

THÈSE de l'université de Strasbourg

Présentée Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE STRASBOURG Discipline Chimie

par

Julien GROSS

Caractérisation de surfaces biofonctionnalisées pour l'étude de protéines de la chaîne respiratoire par spectroscopie infrarouge couplée à l'électrochimie

Thèse soutenue le 7 Décembre 2011 devant la commission d'examen

Prof. Petra HELLWIGDirecProf. Marc DE LAMY DE LA CHAPELLERappDr. Sophie LECOMTERappDr. Fouzia BOULMEDAISExam

Directrice de thèse Rapporteur externe Rapporteur externe Examinatrice

Thèse préparée au sein du Laboratoire de Spectroscopie Vibrationnelle et Electrochimie des Biomolécules (LSVEB, U.M.R. 7177, Institut de Chimie de Strasbourg)

i. Table des matières	Ι
ii. Liste des figures	IV
iii. Liste des tables	XII
iv. Liste des abréviations	XV
v. Les vingt acides aminés	XVII
vi. Liste des publications	XVIII
vii. Résumé	XIX
ix. Remerciements	XXI

Table des matières

I.	Intro	ductio)n	1
	1.	Moti	vation du projet	2
	2.	La cl	naîne respiratoire	3
		1.	Introduction	3
		2.	Le complexe I	6
		3.	Le complexe II	7
		4.	Le complexe III	7
		5.	Le complexe IV	9
		6.	L'organisme Thermus thermophilus	. 10
	3.	La la	ccase ou CotA de Bacillus subtilis	. 21
		1.	Structure	. 21
		2.	Mécanisme fonctionnel	. 23
	4.	L'int	eraction protéine-protéine	. 25
		1.	Introduction	. 25
		2.	Approche expérimentale	. 27
		3.	Approche théorique	. 28
	5.	Biop	ile à biocatalyseurs optimisés	. 29
		1.	Principe	. 29
	6.	Fonc	tionnalisation de surfaces	. 33
		1.	Immobilisation de protéines	. 33
	7.	But o	le la thèse	. 37
	8.	Réfé	rences	. 39
II.	Tech	nique	s de caractérisation	. 48
	1.	Tech	niques de caractérisation	. 49
		1.	Spectroscopie UV/Visible	. 50
		2.	Spectroscopie infrarouge	. 51
		3.	Etude de protéines grâce à la Spectroscopie infrarouge à	
			transformée de Fourier	. 56
		4.	Prédiction de la structure secondaire grâce à la	
			spectroscopie infrarouge	. 62
		5.	Electrochimie	. 64
	2.	Réfé	rences	.73
III.	Maté	riels &	& Méthodes	.76
	1.	Prép	aration des échantillons	.77
		1.	Echantillons de cytochrome c oxydase de type ba_3	.77
		2.	Echantillons de cytochrome c_{552} et c_1	.77
		3.	Echantillons de laccase	. 78
		4.	Echantillons de cytochrome <i>c</i> de cœur de bœuf	. 78
		5.	Préparation des nanoparticules	. 78
		6.	Préparation de l'électrode	. 79
		7.	Etude en TEM (Transmission Electron Microscopy)	. 80

	2. Etud	les spectroscopiques	82
	1.	Eléments optiques pour les mesures en infrarouge	82
	2.	UV/Visible	82
	3.	Réflexion Totale Atténuée Exaltée de Surface	83
	4.	Détermination de la structure secondaire	84
	5.	Electrochimie	84
	3. Réfé	rences	
IV.	Etude de l'	influence du pH sur la cytochrome <i>c</i> oxydase de type	ba_3
	de Thermu	s thermophilus	88
	1. Intro		89
		Exterisation du cytochrome ba_3 a pH 8	
	1.	Spectre U V/VISIBle	92
	2.	Etude du spectre differentiel du cytochrome Da_3	93
	5. 4	Etude du spectre différentiel de l'hème h	90
	4.	Etude du spectre différentiel de l'hème a	
	J. 3 Com	Etude du spectre différentiels neur le extechrome h_{a_1}	101 103
	J. Com	Finite le pH 6.4 et 7.5	103
	1. 2	Entre le pH 7 5 et 8	105
	2.	Entre le pH 8 et 8 5	107
	4. Com	paraison des spectres différentiels pour l'hème b	109
	1.	Entre le pH 6.4 et 7.5 et entre le pH 8 et 8.5	110
	5. Com	paraison des spectres différentiels pour l'hème a_3	112
	1.	Entre le pH 6.4 et 8.5.	112
	6. Conc	clusion	115
	7. Réfé	rences	117
V.	Interaction	n protéine-protéine	120
	1. Intro	oduction	121
	2. Le c	cytochrome c_1 , fragment soluble du complexe bc_1	de
	Ther	mus thermophilus	122
	1.	Spectre UV/Visible	122
	2.	Spectroscopie différentielle UV/Visible : détermination	ı du
		potentiel de demi-vague	123
	3.	Spectroscopie différentielle infrarouge	124
	3. Le cy	tochrome c_{552} , substrat naturel de la cytochrome c oxydas	se.130
	1.	Spectre UV/Visible	130
	2.	Spectroscopie différentielle UV/Visible : détermination	1 du
	2	potentiel de demi-vague	130
	3.	Spectroscopie differentielle infrarouge	132
	4. Les C		127
	1.	Le complexe c - c_{552}	1 13/
	<u>ک</u> .	Etudo de l'interaction entre le extendreme e et c	140
	з.	Ende de l'interaction entre le cytochrome c_1 et c_{552}	130

	5. Conclusion	173
	6. Références	175
VI.	Création de réseau de nanoparticules pour l'étude de protéines	
	membranaires	180
	1. Introduction	181
	1. Préparation de l'électrode	181
	2. Détermination de la taille des nanoparticules	
	fonctionnalisées	182
	3. Dépôt des nanoparticules d'or	183
	2. Electrochimie et caractérisation des enzymes immobilisées	185
	1. Etude de la laccase de <i>Bacillus subtilis</i>	185
	2. Etude du cytochrome c_1 de <i>Thermus thermophilus</i>	188
	3. Etude du cytochrome c_{552} de <i>Thermus thermophilus</i>	193
	4. Etude de la cytochrome c oxydase de type ba_3 de Therm	านร
	thermophilus	197
	3. Comparaison des immobilisations de protéines	207
	1. Durée de vie de la protéine immobilisée	207
	4. Conclusion	209
	5 Références	210
VII	Conclusion	210
7 11.	Annavac 91	6_217
	AIIIICAC5	10-41/

Liste des figures

Figure 1.2.1 : schéma d'une mitochondrie	3
Figure 1.2.2 : Modèle classique de la chaîne respiratoire et de l'ATP synthase. La figure est	t
un mélange de structures connues (bactérienne et mitochondriale). Elles sont basées sur les	S
codes PDB : 3M9S (NADH:ubiquinone oxidoreductase); 1QLB (Fumarate réductase);	;
1ZRT (cytochrome <i>bc</i> ₁); 3HB3 (C <i>c</i> O); 1BMF (F1 : partie de l'ATP synthase)	5
Figure 1.2.3 : Structure du cytochrome bc_1 de Paracoccus denitrificans (à gauche) et	t
représentation schématique du cycle Q (à droite).	8
Figure 1.2.4 : Schéma du transfert d'électrons dans T. thermophilus ; les flèches indiquent	t
le passage d'un électron	. 11
Figure 1.2.5 : Représentation de la structure tertiaire du cytochrome c_{552} (code pdb :	:
1DT1ou 1C52) En rouge sont représentées les hélices α , en jaune les feuillets β , en vert les	S
structures aléatoires, en bleu la porphyrine et en orange le centre ferrique	. 13
Figure 1.2.6 : Structure du cytochrome ba_3 de T. thermophilus (code PDB : 1XME)	',
1ЕНК)	. 15
Figure 1.2.7 : Dépendance en pH du potentiel de demi-vague des hèmes b et a_3 du	1
cytochrome ba_3 de T. thermophilus. Les potentiels sont ici donnés par rapport à l'ENH	ł
(Electrode Normal à Hydrogène)	. 16
Figure 1.2.8 : Proposition de structure du chemin de protons K	. 18
Figure 1.2.9 : Schéma illustrant le cycle de réaction oxydatif de la cytochrome c oxydase	9
de type <i>ba</i> ₃	. 19
Figure 1.3.1 : Représentation de la structure de la CotA, les atomes de cuivre sont	t
représentés en magenta	. 22
Figure 1.3.2 : Rôle du médiateur dans la réaction catalytique.	. 22
Figure 1.3.3 : Différents états oxydés de l'ABTS	. 23
Figure 1.3.4 : Schéma des centres Cu de la laccase de Bacillus subtilis (Cu ₁ est le centre de	3
type I, Cu_4 le centre de type II et Cu_2 et Cu_3 sont les centres de type III).	. 24
Figure 1.4.1 : Exemple d'interaction entre deux protéines.	. 25
Figure 1.5.1 : Représentation schématique d'une biopile enzymatique	. 30
Figure 1.5.2 : Schéma de la biopile du projet du laboratoire du Pr. Andrew Griffiths	. 32
Figure 1.6.1 : Mécanisme de transfert d'électrons : (a) transfert d'électrons direct (effe	t
tunnel) de la surface de l'électrode jusqu'au site actif de la protéine ; (b) Transfer	t
	34

Figure 1.6.2 : Différentes méthodes d'immobilisation : (a) adsorption physique ; (b)
inclusion dans un polyélectrolyte ou dans un polymère conducteur ; (c) inclusion dans une
monocouche auto assemblée (SAMs); (d) attachement non orienté sur une monocouche
auto assemblée; (e) attachement orienté sur une monocouche auto assemblée; (f)
attachement directement sur la surface du site actif
Figure 2.1.1 : Caractérisation du spectre électromagnétique
Figure 2.1.2 : Schéma de principe du spectrophotomètre UV Visible
Figure 2.1.3 : Modes normaux de vibrations
Figure 2.1.4 : Description du schéma d'un spectromètre infrarouge à transformée de
Fourier
Figure 2.1.5 : Représentation schématique du principe de la RTA
Figure 2.1.6 : Schéma expliquant le principe de la spectroscopie infrarouge par réflexion
totale atténuée
Figure 2.1.7 : Structure chimique de l'hème a. Les symboles sur les atomes de carbone de
l'anneau porphyrine sont indiqués 59
Figure 2.1.8 : Structure chimique de l'hème b. Les symboles sur les atomes de carbone de
l'anneau porphyrine sont indiqués 60
Figure 2.1.9 : Structures chimiques de l'hème c. Les symboles sur les atomes de carbone
de l'anneau porphyrine sont indiqués
Figure 2.1.10 : Spectre UV/Visible du cytochrome c_1 à pH 8 sous sa forme réduite après
ajout de dithionite de sodium
Figure 2.1.11 : Représentation de différents éléments issus de la structure secondaire
Figure 2.1.12 : Représentation schématique d'un système à trois électrodes. WE représente
l'électrode de travail, Ref l'électrode de référence et CE la contre-électrode. Le potentiel
est contrôlé entre la WE et la Ref quand le courant est contrôlé entre la WE et la CE
Figure 2.1.13 : Principe de la variation de potentiel en voltampérométrie cyclique
Figure 2.1.14 : Cyclovoltammogrammes caractéristique d'une espèce : a) adsorbée à la
surface b) en solution
Figure 2.1.15 : Spectre d'absorbance en infrarouge du cytochrome c oxydase de
Paracoccus denitrificans à pH 8 dans sa forme oxydée (en bleu) et dans sa forme réduite
(en rouge)
Figure 2.1.16 : Représentation schématique de la cellule OTTLE
Figure 2.1.17 : Spectres différentiels infrarouge oxydé moins réduit du cytochrome c
oxydase de Paracoccus denitrificans à pH 8. Les signaux positifs en bleu représentent la

protéine dans son état oxydée et les signaux négatifs en rouge la protéine dans son état
réduit
Figure 3.1.1 : Voltampérogramme de l'électrode d'or polycristalline nue à une vitesse de
balayage de 0.1 V/s (dans H_2SO_4 0.1 M)
Figure 3.2.1 : Schéma de la grille d'or modifiée (en rouge : acide 3-mercaptopropionique ;
en noir : cystéamine hydrochloride ; en jaune : la grille d'or)
Figure 4.1.1 : Représentation de la structure du cytochrome ba_3 de T.thermophilus avec le
chemin de protons, la présence du Cu _A , de l'hème b et a_3 et des propionates des hèmes les
entourant (à gauche) et proposition de structure du chemin de protons K (à droite)
(codePDB : 3S8F)
Figure 4.1.2 : Dépendance en pH du potentiel de demi-vague des hèmes b et a_3 du
cytochrome ba_3 de T. thermophilus. Les potentiels sont ici donnés par rapport à l'ENH
(Electrode Normal à Hydrogène)
Figure 4.2.1 : Spectres UV/Visible du cytochrome ba_3 dans sa forme oxydée (en noir) et
dans sa forme réduite (en rouge) après ajout de dithionite à pH 8
Figure 4.2.2 : Spectre différentiel infrarouge (ox-red) du cytochrome ba_3 à pH 8 dans la
région spectrale comprise entre 1800 et 1200 cm ⁻¹ entre -500 et +500 mV
Figure 4.2.3 : Spectre différentiel infrarouge (ox-red) du cytochrome ba_3 à pH 8 dans la
région spectrale comprise entre 1725 et 1600 cm ⁻¹ entre -500 et +500 mV 95
Figure 4.2.4 : Spectre différentiel infrarouge (ox-red) du cytochrome ba ₃ à pH 8 dans la
région spectrale comprise entre 1600 et 1200 cm ⁻¹ entre -500 et +500 mV
Figure 4.2.5 : Spectre différentiel infrarouge (ox-red) du cytochrome ba_3 à pH 8 dans la
région spectrale comprise entre 1200 et 1000 cm ⁻¹ entre -500 et +500 mV
Figure 4.2.6 : Spectre différentiel infrarouge (ox-red) du cytochrome ba_3 à pH 8 dans la
région spectrale comprise entre 1800 et 1200 cm ⁻¹ de -500 à +20 mV 100
Figure 4.2.7 : Spectre différentiel infrarouge (ox-red) du complexe ba ₃ à pH 8 dans la
région spectrale comprise entre 1800 et 1200 cm ⁻¹ de $+20$ à $+500$ mV
Figure 4.3.1 : Spectres différentiels infrarouge (ox-red) du cytochrome ba_3 à pH 6.4 (en
noir), 7.5 (en rouge), 8 (en bleu) et 8.5 (en cyan) dans la région spectrale comprise entre
1800 et 1200 cm ⁻¹ . Les deux zones sont représentées par un cercle noir
Figure 4.3.2 : Double différentiel infrarouge (pH 7.5-6.4) du cytochrome ba_3 entre 1800 et
1200 cm ⁻¹
Figure 4.3.3 : Double différentiel infrarouge (pH 8-7.5) du cytochrome ba_3 entre 1800 et
1200 cm ⁻¹

Figure 4.3.4 : Double différentiel infrarouge (pH 8.5-8) du cytochrome ba₃ entre 1800 et Figure 4.4.1 : Spectres différentiels infrarouge (ox-red) du cytochrome ba₃ à pH 6.4 (en noir), 7.5 (en rouge), 8 (en bleu) et 8.5 (en cyan) dans la région spectrale comprise entre Figure 4.4.2 : Doubles différentiels infrarouge du cytochrome ba_3 entre 1800 et 1200 cm⁻¹ pour la contribution de l'hème b a) entre le pH 7.5 et 6.4 et b) entre le pH 8.5 et 8...... 110 Figure 4.5.1 : Spectres différentiels infrarouge (ox-red) du cytochrome ba₃ à pH 6.4 (en noir), 7.5 (en rouge), 8 (en bleu) et 8.5 (en cyan) dans la région spectrale comprise entre Figure 4.5.2 : Double différentiel infrarouge (pH 8.5-6.4) du cytochrome ba₃ entre 1800 et Figure 5.1.1 : Schéma du transfert d'électrons dans T. thermophilus ; les flèches indiquent Figure 5.2.1: Spectres UV/Visible du cytochrome c_1 à pH 8 dans sa forme oxydée (en noir) et dans sa forme réduite (en rouge) après ajout de dithionite. En encart, un zoom entre 500 Figure 5.2.2 : Spectres du dosage du cytochrome c_1 à pH 8 pour un potentiel de -300 à Figure 5.2.3 : Courbe de titration redox du cytochrome c_1 à pH 8 effectuée sur la bande de Soret, le potentiel de demi-vague obtenu est : E_m =-60 mV±5.7 pour n=1...... 124 Figure 5.2.4 : Spectre différentiel infrarouge (ox-red) du cytochrome c_1 à pH 8 dans la région spectrale comprise entre 1800 et 1200 cm⁻¹ entre -500 et +500 mV 125 Figure 5.2.5 : Spectre différentiel infrarouge (ox-red) du cytochrome c_1 à pH 8 dans la région spectrale comprise entre 1720 et 1600 cm⁻¹ entre -500 et +500 mV 127 Figure 5.2.6 : Spectre différentiel infrarouge (ox-red) du cytochrome c_1 à pH 8 dans la région spectrale comprise entre 1600 et 1200 cm⁻¹ entre -500 et +500 mV 128 Figure 5.2.7 : Spectre différentiel infrarouge (ox-red) du cytochrome c_1 à pH 8 dans la région spectrale comprise entre 1200 et 1000 cm⁻¹ entre -500 et +500 mV 129 Figure 5.3.1 : Spectres UV/Visible du cytochrome c_{552} à pH 8 dans sa forme oxydée (en noir) et dans sa forme réduite (en rouge) après ajout de dithionite. En encart un zoom entre Figure 5.3.2 : Spectres du dosage du cytochrome c_{552} à pH 8 pour un potentiel de -500 à

Figure 5.3.3 : Courbe de titration redox du cytochrome c_{552} à pH 8 effectuée sur la bande
de Soret, le potentiel de demi-vague est : E_m =-29 mV±2.8 pour n=1
Figure 5.3.4 : Spectre différentiel infrarouge (ox-red) du cytochrome c_{552} à pH 8 dans la
région spectrale comprise entre 1800 et 1200 cm^{-1} entre -500 et +500 mV 132
Figure 5.3.5 : Spectre différentiel infrarouge (ox-red) du cytochrome c_{552} à pH 8 dans la
région spectrale comprise entre 1720 et 1600 cm ⁻¹ entre -500 et +500 mV 134
Figure 5.3.6 : Spectre différentiel infrarouge (ox-red) du cytochrome c_{552} à pH 8 dans la
région spectrale comprise entre 1600 et 1200 cm ⁻¹ entre -500 et $+500$ mV
Figure 5.4.1 : Spectres du dosage du complexe c - c ₅₅₂ à pH 8 pour un potentiel de -500 à
+500 mV entre 350 et 600 nm
Figure 5.4.2 : Courbe de titration redox du cytochrome c - c ₅₅₂ à pH 8 effectuée sur la bande
de Soret, les potentiels de demi-vague sont : E_{m1} =-35 mV±10.9 pour n=1 et E_{m2} = 50
mV±1.9 pour n=1
Figure 5.4.3 : Spectres différentiels infrarouge (ox-red) du complexe c - c ₅₅₂ (en rouge) et de
l'addition arithmétique (en noir) à pH 8 dans la région spectrale comprise entre 1800 et
1200 cm^{-1} entre -500 et +500 mV
Figure 5.4.4 : Description de l'interaction hème-hème entre le cytochrome c_1 de
Saccharomyces cerevisiae et c de cœur de bœuf141
Figure 5.4.5 : Spectres du dosage du complexe c_1 - c à pH 8 pour un potentiel de -500 à
+500 mV entre 400 et 600 nm
Figure 5.4.6 : Courbe de titration redox du complexe c_1 - c à pH 8 effectuée sur la bande de
Soret, les potentiels de demi-vague sont : E_{m1} =-82 mV±12.1 pour n=1 et E_{m2} = 70 mV±4.9
pour n=1
Figure 5.4.7 : Spectre différentiel infrarouge (ox-red) du complexe c_1 - c à pH 8 dans la
région spectrale comprise entre 1800 et 1200 cm ⁻¹ entre -500 et $+500$ mV
Figure 5.4.8 : Spectre différentiel infrarouge (ox-red) du complexe c_1 - c à pH 8 dans la
région spectrale comprise entre 1710 et 1600 cm ⁻¹ entre -500 et $+500$ mV
Figure 5.4.9 : Spectre différentiel infrarouge (ox-red) du complexe c_1 - c à pH 8 dans la
région spectrale comprise entre 1600 et 1200 cm ⁻¹ entre -500 et $+500$ mV
Figure 5.4.10 : Spectres differentiels infrarouge (ox-red) du complexe c_1 - c (en rouge) et de
Figure 5.4.10 : Spectres différentiels infrarouge (ox-red) du complexe c_1 - c (en rouge) et de l'addition arithmétique (en noir) à pH 8 dans la région spectrale comprise entre 1750 et
Figure 5.4.10 : Spectres différentiels infrarouge (ox-red) du complexe c_1 - c (en rouge) et de l'addition arithmétique (en noir) à pH 8 dans la région spectrale comprise entre 1750 et 1550 cm ⁻¹ entre -500 et +500 mV
Figure 5.4.10 : Spectres différentiels infrarouge (ox-red) du complexe c_1 - c (en rouge) et de l'addition arithmétique (en noir) à pH 8 dans la région spectrale comprise entre 1750 et 1550 cm ⁻¹ entre -500 et +500 mV

Figure 5.4.12 : Spectres UV/Visible du complexe c_1 - c_{552} à pH 8 dans sa forme oxydée (en
noir) et dans sa forme réduite (en rouge) après ajout de dithionite 152
Figure 5.4.13 : Spectres du dosage du complexe c_1 - c_{552} à pH 8 pour un potentiel de -500 à
+500 mV entre 350 et 600 nm
Figure 5.4.14 : Courbe de titration redox du complexe c_1 - c_{552} à pH 8 effectuée sur la bande
de Soret, les potentiels de demi-vague sont de : E_{m1} =-275 mV±11.6 pour n=0,9 et E_{m2} = 19
mV±4.5 pour n=0,9
Figure 5.4.15 : Spectre différentiel infrarouge (ox-red) du complexe c_1 - c_{552} à pH 8 dans la
région spectrale comprise entre 1800 et 1200 cm ⁻¹ entre -500 et $+500$ mV 155
Figure 5.4.16 : Spectre différentiel infrarouge (ox-red) du complexe c_1 - c_{552} à pH 8 dans la
région spectrale comprise entre 1750 et 1600 cm ⁻¹ entre -500 et +500 mV 157
Figure 5.4.17 : Spectre différentiel infrarouge (ox-red) du complexe c_1 - c_{552} à pH 8 dans la
région spectrale comprise entre 1600 et 1200 cm ⁻¹ entre -500 et +500 mV 158
Figure 5.4.18 : Spectres différentiels infrarouge (ox-red) du complexe c_1 - c_{552} (en rouge) et
de l'addition arithmétique (en noir) à pH 8 dans la région spectrale comprise entre 1720 et
1500 cm^{-1} entre -500 et +500 mV
Figure 5.4.19 : Spectre différentiel infrarouge (ox-red) du complexe c_1 - c_{552} à pH 8 dans la
région spectrale comprise entre 1800 et 1200 cm ^{-1} de -500 à -50 mV
Figure 5.4.20 : Spectre différentiel infrarouge (ox-red) du complexe c_1 - c_{552} à pH 8 dans la
région spectrale comprise entre 1730 et 1600 cm ⁻¹ de -500 à -50 mV 163
Figure 5.4.21 : Spectre différentiel infrarouge (ox-red) du complexe c_1 - c_{552} à pH 8 dans la
région spectrale comprise entre 1600 et 1200 cm ⁻¹ de -500 à -50 mV 164
Figure 5.4.22 : Spectres différentiels infrarouge du complexe c_1 - c_{552} (en noir) de -500 à -50
mV, du cytochrome c_1 (en rouge) de -500 à +500 mV et c_{552} (en bleu) de -500 à +500 mV
entre 1800 et 1200 cm ⁻¹ à pH 8
Figure 5.4.23 : Spectre différentiel infrarouge (ox-red) du complexe c_1 - c_{552} à pH 8 dans la
région spectrale comprise entre 1800 et 1200 cm ⁻¹ de -50 à +500 mV 167
Figure 5.4.24 : Spectre différentiel infrarouge (ox-red) du complexe c_1 - c_{552} à pH 8 dans la
région spectrale comprise entre 1730 et 1600 cm ⁻¹ de -50 à +500 mV 169
Figure 5.4.25 : Spectre différentiel infrarouge (ox-red) du complexe c_1 - c_{552} à pH 8 dans la
région spectrale comprise entre 1600 et 1200 cm ⁻¹ de -50 à +500 mV 170
Γ
Figure 5.4.26 : Spectres differentiels infrarouge du complexe c_1 - c_{552} (en noir) de -50 a
+500 mV, du cytochrome c_1 (en rouge) de -500 à +500 mV et c_{552} (en hoir) de -50 a

Figure 6.1.1 : Spectres UV/Visible des nanoparticules d'or fonctionnalisées avec du citrate de sodium (en noir) et de l'acide thioctique (en rouge). La bande à 521 nm représente la Figure 6.1.2 : Images du TEM des nanoparticules fonctionnalisées avec du citrate de sodium 183 Figure 6.1.3 : Voltampérogramme de l'électrode d'or après déposition des nanoparticules d'or fonctionnalisées avec du citrate de sodium à une vitesse de balayage de 0.1 V/s (dans Figure 6.2.1 : Schéma de la modification de la surface d'or avec la présence de nanoparticules d'or fonctionnalisées avec de l'acide thioctique, du biphényl-4,4'-dithiol et Figure 6.2.2 : Spectres infrarouge obtenus par réflexion totale atténuée exaltée de surface sur une surface d'or de 20 nm après dépôt du modifiant (en noir), des nanoparticules d'or fonctionnalisées avec de l'acide thioctique (en rouge), et de la laccase à pH 8 (en bleu) 186 Figure 6.2.3 : Voltampérogramme de la laccase immobilisée à pH 8 sur une monocouche auto-assemblée de nanoparticules d'or fonctionnalisées avec de l'acide thioctique à une vitesse de balayage de 0.1 V/s. Le spectre en rouge correspond au voltampérogramme Figure 6.2.4 : Schéma de la modification de la surface d'or avec la présence de nanoparticules d'or fonctionnalisées avec du citrate de sodium, du DTSP et du cytochrome Figure 6.2.5 : Spectres infrarouge obtenus par réflexion totale atténuée exaltée de surface sur une surface d'or de 20 nm après dépôt des nanoparticules d'or fonctionnalisées avec du citrate de sodium (en noir), du modifiant (en rouge) et du cytochrome c_1 à pH 8 (en bleu). 189 Figure 6.2.6: Voltampérogramme du cytochrome c_1 à pH 8 (en noir) immobilisé sur les nanoparticules d'or fonctionnalisées avec du DTSP à une vitesse de balayage de 0.1 V/s. Le voltampérogramme en rouge correspond à celui obtenu avant l'immobilisation de la protéine...... 191 Figure 6.2.7 : Influence de la vitesse de balayage sur le courant de pic cathodique (valeur absolue) du cytochrome c_1 à pH 8...... 192 Figure 6.2.8 : Images du TEM des nanoparticules fonctionnalisées avec du citrate de Figure 6.2.9 : Schéma de la modification de la surface d'or avec la présence de nanoparticules d'or fonctionnalisées avec du citrate de sodium, du mélange de deux SAMs

Figure 6.2.10 : Spectres infrarouge obtenus par réflexion totale atténuée exaltée de surface sur une surface d'or de 20 nm après dépôt des nanoparticules d'or fonctionnalisées avec du citrate de sodium (en noir), du modifiant (en rouge) et du cytochrome c₅₅₂ à pH 8 (en bleu)194 Figure 6.2.11 : Voltampérogramme du cytochrome c_{552} à pH 8 (en noir) immobilisé sur les nanoparticules d'or fonctionnalisées avec le mélange de deux thiols à une vitesse de balayage de 0.1 V/s. Le voltampérogramme en rouge correspond à celui obtenu avant Figure 6.2.12 : Influence de la vitesse de balayage sur le courant de pic cathodique (valeur absolue) du cytochrome c₅₅₂ à pH 8..... 197 Figure 6.2.13 : Schéma de la modification de la surface d'or avec la présence de nanoparticules d'or fonctionnalisées avec du citrate de sodium, du mélange de deux SAMs et du cytochrome ba₃ de T. thermophilus. La flèche indique l'hème qui est affecté par cette Figure 6.2.14 : Spectres infrarouge obtenus par réflexion totale atténuée exaltée de surface sur une surface d'or de 20 nm après dépôt des nanoparticules d'or fonctionnalisées avec du Figure 6.2.15 : Voltampérogrammes du cytochrome ba_3 à pH 6.4 (en noir), 7.5 (en rouge), 8 (en bleu) et 8.5 (en vert) immobilisés sur les nanoparticules d'or fonctionnalisées avec le mélange de deux thiols à une vitesse de balayage de 0.2 V/s. Le voltampérogramme en Figure 6.2.16 : Influence de la vitesse de balayage sur le courant de pic cathodique (valeur absolue) du cytochrome ba₃ à pH 6.4 (en noir), 7.5 (en rouge), 8 (en bleu) et 8.5 (en vert). 201 Figure 6.2.17 : Influence du pH sur les potentiels de demi-vague du cytochrome ba_3 . La courbe en noire représente les potentiels après adsorption de la protéine sur la surface. Les courbes en bleu et en rouge représentent respectivement les potentiels de l'hème a_3 et b... 202 Figure 6.2.18 : Voltampérogrammes du cytochrome ba_3 à pH 6.4 (en noir) immobilisés sur les nanoparticules d'or fonctionnalisées avec le mélange de deux thiols à une vitesse de balayage de 0.005 V/s et après ajout de 100mM de KCN (en rouge). Le temps d'attente est de 10 min. 204 Figure 6.2.19 : Structure du cytochrome c oxydase de type ba_3 , les pointillés montrent les limites de l'espace périplasmique. Les trois sous-unités (Cu_A , hèmes b et a_3) sont mises en avant. Les distances sont mesurées entre l'hème b et la surface. Les deux flèches indiquent

Figure 6.2.20: Spectres infrarouge obtenus par réflexion totale atténuée exaltée de surface
sur une surface d'or de 20 nm après rinçage pour le cytochrome ba_3 à pH 6.4 (en noir), 7.5
(en rouge), 8 (en bleu) et 8.5 (en vert)

Liste des tables

Tableau 2.1.1 : Nom des bandes, longueur d'onde et assignements des bandes d'absorption
en infrarouge du squelette peptidique des protéines 57
Tableau 2.1.2 : Absorption d'une sélection des différents acides amines en infrarouge (v)
avec leur coefficient d'absorption molaire (ɛ) s : élongation, sym : symétrique, as :
antisymétrique, def : déformation 58
Tableau 2.1.3: Bandes d'absorption infrarouge des hèmes a, b et c avec X : Substituant des
porphyrines, v : élongation, δ : torsion
Tableau 2.1.4 : Bandes d'absorption infrarouge des substituants vinyles pour les hèmes a et
<i>b</i> avec v : élongation, δ : torsion, sym : symétrique, as : antisymétrique
Tableau 2.1.5 : Assignements des éléments de la structure secondaire des protéines par la
déconvolution de la bande Amide I en infrarouge en H ₂ O et en D ₂ O 64
Tableau 2.1.6 : Valeur de 1/m par rapport à la différence de potentiels entre les pics oxydés
et réduits72
Tableau 3.2.1 : Vue d'ensemble des éléments optiques pour la gamme d'infrarouge
utilisée
Tableau 3.2.2 : Liste des 19 médiateurs utilisés en électrochimie ainsi que leurs potentiels
de demi-vague respectifs
Tableau 4.2.1 : Tentative d'assignements pour le spectre différentiel infrarouge (ox-red) du
complexe <i>ba</i> ₃ de <i>T. thermophilus</i> à pH 8
Tableau 4.2.2 : Plage de potentiels à appliquer pour obtenir la contribution individuelle des
hèmes à différents pH. Les potentiels sont données vs. Ag/AgCl 3M KCl
Tableau 4.2.3 : Tentative d'assignements pour le spectre différentiel infrarouge (ox-red) du
complexe <i>ba</i> ₃ de <i>T. thermophilus</i> uniquement pour l'hème <i>b</i> à pH 8100
Tableau 4.2.4 : Tentative d'assignements pour le spectre différentiel infrarouge (ox-red) du
complexe ba_3 de <i>T. thermophilus</i> uniquement pour l'hème a_3 à pH 8 102
Tableau 5.2.1 : Tentative d'assignements pour le spectre différentiel infrarouge (ox-red) du
cytochrome c_1 de <i>T. thermophilus</i> à pH 8 126
Tableau 5.3.1 : Tentative d'assignements pour le spectre différentiel infrarouge (ox-red) du
cytochrome <i>c</i> ₅₅₂ de <i>T. thermophilus</i> à pH 8

Tableau 5.4.1 : Tentative d'assignements pour le spectre différentiel infrarouge (ox-red) du complexe c_1 -c de T. thermophilus avec l'attribution individuelle des bandes pour le Tableau 5.4.2 : Tentative d'assignements pour le spectre différentiel infrarouge (ox-red) du complexe c₁-c comparé avec son addition arithmétique de T. thermophilus à pH 8. 148 Tableau 5.4.3 : Pourcentage des différents éléments structuraux issus de la structure Tableau 5.4.4 : Tentative d'assignements pour le spectre différentiel infrarouge (ox-red) du complexe c_1 - c_{552} de *T. thermophilus* avec l'attribution individuelle des bandes pour le Tableau 5.4.5 : Tentative d'assignements pour le spectre différentiel infrarouge (ox-red) du complexe c_1 - c_{552} comparé avec son addition arithmétique de *T. thermophilus* à pH 8. 160 Tableau 5.4.6 : Tentative d'assignements pour le spectre différentiel infrarouge (ox-red) du complexe c_1 - c_{552} de *T. thermophilus* avec l'attribution individuelle des bandes pour le cytochrome c_1 et c_{552} entre -500 et -500 mV à pH 8..... 162 Tableau 5.4.7 : Tentative d'assignements pour le spectre différentiel infrarouge (ox-red) du complexe c₁-c₅₅₂ de T. thermophilus entre -500 et -50 mV comparé avec l'attribution Tableau 5.4.8 : Tentative d'assignements pour le spectre différentiel infrarouge (ox-red) du complexe c_1 - c_{552} de T. thermophilus avec l'attribution individuelle des bandes pour le Tableau 5.4.9 : Analyse pour la contribution des propionates pour le spectre différentiel infrarouge (ox-red) du complexe c_1 - c_{552} de T. thermophilus entre -50 et +500 mV comparé avec l'attribution individuelle pour le cytochrome c_1 et c_{552} à pH 8 entre -500 et +500 mV. 172 Tableau 5.5.1 : Récapitulatif des différents potentiels de demi-vague (vs. Ag/AgCl 3M KCl) pour les cytochromes c_1 et c_{552} et les complexes $c-c_{552}$ c_1-c et c_1-c_{552} de T. Tableau 6.2.1 : Potentiel de demi-vague (vs. Ag/AgCl 3M KCl) de la protéine immobilisée comparé à la valeur en solution (voir chapitre précédent), la largeur à mi-hauteur du pic cathodique, le taux de couverture et la vitesse de transfert d'électrons pour le cytochrome Tableau 6.2.2 : Potentiel de demi-vague (vs. Ag/AgCl 3M KCl) de la protéine immobilisé comparé à la valeur en solution (voir chapitre précédent), la largeur à mi-hauteur du pic

cathodique, le taux de couverture et la vitesse de transfert d'électrons pour le cytochrome
<i>c</i> ₅₅₂ à pH 8 (voir annexe 3)
Tableau 6.2.3 : Potentiels de demi-vague (vs. Ag/AgCl 3M KCl) de la protéine
immobilisée comparés aux valeurs en solution, la largeur à mi-hauteur du pic cathodique,
le taux de couverture et la vitesse de transfert d'électrons pour le cytochrome ba_3 à pH 6.4,
7.5, 8 et 8.5 (voir annexe 4)
Tableau 6.3.1 : Potentiels de demi-vague (vs.Ag/AgCl 3M KCl) de la protéine immobilisée
comparés aux valeurs en solution, la largeur à mi-hauteur du pic cathodique, le taux de
couverture et la vitesse de transfert d'électrons pour le cytochrome c_1 , c_{552} et ba_3 à pH 6.4,
7.5, 8 et 8.5

Liste des abréviations

ABTS	2,2'-azino-bis(acide 3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique)
ATP	Adénosine Triphosphate
ba_3	Complexe IV de la chaîne respiratoire avec les hèmes a et b
bc_1	Complexe III de la chaîne respiratoire avec les hèmes b et c
CcO	Cytochrome c oxydase
DDM	n–Dodecyl–β–maltoside
DTSP	dithiobis (succinimidyle propionate)
E _m	Potentiel de demi-vague
ENH	Electrode Standard à Hydrogène
FAD	flavine adénine dinucléotide
FADH ₂	flavine adénine dinucléotide protonée
IRTF	Infrarouge à Transformée de Fourier
KDa	Kilo Dalton
Kpi	Potassium Phosphate (tampon)
LMH	Largeur à mi-hauteur
МСТ	Mercury Cadmium Telluride
min	Minute
MIR	Moyen Infrarouge
NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide
OTTLE	Optically Transparent Thin–Layer Electrochemical cell
P. denitrificans	Paracoccus denitrificans
Q	Quinone
RTA	Réflexion totale atténuée
SAM's	Self Assembled Monolayers (monocouches auto assemblées)
SEIRAS	Surface-Enhanced Infrared Absorption Spectroscopy
SERS	Surface-Enhanced Raman Scattering
T. Thermophilus	Thermus thermophilus
TEM	Transmission electron microscopy
UQ_2	ubiquinol
UV/Visible	Ultraviolet/Visible
υ	Vibration d'élongation
υ ^s	Vibration d'élongation symétrique

- υ^{as} Vibration d'élongation antisymétrique
- δ Vibration de déformation
- γ Vibration de cisaillement

Les vingt acides aminés



Liste des publications

Publiées

Youssef EL KHOURY, Ruth HIELSCHER, Mariana VOICESCU, Julien GROSS et Petra HELLWIG «On the Specificity of the Amide VI band for the Secondary Structure of Proteins», Vib. Spectrosc. (2011) 55(2), 258-66

Youssef EL KHOURY, Aurélien TRIVELLA, **Julien GROSS** et Petra HELLWIG «*Probing the Hydrogen Bonding Structure in the Rieske Protein*», ChemPhysChem (2010) 11(15), 3313-19

Thomas MEYER, Julien GROSS, Christian BLANCK, Marc SCHMUTZ, Bernd LUDWIG, Petra HELLWIG et Frédéric MELIN «*Electrochemistry of Cytochrome c*₁, *Cytochrome c*₅₅₂ and CuA from the Respiratory Chain of Thermus thermophilus Immobilized on Gold *Nanoparticles*», J.Phys.Chem. B (2011), 115 (21), 7165–70

En préparation

Julien GROSS, Yashvin NEEHAUL, Arnaud PETROWICK, Thomas MEYER, Bernd LUDWIG, Frédéric MELIN et Petra HELLWIG

«Characterization of the complex c_1 *-* c_{552} *from Thermus thermophilus: the protein-protein interaction»*

Julien GROSS, Thomas MEYER, James A. FEE, Frédéric MELIN et Petra HELLWIG «*pH dependent of the cytochrome ba₃ from Thermus thermophilus: an electrochemical study*»

Résumé

Ce travail de thèse s'articule autour de la fonctionnalisation de surfaces pour l'étude de protéines membranaires issues de la chaîne respiratoire en utilisant la spectroscopie différentielle, méthode qui est une des spécialités du laboratoire ainsi que la voltammétrie cyclique. Il s'agit d'un outil puissant pour l'analyse de molécules biologiques et qui donne des informations essentielles, notamment sur la réorganisation du squelette peptidique et sur l'absorption des différents acides aminés. Elle permet aussi de mettre en avant des systèmes catalytiques ayant une application potentielle pour une future biopile.

