

Les extrémozymes en électrocatalyse

Résumé Les environnements extrêmes sont peuplés de bactéries adaptées pour supporter des conditions a priori néfastes pour tout organisme vivant. Les métalloenzymes, qui catalysent au sein de ces microorganismes de nombreuses réactions chimiques nécessaires à leur métabolisme, présentent elles aussi des propriétés remarquables. Elles apparaissent ainsi comme des catalyseurs de choix pour développer des biotechnologies durables. Résistance en présence de sels, aux hautes températures, à la présence de métaux, activité à bas pH et en conditions de faible concentration en substrat..., tels sont les facteurs dont l'impact sur l'électrocatalyse de la réduction de l'oxygène et de l'oxydation de l'hydrogène a été étudié. Grâce à la connaissance des bases moléculaires qui assurent un transfert d'électrons optimal aux électrodes, l'intérêt de l'utilisation de ces extrémozymes au sein d'une pile à combustible enzymatique haute température est démontré dans cet article.

Mots-clés **Électrochimie, métalloenzymes, électrocatalyse, extrémophilie, homéostasie du cuivre.**

Abstract **Extremozymes in electrocatalysis**

Extreme environments host bacteria adapted to withstand conditions that are a priori harmful to any living organism. The metalloenzymes, which catalyze within these microorganisms numerous chemical reactions necessary for their metabolism, exhibit themselves outstanding properties. They thus appear as attractive catalysts for developing sustainable biotechnologies. Resistance to high salt concentrations, high temperatures, presence of metals, activity in conditions of low pH and substrate concentration..., these are the factors whose impact on the electrocatalysis of the reduction of oxygen and the oxidation of hydrogen have been studied. Thanks to the knowledge of the molecular basis which ensure an optimal electron transfer to electrodes, the interest of the use of these extremozymes in a high temperature enzymatic fuel cell is demonstrated in this article.

Keywords **Electrochemistry, metalloenzymes, electrocatalysis, extremophily, copper homeostasis.**

La catalyse des réactions chimiques impliquées dans de nombreux procédés industriels (synthèse de produits finis, surveillance environnementale, diagnostic médical ou encore production d'énergie) est un processus clé vers la durabilité en accélérant les cinétiques ou en augmentant la sélectivité. Cependant, les catalyseurs chimiques sont souvent produits et utilisés de manière non écologique, nécessitant pour leur synthèse des solvants organiques ou des températures élevées, ou étant à base de métaux nobles.

Si l'on change d'échelle, il est frappant de réaliser comment les microorganismes ont cette capacité de catalyser de nombreuses réactions chimiques dans des conditions douces et durables. Parmi les microorganismes, les bactéries présentent des métabolismes divers et adaptatifs. Au sein de cette machinerie métabolique, ce sont les enzymes qui opèrent en tant que catalyseurs. Leur étonnante diversité fonctionnelle provient directement de la chimie et de la polarité des acides aminés qui se replient dans une diversité de structures tridimensionnelles. Une classe d'enzymes contient des centres redox nécessaires à leur activité. Ces oxydoréductases transforment leur substrat en échangeant des électrons avec leurs partenaires physiologiques dans la chaîne métabolique. Les composants redox peuvent être des cofacteurs inorganiques tels que la flavine adénine dinucléotide pour l'oxydation des sucres. Il peut s'agir de centres métalliques : cuivre pour la réduction de l'oxygène, fer et nickel pour la production ou l'oxydation de l'hydrogène ou encore la réduction du CO_2 , manganèse pour l'oxydation de l'eau lors de la photosynthèse, etc. De telles enzymes ont été envisagées, tout au moins à l'échelle du laboratoire, comme biocatalyseurs dans des biocapteurs électrochimiques, des réacteurs de bioélectrosynthèse ou des piles à combustible enzymatiques [1-2].

Une des principales limitations à l'utilisation des biomolécules enzymatiques est leur trop faible stabilité dans des conditions non physiologiques souvent requises en biotechnologie. Il existe cependant des bactéries dites extrémophiles, qui ont évolué pour survivre en conditions extrêmes dans des niches écologiques : événements hydrothermaux des grands fonds, sources chaudes, zones volcaniques ou drainage minier... L'identification et l'étude d'enzymes extraites de ces bactéries extrémophiles, les extrémozymes, qui possèdent des propriétés remarquables – résistance aux pH extrêmes, à la salinité, aux solvants organiques, à la température... – doit permettre d'étendre le champ d'application de la bioélectrocatalyse.

Ces concepts sont illustrés ici par la mise en évidence de propriétés « exotiques » d'enzymes redox extraites de diverses bactéries hyperthermophiles, thermophiles et acidophiles pour la catalyse de transformation de deux molécules gazeuses (réduction de O_2 , oxydation de H_2) et d'un cation métallique (oxydation de Cu^+).

