cytoplasmique des protéines.

2.2.2. Clonage de l'apo-GDH-Nb₇₅-6his

La séquence GDH avec les sites de restriction SapI a été directement synthétisée (IDT). La séquence de liaison-Nb₇₅-6his a été amplifiée à l'aide des amorces #1096-1097 à partir d'un gène synthétique (IDT) pour ajouter des sites SapI compatibles et des extrémités cohésives à la séquence GDH. Les deux séquences ont été clonées dans le plasmide pETcyto par clonage Golden Gate, ce qui a donné le plasmide pETcyto-GDH-Nb₇₅-6his. Le plasmide a ensuite été validé par séquençage Sange.

2.2.3. Production de l'apo-GDH-Nb₇₅-6his.

La production a été réalisée dans la souche E. coli Shuffle (New England Biolabs) cultivée dans un milieu TB à 37°C jusqu'à ce qu'elle atteigne une absorbance de 0,8 à 600 nm, puis induite avec 1 mM d'IPTG à 20°C pendant la nuit. Les cellules ont été resuspendues dans un tampon GDH-1 (20 mM Tris-HCl, 3 mM de CaCl₂, 20 mM d'imidazole, pH 7,5) avec le cocktail d'inhibiteurs de protéases cOmplete (Roche).

2.2.4. Purification de l'apo-GDH-Nb₇₅-6his.

La purification a été réalisée à 4°C sur un appareil ÄKTA Pure (Cytiva) avec une colonne HisTrap FF Crude de 1 mL (Cytiva) fonctionnant dans un tampon IMAC. La protéine immobilisée a été éluée en utilisant 500 mM d'imidazole. Les fractions appropriées ont ensuite

été injectées sur une colonne Superdex 200 (Cytiva). La chromatographie d'exclusion de taille sur la colonne Superdex 200 a été réalisée dans un tampon GDH-2 (20 mM Tris-HCl, 3 mM de CaCl₂, pH 7,5). Les fractions ont été vérifiées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS-PAGE) à 12,5% avant d'être regroupées et concentrées à l'aide d'un dispositif Amicon Ultra (Merck Millipore) de 30 kDa.

2.2.5. Séquence protéique de la GDH-linker-Nb₇₅-6his produite.

>MDVPLTPSQFAKAKSENFDDKKVILSNLNKPHALLWGPDNQIWLTERATGKILRVNP
ESGSVKTQVPEIVNDADGQNGLLGFAPDFKNNPYIYISGTFKNPKSTDKELPNQ
TIIRRYTYNKSTDTLEKPVDLLAGLPSSKDHQSGRLVIGPDQKIYYTIGDQGRNQLAY
LFLPNQAQHTPTQQELNGKDYHTYMGKVLRLNLDGSIPKDNPSFNGVVSHIYTLGHR
NPQGLAFTPNGKLLQSEQGPNSSDDEINLIVKGGNYGWPNVAGYKDDSGYAYANYS
AANKSIKDLAQNQGVKVAAGVPVTKESWTKGNFVPLKTLTYTVQDTYNYNDPTCGE
MTYICWPTVAPSSAYVYKGGKKAITGWENTLLVPSLKRGVIFRIKLDPTYSTTYDDA
VPMFKSNRYRDVIASPDGNVLYVLTDTAGNVQKDDGSVTNTLENPGSLIKFTYKA
KGGGGSGGGGSGGGSGQVQLQESGGGSVQAGGSLRLSCVASEYSSSTAMAWFRQ
APGKEREGVAAINS VRHTTSYADSVKGRFTISKDNADNMMYLEMNSLKPEDTAIYY
CAAADAIGLAEYWSTPTLSAARYKYWGQGTQVTVSSGGGHHHHH*

2.2.6. Séquence nucléique de la GDH-linker-Nb₇₅-6his produite.

>ATGGATGTACCCCTGACTCCATCTCAGTTTGCCAAAGCCAAAAGTGAGAACTTT
GACAAGAAGGTGATTCTTAGTAATCTGAACAAGCCGCACGCCTTGCTGTGGGGAC
CAGACAACCAGATTTGGTTAACAGAACGCGCGACGGGAAAAATCTTACGCGTCA
ATCCAGAGTCCGGCAGTGTCAAGACAGTGTTC AAGTACCGGAAATCGTAAACG
ATGCAGATGGGCAAACGGATTATTGGGATTTGCCTTTCATCCTGACTTTAAAAA
CAATCCCTACATCTACATCAGCGGTACGTTTAAGAATCCCAAGAGTACGGATAAA
GAACTTCCGAACCAAACAATCATTCTGTCGTTATACTTACAACAAATCCACCGACA
CCCTGGAAAAGCCAGTGGATCTGCTTGCAGGACTTCCATCGTCCAAGGACCATCA
ATCAGGCCGTTTGGTAATTGGCCCTGACCAGAAGATCTACTATACCATTGGTGAT
CAGGGTCGCAACCAACTGGCCTACCTTTTTCTTCCAAACCAGGCTCAGCACACTC
CGACGCAGCAAGAATTGAACGGAAAAGACTACCATACTTATATGGGTAAGGTGT
TGCGCTTAAATTTAGATGGTAGCATCCCGAAAGATAATCCCTCATTTAATGGGGT
CGTCTCCACATCTACACATTAGGGCATCGCAATCCCCAGGGACTTGCCTTCACC
CCGAACGGCAAATTA CTTCAGAGTGAGCAGGGGCCGAACAGCGACGACGAAATT
AACTTAATTGTGAAGGGTGGCAATTACGGCTGGCCCAATGTTGCTGGTTACAAGG

ATGATAGTGGATATGCCTATGCCAACTATTCGGCAGCCGCCAACAAGTCAATTAAGGATCTGGCTCAGAATGGCGTGAAAGTAGCGGCCGGCGTACCTGTCACCAAGGAGTCAGAATGGACAGGTAAAAATTTTGTCCCCATTAAAAACCTTGTACACGGTACAAGACTTACAACCTACAACGATCCAACCTGCGGCGAGATGACGTATATCTGCTGGCCTACTGTTGCACCTTCTTCAGCTTATGTGTATAAGGGCGGGAAGAAAGCGATCACAGGGTGGGAAAACACATTGCTGGTGCCGAGTCTGAAGCGCGGTGTGATTTTTCGCATTAAACTTGACCCGACCTATTCAACGACCTATGACGACGCCGTTCCCATGTTCAAATCAAACAATCGCTACCGCGATGTGATTGCGTCGCCGGACGGAAACGTCTGTATGTGCTTACCGACACGGCCGGGAATGTCCAAAAGGACGATGGCTCAGTGACTAATACTCTTGAAAATCCGGGCAGCTTAATTAAGTTTACATACAAGGCAAAGGGA
GGCGGTGGATCCGGAGGCGGTGGATCCGGAGGCGGATCCGGCCAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGGGGAGGCTCGGTGCAGGCTGGAGGCTCTCTGAGACTCTCCTGTGTAGCCTCTGAATACCCAGTAGTAGCACCGCGATGGCTTGGTTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGAGCGTGAGGGGGTTCGACGCCATTAATAGTGTTTCGTCATACCACATCGTACGCCGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAAGGACAACGCCGACAA
TATGATGTATCTGGAAATGAACAGCCTGAAACCTGAGGACACGGCCATCTATTACTGTGCGGCGGCCGACGCCATTGGGTTAGCTGAATACTGGTCAACTCCTACCCTTTCCGCCGCGAGGTATAAGTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCCG
GAGGGGGACACCATCACCATCACTGA

2.2.7. Incorporation de la PQQ à la GDH-Nb₇₅-6his produite.

Pour obtenir la forme Holo de l'enzyme, l'Apo-GDH-Nb₇₅ a été incubé avec un excès d'environ 10 fois de PQQ dans un tampon tris pH 7,5 à 20 mM contenant 3 mM de CaCl₂ pendant 60 minutes à température ambiante. L'excès de PQQ a été éliminé par ultra-centrifugation sur une membrane de 30 kDa. L'apparition d'un pic à 352 nm dans le spectre UV-visible de GDH-Nb₇₅ a confirmé l'incorporation de PQQ (voir Chapitre 2), indiquant la formation de la forme Holo de l'enzyme.