Cette thèse contient trois parties.

Dans un premier temps, l'étude de la cytochrome c oxydase de type ba_3 de l'organisme *Thermus thermophilus* a été faite. Il s'agit d'une enzyme qui catalyse la réduction de l'oxygène en eau dans un organisme thermostable. Il a été décrit que lors le pH augmente, des interactions électrostatiques homotropes perturbent les potentiels de demi-vague de la protéine, entrainant une inversion des potentiels des hèmes b et a_3 . Dans cette partie, la spectroscopie différentielle a permis d'étudier les conséquences de ce changement d'un point de vue conformationel et sur la redistribution des charges dans les sites des cofacteurs. Des effets sont également visibles sur la réorganisation des hèmes, du squelette polypeptidique et des chaînes latérales d'acides aminés lors du transfert d'électrons. De plus, le transfert de protons couplé aux processus redox peut être visualisé dans ce spectre. Cette étude a mis en évidence le rôle crucial des propionates des hèmes dans le mécanisme de la protéine.

Ensuite, l'interaction protéine-protéine entre deux hémoprotéines solubles de la chaine respiratoire du même organisme a été étudiée. Elle est déterminante pour les processus ou toutes autres réactions au sein des cellules biologiques. Ces interactions sont encore mal étudiées. Dans un premier temps, une caractérisation complète des deux protéines isolées est effectuée puis le complexe formé est analysé. Par l'apport de spectres différentiels, nous avons pu déterminer l'influence de l'interaction entre les deux cytochromes sur divers bandes qui refléteront la réorganisation des hèmes, du squelette peptidique et des chaînes principales des acides aminés.

Cette étude nous montre l'importance des propionates des hèmes, qui jouent un rôle crucial dans cette interaction, et nous a permis de caractériser l'interaction au niveau moléculaire. Ces deux parties nous ont permis de mieux décrire et de comprendre les interactions protéines-protéines et permettent, par la suite, l'étude de différentes protéines membranaires à l'aide de la technique d'immobilisation mise en place.

Enfin, une application plus concrète de la fonctionnalisation de surface avec l'étude de la partie cathodique d'une biopile à biocatalyseurs optimisés a été réalisée. Ce projet nous a permis de mettre en place une nouvelle technique d'immobilisation de protéines, utilisant un réseau de nanoparticules d'or fonctionnalisées et nous permet de trouver des catalyseurs pour une éventuelle biopile. Elle nous donne accès, grâce à la voltampérométrie cyclique, au potentiel de demi-vague de la protéine étudiée et à la cinétique du transfert électronique. Cette méthode est d'abord mise au point sur la laccase de *Bacillus subtilis* qui est une glycoprotéine, puis sur deux protéines solubles le cytochrome c_1 et c_{552} et ensuite appliquée sur une protéine membranaire le cytochrome ba_3 , déjà étudiés dans un premier temps. La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier exaltée de surface nous confirme l'immobilisation et la pérennité de la protéine. Les potentiels de demi-vague obtenus pour le système immobilisé et ceux obtenus en solution sont comparés. Il a été possible pour le cytochrome ba_3 , de visualiser la dépendance pH trouvée en spectroscopie différentielle et de mieux décrire les phénomènes qui gèrent la dépendance due à l'activité catalytique.

Remerciements

Tout d'abord, je souhaite remercier vivement le Prof. Dr. Petra Hellwig pour sa gentillesse, sa patience, ses excellents conseils pendant les cinq années durant lesquelles j'ai eu la chance de travailler dans son laboratoire. J'ai acquis énormément d'expériences durant ces années, qui m'accompagneront et me seront utiles dans ma future carrière.

Puis je souhaite remercier personnellement Frédéric pour ses quelques années passées à travailler avec lui. Tu as été d'un grand soutien, d'une grande aide. Tu as su m'orienter et me guider pendant cette thèse. Tes corrections sur mon manuscrit et tes remarques m'ont permis d'aller dans le bon sens.

Je veux aussi remercier mes différents collègues, qui étaient présents pendant ces années et qui m'ont apporté leur soutien inconditionnel. Merci Aurélien, Mariana, Michelle, Nesrine, Ruth, Sébastien et Yashvin, sans oublier les nombreux et nombreuses stagiaires.

Merci à Youssef pour ces remarques et ses conseils pertinents pendant l'écriture de ma thèse et surtout pour son aide sur Pymol, Chemdraw et EndNote.

Je veux également remercier Thomas qui a toujours été d'un grand soutien et qui a permis au projet des nanoparticules de voir le jour.

Merci également à Arnaud pour son excellent travail sur les complexes.

Je remercie également Mireille pour sa gentillesse et pour nos discussions qui m'ont permis d'avancer.

Un grand merci à Christiane et à Paola pour leur aide concernant tous les problèmes administratifs.

Merci aussi à nos différents collaborateurs pour leur disponibilité et leur grande réactivité. Merci à James A. Fee (Department of Molecular Biology, The Scripps Research Institute, La Jolla, California 92037, USA), Bernd Ludwig (Institute of Biochemistry, Molecular Genetics, Biocenter Goethe–Universität, Frankfurt, Germany) et Valérie Taly (ISIS, UdS, Strasbourg, France).

Je veux aussi remercier l'Université de Strasbourg, L'Agence Nationale de la Recherche « Chair d'Excellence », le Centre National de la Recherche Scientifique.

Enfin, je veux remercier, plus personnellement, mes ami(e)s et ma famille qui m'ont toujours supporté. Merci à mon frère Alexandre, pour son soutien sans faille et à mes parents pour leur relecture attentive de mon manuscrit.

Merci à Ludovic pour sa motivation malgré la distance.

Enfin un grand merci à Aurélia, d'avoir été la quand j'avais besoin de toi. Si j'y suis arrivé c'est grâce à toi et à ton soutien. Tu as su me remonter le moral, me motiver. J'ai pu compter sur toi pendant toutes ces années je ne te remercierais jamais assez pour tout ce que tu as fait pour moi.

«Un plan, quand il apparaît à l'esprit, le séduit et le captive, il est tout lumière, ordre et nouveauté ; puis, lorsque vient l'heure d'exécution et de travail, lorsqu'il faut ranger dans le cadre et dans les lignes régulières qu'il présente, la masse brute et informe des matériaux amassés, alors commence l'épreuve décisive. Rien de plus laborieux que le passage d'une conception abstraite à une œuvre effective.»

Paul-Émile Littré « Préface au Dictionnaire de la langue française » (1872)

Chapitre I : Introduction

1. Motivation du projet

Cette thèse s'articule autour de la fonctionnalisation de surfaces pour l'étude de protéines membranaires avec des techniques mises en place au laboratoire. Tout d'abord diverses protéines de la chaîne respiratoire venant de l'organisme *Thermus thermophilus*, sont étudiées soit de manières isolées, soit par des interactions protéine-protéine. La méthode utilisée est la spectroscopie infrarouge couplée à l'électrochimie qui est un outil puissant pour l'analyse de molécules biologiques. Elle donne des informations essentielles, entre autres sur la réorganisation du squelette peptidique et sur l'absorption des différents acides aminés. Puis, une application plus concrète est abordée avec l'étude d'une biopile à biocatalyseurs optimisés grâce aux protéines étudiées précédemment. Une laccase bactérienne est également caractérisée pour une éventuelle application à une biopile. Cette étude permet de mettre en place une nouvelle technique d'immobilisation de protéines, grâce à la voltampérométrie cyclique, le potentiel de demi-vague de la protéine. L'activité redox des protéines immobilisées et en solution est alors comparée pour exploiter leur efficacité catalytique dans des futurs biopiles.

2. La chaîne respiratoire

2.1.Introduction

La respiration cellulaire est étudiée dans la bioénergétique moderne. Une série des réactions chimiques sont entrepris dans la cellule afin d'accomplir la respiration.

La chaîne respiratoire est constituée de fragments de sous-unités avec une structure et une fonction bien définies. Il existe, dans la nature, plusieurs variations de chaîne respiratoire. Deux types bien particuliers sont étudiés : la chaîne respiratoire mitochondriale et la chaîne respiratoire bactérienne qui est décrite succinctement.

La chaîne respiratoire mitochondriale repose sur le rôle essentiel de la mitochondrie. La mitochondrie apparaît comme le siège du métabolisme cellulaire. Les organites, dont la taille est de l'ordre du micromètre, se composent de deux membranes, une externe et une interne. Au sein de la membrane interne, les protéines de la chaîne respiratoire impliquées dans la phosphorylation oxydative sont présentes. La membrane est imperméable à toutes les molécules polaires et à certains anions et cations. Elle est repliée sur elle-même de façon à créer de nombreuses invaginations. Les invaginations augmentent la surface de la membrane sans augmenter le volume de la mitochondrie, mais accroît la capacité de phosphorylation oxydative (voir figure 1.2.1).



Figure 1.2.1 : schéma d'une mitochondrie.

La chaîne respiratoire bactérienne est généralement un modèle qui contient moins de sousunités que la chaîne respiratoire mitochondriale. Cependant, il existe deux types de chaîne respiratoire bactérienne : l'aérobie et l'anaérobie. Ces deux types ont des organisations très différentes de leurs cytochromes respectifs avec divers groupes prosthétiques. La chaîne respiratoire bactérienne est un système type pour l'étude de l'évolution biochimique du métabolisme énergétique et de la biosynthèse des cytochromes.(1)

Il a été postulé qu'il existe un ancêtre commun capable de faire de la respiration aérobie et anaérobie.(2, 3)

La chaîne respiratoire aérobie a une grande diversité dans les chemins de transfert d'électrons comparée à la chaîne respiratoire mitochondriale. En fonction de l'habitat naturel des bactéries et de leurs modes de métabolisme aérobie, la chaîne respiratoire peut exploiter des oxydases terminales uniques.(4, 5) Dans la respiration aérobie, la réoxydation des coenzymes réduits est assurée par le transfert des électrons par voie cytochromique vers le dioxygène. Chez les bactéries la composition en cytochromes de la chaîne respiratoire est très différente de celle des eucaryotes et varie en fonction de l'espèce et même pour une espèce donnée en fonction des conditions de culture. Indépendamment de la chaîne respiratoire utilisée, toutes les bactéries à respiration aérobie ont un métabolisme oxydatif.

Certaines espèces bactériennes peuvent utiliser comme accepteur final d'électrons des composés minéraux oxydés du milieu de culture autre que le dioxygène. Il s'agit, par exemple, de composés azotés oxydés, nitrites NO_2^- ou nitrates NO_3^- . La respiration anaérobie nitrate correspond à un phénomène de dénitrification qui est une désoxygénation des ions nitrates. C'est une réaction dissimulatrice des NO_3^- en NO_2 . Il existe plusieurs familles de bactéries dénitrificantes comme *Pseudomonas* ou *Paracoccus denitrificans*. L'organisme *P. denitrificans* sert de système modèle pour des systèmes mitochondriaux plus complexes.(6) Dans des conditions anaérobiques, l'organisme *T. thermophilus* exprime une chaîne respiratoire qui ressemble aux modèles mésophiles de l'organisme *P. denitrificans*. Ces respiratoires anaérobies ont un rendement énergétique plus faible. Enfin, les chaînes respiratoires anaérobies ne coexistent pas dans les bactéries avec une chaîne aérobie.(*7*, 8)

De manière générale, la chaîne respiratoire est donc formée de cinq complexes protéiques :

- La NADH : ubiquinone oxydoréductase ou Complexe I
- La succinate déshydrogénase ou Complexe II
- Le complexe bc_1 ou Complexe III
- La cytochrome *c* oxydase ou Complexe IV
- L'ATP synthase ou Complexe V

Et contient également :

- Le coenzyme Q₁₀ ou ubiquinone Q
- Le cytochrome *c*

Au-delà du modèle classique de la chaîne respiratoire (voir figure 1.2.2), les complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale sont organisés en supercomplexes, qui peuvent être constituées de deux copies du complexe I, une copie du complexe III et deux copies du complexe IV.(9) Cette organisation n'est pas commune à tous les organismes, où le nombre de copies de chaque complexe varie d'un organisme à l'autre. Le complexe V, l'ATP-synthase peut être actif, par exemple, en tant que monomère, (10) dimère ou assemblé au sein de grandes chaînes oligomères.(9)



Figure 1.2.2 : Modèle classique de la chaîne respiratoire et de l'ATP synthase. La figure est un mélange de structures connues (bactérienne et mitochondriale). Elles sont basées sur les codes PDB : 3M9S
(NADH:ubiquinone oxidoreductase); 1QLB (Fumarate reductase); 1ZRT (cytochrome bc₁); 3HB3 (CcO); 1BMF (F1 : partie de l'ATP synthase).(11)

La phosphorylation oxydative est un processus indispensable dans le processus mis en jeu dans la chaîne respiratoire. Le principe chimiosmotique, qui permet de mieux comprendre la phosphorylation oxydative a été découvert par Peter Mitchell en 1961 (*12*) et récompensée en 1978 par un prix Nobel.

Il désigne le processus par lequel l'ATP (Adénosine Triphosphate) est formé lorsque des électrons sont transférés du NADH (nicotinamide adénine dinucléotide) déshydrogénase et du FADH₂ (flavine adénine dinucléotide protonée) par une série de transporteurs pour former le gradient électrochimique de proton entre l'espace intermembranaire et la matrice mitochondriale. Les électrons de basses énergies libérés à la fin de la chaîne respiratoire réagissent ainsi avec les molécules d'oxygène et les protons présents dans la matrice mitochondriale afin de former des molécules d'eau. Les transporteurs d'électrons sont le complexe I et II jusqu'au complexe IV, accepteur terminal d'électrons, où le dioxygène est réduit en eau. Le transfert d'électrons consiste en une cascade de réactions d'oxydoréduction catalysées par les différents complexes protéiques. Les complexes se comportent comme des catalyseurs enzymatiques et de pompes à protons qui assurent le maintien d'un gradient de protons à travers la membrane à l'exception du complexe II. L'énergie, issue du gradient de protons et appelée force proton-motrice, est utilisée au niveau du complexe V pour la synthèse de l'ATP.

2.2. Le complexe I

Le complexe I ou nicotinamide adénine dinucléotide (NADH) déshydrogénase est la première et la plus large enzyme dans la chaîne respiratoire mitochondriale et bactérienne. Il catalyse l'oxydation du NADH et la réduction de l'ubiquinone Q couplée à la translocation de protons à travers la membrane interne des mitochondries ou du cytosol bactérien. L'énergie libérée par cette réaction, qui entraîne une chute de potentiel du NADH, permet le pompage de quatre protons à travers la membrane. L'équation décrit ce mécanisme où H_p^+ et H_n^+ désigne les protons qui passent du côté positif au côté négatif de la membrane. L'ubiquinone transporte les électrons du complexe I au complexe III.(*13*)

$$NADH + Q + 5H_n^+ \rightarrow NAD^+ + QH_2 + 4H_n^+$$
 Equation 1

2.3. Le complexe II

Le complexe II ou succinate déshydrogénase possède 4 sous-unités pour un poids total de 125 kDa dans la chaîne respiratoire mitochondriale. Il accepte deux électrons du succinate et catalyse la réduction de l'ubiquinone Q en ubiquinol (QH₂). Le succinate est transformé en fumarate grâce à une flavine adénine dinucléotide (FAD) qui est une des réactions du cycle de Krebs. C'est cette flavine adénine dinucléotide protonée (FADH₂) qui permet la formation de QH₂. Ce mécanisme est décrit ci-dessous dans les deux équations. Cependant, le complexe II ne contribue pas à l'expulsion de protons vers l'espace intermembranaire à cause de la faible variation d'énergie libre de la réaction engendrée. Dans la chaîne respiratoire aérobie, le complexe II ou succinate : quinone oxydase est un membre du cycle d'acide citrique. Comme dans la chaîne respiratoire mitochondriale, il couple l'oxydation du succinate en fumarate et catalyse la réduction de la quinone en quinol. Il catalyse la réaction inverse mais sans expulsion de protons à travers la membrane. Pour le complexe II dans la chaîne respiratoire aérotire anaérobie nommé quinol : fumarate oxydase, la réaction est différente. Il couple la réduction du fumarate en succinate avec une oxydation de la quinol sans être impliqué dans un processus de transfert de protons.(*14, 15*)

Succinate +
$$FAD \rightarrow Fumarate + FADH_2$$
 Equation 2

 $FADH_2 + Q \rightarrow QH_2 + FAD$ Equation 3

2.4. Le complexe III

Le complexe bc_1 appelé aussi complexe III ou ubiquinol-cytochrome c oxydoréductase est donc la troisième composante de la chaîne respiratoire mitochondriale. Cette enzyme est un dimère qui contient, au minimum, trois sous-unités catalytiques. Tout d'abord, un cytochrome b avec 2 hèmes nommés b_L et b_H . Ils sont liés de façon non covalente à la chaîne polypeptidique. L'hème b_L a un bas potentiel et l'hème b_H un haut potentiel. Puis un cytochrome de type c_1 , lié de façon covalente à la chaîne polypeptidique. Enfin une protéine Fer-Soufre, nommée Rieske formée par un cluster de type [2Fe-2S], qui est un centre mobile redox.

La première structure cristalline découverte du complexe bc_1 provient du cœur de bovin.(16) Par la suite d'autres structures cristallines provenant de différents organismes ont été résolues comme par exemple *Saccharomyces cerevisiae*.(*17*) Une structure en 3D a également été réalisée en 2001.(*18*) Pour la chaîne respiratoire bactérienne, le complexe III venant de *Rhodobacter capsulatus* a été résolue (voir figure 1.2.3). (*19*)

La sous-unité qui contient le cytochrome c_1 est une des protéines étudiées dans notre thèse. Le cytochrome c_1 de cœur de muscle a été découvert en 1940 par Yakushiji et al..(20) et confirmé quelques années plus tard par Keilin et al.(21) Il fait partie de la famille des cytochromes de classe I, famille qui décrit les cytochromes n'ayant qu'un seul hème de type c.(22) De manière générale, quatre classes de cytochromes c existent. La classe I inclut les cytochromes c solubles bas spin venant de la plupart des bactéries et des mitochondries avec un site d'attachement de l'hème vers le N-terminale. La classe II inclut les cytochromes c de haut spin et un certain nombre de cytochromes bas spin. Le site de l'attachement de l'hème est proche du C-terminale. Un exemple d'hème classe II est le cytochrome c_{756} . La classe III comprend les cytochromes à hèmes multiples comme le cytochrome c_7 . Enfin la classe IV a été crée pour les protéines qui ont un autre groupe prosthétique, la flavocytochrome c est dans ce cas.(23, 24)



Figure 1.2.3 : Structure du cytochrome bc_1 de *Rhodobacter capsulatus* (à gauche) et représentation schématique du cycle Q (à droite) (code PDB : 1ZRT).(19, 25)

Le mécanisme de cette enzyme se nomme cycle Q (voir figure 1.2.3). Ce cycle a été proposé par Peter Mitchell (*26, 27*) puis modifié par la suite (*28-30*) mais ce mécanisme est encore débattu aujourd'hui. Il est le même dans la chaîne respiratoire bactérienne ou mitochondriale.

Ce dimère possède deux sites de liaison de quinone nommée Q_o et Q_i . Le site Q_o est situé dans la membrane entre l'hème b_L et le centre Fer-Soufre. Quant au site Q_i localisé en dehors de la membrane, il est proche de l'hème b_H pendant le cycle catalytique. Une molécule d'ubiquinol

se lie au site Q_o et relâche ainsi deux protons et deux électrons. Une bifurcation se met en place. Le premier électron est transféré à la protéine Rieske, puis passe par le cytochrome c_1 . Enfin l'électron est livré au cytochrome c qui se trouvera en dehors de ce complexe qui luimême le transférera à l'accepteur terminal d'électron, le cytochrome c oxydase. D'un autre côté, le deuxième électron est amené par les deux hèmes de type b le b_H puis le b_L au site de liaison Q_i . L'ubiquinone est alors réduit en une semiquinone qui est un anion radicalaire QH•. Un deuxième cycle est nécessaire pour réduire cet anion en ubiquinol.(25) L'équation générale est décrite ci-dessous.

$$QH_2 + 2 \ cyt \ c_{ox} + 2H_n^+ \rightarrow Q + 2 \ cyt \ c_{red} + 2H_p^+$$
 Equation 4

A la fin de ces deux cycles, deux molécules de cytochrome *c* sont réduites et deux protons sont relâchés par le site Q_i et quatre par le site Q_o . A partir de là, ce complexe possède deux chemins alternatifs pour la réduction de l'oxygène en eau qui dépend de la pression partielle d'oxygène.(*31, 32*)

2.5. Le complexe IV

Le complexe IV ou la cytochrome c oxydase est un des deux oxydoréductases présente dans la chaîne respiratoire mitochondriale. Il est le dernier complexe de la chaîne de transport d'électrons, il est l'accepteur terminal d'électrons et catalyse la réduction de l'oxygène moléculaire en eau. Les quatre protons proviennent du cytochrome c et sont transférés un à un. Ce complexe expulse quatre protons vers l'espace intermembranaire. Le mécanisme est le même pour la chaîne respiratoire mitochondriale et bactérienne.

$$O_2 + 4H^+ + 4e^- \rightarrow 2H_2O$$
 Equation 5

Il existe trois familles d'oxydases de type hème-cuivre qui sont identifiées dans les différents organismes : les types A, B et C qui se différencient principalement par la structure du chemin de protons.(*3*) Ainsi, ces familles constituent trois lignes différentes d'évolution. Elles ont pu être mises en place grâce à la connaissance des séquences entières d'acides aminés des sous-unités et des résidus clés impliqués dans le transfert de protons. Le premier type peut être divisé en deux sous-familles grâce aux résidus de l'hélice VI à la fin du chemin de protons D.

Elle contient des oxydases principalement de type mitochondriale. Le type A1 englobe les protéines avec un résidu Glutamate dans une séquence précises d'acides aminés. Le type A2 possède une Tyrosine et une Sérine dans une autre séquence spécifique d'acides aminés. Le second type contient des oxydases de type ba_3 qui sont les ancêtres de celles qui possèdent un résidu Glutamate. Le dernier type d'oxydases englobe les protéines de type cbb_3 .

La première oxydase terminale à hème-cuivre a être caractérisée est la cytochrome c oxydase aa_3 de *P. denitrificans* en 1995 avec une résolution de 2,8 Å issue de la chaîne respiratoire bactérienne.(*33*) La cytochrome c oxydase bactérienne est constituée de quatre sous-unités au contraire de la protéine mitochondriale qui est un dimère et qui possède treize sous-unités comme celle du cœur de bovin.(*34, 35*) Il faut également savoir que la formation de ce complexe dépend de l'apport d'oxygène et des conditions de fermentation. Il y a soit la génération du cytochrome b pour une faible pression partielle d'oxygène soit du cytochrome c pour une forte pression partielle d'oxygène.(*36*)

2.6. L'organisme Thermus thermophilus

Durant cette thèse, des protéines provenant d'une bactérie Gram négative sont utilisées. Ces bactéries sont extrêmophiles, ainsi elles vivent dans des cheminées hydrothermales appelées couramment fumeurs noirs, dans lesquelles les températures peuvent atteindre 350°C, des pressions de l'ordre de 200 bars et des pH très acides. Cependant, la température de croissance optimale pour cet organisme se situe entre 75 et 80 °C et à pH 7.(*37*) La souche la plus utilisée est la HB27 initialement isolée d'un environnement thermal naturel au Japon. C'est un organisme modèle pour la manipulation génétique et possède donc des applications dans le domaine biotechnologique. Une deuxième souche très populaire est la HB8.(*38*) La particularité de cette souche est qu'elle peut grandir dans des conditions anaérobiques en présence de nitrate, ce qui n'est pas le cas de la HB27. Le génome de ces 2 souches HB8 ET HB27 a été caractérisé indépendamment en 2004.(*39*)

Ces organismes thermophiles sont aussi essentiels pour la détermination de structure 3D comme celle de la cytochrome c oxydase de type ba_3 (40) ou de la partie hydrophile du complexe I.(41) Cet organisme est enfin très utilisé pour différentes études sur la thermostabilité des protéines isolées depuis près de 35 ans.(42)



Figure 1.2.4 : Schéma du transfert d'électrons dans *T. thermophilus* ; les flèches indiquent le passage d'un électron.(43)

Les différentes protéines issues de l'organisme *T. thermophilus* et présentes dans la figure 1.2.4 sont étudiées. Pour une faible pression partielle en oxygène, l'électron passe du cytochrome c_{552} à la cytochrome c oxydase. Pour une forte pression partielle en oxygène, l'électron passe directement au cytochrome $caa_3.(44)$

2.6.1. Le cytochrome c_1 , fragment soluble du complexe III

La structure du complexe bc_1 de *T.thermophilus* n'est, à ce jour, pas encore connue.(45) Seule la protéine Rieske a été décrite.(46) Cependant, le cytochrome bc_1 a été caractérisé d'un point de vue génétique par Mooser et al..(45) Ce cytochrome contient en fait quatre sous-unités au lieu de trois habituellement : le cytochrome c_1 , la protéine Rieske et le cytochrome b qui présentent des caractéristiques identiques à ceux des autres complexes bc_1 . La quatrième sousunité a une structure d'opéron et est nommé FbcX pour une masse de 17.6 kDa pour 150 acides aminés. C'est une sous-unité hydrophobique mais sa fonction n'est pas précisément connue.(47)

Ce cytochrome présente une topologie particulière car il présente une structure inhabituelle avec deux domaines hydrophiles : un domaine de type N-terminale hydrophile se finissant par un groupe amine (-NH₂) et un domaine C-terminale se terminant par un groupe carboxylique (-COOH). Ces deux domaines solubles de 125 et 100 acides aminés sont séparés par une hélice transmembranaire de 13 acides aminés pour une masse de 26 kDa.(45) Ce domaine de type N-terminale est intéressant, il contient le site de liaison de l'hème et peut interagir avec le cytochrome c_{552} . Cette interaction est de type hydrophobe d'après des mesures cinétiques.(45)
La structure du cytochrome c_1 de *T.thermophilus* diffère légèrement de celles des autres cytochromes c_1 , mais ils possèdent tous 3 domaines : un domaine central et des domaines C-terminale et N-terminale.(48) Les différences structurales entre chaque organisme sont apparemment liées aux interactions spécifiques entre le cytochrome c_1 et les autres protéines.(49)

Il faut enfin savoir que seul une partie soluble du fragment qui contient l'hème c avec une masse de 9.4 kDa est étudiée.(45)

Il ne faut pas exclure que ce cycle Q pourra être modifié pour le cytochrome bc_1 de l'organisme *T.thermophilus*. En effet la quatrième sous-unité n'était identifiée que dans cet organisme et pour l'instant son rôle n'est pas déterminé.

2.6.2. Le cytochrome c_{552}

Le cytochrome c_{552} de *T.thermophilus* possède un hème unique soluble. Il se compose de 131 acides aminés pour une masse de 14.158 kDa.(50) Il fait partie également de la famille des cytochromes de classe I.

De nombreuses études ont été menées sur le cytochrome c_{552} qui est très bien caractérisé.(51, 52) Il possède une porphyrine de fer avec une bande α à 552 nm dans le domaine du Visible et qui donne le nom à cette protéine. En fait cette bande se scinde en deux, dans sa forme réduite grâce au centre Fe²⁺, avec une bande à 552 nm et un épaulement à 549 nm. La structure cristalline est connue.(44) Elle a permis de comprendre l'interaction du cytochrome c_{552} avec le cytochrome c oxydase, l'accepteur terminal d'électrons. Une résolution de 1,28 Å est publiée (voir figure 1.2.5).(53) En 2000 une résolution de 2,8 Å est réalisée à partir de la souche *E.coli.*(54)



Figure 1.2.5 : Représentation de la structure tertiaire du cytochrome c_{552} (code pdb : 1DT1 (54) ou 1C52 (53)) En rouge sont représentées les hélices α , en jaune les feuillets β , en vert les structures aléatoires, en bleu la porphyrine et en orange le centre ferrique.

Le cytochrome c_{552} contient trois domaines, un de type N-terminale, un de type C-terminale et un hème de type c. Cependant, l'intérieur de la molécule est très hydrophobe avec l'absence de molécules d'eau dans sa structure interne ce qui n'est pas commun aux autres cytochromes de classe I. Les molécules d'eau sont situées à la surface de la protéine. Cependant, elle ne possède pas de résidus Lysine chargés à la surface à proximité de l'hème contrairement aux autres cytochromes de classe I.(53) La région autour de l'hème est protégée par un segment peptidique apolaire constitué de la Met 63 et de la Leu 75 qui renforce la thermostabilité de la protéine.(53) A l'inverse, le cytochrome c_{552} de *P. denitrificans* possède lui des résidus Lysines chargés autour de la crevasse de l'hème ce qui gouverne l'interaction avec la cytochrome c oxydase.(55) Une autre caractéristique est sa grande stabilité à la dénaturation thermique décrite en 1977. Elle est probablement due à la pince du groupe C-terminale qui entoure l'hème comme une couche lipidique.(51, 56)

D'autres différences peuvent être distinguées comme la présence du domaine C-terminale de la chaîne peptidique qui est normalement absent dans de nombreux cytochrome de classe I. Un tiers du domaine forme ici une pince supplémentaire et entoure l'hème. Les résidus Lysine se trouvent dans ce domaine, ils apporteront donc une grande stabilité à la protéine. Une autre particularité est la présence de feuillets β dans la protéine.(*53*) Sa grande stabilité lui permet également des applications d'ingénierie moléculaire.

Le cytochrome c_{552} peut être transformée en une péroxydase artificielle thermophile en créant des mutants se basant sur le mécanisme des péroxydases naturelles sans pour autant perdre sa thermostabilité naturelle. Ces péroxydases sont utilisées comme catalyseur qui utilisent le peroxyde d'hydrogène comme oxydant.(57) Il en découle que l'ingénierie sur des protéines thermophiles peut être une méthode intéressante pour produire des enzymes artificielles.

Le cytochrome c_{552} est le substrat naturel de la cytochrome c oxydase. Ces deux protéines ne contiennent pas de résidus chargés à leur surface, d'après leurs structures cristallines respectives. Cette interaction a été très bien étudiée en « Flux stoppé » mais aussi en RMN et par des calculs théoriques.(58) En fait c'est le Cu_A de la cytochrome c oxydase qui est son partenaire redox naturel.