Une même famille, mais tous différents

Les recherches menées depuis une décennie sur les enzymes redox à diverses interfaces électrochimiques ont permis des améliorations conséquentes des efficacités enzymatiques. Les courants de biocatalyse sont ainsi passés de quelques $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ à plusieurs dizaines de mA/cm^2 . Ces concepts ne sont pas encore généralisables à toutes les enzymes, puisqu'une majorité d'entre elles ne fonctionnent que via un médiateur redox, ou ne sont tout simplement pas adressables électrochimiquement. Même dans les cas où les paramètres favorables au transfert d'électrons ont été définis, une faible proportion des enzymes immobilisées participe effectivement à la catalyse [3]. Avant d'envisager toute utilisation d'enzymes

redox variées, il faut donc rationaliser les bioélectrodes. Un des moyens pour y parvenir est d'étudier les bases moléculaires de l'immobilisation fonctionnelle de plusieurs enzymes appartenant à la même famille mais de conformations différentes.

Les laccases (LAC) et les bilirubines oxydases (BOD) les plus communément étudiées sont celles extraites de champignons comme la LAC de *Trametes versicolor* ou la BOD de *Myrothecium verrucaria*. Il est décrit dans la littérature que certains nanomatériaux déposés en film mince sur des électrodes permettent l'immobilisation fonctionnelle de ces enzymes [4]. Pour ce qui concerne la BOD de *M. verrucaria*, des nanotubes de carbone (NTC) portant des fonctions carboxyliques de surface favorisent la catalyse de réduction de O_2 . Le groupe de Nicolas Mano (CRPP, Bordeaux) avait identifié dans la bactérie *Bacillus pumilus* une BOD thermostable [5]. Cependant, l'immobilisation de cette BOD bactérienne sur le même type de matériau que la BOD de *M. verrucaria* ne permettait pas d'obtenir de catalyse. **D'où un concept majeur à retenir : deux enzymes ayant la même fonction mais issues d'organismes différents peuvent se comporter totalement différemment pour l'électrocatalyse !** (voir encadré).

Dans le cas des BOD et des LAC, il s'agit de favoriser l'orientation de l'enzyme sur l'électrode via le Cu T1 (figure 1). Si l'on compare les deux BOD de *M. verrucaria* et *B. pumilus*, dans une large gamme de pH, le moment dipolaire pointe dans la direction du Cu T1 pour la première, et sa direction est opposée pour la seconde. Ces données induisent des interactions très différenciées en fonction de la charge de l'électrode et du pH, qui contrôlent le processus ultérieur de transfert d'électrons. Il est ainsi montré qu'une électrode modifiée par des NTC possédant une charge de surface négative augmente la proportion de molécules de BOD de *M. verrucaria* orientées favorablement pour la catalyse, alors que la BOD de *B. pumilus* n'est connectée électriquement que sur des NTC chargés positivement [7] (figure 2). Ces résultats rejoignent les données d'orientation spécifique obtenues sur électrodes d'or modifiées par des monocouches auto-assemblées de thiols présentant des charges de surface différentes [8]. En couplant de l'électrochimie à de la modélisation, nous avons

Encadré

Orienter une enzyme sur une électrode pour favoriser le transfert d'électrons

La particularité de la plupart des enzymes redox réside dans un site actif enfoui au sein de la structure protéique. Lors de leur maturation, les protéines incorporent des centres redox nécessaires à leur activité et distants de moins de 10 Å. Ainsi, le transfert d'électron intramoléculaire n'est pas limitant puisqu'il s'effectue à des vitesses bien plus grandes (k_{ET} entre $10^7 s^{-1}$ et $10^{13} s^{-1}$) que celles des réactions catalytiques d'oxydoréduction du substrat (k_{cat} entre $10 s^{-1}$ et $10^4 s^{-1}$). Un centre redox en surface de la protéine joue le plus souvent le rôle de relais électronique. Du fait de leur taille, l'adsorption non contrôlée des protéines sur une électrode induit une distribution des distances électrode/relais électronique, et donc des vitesses de transfert électronique interfacial. Une fonctionnalisation chimique de l'électrode apte à adsorber l'enzyme dans une orientation favorable doit permettre de minimiser la distance électrode/centre redox de surface. L'anisotropie des charges de surface confère aux enzymes un moment dipolaire qui va pouvoir assurer leur approche orientée de l'électrode par interactions électrostatiques [6].

de plus montré que l'enzyme peut effectuer des rotations sur l'interface électrochimique pour s'adapter aux interactions électrostatiques. On peut donc s'attendre à ce qu'un changement local de pH, attendu dans bon nombre de réactions enzymatiques, influe sur la catalyse simplement par un changement d'orientation de l'enzyme sur le support. Ce modèle électrostatique, qui prédit une catalyse contrôlée par l'orientation de l'enzyme sur des électrodes chargées en fonction de son moment dipolaire et de l'environnement du Cu T1 a été validé sur la LAC thermostable de *Thermus thermophilus* (figure 2) [9].