2.2.8. Évaluation de l'activité de la GDH-Nb₇₅ en solution

L'activité catalytique de la protéine de fusion GDH-Nb₇₅ a été évaluée en utilisant un protocole de test spectrophotométrique standard, dont le principe est décrit précédemment dans le chapitre 2.

Une concentration connue (~ 20 pM) de GDH-Nb₇₅ a été introduite dans une cellule spectrophotométrique contenant un mélange de deux accepteurs d'électrons, le 2,6-

dichlorophénol-indophénol (DCPIP, 60 μM) et le méthosulfate de phénazine (PMS, 600 μM). L'action enzymatique a été déclenchée en introduisant du glucose (dans la plage de 3 à 500 mM) dans la cellule. La conversion du DCPIP de sa forme oxydée bleue à sa forme réduite incolore a été suivie en enregistrant l'absorbance de la solution à 600 nm. La vitesse initiale de décroissance de l'absorbance a fourni la vitesse enzymatique (en concentration molaire de DCPIP (donc de glucose) convertie par seconde), qui, une fois divisée par la concentration de l'enzyme, a conduit à une constante de vitesse apparente de premier ordre k_{app} (en s^{-1}).

2.3. Le nanocorps Nb₅₉-GFP

Le nanocorps Nb₅₉-GFP anti-GFLV a été fourni par le Dr. Christophe Ritzenthaler, Institut de biologie moléculaire des plantes, CNRS, Strasbourg.

La production du Nb₅₉-GFP nécessite également l'utilisation du vecteur d'expression bactérien pETcyto. La production du vecteur d'expression bactérien pETcyto a été réalisée comme décrit précédemment.

2.3.1. Clonage du Nb₅₉-GFP-6his-Streptag.

La séquence de Nb₅₉ a été amplifiée à partir d'un bloc de gènes synthétiques (Integrated DNA Technologies, IDT) en utilisant les amorces #767-768 pour ajouter des sites SapI compatibles. La séquence de lien-EGFP-6his-Streptag a été amplifiée à partir de pET-22b(+)-Nb₂₃-EGFP-6his.³ Les fragments de Nb₅₉ et de lien-EGFP-6his-Streptag digérés par SapI ont ensuite été clonés dans pETcyto linéarisé par SapI en utilisant le clonage Golden Gate, tel que décrit dans Incarbone et al., 2021,⁴ en utilisant des cellules compétentes d'E. coli TOP10 (Invitrogen). pETcyto-Nb₅₉-EGFP-6his-Streptag a été validé par séquençage Sanger.

2.3.2. Production du Nb₅₉-GFP-6his-Streptag.

La production a été réalisée comme décrit pour la protéine de fusion GDH-Nb₇₅-6his. Les cellules ont été centrifugées et resuspendues dans un tampon IMAC (100 mM de Tris-HCl, 300 mM de NaCl, 20 mM d'imidazole, 5% de glycérol, pH 7,5), puis lysées à l'aide d'un Microfluidizer LM20 (Microfluidics) à 1000 psi.

2.3.3. Purification du Nb₅₉-GFP-6his-Streptag.

La purification a été réalisée à 4°C sur une ÄKTA Pure (Cytiva) avec une colonne HisTrap FF Crude de 1 mL (Cytiva) fonctionnant avec un tampon IMAC. L'élution de la protéine immobilisée a été effectuée en utilisant un gradient d'imidazole linéaire de 20 à 500 mM. Les fractions appropriées ont ensuite été injectées sur une colonne Superdex 200 (Cytiva) dans un

tampon PBS 1X, et les protéines récupérées ont été concentrées à l'aide d'un Amicon Ultra (Merck Millipore) de 30 kDa. La pureté de la protéine a été évaluée par SDS-PAGE à 12,5% et en utilisant la coloration Instant Blue.

2.3.4. Séquence protéique du Nb₅₉-linker-EGFP-6his-Streptag

>MQVQLQESGGTVQAGGSLRLSCSISGDTNSYCMGWFRQAPGKEREVVAHISTG
VISPGYNKFSEGRFTISPDNAKNSVYLQMNNLKPDAMYYCAARTGYCSGSWGVA
DSFNGWGQGTQVTVSSSGGGSGGGVSKGEELFTGVVPIVELDGDVNGHKFSVSG
EGEGDATYGLTLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLTLYGVQCFSRYPDHMKQHDFKSA
MPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYN
YNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQNTPIGDGPVLLPDNHYL
STQSALS KDPNEKRDHMLLEFVTAAGITLGMDELYKHHHHHHWSHPQFEK*

2.3.5. Séquence nucléique du Nb₅₉-linker-EGFP-6his-Streptag

>ATGCAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGrGGAGGCACGGTGCAGGCTGGAGGGTCT
CTGAGACTCTCCTGTTCAATCTCTGGAGACACCTCCAATCCTACTGCATGGGCTG
GTTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGAACGGGAGGTAGTCGCACATATCAGTACTGG
TGTTATTAGTCCAGGCTACAACAAGTTTTTCAGAGGGCCGATTCACCATCTCCCA
GACAACGCCAAGA ACTCGGTGTATCTGCAAATGAACAACCTGAAACCTGACGAC
ACGGCTATGTACTGTGCAGCGAGAACCGGCTACTGTTCAGGTTCTTGGGGCG
TCGCTGATTCGTTAATGGCTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTC**GTC**
CGGCGGAGGCTCCGGAGGCGGAGGTGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGG
GGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAG
CGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTT
CATCTGCACCACCGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCACCCTCGTGACCACCCTG
ACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACT
TCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAA
GGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCT
GGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCT
GGGGCACAAGCTGGAGTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGA
CAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACCTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGA
CGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCATCGGCGACGG
CCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAA
GACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCC

GGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGCATCACCATCACCATCACTGGT
CACACCCTCAGTTCGAAAAGTGA

3. Préparation de Fc-PEG-Nb₅₉-GFP avec un degré de marquage de 8 Fc-PEG/Nb₅₉-GFP

Les chaînes Fc-PEG ont été conjuguées au Nb₅₉-GFP anti GFLV, en mettant en jeu une réaction de couplage covalent entre la fonction ester activée NHS portée par une chaîne PEG redox, NHS-PEG-Fc, avec les amines primaires (lysine) exposées en surface par la protéine GFP.