La partie soluble du cytochrome c_1 apparait comme étant un donneur d'électrons compatible avec le c_{552} . Des expériences de « Flux Stoppé » ont été réalisées pour prouver cette interaction, il en ressort que le manque de charges dans cette interaction montre l'importance des forces non électrostatiques pendant cette réaction.(45)

2.6.3. La cytochrome c oxydase de type ba_3

Le cytochrome ba_3 ou cytochrome c oxydase est un des deux oxygènes réductases présent dans la chaîne respiratoire de l'organisme *T.thermophilus*. Elle fait partie de la famille de type B, mais également de la famille de type A. La famille de type B possède les mêmes résidus de type métal-ligand que ceux du cytochrome $ba_3.(59)$ Elle partage très peu de similitudes du point de vue de sa séquence d'acides aminés (moins de 20% identiques) avec les autres oxydases et il a été postulé qu'elle appartient au cluster de type SoxB.(60, 61) C'est une des oxydases avec une structure 3D bien connue.(32)

Elle est caractérisée tout d'abord en 1995 par cristallographie avec un résolution de 3,8 Å (*32*) puis en 2000 avec une structure cristalline en 3D de résolution 2,4 Å par Soulimane et al.(*40*). Plus tard, une structure de résolution 2,3 Å est trouvée.(*62*) Enfin, tout récemment, une structure de 1,8 Å dans un environnement lipidique a été publiée par Tiefenbrunn et al.(*63*) Avant cela, le cytochrome c_{552} a été caractérisé ainsi que la sous-unité II contenant le centre Cu_A en 1999.(*64*) Il s'agit de la plus petite cytochrome *c* oxydase connue avec une masse de 84.884 kDa pour 764 résidus (voir figure 1.2.6).



Figure 1.2.6 : Structure du cytochrome ba₃ de T. thermophilus (code PDB : 1XME(62) ou 1EHK.(40, 65)).

Cette protéine possède quatre centres redox : un accepteur d'électron binucléaire Cu_A , un hème *b* bas spin, un hème a_3 haut spin et un centre mononucléaire Cu_B . Elle incorpore deux type d'hèmes différents : les hèmes *b* et a_3 qui ont des propriétés spectrales très différentes ce qui permet donc l'analyse des propriétés redox de chaque hème séparément que ce soit en infrarouge ou en UV/Visible.(*66, 67*) En particulier, la détermination du potentiel de demivague peut se faire pour chaque hème (hèmes *b* et a_3).(*68*) Il est aussi possible d'isoler et donc de caractériser le Cu_A .(*69*) Ces centres redox sont répartis dans trois sous-unités.

Cette protéine a trois sous-unités (32) nommées sous-unité I, II et IIa et avec un petit domaine périplasmique. La sous-unité I montre une certaine analogie avec les autres sous-unités I des autres oxydases, cependant elle possède 13 hélices transmembranaires et cette $13^{ième}$ hélice montre des propriétés inhabituelles responsable de la stabilité thermique de la protéine. La sous-unité I contient l'hème *b* et le centre binucléaire a_3 -Cu_B. Le centre a_3 -Cu_B est responsable de la réduction de l'oxygène en eau.(70) II contient cependant un atome d'oxygène supplémentaire dans le pont liant ces deux cofacteurs. La sous-unité II, qui est située du côté périplasmique, possède un site binucléaire de type Cu_A de plus que les autres sous-unités II. II est responsable de l'interaction de type hydrophobe avec le cytochrome c_{552} , la surface étant non chargée. (40, 61) Cette sous-unité est typique des protéines de type SoxB. La sous-unité IIa, qui couvre la membrane, joue un rôle important dans le fonctionnement de cette enzyme, elle ne possède que 34 résidus d'acides aminés et est semblable à l'hélice 1 de la sous-unité II dans l'oxydase de type aa_3 mais avec une polarité opposée. Contrairement aux autres cytochromes *c* oxydase, le domaine de liaison autour du Cu_A ne possède aucun résidu chargé négativement.(*40*)

Une étude sur le cytochrome ba_3 a plus particulièrement attiré notre attention. Sousa et al. (71) ont étudié le potentiel de demi-vague en fonction du pH (voir figure 1.2.7). En prenant deux longueurs distinctes qui correspondent à chaque hème pour la même transition électronique, ils ont pu montrer l'évolution de ces deux potentiels. Entre le pH 6 et 7.5, l'hème a_3 a un potentiel plus haut que celui de l'hème b. Mais quand on augmente le pH, l'effet inverse est observé. L'hème a_3 a un potentiel de réduction plus haut que l'hème b. L'équilibre du transfert d'électrons est déplacé vers l'état dans lequel l'hème a₃ est réduit. Ces deux centres redox sont donc influencés par le pH. Cette inversion est due d'une part à une interaction électrostatique homotrope entre les deux hèmes et d'autre part aux interactions électrostatiques ou hétérocoopérativité que chaque hème a avec son centre protoné. Cette dernière interaction est appelée effet redox Bohr, effet qui interagit avec les centres redox et crée un réseau complexe de coopérativités quand le pH augmente.(72) On peut alors se demander si ces effets auront un impact sur les centres cuivre de la protéine. Le Cu_A est situé trop loin des deux hèmes pour subir leur influence. Le Cu_B n'absorbe pas dans le domaine UV/Visible, mais il interagit avec l'hème a_3 . Il est donc impossible pour le moment de conclure.



Figure 1.2.7 : Dépendance en pH du potentiel de demi-vague des hèmes *b* et *a*₃ du cytochrome *ba*₃ de *T*. *thermophilus*. Les potentiels sont ici donnés par rapport à l'ENH (Electrode Normal à Hydrogène). Figure modifiée à partir de. (71)

Du point de vue de l'activité catalytique, il a été observé que cette protéine est plus active à des températures supérieures à 60 °C, la température physiologique de l'organisme *T*. *thermophilus*.(73) En effet, à cette température, l'activité catalytique de l'enzyme est augmentée et donc le cytochrome ba_3 est réduit par le cytochrome c_{552} .

Il a été montré, avec l'aide de la cristallographie et grâce à l'affinité avec le Xe, que le canal de transport d'O₂ ne gène pas le passage de l'oxygène vers le centre binucléaire contrairement aux canaux de transport d'O₂ d'autres organismes comme *P. denitrificans* qui sont plus petits.(74) Pour lier l'oxygène, la protéine a besoin de se trouver dans son état réduit, qui est un intermédiaire important pour le cycle catalytique. L'état réduit n'entraîne généralement que très peu de changements structuraux.(75) Le cytochrome ba_3 est une exception, des changements mineurs mais importants sont détectés autour du centre binucléaire. Un mouvement du centre binucléaire qui perdrait un atome d'oxygène est suspecté.(76) La forme réduite de la protéine se lie, par exemple, avec le cyanure. L'hème a_3 , dans son état réduit, a une affinité très forte avec le cyanure. Il subit donc des changements structuraux qui ouvrent l'hème a_3 aux ligands. Cependant, la forme oxydée de la protéine ne réagit pas en présence de cyanure. Cet exemple montre encore une fois la particularité de cette protéine.(77)

Le mécanisme des chemins de protons n'est que partiellement définit, de nombreuses études sont en cours sur le sujet.

Le centre binucléaire catalytique est situé au milieu de la membrane ce qui implique l'utilisation de chemins de protons pour la réduction de l'oxygène et pour le transfert de protons à travers le côté négatif de la membrane tout en passant à travers la barrière hydrophobe. La structure cristalline suggère deux chemins de protons possibles, ils sont similaires à ceux identifiés par Iwata et al. pour le cytochrome aa_3 de *Paracoccus denitrificans (33)* et nommés chemin de proton K et D. Ces noms viennent des deux résidus d'acides aminés, situés à l'entrée du canal, Asp 124(D124) et Lys 354(K354).(43) Il accumule en fait les molécules d'eau dans la piscine (water pool). Il a été postulé que cette piscine fait partie du chemin de sortie des protons et est l'accepteur primaire pour les protons pompés et pour les molécules d'eau formées par le centre binucléaire.(40, 78) Le transfert d'électrons se fait à partir du cytochrome *c* qui délivre un électron au Cu_A, puis au site binucléaire a_3 -Cu_B via l'hème *b*. La formation de deux molécules d'eau nécessite quatre protons qui seront délivrés par les chemins de protons K et D. Le chemin de protons K sert à l'assimilation de protons couplés à la réduction du site binucléaire. Le chemin de protons D sert quant à lui au

transport de protons et à la réduction de l'oxygène. Il montre une efficacité moindre que l'autre chemin de protons K. Le chemin de protons D n'a pas de fonction. Plus récemment, cependant, il a été prouvé, grâce à une mutagenèse, que la protéine n'utilise qu'un seul chemin de protons, le chemin K. Ce résultat est analogue à celui de la famille de type A. Cet unique chemin délivre donc les protons au site actif pour la réduction de l'oxygène et participe au transfert de protons.(79) Une analyse génétique de l'autre chemin de protons montre que les résidus formés ne sont pas conservés et donc que ce chemin de protons n'est pas actif. Une double mutation à l'entrée de ces deux chemins de protons a montré que l'activité de la protéine n'a pas été modifiée. Des mutations ont été également faites sur le chemin de protons K comme la mutation de l'acide aminé Glu 15.(79) Les mutants Glu 15 et Thr 312 ont permis de mettre en évidence l'existence d'un seul chemin de protons. En effet, ces deux mutants retardent et inhibent l'oxydation et la réduction dans une partie du cycle catalytique.(80) Le chemin de protons K commence avec l'acide aminé Glu 15 puis passe via les acides aminés Thr 315, Thr 312 et la Ser 309 (voir figure 1.2.8).(79)



Figure 1.2.8 : Proposition de structure du chemin de protons K. (79)

Les mutations du chemin de protons K affectent l'hème *b* qui va passer de l'état ferrique à l'état ferreux beaucoup plus rapidement en inhibant le transfert d'électrons.

L'énergie libre produite par la réduction de l'oxygène en eau est utilisée pour pomper les protons. Cependant, le chemin de sortie des protons n'est lui pas très bien caractérisé. L'efficacité de pompage est de 0,4-0,5 H^+/e^- (81) contrairement à d'autre cytochrome *c* oxydase mitochondriale qui montre une efficacité de 1 H^+/e^- .

En effet il a été montré que le chemin de proton est modifié pour l'organisme *T.thermophilus* probablement dû à l'His 384 qui change de configuration structurale pendant le cycle catalytique et que le site de pompage alterne entre l'état protoné et déprotoné pour chaque deuxième électron transféré au site catalytique.(*82*)

Le cytochrome ba_3 possède cinq intermédiaires réactionnels, les 3 premiers nommés A, P et O ont des propriétés communes avec les oxydases de type aa_3 . Les deux autres intermédiaires sont R et F. (83, 84) Le schéma 1.2.9 décrit les différentes transitions :



Figure 1.2.9 : Schéma illustrant le cycle de réaction oxydatif de la cytochrome c oxydase de type ba_3 .(83, 84)

- R¹ : enzyme totalement réduite
- A : intermédiaire de type ferreux oxy
- P_R : intermédiaire peroxy
- F_{I/II} : intermédiaire de type oxy ferryl
- O : enzyme totalement oxydée
- YOH : Tyrosine 237 protonée
- YO⁻: Tyrosine 237 deprotonée

La Tyr 237 est un groupe critique dans le cytochrome ba_3 , elle est située près du centre binucléaire et est liée de façon covalente avec un ligand Histidine du Cu_B. (83)

Pour la transition $R \leftrightarrow A$, après addition d'oxygène, la formation d'un complexe de type oxy avec un échange d'électrons et de protons dans les deux sens se réalise. Le rendement de la réaction est de 40%. Il y a une fixation de l'oxygène sur l'hème réduit a_3 qui relâche du CO. Ce mécanisme est le même que pour le cytochrome $aa_3.(85)$

La transition $A \rightarrow P_R$ implique une réduction du complexe oxy par trois électrons provenant de l'hème *b* et du Cu_B avec la rupture d'une liaison O-O de l'hème *a*₃ formant ainsi l'oxy ferryl ou « peroxy » nommé P_R. Ce P_R a le même spectre caractéristique que le cytochrome *aa*₃.(*86*) C'est dans cette transition que l'acide aminé Glu278, non conservé dans le cytochrome *ba*₃, joue un rôle.

La transition $P_R \rightarrow F$ met en jeu la réduction de l'hème *b* sans perturber l'hème a_3 comme c'est le cas dans le cytochrome aa_3 . Un proton est également utilisé pour former l'intermédiaire F.(87)

Enfin, la dernière transition $F \rightarrow O$ va réduire l'oxy ferryl et permettre un transfert d'électron vers l'hème *b* puis vers le Cu_A et enfin vers le centre binucléaire. Il y a un transfert de protons pompés ou obtenus pendant cette transition.

Il est intéressant de noter qu'il n'y a pas de pompage de protons pendant la transition $A \rightarrow P_R \rightarrow F$ ce qui peut expliquer le faible rendement du pompage (0,4-0,5 H⁺/e⁻). Pendant les transitions, F \rightarrow O un ratio de 0,7 protons est échangé.(83)

3. La laccase ou CotA de *Bacillus subtilis* 3.1.Structure

La CotA est une endospore responsable de la sporulation. Le nom Cot vient de l'opéron (un opéron est un ensemble de gènes dont la régulation de l'expression dépend d'une molécule dite opérateur). La CotA se compose de 25 polypeptides pour une masse moléculaire de 65 kDa.(88) Malgré des similitudes avec les oxydases multi cuivres, on ne sait pas si le CotA a une activité oxydative dans *Bacillus subtilis*. La laccase de *Bacillus subtilis* fait partie de la famille des protéines multi cuivre « bleus », cette famille se caractérise par des protéines multidomaines qui utilisent des propriétés redox uniques de ces ions cuivres.(89) Elle présente des similitudes avec les oxydases multi cuivre au niveau des sites actifs.(88)

La laccase se trouve essentiellement dans des champignons responsables de l'humification, mais aussi dans les plantes où elle intervient dans la synthèse de la lignine ainsi que dans les bactéries.

La laccase est une glycoprotéine et appartient à la famille des oxydoréductases capables de catalyser chimiquement l'oxydation des composés phénoliques en réduisant le dioxygène en eau, c'est dans cette optique qu'elle est le plus souvent utilisée. Un intérêt majeur de cette laccase est sa capacité à réduire directement le dioxygène en eau, sans former du peroxyde d'hydrogène et pour des potentiels plus élevés que ce qui peut être observé avec des catalyseurs à base de platine.(90) La grande stabilité de cette laccase et son importante activité catalytique en font un excellent candidat pour une biopile.(91, 92)

L'autre avantage de la CotA est son activité dans une large gamme de températures.(93)

La structure en 3D de la laccase bactérienne CotA a été déterminée à partir de la diffraction des rayons X avec une résolution de 1,7 Å (voir figure 1.3.1).(94-96)



Figure 1.3.1 : Représentation de la structure de la CotA, les atomes de cuivre sont représentés en magenta. (code PDB : 1GSK)(94-96)

La laccase nécessite un médiateur pour pouvoir fonctionner de manière optimale. Le rôle de ce médiateur est très précis, une fois que le médiateur est oxydé par la laccase, il doit oxyder un autre substrat. Par ailleurs, le médiateur oxydé pourrait s'appuyer sur un mécanisme d'oxydation non disponible à l'enzyme, étendant ainsi la gamme de substrats accessible (voir figure 1.3.2).(97)



Figure 1.3.2 : Rôle du médiateur dans la réaction catalytique.(98)

Plus de cent médiateurs ont été décrits et Fabbrini et al.(99) ont démontré que le médiateur le plus adapté pour la laccase est le 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) ou ABTS. Ce médiateur joue un rôle important dans la détermination du mécanisme d'oxydation du substrat grâce à la stabilité de sa forme oxydée ainsi que par la valeur de son potentiel redox. Il peut être oxydé en un radical cationique (ABTS⁺) et en un radical dicationique (ABTS²⁺) qui répondent aux caractéristiques attendues d'un point de vue réactionnel et mécanistique. Il y a encore aujourd'hui des désaccords dans les formes de réactivité de l'ABTS lors de son oxydation (voir figure 1.3.3).(99)



Figure 1.3.3 : Différents états oxydés de l'ABTS.(99)

3.2. Mécanisme fonctionnel

La laccase contient quatre centres actifs Cu^{2+}/Cu^+ , qui sont classés en trois types T1, T2 et T3. Le site T1 est caractérisé par une bande d'absorption vers 600 nm qui correspond à la couleur bleue de la laccase. Cette bande possède des coefficients d'extinction molaire élevés. Cette absorption forte est due au transfert de charge métal-ligand de l'atome de soufre du ligand Cystéine vers l'atome de cuivre. Le site est entouré de deux Histidines, d'une Cystéine en position équatoriale et d'une Méthionine dans une position axiale, le tout décrivant une bipyramide trigonale. Sa fonction est d'extraire successivement quatre électrons au substrat ce qui est typique des laccases et donne la couleur bleue de la laccase.(94)

Le centre trinucléaire est, quant à lui, composé d'un site T2 et de deux sites T3. Le site T2 peut être caractérisé uniquement en RPE car le signal en UV/Visible est trop faible. Ce signal en RPE ressemble à celui des complexes Cu(II) tétragonaux, dans le cas de l'organisme *Bacillus subtilis* cette bande est absente car la distance entre le centre T2 et T3, qui est de l'ordre de 4 Å, est anormalement longue ce qui perturbe le signal.(94)

Le site T3 a lui une bande d'absorption à 330 nm, mais avec un coefficient d'extinction molaire peu élevé. Il contient 2 ions cuivre attachés au ligand et se caractérise par son caractère diamagnétique.

Le centre est entouré de huit Histidines dont six sont coordinés avec le site T3. Un pont hydroxyde relie les deux atomes de cuivre. Enfin, ce centre intervient dans la réduction du dioxygène (voir figure 1.3.4).



Figure 1.3.4 : Schéma des centres Cu de la laccase de *Bacillus subtilis* (Cu₁ est le centre de type I, Cu₄ le centre de type II et Cu₂ et Cu₃ sont les centres de type III).(94)

Les trois ions Cu^{2+} du centre trinucléaire sont donc réduits à l'état Cu^+ . Enfin les sites T2 et T3 interagissent avec la molécule de dioxygène pour former un intermédiaire peroxo qui est ensuite réduit en un ion hydroxyle.

Cette laccase contient aussi trois domaines de type cupredoxin. Ils sont liés par une boucle extérieure interdomaine. Cette boucle contribue à la stabilité de l'enzyme.(94)

4. Interaction protéine-protéine

4.1.Introduction

Un mot général décrit les interactions biologiques : l'interactome. L'interactome décrit toutes les interactions moléculaires possibles dans une cellule comme l'interaction protéine-protéine ou l'interaction ADN-ARN (voir figure 1.4.1). L'étude des ces interactomes permet de comprendre des mécanismes biologiques essentiels pour la cellule et plus particulièrement pour comprendre de nombreuses maladies humaines de type neurodégénérative. Une protéine n'agit jamais seule mais interagit avec d'autres pour assurer sa fonction. Pour la levure il a été montré que 88% de ces 2000 protéines, qui ont été purifiées, étaient sous forme de complexes.(*100*) De plus l'interaction protéine-protéine est aussi cruciale pour les processus de la chaîne respiratoire comme lors de la génération d'un gradient de protons pour la synthèse d'ATP.(*101*)



Figure 1.4.1 : Exemple d'interaction entre deux protéines.

Les interactions entre protéines sont caractérisées comme étant stables ou transitoires. Les interactions stables sont associées avec des protéines qui ont été purifiées comme des sousunités multiples. L'hémoglobine et l'ADN polymérase sont des exemples d'interactions multiples de sous-unités qui forment des complexes stables. Les interactions transitoires sont attendues dans le contrôle de la majorité des processus cellulaires. Elles sont temporaires dans la nature et requièrent typiquement des conditions très spécifiques comme un changement conformationnel. Ces interactions peuvent être fortes ou faibles, rapides ou lentes.

Les conséquences de ces interactions sont multiples. Elles peuvent altérer les propriétés cinétiques de l'enzyme, créer un nouveau site de liaison, désactiver ou dénaturer la protéine et démontrer des nouvelles fonctions que la protéine ne possédait pas en étant seule.(*102*)

Les protéines se lient les unes aux autres grâce à une combinaison de liaisons hydrophobes, de forces de van der Waals, et de ponts salins dans des domaines spécifiques de liaison de chaque protéine. Ces domaines peuvent être de petites ou de larges surfaces et peuvent varier de quelques peptides à des centaines d'acides aminés. La force de la liaison est influencée par la taille du domaine de liaison.(*102*) Il existe différents types d'interactions possibles entre deux protéines. Trois interactions attirent notre attention : électrostatiques, hydrophobes et hydrophiles.(*103*) La nature de la surface des deux protéines en interaction est primordiale.

4.1.1. Interactions électrostatiques

Les interactions électrostatiques sont fondamentales et omniprésentes pour la formation de liaison et de macromolécules.(104) Elles dominent de nombreux aspects du comportement des protéines.(105) Différentes analyses de structures ont montré un rôle central des interactions électrostatiques dans l'association protéine-protéine. Elles se font entre des résidus chargés uniquement. Les clusters de résidus polaires et chargés qui sont localisés dans l'interface protéine-protéine peuvent renforcer la stabilité du complexe, bien que l'ensemble des charges électrostatiques soit généralement déstabilisant pour les protéines.(106) Le complexe formé implique une désolvatation partielle des protéines qui interagissent. Il semble que les interfaces protéine-protéine peuvent être conçues de manière à optimiser les interactions entre les résidus chargés et polaires. Elles sont généralement très stabilisantes et directionnelles.(107) L'interaction entre les groupes Lysine du cytochrome c et les groupes carboxylate chargés négativement sont un exemple d'interaction électrostatique.(108) Enfin, elles peuvent créer, par exemple, des liaisons ioniques, Hydrogène ou covalentes.(109) Des ponts salins peuvent aussi être issus de l'interaction entre deux surfaces chargées. Ils sont généralement associés avec des liaisons Hydrogène et jouent un rôle crucial dans la liaison entre des protéines.(110, 111)

4.1.2. Interactions hydrophobes - hydrophiles

Le terme d'interactions hydrophobes est généralement relié aux interactions de London. Or, il manque les interactions de Debye qui sont tout aussi fortes que celles de London. Il est donc plus juste de parler d'effet hydrophobe qui est un ensemble d'interactions.

Les effets hydrophobes sont fondamentaux dans la stabilisation de deux protéines associées.(*112*) Le terme effet hydrophobe est utilisé pour décrire l'association entre des résidus non polaires situés à la surface des protéines.

Un effet hydrophobe existe entre le cytochrome c_{552} et la cytochrome c oxydase de type ba_3 puisque leurs deux surfaces ne sont pas chargées.(40, 54)

Les interactions hydrophiles et hydrophobes sont toutes les deux dues à une restructuration des molécules d'eau au voisinage des surfaces respectivement hydrophiles ou hydrophobes. L'origine de ces deux interactions n'a pas d'explication théorique satisfaisante dans la littérature.(*103, 113, 114*)

Les surfaces polaires ou chargées ayant plus d'affinité pour l'eau sont dites hydrophiles et les forces susceptibles d'agir entre elles sont qualifiées d'interactions hydrophiles. L'interaction hydrophile résultante entre deux surfaces hydrophiles est répulsive. Certaines molécules non chargées et non polaires peuvent être hydrophiles si leur géométrie est favorable et si elles contiennent des atomes électronégatifs.

La prédiction de tels complexes est très difficile car les mécanismes sont mal compris et très peu décrits, une combinaison d'approches expérimentales et théoriques est donc nécessaire pour comprendre ces mécanismes.

4.2. Approche expérimentale

Plusieurs méthodes permettent d'étudier ces interactions protéine-protéine. Tout d'abord la PCA (Protein fragment Complementation Assay) qui consiste à coupler chacune des protéines avec des fragments d'une protéine rapportrice. Elle permet d'identifier les interactions et les réseaux d'interaction, (*115*) tout comme la méthode FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) qui permet de caractériser des interactions à l'intérieur et à l'extérieur de la cellule.(*116*) La détection d'un signal caractéristique reflète la proximité ou non de la protéine ciblée. Puis la spectroscopie de masse est également utilisée pour identifier les protéines présentes dans le complexe. Or ce procédé est coûteux et nécessite des complexes purifiées.(*117*) D'un point de vue expérimental, très peu de structures ont été déterminées par spectroscopie RMN (Résonance Magnétique Nucléaire) ou par diffraction des rayons X car ces complexes sont de nature transitoire et les protéines, mises en jeu, ont des masses moléculaires trop élevées.(*118*) Une autre méthode est la méthode TAP (Tandem Affinity Purification) qui est, en fait, la purification de complexes protéiques basée sur l'utilisation de protéines chimériques.(*119, 120*)

Cette méthode permet de créer des cartes d'interaction protéine-protéine et ainsi mieux comprendre le développement des cancers chez l'homme. En effet, des protéines sont impliquées dans le développement des cancers et certaines de ces protéines sont communes à d'autres animaux. En dressant la carte d'interaction de ces animaux, une base de travail est obtenue. La technique de double hybride permet également d'établir ces cartes, elle détecte une interaction physique entre deux protéines.

D'autres méthodes d'analyses d'interaction protéine-protéine ont déjà été appliquées à l'étude de protéines membranaires. Tout d'abord la RPE (Résonance Paramagnétique Electronique) est utilisée pour étudier la dynamique des protéines.(121) L'utilisation des centres paramagnétiques, comme par exemple entre la cytochrome c oxydase et le cytochrome c, est nécessaire dans ce cas-là.(122) Enfin d'autres méthodes sont à envisager comme une mutation ou la cinétique fonctionnelle qui permettra de déterminer la nature de l'interaction entre deux protéines en se basant sur un modèle à deux pas. Ces interactions sont de type électrostatique et permettent de se renseigner sur l'efficacité du transfert d'électrons.(123) Certains paramètres rentrent alors en jeu comme la distribution de charges autour de l'hème qui joue un rôle majeur dans l'association entre deux partenaires redox. En effet, ces charges sont responsables du moment dipolaire électrostatique. Un autre paramètre concerne les contacts hydrophobes directs et les propriétés de l'interface qui sont importantes pour le transfert d'électrons.(48)

Cette liste n'est pas exhaustive il existe bien d'autres méthodes pour décrire l'interaction protéine-protéine.(124)

4.3. Approche théorique

Les études théoriques pour l'étude de l'interaction protéine-protéine nécessitent l'utilisation de logiciels spécifiques qui combinent de la bioinformatique (« docking ») et de la biologie structurale pour prédire la formation et donc la configuration de ces complexes. Certaines études sont faites à partir de la base de données PDB (Protein Data Bank) avec des résultats plus ou moins conformes.(*125*) La première base de données qui a regroupé pour la première fois toutes les interactions possibles entre protéines est : DIP (Database of Interacting Proteins) en 2000 (*126*) remise à jour en 2004.(*127*) Depuis de nombreuses autres bases de données ont émergées telles que MINT (Molecular Interaction Database). Une autre méthode consiste à utiliser le criblage à haut débit pour des expériences *in vivo* ou *in vitro*.(*128*)

5. Biopile à biocatalyseurs optimisés – étude de la laccase

5.1. Principe

Parmi les différents axes du projet exposés dans cette thèse le développement d'électrodes pour biopiles s'inscrit dans l'air du temps. Les besoins énergétiques ne cessent de s'accroître et la baisse rapide de la disponibilité en ressources non renouvelables sensibilise au développement de moyens permettant de produire de l'énergie sans avoir à puiser dans ces ressources. Le grand défi de ce siècle est de trouver une alternative aux énergies fossiles, alternative qui devra être non polluante. La visée des biopiles à combustible est de produire de l'énergie électrique grâce à l'utilisation de molécules biologiques sans qu'une recharge extérieure en combustible soit nécessaire, et sans la nécessité de changer régulièrement les batteries. Une biopile ne fonctionne pas avec des solvants classiquement utilisés en industrie mais avec des enzymes issues de produits biologiques (voir figure 1.5.1). Il y a divers types de piles à combustible comme la pile à combustible à hydrogène qui fonctionne avec un couple dihydrogène/dioxygène. Cependant la production de dihydrogène nécessite l'utilisation d'énergies fossiles ou de processus chimiques très couteux. La pile à combustible au méthanol ne répond pas à nos critères car elle produit du dioxyde de carbone et du monoxyde de carbone. Le premier système a été découvert en 1964, près de 50 ans après, ces dispositifs ne sont pas encore au point pour généraliser leur utilisation.

Un critère primordial est la miniaturisation des biopiles. En effet, que ce soit en médecine ou en informatique, les appareils doivent être le plus petit, le plus léger et surtout le plus stable dans le temps sans perte d'efficacité comme par exemple les stimulateurs cardiaques. Un autre domaine d'application est l'industrie alimentaire et l'agriculture où l'utilisation de différents combustibles permettra de diminuer les déchets. Grâce à l'absence de membrane échangeuse de protons due à la forte sélectivité des enzymes pour leur substrat respectif, la réaction du combustible avec l'oxydant est évitée ce qui permet de diminuer la taille et le coût de la biopile.(*129, 130*)



Figure 1.5.1 : Représentation schématique d'une biopile enzymatique.(131)

De nombreux paramètres restent à améliorer, dans des conditions d'utilisation normal des piles et du rendement de transfert d'électrons aux électrodes, que ce soit au niveau de la quantité d'enzymes immobilisées par unité de surface, la stabilité des enzymes dans le temps. Les avancées récentes en nanotechnologie ont permis de redynamiser ce domaine, en effet les nanoparticules d'or et de carbone sont plus adaptées pour une immobilisation et présentent de nombreux avantages comme un bon rapport surface/volume, une bonne biocompatibilité et une conductivité élevée. Ces nanoparticules sont facilement modifiables et peuvent être adaptées spécifiquement à chaque protéine.

5.1.1. Avantages des biopiles à biocatalyseurs optimisés

Le plus gros avantage de ces biopiles vient de l'utilisation de la biocatalyse, cette biocatalyse a une efficacité catalytique très importante.(*132*) Elle nécessite des conditions d'utilisation extrêmement douces : pH neutres, température ambiante et milieux aqueux.(*133*) Elles peuvent enfin oxyder différents substrats présents dans la nature comme le glucose ou le fructose, (*134*), qui sont couramment utilisées, ce qui diminue les coûts de production.

5.1.2. Inconvénients des biopiles à biocatalyseurs optimisés

Malheureusement l'utilisation de ces biopiles présente encore de nombreux inconvénients. Le plus grand inconvénient est que les enzymes ont une activité catalytique diminuée lorsqu'elles sont immobilisées. Puis, un autre problème est la durée de vie de ces biopiles qui est déterminée par la durée de vie des enzymes utilisées. Cette durée de vie ne dépasse pas les quelques jours sur un support solide et quelques heures en solution.(*135*) La taille des enzymes pose également un problème majeur. En effet la densité volumique n'est pas suffisante et donc la concentration d'enzymes par site est insuffisante par rapport à une pile classique. Un autre problème est l'oxydation incomplète du combustible. La densité de puissance est plus faible que celle des piles conventionnelles à cause de la difficulté de communication entre l'enzyme et l'électrode. En conséquence, l'énergie générée est très faible de quelques μ W à 1 mW.cm⁻² comparée à celle d'une pile à combustible classique qui génère 10 à 400 mW.cm⁻². Cette énergie peut être augmentée en immobilisant plus d'enzymes aux électrodes et en optimisant l'efficacité du transfert d'électrons.

5.1.3. Conception d'électrodes

Une des avancées les plus significatives ces dernières années dans le domaine des biopiles est le développement des biocathodes et des bioanodes qui emploie le transfert d'électrons au lieu du transfert d'électrons indirect à l'aide de médiateurs. Des études sur la laccase (136, 137) et sur la bilirubine oxydase (138) ont permis le développement de biocathodes en utilisant le transfert d'électron direct. La glucose oxydase a permis de son côté le développement de bioanode avec le même résultat.(139)

La laccase de l'organisme *Bacillus subtilis* provient du laboratoire de Biologie Chimique dirigé par le Pr. Andrew Griffiths. Dr. Valérie Taly et Thomas Beneyton (U.M.R. 7006), qui ont préparé cette protéine et proposé la biopile décrite dans la figure 1.5.2. Cette biopile est composée dans sa partie anodique d'une alcool déshydrogénase (ADH) soluble ayant pour cofacteur la pyrroloqinoline quinone (PQQ). Cette enzyme peut extraire quatre électrons de son substrat. Pour le compartiment cathodique, ils ont utilisé une laccase bactérienne soluble issue d'un organisme extrêmophile qui présente donc une forte stabilité et une bonne efficacité catalytique.(*140*)



Figure 1.5.2 : Schéma de la biopile du projet du laboratoire du Pr. Andrew Griffiths et du Dr. Valérie Taly

Nos collaborateurs ont développé une méthode de sélections de variants optimisés de laccase et d'ADH qui combine la compartimentation *In Vitro* (IVC) (*141*) et la microfluidique digitale.(*142*) Ces gouttelettes formées par microfluidique permettent de réaliser des sélections dans toutes les conditions désirées ce qui permet de mimer les conditions réelles d'utilisation des variants dans les biopiles.

6. Fonctionnalisation de surface

La fonctionnalisation de surfaces est un domaine en pleine expansion, en effet elles confèrent à ces surfaces de nouvelles propriétés. De plus une large palette de fonctionnalisations est disponible et ne cesse de croître de jour en jour. La définition de la fonctionnalisation est le fait de changer les caractéristiques de surface d'une partie d'un dispositif pour modifier sa fonctionnalité et ainsi aboutir à des effets précis et souhaités. Les matériaux utilisés sont variés comme les nanotubes de carbone, les nanofils, les nanoparticules métalliques et semiconductrices.

6.1. Immobilisation de protéines

Tout d'abord les différents types d'immobilisation sont passés en revue, puis le cas des nanoparticules d'or utilisées comme médiateurs est mise en avant.

6.1.1. Mécanisme de transfert d'électrons

Le contact électrique entre le centre actif de la protéine et l'électrode joue un rôle central dans le design d'électrode enzymatique. Deux types de mécanisme de transfert d'électrons sont distingués. Dans tous les cas le transfert d'électrons doit se faire de manière la plus efficace possible.

6.1.1.1. Transfert d'électrons direct

Ce transfert d'électron direct doit se faire sans l'intervention de médiateurs entre le centre actif de la protéine et l'électrode mais très peu d'exemples utilisant ce type de transfert sont connus. Un médiateur est une espèce redox réversible électrochimiquement dite électroactive qui participe au transfert d'électrons. Dans ce cas, c'est donc la protéine qui joue le rôle d'électrocatalyseur et favorise le transfert qui se fait grâce à un effet tunnel (voir figure 1.6.1). Bien entendu, ce transfert dépend de la localisation du centre actif de la protéine qui doit être orientée de façon optimale et proche de l'électrode, ainsi la distance de transfert est optimale pour ce type de transfert.(*133*)



Figure 1.6.1 : Mécanisme de transfert d'électrons : (a) transfert d'électrons direct (effet tunnel) de la surface de l'électrode jusqu'au site actif de la protéine ; (b) Transfert d'électrons via des médiateurs redox.(*143*)

6.1.1.2. Transfert d'électrons à l'aide de médiateurs

En général, le site actif de la protéine est enfoui très profondément au sein du squelette protéique rendant le transfert d'électron difficile dû à la vitesse de transfert qui diminue de manière exponentielle avec la distance. Un lien entre le centre actif et l'électrode est créé et permet ainsi le transfert d'électrons. Des médiateurs qui doivent remplir un certain nombre de conditions sont utilisés. Tout d'abord ils doivent être stables dans les conditions de travail sans participer à la réaction et sans réagir avec l'oxygène. Ensuite, leur réaction doit être rapide et réversible d'un point de vue cinétique ou thermodynamique. Enfin, le potentiel redox de la protéine étudiée est déterminée par le potentiel d'oxydation du médiateur.(*144*)

Enfin, le médiateur a généralement une concentration très inférieure à celle de la protéine étudiée. Les médiateurs les plus communément utilisés sont soit immobilisés sur l'électrode, soit dissouts dans le tampon. Cependant, la stabilité et leur facilité de diffusion loin de la surface limitent la durée des systèmes.