Des enzymes détoxifiantes

La LAC de *T. thermophilus* n'est pas que thermostable ! La littérature rapportait que l'activité d'oxydation des phénols de cette LAC en phase homogène n'avait lieu qu'après addition

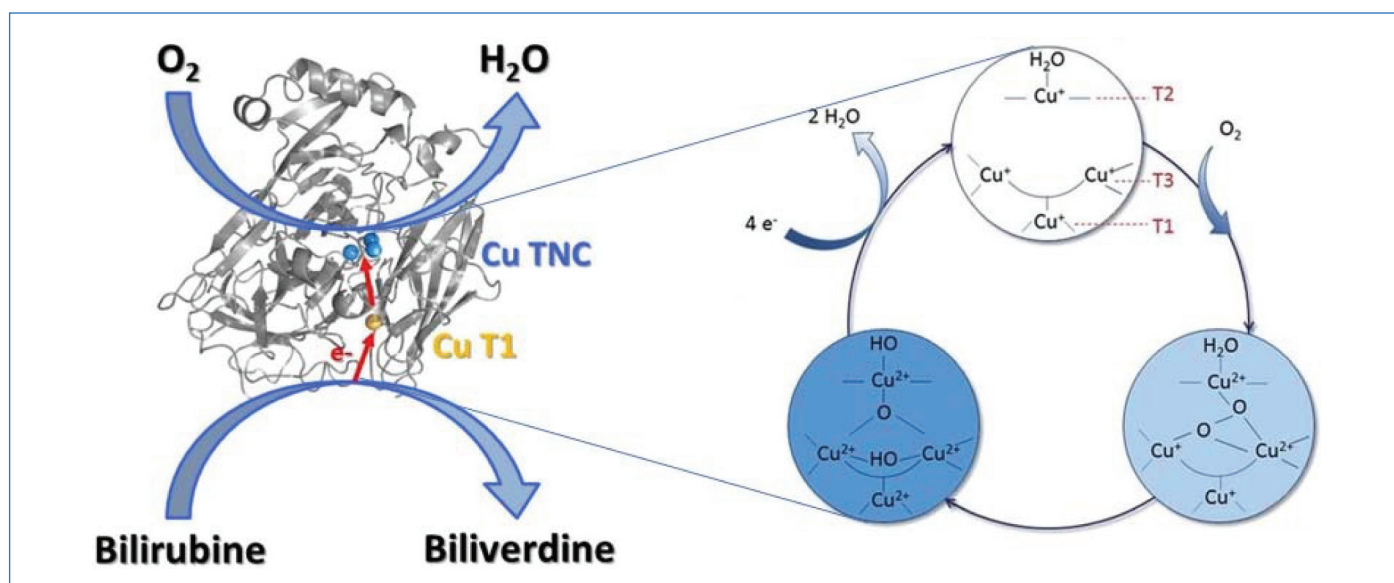


Figure 1 - Les laccases (LAC) et les bilirubines oxydases (BOD) sont des enzymes de la famille des oxydases multicuivre qui catalysent la réduction de O_2 en eau avec souvent de faibles surtensions [4]. Le Cu T1 est physiologiquement le site de liaison du substrat et le premier accepteur d'électrons. Un transfert électronique intramoléculaire a lieu vers le site Cu trinuécléaire (Cu TNC) où a lieu la réduction de O_2 . La structure de la BOD de *M. verrucaria* ainsi que le cycle catalytique de réduction de O_2 sont représentés ici.

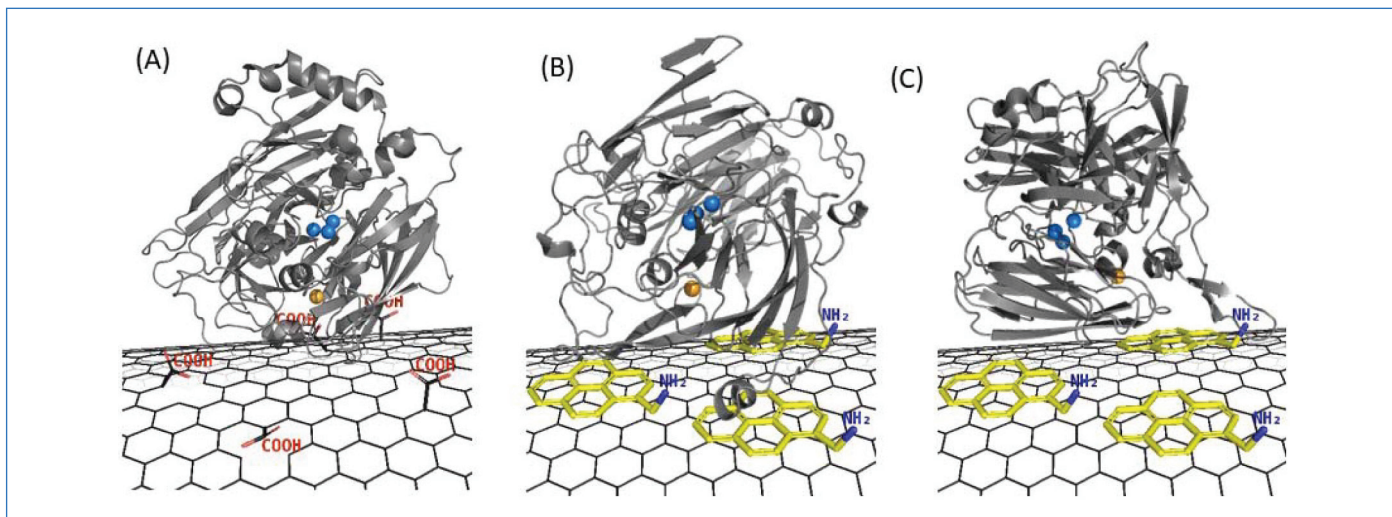


Figure 2 - Immobilisation fonctionnelle des BOD de *M. verrucaria* (A) et *B. pumilus* (B) et de la LAC de *T. thermophilus* (C) sur NTC fonctionnalisés. L'anisotropie de charge conduit à un moment dipolaire propre à chaque enzyme qui contrôle son orientation sur une surface chargée. Ainsi la réduction de O_2 a lieu sur NTC chargés négativement (fonctions carboxyliques de surface) ou positivement (fonctions amines de surface) pour la BOD de *M. verrucaria* et les BOD de *B. pumilus* et LAC de *T. thermophilus* respectivement.