Pour assurer un marquage complet de la GFP, la concentration de NHS doit être 10 fois supérieure à celle du Nb₅₉-GFP. Ainsi, la concentration de l'agent de pegylation activé, Fc-PEG-NHS, a été choisie pour être supérieure à 0.2 mM, sachant que la concentration du Nb₅₉-GFP était d'environ 20 µM dans un volume de réaction de 60 µL. La procédure de bioconjugaison peut être divisée en 3 étapes différentes :

3.1. Échange de tampon du Nb₅₉-GFP à pH 8 et concentration de l'échantillon

25 µL de la solution du Nb₅₉-GFP anti GFLV ont été dilués dans 500 µL de tampon phosphate 0,1 M à pH 8 afin d'obtenir une concentration de Nb₅₉-GFP de 0,1 mg/mL. Cette solution de Nb₅₉-GFP a ensuite été filtrée à l'aide d'un filtre stérile à membrane PVDF de 0,22 µm sur une seringue stérile WVR de 4 mm. La concentration de la solution du nanocorps filtrée a été évaluée par spectrophotométrie UV-vis en mesurant son absorbance à 280 nm et en utilisant la loi de Beer-Lambert (coefficient d'extinction molaire, $\epsilon_{280} \sim 53 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ et poids moléculaire, $M \sim 42 \text{ kDa}$). Une absorbance de 0,245 a été enregistrée, correspondant à ~0,194 mg/mL de Nb₅₉-GFP dans un volume de 110 µl. Ainsi, 0,5 nmol de Nb₅₉-GFP ont été utilisés pour la procédure de bioconjugaison. Après l'analyse spectrophotométrique, la solution de nanocorps a été centrifugée pendant 14 minutes à 9168 g en utilisant un filtre à membrane Amicon ultra-4 de 10 kDa. Le volume de Nb₅₉-GFP concentré obtenu a été estimé par pesée : un microtube Eppendorf stérile a été pesé avant et après l'ajout de la solution de nanocorps. Le volume requis de tampon phosphate 0,1 M à pH 8 pour obtenir 50 µL a été ajouté.

3.2 Réaction du Nb₅₉-GFP avec le Fc-PEG-NHS.

220 nM de Fc-PEG₃₅₀₀-NHS ont été ajoutés à la solution de Nb₅₉-GFP à une concentration de 8,5 µM dans un tampon phosphate à 100 mM et pH 8. Cette quantité de Fc-PEG₃₅₀₀-NHS correspond approximativement à un rapport Fc-PEG₃₅₀₀-NHS/ Nb₅₉-GFP de 21 (0,61 nmol de

Nb₅₉-GFP). La solution a été doucement agitée et laissée réagir pendant 4 heures à température ambiante, dans l'obscurité.

3.3 Purification du nanocorps redox Fc-PEG-Nb₅₉-GFP

Une fois la réaction de bioconjugaison terminée, une étape de purification a été réalisée pour séparer les molécules de Fc-PEG-Nb₅₉-GFP des chaînes Fc-PEG non attachées. Pour cela, 500 µl de tampon phosphate salin pH 7,4 (PBS) a été ajouté à la solution de nanocorps, qui a été filtrée à l'aide d'un filtre VWR de 4 mm avec une membrane PVDF de 0,22 µm et transférée dans une unité Amicon-4 de 10 kDa. Pour assurer l'élimination complète des chaînes Fc-PEG non attachées, le Fc-PEG-Nb₅₉-GFP nouvellement synthétisé a été soumis à 6 cycles de concentration/dilution. Après chaque étape de centrifugation de 14 min à 9168 g, les molécules de protéines Nb₅₉-GFP marquées par Fc étaient retenues dans la solution de ~50 µL conservée au-dessus du filtre (le concentré), tandis que les chaînes Fc-PEG non attachées passaient librement à travers la membrane dans l'éluat. Ce dernier a été analysé par spectrophotométrie UV-visible afin de suivre les bandes d'absorption caractéristiques des chaînes Fc-PEG libres et des groupes NHS. L'absorbance de l'éluat a diminué progressivement après chaque étape d'ultrafiltration, ce qui démontre que les chaînes Fc-PEG libres ont été progressivement éliminées du concentré. Après 5 cycles, les chaînes Fc-PEG n'étaient plus détectables dans l'éluat, assurant que le concentré ne contenait que du Fc-PEG-Nb₅₉-GFP. La fin de la purification du Fc-PEG-Nb₅₉-GFP est atteinte pour la 6^{ème} centrifugation. La solution de concentré final a été soigneusement pipetée et transférée dans un microtube Eppendorf stérile, sa concentration mesurée par spectrophotométrie et son volume estimé par pesée.

L'analyse par spectrophotométrie UV-Vis du conjugué Fc-PEG-Nb₅₉-GFP a fourni une estimation du degré de marquage du Nb₅₉-GFP (voir Chapitre 2). Un nombre d'environ 8 chaînes Fc-PEG par Nb₅₉-GFP a été déterminé.

Enfin, du PBS contenant 0,01 % (p/v) d'azide de sodium a été ajouté et la solution de Fc-PEG-Nb₅₉-GFP a été conservée au réfrigérateur pour une utilisation ultérieure

4. Assemblage des différents composants du système.

Le système basé sur GFLV a été assemblé sur des surfaces d'or TS ultra-plates, une stratégie décrite ci-dessous.

4.1. Préparation d'électrodes d'or TS ultra-plates

Les surfaces d'or ultra-plates, utilisées pour les expériences d'imagerie AFM et pour la caractérisation par voltammétrie cyclique des systèmes basés sur GFLV, ont été produites par la méthode de "template-stripping" (TS). Pour cela, des surfaces de mica atomiquement plates ont été utilisées comme gabarit pour le dépôt d'une couche d'or d'une épaisseur de 200 nm, suivant la procédure décrite dans la littérature.^{5,6} Après dépôt thermique de la monocouche d'or sur un mica fraîchement clivé, un substrat en verre a été collé sur la surface externe de l'or. Le sandwich obtenu mica/or/verre a été stocké jusqu'à son utilisation. Juste avant utilisation, la feuille de mica a été enlevée chimiquement du sandwich en la plongeant dans une solution de tétrahydrofurane pendant au moins 10 minutes, permettant de récupérer une surface d'or TS fraîchement "template-stripped". Un masque adhésif perforé en Téflon a été collé sur la surface d'or TS pour définir une électrode en forme de disque de 4 mm de diamètre. Toutes les étapes ultérieures de modification de surface ont été effectuées en déposant des gouttes de solutions d'environ 20 μL confinées à la zone de l'électrode définie par le masque hydrophobe en Téflon. L'électrode d'or TS ainsi obtenue a ensuite été soigneusement rincée à l'éthanol et à l'eau Milli-Q avant une modification immédiate.

4.2. Auto-assemblage d'une couche de cystéamine sur les surfaces d'or.

Une surface d'or ultra-plate, délimitée par un masque adhésif en téflon de 4 mm de diamètre, a tout d'abord été mise en contact avec une goutte de 20 μL d'une solution de 5 mM de chlorhydrate de cystéamine dans de l'eau Milli-Q, pendant 2 heures, sous une atmosphère d'azote saturée en eau. Toutes les étapes d'assemblage ultérieures ont été réalisées sous la même atmosphère inerte, afin d'éviter la désorption oxydative de la couche de cystéamine de la surface de l'électrode d'or.

4.3. Adsorption des virus GFLV sur les surfaces d'or

Une solution de 20 μL de tampon phosphate contenant des particules virales de GFLV à une concentration choisie dans la plage de 2 à 30 $\mu\text{g/mL}$, a été laissée sur la surface d'or fonctionnalisée par la cystéamine pendant 20 minutes pour l'adsorption. Ensuite, la surface a été soigneusement rincée par deux étapes de remplacement de gouttes et laissée en contact avec du tampon phosphate pendant 10 minutes pour désorber tout matériel faiblement lié. Ces conditions ont produit des réseaux aléatoires de GFLV irréversiblement adsorbés sur surface d'or TS ultra plate avec une couverture de surface reproductible dépendant de la concentration de GFLV adsorbée au début.

4.4. Protection de la surface d'or par des agents bloquants de l'adsorption non spécifique des nanocorps

La surface a été « bloquée » en adsorbant séquentiellement de l'albumine sérique bovine (BSA) à une concentration de 2 mg/mL pendant 30 minutes, suivie de la protéine B₂-GFP à 1 mg/mL pendant 30 autres minutes. Cette étape a été effectuée pour prévenir l'adsorption non spécifique lors des étapes d'assemblage ultérieures.