6.1.2. Différents types d'immobilisation

L'immobilisation permet d'orienter de façon spécifique la protéine souhaitée, en tenant compte de la nature de la surface, de la stabilité et des propriétés des protéines (voir figure 1.6.2). Les propriétés électrochimiques et optiques des protéines redox sont utilisées dans les différents cas listés ci-dessous.(*145*)





De nombreuses études ont été menées par le passé en utilisant différentes méthodes telles que le greffage de relais redox sur la protéine, l'immobilisation d'enzymes sur des polymères électroactifs ou encore l'introduction des médiateurs faisant office de relais d'électrons ; (147) le contact électrique obtenu par le biais de ces méthodes est relativement inefficace soit parce que la modification de la protéine n'est pas optimale, soit parce que l'immobilisation de l'enzyme engendre une orientation qui n'est pas favorable à un transfert d'électron entre le centre actif de la protéine et l'électrode.

Concernant l'attachement directement sur la surface de la protéine, il est soumis à plusieurs contraintes dont la plus importante est que la protéine ne se dégrade pas après son immobilisation. L'interaction entre la protéine et la surface peut être de type hydrophobe ou électrostatique qui dépend du pH et de la force ionique.(*135*) L'attachement orienté sur une monocouche auto assemblée se rapproche le plus de la technique voulue et reste celle la plus

couramment utilisée.(*148, 149*) On peut citer l'exemple de la laccase de *T.versicolor* qui a été récemment immobilisée sur une électrode de carbone vitreux.(*150*) Le principe est de mettre un modifiant sur une surface noble pour orienter de façon spécifique la protéine.

6.1.3. Utilisation des nanoparticules d'or comme médiateur

Une approche en utilisant les nanoparticules d'or comme médiateur est adoptée.(151) C'est une des procédures les plus prometteuses. En effet ces nanoparticules agissent comme un relais dans un transfert d'électron à longue distance. De nombreux exemples sont décrits dans la littérature avec diverses protéines comme la glucose oxydase, (152) la galactose oxydase, (153) la laccase (154) ou encore le cytochrome c.(155) Pour ces immobilisations, une monocouche de nanoparticules d'or a été déposée avec un taux de transfert tout à fait acceptable. La méthode utilisée a été décrite dans la publication de Murata et al.(156) qui utilise un réseau 3D de nanoparticule d'or sur une électrode. Ces nanoparticules présentent divers avantages comme une bonne biocompatibilité ce qui est primordial dans la mise en place de dispositifs électrochimiques car la durée de vie des protéines immobilisées augmente. La surface spécifique de ce réseau est exceptionnellement élevée ce qui augmente la sensibilité de la mesure et donc permet d'avoir une vitesse de transfert d'électrons et une vitesse de réaction élevée. De façon plus générale, il est possible de contrôler la taille des nanoparticules en fonction de la méthode de synthèse utilisée pour trouver la distance optimale entre la nanoparticule et le centre actif. La formation de couches est donc contrôlable. La variation de la taille du modifiant permet de changer sa flexibilité et la variation de la charge du modifiant est un critère intéressant dans la mesure où les charges de surface de la protéine ne sont pas forcément connues. Tous ces critères sont importants car ils influencent, de façon décisive, sur la conformation de la protéine adsorbée et sur son activité redox.(157, 158) Dans la publication de Murata et al(156), le cytochrome c est adsorbé à l'aide d'une interaction électrostatique entre les résidus Lysine de surface de la protéine et les alcanes thiols de l'acide carboxylique.

7. But de la thèse

La recherche présentée dans cette thèse est centrée sur l'étude et la caractérisation de protéines issues de la chaîne respiratoire de l'organisme *T.thermophilus* étudiée par spectroscopie infrarouge et électrochimie grâce à la biofonctionnalisation de différentes surfaces. Notre but est de trouver et de caractériser des systèmes catalytiques ayant une application potentielle pour une future biopile.

• Etude de la cytochrome c oxydase de type ba_3

La cytochrome c oxydase de type ba_3 est la plus petite des cytochrome c oxydase connue. Elle est responsable de la réduction de l'oxygène moléculaire en eau.

Cette protéine membranaire présente une dépendance pH de son potentiel de demi-vague très particulière. En effet, elle possède deux types d'hèmes différents qui ont des propriétés spectrales très différentes et qui ont chacun leur propre dépendance. Ainsi, grâce à notre technique de spectroscopie infrarouge couplée à l'électrochimie, la possibilité de comprendre et de mettre en avant les raisons de cette dépendance est possible. Des conséquences sur la conformation, sur les chaînes latérales d'acides aminés et sur la redistribution des charges dans les sites des cofacteurs sont attendues.

• Interaction protéine-protéine

L'interaction protéine-protéine est un phénomène très complexe encore peu compris de nos jours. Il met en jeu plusieurs interactions qui influencent de façon notable sur le complexe formé et sur ses caractéristiques spectroscopiques.

Deux protéines solubles le cytochrome c_1 et le cytochrome c_{552} de *T. thermophilus* sont étudiées. Leur interaction est caractérisée par une technique de spectroscopie infrarouge et d'UV/Visible couplée à l'électrochimie qui permet de mieux comprendre l'impact sur la réorganisation des hèmes, du squelette peptidique et des chaînes latérales d'acides aminés. Deux autres complexes différents sont aussi formés dans le but de prouver que l'interaction entre le cytochrome c_1 et c_{552} est bien réelle. Pour cela, le cytochrome c du cœur de cheval est utilisé pour montrer qu'une interaction n'est pas toujours possible.

• Utilisation de nanoparticules

Les protéines de la chaîne respiratoire caractérisées précédemment sont donc utilisées ici pour mieux comprendre le mécanisme des protéines et mettre en avant leur éventuelle efficacité catalytique dans une future biopile. Les biopiles représentent une alternative aux énergies fossiles. L'étude d'une glycoprotéine, la laccase de *Bacillus subtilis*, permet de mettre en place une technique d'immobilisation grâce à des nanoparticules d'or. Le but est de trouver une méthode d'immobilisation qui présente une stabilité et une cinétique de transfert électronique efficace.

8. Références

- 1. Knowles, J. C. (1981) *Diversity of Bacterial Respiratory Systems*, Vol. 1, CRC Press.
- 2. Woese, C. R., Kandler, O., and Wheelis, M. L. (1990) Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya, *Proceedings of the National Academy of Sciences 87*, 4576-4579.
- 3. Pereira, M. M., Santana, M., and Teixeira, M. (2001) A novel scenario for the evolution of haem-copper oxygen reductases, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Bioenergetics 1505*, 185-208.
- 4. Ludwig, B. (1987) Cytochrome c oxidase in prokaryotes, *FEMS Microbiology Letters* 46, 41-56.
- 5. Anraku, Y., and Gennis, R. B. (1987) The aerobic respiratory chain of Escherichia coli, *Trends in Biochemical Sciences* 12, 262-266.
- 6. Janzon, J., Ludwig, B., and Malatesta, F. (2007) Electron transfer kinetics of soluble fragments indicate a direct interaction between complex III and the caa3 oxidase in Thermus thermophilus, *IUBMB Life 59*, 563-569.
- 7. Hedderich, R., Klimmek, O., Kröger, A., Dirmeier, R., Keller, M., and Stetter, K. O. (1998) Anaerobic respiration with elemental sulfur and with disulfides, *FEMS microbiology reviews* 22, 353-381.
- 8. Chance, B., and Williams, G. R. (2006) The Respiratory Chain and Oxidative Phosphorylation, In *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*, pp 65-134, John Wiley & Sons, Inc.
- 9. Dudkina, N. V., Kouril, R., Peters, K., Braun, H. P., and Boekema, E. J. (2010) Structure and function of mitochondrial supercomplexes, *Biochim Biophys Acta* 1797, 664-670.
- 10. Schagger, H. (2002) Respiratory chain supercomplexes of mitochondria and bacteria, *Biochim Biophys Acta* 1555, 154-159.
- 11. El Khoury, Y. (2010) Thèse de l'Université de Strasbourg
- Mid and far infrared spectroelectrochemical studies on the metal–ligand interactions in respiratory chain enzymes In *Chemistry*, p 224, Strasbourg.
- 12. Mitchell, P. (1961) Coupling of Phosphorylation to Electron and Hydrogen Transfer by a Chemi-Osmotic type of Mechanism, *Nature 191*, 144-148.
- 13. Efremov, R. G., Baradaran, R., and Sazanov, L. A. (2010) The architecture of respiratory complex I, *Nature 465*, 441-445.
- 14. Ruprecht, J., Yankovskaya, V., Maklashina, E., Iwata, S., and Cecchini, G. (2009) Structure of Escherichia coli Succinate:Quinone Oxidoreductase with an Occupied and Empty Quinonebinding Site, *Journal of Biological Chemistry 284*, 29836-29846.
- 15. Lancaster, C. R. D., Kröger, A., Auer, M., and Michel, H. (1999) Structure of fumarate reductase from Wolinella succinogenes at 2.2[thinsp][angst] resolution, *Nature 402*, 377-385.
- 16. Xia, D., Yu, C.-A., Kim, H., Xia, J.-Z., Kachurin, A. M., Zhang, L., Yu, L., and Deisenhofer, J. (1997) Crystal Structure of the Cytochrome bc1 Complex from Bovine Heart Mitochondria, *Science 277*, 60-66.
- 17. Lange, C., and Hunte, C. (2002) Crystal structure of the yeast cytochrome bc1 complex with its bound substrate cytochrome c, *Proc Natl Acad Sci U S A 99*, 2800-2805.
- 18. Crofts, A. R., and Berry, E. A. (1998) Structure and function of the cytochrome bc1 complex of mitochondria and photosynthetic bacteria, *Curr Opin Struct Biol 8*, 501-509.
- 19. Berry, E. A., Huang, L. S., Saechao, L. K., Pon, N. G., Valkova-Valchanova, M., and Daldal, F. (2004) X-Ray Structure of Rhodobacter Capsulatus Cytochrome bc (1): Comparison with its Mitochondrial and Chloroplast Counterparts, *Photosynth Res 81*, 251-275.
- 20. Yakushiji, E., and Okunuki, K. (1940) Über eine neue Cytochromkomponente und ihre Funktion, *Proceedings of the Imperial Academy (Japon)* 16, 4.
- 21. Keilin, D., and Hartree, E. F. (1949) Activity of the succinic dehydrogenase-cytochrome system in different tissue preparations, *Biochem J* 44, 205-218.

- 22. Van Beeumen, J. (1991) Primary structure diversity of prokaryotic diheme cytochromes c, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics 1058*, 56-60.
- 23. Moore, G. R. (1991) Bacterial 4-[alpha]-helical bundle cytochromes, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Bioenergetics 1058*, 38-41.
- 24. Ambler, R. P. (1991) Sequence variability in bacterial cytochromes c, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Bioenergetics 1058*, 42-47.
- 25. Cooley, J. W., Lee, D.-W., and Daldal, F. (2009) Across Membrane Communication between the Qo and Qi Active Sites of Cytochrome bc1, *Biochemistry 48*, 1888-1899.
- 26. Mitchell, P. (1975) Protonmotive redox mechanism of the cytochrome b-c1 complex in the respiratory chain: protonmotive ubiquinone cycle, *FEBS Lett 56*, 1-6.
- 27. Mitchell, P. (1975) The protonmotive Q cycle: a general formulation, *FEBS Lett 59*, 137-139.
- 28. Crofts, A. R. (2004) The Q-cycle A Personal Perspective, *Photosynth Res 80*, 223-243.
- 29. Crofts, A. R., Meinhardt, S. W., Jones, K. R., and Snozzi, M. (1983) The Role of the Quinone Pool in the Cyclic Electron-Transfer Chain of Rhodopseudomonas Sphaeroides: A Modified Q-Cycle Mechanism, *Biochim Biophys Acta 723*, 202-218.
- 30. Trumpower, B. L. (1990) The protonmotive Q cycle. Energy transduction by coupling of proton translocation to electron transfer by the cytochrome bc1 complex, *J Biol Chem 265*, 11409-11412.
- 31. Fee, J. A., Choc, M. G., Findling, K. L., Lorence, R., and Yoshida, T. (1980) Properties of a copper-containing cytochrome c1aa3 complex: a terminal oxidase of the extreme thermophile Thermus thermophilus HB8, *Proc Natl Acad Sci U S A 77*, 147-151.
- 32. Soulimane, T., Gohlke, U., Huber, R., and Buse, G. (1995) Three-dimensional crystals of cytochrome-c oxidase from Thermus thermophilus diffracting to 3.8 A resolution, *FEBS Lett* 368, 132-134.
- 33. Iwata, S., Ostermeier, C., Ludwig, B., and Michel, H. (1995) Structure at 2.8 A resolution of cytochrome c oxidase from Paracoccus denitrificans, *Nature 376*, 660-669.
- 34. Tsukihara, T., Aoyama, H., Yamashita, E., Tomizaki, T., Yamaguchi, H., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R., and Yoshikawa, S. (1996) The Whole Structure of the 13-Subunit Oxidized Cytochrome c Oxidase at 2.8 Å, *Science 272*, 1136-1144.
- 35. Tsukihara, T., Aoyama, H., Yamashita, E., Tomizaki, T., Yamaguchi, H., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R., and Yoshikawa, S. (1995) Structures of metal sites of oxidized bovine heart cytochrome c oxidase at 2.8 A, *Science 269*, 1069-1074.
- Keightley, J. A., Zimmermann, B. H., Mather, M. W., Springer, P., Pastuszyn, A., Lawrence, D. M., and Fee, J. A. (1995) Molecular genetic and protein chemical characterization of the cytochrome ba3 from Thermus thermophilus HB8, *J Biol Chem* 270, 20345-20358.
- 37. Oshima, T., and Imahori, K. (1974) Description of Thermus thermophilus (Yoshida and Oshima) comb. nov., a Nonsporulating Thermophilic Bacterium from a Japanese Thermal Spa, *Int J Syst Bacteriol 24*, 102-112.
- 38. Oshima, T. (1974) [Comparative studies on biochemical properties of an extreme thermophile, Thermus thermophilus HB 8 (author's transl)], *Seikagaku 46*, 887-907.
- Henne, A., Bruggemann, H., Raasch, C., Wiezer, A., Hartsch, T., Liesegang, H., Johann, A., Lienard, T., Gohl, O., Martinez-Arias, R., Jacobi, C., Starkuviene, V., Schlenczeck, S., Dencker, S., Huber, R., Klenk, H.-P., Kramer, W., Merkl, R., Gottschalk, G., and Fritz, H.-J. (2004) The genome sequence of the extreme thermophile Thermus thermophilus, *Nat Biotech* 22, 547-553.
- 40. Soulimane, T., Buse, G., Bourenkov, G. P., Bartunik, H. D., Huber, R., and Than, M. E. (2000) Structure and mechanism of the aberrant ba₃-cytochrome *c* oxidase from thermus thermophilus, *EMBO J 19*, 1766-1776.
- 41. Sazanov, L. A., and Hinchliffe, P. (2006) Structure of the hydrophilic domain of respiratory complex I from Thermus thermophilus, *Science 311*, 1430-1436.
- 42. Kagawa, Y., Sone, N., Hirata, H., and Yoshida, M. (1979) Reconstitution of ATPase and carriers from thermophilic biomembranes, *Trends in Biochemical Sciences* 4, 31-33.

- 43. Richter, O.-M. H., and Ludwig, B. (2009) Electron transfer and energy transduction in the terminal part of the respiratory chain -- Lessons from bacterial model systems, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Bioenergetics 1787*, 626-634.
- 44. Soulimane, T., von Walter, M., Hof, P., Than, M. E., Huber, R., and Buse, G. (1997) Cytochrome-c552 from Thermus thermophilus: a functional and crystallographic investigation, *Biochem Biophys Res Commun 237*, 572-576.
- 45. Mooser, D., Maneg, O., Corvey, C., Steiner, T., Malatesta, F., Karas, M., Soulimane, T., and Ludwig, B. (2005) A four-subunit cytochrome bc(1) complex complements the respiratory chain of Thermus thermophilus, *Biochim Biophys Acta 1708*, 262-274.
- 46. Fee, J. A., Findling, K. L., Yoshida, T., Hille, R., Tarr, G. E., Hearshen, D. O., Dunham, W. R., Day, E. P., Kent, T. A., and Munck, E. (1984) Purification and characterization of the Rieske ironsulfur protein from Thermus thermophilus. Evidence for a [2Fe-2S] cluster having noncysteine ligands, *J Biol Chem* 259, 124-133.
- 47. Mooser, D., Maneg, O., MacMillan, F., Malatesta, F., Soulimane, T., and Ludwig, B. (2006) The menaquinol-oxidizing cytochrome bc complex from Thermus thermophilus: protein domains and subunits, *Biochim Biophys Acta* 1757, 1084-1095.
- 48. Janzon, J., Eichhorn, A. C., Ludwig, B., and Malatesta, F. (2008) Electron transfer kinetics between soluble modules of Paracoccus denitrificans cytochrome c1 and its physiological redox partners, *Biochim Biophys Acta* 1777, 250-259.
- 49. Iwata, S., Lee, J. W., Okada, K., Lee, J. K., Iwata, M., Rasmussen, B., Link, T. A., Ramaswamy, S., and Jap, B. K. (1998) Complete structure of the 11-subunit bovine mitochondrial cytochrome bc1 complex, *Science 281*, 64-71.
- 50. Titani, K., Ericsson, L. H., Hon-nami, K., and Miyazawa, T. (1985) Amino acid sequence of cytochrome c-552 from Thermus thermophilus HB8, *Biochem Biophys Res Commun 128*, 781-787.
- 51. Nojima, H., Hon-Nami, K., Oshima, T., and Noda, H. (1978) Reversible thermal unfolding of thermostable cytochrome c-552, *J Mol Biol 122*, 33-42.
- 52. Hon-Nami, K., Kihara, H., Kitagawa, T., Miyazawa, T., and Oshima, T. (1980) Proton nuclearmagnetic-resonance and resonance Raman studies of thermophilic cytochrome c-552 from Thermus thermophilus HB8, *Eur J Biochem 110*, 217-223.
- 53. Than, M. E., Hof, P., Huber, R., Bourenkov, G. P., Bartunik, H. D., Buse, G., and Soulimane, T. (1997) Thermus thermophilus cytochrome-c552: A new highly thermostable cytochrome-c structure obtained by MAD phasing, *J Mol Biol 271*, 629-644.
- 54. Fee, J. A., Chen, Y., Todaro, T. R., Bren, K. L., Patel, K. M., Hill, M. G., Gomez-Moran, E., Loehr, T. M., Ai, J., Thony-Meyer, L., Williams, P. A., Stura, E., Sridhar, V., and McRee, D. E. (2000) Integrity of thermus thermophilus cytochrome c552 synthesized by Escherichia coli cells expressing the host-specific cytochrome c maturation genes, ccmABCDEFGH: biochemical, spectral, and structural characterization of the recombinant protein, *Protein Sci 9*, 2074-2084.
- 55. Drosou, V., Reincke, B., Schneider, M., and Ludwig, B. (2002) Specificity of the interaction between the Paracoccus denitrificans oxidase and its substrate cytochrome c: comparing the mitochondrial to the homologous bacterial cytochrome c(552), and its truncated and site-directed mutants, *Biochemistry* 41, 10629-10634.
- 56. Hon-Nami, K., and Oshima, T. (1977) Purification and some properties of cytochrome c-552 from an extreme thermophile, Thermus thermophilus HB8, *J Biochem 82*, 769-776.
- 57. Nakajima, H., Ichikawa, Y., Satake, Y., Takatani, N., Manna, S. K., Rajbongshi, J., Mazumdar, S., and Watanabe, Y. (2008) Engineering of Thermus thermophilus cytochrome c552: thermally tolerant artificial peroxidase, *Chembiochem 9*, 2954-2957.
- 58. Muresanu, L., Pristovsek, P., Lohr, F., Maneg, O., Mukrasch, M. D., Ruterjans, H., Ludwig, B., and Lucke, C. (2006) The electron transfer complex between cytochrome c552 and the CuA domain of the Thermus thermophilus ba3 oxidase. A combined NMR and computational approach, *J Biol Chem 281*, 14503-14513.

- 59. Keightley, J. A., Mather, M. W., Springer, P., and Fee, J. A. (1992) Molecular genetic studies of cytochrome ba3 from Thermus thermophilus (Tt): evidence for a multisubunit structure and homology with cytochrome caa3, *Faseb J 6*, 1114.
- 60. Castresana, J., Lubben, M., Saraste, M., and Higgins, D. G. (1994) Evolution of cytochrome oxidase, an enzyme older than atmospheric oxygen, *The EMBO journal 13*, 2516-2525.
- 61. Schafer, G., Purschke, W., and Schmidt, C. L. (1996) On the origin of respiration: electron transport proteins from archaea to man, *FEMS microbiology reviews 18*, 173-188.
- 62. Hunsicker-Wang, L. M., Pacoma, R. L., Chen, Y., Fee, J. A., and Stout, C. D. (2005) A novel cryoprotection scheme for enhancing the diffraction of crystals of recombinant cytochrome ba3 oxidase from Thermus thermophilus, *Acta Crystallographica Section D* 61, 340-343.
- 63. Tiefenbrunn, T., Liu, W., Chen, Y., Katritch, V., Stout, C. D., Fee, J. A., and Cherezov, V. (2011) High Resolution Structure of the ba3 Cytochrome c Oxidase from Thermus thermophilus in a Lipidic Environment, *PLoS One 6*, e22348.
- 64. Williams, P. A., Blackburn, N. J., Sanders, D., Bellamy, H., Stura, E. A., Fee, J. A., and McRee, D. E. (1999) The CuA domain of Thermus thermophilus ba3-type cytochrome c oxidase at 1.6 A resolution, *Nat Struct Biol* 6, 509-516.
- 65. Than, M. E., and Soulimane, T. (2006) *ba3-Cytochrome c Oxidase From Thermus Thermophilus*, John Wiley & Sons, Ltd.
- 66. Zimmermann, B. H., Nitsche, C. I., Fee, J. A., Rusnak, F., and Munck, E. (1988) Properties of a copper-containing cytochrome ba3: a second terminal oxidase from the extreme thermophile Thermus thermophilus, *Proc Natl Acad Sci U S A 85*, 5779-5783.
- 67. Farver, O., Wherland, S., Antholine, W. E., Gemmen, G. J., Chen, Y., Pecht, I., and Fee, J. A. (2010) Pulse Radiolysis Studies of Temperature Dependent Electron Transfers among Redox Centers in ba3-Cytochrome c Oxidase from Thermus thermophilus: Comparison of A- and B-Type Enzymes, *Biochemistry*, null-null.
- 68. Hellwig, P., Soulimane, T., Buse, G., and Mantele, W. (1999) Electrochemical, FTIR, and UV/VIS spectroscopic properties of the ba(3) oxidase from Thermus thermophilus, *Biochemistry 38*, 9648-9658.
- 69. Wolpert, M., Maneg, O., Ludwig, B., and Hellwig, P. (2004) Characterization of the CuA center in the cytochrome c oxidase from Thermus thermophilus for the spectral range 1800-500 cm-1 with a combined electrochemical and Fourier transform infrared spectroscopic setup, *Biopolymers 74*, 73-76.
- 70. Fee, J. A., Case, D. A., and Noodleman, L. (2008) Toward a chemical mechanism of proton pumping by the B-type cytochrome c oxidases: application of density functional theory to cytochrome ba3 of Thermus thermophilus, *J Am Chem Soc 130*, 15002-15021.
- Sousa, F. L., Verissimo, A. F., Baptista, A. M., Soulimane, T., Teixeira, M., and Pereira, M. M. (2008) Redox properties of Thermus thermophilus ba3: different electron-proton coupling in oxygen reductases?, *Biophys J 94*, 2434-2441.
- 72. Papa, S. (2005) Role of cooperative H(+)/e(-) linkage (redox bohr effect) at heme a/Cu(A) and heme a(3)/Cu(B) in the proton pump of cytochrome c oxidase, *Biochemistry (Mosc) 70*, 178-186.
- 73. Giuffre, A., Forte, E., Antonini, G., D'Itri, E., Brunori, M., Soulimane, T., and Buse, G. (1999) Kinetic properties of ba3 oxidase from Thermus thermophilus: effect of temperature, *Biochemistry 38*, 1057-1065.
- 74. Luna, V. M., Chen, Y., Fee, J. A., and Stout, C. D. (2008) Crystallographic studies of Xe and Kr binding within the large internal cavity of cytochrome ba3 from Thermus thermophilus: structural analysis and role of oxygen transport channels in the heme-Cu oxidases, *Biochemistry* 47, 4657-4665.
- 75. Harrenga, A., and Michel, H. (1999) The Cytochrome c Oxidase from Paracoccus denitrificans Does Not Change the Metal Center Ligation upon Reduction, *Journal of Biological Chemistry* 274, 33296-33299.

- 76. Liu, B., Chen, Y., Doukov, T., Soltis, S. M., Stout, C. D., and Fee, J. A. (2009) Combined microspectrophotometric and crystallographic examination of chemically reduced and X-ray radiation-reduced forms of cytochrome ba3 oxidase from Thermus thermophilus: structure of the reduced form of the enzyme, *Biochemistry 48*, 820-826.
- 77. Kalinovich, A. V., Azarkina, N. V., Vygodina, T. V., Soulimane, T., and Konstantinov, A. A. (2010) Peculiarities of cyanide binding to the ba3-type cytochrome oxidase from the thermophilic bacterium Thermus thermophilus, *Biochemistry (Mosc)* 75, 342-352.
- 78. Koutsoupakis, C., Soulimane, T., and Varotsis, C. (2004) Probing the Q-Proton Pathway of ba3-Cytochrome c Oxidase by Time-Resolved Fourier Transform Infrared Spectroscopy, *Biophysical journal 86*, 2438-2444.
- 79. Chang, H. Y., Hemp, J., Chen, Y., Fee, J. A., and Gennis, R. B. (2009) The cytochrome ba3 oxygen reductase from Thermus thermophilus uses a single input channel for proton delivery to the active site and for proton pumping, *Proc Natl Acad Sci U S A 106*, 16169-16173.
- 80. Smirnova, I., Reimann, J., von Ballmoos, C., Chang, H. Y., Gennis, R. B., Fee, J. A., Brzezinski, P., and Adelroth, P. (2010) Functional role of Thr-312 and Thr-315 in the proton-transfer pathway in ba₃ Cytochrome c oxidase from Thermus thermophilus, *Biochemistry 49*, 7033-7039.
- 81. Kannt, A., Soulimane, T., Buse, G., Becker, A., Bamberg, E., and Michel, H. (1998) Electrical current generation and proton pumping catalyzed by the ba₃-type cytochrome c oxidase from Thermus thermophilus, *FEBS Lett 434*, 17-22.
- 82. von Ballmoos, C., Gennis, R. B., Ädelroth, P., and Brzezinski, P. (2011) Kinetic design of the respiratory oxidases, *Proceedings of the National Academy of Sciences*.
- 83. Smirnova, I. A., Zaslavsky, D., Fee, J. A., Gennis, R. B., and Brzezinski, P. (2008) Electron and proton transfer in the ba₃ oxidase from Thermus thermophilus, *J Bioenerg Biomembr 40*, 281-287.
- 84. Siletsky, S. A., and Konstantinov, A. A. (2011) Cytochrome c oxidase: Charge translocation coupled to single-electron partial steps of the catalytic cycle, *Biochimica et Biophysica Acta* (*BBA*) *Bioenergetics*.
- 85. Verkhovsky, M. I., Morgan, J. E., and Wikstroem, M. (1994) Oxygen Binding and Activation: Early Steps in the Reaction of Oxygen with Cytochrome c Oxidase, *Biochemistry 33*, 3079-3086.
- 86. Oliveberg, M., Brezezinski, P., and Malmström, B. G. (1989) The effect of pH and temperature on the reaction of fully reduced and mixed-valence cytochrome c oxidase with dioxygen, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Bioenergetics 977*, 322-328.
- 87. Morgan, J. E., Verkhovsky, M. I., Palmer, G., and Wikström, M. (2001) Role of the PR Intermediate in the Reaction of Cytochrome c Oxidase with O₂, *Biochemistry 40*, 6882-6892.
- 88. Hullo, M.-F., Moszer, I., Danchin, A., and Martin-Verstraete, I. (2001) CotA of Bacillus subtilis Is a Copper-Dependent Laccase, *J. Bacteriol.* 183, 5426-5430.
- 89. McMillin, D. R., and Eggleston, M. K. (1997) *Multi-Copper Oxidases*, Vol. 5, Singapore.
- 90. Soukharev, V., Mano, N., and Heller, A. (2004) A four-electron O(2)-electroreduction biocatalyst superior to platinum and a biofuel cell operating at 0.88 V, *J Am Chem Soc 126*, 8368-8369.
- 91. Yuhashi, N., Tomiyama, M., Okuda, J., Igarashi, S., Ikebukuro, K., and Sode, K. (2005) Development of a novel glucose enzyme fuel cell system employing protein engineered PQQ glucose dehydrogenase, *Biosens Bioelectron 20*, 2145-2150.
- 92. Zhu, Z., Momeu, C., Zakhartsev, M., and Schwaneberg, U. (2006) Making glucose oxidase fit for biofuel cell applications by directed protein evolution, *Biosens Bioelectron 21*, 2046-2051.
- 93. Martins, L. O., Soares, C. M., Pereira, M. M., Teixeira, M., Costa, T., Jones, G. H., and Henriques, A. O. (2002) Molecular and biochemical characterization of a highly stable bacterial laccase that occurs as a structural component of the Bacillus subtilis endospore coat, *J Biol Chem* 277, 18849-18859.

- 94. Enguita, F. J., Martins, L. O., Henriques, A. O., and Carrondo, M. A. (2003) Crystal structure of a bacterial endospore coat component. A laccase with enhanced thermostability properties, *J Biol Chem 278*, 19416-19425.
- 95. Enguita, F. J., Marcal, D., Martins, L. O., Grenha, R., Henriques, A. O., Lindley, P. F., and Carrondo, M. A. (2004) Substrate and dioxygen binding to the endospore coat laccase from Bacillus subtilis, *J Biol Chem 279*, 23472-23476.
- 96. Bento, I., Martins, L. O., Gato Lopes, G., Armenia Carrondo, M., and Lindley, P. F. (2005) Dioxygen reduction by multi-copper oxidases; a structural perspective, *Dalton Trans*, 3507-3513.
- 97. Hilden, L., Johansson, G., Pettersson, G., Li, J., Ljungquist, P., and Henriksson, G. (2000) Do the extracellular enzymes cellobiose dehydrogenase and manganese peroxidase form a pathway in lignin biodegradation?, *FEBS Lett 477*, 79-83.
- 98. Fabbrini, M., Galli, C., and Gentili, P. (2002) Comparing the catalytic efficiency of some mediators of laccase, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 16*, 231-240.
- 99. Fabbrini, M., Galli, C., and Gentili, P. (2002) Radical or electron-transfer mechanism of oxidation with some laccase/mediator systems, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 18*, 169-171.
- 100. Gavin, A. C., Aloy, P., Grandi, P., Krause, R., Boesche, M., Marzioch, M., Rau, C., Jensen, L. J., Bastuck, S., Dumpelfeld, B., Edelmann, A., Heurtier, M. A., Hoffman, V., Hoefert, C., Klein, K., Hudak, M., Michon, A. M., Schelder, M., Schirle, M., Remor, M., Rudi, T., Hooper, S., Bauer, A., Bouwmeester, T., Casari, G., Drewes, G., Neubauer, G., Rick, J. M., Kuster, B., Bork, P., Russell, R. B., and Superti-Furga, G. (2006) Proteome survey reveals modularity of the yeast cell machinery, *Nature 440*, 631-636.
- 101. Trumpower, B. L., and Gennis, R. B. (1994) Energy transduction by cytochrome complexes in mitochondrial and bacterial respiration: the enzymology of coupling electron transfer reactions to transmembrane proton translocation, *Annu Rev Biochem 63*, 675-716.
- 102. Golemis, E. (2002) *Protein-protein interactions : A molecular cloning manual*, Cold Spring Harbor, New York.
- 103. Israelachvili, J. N. (1991) Intermolecular and Surface Forces, 2nd edition, Academic Press, San Diego.
- 104. Warshel, A., and Russell, S. T. (1984) Calculations of electrostatic interactions in biological systems and in solutions, *Quarterly Reviews of Biophysics* 17, 283-422.
- 105. Perutz, M. (1978) Electrostatic effects in proteins, *Science 201*, 1187-1191.
- 106. Honig, B. H., Hubbell, W. L., and Flewelling, R. F. (1986) Electrostatic Interactions in Membranes and Proteins, *Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry* 15, 163-193.
- 107. Sheinerman, F. B., Norel, R., and Honig, B. (2000) Electrostatic aspects of protein-protein interactions, *Current Opinion in Structural Biology 10*, 153-159.
- 108. Smith, H. T., Ahmed, A. J., and Millett, F. (1981) Electrostatic interaction of cytochrome c with cytochrome c1 and cytochrome oxidase, *J Biol Chem* 256, 4984-4990.
- 109. Bhushan, B. (1995) Handbook of Micro/Nanotribology, CRC Press, New York.
- 110. Honig, B. H., and Hubbell, W. L. (1984) Stability of "salt bridges" in membrane proteins, *Proceedings of the National Academy of Sciences 81*, 5412-5416.
- 111. Hendsch, Z. S., and Tidor, B. (1994) Do salt bridges stabilize proteins? A continuum electrostatic analysis, *Protein Science 3*, 211-226.
- 112. Chothia, C., and Janin, J. (1975) Principles of protein-protein recognition, *Nature 256*, 705-708.
- 113. Israelachvili, J., and Wennerstrom, H. (1996) Role of hydration and water structure in biological and colloidal interactions, *Nature 379*, 219-225.
- 114. Israelachvili, J. N., and Wennerstrom, H. (1997) Hydration in electrical double layers, *Nature 385*, 690-690.