de Cu^{2+} . En cela, l'enzyme se comporterait comme la « copper efflux oxydase » (CueO) de *Escherichia coli*, impliquée dans l'homéostasie du cuivre. Si le cuivre est un oligo-élément essentiel dans les systèmes vivants, étant présent dans les enzymes impliquées dans de nombreux processus biologiques, le cuivre en excès catalyse des réactions type Fenton qui génèrent des espèces radicalaires hautement toxiques pour la cellule, radical hydroxyle HO^\bullet en particulier. En contrepartie, cette toxicité ouvre la voie à des procédés antibactériens. La compréhension des mécanismes de l'équilibre intracellulaire du cuivre entre besoin et toxicité est donc cruciale d'un point de vue fondamental, médical ou environnemental. Parmi les systèmes exprimés pour lutter contre l'excès de cuivre, l'enzyme CueO est une oxydase multicuivre (MCO) périplasmique, reconnue pour coupler la réduction de O_2 en eau à l'oxydation de Cu^+ en Cu^{2+} moins toxique pour la cellule. Cette activité Cu^+ oxydase est cependant délicate à quantifier *in vitro* du fait de la nécessité de complexer les ions Cu^+ pour les stabiliser en aérobie.

La connaissance des bases moléculaires permettant une orientation fonctionnelle de l'enzyme sur une électrode nous a permis de lever cette difficulté. Dans la mesure où sur NTC chargés négativement aucune catalyse de réduction de O_2 n'était enregistrée, nous nous sommes demandés si l'ajout de Cu^{2+} permettrait de recouvrer une activité enzymatique à l'instar de ce qui se passe en phase homogène. En fait, l'addition de Cu^{2+} en solution ne fait pas apparaître la vague de catalyse au potentiel attendu pour une réaction déclenchée par un premier transfert d'électrons au Cu T1. En revanche, un nouveau signal electrocatalytique à un potentiel plus négatif est enregistré. Son analyse permet de quantifier l'activité d'oxydation de Cu^+ par la LAC grâce à la génération electrochimique *in situ* des ions Cu^+ [9] (figure 3).

Une caractéristique structurale commune à la LAC de *T. thermophilus* et à la CueO de *E. coli* est la présence de domaines riches en résidus méthionines. Ces résidus étant susceptibles de lier préférentiellement le Cu^+ , leur implication dans l'activité cuprous oxydase est proposée. Le rôle exact de ces domaines riches en résidus méthionines dans l'homéostasie du cuivre reste à déterminer. Combien de cuivres peuvent se lier au domaine Met-rich ? Quel est leur rôle respectif dans l'activité de Cu^+ oxydase ? Pourquoi le domaine Met-rich

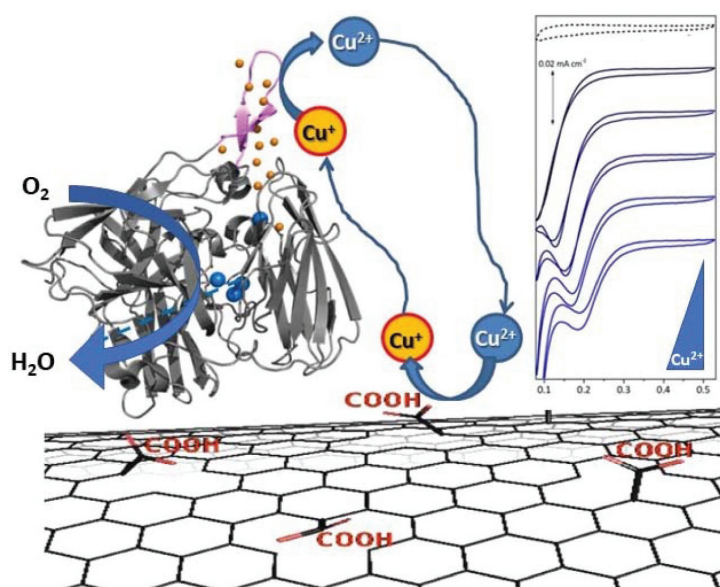


Figure 3 - Activité d'oxydation de l'ion cuivreux par la laccase de *T. thermophilus*. Contrairement à la majorité des MCO où le site Cu T1 est exposé à la surface de la protéine, dans le cas de la LAC de *T. thermophilus*, une région flexible riche en méthionines (Met-rich) recouvre ce site. Cette région (ici en magenta) permet la liaison d'atomes de Cu additionnels qui assurent un chemin de transfert d'électrons vers le Cu T1 puis le TNC pour la réduction de O_2 . Ainsi, les ions Cu^+ produits par réduction de Cu^{2+} à l'interface électrochimique se lient à des résidus Met dans la région Met-rich, et la régénération des ions Cu^{2+} suite à la catalyse de réduction de O_2 est assurée par la faible affinité de Cu^{2+} pour les résidus Met [14].