4.5. Assemblage du nanocorps anti-GFLV, Fc-PEG-Nb₅₉-GFP.

La surface portant le virus GFLV et protégée avec une couche de BSA/B₂-GFP a été incubée avec 20 µL d'une solution de Fc-PEG-Nb₅₉-GFP à 16 µg/mL pendant toute une nuit. Ensuite, deux étapes de rinçage/désorption de 10 minutes chacune ont été effectuées en utilisant une solution tampon phosphate contenant 1 mg/mL de BSA et 0,5 mg/mL de B₂-GFP.

4.6. Assemblage du nanocorps anti-GFLV, GDH-Nb₇₅.

20 µL d'une solution à 15 µg/mL de conjugué anti-GFLV, GDH-Nb₇₅ dans un tampon Tris a été mis en contact avec la surface pendant 2 heures. Deux étapes de rinçage/désorption de 5 minutes chacune, a été réalisée dans la même solution tampon contenant 1 mg/mL de BSA et 0,5 mg/mL de B₂-GFP.

5. Détermination du nombre de molécules d'enzyme décorant les particules de GFLV par spectrophotométrie

Pour déterminer le nombre de molécules d'enzyme décorant chaque particule virale individuelle, le système à base de GFLV a été assemblé sur des surfaces en or TS ultra-plates.

Les étapes de modification de la surface d'or ont été réalisées comme décrit précédemment (sections 4.1- 4.4). De manière similaire à ce qui avait été fait pour la caractérisation du système basé sur *fd*,⁷ la quantité de molécules de GDH décorant chaque particule virale de GFLV a été quantifiée en mesurant le cofacteur PQQ relargué de la surface d'or. Une solution de virus à 16 µg/mL a été utilisée et une densité de virus de 130 particules/µm² a été obtenue, comme confirmé par AFM en mode tapping dans l'air. Après l'assemblage, une goutte de 20 µL de tampon glycine pH 2,5 a été mise en contact avec la surface pendant 90 min, afin de retirer les nanocorps GDH-Nb₇₅ des particules virales. Cette goutte a été collectée et la surface a ensuite été rincée deux fois avec 20 µL de tampon Tris pH 7,5. Les trois gouttes ont été regroupées et portées à 100 µL en ajoutant le volume requis de tampon Tris pH 7,5. L'échantillon de 100 µL

a ensuite été chauffé dans un bain à circulation d'eau à 50°C pendant 60 min, dénaturant la GDH et favorisant la libération spontanée de ses molécules de cofacteur PQQ.⁸ L'apo GDH a été ajouté en excès (100 nM) par rapport à la quantité de PQQ dans l'échantillon. Une fois en contact avec les molécules de PQQ à doser, l'apo-GDH ajouté a été spontanément reconstitué sous forme d'holo-GDH et son activité a été mesurée par spectrophotométrie en présence de glucose et de deux cofacteurs redox solubles (la phénazine méthosulfate (PMS) et le dichlorophénolindophénol (DCPIP)), comme représenté en Figure 1. L'absorbance du DCPIP, qui agit comme accepteur d'électrons terminal de la chaîne redox, a été mesurée à 600 nm immédiatement après l'ajout de glucose. Sa concentration décroissait linéairement avec l'oxydation du glucose catalysée par le PQQ-GDH.

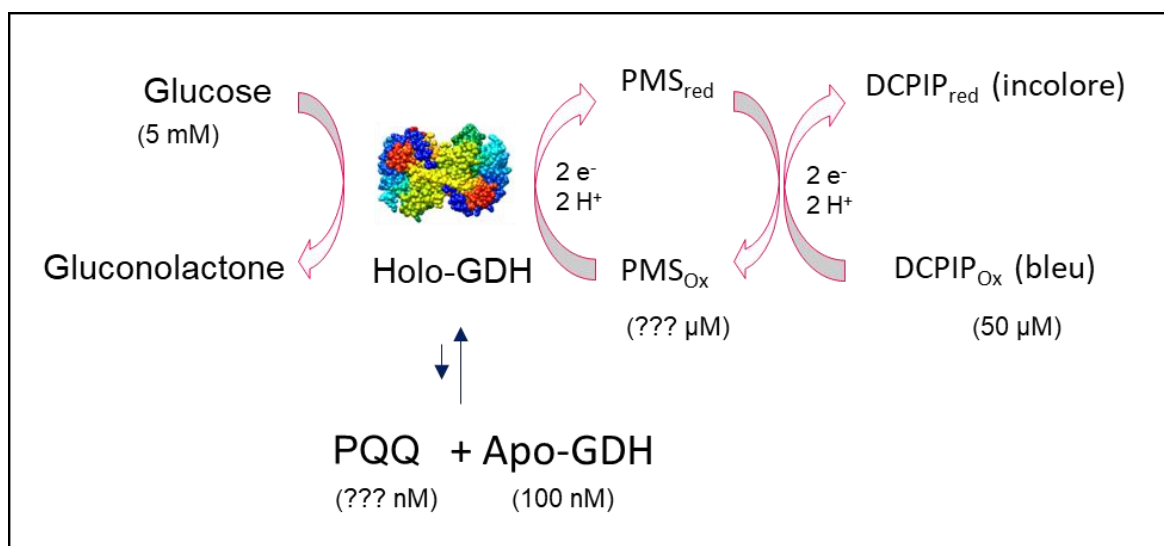


Figure 1. Schémas du dosage de PQQ relargué des surfaces d'or.

Pour le dosage, les solutions suivantes ont été mélangées dans une cuvette en plastique (les concentrations finales sont indiquées entre parenthèses) :

100 μL d'échantillon traité thermiquement

10 μL d'apo-GDH (100 nM)

10 μL de DCPIP (50 μM)

10 μL de PMS/Ca²⁺ (10 mM/0,5 mM)

2 μL de glucose (5 mM)

La vitesse de décroissance de la concentration de DCPIP a été mesurée. À partir de cette valeur, il a été possible de calculer la concentration de PQQ. Pour cela, des solutions étalons de PQQ avec une concentration connue ont été utilisées pour construire une courbe d'étalonnage présentée en Figure 2B. La quantité de PQQ calculée a été divisée par un facteur de 2 pour obtenir la quantité totale de PQQ-GDH présente initialement à la surface, car le PQQ-GDH est une enzyme dimérique, chaque monomère contenant 1 molécule de PQQ comme cofacteur. Une valeur d'environ 5 molécules de GDH par particule virale a été calculée.

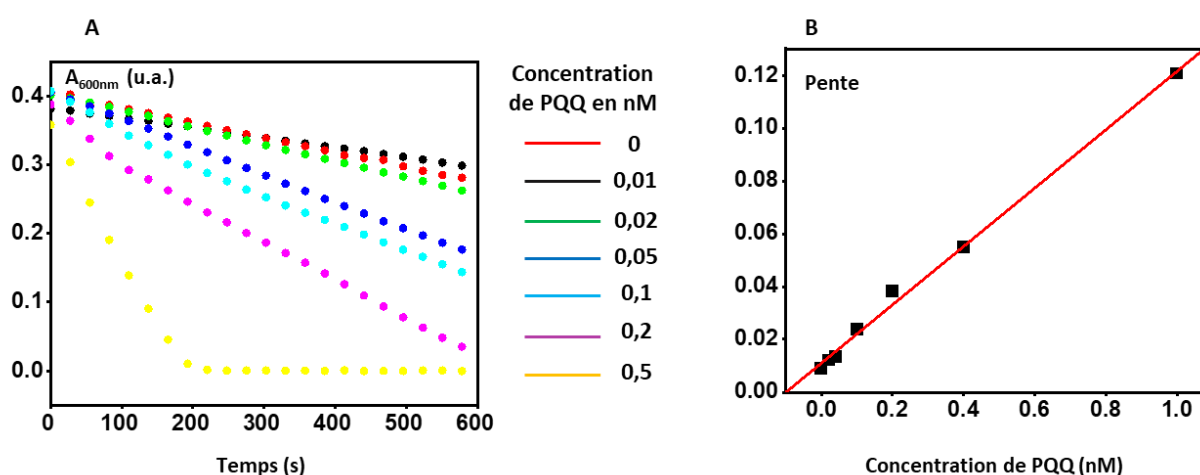


Figure 2. (A) Courbes montrant la décroissance de l'absorbance de DCPIP à 600 nm pour différentes concentrations de PQQ. (B) Courbe d'étalonnage de PQQ.