- 115. Johnsson, N., and Varshavsky, A. (1994) Split ubiquitin as a sensor of protein interactions in vivo, *Proc Natl Acad Sci U S A 91*, 10340-10344.
- 116. Stryer, L. (1978) Fluorescence energy transfer as a spectroscopic ruler, *Annu Rev Biochem* 47, 819-846.
- 117. Zhao, Y., Muir, T. W., Kent, S. B., Tischer, E., Scardina, J. M., and Chait, B. T. (1996) Mapping protein-protein interactions by affinity-directed mass spectrometry, *Proc Natl Acad Sci U S A 93*, 4020-4024.
- 118. Pelletier, H., and Kraut, J. (1992) Crystal structure of a complex between electron transfer partners, cytochrome c peroxidase and cytochrome c, *Science 258*, 1748-1755.
- 119. Rigaut, G., Shevchenko, A., Rutz, B., Wilm, M., Mann, M., and Seraphin, B. (1999) A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration, *Nat Biotechnol 17*, 1030-1032.
- 120. Puig, O., Caspary, F., Rigaut, G., Rutz, B., Bouveret, E., Bragado-Nilsson, E., Wilm, M., and Seraphin, B. (2001) The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification, *Methods 24*, 218-229.
- 121. Sarewicz, M., Borek, A., Daldal, F., Froncisz, W., and Osyczka, A. (2008) Demonstration of short-lived complexes of cytochrome c with cytochrome bc1 by EPR spectroscopy: implications for the mechanism of interprotein electron transfer, *J Biol Chem 283*, 24826-24836.
- 122. Lyubenova, S., Siddiqui, M. K., Vries, M. J., Ludwig, B., and Prisner, T. F. (2007) Proteinprotein interactions studied by EPR relaxation measurements: cytochrome c and cytochrome c oxidase, *J Phys Chem B* 111, 3839-3846.
- 123. Janzon, J., Yuan, Q., Malatesta, F., Hellwig, P., Ludwig, B., Durham, B., and Millett, F. (2008) Probing the Paracoccus denitrificans cytochrome c(1)-cytochrome c(552) interaction by mutagenesis and fast kinetics, *Biochemistry* 47, 12974-12984.
- 124. Phizicky, E. M., and Fields, S. (1995) Protein-protein interactions: methods for detection and analysis, *Microbiol Rev 59*, 94-123.
- 125. Vajda, S., Vakser, I. A., Sternberg, M. J., and Janin, J. (2002) Modeling of protein interactions in genomes, *Proteins* 47, 444-446.
- 126. Xenarios, I., Rice, D. W., Salwinski, L., Baron, M. K., Marcotte, E. M., and Eisenberg, D. (2000) DIP: the database of interacting proteins, *Nucleic Acids Res 28*, 289-291.
- 127. Salwinski, L., Miller, C. S., Smith, A. J., Pettit, F. K., Bowie, J. U., and Eisenberg, D. (2004) The Database of Interacting Proteins: 2004 update, *Nucleic Acids Res 32*, D449-451.
- 128. Lu, J.-P., Beatty, L., and Pinthus, J. (2008) Dual expression recombinase based (DERB) single vector system for high throughput screening and verification of protein interactions in living cells, *Nature precedings*.
- 129. Kakehi, N., Yamazaki, T., Tsugawa, W., and Sode, K. (2007) A novel wireless glucose sensor employing direct electron transfer principle based enzyme fuel cell, *Biosensors and Bioelectronics 22*, 2250-2255.
- 130. Soukharev, V., Mano, N., and Heller, A. (2004) A Four-Electron O2-Electroreduction Biocatalyst Superior to Platinum and a Biofuel Cell Operating at 0.88 V, *Journal of the American Chemical Society 126*, 8368-8369.
- 131. Minteer, S. D., Liaw, B. Y., and Cooney, M. J. (2007) Enzyme-based biofuel cells, *Current Opinion in Biotechnology 18*, 228-234.
- 132. Armstrong, F. A., and Wilson, G. S. (2000) Recent developments in faradaic bioelectrochemistry, *Electrochim Acta* 45, 2623-2645.
- 133. Neto, S., Forti, J., and De Andrade, A. (2010) An Overview of Enzymatic Biofuel Cells, *Electrocatalysis* 1, 87-94.
- 134. Brito, P., and Turner, A. P. F. (2010) Mediated Biocatalytic Electrodes and Enzyme Stabilisation for Power Generation, *Electroanalysis 22*, 732-743.
- 135. Cooney, M. J., Svoboda, V., Lau, C., Martin, G., and Minteer, S. D. (2008) Enzyme catalysed biofuel cells, *Energy & Environmental Science* 1, 320-337.

- 136. Yan, Y., Zheng, W., Su, L., and Mao, L. (2006) Carbon-Nanotube-Based Glucose/O2 Biofuel Cells, *Adv Mater 18*, 2639-2643.
- 137. Zheng, W., Li, Q., Su, L., Yan, Y., Zhang, J., and Mao, L. (2006) Direct Electrochemistry of Multi-Copper Oxidases at Carbon Nanotubes Noncovalently Functionalized with Cellulose Derivatives, *Electroanalysis 18*, 587-594.
- 138. Duma, R., and Minteer, S. D. (2006) Development of bilirubin oxidase cathodes for ethanol/oxygen biofuel cells, *Polym Materials: Sci Eng 94*, 592-593.
- 139. Ivnitski, D., Branch, B., Atanassov, P., and Apblett, C. (2006) Glucose oxidase anode for biofuel cell based on direct electron transfer, *Electrochem Commun 8*, 1204-1210.
- 140. Martins, L. g. O., Soares, C. M., Pereira, M. M., Teixeira, M., Costa, T., Jones, G. H., and Henriques, A. O. (2002) Molecular and Biochemical Characterization of a Highly Stable Bacterial Laccase That Occurs as a Structural Component of theBacillus subtilis Endospore Coat, *Journal of Biological Chemistry 277*, 18849-18859.
- 141. Taly, V., Kelly, B. T., and Griffiths, A. D. (2007) Droplets as microreactors for high-throughput biology, *Chembiochem 8*, 263-272.
- 142. Kelly, B. T., Baret, J. C., Taly, V., and Griffiths, A. D. (2007) Miniaturizing chemistry and biology in microdroplets, *Chem Commun (Camb)*, 1773-1788.
- 143. Barton, S. C., Gallaway, J., and Atanassov, P. (2004) Enzymatic biofuel cells for implantable and microscale devices, *Chem Rev 104*, 4867-4886.
- 144. Chaubey, A., and Malhotra, B. D. (2002) Mediated biosensors, *Biosens Bioelectron 17*, 441-456.
- 145. Ferretti, S., Paynter, S., Russell, D. A., Sapsford, K. E., and Richardson, D. J. (2000) Selfassembled monolayers: a versatile tool for the formulation of bio-surfaces, *TrAC Trends in Analytical Chemistry 19*, 530-540.
- 146. Gilardi, G., and Fantuzzi, A. (2001) Manipulating redox systems: application to nanotechnology, *Trends in Biotechnology 19*, 468-476.
- 147. Li, G. (2010) Handbook Of Porphyrin Science With Applications to Chemistry, Physics, Materials Science, Engineering, Biology and Medicine, Vol. 1-5.
- 148. Katz, E., Sheeney-Haj-Ichia, L., and Willner, I. (2004) Electrical contacting of glucose oxidase in a redox-active rotaxane configuration, *Angew Chem Int Ed Engl 43*, 3292-3300.
- 149. Cabrita, J. F., Abrantes, L. M., and Viana, A. S. (2005) N-Hydroxysuccinimide-terminated selfassembled monolayers on gold for biomolecules immobilisation, *Electrochim Acta 50*, 2117-2124.
- 150. Beneyton, T., El Harrak, A., Griffiths, A. D., Hellwig, P., and Taly, V. (2011) Immobilization of CotA, an extremophilic laccase from Bacillus subtilis, on glassy carbon electrodes for biofuel cell applications, *Electrochem Commun 13*, 24-27.
- 151. Welch, C., and Compton, R. (2006) The use of nanoparticles in electroanalysis: a review, *Analytical and Bioanalytical Chemistry 384*, 601-619.
- 152. Xiao, Y., Patolsky, F., Katz, E., Hainfeld, J. F., and Willner, I. (2003) "Plugging into Enzymes": Nanowiring of Redox Enzymes by a Gold Nanoparticle, *Science 299*, 1877-1881.
- 153. Abad, J. M., Gass, M., Bleloch, A., and Schiffrin, D. J. (2009) Direct electron transfer to a metalloenzyme redox center coordinated to a monolayer-protected cluster, *J Am Chem Soc 131*, 10229-10236.
- 154. Rahman, M. A., Noh, H.-B., and Shim, Y.-B. (2008) Direct Electrochemistry of Laccase Immobilized on Au Nanoparticles Encapsulated-Dendrimer Bonded Conducting Polymer: Application for a Catechin Sensor, *Analytical Chemistry 80*, 8020-8027.
- Jensen, P. S., Chi, Q., Grumsen, F. B., Abad, J. M., Horsewell, A., Schiffrin, D. J., and Ulstrup, J. (2007) Gold Nanoparticle Assisted Assembly of a Heme Protein for Enhancement of Long-Range Interfacial Electron Transfer, *The Journal of Physical Chemistry C* 111, 6124-6132.
- 156. Murata, K., Kajiya, K., Nukaga, M., Suga, Y., Watanabe, T., Nakamura, N., and Ohno, H. (2010) A Simple Fabrication Method for Three-Dimensional Gold Nanoparticle Electrodes and Their

Application to the Study of the Direct Electrochemistry of Cytochrome c, *Electroanalysis 22*, 185-190.

- 157. Aubin-Tam, M.-E., and Hamad-Schifferli, K. (2005) Gold Nanoparticle–Cytochrome c Complexes: The Effect of Nanoparticle Ligand Charge on Protein Structure, *Langmuir 21*, 12080-12084.
- Hung, A., Mwenifumbo, S., Mager, M., Kuna, J. J., Stellacci, F., Yarovsky, I., and Stevens, M. M. (2011) Ordering Surfaces on the Nanoscale: Implications for Protein Adsorption, *Journal* of the American Chemical Society 133, 1438-1450.
Chapitre II : Techniques de caractérisation

1. Techniques de caractérisation

Cette thèse s'articule autour de plusieurs techniques de caractérisation principalement dans le domaine de la spectroscopie, tout d'abord le domaine de l'UV/Visible et ensuite le domaine du moyen infrarouge.

La figure 2.1.1 présente les différentes longueurs d'onde de toutes les radiations électromagnétiques connues. Le spectre électromagnétique est la décomposition du rayonnement électromagnétique selon plusieurs paramètres, tous ces paramètres étant reliés grâce à 2 formules.

$$E = hv$$
 Equation 6

$$avec v = \frac{c}{\lambda}$$

$$d'o\dot{v} E = h\frac{c}{\lambda}$$
Equation 7

où **E** représente l'énergie en J ; \boldsymbol{v} la fréquence en Hz ; $\boldsymbol{\lambda}$ la longueur d'onde en m ; **c** la vitesse de la lumière en m.s⁻¹ ; **h** la constante de Planck en J.s

Deux domaines sont utilisés:

- Le domaine ultraviolet et visible (UV/Visible) se situant entre 200 et 800 nm.
- Le domaine infrarouge.



Figure 2.1.1 : Caractérisation du spectre électromagnétique.(1)

1.1.Spectroscopie UV/Visible

Le principe de la spectroscopie UV Visible repose sur la transition d'un électron d'un état fondamental vers un état excité par excitation grâce à une interaction avec une onde électromagnétique. Le passage d'un état électronique à un autre état électronique d'énergie plus élevée nécessite l'absorption d'énergie sous forme de photons. Le principe du spectromètre UV/Visible consiste en une source munie de deux lampes qui permettent un continuum d'émission sur toute la gamme de longueur d'onde UV Visible :

- Lampe au deutérium qui émet des longueurs d'ondes de 180 à 400 nm (UV)
- Lampe au tungstène qui émet des longueurs d'ondes de 400 à 800 nm (Visible)

Un monochromateur permet de sélectionner les longueurs d'ondes et donc de faire un balayage de la gamme en déplaçant ce monochromateur. Le faisceau de photons à la longueur d'onde sélectionnée traverse un miroir qui synchronise le mouvement du monochromateur, puis le faisceau traverse l'échantillon et/ou la référence, puis un amplificateur permet de comparer l'intensité en sortie par rapport à l'intensité d'émission (voir figure 2.1.2).



Figure 2.1.2 : Schéma de principe du spectrophotomètre UV Visible.

Le spectre d'absorption ainsi obtenu est caractérisé par un coefficient d'extinction molaire ε pour chaque longueur d'onde. La loi de Beer-Lambert dit que l'absorption est proportionnelle à la concentration c du produit et à la longueur *l* du chemin optique. Elle est décrite dans l'équation.

$$A = \log \frac{I_0}{I} = \varepsilon * l * c \qquad \text{Equation 8}$$

où **A** est l'absorbance ; \mathbf{I}_0 l'intensité de la lumière incidente ; **I** l'intensité de la lumière sortante ; $\boldsymbol{\epsilon}$ le coefficient d'extinction molaire en L.mol⁻¹cm⁻¹ ; \boldsymbol{l} le chemin optique en cm ; **c** la concentration en mol.L⁻¹

1.2. Spectroscopie infrarouge

L'infrarouge correspond à des rayonnements de longueur d'ondes supérieures à celles de la lumière visible et inférieures à celles du domaine submillimétrique. La partie infrarouge du spectre électromagnétique se divise en 3 régions bien distinctes : le proche (13300 à 4000 cm⁻¹), le moyen (4000 à 450 cm⁻¹) et le lointain infrarouge (450 à 10 cm⁻¹). Lorsque la longueur d'onde apportée par le faisceau lumineux est voisine de l'énergie de vibration de la molécule, cette dernière va absorber le rayonnement et on enregistre une diminution de l'intensité réfléchie ou transmise. Le domaine infrarouge correspond au domaine d'énergie de vibration des molécules. Toutes les vibrations ne donnent pas lieu à une absorption, cela dépend aussi de la géométrie de la molécule et en particulier de sa symétrie. En effet, un changement du moment dipolaire est nécessaire. Pour une géométrie donnée on peut déterminer les modes de vibration actifs en infrarouge grâce à la théorie des Groupes.

Dans un modèle très simplifiée, la position de ces bandes d'absorption dépend en particulier de la différence d'électronégativité des atomes et de leur masse. Par conséquent à un matériau de composition chimique et de structure donnée correspond un ensemble de bandes d'absorption caractéristiques permettant d'identifier le matériau. La lumière excitatrice provoque, pour chaque transition vibrationnelle, une multitude de transitions rotationnelles, qui va donner au pic de transition vibrationnelle l'allure d'une bande d'absorption. Pour une molécule non linéaire formée de N atomes, 3N-6 modes normaux de vibration sont trouvés. La fréquence d'oscillation d'un mode de vibration est déterminée par :

$$v = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}} avec \ \mu = \frac{m_a * m_b}{m_{a+m_b}}$$
 Equation 9

où \boldsymbol{v} est la fréquence en cm⁻¹; k la constante de force en N.cm⁻¹; $\boldsymbol{\mu}$ la masse réduite en kg

Un mode normal de vibration est actif en infrarouge si le moment dipolaire de transition associée n'est pas nul. De nombreux modes de vibration peuvent être observés en spectroscopie infrarouge. On définit en fait 2 types de modes normaux de vibration principaux : les déformations et les élongations (voir figure 2.1.3). Les élongations mettent en jeu la longueur de la liaison, les déformations modifient l'angle de liaison.(2)



Figure 2.1.3 : Modes normaux de vibrations. (3)

1.2.1. Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF)

Comparée aux techniques traditionnelles, l'interférométrie est une méthode très compétitive. Toutes les fréquences de la source infrarouge sont traitées ensemble sans sélection préalable, ce qui permet de capter le spectre entier en moins d'une milliseconde. En spectrométrie IRTF, le signal enregistré (interférogramme) est obtenu à l'aide d'un interféromètre de Michelson dont un des miroirs subit une translation à vitesse constante. L'interférogramme enregistré à l'aide d'un seul balayage du miroir est constitué d'une combinaison complexe de sinusoïdes de fréquences différentes et dont l'intensité est fonction du signal reçu pour la radiation. Un traitement par transformée de Fourier conduit au spectre d'absorbance en fonction de la fréquence (voir figure 2.1.4). Le principe de Transformation de Fourier (TF) se base sur le fait que chaque fonction peut être décomposée en une somme de fonctions sinusoïdales, chaque fonction sinusoïdale étant définie par deux valeurs: sa fréquence ou longueur d'ondes et son amplitude.

De par son principe, la spectrométrie IRTF autorise l'acquisition rapide de spectres extrêmement précis. Un spectromètre par transformée de Fourier ne décrit pas directement les raies d'un spectre, mais les fréquences spatiales qui transcrivent ces raies, dans un

interférogramme. L'interférogramme conclut au spectre par une transformation de Fourier inverse (voir figure 2.1.4).



Figure 2.1.4 : Description du schéma d'un spectromètre infrarouge à transformée de Fourier.(3)

1.2.2. Réflexion Totale Atténuée (RTA)

Les échantillons peuvent être étudiés en transmission ou en réflexion grâce à un appareil nommé RTA.

Lorsqu'un faisceau lumineux arrive à l'interface entre 2 milieux d'indice de réfraction très différents, il peut subir une réflexion interne totale. Ce phénomène se produit lorsque la valeur de l'angle du rayon incident est supérieure à un certain angle critique. Lorsque la réflexion se produit, une partie de ce faisceau pénètre dans le milieu d'indice de réfraction le plus faible avant de subir la réflexion : c'est l'onde évanescente. C'est cette onde évanescente qui va interagir avec les molécules étudiées. Lors du passage dans le second milieu, une partie de la lumière incidente peut être absorbée par un échantillon et donc le rayon réfléchi est moins énergétique que le rayon incident. De cette manière, il devient possible de réaliser un spectre d'absorption.(4) C'est l'une des techniques de la spectroscopie infrarouge qui a le plus évoluée ces dernières années.

C'est une méthode d'analyse de surface (voir figure 2.1.5). L'épaisseur analysée dépend de la pénétration de l'onde évanescente dans l'échantillon. Celle-ci peut aller de 0,5 à 5 µm.

Cela rend donc la Réflexion Totale Atténuée particulièrement intéressante pour l'analyse des échantillons purs, puisque le risque de voir les pics saturés est très faible. Elle permet enfin de faire varier les conditions expérimentales pendant les mesures et est également une technique très reproductible à condition de ne pas réclamer des sensibilités très importantes. La profondeur de pénétration de l'onde évanescente dans l'échantillon est caractérisée par la distance d_p et décrit dans l'équation :

$$d_p = \frac{\lambda/n_1}{\sqrt{2\pi(\sin^2\theta - (n_2/n_1)^2)}}$$
 Equation 10

où λ est la longueur d'onde en cm⁻¹; \mathbf{n}_1 l'indice de réfraction interne; \mathbf{n}_2 celui de l'échantillon; $\boldsymbol{\theta}$ l'angle d'incidence en radians



Figure 2.1.5 : Représentation schématique du principe de la RTA.(3)

1.2.3. Réflexion Totale Atténuée Exaltée de Surface (SEIRAS)

Une application possible pour les mesures en RTA est la Réflexion Totale Atténuée Exaltée de Surface ou SEIRAS.

L'effet SEIRAS (Surface-Enhanced Infrared Absorption Spectroscopy) a été découvert en 1980 (5) bien après la découverte de l'effet SERS (Surface-Enhanced Raman Scattering).(6, 7) Cette technique a été utilisée car elle ne montre exclusivement que le signal des protéines adsorbées avec une sensibilité de surface très haute.(8, 9) Il repose sur le principe d'une molécule sur une surface de métal qui voit une augmentation de son absorption en infrarouge de 10 à 1000 fois plus intense que lorsqu'elle n'est pas sur ce métal.

Cette exaltation dépend de la taille, de la forme et de la densité des particules sur le film de métal sélectionné. Depuis sa découverte, cet effet a été observé sur différents métaux. La réflexion totale atténuée est exclusivement utilisée ici,(10-12) mais cet effet peut aussi être observé en transmission (13, 14) ou en réflexion externe.(15) Le métal utilisé ici est l'or qui est déposé sur une surface de Si grâce à un métalliseur à pulvérisation cathodique. Les molécules chimisorbées présentent une augmentation plus importante que les molécules physisorbés.

Le phénomène est encore en discussion aujourd'hui et il n'est toujours pas totalement compris.(*16, 17*) L'exaltation de surface semble reposer sur deux mécanismes différents : le mécanisme électromagnétique et chimique.(*18, 19*) Ces deux composantes sont présentes dans l'équation qui décrit l'absorption en infrarouge. Le modèle décrit par Osawa est utilisé ici.(*12, 20*) De manière générale en Infrarouge, l'absorbance A s'écrit :

$$A \propto \left| \frac{\partial \mu}{\partial Q} \cdot \boldsymbol{E} \right|^{2} = \left| \frac{\partial \mu}{\partial Q} \right|^{2} |\boldsymbol{E}|^{2} \cos^{2}\theta \qquad \text{Equation 11}$$

où $\partial \mu / \partial Q$ est la dérivée du moment dipolaire par rapport aux coordonnées normales ; **E** est le champ électrique qui excite la molécule ; θ est l'angle entre ces deux composantes

La composante électromagnétique représentée par le champ électrique permet un accroissement du champ électrique local à la surface.(21) Le dépôt d'un film sur la surface ne se fait pas de manière continue mais avec la formation de petits îlots de métal ce qui implique une surface non parfaite.

Ces petits îlots jouent un rôle très important, en effet ils sont polarisés par un champ de photons incidents générant un champ électrique local intense. La molécule adsorbée induit donc des dipôles supplémentaires sur ces petits îlots. Il est très important de contrôler la déposition pour pouvoir avoir une exaltation de surface optimale.

La composante chimique est liée à un accroissement de la dérivée du moment dipolaire à cause des interactions chimiques entre la molécule et le métal présents à la surface.

Concernant l'angle entre ces deux composantes, il faut savoir que des molécules adsorbées sont plus souvent orientées de façon spécifique à la surface (voir figure 2.1.6).



Figure 2.1.6 : Schéma expliquant le principe de la spectroscopie infrarouge par réflexion totale atténuée. (22) Seuls certains modes seront donc exaltés, spécifiquement ceux qui ont une composante dipolaire perpendiculaire.(*12*)

Il faut noter que l'exaltation est 10 à 1000 fois moins importante qu'avec le SERS.

L'exaltation de surface est obtenue en déposant un film métallique, typiquement Au ou Ag, à la surface du cristal.(23, 24)

Cette technique permet de travailler avec des monocouches autoassemblées de thiols sur des surfaces en métal,(25, 26) pour déterminer l'équilibre acide-base de ces monocouches en solution.(26, 27)

1.3. Etude de protéines grâce à la Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier1.3.1. Les bandes Amide

L'infrarouge des protéines montre des bandes avec des absorptions spécifiques associées au squelette peptidique. Les bandes infrarouge caractéristiques des protéines et des peptides sont listées dans le tableau 2.1.1, il y a neuf bandes Amide décrites.

Bandes	Longueur d'onde (cm ⁻¹)	Assignement
Amide A	3300-3250	Elongation (N-H)
Amide B	~3100	Elongation (N-H), en résonance avec des
Amide I	1700-1600	harmoniques d'Amide II 80 % d'élongation (C=O); 10 % d'élongation (C-N);
Amide II	1575-1480	10 % de déformation (N-H) 60 % de déformation (N-H) 40 % d'élongation (C-N)
Amide III	1330-1220	30 % de déformation (C-N); 30 % de déformation
		(N-H); 10 % d'élongation (C=O); 10 % de
		déformation (O=C-N); mixés avec d'autres modes
Amide IV	767-625	40 % de déformation (O=C-N); 60 % d'autres modes
Amide V	800-630	Déformation hors du plan (N-H)
Amide VI	605-535	Déformation hors du plan (C=O)
Amide VII	~200	Torsion du squelette

 Tableau 2.1.1 : Nom des bandes, longueur d'onde et assignements des bandes d'absorption en infrarouge du squelette peptidique des protéines.(28-31)

Une partie de notre étude se fait sur la bande Amide I, qui est la bande la plus intense et donc la plus étudiée. Elle est composée à 80% par la vibration d'élongation de la liaison C=O issue de la liaison peptidique avec également une contribution de la vibration de la liaison C-N, qui augmente la hauteur des bandes. Cette bande se situe entre 1700 et 1600 cm⁻¹. Elle indique clairement la structure secondaire de la protéine à cause de sa sensibilité aux liaisons Hydrogène, à l'interaction dipôle-dipôle et la géométrie du squelette peptidique.(*29, 30*) Ainsi, la forme et l'intensité sont directement reliées à la structure secondaire de la protéine.

Cependant, d'autres cofacteurs rentrent également en jeu comme les acides aminés et les hèmes.

1.3.2. Les acides aminés – caractérisation infrarouge

Vingt acides aminés importants sont distingués. Leur masse moyenne est de 0.1 kDa. Le tableau présente la contribution individuelle des acides aminés principaux présents dans les protéines dont leur absorption est la plus intense entre 1800 et 1000 cm⁻¹.

Acide aminé	Vibrations	$v(cm^{-1})$	$\epsilon (M^{-1}cm^{-1})$
Asp	-COOH ^s	1716	280
	-COO ^{-s,as}	1574	380
	-COO ^{-s,sym}	1402	256
		1250	100-200
Glu	-COOH ^s	1712	220
	-COO ^{-s,as}	1560	470
	-COO ^{-s,sym}	1404	316
		1250	100-200
Arg	$-CN_3H_5^{s,as}$	1673	420
	$-CN_3H_5^{s,sym}$	1633	300
Lys	$-NH_3^{+def,as}$	1629	130
	-NH3 ^{+def,sym}	1526	100
Asn	$-C=O^{s}$	1678	310
	$-NH_2^{def}$	1622	160
Gln	$-C=O^{s}$	1670	360
		1687	
	$-NH_2^{def}$	1610	220
		1590	
Tyr	Ring, Tyr-OH	1612	
	Ring, Tyr-OH	1518	430
	C-OH ^s	1245	200
	Ring, Tyr-O ⁻	1602	160
	Ring, Tyr-O ⁻	1498	700
	$C-O^{-s}$	1269	580
His	Ring	1596	70
Phe	Ring	1494	80
Trp		1455	
		1334	
Pro	Ring-N	1424	
	H-Ring-N	1456	

Tableau 2.1.2 : Absorption d'une sélection des différents acides amines en infrarouge (ν) avec leur coefficient d'absorption molaire (ε) s : élongation, sym : symétrique, as : antisymétrique, def :

déformation.(32)

1.3.3. Les hèmes

Un hème est caractérisé par un centre métallique au cœur d'une porphyrine avec la présence d'un groupe farnésyl et de propionates. Les porphyrines qui sont des macrocycles tétrapyrroliques aromatiques, sont des molécules qui participent à de nombreux processus biologiques sous leur forme métallées comme l'hémoglobine ou la myoglobine. Les hémoprotéines utilisent une molécule prosthétique, l'hème, pour interagir avec des ligands diatomiques et remplissent des fonctions essentielles comme le transport d'électrons.

1.3.3.1.Structure des différents hèmes

Trois types d'hèmes principaux sont distingués.

L'hème *a* est un cofacteur redox unique de la cytochrome *c* oxydase qui est vitale pour la respiration aérobie. Il est constitué d'un atome de Fer en son cœur entouré d'un ligand macrocyclique appelé porphyrine. Il diffère des hèmes *b* grâce à deux modifications chimiques.(*33*) Il a été isolé pour la première fois en 1951 par Otto Warburg. Il a montré qu'il est un composant actif de la cytochrome *c* oxydase.(*34*) La structure de l'hème *a* se caractérise par une chaîne isoprène nommée farnésène (voir figure 2.1.7).



Figure 2.1.7 : Structure chimique de l'hème *a*. Les symboles sur les atomes de carbone de l'anneau porphyrine sont indiqués.

L'hémoglobine ou la myoglobine sont des exemples de molécules contenant un hème *b*. Généralement, il est attaché à une apoprotéine par une liaison de coordination entre le fer hémique et un acide aminé de la chaîne latérale et participe au stockage de l'oxygène dans les tissus musculaires ainsi qu'à son transport vers les mitochondries.(*35*) La structure se compose de deux chaînes de type vinyle situées à ses extrémités (voir figure 2.1.8).



Figure 2.1.8 : Structure chimique de l'hème *b*. Les symboles sur les atomes de carbone de l'anneau porphyrine sont indiqués.

L'hème c diffère de l'hème b par le remplacement de ses deux chaînes vinyle par deux groupes thioéthers (voir figure 2.1.9). Tout comme l'hème b, l'hème c joue un rôle dans les réactions de transport d'électrons.(35) La structure a été publiée, pour la première fois, par K.G. Paul et al.(36)



Figure 2.1.9 : Structure chimique de l'hème *c*. Les symboles sur les atomes de carbone de l'anneau porphyrine sont indiqués.

Grâce aux propriétés optiques de l'hème, la spectroscopie UV/Visible et Infrarouge donnent de précieuses informations.

1.3.3.2. Caractérisation en UV/Visible

Pour l'UV/Visible, deux bandes sont mises en avant (voir figure 2.1.10). Tout d'abord la bande γ dite de Soret, située entre 380 et 450 nm, est caractéristique de l'aromaticité de la molécule. Le maximum varie selon l'hème étudié.(*33*) Le coefficient d'extinction molaire de la bande de la forme réduite est très élevée (ϵ >10⁵ M⁻¹.cm⁻¹). Puis, les bandes α et β ou bandes Q, qui sont au nombre de deux (Q₀ et Q₁) dans le cas des hèmes, sont situées entre 480 et 700 nm. Leur coefficient d'extinction molaire est très variable mais généralement plus faible que celui de la bande de Soret (ϵ >10⁴ M⁻¹.cm⁻¹). Leur intensité est dix à cent fois plus faible.(*37*)



Figure 2.1.10 : Spectre UV/Visible du cytochrome c_1 à pH 8 sous sa forme réduite après ajout de dithionite de sodium.

Ces deux bandes correspondent à des transitions électroniques de type π - π *. Elles dépendent de l'état d'oxydation du Fer, des substituants périphériques, des ligands axiaux, de l'état de coordination et des acides aminés voisins.(*38*)

1.3.3.3.Caractérisation infrarouge

La nomenclature utilisée ici pour les modes des hèmes en infrarouge a été décrite par Spiro et Li.(*39*) Les différentes vibrations qui existent pour les différents hèmes sont répertoriées dans les tableaux 4.2.2 et 4.2.3.

Vibrationa	Vibrationa	Dandanava	Dandanava	Dandanava	Nom
v ibrations	v ibrations	Бande pour	вanae pour	Бапае pour	INOM
	couplées	un hème de	un hème de	un hème de	
		type a	type b	type c	
		(cm^{-1})	(cm^{-1})	(cm^{-1})	
v(CaCm)	$\delta(CaCmH)$ ou	1573-1553	1573-1553	1645-1593	v_{37}
	$\delta(CmX)$				
v(CbCb)	v(CaCm),		1538-1533	1570	V ₃₈
	v(NCa),	1570-1542			$v_{38x/y}$
$v(CaCm)^{sym}$	v(NCa),	1481-1478	1481-1478	1478-1455	V39
	v(CbCb),				
v(CaCb)	δ (CbX),	1406-1396	1406-1396	1406-1396	v_{40}
	v(NCa),				
v(CaN)	v(CaCb),	1387-1386		1393-1384	v_{41}
	$\delta(CmX), \delta$				
ν(C <i>m</i> H)	δ CbX),	1244-1240	1244-1240	1262-1220	δ_{42}
	v(CaN).				

Tableau 2.1.3: Bandes d'absorption infrarouge des hèmes a (40),b (41) et c (42) avec X : Substituant des porphyrines, v : élongation, δ : torsion.(32)

Vibrations	Bande en cm ⁻¹	Hèmes
ν(Cα=Cβ)	1620, 1626, 1613	a/b
$\delta(=CH_2)^s$	1345, 1337	a/b
$v(CbC\alpha)$	1118	a/b
$\delta(=CH_2)^{as}$	1080	a/b

Tableau 2.1.4 : Bandes d'absorption infrarouge des substituants vinyles pour les hèmes a et b avec v : élongation,

 δ : torsion, sym : symétrique, as : antisymétrique.(32)

1.4. Prédiction de la structure secondaire grâce à la spectroscopie infrarouge

Quatre types de structure de complexité croissante existent pour caractériser une protéine. Tout d'abord la structure primaire, elle est la séquence des acides aminés qui forme une chaîne polypeptidique. La structure secondaire est caractérisée par des motifs structuraux (hélice α ; feuillet β ; aléatoire et boucles) dont la propriété principale est de stabiliser la structure de la protéine par un caractère répétitif de liaisons Hydrogènes intramoléculaires (voir figure 2.1.11). Les feuillets β reposent sur des liaisons hydrogènes en CO et NH entre la même chaine polypeptidique, ils imposent une conformation plane, donc bidimensionnelle. Les brins adjacents peuvent être de même sens (feuillet parallèle) ou de sens opposé (feuillet antiparallèle). Le changement de direction du feuillet β est réalisé par un élément structural commun appelé boucles. L'hélice α est formée par l'enroulement régulier d'une chaîne polypeptidique sur elle-même. Elle est stabilisée par des liaisons hydrogène entre les groupes NH et CO de la chaîne principale : tous les CO et NH de la chaîne principale sont unis par des liaisons non covalentes (liaisons faibles) des liaisons hydrogène.

Ensuite la structure tertiaire qui se rapporte aux relations dans l'espace des différentes structures secondaires. Elle est maintenue par des liaisons (covalentes, Hydrogène ...) entre des acides aminés souvent très éloignés sur la chaîne primaire.

Enfin la structure quaternaire, qui n'existe que pour les protéines qui contiennent plus d'une chaîne polypeptidique, présente un niveau supplémentaire d'organisation qui correspond à l'association spécifique de plusieurs chaînes peptidiques. La structure secondaire est la seule étudiée dans cette thèse. L'utilisation de la dérivée seconde pour déterminer la structure secondaire de la protéine est la méthode la plus couramment utilisée. La position des pics est donnée par le maximum de chaque pic négatif issu de la dérivée seconde. Cependant, la dérivation ne conserve pas l'aire de chaque composante individuelle. Une procédure d'ajustement de courbe peut être appliquée pour calculer quantitativement la superficie de chaque pic négatif originaire de la dérivée seconde.(43-46) La structure secondaire est étudiée uniquement sur la bande Amide I. Plus récemment, El Khoury et al. ont analysé la spécificité de la bande Amide VI pour les différents types de structure secondaire dans la région spectrale comprise entre 590 et 490 cm⁻¹.(47)



Figure 2.1.11 : Représentation de différents éléments issus de la structure secondaire.

$H_2O(cm^{-1})$	$D_2O(cm^{-1})$	Assignement
1624-1642	1624-1637	Feuillets β
1648	1645	Aléatoire
1656	1653	Hélices a
1663	1641	Hélices 3 ₁₀
1667-1685	1663-1671 et 1683-1694	Boucles
1691-1696	1675	Feuillets B

Tableau 2.1.5 : Assignements des éléments de la structure secondaire des protéines par la déconvolution de la bande Amide I en infrarouge en H₂O (48, 49) et en D₂O.(43, 45)

Le tableau 2.1.5 découle de la comparaison de plusieurs structures cristallines aux rayons X à haute résolution pour établir une corrélation entre les différentes bandes et les spectres obtenus.(*50*)

1.5.Electrochimie

La cellule électrochimique utilisée ici repose sur un système à trois électrodes (voir figure 2.1.12) : une électrode de travail, une électrode de référence et une contre-électrode.

Un montage comprenant seulement deux électrodes ne permet pas de contrôler précisément la tension à leurs bornes en présence d'un courant important les traversant. Le rôle de la troisième électrode ou contre-électrode est de permettre le passage du courant traversant l'électrode de travail, sans passer par l'électrode de référence.

Ainsi l'électrode de référence n'est pas polarisée et la portion de circuit entre l'électrode de travail et la référence ne contribue que faiblement à la chute ohmique due à la résistance non nulle de la solution électrolytique.



Figure 2.1.12 : Représentation schématique d'un système à trois électrodes. WE représente l'électrode de travail, Ref l'électrode de référence et CE la contre-électrode. Le potentiel est contrôlé entre la WE et la Ref quand le courant est contrôlé entre la WE et la CE.(*3*)

1.5.1. Cyclovoltammétrie

La voltampérométrie cyclique est basée sur la mesure du courant résultant d'un balayage linéaire de potentiel entre des limites E_{inf} et E_{sup} . La programmation en potentiel est triangulaire et une vitesse de balayage v=dE/dt est imposée. Le résultat obtenu est une courbe i=f(E). Plusieurs cycles consécutifs peuvent être exécutés, chacun étant représenté par un tracé du courant enregistré en fonction du potentiel appliqué, appelé voltampérogramme (voir figure 2.1.13).