est-il structuralement différent selon les microorganismes, et pourquoi les résidus méthionines sont parfois remplacés par des histidines ? Au niveau plus appliqué, il est essentiel de comprendre la régulation du cuivre pour prévenir certaines maladies dégénératives ou trouver des antimicrobiens efficaces. Enfin, on peut aussi penser que l'activité electrochimique d'oxydation de Cu^+ démontré chez la LAC de *T. thermophilus* pourra être mise à profit pour développer des capteurs environnementaux.

Résiste !

Catalyse de réduction de O_2 en milieu salin

La résistance aux chlorures est une propriété recherchée pour nombre d'enzymes redox puisque influençant fortement

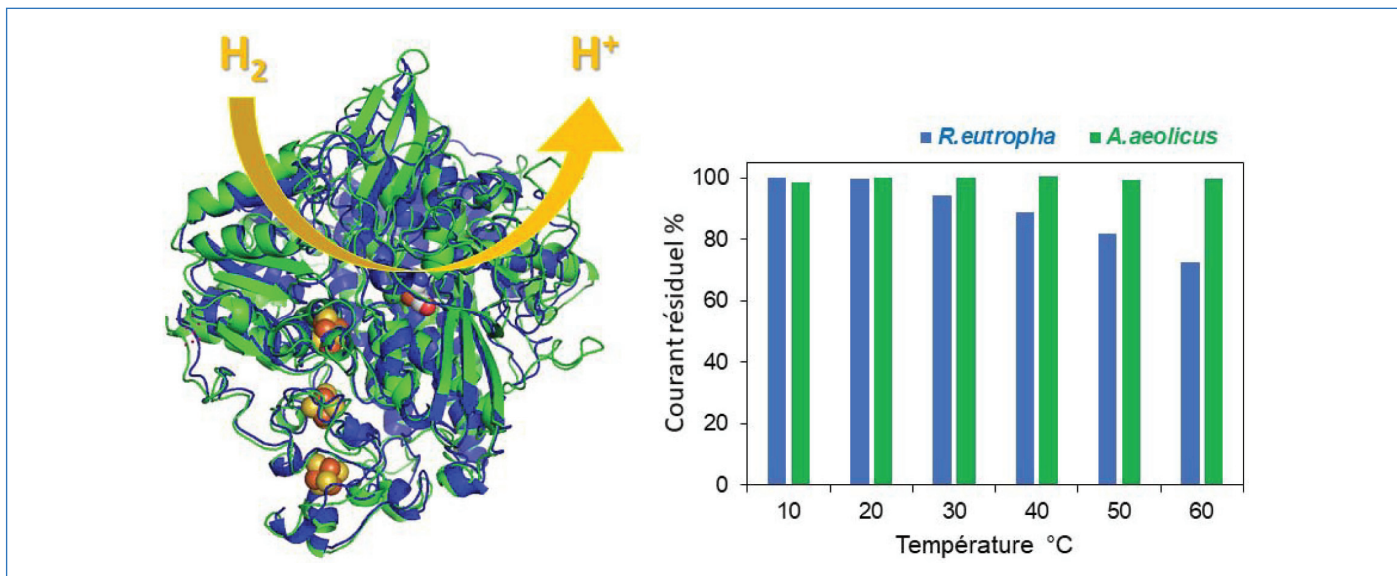


Figure 4 - Alignement de structure des hydrogénases hyperthermophile de *A. aeolicus* (vert) et mésophile de *R. eutropha* (bleu) ; le site actif NiFe et les trois centres FeS apparaissent comme des sphères. Activité résiduelle d'oxydation de H₂ par l'hydrogénase de *A. aeolicus* et l'hydrogénase de *R. eutropha* après 360 s aux différentes températures.

l'activité et la stabilité des bioélectrodes insérées dans des biodispositifs implantés dans des environnements divers, fluides physiologiques, ou milieu marin par exemple. Contrairement aux LAC, les BOD sont considérées dans la littérature comme étant résistantes aux chlorures. Nous avons revisité ce paradigme en étudiant l'inhibition de la BOD extraite de la bactérie *B. pumilus* immobilisée sur des nanofibres de carbone [10]. Nous avons montré que la résistance aux Cl⁻ était en fait cinétiquement dépendante et de la température et du pH. D'autres résultats fondamentaux ont été tirés de cette étude qui éclairent le mécanisme catalytique de réduction de O₂ par les BOD. En particulier, l'addition de chlorures induit la formation d'un état inactif de l'enzyme réactivable uniquement à bas potentiel. Nous avons montré que ce mécanisme était commun à de nombreuses MCO.