6. Imagerie AFM.

Avant l'imagerie AFM des surfaces portant le GFLV, celles-ci ont été traitées avec du Glutaraldéhyde à 1% dans un tampon phosphate de 10 mM à pH 7. Cet agent fixateur a rigidifié les particules, les rendant plus faciles à imager. L'imagerie devait donc être effectuée après toutes les étapes d'assemblage et de caractérisation. Nous avons veillé, en imager des surfaces de test à différents stades des expériences, à ce que la couverture virale sur la surface ne soit pas affectée par ces étapes. Les images en mode tapping AFM ont été acquises à l'aide d'un microscope Nanowizard II (JPK, Allemagne). L'imagerie à l'air a été effectuée après rinçage de la surface à l'eau et séchage, à l'aide d'une pointe commerciale Multi75G avec une constante de ressort spécifique de 0,1 N/m et une fréquence de 75 kHz. L'imagerie in situ (dans un tampon phosphate ou de Tris) a été réalisée à l'aide de pointes en or souples faites maison qui ont été préparées à partir d'un fil d'or étiré et aplati de 25 μm de diamètre, avec une constante de ressort inférieure à 0,1 N/m.

7. Sondes AFM

Notre protocole de fabrication de sondes AFM produit des sondes présentant un cantilever flexible rectangulaire ("bras") portant une pointe fine, une géométrie assez courante pour les sondes AFM (voir Figure 3)

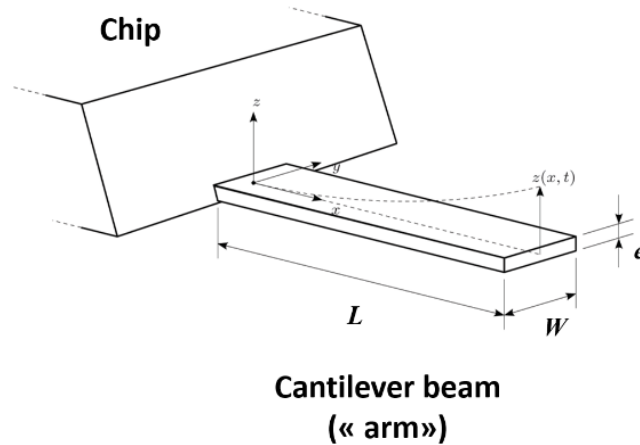


Figure 3. Schémas du cantilever rectangulaire (bras) d'une sonde AFM.

La "rigidité" d'une sonde AFM et son comportement dynamique dépendent principalement des dimensions physiques de la poutre de la cantilever : sa longueur, L , sa largeur, W et son épaisseur, e . Lorsqu'elle se plie, la poutre agit comme un ressort de mesure de force, caractérisé par une constante de raideur, k , donnée par :

$$k = \frac{EW e^3}{4L^3}, \text{ où } E \text{ est le module de Young du matériau de la sonde (79 GPa pour l'or).}$$

La fréquence fondamentale de flexion de la poutre, f , est donnée par :

$$f = 0.56 \frac{e}{L^2} \sqrt{\frac{E}{12\rho}}, \text{ où } \rho \text{ est la masse spécifique du matériau de la sonde (19300 kg/m}^3 \text{ pour l'or).}$$

Dans notre cas, la poutre est produite en aplatissant un fil, la largeur et l'épaisseur de la poutre sont liées au rayon du fil, r , par :

$$\pi r^2 = eW$$

Cette relation suppose que le fil, une fois aplati, ne subit pas d'allongement significatif. De plus, nous avons également remarqué que, pour notre processus d'aplatissement, la largeur de la poutre obtenue est systématiquement ~ 8 fois plus grande que le rayon du fil initial : $W \sim 8r$. Par conséquent, la constante de raideur et la fréquence de nos sondes sont liées à r et données par :

$$k = \frac{E\pi^3 r^4}{256L^3}$$

À partir de ces formules, il peut être calculé que la constante de raideur des sondes fabriquées jusqu'à présent à partir de fils d'or de $25 \mu\text{m}$, avec une longueur typique de poutre L dans la plage de 1-2 mm, est plus petite que 0.1 N/m, leur fréquence d'oscillation est de l'ordre de 1.6 kHz

8. Préparation des sondes AFM

Les résultats d'imagerie AFM in situ présentés dans le chapitre III ont été obtenus en utilisant principalement des sondes AFM fabriquées à partir de fils d'or de $25 \mu\text{m}$ de diamètre. Le protocole utilisé pour fabriquer ces sondes, inspiré des premiers travaux de la littérature du groupe Unwin,⁹ a été rapporté par notre groupe en 2002.¹⁰ Il a été continuellement amélioré depuis, dans le cadre de plusieurs thèses.¹¹⁻¹³

8.1. Aplatir un fil d'or pour former un bras flexible sensible à la force

Les sondes AFM sont préparées à partir d'un fil d'or pur à 99,99 %, de $25 \mu\text{m}$ de diamètre. La procédure commence par la formation d'un bras flexible en aplatissant le fil d'or entre deux anneaux en acier inoxydable bien polis. Le diamètre d'anneau en acier inoxydable utilisé, est de 5 mm. Pour obtenir un bras parfaitement lisse, la surface des anneaux en acier inoxydable doit être soigneusement polie pour éliminer les rayures laissées par les sessions d'aplatissement précédentes. Un polissage grossier est d'abord effectué en utilisant un disque abrasif SiC P1200 ($15,3 \mu\text{m}$), puis un disque SiC P2400 ($6,5 \mu\text{m}$). Les séries subséquentes d'étapes de polissage sont effectuées sur des disques PAL-F portant des suspensions à base de poudre d'alumine de taille de grain de plus en plus petite (3, 0,3 et $0,03 \mu\text{m}$). Entre chaque étape de polissage, les anneaux sont rincés à l'eau Milli-Q et « ultrasoniqués » pendant 5 minutes pour éliminer les

particules d'alumine. Une étape de rinçage final avec de l'acétone est finalement effectuée, suivie d'un séchage sous flux de N₂. Pour l'aplatissement, une portion droite et non tordue du fil d'or, d'environ 1,5 cm de long, est placée entre les anneaux en acier inoxydable, comme illustré à la Figure 4A, l'extrémité du fil dépassant d'au moins 3-5 mm de chaque côté de l'anneau. Comme représenté en Figure 4B, les anneaux sont ensuite placés dans les mâchoires d'un étau, qui est progressivement serré pour aplatir le fil et former le bras de la sonde.