Figure 2.1.13 : Principe de la variation de potentiel en voltampérométrie cyclique.

Le courant total mesuré est la somme de deux courants à l'interface électrode/solution : un courant capacitif lié à l'existence de la double couche électrochimique et un courant faradique dû à la réaction d'oxydoréduction et relié par l'équation :

$$i = i_c + i_f = \frac{dQ_c}{dt} + \frac{dQ_f}{dt}$$
 Equation 12

où **i** est le courant total en A ; \mathbf{i}_c et \mathbf{Q}_c le courant et la charge capacitif en A et en C ; \mathbf{i}_f et \mathbf{Q}_f le courant et la charge faradique en A et en C ; \mathbf{t} le temps en s

Le courant faradique varie avec la concentration en l'espèce électroactive et l'aire de l'électrode. Pour éliminer son influence, le courant est normalisé par rapport à l'aire de l'électrode et présenté sous la forme d'une densité de courant :

$$j = \frac{i}{a}$$
 Equation 13

Cette technique permet d'obtenir des voltampérogrammes tout à fait caractéristiques de la réaction qui se produit. Pour la figure 2.1.14, le voltampérogramme à gauche correspond à une espèce adsorbée à l'électrode et à droite à une espèce dissoute donc en solution. Notre but est d'avoir un voltampérogramme totalement symétrique, qui est caractéristique d'une espèce adsorbée, échangeant réversiblement et rapidement des électrons. Il faut également noter que le voltampérogramme d'une protéine est généralement difficile à obtenir du moins en solution. En effet, la raison principale est le facteur d'orientation de la protéine, elle ne s'oriente pas de manière uniforme sur la surface mais de manière aléatoire. Un autre problème est également l'accessibilité du centre actif de la protéine, qui est au cœur de la protéine, est donc non accessible sans médiateurs. Il ne faut pas oublier que la vitesse de transfert d'électrons de la protéine est plus faible que la plus petite vitesse de balayage.

De ces graphiques, le potentiel de demi-vague $E_{1/2}$ ou potentiel redox est extrait. Il se calcule de la manière suivante :

$$E_{1/2} = \frac{E_o + E_R}{2}$$
 Equation 14

où E_0 et E_R les potentiels anodiques et cathodiques en V.



Figure 2.1.14 : Cyclovoltammogrammes caractéristique d'une espèce : a) adsorbée à la surface b) en solution.

Le taux de couverture Γ est également calculé une fois la protéine adsorbée à la surface. Il se définit par le nombre de molécules adsorbées sur la surface divisé par le nombre de molécules sur une surface d'or polycristalline. La formule utilisée est la suivante :

$$\Gamma = \frac{Q}{nFA}$$
 Equation 15

avec

$$A = \frac{Q_0}{390}$$
 Equation 16

où **Q** est la charge obtenue par intégration du pic cathodique ou anodique en C divisée par la vitesse de balayage; **n** est le nombre d'électrons échangés; **F** la charge d'une mole d'électrons en C; **A** l'aire de la surface polycristalline après dépôt des nanoparticules en cm²; **Q**₀ est la charge obtenue par intégration du pic de la réduction de l'Au-O obtenu sur l'électrode polycristalline; **390** μ C.cm⁻² est la constante pour une monocouche d'oxyde chimisorbée sur une surface d'or polycristalline.(*51*)

1.5.2. La spectroscopie différentielle : la cellule OTTLE

Le spectre d'absorbance des protéines peut donner des informations sur la structure secondaire de la protéine, mais aussi sur les fonctions de cette protéine. Or, les spectres d'absorbance des protéines pour deux états différents (états redox dans le cas de la chaîne respiratoire) sont presque indissociables à l'œil nu (voir figure 2.1.15).



Figure 2.1.15 : Spectre d'absorbance en infrarouge du cytochrome *c* oxydase de *P. denitrificans* à pH 8 dans sa forme oxydée (en bleu) et dans sa forme réduite (en rouge). Les deux spectres sont décalés pour une meilleure lisibilité.

Dans le but d'obtenir un aperçu du mécanisme de la protéine grâce à la spectroscopie infrarouge, une technique spectroscopique différentielle a été développée pour visualiser les changements qui ont lieu pendant la réaction de la protéine. Le principe est d'appliquer, d'une part un potentiel oxydant pour avoir la forme oxydée de la protéine puis d'autre part d'appliquer un potentiel réducteur pour obtenir la forme réduite. Des spectres différentiels en absorbance (oxydé moins réduit) sont donc obtenus. Il faut noter que la réaction du système doit être réversible. D'autres techniques font intervenir les spectres différentiels comme les spectres différentiels induits par la lumière.(*52*) Cependant, la technique du spectre différentiel en absorbance est celle qui permet une meilleure compréhension de la dynamique des réactions électrochimiques.

Cette technique a été réalisée dans une cellule électrochimique nommée OTTLE (Optically Transparent Thin-Layer Electrochemical cell). développée dans les années 90 (53) et adaptée par l'équipe du Pr.Petra Hellwig aux protéines membranaires (voir figure 2.1.16).(54)



- a. Fenêtre CaF₂ transparentes
- b. Plexiglas
- c. PVC
- d. Contre électrode en Pt
- e. Electrode de travail en or de 4 μ m
- f. Joint
- g. Electrode de Référence de type Ag/AgCl 3M KCl

Figure 2.1.16 : Représentation schématique de la cellule OTTLE.

La cellule comprend un corps en PVC (c) avec quatre entrées. L'électrode de travail en or (e) est reliée à la première entrée grâce à une pièce en Pt, la contre électrode est directement connectée à la seconde entrée sans contact avec l'électrode de travail (d). La troisième entrée est la connexion de l'électrode de référence (g). Enfin, la dernière entrée permet le remplissage de tampon dans la cellule. L'ensemble est maintenu entre deux fenêtres de CaF_2 transparentes (a) fixées sur un support en plexiglas (b). Les joints (f) assurent l'étanchéité de la cellule. Après montage, l'épaisseur obtenue est de l'ordre de 5 à 10 µm ce qui permet d'éviter la forte absorption de l'eau.

Le signal différentiel représente le total des changements moléculaires concomitants avec les réactions redox comme les changements conformationnels ou les redistributions des charges dans les sites des cofacteurs. Le signal reflète donc la réorganisation des hèmes, du squelette polypeptidique et des chaînes latérales d'acides aminés lors du transfert d'électrons. En plus, le transfert de protons couplés aux processus redox peut être attendu dans ce spectre (voir figure 2.1.17). Plusieurs régions peuvent être mises en avant : entre 1750 et 1700 cm⁻¹ qui correspond à la protonation-déprotonation des différents acides aminés, entre 1690 et 1620 cm⁻¹ pour la bande Amide I, entre 1560 et 1520 cm⁻¹ pour la bande Amide II et entre 1200 et 1000 cm⁻¹ pour la contribution du tampon.

Cependant, ces spectres différentiels autorisent des assignements plus précis en utilisant diverses méthodes pour compléter les différentes conclusions.

Par exemple, la mutation spécifique d'un acide aminé jouant un rôle, par exemple, dans le transfert de protons est envisageable. La comparaison entre la forme native et le mutant donne des indications cruciales pour déterminer l'acide aminé responsable de la réaction de protonation.(55) Un marquage isotopique d'un acide aminé est aussi envisageable pour pouvoir déterminer avec précision le signal spécifique d'une vibration.(56) Enfin un échange H-D (54) des protons labiles est possible, provoquant un déplacement de la bande Amide II et la création d'une bande Amide II' et donc un changement dans les vibrations du squelette. En effet, l'échange H-D peut apporter des informations sur la localisation des acides aminés impliqués dans la réaction des protéines. La méthode est particulièrement efficace pour les résidus d'acides aminés protonés comme l'acide Aspartique et le Glutamique.



Figure 2.1.17 : Spectre différentiel infrarouge oxydé moins réduit du cytochrome *c* oxydase de *P. denitrificans* à pH 8. Les signaux positifs en bleu représentent la protéine dans son état oxydée et les signaux négatifs en rouge la protéine dans son état réduit.(*3*)

1.5.3. Théorie de Laviron

Pour obtenir des informations sur la cinétique de transfert électronique des espèces adsorbées, il est important d'étudier la théorie de E. Laviron.(57) Il a développé un modèle théorique considérant le transfert de charges des espèces électroactives adsorbées dans la limite de faibles perturbations alternatives. Pour des espèces électroactives présentant un comportement d'adsorption de Langmuir, l'impédance faradique est représentée par une combinaison en série d'une résistance faradique et d'une capacité faradique. Le courant peut être défini par une fonction sans dimension : (57)

$$\psi = \frac{i}{\left(\frac{F^2}{RT}\right)n^2 \nu A \Gamma_T} = m[(\Gamma_O - \Gamma_T)\eta^{-\alpha} - (\Gamma_R - \Gamma_T)\eta^{1-\alpha}] \qquad \text{Equation 17}$$

où ψ est le courant en A ; **F** la charge d'une mole d'électrons en C ; **R** la constante des gaz parfaits en J.K⁻¹.mol⁻¹; **T** la température en K ; **n** le nombre d'électron échangé ; **v** la vitesse de balayage en V.s⁻¹; **A** l'aire en cm²; Γ_{T} la somme constante ; **m** est défini par l'équation ; Γ_{0} et Γ_{R} sont les concentrations de surface de l'oxydant et du réducteur en mol.cm⁻²; **η** donne le rapport de l'excès superficiel de la forme oxydée et la forme réduite de l'espèce adsorbée ; **α** une constante.

avec
$$m = \left(\frac{RT}{F}\right) * \left(\frac{k}{n*\nu}\right)$$
 Equation 18

où **k** est le taux de transfert d'électrons en s⁻¹

De cette équation, k est extrait pour obtenir la formule suivante en admettant que $\alpha=0,5$: (57)

$$k = \frac{m * n * v * F}{RT}$$
 Equation 19

où $\mathbf{n}=1$; $\mathbf{T}=298^{\circ}K$; $\mathbf{R}=8.314 \text{ J.K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$; \mathbf{v} est la vitesse de balayage en V.s⁻¹; $\mathbf{F}=96320$ C.mol⁻¹

m est déterminé par la séparation entre les pics de la forme oxydé et réduit en prenant la valeur trouvée dans le tableau 2.1.6. Plus la constante de transfert d'électrons est élevée, plus les pics sont proches et plus le centre actif est proche et donc accessible, ce qui donne des informations précieuses sur l'efficacité de la modification.

$\frac{1}{m}$	0,5	0,75	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4
$n\Delta E_p(mV)$	18,8	27	34,8	48,8	61,2	72,2	82,4	91,8	100,6
$\frac{1}{m}$	5	6	7	8	9	10	11	12	13
$n\Delta E_p(mV)$	116,2	130	142,4	153,8	164	173,4	182	190	197,6

Tableau 2.1.6 : Valeur de 1/m par rapport à la différence de potentiels entre les pics oxydés et réduits.

Pour chaque vitesse de balayage, la différence de potentiel entre les pics oxydées et réduits est cherchée. La valeur de 1/m est alors déduite. Enfin la courbe de la vitesse de balayage par rapport à 1/m est tracée. La formule devient alors :

$$\frac{1}{m} = \frac{n*F}{RT} * \frac{1}{k} * \nu$$
 Equation 20

La courbe trouvée est considérée comme une droite passant par l'origine. Le coefficient directeur de la courbe est alors :

$$\frac{n*F}{RT} * \frac{1}{k}$$
 Equation 21

La seule inconnue ici est le coefficient k. Il est donc extrait.

Il est important de souligner que cette méthode n'est valable que pour des vitesses de balayage élevées (supérieures à 0.5 V.s^{-1}).

1.5.4. Calcul de la largeur à mi-hauteur (LMH)

La largeur à mi-hauteur se mesure entre les deux valeurs extrêmes du pic et est égale à la moitié de la valeur maximale. Elle est mesurée exclusivement pour le pic cathodique à une vitesse de balayage de 0.1 V.s^{-1} . Dans le cas des espèces redox homogènes immobilisées sur la surface et qui mettent en jeu un processus électrochimique réversible, la largeur à mi-hauteur est égale à 90.6 mV.(58) Une valeur plus grande suggère une orientation plus aléatoire de la protéine sur la surface et donc l'obtention d'un potentiel formel. Le potentiel formel est le potentiel obtenu dans les conditions expérimentales.(59)

2. Références

- 1. Elert, G. (1998) The Electromagnetic Spectrum, The Physics Hypertextbook.
- 2. Hollas, J. M. (1998) *Spectroscopie : Cours et exercices*, Dunod ed., Sciences Sup.
- 3. El Khoury, Y. (2010) Thèse de l'Université de Strasbourg
- Mid and far infrared spectroelectrochemical studies on the metal-ligand interactions in respiratory chain enzymes In *Chemistry*, p 224, Strasbourg.
- 4. Hamon, M., Pellerin, F., Guernet, M., and G., M. (1998) *Chimie analytique, tome 3 : Méthodes spectrales et analyse organique, 2ème édition*, Masson ed.
- 5. Hartstein, A., Kirtley, J. R., and Tsang, J. C. (1980) Enhancement of the Infrared Absorption from Molecular Monolayers with Thin Metal Overlayers, *Physical Review Letters* 45, 201.
- 6. Fleischmann, M., Hendra, P. J., and McQuillan, A. J. (1974) Raman spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode, *Chemical Physics Letters 26*, 163-166.
- 7. Jeanmaire, D. L., and Van Duyne, R. P. (1977) Surface raman spectroelectrochemistry: Part I. Heterocyclic, aromatic, and aliphatic amines adsorbed on the anodized silver electrode, *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry 84*, 1-20.
- Ataka, K., Giess, F., Knoll, W., Naumann, R., Haber-Pohlmeier, S., Richter, B., and Heberle, J. (2004) Oriented attachment and membrane reconstitution of His-tagged cytochrome c oxidase to a gold electrode: in situ monitoring by surface-enhanced infrared absorption spectroscopy, *J Am Chem Soc 126*, 16199-16206.
- 9. Ataka, K., and Heberle, J. (2007) Biochemical applications of surface-enhanced infrared absorption spectroscopy, *Anal Bioanal Chem 388*, 47-54.
- 10. Hatta, A., Ohshima, T., and Suëtaka, W. (1982) Observation of the enhanced infrared absorption of p-nitrobenzoate on Ag island films with an ATR technique, *Applied Physics A: Materials Science & amp; Processing 29*, 71-75.
- 11. Hatta, A., Suzuki, Y., and Suëtaka, W. (1984) Infrared absorption enhancement of monolayer species on thin evaporated Ag films by use of a Kretschmann configuration: Evidence for two types of enhanced surface electric fields, *Applied Physics A: Materials Science & amp; Processing 35*, 135-140.
- 12. Osawa, M. (1997) Dynamic Processes in Electrochemical Reactions Studied by Surface-Enhanced Infrared Absorption Spectroscopy (SEIRAS), *Bulletin of the Chemical Society of Japan 70*, 2861-2880.
- 13. Nishikawa, Y., Fujiwara, K., and Shima, T. (1991) A Study on the Qualitative and Quantitative Analysis of Nanogram Samples by Transmission Infrared Spectroscopy with the Use of Silver Island Films, *Appl. Spectrosc.* 45, 747-751.
- 14. Osawa, M., and Ikeda, M. (1991) Surface-enhanced infrared absorption of p-nitrobenzoic acid deposited on silver island films: contributions of electromagnetic and chemical mechanisms, *The Journal of Physical Chemistry 95*, 9914-9919.
- 15. Nishikawa, Y., Fujiwara, K., Ataka, K., and Osawa, M. (1993) Surface-enhanced infrared external reflection spectroscopy at low reflective surfaces and its application to surface analysis of semiconductors, glasses, and polymers, *Analytical Chemistry 65*, 556-562.
- 16. Aroca, A. S., and Ross, D. J. (2004) Surface-Enhanced Infrared Spectroscopy, *Applied Spectroscopy 58*, 324A-338A.
- 17. Pohl, D. (2001) Near-Field Optics and the Surface Plasmon Polariton, In *Near-Field Optics and Surface Plasmon Polaritons* (Kawata, S., Ed.), pp 1-13, Springer Berlin / Heidelberg.
- 18. Merklin, G. T., and Griffiths, P. R. (1997) Influence of Chemical Interactions on the Surface-Enhanced Infrared Absorption Spectrometry of Nitrophenols on Copper and Silver Films, *Langmuir* 13, 6159-6163.
- 19. Krauth, O., Fahsold, G., and Pucci, A. (1999) Asymmetric line shapes and surface enhanced infrared absorption of CO adsorbed on thin iron films on MgO(001), *The Journal of Chemical Physics 110*, 3113-3117.

- 20. (2002) *Handbook of Vibrational Spectroscopy*, Vol. 1, Chalmers, J.M. P. R.Griffiths, P.R. ed., Wiley, Chichester.
- 21. Osawa, M., and Ataka, K.-i. (1992) Electromagnetic mechanism of enhanced infrared absorption of molecules adsorbed on metal island films, *Surface Science 262*, L118-L122.
- 22. Barth, A. (2007) Infrared spectroscopy of proteins, *Biochim Biophys Acta* 1767, 1073-1101.
- 23. Delgado, J. M., Orts, J. M., Pérez, J. M., and Rodes, A. (2008) Sputtered thin-film gold electrodes for in situ ATR-SEIRAS and SERS studies, *Journal of Electroanalytical Chemistry 617*, 130-140.
- 24. Tolstoy, V. P., Chernyshova, I. V., and Skryshevsky, V. A. (2003) *Handbook of Infrared Spectroscopy of Ultrathin Films*, John Wiley & Sons, Inc.
- 25. Merklin, G. T., L.-T. He, L.-T., and Griffiths, P. R. (1999) Surface-Enhanced Infrared Absorption Spectrometry of p-Nitrothiophenol and its Disulfide, *Applied Spectroscopy 53*, 416A.
- 26. Wan, L.-J., Terashima, M., Noda, H., and Osawa, M. (2000) Molecular Orientation and Ordered Structure of Benzenethiol Adsorbed on Gold(111), *The Journal of Physical Chemistry B* 104, 3563-3569.
- 27. Matsuda, N., Yoshii, K., Ataka, K., Osawa, M., Matsue, T., and Uchida, I. (1992) Surface-Enhanced Infrared and Raman Studies of Electrochemical Reduction of Self-Assembled Monolayers Formed from p-Nitrohiophenol at Silver, *Chemistry Letters 21*, 1385.
- 28. Elliott, A., and Ambrose, E. J. (1950) Structure of synthetic polypeptides, *Nature 165*, 921-922.
- 29. Krimm, S., and Bandekar, J. (1986) Vibrational spectroscopy and conformation of peptides, polypeptides, and proteins, *Adv Protein Chem 38*, 181-364.
- 30. Bandekar, J. (1992) Amide modes and protein conformation, *Biochim Biophys Acta 1120*, 123-143.
- 31. Miyazawa, T., Shimanouchi, T., and Mizushima, S.-i. (1956) Characteristic Infrared Bands of Monosubstituted Amides, *The Journal of Chemical Physics* 24, 408-418.
- 32. Hellwig, P. (1998) Elektronen- und Protonentransfer in der Cytochrom *c* Oxidase von *Paracoccus denitrificans*, p 203, Erlangon-Nûrnberg.
- 33. Zhuang, J., Reddi, A. R., Wang, Z., Khodaverdian, B., Hegg, E. L., and Gibney, B. R. (2006) Evaluating the Roles of the Heme a Side Chains in Cytochrome c Oxidase Using Designed Heme Proteins[†], *Biochemistry* 45, 12530-12538.
- 34. Warburg, O., and Gewitz, H.-S. (1951) Cytohämin aus Herzmuskel, *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie 288*, 1-4.
- 35. Chapman, S., Daff, S., and Munro, A. (1997) Heme: The most versatile redox centre in biology? Metal Sites in Proteins and Models, (Hill, H., Sadler, P., and Thomson, A., Eds.), pp 39-70, Springer Berlin / Heidelberg.
- 36. Paul, K. G., Högfeldt, E., Sillén, L. G., and Kinell, P.-O. (1950) The splitting with silver salts of the cysteine-porphyrin bonds in cytochrome c, *Acta Chemica Scandinavica* 4, 239-244.
- 37. Martin, G. (1961) Spectra of porphyrins, *Journal of Molecular Spectroscopy* 6, 138-163.
- 38. Wyer, J. A. (2010) Absorption in the Q-band region by isolated ferric heme+ and heme+(histidine) in vacuo, *J. Chem. Phys.* 133, 084306.
- 39. Spiro, T. G., and Li, X.-Y. (1998) *Resonance Raman Spectroscopy of Metalloporphyrins, Chapter 1 in Biological Applications of Resonance Raman Spectroscopy*, Vol. 1, Wiley and Sons, New York.
- 40. Hellwig, P., Soulimane, T., Buse, G., and Mantele, W. (1999) Electrochemical, FTIR, and UV/VIS spectroscopic properties of the ba(3) oxidase from Thermus thermophilus, *Biochemistry 38*, 9648-9658.
- 41. Berthomieu, C., Boussac, A., Mantele, W., Breton, J., and Nabedryk, E. (1992) Molecular changes following oxidoreduction of cytochrome b559 characterized by Fourier transform infrared difference spectroscopy and electron paramagnetic resonance: photooxidation in photosystem II and electrochemistry of isolated cytochrome b559 and iron protoporphyrin IX-bisimidazole model compounds, *Biochemistry 31*, 11460-11471.

- 42. Marboutin, L., Boussac, A., and Berthomieu, C. (2006) Redox infrared markers of the heme and axial ligands in microperoxidase: Bases for the analysis of c-type cytochromes, *J Biol Inorg Chem* 11, 811-823.
- 43. Susi, H., and Byler, D. M. (1986) Resolution-enhanced Fourier transform infrared spectroscopy of enzymes, *Methods Enzymol* 130, 290-311.
- 44. Susi, H., and Byler, D. M. (1983) Protein structure by Fourier transform infrared spectroscopy: second derivative spectra, *Biochem Biophys Res Commun 115*, 391-397.
- 45. Byler, D. M., and Susi, H. (1986) Examination of the secondary structure of proteins by deconvolved FTIR spectra, *Biopolymers 25*, 469-487.
- 46. Dong, A., Huang, P., and Caughey, W. S. (1990) Protein secondary structures in water from second-derivative amide I infrared spectra, *Biochemistry 29*, 3303-3308.
- 47. El Khoury, Y., Hielscher, R., Voicescu, M., Gross, J., and Hellwig, P. (2011) On the specificity of the amide VI band for the secondary structure of proteins, *Vibrational Spectroscopy* 55, 258-266.
- 48. Dong, A., Caughey, B., Caughey, W. S., Bhat, K. S., and Coe, J. E. (1992) Secondary structure of the pentraxin female protein in water determined by infrared spectroscopy: effects of calcium and phosphorylcholine, *Biochemistry 31*, 9364-9370.
- 49. Dong, A. C., Huang, P., and Caughey, W. S. (1992) Redox-dependent changes in betaextended chain and turn structures of cytochrome c in water solution determined by second derivative amide I infrared spectra, *Biochemistry 31*, 182-189.
- 50. Kong, J., and Yu, S. (2007) Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures, *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai) 39*, 549-559.
- 51. Trasatti, S., and Petrii, O. A. (1992) Real surface area measurements in electrochemistry, *Journal of Electroanalytical Chemistry 327*, 353-376.
- 52. Hellwig, P., Rost, B., and Mantele, W. (2001) Redox dependent conformational changes in the mixed valence form of the cytochrome c oxidase from p. The reorganization of glutamic acid 278 is coupled to the electron transfer from/to heme a and the binuclear center. denitrificans, *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc 57A*, 1123-1131.
- 53. Moss, D., Nabedryk, E., Breton, J., and Mantele, W. (1990) Redox-linked conformational changes in proteins detected by a combination of infrared spectroscopy and protein electrochemistry. Evaluation of the technique with cytochrome *c*, *Eur J Biochem* 187, 565-572.
- 54. Hellwig, P., Rost, B., Kaiser, U., Ostermeier, C., Michel, H., and Mantele, W. (1996) Carboxyl group protonation upon reduction of the Paracoccus denitrificans cytochrome c oxidase: direct evidence by FTIR spectroscopy, *FEBS Lett 385*, 53-57.
- 55. Hellwig, P., Behr, J., Ostermeier, C., Richter, O. M., Pfitzner, U., Odenwald, A., Ludwig, B., Michel, H., and Mantele, W. (1998) Involvement of glutamic acid 278 in the redox reaction of the cytochrome c oxidase from Paracoccus denitrificans investigated by FTIR spectroscopy, *Biochemistry 37*, 7390-7399.
- 56. Hellwig, P., Pfitzner, U., Behr, J., Rost, B., Pesavento, R. P., Donk, W. V., Gennis, R. B., Michel, H., Ludwig, B., and Mantele, W. (2002) Vibrational modes of tyrosines in cytochrome c oxidase from Paracoccus denitrificans: FTIR and electrochemical studies on Tyr-D4-labeled and on Tyr280His and Tyr35Phe mutant enzymes, *Biochemistry 41*, 9116-9125.
- 57. Laviron, E. (1979) General expression of the linear potential sweep voltammogram in the case of diffusionless electrochemical systems, *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry 101*, 19-28.
- 58. Bard, A. J., and Faulkner, L. R. (2000) *Electrochemical methods : fundamentals and applications*, Wiley ed., New York.
- 59. Clark, R. A., and Bowden, E. F. (1997) Voltammetric Peak Broadening for Cytochrome c/Alkanethiolate Monolayer Structures: Dispersion of Formal Potentials, *Langmuir* 13, 559-565.

Chapitre III : Matériels & Méthodes

1. Préparation des échantillons

1.1. Echantillons de cytochrome c oxydase de type ba₃

Le cytochrome ba₃ de T.thermophilus est préparé dans le laboratoire du Pr. James A. Fee (Department of Molecular Biology, The Scripps Research Institute, La Jolla, California, USA). Pour l'électrochimie en moyen infrarouge, la protéine est transférée dans un tampon phosphate (Kpi) 50mM contenant 100 mM de KCl, qui est notre sel de fond et avec 0.05 % de DDM (n–Dodecyl–β–maltoside) à pH 6.4, 7.5, 8 et 8.5. Le changement de tampon et la concentration de la protéine se sont effectués dans un dispositif d'ultrafiltration Microcon (Millipore, Billerica, MA 01821, USA) de 0.5 mL avec un seuil de coupure à 50 kDa dans une centrifuge 5804 R (Eppendorf, Le Pecq, France) à 5 °C. La protéine est lavée plusieurs fois avec le tampon choisi à une vitesse de 5000 tr/min pendant 40 min. La concentration de la protéine est estimée en UV/Visible entre 800 et 400 nm. La protéine étant dans un état oxydé, du dithionite de sodium (Na₂S₂O₄.2H₂O) est alors ajoutée pour obtenir sa réduction. La différence de la bande à 560 nm (forme réduite) moins celle à 590 nm (forme oxydée) avec $\Delta \epsilon_{560-590 nm} = 26 \text{ mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ donne une indication de la concentration approximative de la protéine.(1) Les valeurs trouvées sont typiquement de l'ordre de 2 mM. Pour l'étude avec les nanoparticules, la protéine est lavée 8 fois consécutivement avec un tampon phosphate 50 mM à pH 6.4, 7.5, 8 et 8.5 suivant la même procédure que précédemment, sans mesurer la concentration finale de la protéine.

1.2. Echantillons de cytochrome c_{552} et c_1

Le cytochrome c_{552} et le cytochrome c_1 de *T.thermophilus* sont préparées par le Pr. Bernd Ludwig (Institute of Biochemistry, Molecular Genetics, Biocenter Goethe–Universität, Frankfurt, Germany). Pour l'électrochimie en moyen infrarouge, un tampon phosphate 50 mM à pH 8 avec 100 mM de KCl, qui est notre sel de fond, est utilisé. Les protéines sont concentrées avec un dispositif d'ultrafiltration avec un seuil de coupure à 10 kDa. Comme précédemment la détermination de la concentration de la protéine s'obtient en soustrayant une bande de la forme réduite à une bande de la forme oxydée. Pour le c_{552} la bande à 552 nm est utilisée ($\Delta \epsilon_{552nm(réduite)-552nm(oxydée) = 21 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (2) et pour le c_1 à 551 nm $\Delta \epsilon_{551(réduite)-540nm(oxydée)} = 19.2 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.(3)

Les coefficients sont plus faibles que ceux des autres cytochromes issus d'autres organismes. Les concentrations trouvées sont de l'ordre de 2 mM pour le c_{552} et de 5 mM pour le c_1 . Pour l'étude avec les nanoparticules, le tampon utilisé est phosphate 50 mM à pH 8.

1.3. Echantillons de laccase

La laccase de l'organisme *Bacillus subtilis* provient du laboratoire du Pr. Andrew Griffiths (U.M.R. 7006, ISIS, Strasbourg, France). Cette laccase est préparée dans un tampon phosphate 50 mM, à pH 8 pour permettre l'étude avec les nanoparticules.

1.4. Echantillons de cytochrome c de cœur de bœuf

Le cytochrome *c* de cœur de bœuf (Sigma Aldrich, St Louis, Missouri, USA) est préparé dans un tampon phosphate 50 mM à pH 8. La concentration utilisée pour l'étude avec les nanoparticules est de l'ordre de 0.1 mM.

1.5. Préparation des nanoparticules

La spectroscopie UV/Visible est utilisée pour déterminer la taille moyenne des nanoparticules mesurée à partir de la bande plasmonique située vers 521 nm. Le rapport se fait entre l'absorbance maximale pour la bande plasmonique et la ligne de base (A_{521}/A_{450}) . La valeur obtenue est alors comparée à celle des tables.(4) En fait, le nom complet est la bande plasmonique localisée. Cette bande, qui absorbe dans le visible, est liée à la présence de plasmons qui sont dus à des oscillations collectives des électrons de conduction de haute densité. Elle dépend de la taille des nanoparticules mais également de la fonction diélectrique et du milieu environnant de la nanoparticule. Ce plasmon se caractérise par une excitation localisée du plasmon d'électrons à l'intérieur des nanoparticules. Pour des nanoparticules d'une taille inférieure à 5 nm, cette bande n'est pas présente en raison de la réduction du chemin des électrons.(5, 6)

Les nanoparticules fonctionnalisées avec du citrate de sodium sont synthétisées par Thomas Meyer (Stagiaire M2) suivant la procédure initiée par Turkevitch en 1951 (7) et affinée par Frens en 1972.(8) Une solution de HAuCl₄ dans de l'eau milliQ est portée à ébullition puis une solution aqueuse de citrate de sodium est ajoutée. La température a été maintenue pendant 15 min puis la solution est refroidie à température ambiante. Les nanoparticules ainsi obtenues sont concentrées par centrifugation à 10000 tr/min pendant 30 min et redispersées dans 1 % de son volume initial. Des nanoparticules d'une taille de 15 nm sont donc synthétisées.

Pour les nanoparticules fonctionnalisées avec de l'acide thioctique, une procédure différente est utilisée par Thomas Meyer. Elles sont synthétisées selon la méthode de Brust-Schiffrin.(9)

Il s'agit d'une technique à froid qui nécessite un agent de transfert de phase afin de transférer les ions Au³⁺ de la phase aqueuse vers la phase organique dans le but de pouvoir les réduire avec NaBH₄ en présence du ligand désiré. Une solution aqueuse de HAuCl₄ est agité pendant 30 minutes avec une solution de TOABr dans du toluène. L'acide-±- α -lipoïque ou acide thioctique est ajouté lorsque le sel d'or est transféré vers la phase organique. La solution diphasique obtenue est agitée 30 minutes à température ambiante, avant d'être refroidie dans un bain eau/glace. Une solution de NaBH₄ est ensuite ajoutée à la solution et le mélange est agité pendant 3 heures à 3 °C. Les phases sont séparées par extraction et la phase aqueuse de couleur rouge est conservée. Des nanoparticules d'une taille inférieure à 2 nm sont donc obtenues à cause de l'absence de la bande plasmonique en UV/Visible.

1.6. Préparation de l'électrode

L'électrode d'or polycristalline de diamètre 2 mm est d'abord polie manuellement avec une poudre d'alumine de taille 1 et 0.05 μ m puis passée pendant 15 min dans un bain d'ultrasons. Cette électrode est activée en la plongeant dans une solution de H₂SO₄ à 0.1 M et en maintenant un potentiel de +2.0 V pendant 5 s, -0.35 V pendant 10 s puis par voltampérométrie cyclique de -0.35 V à 1.5 V en faisant 100 scans à 4 V.s⁻¹. Un voltampérogramme final est alors pris entre -0.35 V à 1.5 V à 0.1 V.s⁻¹ pour être comparé à celui d'une surface d'or polycristalline.(*10*) Le voltampérogramme de la figure 3.1.1 se caractérise par un pic d'oxydation situé à 1.2 V et par un pic de réduction de l'Au-O à 0.9 V La surface réelle de l'électrode (ou aire microscopique) a été estimée par l'intégration du pic de réduction de l'Au-O à 0.9 V en prenant comme valeur 390 μ C.cm⁻² pour une monocouche d'oxyde chimisorbée sur une surface d'or polycristalline.(*11*) Tous les potentiels sont pris par rapport à une électrode de référence de type Ag/AgCl 3M KCl.

Immédiatement après le nettoyage, la surface est séchée et une goutte des nanoparticules stabilisées avec du citrate de sodium est déposée sur la surface de l'électrode et séchée à l'air ambiant. Deux autres dépôts sont faits. L'électrode est ensuite plongée dans une solution de H_2SO_4 à 0.1 M et un voltampérogramme est fait entre -0.35 V à 1.5 V à 0.1 V.s⁻¹ jusqu'à stabilisation du signal et la nouvelle surface d'or est estimée par intégration du pic de réduction de l'Au-O. Enfin, l'électrode est immergée, pendant une nuit, soit dans une solution de DTSP (dithiobis (succinimidyle propionate)) dans le diméthylsulfoxyde pour une concentration finale de 2 mM, soit dans une solution de 1 mM d'hexanethiol et 6-mercaptohexan-1-ol dans l'éthanol (ratio 1:1).

Après avoir rincé l'électrode avec du tampon, 2 µL de protéine est déposée sur l'électrode pendant 8 à 10 h à 4 °C. Finalement l'électrode est lavée plusieurs fois avec du tampon



Figure 3.1.1 : Voltampérogramme de l'électrode d'or polycristalline nue à une vitesse de balayage de 0.1 V.s^{-1} (dans H₂SO₄ 0.1 M).

Pour les nanoparticules fonctionnalisées avec de l'acide thioctique, le protocole est différent. L'électrode est tout d'abord trempée pendant 24 h dans une solution de 1 mM de biphényl-4,4'-dithiol dans l'éthanol avant d'être replongée pendant 24 h dans la solution de nanoparticules d'or. Après avoir rincé l'électrode avec du tampon, 2 μ L de protéine est déposée sur l'électrode avec la même procédure que précédemment.