Catalyse d'oxydation de H₂ à haute température

Nous travaillons depuis plusieurs années à comprendre les bases moléculaires de l'immobilisation fonctionnelle sur électrode d'une enzyme spécifique de l'oxydation de H₂. Cette hydrogénase, dont le site actif est composé d'un diatome de nickel et de fer, est particulièrement intéressante puisque extraite d'une bactérie ancestrale trouvant son énergie dans un métabolisme couplant l'oxydation de H₂ à la réduction de O₂ (figure 4). Nous avons démontré que ce type d'hydrogénase était tolérante à O₂, contrairement aux hydrogénases jusque-là identifiées, et était aussi insensible au CO, deux propriétés essentielles pour une utilisation comme biocatalyseurs dans des piles à combustible [11]. Un intérêt supplémentaire de cette hydrogénase est qu'elle est extraite de la bactérie hyperthermophile *Aquifex aeolicus*, dont la température optimale de croissance est de 85 °C. L'hydrogénase fonctionne elle aussi à hautes températures – 85 °C est une température extrême pour tout microorganisme classique –, que ce soit en phase homogène ou immobilisée sur des électrodes. Pour mettre en évidence tout l'intérêt de travailler en électrocatalyse avec de telles enzymes, nous avons comparé la stabilité de deux bioélectrodes opérant en oxydation de H₂ : la première basée sur l'hydrogénase hyperthermophile d'*A. aeolicus*, la deuxième basée sur une hydrogénase homologue mais extraite de la bactérie

mésophile *Ralstonia eutropha* (collaboration O. Lenz, TU Berlin, Allemagne). De manière remarquable, non seulement l'activité d'oxydation de H₂ par l'hydrogénase d'*A. aeolicus* est maintenue dans le temps à haute température, mais la bioélectrode présente une activité et une stabilité remarquables dans toute la gamme de températures étudiée, y compris à basse température. *A contrario*, l'hydrogénase extraite de la bactérie mésophile *R. eutropha* n'est pas stable à des températures supérieures à 40 °C, mais est aussi bien moins stable dans le temps, même à plus basse température [11].

Substrat, mon amour

La faible affinité des BOD et LAC pour O₂ (de l'ordre de 100 μM) limite la catalyse dans des conditions où la concentration en O₂ est faible (cas des fluides physiologiques, de certains environnements ou encore de piles à combustible enzymatiques H₂/O₂). Au sein des microorganismes, les cytochrome c oxydases (CcO) jouent un rôle clé dans les chaînes énergétiques en étant le dernier accepteur d'électron réduisant O₂ en eau. Du fait de leur rôle physiologique, leur affinité pour O₂ est de l'ordre du μM. En revanche, la plupart des CcO actuellement identifiées présente des potentiels redox des centres métalliques 200 à 300 mV plus bas que le Cu T1 des BOD ou LAC, et les rares études menées en électrochimie sur les CcO immobilisées sur électrodes montrent des surtensions de réduction de O₂ très élevées.

Notre laboratoire étudie le métabolisme de la bactérie acidophile *Acidithiobacillus ferrooxidans* qui trouve son énergie en couplant l'oxydation de Fe²⁺ à la réduction de O₂ en eau. Les protéines caractérisées dans cette chaîne métabolique ont toutes comme caractéristiques de présenter des potentiels redox élevés compatibles avec un rôle dans la voie d'oxydation du fer. Nous avons purifié et caractérisé la CcO de cette bactérie, avec l'idée que cette enzyme conjuguerait les propriétés d'affinité pour O₂ et de potentiel redox élevé. Nous avons effectivement prouvé que cette CcO présentait une affinité (constante de Michaélis K_M) pour O₂ de 8 μM, un ordre de grandeur plus bas que les BOD ou les LAC. Nous avons également établi les conditions pour lesquelles le transfert

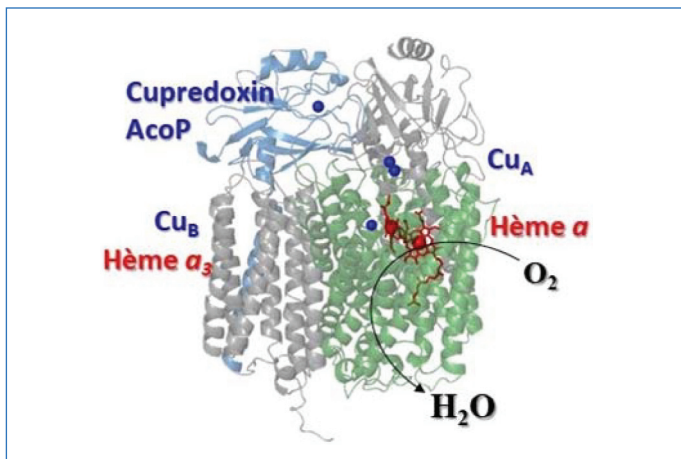


Figure 5 - Structure tridimensionnelle de la CcO de *A. ferrooxidans* montrant le Cu_A , le site actif Cu_B -hème a_3 ainsi que la cuprédoxine additionnelle AcoP qui offre un chemin supplémentaire de transfert d'électrons en milieu acide.

d'électrons était possible entre cette enzyme membranaire et une électrode nanostructurée. La réduction catalytique de O_2 a lieu au potentiel de + 700 mV vs ESH à pH 4, permettant d'envisager ce type d'enzyme dans une pile où l'anode serait basée par exemple sur un catalyseur biomimétique. Le chemin de transfert d'électron dans cette configuration reste encore à déterminer. Néanmoins, nos études électrochimiques des différentes composantes de la CcO suggèrent que la connexion électrique se fait via l'hème a vers le site actif. Cette orientation spécifique de la CcO à l'électrode permet ainsi la réduction de O_2 à un potentiel supérieur à celui attendu pour un transfert d'électron physiologique depuis le centre Cu_A [12] (figure 5).