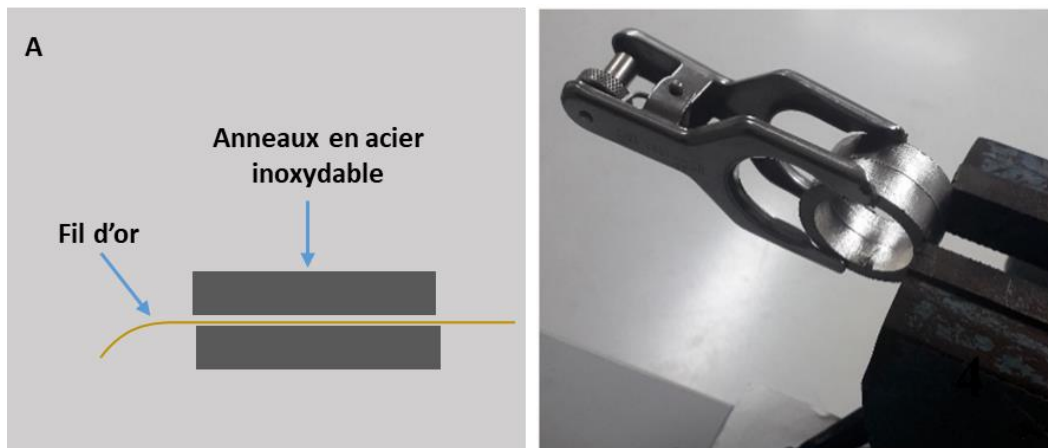


Figure 4. Représentation schématique (A) du positionnement correct du fil d'or entre les deux anneaux en acier inoxydable polis et (B) de leur placement dans les mâchoires d'un étau pour aplatir le fil d'or et former le bras flexible du cantilever.

L'idéal est que le bras soit rectangulaire, sans défauts et lisse, comme montré en Figure 5. Une largeur de bras d'environ 100 μm est attendue pour ces fils d'or de 25 μm de diamètre.

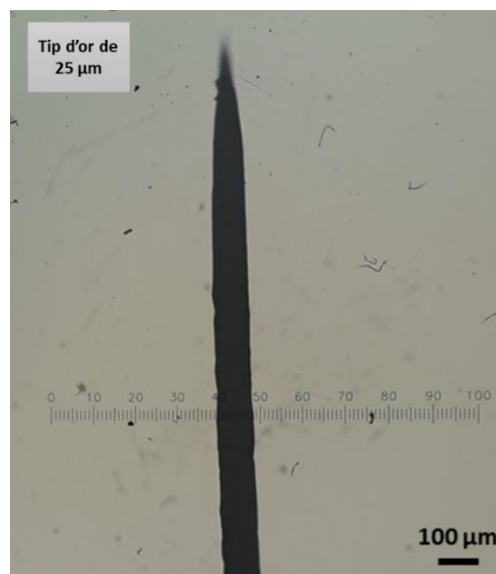


Figure 5. Images au microscope optique du fil d'or aplati de 25 μm de diamètre montrant le bras du cantilever. Grossissement 10x.

Le "nez" de la sonde est ensuite formé en pliant l'extrémité non-aplatie du fil qui dépasse des anneaux. Le fil fraîchement aplati est plié après avoir été retiré des anneaux et placé sur une surface souple. Une fine lamelle d'acier inoxydable est ensuite utilisée pour exercer une pression locale à l'intersection entre les portions aplaties et non-aplaties du fil, afin de plier son extrémité (Figure 6). Dans tous les cas, l'extrémité pliée, correspondant au nez de la sonde, est ensuite coupée avec une lame de cutter à une longueur d'environ 1 mm. L'autre extrémité du fil est finalement insérée entre les mâchoires d'une mini-pince crocodile, afin d'être manipulée pour les étapes suivantes. À la fin de cette étape, le fil aplati est examiné avec un microscope optique (Figure 5).

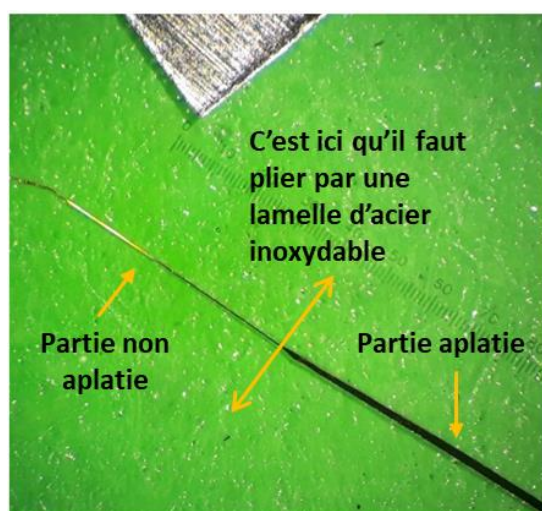


Figure 6. Etape pour la formation du nez d'une sonde fabriquée à partir d'un fil d'or de 25 μm .

8.2. Formation de l'extrémité pointue de la sonde par électrocorrosion.

Pour donner une forme conique, l'extrémité du nez de fil est soumise à une électrocorrosion. L'extrémité du nez est immergée dans une goutte d'une solution corrosive contenant 5 mL de CaCl_2 saturé, 3 mL d' HCl , 10 mL d'éthanol et 20 mL d'eau Milli-Q. Cette solution est diluée par un facteur de 2 lors de l'électrocorrosion des fils d'or de 25 μm .

Environ 1 mL de la solution d'électrocorrosion est déposé sur la surface d'une plaque de platine, sur une zone délimitée par un masque isolant formant deux réservoirs latéraux reliés par une région centrale étroite (Figure 7). Dans cette région, la surface de platine est isolée par une bande de parafilm et la solution forme une goutte, dans laquelle le nez de fil d'or est immergé.

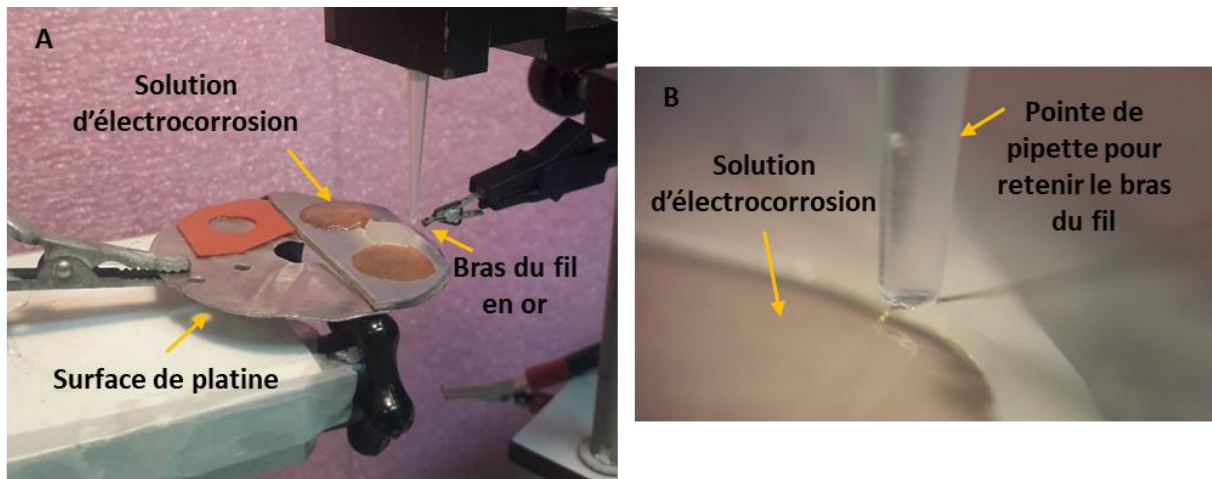


Figure 7. (A) Photo de l'installation utilisée pour l'électrocorrosion afin d'affiner le nez de la sonde. (B) Photo prise avant l'immersion dans la solution d'électrocorrosion, montrant le positionnement de la pipette en plastique tenant le bras flexible de la sonde faite d'un fil d'or de 25 μm de diamètre.

La position du fil d'or dans la goutte est méticuleusement ajustée à l'aide d'un micromanipulateur et surveillée avec un microscope à longue distance. Cependant, pour ces fils d'or de 25 μm , la position du bras est difficile à contrôler car il est très flexible et est généralement "aspiré" dans la solution par des forces capillaires. Une pointe de pipette en plastique est donc utilisée pour retenir électrostatiquement le bras du fil, le maintenant horizontal et empêchant son immersion dans la solution, comme le montrent la Figure 7B.