1.7. Etude en TEM (Transmission Electron Microscopy)

Pour les mesures en TEM, une solution de cytochrome c_1 de concentration 0.05 mM dans un tampon phosphate 50 mM à pH 8 est préparée dans laquelle est ajoutée un excès de DTSP. Le mélange est alors vigoureusement agité pour 3 heures à 4 °C. L'excès du modifiant est enlevé par centrifugation et 1 µL de nanoparticules d'or a été ajouté. Le mélange est de nouveau agité pour 3 heures et centrifugé pour 10 min pour enlever l'excès de protéines. Par la suite, le surnageant est retiré et les nanoparticules d'or précipitées sont redispersées dans un tampon phosphate 50 mM à pH 8. La centrifugation est de nouveau répétée. 5 µL de la solution sont déposés sur une grille de cuivre de taille 400 mesh. Pour pouvoir observer les protéines, 5 µL d'acétate d'uranyle sont ajoutés. Le microscope utilisé est un CM 12 (Philips, Pays-Bas) utilisant une tension accélératrice des électrons de 120 kV.

Les images des nanoparticules fonctionnalisées avec du citrate du sodium et celles avec la protéine immobilisée sont réalisées et analysées par Christian Blanck et Marc Schmutz de l'Institut Charles Sadron (Strasbourg, France).

2. Etudes spectroscopiques

2.1. Eléments optiques pour les mesures en infrarouge

Le choix des éléments optiques est primordial pour effectuer des mesures en absorbance en moyen infrarouge. Ces différents éléments sont listés dans le tableau 3.2.1.

	MIR		
Source	Globar		
Gamme de fréquence	$4000-800 \text{ cm}^{-1}$		
Séparatrice	KBr		
Détecteur	MCT		
Nombre de scans	256		
Vitesse de scans	20 kHz		
Fenêtres	CaF ₂ , diamant et Si (ATR)		

Tableau 3.2.1 : Vue d'ensemble des éléments optiques pour la gamme d'infrarouge utilisée.

Les mesures en spectroélectrochimie sont faites avec un VERTEX 70 de chez Bruker Optics (Karlsruhe, Allemagne) de 4000 à 1000 cm⁻¹ en utilisant un détecteur MCT (Mercury Cadmium Telluride) refroidi à l'azote liquide et une source Globar. Typiquement 256 scans sont enregistrés avec une résolution de 4 cm⁻¹. Les fenêtres utilisées sont du CaF₂ (Korth Kristalle GMBH, Allemagne). Pour les mesures en RTA, les mêmes paramètres sont appliqués pour le moyen infrarouge en utilisant un cristal de diamant ou un cristal de Si pour les mesures en SEIRAS. Tous les spectromètres sont purgés avec de l'air sec.

2.2. UV/Visible

Les différents spectres présents ici sont enregistrés avec l'aide d'un spectromètre Varian Cary Scan 300 (Agilent Technologies, Santa Clara, USA).

Les spectres en absorbance utilisés pour déterminer la concentration des échantillons sont faits avec des cuvettes en quartz (Helma) d'une longueur de 1 cm. Les spectres différentiels en UV/Visible sont réalisés avec la cellule OTTLE sur le même appareil.

Dans la cellule OTTLE, les fenêtres utilisées sont des fenêtres de CaF_2 de 4 µm de chemin optique. Pour déterminer les potentiels de demi-vague, l'évolution de la bande de Soret et de la bande α durant la titration oxydative est suivie. Pour une meilleure équilibration, des médiateurs sont rajoutés. Les données sont collectées entre 200 et 800 nm à 8 °C.

Trois scans sont moyennés pour chaque potentiel. Le potentiel de départ est -500 mV jusqu'à 500 mV avec des pas de 25 mV pour un temps d'équilibre qui varie selon la protéine étudiée. La valeur des absorbances *versus* potentiel appliquée à une longueur d'onde donnée est ensuite effectuée. L'analyse de ce graphique se fait grâce à une équation de type Nernst, d'où un potentiel de demi-vague est tiré :

$$A(p) = \sum \frac{A_{max}}{1 + e^{(p - E_m)\frac{nF}{RT}}}$$
 Equation 22

où A_{max} est le changement maximum en absorbance ; **p** est le potentiel appliqué en V ; E_m est le potentiel de demi-vague du groupe rédox actif ou cofacteur en V ; **n** est le nombre d'électrons transférés (peut varier de 0,8 à 1) ; **F** est la constante de Faraday en C ; **R** est la constante universelle des gaz parfaits en J.mol⁻¹.K⁻¹; **T** est la température à laquelle s'est effectuée l'expérience en K.

Ce potentiel de demi-vague est, en fait, le potentiel pour lequel la moitié des centres redox est réduit.

2.3. Réflexion Totale Atténuée Exaltée de Surface

L'utilisation de la Réflexion Totale Atténuée maintient les avantages de cette technique.(*12*) L'amélioration est assez forte pour obtenir des spectres à partir seulement d'une monocouche de protéines.

Les mesures sont effectuées avec un cristal de Si modifié avec une surface d'or d'une épaisseur de 20 nm déposée à l'aide d'un métalliseur (courant 30 A, pression d'Argon de 0.06 mbar, temps de dépôt 10 minutes) (Cressington 108 Auto, Watford WD19 4BX, England UK). Cette méthode permet de caractériser la surface obtenue sur l'électrode par dépôts successifs et ainsi de confirmer que les voltampérogrammes obtenus sont bien ceux de la protéine et donc que la protéine est adsorbée à la surface. La modification de surface est effectuée dans le même ordre que celle effectuée sur l'électrode. La durée du dépôt correspond au temps de séchage de la goutte. La vérification de l'attachement est faite en refaisant un spectre en lavant la surface avec le solvant utilisé.
2.4. Détermination de la structure secondaire

La structure secondaire des différents cytochromes est déterminée à partir de la bande Amide I qui se situe entre 1700 et 1600 cm⁻¹. La position de la vibration C=O, majoritaire dans la bande Amide I, dépend des liaisons Hydrogène et donc de la structure secondaire. Une régression est alors réalisée en utilisant un mélange de bandes Gaussienne et Lorentzienne grâce au programme Peakfit (Systat Software, San Jose, Californie, USA). Les paramètres utilisés sont originaires de la dérivée seconde extraite de la bande Amide I. Chaque bande, qui résulte de la régression, peut être assignée à la structure secondaire en se basant sur la fréquence de la bande obtenue.(*13-15*)

L'aire de chaque bande donne alors le pourcentage de chaque élément structural. L'erreur standard de ces calculs est de l'ordre de 10 %. On suppose enfin que les coefficients d'extinction molaire sont égaux pour tous les éléments de la structure secondaire.(*13-15*)

2.5. Électrochimie

2.5.1. Spectroélectrochimie

La spectroélectrochimie effectuée pendant cette thèse est effectuée grâce à la cellule OTTLE, elle repose sur un système à 3 électrodes. Une électrode de référence de type Ag/AgCl 3M KCl avec un potentiel de -208 mV par rapport à l'ENH est utilisée. Tous les potentiels sont référencés par rapport à une référence de type Ag/AgCl 3M KCl. La contre électrode consiste en un fil de platine. L'électrode de travail est une grille en or d'une épaisseur de 4 à 6 μ m (55% transmission, 35x35 μ m, Precision Eforming, New York, USA) et le potentiel appliqué sur l'électrode de travail est contrôlé par un potentiostat fait maison.

2.5.2. Électrochimie classique

Dans le cas de l'électrochimie classique, un système à trois électrodes est également utilisé. Comme précédemment, l'électrode de référence est de type Ag/AgCl 3M KCl et le fil de platine est la contre électrode. L'électrode de travail est une électrode en or polycristalline de diamètre 2 mm, son potentiel est contrôlé par un potentiostat VersaSTAT 4 (Princeton Applied Research, Metek, Tennesse, USA).

Pour éviter une dénaturation des protéines utilisées durant la spectroélectrochimie, il est important de modifier chimiquement la surface en or.

Deux modifiants la cystéamine hydrochlorate et l'acide 3-mercaptopropionique à une concentration de 2 mM sont utilisés. L'électrode est plongé dans ces 2 modifiants pendant 20 min à température ambiante puis rincé avec de l'eau MilliQ avant d'être déposé sur la fenêtre de CaF_2 (voir figure 3.2.1).



Figure 3.2.1 : Schéma de la grille d'or modifiée (en rouge : acide 3-mercaptopropionique ; en noir : cystéamine hydrochlorate ; en jaune : la grille d'or).

Cependant, des protéines sont souvent très grandes et dans beaucoup de cas le centre actif est enfoui très profondément à l'intérieur. Le transfert d'électron entre l'électrode et le centre actif décroit de façon exponentielle avec la distance, ce transfert est donc très lent. Pour l'améliorer, l'utilisation de médiateurs est primordiale.

Pour la spectroélectrochimie, un cocktail de 19 médiateurs est ajouté à chaque échantillon de protéine. Les médiateurs ont été choisis de façon adéquate pour couvrir un potentiel de -600 à +600 mV vs. Ag/AgCl 3M KCl et qui répond aux gammes de potentiels pour les protéines étudiées (voir tableau 3.2.2). Ces médiateurs ont une concentration finale de 13 μ M, ils n'ont donc aucune contribution dans les différents spectres. La concentration moyenne de nos protéines est de 2 mM.

Produits	E _m (mV)	Solvant
	vs. Ag/AgCl 3M KCl	
(Ferrocènylméthyle)triméthylammonium	+607	Ethanol
iodide		
Acide 1,1'-ferrocène dicarboxylique	+436	Ethanol
Potassiumhexacyanoferrate(II) trihydraté	+212	Eau
1,1'-diméthylferrocène	+133	Ethanol
Quinhydrone	+70	Ethanol
Tetrachloro-1,4-benzoquinone	+72	Acétone
N,N,N',N'-tétraméthyl-p-phénylenediamine	+62	Eau
2,6-dichlorophenolindophenol sel de sodium	+9	Ethanol
Hexaammineruthenium(III)chlorure	-8	Eau
Acide Anthraquinone sulfonique -2- sodium	-23	Eau
1,4-naphthoquinone hydraté	-63	Ethanol
Anthraquinone	-108	Ethanol
5-hydroxy-1,4-naphtoquinone	-158	Ethanol
Duroquinone	-198	Ethanol
Ménadione	-220	Acétone
2-hydroxyl-1,4 naphthoquinone	-333	Ethanol
Acide 9,10-antraquinone-2,6-disulfonique	-433	Ethanol
Rouge Neutre	-515	Ethanol
Méthyl viologène dichloride hydraté	-628	Eau

Tableau 3.2.2 : Liste des 19 médiateurs utilisés en électrochimie ainsi que leurs potentiels de demi-vague respectifs.(16)

3. Références

- 1. Chen, Y., Hunsicker-Wang, L., Pacoma, R. L., Luna, E., and Fee, J. A. (2005) A homologous expression system for obtaining engineered cytochrome ba3 from Thermus thermophilus HB8, *Protein Expr Purif* 40, 299-318.
- 2. Soulimane, T., von Walter, M., Hof, P., Than, M. E., Huber, R., and Buse, G. (1997) Cytochrome-c552 from Thermus thermophilus: a functional and crystallographic investigation, *Biochem Biophys Res Commun 237*, 572-576.
- 3. Iwaki, M., Osyczka, A., Moser, C. C., Dutton, P. L., and Rich, P. R. (2004) ATR-FTIR spectroscopy studies of iron-sulfur protein and cytochrome c1 in the Rhodobacter capsulatus cytochrome bc1 complex, *Biochemistry* 43, 9477-9486.
- 4. Haiss, W., Thanh, N. T., Aveyard, J., and Fernig, D. G. (2007) Determination of size and concentration of gold nanoparticles from UV-vis spectra, *Anal Chem 79*, 4215-4221.
- 5. Kreibig, U., and Vollmer, M. (1995) *Optical Properties of Metal Clusters* Vol. 25, Springer Series in Materials Science.
- 6. Bohren, C. F., and Huffman, D. R. (1983) *Absorption and Scattering of Light by Small Particles*, Wiley, New york.
- 7. Turkevich, J., Stevenson, P. C., and Hillier, J. (1951) A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold, *Discussions of the Faraday Society* 11, 55-75.
- 8. Frens, G. (1972) Particle size and sol stability in metal colloids, *Colloid & Colloid & Coll*
- 9. Brust, M., Walker, M., Bethell, D., Schiffrin, D. J., and Whyman, R. (1994) Synthesis of thiolderivatised gold nanoparticles in a two-phase Liquid-Liquid system, *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, 801-802.
- 10. Abad, J. M., Gass, M., Bleloch, A., and Schiffrin, D. J. (2009) Direct electron transfer to a metalloenzyme redox center coordinated to a monolayer-protected cluster, *J Am Chem Soc 131*, 10229-10236.
- 11. Trasatti, S., and Petrii, O. A. (1992) Real surface area measurements in electrochemistry, *Journal of Electroanalytical Chemistry 327*, 353-376.
- 12. Nowak, C., Luening, C., Knoll, W., and Naumann, R. L. (2009) A two-layer gold surface with improved surface enhancement for spectro-electrochemistry using surface-enhanced infrared absorption spectroscopy, *Appl Spectrosc* 63, 1068-1074.
- 13. Goormaghtigh, E., Cabiaux, V., and Ruysschaert, J. M. (1994) Determination of soluble and membrane protein structure by Fourier transform infrared spectroscopy. I. Assignments and model compounds, *Subcell Biochem* 23, 329-362.
- 14. Goormaghtigh, E., Cabiaux, V., and Ruysschaert, J. M. (1994) Determination of soluble and membrane protein structure by Fourier transform infrared spectroscopy. II. Experimental aspects, side chain structure, and H/D exchange, *Subcell Biochem 23*, 363-403.
- 15. Goormaghtigh, E., Cabiaux, V., and Ruysschaert, J. M. (1994) Determination of soluble and membrane protein structure by Fourier transform infrared spectroscopy. III. Secondary structures, *Subcell Biochem 23*, 405-450.
- 16. Hellwig, P., Behr, J., Ostermeier, C., Richter, O. M., Pfitzner, U., Odenwald, A., Ludwig, B., Michel, H., and Mantele, W. (1998) Involvement of glutamic acid 278 in the redox reaction of the cytochrome c oxidase from Paracoccus denitrificans investigated by FTIR spectroscopy, *Biochemistry 37*, 7390-7399.

Chapitre IV : Etude de l'influence du pH sur la cytochrome c oxydase de type ba₃ de Thermus thermophilus

1. Introduction

Le cytochrome ba_3 de *T. thermophilus* est la plus petite cytochrome *c* oxydase connue. Elle est très bien étudiée et c'est une des seules oxydases avec une structure en 3D bien connue.(*1*) Elle possède 764 résidus pour une masse de 84, 884 kDa. Cette protéine est l'accepteur terminal d'électrons, la dernière enzyme de la chaîne respiratoire. Elle est responsable de la réduction de l'oxygène moléculaire en eau.(2) Une caractéristique de cette protéine est la possibilité d'étudier la contribution de chaque hème individuellement (l'hème *b* et l'hème a_3) que ce soit en infrarouge ou en UV/visible contrairement au cytochrome $aa_3.(3, 4)$

Il est alors intéressant, grâce à l'infrarouge couplé à l'électrochimie, de montrer les conséquences de ce changement d'un point de vue conformationel sur l'ensemble de la protéine et sur chaque hème de façon individuelle. Cette inversion de potentiel engendre donc des changements structuraux. En effet, le potentiel de demi-vague d'une protéine est déterminé par la nature du ligand axial relié à l'hème mais également par les groupes fonctionnels ionisables situés à proximité de l'hème. Il a été proposé que l'interaction entre les chaînes principales des propionates des hèmes et les charges positives des ions ferriques détermine la valeur du potentiel et joue un rôle dans le changement de conformation dû à l'état redox.(5) Les changements intervenants dans les propionates des hèmes sont les plus intéressants.

Le chemin de protons K est équivalent dans la famille des oxygènes réductases de type A.(6) D'après la figure 4.1.1, ce chemin commence par un acide aminé Glutamate (Glu) situé dans l'interface du cytoplasme des sous-unités I et II jusqu'au cofacteur Histidine-Tyrosine dans le site actif. Un changement peut aussi intervenir dans cette liaison spécifique (« cross-link ») entre l'His 240 et la Tyr 237 (voir figure 4.1.1).(6, 7) Il intervient dans le mécanisme catalytique de la protéine puisqu'il est situé à la fin du chemin de protons K à côté du site binucléaire a_3 -Cu_B et influe le potentiel de demi-vague.(8, 9) Son rôle, dans le mécanisme de réduction de l'oxygène en eau, est de donner des électrons et des protons nécessaires pour casser la liaison de l'oxygène.(10) La Tyr 237 joue un rôle crucial dans cette protéine à cause de sa proximité avec le centre binucléaire.



Figure 4.1.1 : Représentation de la structure du cytochrome *ba*₃ de *T.thermophilus* avec le chemin de protons, la présence du Cu_A, de l'hème *b* et *a*₃ et des propionates des hèmes les entourant (à gauche) et proposition de structure du chemin de protons K (à droite) (codePDB : 3S8F).(8)

Une étude a attiré notre attention. Sousa et al. ont étudié le potentiel de demi-vague en fonction du pH (voir figure 4.1.2).(11) Entre le pH 6 et 7.4 il a été montré que l'hème a_3 a un potentiel plus haut que celui de l'hème *b*. Mais quand on augmente le pH, l'effet s'inverse. L'hème a_3 a ainsi un potentiel de réduction plus haut que l'hème *b*. L'équilibre du transfert d'électrons est donc déplacé vers l'état dans lequel l'hème a_3 est réduit. Ces deux centres redox sont donc influencés par le pH. Cette inversion est due d'une part à une interaction électrostatique homotrope entre les deux hèmes et d'autre part aux interactions électrostatiques (nommées également hétérocoopérativité ou effet Bohr) que chaque hème a avec son centre protoné.

Le cytochrome ba_3 à quatre pH différents est donc étudié : pH 6.4, 7.5, 8 et 8.5. D'après la figure 4.1.2, il y a deux phases dans la modification du potentiel, plus particulièrement pour l'hème *b*. Dans la première phase c'est-à-dire entre le pH 6.4 et 7.5, il y a probablement une déprotonation d'un groupe. Et dans la seconde phase, entre le pH 8 et 8.5, il y a vraisemblablement la déprotonation d'un autre groupe. Or, pour l'hème a_3 , ce comportement est plus habituel avec la possibilité d'une déprotonation d'un unique groupe.

Les spectres différentiels permettent d'identifier ce groupe et ainsi de comprendre ce comportement inhabituel.

Ainsi, les pH 6.4 et 7.5, les pH 7.5 et 8, les pH 8 et 8.5 et les pH 8.5 et 6.4 sont comparés entre eux.

Mais tout d'abord la protéine est caractérisée à pH 8 ainsi que les spectres contenant la contribution individuelle de l'hème *b* et a_3 . La publication d'Hellwig et al. sert de base à notre étude.(*12*)



Figure 4.1.2 : Dépendance en pH du potentiel de demi-vague des hèmes b et a_3 du cytochrome ba_3 de T. thermophilus. Les potentiels sont ici donnés par rapport à l'ENH (Electrode Normal à Hydrogène) modifiée à partir de.(11)

2. Caractérisation du cytochrome ba₃ à pH 8

2.1. Spectre UV/Visible

Un spectre UV/Visible est effectué pour le cytochrome ba_3 à pH 8 pour la forme oxydée et réduite de la protéine. Le passage à la forme réduite se fait de manière réversible par un ajout de dithionite de sodium (Na₂S₂O₄.2H₂O). Ce spectre sert, d'une part à contrôler l'état redox de la protéine et d'autre part à déterminer sa concentration. La figure 4.2.1 présente les spectres du cytochrome ba_3 pour sa forme oxydée et réduite.



Figure 4.2.1 : Spectres UV/Visible du cytochrome ba_3 dans sa forme oxydée (en noir) et dans sa forme réduite (en rouge) après ajout de dithionite à pH 8.

Des contributions individuelles de l'hème *b* et a_3 sont attendues.(*13, 14*) La bande de Soret ou bande γ est observée à 413 nm pour la formé oxydée. Pour la forme réduite, la bande se scinde en deux. La bande à 427 nm est attribuée à l'hème *b* et celle à 441 nm à l'hème a_3 . Cette bande est la plus intense et elle est constituée de toutes les bandes γ de tous les hèmes. Puis, la contribution de la bande β est visible à 528 nm uniquement pour la forme oxydée. Cette bande est attribuée à l'hème *b*. Enfin, pour la forme réduite, à 558 et 611 nm, la bande α est présente. L'hème *b* est présent via la bande à 558 nm et l'hème a_3 via celle à 611 nm.(*15*) Or, le Cu_B n'a pas d'absorption dans le domaine UV/Visible. Le Cu_A a lui une contribution dans le spectre, mais ces bandes sont masquées par la contribution plus intense des hèmes. D'après des études sur un fragment du cytochrome aa_3 , il possède trois bandes à 480, 530 et 834 nm.(*16, 17*)

2.2. Etude du spectre différentiel du cytochrome ba₃

Le spectre infrarouge du cytochrome ba_3 est caractérisé à pH 8. Le potentiel appliqué est de -500 à +500mV vs. Ag/AgCl 3M KCl. Le temps d'équilibre a été mesuré en UV/Visible, il permet d'avoir la forme entièrement oxydée ou réduite. Après application du potentiel, la forme pleinement oxydée a été obtenue en 7 min et la forme réduite en 8 min. Les même temps d'équilibre ont été constatés pour tous les pH.



Figure 4.2.2 : Spectre différentiel infrarouge (ox-red) du cytochrome ba_3 à pH 8 dans la région spectrale comprise entre 1800 et 1200 cm⁻¹ entre -500 et +500 mV.

Ce spectre peut se découper en trois parties : entre 1710 et 1610 cm⁻¹, entre 1600 et 1200 cm⁻¹ et enfin entre 1200 et 1000 cm⁻¹. Les bandes sont consignées dans le tableau 4.2.1.Aucune contribution n'est constatée entre 1800 et 1710 cm⁻¹ (voir figure 4.2.2). Le rapport signal sur bruit peut être déduit dans cette zone.

Position de la bande (cm ⁻¹)	Etat	Tentative d'attribution	
1708	Ox	v(C=O) propionate des hèmes	
1698	Red	v(C=O) propionate des hèmes	
1692	Ox	v(C=O) propionate des hèmes	
1688	Red	Amide I	
1678	Ox	$v(C=O)$ CHO-hème $a_3/v(C=O)$	
		propionate des hèmes / $v(CN_3H_5)^{as}$	
		Arg/ Amide I/ Asn, Gln	
1668	Red	$v(C=O)$ CHO-hème a_3 /Amide I	
1664	Red	Amide I	
1656	Ox	Amide I	
1651	Red	Amide I	
1646	Ox	Amide I	
1630	Red	v(CN ₃ H ₅) ^s Arg/ Amide I	
1618	Red	$v(C\alpha = C\beta)$ groupe vinyl (hème b/a_3)	
		/Amide I	
1610	Ox	v_{37} hème a_3	
1590	Ox	Ring-O ⁻ Tyr	
1570	Ox	$v(COO^{-})^{as}$ propionate des hèmes,	
		Ring-O ⁻ Tyr, v_{37} hème b , v_{38x} hème	
		a_3	
1554	Red	v_{37} hème b	
1542	Red	v_{38y} hème a_3	
1536	Ox	Amide II	
1528	Ox	$v(COO^{-})^{as}$ propionate des hèmes	
1518	Red	Ring-OH Tyr	
1504	Ox	Ring-O ⁻ Tyr	
1434	Ox	v(COO ⁻) ^s Asp/Glu	
1418	Red	v(COO ⁻) ^s Asp/Glu	
1404	Ox	v(COO ⁻) ^s Asp/Glu	
1398	Red	v(COO ⁻) ^s propionate des hèmes	
1380	Ox	v_{41} hème a_3	
1280	Red	Hème	
1266	Ox	δ_{42} hème $b/a_3/v(\text{CO}^-)^{\text{s}}$ Tyr	

Tableau4.2.1 : Tentative d'assignements pour le spectre différentiel infrarouge (ox-red) du complexe ba_3 de T.thermophilus à pH 8

Dans la première région, des contributions des modes du squelette peptidique, des acides aminés et des hèmes sont attendus (voir figure 4.2.3).



Figure 4.2.3 : Spectre différentiel infrarouge (ox-red) du cytochrome ba_3 à pH 8 dans la région spectrale comprise entre 1725 et 1600 cm⁻¹ entre -500 et +500 mV.

Entre 1690 et 1610 cm⁻¹, des vibrations C=O du squelette peptidique caractérisant la structure secondaire sont visibles. Ils viennent de la réorganisation du squelette après réduction et oxydation des cofacteurs de la protéine. Plusieurs éléments structuraux caractérisant la structure secondaire sont mis en avant. A 1656 et 1664 cm⁻¹, la contribution des hélices α est visible.

Les feuillets β sont également représentés par deux bandes négatives à 1630 et 1618 cm⁻¹. La bande négative à 1651 cm⁻¹ et celle positive à 1646 cm⁻¹ sont caractéristiques de la structure aléatoire. Enfin, les boucles ont une contribution à 1688, 1678 et 1668 cm⁻¹.(*18, 19*)

Cependant, d'autres contributions sont visibles, comme celles des propionates des hèmes protonés. Ils ont quatre bandes bien distinctes à 1708, 1698, 1692 et 1678 cm⁻¹.(20)

Puis, des modes principaux d'acides aminés ont une contribution dans cette région (voir Chapitre II Techniques de caractérisation). L'Arginine, situé à proximité du site actif, contribue via deux modes de vibrations bien distinctes, une vibration $v(CN_3H_5)$ asymétrique à 1678 cm⁻¹ et une vibration $v(CN_3H_5)$ symétrique à 1630 cm⁻¹. De plus l'Asparagine et la Glutamine contribuent à la vibration v(C=O) à 1678 cm⁻¹.

Enfin, des vibrations issues des hèmes individuels sont attendues dans ce spectre. La vibration $v(C\alpha=C\beta)$ du groupe vinyle a été observe à 1620 cm⁻¹ dans les modèles d'hème *b* et à 1618 cm⁻¹ pour l'hème *a*₃. Ici, la vibration est présente à 1618 cm⁻¹ et elle est donc assignée aux deux hèmes. Une vibration v(C=O) CHO à 1668 cm⁻¹ est attribuée exclusivement à l'hème *a*₃. Enfin, la vibration C*a*C*m* de l'anneau porphyrine est visible à 1610 cm⁻¹ uniquement pour l'hème *a*₃.(*21*)

Les différentes vibrations qui existent pour les deux hèmes sont répertoriées dans les tableaux 4.2.2 et 4.2.3 (voir chapitre II Techniques de caractérisation). La vibration v_{38} et la vibration v_{41} sont les seules qui diffèrent pour l'hème a_3 . La vibration CbCb (v_{38}) se coupe en deux à cause de la symétrie de réduction de l'anneau porphyrine mais seulement pour les hèmes de type a. Deux bandes avec des axes x et y décrivent l'orientation de cette coupure.(21) Pour la vibration CaN (v_{41}) elle est donc uniquement visible pour l'hème $a_3.(21)$ La vibration v(C=O) du groupe formyle (CHO) oxydé ou réduit est exclusivement attribuée à l'hème a_3 . Elle dépend des liaisons Hydrogène avec les acides aminés voisins.

Dans la deuxième région entre 1600 et 1200 cm⁻¹, plusieurs contributions sont mises en avant (voir figure 4.2.4).



Figure 4.2.4 : Spectre différentiel infrarouge (ox-red) du cytochrome ba_3 à pH 8 dans la région spectrale comprise entre 1600 et 1200 cm⁻¹ entre -500 et +500 mV.

La région des vibrations de type Amide II, composée à 60 % de déformation N-H et à 40 % d'étirement C-N, se situe entre 1570 et 1520 cm⁻¹.

Les propionates des hèmes sont attendus dans la région Amide II mais ces bandes se chevauchent avec la contribution de chaines latérales des acides aminés déprotonées.

Les propionates des hèmes se retrouvent ici mais avec une vibration de type $v(COO^{-})$ asymétrique. Elle se situe entre 1570 et 1530 cm⁻¹. Dans notre cas, deux bandes leur sont attribuées à 1570 et 1528 cm⁻¹. De même le vibration associée $v(COO^{-})$ symétrique a une bande à 1398 cm⁻¹.(22)

Des vibrations typiques de l'anneau porphyrine sont attendues qui pourront être distinguées pour chaque hème. Tout d'abord, la vibration CaCm nommée v₃₇ est attendue entre 1655 et 1586 cm⁻¹. D'après les modèles d'hème *b*, le signal est assigné à 1570 cm⁻¹ dans sa forme oxydée et à 1554 cm⁻¹ dans sa forme réduite. Une bande à 1610 cm⁻¹ est présente pour l'hème $a_3.(20)$ Une autre vibration CbCb nommée v₃₈ est visible, à 1570 cm⁻¹, elle est décrite pour l'axe x et à 1542 cm⁻¹ pour l'axe y.(21) Puis une vibration CaN (v₄₁) est prévue entre 1389 et 1319 cm⁻¹ d'après les bandes identifiées en Raman. Ici elle se retrouve à 1380 cm⁻¹ pour l'hème $a_3.(23)$ Enfin la vibration CmH (δ_{42}) est observée entre 1268 et 1150 cm⁻¹ pour les modèles d'hème *b*. Le signal positif à 1266 cm⁻¹ est attribué à cette vibration pour les hèmes *b* et $a_3.(20)$

Pour finir, les modes de vibration des acides aminés ont également une contribution dans ce spectre comme les vibrations de l'acide Aspartique et Glutamique. Il n'y a pas de vibration de type v(C=O) dans ce spectre parce qu'il n'y a pas d'acides Aspartique et Glutamique protonés. De même, la vibration v(COO⁻) asymétrique de l'acide Aspartique et Glutamique ionisés n'est pas visible. Cependant, la vibration v(COO⁻) symétrique protonée contribue grâce à trois bandes : deux bandes positives à 1434 et 1404 cm⁻¹ et négative à 1418 cm⁻¹.(*24*) Or, cette région est très complexe et beaucoup de signaux se chevauchent entre eux. Un acide Glutamique attire plus particulièrement notre attention. Il s'agit du Glu 15, situé à l'entrée du chemin de protons K (voir figure 4.1.1). Cet acide aminé peut subir des changements dus à la dépendance pH.

D'autres acides aminés sont présents comme la Tyrosine. La vibration des chaînes latérales de l'anneau Tyrosine absorbe vers 1518 cm⁻¹ et sa forme ionisée à 1560 et 1498 cm⁻¹ d'après un assignement fait sur les acides aminés individuels.(25) Dans ce spectre, la contribution des chaînes latérales de la forme deprotonée est présente à 1590, 1570 et 1518 cm⁻¹. Une autre vibration v(CO⁻) symétrique d'une Tyrosine déprotonée est attendue dans une zone comprise entre 1280 et 1266 cm⁻¹.

Cette dernière vibration dépend des liaisons Hydrogène ce qui induit un déplacement de la bande pouvant aller jusqu'à 10 cm⁻¹. A ce pH, les Tyrosines sont probablement protonées. Ce signal reflète une dépendance pH des coefficients d'extinction molaire de la vibration due aux variations de l'environnement entourant cette Tyrosine.(26) Les bandes observées viennent probablement de la déprotonation/protonation d'un groupe Tyrosine couplée au transfert d'électron vers ou venant de l'hème *b*. Une autre explication est le changement d'environnement d'un groupe Tyrosine déprotoné couplé à l'hème a_3 . La Tyr 237 attire notre attention, elle est impliquée dans la liaison spécifique (voir figure 4.1.1.). Or, un marquage de cette Tyrosine est nécessaire pour déterminer sa contribution.

Dans la dernière région, la contribution des vibrations P=O spécifiques du tampon est uniquement visible (voir figure 4.2.5). Elle est due à la déprotonation du tampon et corrélée aux échanges de protons avec la protéine et les médiateurs suite au transfert d'électrons (voir annexe 1).(27)



Figure 4.2.5 : Spectre différentiel infrarouge (ox-red) du cytochrome ba_3 à pH 8 dans la région spectrale comprise entre 1200 et 1000 cm⁻¹ entre -500 et +500 mV.

2.3. Plage de potentiels

Le cytochrome ba_3 offre la possibilité d'étudier, de façon séparé, la contribution individuelle des hèmes *b* et a_3 . En connaissant leurs potentiels respectifs, une plage de potentiel est applicable où il y a la contribution exclusive de l'un des deux hèmes.

Pour avoir la contribution de l'ensemble du cytochrome ba_3 , le potentiel à appliquer est -500 à +500 mV. Or, comme le potentiel de demi-vague de chaque hème change en fonction du pH, la plage de potentiels doit être modifiée (voir tableau 4.2.2). En connaissant les potentiels de l'hème *b* et a_3 , une moyenne est effectuée entre ces deux potentiels. Le résultat est donc le potentiel limite à appliquer selon la contribution majoritaire voulue. Puisque les deux potentiels s'inversent, les potentiels limites sont également à inverser. A pH 7.5, le potentiel de l'hème a_3 est plus grand que l'hème *b* à l'inverse du pH 8.

Quelque soit le pH, le temps d'équilibre pour la forme entièrement oxydée est de 7 min et pour la forme entièrement réduite de 9 min après application du potentiel.

Contribution	pH 6.4	рН 7.5	pH 8	pH 8.5
Cytochrome ba_3	-500/500 mV	-500/500 mV	-500/500 mV	-500/500 mV
Hème b	-500/75 mV	-500/25 mV	20/500 mV	15/500 mV
Hème a_3	75/500 mV	25/500 mV	-500/20 mV	-500/15 mV

Tableau 4.2.2 : Plage de potentiels à appliquer pour obtenir la contribution individuelle des hèmes à différentspH. Les potentiels sont donnés vs. Ag/AgCl 3M KCl.

2.4. Etude du spectre différentiel de l'hème b

Les bandes sont consignées dans le tableau 4.2.3.

La figure 4.2.6 présente le spectre différentiel dans une plage de potentiel où la contribution majoritaire de l'hème b est attendue. Les différentes bandes qui sont spécifiques à cet hème sont mises en avant. Cependant, elles sont uniquement issues de l'anneau porphyrine et des groupes vinyle.



Figure 4.2.6 : Spectre différentiel infrarouge (ox-red) du cytochrome ba_3 à pH 8 dans la région spectrale comprise entre 1800 et 1200 cm⁻¹ de -500 à +20 mV.

Position de la bande (cm ⁻¹)	Etat	Tentative d'attribution
	redox	
1706	Ox	v(C=O) propionates des hèmes
1694	Ox	v(C=O) propionates des hèmes
1672	Red	v(C=O) hème propionates/
1656	Ox	v(CN ₃ H ₅) ^{as} Arg/Asn/Gln Amide I
1646	Or	Amida I
1040	0x	Allide I
1630	Red	v(CN ₃ H ₅) ^s Arg/Asn,/Lys/ His-H/
1618	Red	amide I $v(C\alpha=C\beta)$ groupe vinvl (hème b)/
		amide I
1580	Ox	v(COO ⁻) ^{as} propionates des hèmes/
		Ring-O ⁻ Tyr/ v_{37} hème b
1546	Red	v_{37} hème b
1537	Ox	Amide II
1518	Red	Ring-OH Tyr
1504	Ox	Ring-O ⁻ Tyr
1280	Red	Hème
1266	Ox	δ_{42} hème <i>b</i> / v(CO ⁻) ^s Tyr

Tableau 4.2.3 : Tentative d'assignements pour le spectre différentiel infrarouge (ox-red) du complexe ba_3 de T.thermophilus uniquement pour l'hème b à pH 8

A 1618 cm⁻¹, outre la contribution de la structure secondaire, une vibration v(C α =C β) du groupe vinyle est claire. La vibration v₃₇ se retrouve également ici respectivement à 1580 et 1546 cm⁻¹ pour la forme oxydée et réduite. Enfin, la vibration δ_{42} est visible à 1266 cm⁻¹.(20) Ces différentes bandes ont déjà été décrites précédemment.