Une pile à combustible enzymatique « haute température »

Comment ne pas exploiter les propriétés remarquables des enzymes thermostables pour développer une nouvelle génération de piles à combustible enzymatique H_2/O_2 (figure 6). Si les biopiles implantables glucose/ O_2 sont développées depuis de nombreuses années et dans de nombreux laboratoires, l'équivalent « bio » des piles à combustible à membrane échangeuse de protons est un procédé encore émergent dans de rares laboratoires au

monde. Ce décalage est essentiellement lié à la sensibilité à O_2 des hydrogénases, limitation levée par les enzymes du type de l'hydrogénase de *A. aeolicus* [3, 13]. La dernière génération de piles, basée à la cathode sur la BOD de *B. pumilus* elle-même thermotolérante, montre des courants supérieurs à 20 mA, et la pile, avec une tension à circuit ouvert de 1,02 V, délivre des puissances de l'ordre de 2 mW, ce qui place ce dispositif parmi les plus performants.

Un des résultats notables a été la détermination de la quantité d'enzymes participant effectivement à la catalyse. Cette donnée a permis pour la première fois de déterminer un nombre de « turn over » de 10^7 et 6×10^8 pour la BOD et l'hydrogénase respectivement, montrant les potentialités de ces enzymes. Impressionnants également sont les courants reportés à la quantité d'enzymes, qui atteignent les 1 A/mg à 50°C. Un autre résultat majeur est la modélisation des limitations par le transfert de masse au sein de la matrice poreuse, ouvrant les pistes à développer en termes de géométrie d'électrodes et d'approvisionnement en substrats [14].

Et maintenant...

Nous avons montré à travers ces quelques exemples comment la biodiversité pouvait être source de biocatalyseurs présentant des propriétés remarquables. Nul doute que les progrès en biologie, métagénomique, biologie synthétique, évolution dirigée... permettront la découverte de nouvelles enzymes naturelles ou le design d'enzymes artificielles avec des propriétés spécifiques en fonction de l'application ciblée. Pour une utilisation en bioélectrocatalyse, il s'agira de développer des méthodes *in situ* et *in operando* de manière à décrire à l'échelle moléculaire le comportement des enzymes aux interfaces électrochimiques [15]. La compréhension fine des facteurs qui contrôlent la catalyse électroenzymatique permettra aussi d'avancer dans la conception de catalyseurs bioinspirés, alternatives aux enzymes et aux catalyseurs métalliques [16]. Plus fondamentalement, l'étude de ces enzymes non conventionnelles, extraites de chaînes de transfert d'électrons eux-mêmes non conventionnels, doit permettre d'améliorer nos connaissances sur les systèmes d'adaptation de la vie aux conditions extrêmes. Autant d'axes de recherche qui ne peuvent se faire que dans le cadre d'une interdisciplinarité forte biochimie/physico-chimie/sciences des matériaux.

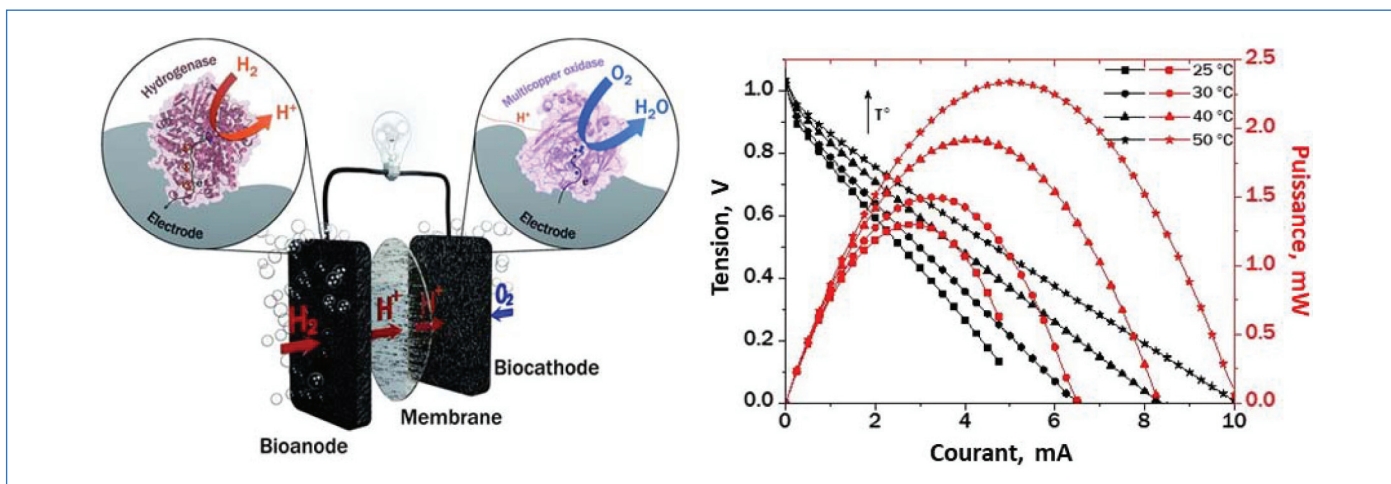


Figure 6 - Principe de la pile à combustible enzymatique basée à l'anode sur l'hydrogénase hyperthermophile de *A. aeolicus* et à la cathode de la BOD thermostable de *B. pumilus* (à gauche). Performances de la biopile en fonction de la température (à droite).