La dissolution anodique du fil d'or est ensuite réalisée en appliquant une différence de potentiel de +3,4 V entre le fil d'or (anode) et la plaque de platine (cathode), reliée au potentiostat en configuration à deux électrodes. Pendant l'électrocorrosion, le courant est enregistré en fonction du temps. Un chronoampérogramme typique ainsi obtenu est présenté en Figure 8.

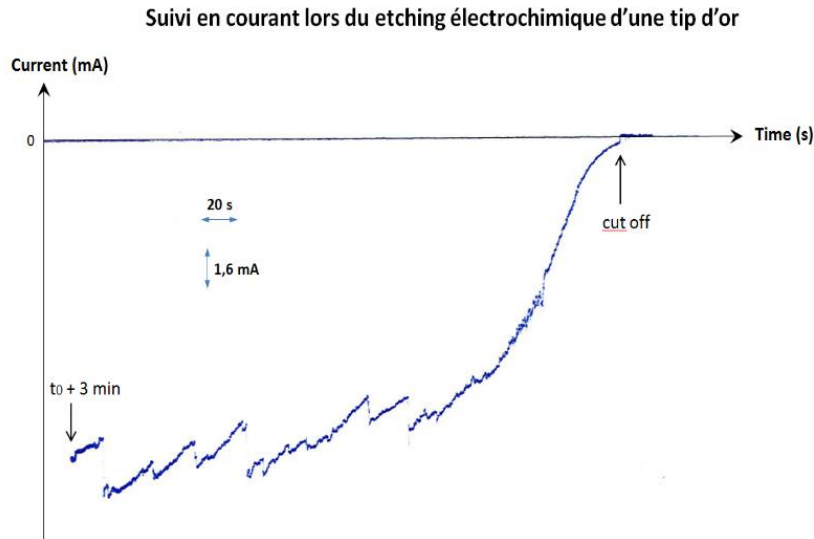


Figure 8. Courbe montrant la variation du courant typique des dernières minutes de l'électrocorrosion de fils d'or. Le processus est arrêté immédiatement avant que le courant n'atteigne 0.

Deux zones différentes peuvent être clairement identifiées : une décroissance de courant lente et presque linéaire durant les premières minutes, suivie d'une décroissance asymptotique du courant vers 0. Comme on peut le voir, le chronoampérogramme présente également des "sauts" de courant, enregistrés lorsque des bulles de gaz se détachent du fil d'or. Des bulles se forment également à la surface de platine, mais comme la région de la plaque de platine sous la sonde est isolée avec une bande de parafilm hydrophobe, aucune bulle ne se forme là. Cela empêche l'immersion accidentelle du bras flexible dans la solution.

Pour obtenir une pointe très fine, l'électrocorrosion est interrompue en ouvrant manuellement le circuit avant que l'intensité du courant n'atteigne 0. Idéalement, l'électrocorrosion est interrompue lorsque l'intensité atteint moins de 5% de sa valeur initiale. Le rayon de courbure de l'extrémité de la pointe est alors généralement compris entre 10 et 20 nm, comme le montrent les caractérisations antérieures en microscopie électronique à balayage¹³. Une pointe avec un rayon de courbure plus grand, d'environ 100 nm, peut être obtenue en laissant l'électrocorrosion se terminer d'elle-même. Une fois attaquée, le fil d'or doit être examinée attentivement au microscope optique pour s'assurer que l'électrocorrosion a été réussie et pour évaluer les dimensions de la pointe. Comme le montre l'exemple représenté sur les Figures 9A et 9B, une pointe en forme d'aiguille est généralement formée et la longueur du nez est de l'ordre de 300 à

500 μm . Dans l'ensemble, l'étape d'électrocorrosion est cruciale car la résolution de l'AFM dépend à la fois de la taille et de la géométrie de l'extrémité de la pointe.

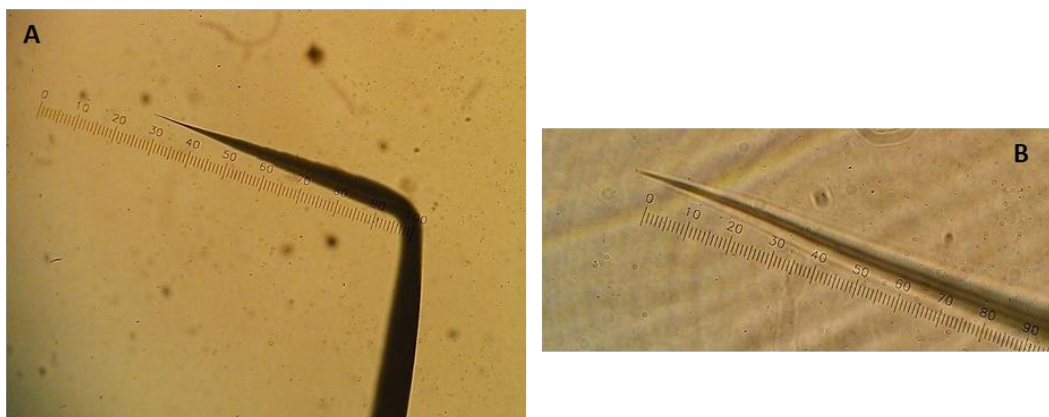


Figure 9. Images au microscope optique d'une sonde en or après gravure électrochimique, montrant (A) le bras flexible et le nez. Grossissement 10x. (B) Détail montrant l'extrémité aiguë du nez (pointe). Grossissement 100x.

8.3. Collage des sondes exposées sur des lamelles en polycarbonate et montage sur le prisme AFM

Afin d'être utilisée dans le microscope AFM, la sonde doit être collée sur une micro-lamelle rectangulaire en polycarbonate (3 mm x 1,5 mm) pour être montée sur le prisme en verre de l'AFM.

Généralement, cette étape de collage est réalisée en utilisant une colle cyanoacrylate à durcissement lent spécialement choisie, car le temps nécessaire pour commencer le durcissement (environ une minute) permet le positionnement de la sonde sur la micro-lamelle. Cette étape est cruciale car les propriétés dynamiques de la sonde dépendent, entre autres facteurs, de la longueur du bras (partie flexible de la sonde dépassant la micro-lamelle). En règle générale, lors du collage d'une sonde préparée à partir d'un fil de 25 μm de diamètre, une longueur de bras comprise entre 0,8 et 1,0 mm est visée.

Un problème avec la colle cyanoacrylate est la nécessité d'une étape de séchage sous flux de N_2 , d'une durée de quelques heures, pour éviter le dépôt de la colle volatile sur l'apex de la sonde. Cette étape supplémentaire augmente considérablement la durée de la procédure de préparation de la sonde. Une autre colle durcissable aux UV peut être utilisée. Il s'agit d'une solution liquide de colle qui ne durcit qu'une fois exposée au rayonnement UV. L'étape de séchage sous N_2 n'est plus nécessaire lors de l'utilisation de cette nouvelle colle à faible

volatilité et, en outre, le temps disponible pour manipuler et positionner la sonde sur la micro-lamelle en polycarbonate est beaucoup plus long qu'avec la colle précédente.

Après le collage sur la micro-lamelle en polycarbonate, la sonde doit être fixée sur le prisme en verre de l'AFM à l'aide d'une colle "bleue" fournie par Bruker JPK.

8.4. Détermination des propriétés mécaniques des sondes AFM.

Une fois collées et montées sur le prisme, les sondes peuvent être placées dans le microscope JPK pour la détermination de leurs propriétés mécaniques et dynamiques. Comme les sondes sont destinées à être utilisées en mode tapping, leur fréquence de résonance flexurale fondamentale doit être déterminée. Cela est réalisé en enregistrant le spectre de bruit thermique de la sonde, qui est un graphique des fluctuations spontanées du cantilever en fonction de la fréquence. La fréquence de résonance flexurale fondamentale du cantilever peut être identifiée à partir du spectre, qui affiche généralement un pic unique bien défini. La Figure 10 représente deux exemples de spectres de bruit thermique déterminés pour deux sondes fabriquées.

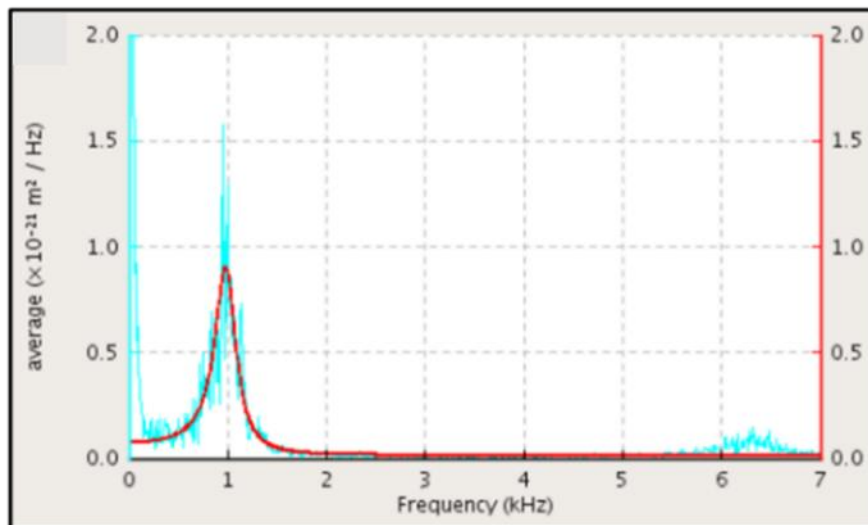


Figure 10. Spectres de bruit thermique montrant le pic de résonance mesuré du cantilever (bleu) et l'ajustement de Lorentz (rouge) d'un cantilever AFM fabriqué à partir d'un fil d'or de 25 µm de diamètre. Le spectre a été acquis en milieu aqueux.

La sonde fabriquée à partir d'un fil d'or de 25 µm de diamètre donne lieu à un pic de résonance proche de 1 kHz. Veuillez noter que les fréquences dérivées du spectre thermique sont généralement inférieures à celles calculées à partir des seules dimensions du bras. Cela est dû à l'influence du milieu liquide et de la présence du nez, qui agissent tous deux comme des masses ajoutées et abaissent la fréquence réelle d'oscillation du bras. Notez également que, puisque l'amplitude des fluctuations dépend de la constante de ressort du cantilever, ce paramètre peut également être déterminé à partir du spectre thermique.

Cependant, cela nécessite l'enregistrement d'une courbe d'approche en mode contact pour étalonner le détecteur laser sensible à la position. En général, nous évitons d'enregistrer de telles courbes d'approche pour les pointes utilisées dans les expériences réelles d'AFM, car cela peut endommager l'apex de la pointe.

Bibliographie

- (1) Nault, L.; Taofifenua, C.; Anne, A.; Chovin, A.; Demaille, C.; Besong-Ndika, J.; Cardinale, D.; Carette, N.; Michon, T.; Walter, J. Electrochemical Atomic Force Microscopy Imaging of Redox-Immunomarked Proteins on Native Potyvirus: From Subparticle to Single-Protein Resolution. *ACS Nano* **2015**, *9* (5), 4911–4924. <https://doi.org/10.1021/acsnano.5b00952>.
- (2) Belval, L.; Hemmer, C.; Sauter, C.; Reinbold, C.; Fauny, J. D.; Berthold, F.; Ackerer, L.; Schmitt-Keichinger, C.; Lemaire, O.; Demangeat, G.; Ritzenthaler, C. Display of Whole Proteins on Inner and Outer Surfaces of Grapevine Fanleaf Virus-like Particles. *Plant Biotechnol J* **2016**, *14* (12), 2288–2299. <https://doi.org/10.1111/pbi.12582>.
- (3) C. Hemmer, S. Djennane, L. Ackerer, K. Hleibieh, A. Marmonier, S. Gersch, S. Garcia, E. Vigne, V. Komar, M. Perrin, C. Gertz, L. Belval, F. Berthold, B. Monsion, C. Schmitt-Keichinger, O. Lemaire, B. Lorber, C. Gutiérrez, S. Muyldermans, G. Demangeat, C. Ritzenthaler, *Plant Biotechnol. J.* **2018**, *16*, 660–671.
- (4) M. Incarbone, M. Clavel, B. Monsion, L. Kuhn, H. Scheer, É. Vantard, V. Poignavent, P. Dunoyer, P. Genschik, C. Ritzenthaler, *Plant Cell* **2021**, *33*, 3402–3420.
- (5) Huang, K.; Anne, A.; Bahri, M. A.; Demaille, C. Probing Individual Redox PEGylated Gold Nanoparticles by Electrochemical–Atomic Force Microscopy. *ACS Nano* **2013**, *7* (5), 4151–4163.
- (6) Hegner, M.; Wagner, P.; Semenza, G. Ultralarge Atomically Flat Template-Stripped Au Surfaces for Scanning Probe Microscopy. *Surf. Sci.* **1993**, *291* (1–2), 39–46.
- (7) Torbensen, K.; Patel, A. N.; Anne, A.; Chovin, A.; Demaille, C.; Bataille, L.; Michon, T.; Grelet, E. Immuno-Based Molecular Scaffolding of Glucose Dehydrogenase and Ferrocene Mediator on Fd Viral Particles Yields Enhanced Bioelectrocatalysis. *ACS Catal* **2019**, *9* (6), 5783–5796. <https://doi.org/10.1021/acscatal.9b01263>.
- (8) Witarto, A. B.; Ohtera, T.; Sode, K.; Takafumi, O.; Sode, K. Site-Directed Mutagenesis Study on the Thermal Stability of a Chimeric PQQ Glucose Dehydrogenase and Its Structural Interpretation. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **1999**, *77–79*, 159–168.

- (9) Macpherson, J. V.; Unwin, P. R. Combined Scanning Electrochemical-Atomic Force Microscopy. *Anal Chem* **2000**, *72* (2), 276–285. <https://doi.org/10.1021/ac990921w>.
- (10) Abbou, J.; Demaille, C.; Druet, M.; Moiroux, J. Fabrication of Submicrometer-Sized Gold Electrodes of Controlled Geometry for Scanning Electrochemical-Atomic Force Microscopy. *Anal Chem* **2002**, *74* (24), 6355–6363. <https://doi.org/10.1021/ac020385z>.
- (11) Chennit, K. Combiner Nanopuces et Microscopie Électrochimique à Force Atomique à Médiateur Lié Pour l'adressage de Biomacromolécules Individuelles, Thèse de Doctorat de l'Université Paris Diderot - Paris 7, 2018.
- (12) Abbou, J. Développement d'une Microscopie Électrochimique (SECM) à l'échelle Du Nanomètre Par Couplage Avec La Microscopie à Force Atomique (AFM) : Application à l'étude de La Compression et de La Dynamique de Chaînes Linéaires de Polyéthylène Glycol Immobilisées P, Thèse de Doctorat de l'Université Paris Diderot - Paris 7, 2004.
- (13) Bahri, M. A. Vers l'adressage de Biomolécules Uniques Par Microscopie Électrochimique à Force Atomique à Médiateur Lié Mt/AFM-SECM, Thèse de doctorat de l'Université Paris Diderot, 2012.