L'auteure remercie tous les chercheurs et étudiants qui ont participé à ce travail, avec une mention spéciale à Romain Clément, Anne de Poulpiquet, Marianne Ilbert et Ievgen Mazurenko, pour leur enthousiasme quotidien à mener des recherches à l'interface biochimie/physico-chimie.

- [1] R.R. Wu, C.L. Ma, Z.G. Zhu, Enzymatic electrosynthesis as an emerging electrochemical synthesis platform, *Curr. Op. Electrochem.*, **2020**, *19*, p. 1-7.
- [2] X.X. Xiao *et al.*, Tackling the challenges of enzymatic (bio)fuel cells, *Chem. Rev.*, **2019**, *119*, p. 9509-9558.
- [3] I. Mazurenko *et al.*, Impact of substrate diffusion and enzyme distribution in 3D-porous electrodes: a combined electrochemical and modelling study of a thermostable H₂/O₂ enzymatic fuel cell, *Energ. Environ. Sci.*, **2017**, *10*, p. 1966-1982.
- [4] N. Mano, A. de Poulpiquet, O₂ reduction in enzymatic biofuel cells, *Chem. Rev.*, **2018**, *118*, p. 2392-2468.
- [5] F. Durand *et al.*, Bilirubin oxidase from *Bacillus pumilus*: a promising enzyme for the elaboration of efficient cathodes in biofuel cells, *Biosens. Bioelectron.*, **2012**, *35*, p. 140-146.
- [6] I. Mazurenko, V.P. Hitaishi, E. Lojou, Recent advances in surface chemistry of electrodes to promote direct enzymatic bioelectrocatalysis, *Curr. Op. Electrochem.*, **2020**, *19*, p. 113-121.
- [7] I. Mazurenko *et al.*, How the intricate interactions between carbon nanotubes and two bilirubin oxidases control direct and mediated O₂ reduction, *ACS App. Mater. Inter.*, **2016**, *8*, p. 23074-085.
- [8] V.P. Hitaishi *et al.*, Controlling redox enzyme orientation at planar electrodes, *Catalysts*, **2018**, *8*, 192.
- [9] V.P. Hitaishi *et al.*, Interplay between orientation at electrodes and copper activation of *Thermus thermophilus* Laccase for O₂ reduction, *J. Am. Chem. Soc.*, **2020**, *142*, p. 1394-1405.
- [10] A. de Poulpiquet *et al.*, Mechanism of chloride inhibition of bilirubin oxidases and its dependence on potential and pH, *ACS Catal.*, **2017**, *7*, p. 3916-3923.

- [11] K. Monsalve *et al.*, Impact of carbon nanotube surface chemistry on hydrogen Oxidation by membrane-bound oxygen-tolerant hydrogenases, *Chem. Electro. Chem.*, **2016**, *3*, p. 2179-2188.
- [12] X. Wang *et al.*, Bacterial respiratory chain diversity reveals a cytochrome c oxidase reducing O₂ at low overpotentials, *J. Am. Chem. Soc.*, **2019**, *141*, p. 11093-102.
- [13] M. Sensi, M. del Barrio, C. Baffert, V. Fourmond, C. Leger, New perspectives in hydrogenase direct electrochemistry, *Curr. Op. Electrochem.*, **2017**, *5*, p. 135-145.
- [14] I. Mazurenko, X. Wang, A. de Poulpiquet, E. Lojou, H₂/O₂ enzymatic fuel cells: from proof-of-concept to powerful devices, *Sust. Energ. Fuels*, **2017**, *1*, p. 1475-1501.
- [15] B. Tassy *et al.*, *In situ* fluorescence tomography enables a 3D mapping of enzymatic O₂ reduction at the electrochemical interface, *Anal. Chem.*, **2020**, *92*, p. 7249-7256.
- [16] S. Gentil *et al.*, A nanotube-supported dicopper complex enhances Pt-free molecular H₂/air fuel cells, *Joule*, **2019**, *3*, p. 2020-2029.

Elisabeth LOJOU*,

Directrice de recherche CNRS, Aix-Marseille Université, Laboratoire de Bioénergétique et Ingénierie des Protéines.

Elle a reçu le Prix Chercheur confirmé de la division Chimie physique (DCP) de la Société Chimique de France en 2020.



* lojou@imm.cnrs.fr



Aquifex aeolicus



© K.O. Stetter & Reinhard Rachel, University of Regensburg.

Bactérie isolée d'une source hydrothermale à une T° de 102°C.