2.5. Etude du spectre différentiel de l'hème a₃

Les bandes sont consignées dans le tableau 4.2.4.



Figure 4.2.7 : Spectre différentiel infrarouge (ox-red) du complexe ba_3 à pH 8 dans la région spectrale comprise entre 1800 et 1200 cm⁻¹ de +20 à +500 mV.

Certaines vibrations ne sont spécifiques qu'à l'hème a_3 , comme les groupes formyle (-CHO) (voir figure 4.2.7).

La vibration v(C=O) des groupes formyle de l'hème a_3 est donc attendue ici. Pour la forme oxydée de l'hème, il y a une bande à 1676 cm⁻¹ et pour la forme réduite à 1668 cm⁻¹.(21) Ces bandes sont confirmées par des mesures effectuées en Raman.(15, 28)

La vibration $v(C\alpha=C\beta)$ du groupe vinyle à 1618 cm⁻¹ et la vibration δ_{42} à 1266 cm⁻¹ sont également présentes pour cet hème.(*20*) La vibration v_{37} est légèrement décalée à 1610 cm⁻¹. Les vibrations v_{38x} , v_{38y} , discutaient antérieurement, sont également visibles à 1570 et 1546 cm⁻¹. Enfin à 1380 cm⁻¹, la vibration v_{41} est attendue.

A présent, grâce à ses attributions, les différents spectres différentiels sont comparés entre eux.

Position de la bande (cm ⁻¹)	Etat	Tentative d'attribution
	redox	
1708	Ox	<i>v</i> (C=O) propionates des hèmes
1700	Red	v(C=O) propionates des hèmes
1676	Ox	$v(C=O)$ CHO-hème $a_3/v(C=O)$
1668	Red	propionates des hèmes/ v(CN ₃ H ₅) ^{as} v(C=O) CHO-hème a ₃
1656	Red	Amide I
1630	Red	v(CN ₃ H ₅) ^s Arg/Asn,/Lys/ His-H/
1618	Red	amide I $v(C\alpha=C\beta)$ groupe vinyl hème $a_3/amide I$
1610	Ox	v_{37} hème a_3
1570	Ox	v(COO ⁻) ^{as} propionates des hèmes/
		Ring-O ⁻ Tyr/ v_{38x} hème a_3
1546	Red	v_{38y} hème a_3
1504	Ox	Ring-O ⁻ Tyr
1380	Ox	v_{41} hème a_3
1280	Red	Hème
1266	Ox	δ_{42} hème $a_3/v(\text{CO}^{-)s}$ Tyr

Tableau4.2.4: Tentative d'assignements pour le spectre différentiel infrarouge (ox-red) du complexe ba_3 de T.thermophilus uniquement pour l'hème a_3 à pH 8

3. Comparaison des spectres différentiels pour le cytochrome ba₃

A première vue, les spectres de la figure 4.3.1 sont comparables. Les zones où des changements ont lieu sont repérées. La première zone mise en avant est celle de la contribution des propionates des hèmes et de la structure secondaire entre 1708 et 1613 cm⁻¹. La deuxième zone, entre 1565 et 1415 cm⁻¹, correspond à la contribution des propionates des hèmes et des acides aminés comme les acides Aspartique, Glutamique et les Tyrosines.



Figure 4.3.1 : Spectres différentiels infrarouge (ox-red) du cytochrome ba_3 à pH 6.4 (en noir), 7.5 (en rouge), 8 (en bleu) et 8.5 (en cyan) dans la région spectrale comprise entre 1800 et 1200 cm⁻¹ entre -500 et +500mV. Les deux zones sont représentées par un cercle noir.

L'intensité du double différentiel n'est pas très élevée. Pour comparaison, le bruit de fond a une intensité de l'ordre de 10^{-6} en absorbance. Les spectres doubles différentiels sont donc utilisés.

3.1. Entre le pH 6.4 et 7.5

Entre ces deux pH, il y a, pour l'hème a_3 , une diminution de son potentiel qui passe de 323 à 251 mV vs. ENH. Cette même diminution est visible pour l'hème *b* son potentiel varie de 238 à 218 mV vs. ENH.

3.1.1. Etude du double différentiel pour la contribution de l'ensemble des hèmes entre le pH 7.5 et 6.4

Pour permettre de voir les bandes influencées par ce changement de pH, le spectre double différentiel est effectué en soustrayant le pH 7.5 au pH 6.4. Les différentes bandes qui subissent un changement peuvent être visualisées. Les bandes qui seront positives correspondent aux vibrations présentes dans le pH 7.5 et celles négatives dans le pH 6.4. Pour obtenir ce spectre, les deux spectres différentiels ont été soustraits après normalisation par rapport à la bande Amide I située à 1630 cm^{-1} .



Figure 4.3.2 : Double différentiel infrarouge (pH 7.5-6.4) du cytochrome ba_3 entre 1800 et 1200 cm⁻¹.

Pour commencer, il faut plus particulièrement faire attention aux bandes fines qui apparaissent dans ce spectre, elles peuvent être simplement des artefacts issus de la soustraction des deux spectres.

Le double différentiel montre la contribution de plusieurs bandes (voir figure 4.3.2), plus particulièrement dans la région Amide I, qui découle des signaux des hèmes mais également ceux du squelette peptidique. Il est clair que ce changement de pH affecte la structure secondaire de la protéine dans une moindre mesure cependant. Un changement plus important de la conformation n'est pas énergiquement favorable.

Dans la région Amide I, des acides aminés comme l'Arginine, l'Asparagine et la Glutamine sont également perturbés. Cependant, leur faible coefficient d'extinction molaire ne permet pas de les distinguer dans les bandes issues de la structure secondaire.

Dans la région comprise entre 1708 et 1692 cm⁻¹, la vibration v(C=O) des propionates des hèmes est attendue. L'absence de bandes communes aux deux pH indique un changement. La bande à 1708 et 1700 cm⁻¹ pour les deux pH suggère un changement d'environnement d'un des propionates des hèmes. De ce fait, le réseau de liaison Hydrogène entre les propionates des hèmes et les acides aminés joue ici un rôle important. Le déplacement de liaison Hydrogène explique ce changement d'environnement, ce même changement est visible pour les acides aminés dans la région Amide I. Un changement d'état de protonation et d'environnement est donc possible mais le spectre différentiel ne permet pas de conclure de manière définitive. Il faut tenir compte de la coopérativité entre les propionates des hèmes.

Dans la région Amide II, entre 1600 et 1500 cm⁻¹, des changements de l'environnement sont aussi visibles.

La présence de bandes entre 1548 et 1390 cm⁻¹, confirme notre hypothèse sur le changement d'environnement des propionates des hèmes. Les vibrations v(COO⁻) asymétrique et v(COO⁻) symétrique sont présentes dans ce spectre. Pour la vibration v(COO⁻) asymétrique, la bande à 1570 cm⁻¹ ne se retrouve pas dans ce double différentiel, sa faible intensité dans le différentiel en est la cause. Or, la bande à 1528 cm⁻¹ est déplacée à 1533 cm⁻¹ ce qui suggère une nouvelle fois un changement d'environnement des propionates des hèmes. De plus, un déplacement de la bande de 1398 à 1394 cm⁻¹ en augmentant le pH, pour la vibration v(COO⁻) symétrique, soutient cette hypothèse.

Pour le pH 7.5, une déprotonation des propionates des hèmes est envisageable, le pK_a des propionates des hèmes est généralement de l'ordre de 4 à 5, un changement de protonation est donc possible.(29-31) De plus, à l'intérieur de l'hème, deux propionates nommés anneau A et D peuvent intervenir. D'après la structure autour de l'hème a_3 , les protons pompés transitent uniquement via un propionate de type A.(32-35)

La contribution des vibrations v(COO⁻) symétrique de l'Acide Aspartique et Glutamique est aussi intéressante. En passant au pH 7.5, deux bandes apparaissent à 1423 et à 1438 cm⁻¹. L'absence de ces bandes à pH 6.4 peut traduire une déprotonation de ces acides aminés. Il n'est pas possible de savoir si les acides aminés sont impliqués dans le mécanisme, ils peuvent être isolés et ne pas participer au transfert d'électrons.

Il serait intéressant de regarder la contribution des Tyrosines. L'absence de bandes à 1515 cm⁻¹ et à 1280 cm⁻¹ pour le pH 6.4 peut traduire une protonation des Tyrosines. Encore une fois, sans l'étude de Tyrosine marquée, la Tyrosine concernée ne peut pas être mise en avant. Ce changement d'environnement peut provenir de la Tyrosine qui est couplée au transfert d'électron provenant de l'hème *b* ou a_3 .

3.2. Entre le pH 7.5 et 8

Entre ces deux pH, l'hème a_3 voit son potentiel diminué qui passe de 251 à 222 mV vs. ENH. Une augmentation du potentiel est visible pour l'hème qui varie de 218 à 231 mV vs. ENH.

3.2.1. Etude du double différentiel pour la contribution de l'ensemble des hèmes entre le pH 8 et 7.5

Pour obtenir ce spectre, les deux spectres différentiels ont été soustraits après normalisation par rapport à la bande Amide I située à 1630 cm⁻¹.



Figure 4.3.3 : Double différentiel infrarouge (pH 8-7.5) du cytochrome ba_3 entre 1800 et 1200 cm⁻¹.

Tout d'abord, les régions Amide I et II sont de nouveau perturbées par le changement de pH. Des modifications structurales sont attendues et sont visibles respectivement pour la région de l'Amide I et de l'Amide II. Encore une fois, ces changements sont prévisibles, un changement de potentiel implique forcément une modification légère de la structure de la protéine (voir figure 4.3.3).

Concernant les propionates des hèmes et plus particulièrement la vibration v(C=O), des similitudes sont visibles au niveau des bandes présentes à pH 8 avec celles qui ont été mises en avant précédemment pour le pH 6.4. Un changement de l'environnement d'un des propionates des hèmes est donc attendu et plus particulièrement ceux entourant l'hème b.

Cette hypothèse est appuyée par les vibrations $v(COO^{-})$ asymétrique et $v(COO^{-})$ symétrique des propionates des hèmes présentes entre 1550 et 1390 cm⁻¹. Un déplacement de leurs bandes respectives de 1533 à 1528 cm⁻¹ et de 1394 à 1398 cm⁻¹ suggère un changement d'environnement.

La contribution des vibrations $v(COO^{-})$ symétrique de l'Acide Aspartique et Glutamique est aussi visible. En passant au pH 8, un décalage intervient. La bande à 1438 cm⁻¹ est déplace à 1436 cm⁻¹. Le décalage peut s'expliquer par un changement d'environnement.

Enfin pour les Tyrosines, le passage au pH 8 peut conduire à une protonation à cause de l'absence de bandes à 1515 et 1280 cm⁻¹.

3.3. Entre le pH 8 et 8.5

Entre ces deux pH, le potentiel de l'hème a_3 passe de 222 à 199 mV vs. ENH. Pour l'hème b, le potentiel varie de 231 à 246 mV vs. ENH.

3.3.1. Etude du double différentiel pour la contribution de l'ensemble des hèmes entre le pH 8.5 et 8

Pour obtenir ce spectre, les deux spectres différentiels ont été soustraits après normalisation par rapport à la bande Amide I située à 1630 cm⁻¹.



Figure 4.3.4 : Double différentiel infrarouge (pH 8.5-8) du cytochrome ba_3 entre 1800 et 1200 cm⁻¹.

Des changements structuraux sont observés dans la région Amide I et II (voir figure 4.3.4).

Concernant la vibration v(C=O) des propionates des hèmes, un changement d'environnement est de nouveau suggéré avec une bande qui passe de 1708 à 1700 cm⁻¹. Des changements dans cette zone ne sont pas étonnants.

Quant aux vibrations v(COO⁻) asymétrique et v(COO⁻) symétrique des propionates des hèmes, un nouveau décalage de leurs bandes respectives de 1528 à 1533 cm⁻¹ et de 1398 à 1394 cm⁻¹ soutient le changement d'environnement postulé précédemment.

Pour les vibrations v(COO⁻) symétrique de l'Acide Aspartique et Glutamique, l'absence de ces bandes à pH 8.5 peut traduire une déprotonation.

Au sujet des Tyrosines, à pH 8.5, la présence de bandes à 1515 et 1280 cm⁻¹ peut suggérer une déprotonation d'une Tyrosine ou un changement d'environnement de celle-ci.

Un changement au niveau des propionates a d'abord été constaté. Ces changements d'état redox des différents acides aminés spécifiques sont à confirmer avec l'étude de la contribution individuelle de chaque hème.

4. Comparaison des spectres différentiels pour l'hème b

Pour l'hème *b*, deux phases sont distinctes. Entre le pH 6.4 et 7.5, le potentiel de demi-vague diminue. Entre le pH 8 et 8.5, le potentiel de demi-vague augmente. Les spectres différentiels entre ces deux plages de pH sont étudiés.

De nouveau, les spectres différentiels ne permettent pas de conclure, l'étude du double différentiel apporte donc plus d'informations (voir figure 4.4.1). Deux zones sont mises en avant, en premier celle de la contribution des propionates des hèmes et de la structure secondaire entre 1708 et 1589 cm⁻¹ et en second celle de la contribution des propionates des hèmes et des acides aminés comme les acides Aspartique, Glutamique et la Tyrosine entre 1528 et 1392 cm⁻¹.



Figure 4.4.1 : Spectres différentiels infrarouge (ox-red) du cytochrome ba_3 à pH 6.4 (en noir), 7.5 (en rouge), 8 (en bleu) et 8.5 (en cyan) dans la région spectrale comprise entre 1800 et 1200 cm⁻¹ pour la contribution de l'hème *b* uniquement.

4.1. Entre le pH 6.4 et 7.5 et entre le pH 8 et 8.5

4.1.1. Etude du double différentiel pour la contribution de l'hème b entre le pH7.5 et 6.4 et entre le pH 8.5 et 8

Pour obtenir ce spectre, les deux spectres différentiels ont été soustraits après normalisation par rapport à la bande Amide I située à 1630 cm⁻¹. L'hème *b* est entouré par les principaux propionates des hèmes d'après la structure cristalline. Des changements de ces propionates sont donc observables ici.



Figure 4.4.2 : Doubles différentiels infrarouge du cytochrome ba_3 entre 1800 et 1200 cm⁻¹ pour la contribution de l'hème *b* a) entre le pH 7.5 et 6.4 et b) entre le pH 8.5 et 8.

Tout d'abord, le double différentiel montre la contribution de plusieurs bandes (voir figures 4.4.2), dans la région Amide I issue du squelette peptidique. Il est clair que ce changement de pH affecte la structure secondaire de la protéine comme constaté précédemment. Dans la région Amide II, entre 1600 et 1500 cm⁻¹, des changements de l'environnement sont aussi visibles.

Dans la région comprise entre 1706 et 1700 cm⁻¹, la vibration v(C=O) des propionates des hèmes est attendue. L'absence de bandes communes aux deux pH indique un changement. Entre le pH 7.5 et 6.4, un déplacement de la bande suggère un changement d'environnement des propionates des hèmes. De même entre le pH 8 et 8.5, un décalage conduit à un changement d'environnement.

Le réseau de liaison Hydrogène entre les propionates des hèmes et les acides aminés joue ici un rôle important. Le déplacement de liaison Hydrogène explique ce changement d'environnement

Un changement d'état de protonation et d'environnement est donc possible mais le spectre différentiel ne permet pas de conclure de manière définitive.

Les vibrations v(COO⁻) asymétrique et v(COO⁻) symétrique sont également intéressantes à étudier. Pour la vibration v(COO⁻) asymétrique, la bande à 1570 cm⁻¹ ne se retrouve pas dans ce double différentiel. Entre le pH 6.4 et 7.5, la bande à 1529 cm⁻¹ est déplacée à 1533 cm⁻¹ et entre le pH 8 et 8.5 la bande passe de 1528 à 1533 cm⁻¹ ce qui renforce une nouvelle fois un changement d'environnement des propionates des hèmes. De plus, entre le pH 8 et 8.5, un déplacement de la bande de 1398 à 1405 cm⁻¹, pour la vibration v(COO⁻) symétrique, soutient cette hypothèse.

Concernant la contribution des vibrations $v(COO^{-})$ symétrique de l'Acide Aspartique et Glutamique, entre le pH 6.4 et 7.5 la bande à 1423 est déplace à 1418 cm⁻¹ et entre le pH 8 et 8.5 elle passe de 1420 à 1425 cm⁻¹. La présence de ces bandes à ces différents pH peut induire une protonation de ces acides aminés. Le Glu 15, impliqué dans le mécanisme de transfert d'électrons, ne change pas d'état de protonation car il est trop loin de l'hème *b*.

Enfin pour les Tyrosines, un changement d'état de protonation, selon le pH étudié, est constaté. Or, l'hème b n'est pas entouré de Tyrosines qui sont impliqués dans le mécanisme de la protéine. La présence des bandes à 1515 et 1280 cm⁻¹ peut conduire à une déprotonation en passant au pH 7.5. L'absence de ces bandes peut traduire d'une éventuelle protonation. De ce fait, les Tyrosines sont certainement déprotonées à pH 7.5 et 8 et protonées à pH 6.4 et 8.5.

Pour l'hème *b*, une modification de l'environnement des propionates des hèmes est attendue d'après la structure (voir figure 4.1.1.).

Ici, il y a deux phases dans le changement de potentiel, ce qui peut impliquer un changement d'état de protonation d'un acide aminé bien spécifique. Sans l'étude d'acides aminés marqués, il n'est pas possible de l'identifier. En complément du changement d'environnement des propionates des hèmes, la contribution d'une Tyrosine peut être envisagée.

5. Comparaison des spectres différentiels pour l'hème a₃

Pour l'hème a_3 , la dépendance pH est, dans ce cas, plus habituelle. Entre 1708 et 1624 cm⁻¹, une zone est mise en avant qui correspond à la contribution des propionates des hèmes et de la structure secondaire. Entre 1577 et 1456 cm⁻¹, une deuxième zone est mise en avant avec la contribution des propionates des hèmes et des acides aminés comme les acides Aspartique, Glutamique et la Tyrosine.



Figure 4.5.1 : Spectres différentiels infrarouge (ox-red) du cytochrome ba_3 à pH 6.4 (en noir), 7.5 (en rouge), 8 (en bleu) et 8.5 (en cyan) dans la région spectrale comprise entre 1800 et 1200 cm⁻¹ pour la contribution de l'hème a_3 uniquement.

Les deux pH extrêmes sont donc comparés pour cet hème. L'étude du double différentiel est de nouveau utile dans ce cas présent (voir figure 4.5.1).

5.1. Entre le pH 6.4 et 8.5

5.1.1. Etude du double différentiel pour la contribution de l'hème a₃ entre le pH8.5 et 6.4

Pour obtenir ce spectre, les deux spectres différentiels ont été soustraits après normalisation par rapport à la bande Amide I située à 1630 cm⁻¹.



Figure 4.5.2 : Double différentiel infrarouge (pH 8.5-6.4) du cytochrome ba_3 entre 1800 et 1200 cm⁻¹ pour la contribution de l'hème a_3 uniquement.

Le premier changement attendu ici concerne la région Amide I, qui définit la structure secondaire de la protéine (voir figure 4.5.2). Il est clair qu'un changement de potentiel implique un changement de conformation comme les autres spectres différentiels le suggèrent. Comme précédemment, ce changement est minime mais il existe. Un autre changement dans la zone Amide II confirme ce changement de conformation.

Concernant les propionates de l'hème et plus particulièrement la vibration v(C=O) des propionates des hèmes, deux bandes sont mises en avant à 1710 cm⁻¹ pour le pH 8.5 et à 1700 cm⁻¹ pour le pH 6.4. Ces bandes suggèrent un changement d'environnement d'un des propionates de l'hème comme observé auparavant.

Ce changement est confirmé dans la zone où les vibrations v(COO⁻) asymétrique et v(COO⁻) symétrique des propionates de l'hème interviennent. En effet, un déplacement a lieu de 1529 à 1533 cm⁻¹ pour la vibration v(COO⁻) asymétrique. Pour la vibration associée, un décalage est constaté de 1400 à 1398 cm⁻¹.

Pour la contribution des vibrations $v(COO^{-})$ symétrique de l'Acide Aspartique et Glutamique, des bandes sont attendues à 1434 et 1418 cm⁻¹. A pH 8.5, ces bandes sont bien présentes ce qui signifie une protonation d'un acide aminé à ce pH.

En passant au pH 6.4, ces bandes sont absentes, il passe vraisemblablement à l'état déprotoné. L'acide aminé Glu 15 peut subir ce changement d'état de protonation, l'étude de cet acide aminé marqué peut confirmer notre hypothèse.

L'absence de bandes qui peuvent être attribuées aux Tyrosines signifie qu'elles ne changent pas d'état de protonation pour cet hème. Ce résultat est étonnant, dans la mesure où l'hème a_3 est entouré de Tyrosines cruciaux pour le mécanisme de la protéine.

Pour l'hème a_3 , un changement d'environnement des propionates des hèmes n'est pas surprenant, ces propionates entourent l'hème d'après la structure (voir figure 4.1.1). Encore une fois, leur rôle est primordial dans cette dépendance pH. Une conséquence sur l'activité de la protéine peut être envisagée.

6. Conclusion

Tout d'abord, cette dépendance pH influe sur la structure de la protéine, de nombreux changements dans la région des bandes Amide I et II confirment cette hypothèse. Cependant, ce changement de conformation est minime mais est suffisant pour influencer le potentiel de demi-vague.

Un changement au niveau des propionates a d'abord été constaté. Les changements des bandes des propionates des hèmes à différents pH peuvent être dus à la déprotonation et à la protonation ou causés par un changement d'environnement des propionates des hèmes respectivement protonés ou déprotonés. Pour pouvoir distinguer ses deux possibilités, un assignement des modes de vibrations d'un propionate spécifique est envisagé. Ces propionates sont en interactions très fortes avec des acides aminés et avec une partie de la structure de la protéine.(*36*) Une mutation de ces acides aminés qui interagissent peuvent nous apporter des réponses. Le potentiel de demi-vague d'une protéine est déterminé par la nature du ligand axial relié à l'hème mais également par les groupes fonctionnels ionisables situés à proximité de l'hème.(*5*) Il a été proposé que l'interaction entre les chaînes principales des propionates des hèmes et les charges positives des ions ferriques détermine la valeur du potentiel et joue un rôle dans le changement de conformation dû à l'état redox. Ce potentiel varie avec le pH à cause de la présence de l'anion propionate qui régule le potentiel.(*29, 30*)

De plus, certains cytochromes c mitochondriales subissent un changement de conformation dont le plus important se situe à la base de l'hème et localisé dans les groupes propionates. En conséquence, un changement de conformation entraîne une modification dans les propionates des hèmes et donc dans le potentiel de demi-vague. Le changement de potentiel est relié aux interactions homotropiques spécifiques pour cette protéine. Certains potentiels de cytochrome acquièrent une dépendance pH quand leurs pK_a sont déplacés par l'oxydation des hèmes.(*37*) La contribution des résidus lors de la dépendance pH est fonction de la force des interactions avec l'hème et avec son état de protonation. Une réorientation des propionates est également envisagée ici. En effet, si les propionates sont partiellement protonés, les protons sont libérés lors de l'oxydation de l'hème contribuant ainsi à la dépendance pH.(*38*) Il est clair, que pour l'hème b et a_3 , un phénomène complexe entre en jeu qui dépend de l'état de protonation des deux hèmes mais également de l'orientation des propionates.

Puis, de nombreux acides aminés peuvent subir un changement d'état de protonation. Le rôle de l'état de protonation est encore peu clair sur les potentiels de demi-vague des hèmes

comme l'influence des interactions entre les hèmes sur les potentiels de demi-vague.(39, 40) Une prudence est donc de mise dans nos interprétations.

Une hypothèse est que, pour le Glu 15, il peut être influencé mais uniquement pour l'hème a_3 . Sa distance trop grande avec l'hème *b* explique cette constatation. Un changement de protonation n'est pas étonnant, en effet le Glu 286 du cytochrome *c* oxydase change quatre fois d'état de protonation durant le cycle catalytique.(*41*) Un changement du pK_a est envisagé ce qui implique un changement de conformation qui a pour effet la stabilisation de la forme déprotonée.

Plus étonnamment, aucune Tyrosine n'est perturbée pour l'hème a_3 . Cet hème est entouré de Tyrosines mais ici aucun changement n'est constaté. Or, pour l'hème b, des Tyrosines subissent des probables changements d'état de protonation. Il est plus probable que ce changement intervient pour une Tyrosine isolée.

Une conclusion définitive n'est pas envisageable, l'étude de mutants spécifique de sites cruciaux pour le mécanisme de transfert d'électrons est nécessaire. L'étude de mutants de la Tyrosine et de l'acide Glutamique est à envisager pour appuyer nos conclusions et plus particulièrement de la Tyr 237 et du Glu 15. Tout récemment, une publication de Koutsoupakis et al. a montré que l'absorption de protons s'accompagne de la protonation de deux Tyrosines : la Tyr 136 et la Tyr 133.(42) L'étude de ces deux Tyrosines peut nous aider à mieux comprendre la dépendance pH.

7. Références

- 1. Soulimane, T., Buse, G., Bourenkov, G. P., Bartunik, H. D., Huber, R., and Than, M. E. (2000) Structure and mechanism of the aberrant ba_3 -cytochrome *c* oxidase from thermus thermophilus, *EMBO J 19*, 1766-1776.
- 2. Fee, J. A., Case, D. A., and Noodleman, L. (2008) Toward a chemical mechanism of proton pumping by the B-type cytochrome c oxidases: application of density functional theory to cytochrome ba3 of Thermus thermophilus, *J Am Chem Soc 130*, 15002-15021.
- 3. Farver, O., Wherland, S., Antholine, W. E., Gemmen, G. J., Chen, Y., Pecht, I., and Fee, J. A. (2010) Pulse Radiolysis Studies of Temperature Dependent Electron Transfers among Redox Centers in ba3-Cytochrome c Oxidase from Thermus thermophilus: Comparison of A- and B-Type Enzymes, *Biochemistry*, null-null.
- 4. Zimmermann, B. H., Nitsche, C. I., Fee, J. A., Rusnak, F., and Munck, E. (1988) Properties of a copper-containing cytochrome ba3: a second terminal oxidase from the extreme thermophile Thermus thermophilus, *Proc Natl Acad Sci U S A 85*, 5779-5783.
- 5. Kadenbach, B. (1992) Book Review: Cytochromes C. Evolutionary, Structural and Physicochemical Aspects. (Springer Series in Molecular Biology). By G. R. Moore And G. W. Pettigrew, *Angewandte Chemie International Edition in English 31*, 1098-1098.
- 6. Brzezinski, P., and Gennis, R. (2008) Cytochrome c oxidase: exciting progress and remaining mysteries, *Journal of Bioenergetics and Biomembranes 40*, 521-531.
- 7. Buse, G., Soulimane, T., Dewor, M., Meyer, H. E., and Bluggel, M. (1999) Evidence for a copper-coordinated histidine-tyrosine cross-link in the active site of cytochrome oxidase, *Protein Science 8*, 985-990.
- 8. Chang, H. Y., Hemp, J., Chen, Y., Fee, J. A., and Gennis, R. B. (2009) The cytochrome ba3 oxygen reductase from Thermus thermophilus uses a single input channel for proton delivery to the active site and for proton pumping, *Proc Natl Acad Sci U S A 106*, 16169-16173.
- 9. Klinman, J. P. (1996) Mechanisms Whereby Mononuclear Copper Proteins Functionalize Organic Substrates, *Chem Rev 96*, 2541-2562.
- 10. Blomberg, M. R. A., Siegbahn, P. E. M., Babcock, G. T., and Wikström, M. (2000) O-O bond splitting mechanism in cytochrome oxidase, *Journal of Inorganic Biochemistry 80*, 261-269.
- Sousa, F. L., Verissimo, A. F., Baptista, A. M., Soulimane, T., Teixeira, M., and Pereira, M. M. (2008) Redox properties of Thermus thermophilus ba3: different electron-proton coupling in oxygen reductases?, *Biophys J 94*, 2434-2441.
- 12. Hellwig, P., Soulimane, T., Buse, G., and Mantele, W. (1999) Electrochemical, FTIR, and UV/VIS spectroscopic properties of the ba(3) oxidase from Thermus thermophilus, *Biochemistry 38*, 9648-9658.
- 13. Wikström, M., and Morgan, J. E. (1992) The dioxygen cycle. Spectral, kinetic, and thermodynamic characteristics of ferryl and peroxy intermediates observed by reversal of the cytochrome oxidase reaction, *Journal of Biological Chemistry 267*, 10266-10273.
- 14. Morgan, J. E., Verkhovsky, M. I., and Wikström, M. (1996) Observation and Assignment of Peroxy and Ferryl Intermediates in the Reduction of Dioxygen to Water by Cytochrome c Oxidase⁺, *Biochemistry 35*, 12235-12240.
- 15. Babcock, T. G. (1988) Raman Scattering by Cytochrome Oxidase and by Heme a Model Compounds. Chapter 7 of Biological Applications of Resonance Raman Spectroscopy, Vol. 1, Wiley and Sons, New York.
- 16. Lappalainen, P., Aasa, R., Malmström, B. G., and Saraste, M. (1993) Soluble CuA-binding domain from the Paracoccus cytochrome c oxidase, *Journal of Biological Chemistry 268*, 26416-26421.
- 17. Lappalainen, P., Watmough, N. J., Greenwood, C., and Saraste, M. (1995) Electron Transfer between Cytochrome c and the Isolated CuA Domain: Identification of Substrate-Binding Residues in Cytochrome c Oxidase, *Biochemistry 34*, 5824-5830.

- 18. Dong, A. C., Huang, P., and Caughey, W. S. (1992) Redox-dependent changes in betaextended chain and turn structures of cytochrome c in water solution determined by second derivative amide I infrared spectra, *Biochemistry 31*, 182-189.
- 19. Goormaghtigh, E., Cabiaux, V., and Ruysschaert, J. M. (1994) Determination of soluble and membrane protein structure by Fourier transform infrared spectroscopy. III. Secondary structures, *Subcell Biochem 23*, 405-450.
- 20. Berthomieu, C., Boussac, A., Mantele, W., Breton, J., and Nabedryk, E. (1992) Molecular changes following oxidoreduction of cytochrome b559 characterized by Fourier transform infrared difference spectroscopy and electron paramagnetic resonance: photooxidation in photosystem II and electrochemistry of isolated cytochrome b559 and iron protoporphyrin IX-bisimidazole model compounds, *Biochemistry 31*, 11460-11471.
- 21. Hellwig, P., Grzybek, S., Behr, J., Ludwig, B., Michel, H., and Mantele, W. (1999) Electrochemical and ultraviolet/visible/infrared spectroscopic analysis of heme a and a3 redox reactions in the cytochrome c oxidase from Paracoccus denitrificans: separation of heme a and a3 contributions and assignment of vibrational modes, *Biochemistry 38*, 1685-1694.
- 22. Behr, J., Hellwig, P., Mantele, W., and Michel, H. (1998) Redox dependent changes at the heme propionates in cytochrome c oxidase from Paracoccus denitrificans: direct evidence from FTIR difference spectroscopy in combination with heme propionate 13C labeling, *Biochemistry 37*, 7400-7406.
- 23. Gerscher, S., Hildebrandt, P., Soulimane, T., and Buse, G. (1998) Resonance Raman spectroscopic study of the caa3 oxidase from Thermus thermophilus, *Biospectroscopy 4*, 365-377.
- 24. Hellwig, P., Scheide, D., Bungert, S., Mantele, W., and Friedrich, T. (2000) FT-IR spectroscopic characterization of NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) from Escherichia coli: oxidation of FeS cluster N2 is coupled with the protonation of an aspartate or glutamate side chain, *Biochemistry 39*, 10884-10891.
- 25. Venyaminov, S. Y., and Kalnin, N. N. (1990) Quantitative IR spectrophotometry of peptide compounds in water (H2O) solutions. II. Amide absorption bands of polypeptides and fibrous proteins in α -, β -, and random coil conformations, *Biopolymers 30*, 1259-1271.
- 26. Hellwig, P., Pfitzner, U., Behr, J., Rost, B., Pesavento, R. P., Donk, W. V., Gennis, R. B., Michel, H., Ludwig, B., and Mantele, W. (2002) Vibrational modes of tyrosines in cytochrome c oxidase from Paracoccus denitrificans: FTIR and electrochemical studies on Tyr-D4-labeled and on Tyr280His and Tyr35Phe mutant enzymes, *Biochemistry 41*, 9116-9125.
- 27. Hellwig, P., Rost, B., Kaiser, U., Ostermeier, C., Michel, H., and Mantele, W. (1996) Carboxyl group protonation upon reduction of the Paracoccus denitrificans cytochrome c oxidase: direct evidence by FTIR spectroscopy, *FEBS Lett 385*, 53-57.
- 28. Heibel, G. E., Hildebrandt, P., Ludwig, B., Steinrucke, P., Soulimane, T., and Buse, G. (1993) Comparative Resonance Raman-Study of Cytochrome-C-Oxidase from Beef-Heart and Paracoccus-Denitrificans, *Biochemistry 32*, 10866-10877.
- 29. Moore, G. R., Harris, D. E., Leitch, F. A., and Pettigrew, G. W. (1984) Characterisation of ionisations that influence the redox potential of mitochondrial cytochrome c and photosynthetic bacterial cytochromes c2, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Bioenergetics* 764, 331-342.
- 30. Moore, G. R. (1983) Control of redox properties of cytochrome c by special electrostatic interactions, *FEBS Letters 161*, 171-175.
- 31. Moore, G. R., Williams, R. J. P., and Peterson, J. (1985) A spectroscopic investigation of the structure and redox properties of Escherichia coli cytochrome b-562, *Biochimica et Biophysica Acta Protein Structure and Molecular Enzymology 829*, 83-96.
- 32. Belevich, I., Bloch, D. A., Belevich, N., Wikström, M., and Verkhovsky, M. I. (2007) Exploring the proton pump mechanism of cytochrome c oxidase in real time, *Proceedings of the National Academy of Sciences 104*, 2685-2690.

- 33. Belevich, I., Verkhovsky, M. I., and Wikström, M. (2006) Proton-coupled electron transfer drives the proton pump of cytochrome c oxidase, *Nature 440*, 829-832.
- 34. Brändén, G., Brändén, M., Schmidt, B., Mills, D. A., Ferguson-Miller, S., and Brzezinski, P. (2005) The Protonation State of a Heme Propionate Controls Electron Transfer in Cytochrome c Oxidase[†], *Biochemistry 44*, 10466-10474.
- 35. Faxen, K., Gilderson, G., Adelroth, P., and Brzezinski, P. (2005) A mechanistic principle for proton pumping by cytochrome c oxidase, *Nature 437*, 286-289.
- 36. Hellwig, P., Behr, J., Ostermeier, C., Richter, O. M., Pfitzner, U., Odenwald, A., Ludwig, B., Michel, H., and Mantele, W. (1998) Involvement of glutamic acid 278 in the redox reaction of the cytochrome c oxidase from Paracoccus denitrificans investigated by FTIR spectroscopy, *Biochemistry 37*, 7390-7399.
- 37. Harris, D. A. (1991) Energy transduction in biological membranes, A textbook of bioenergetics by William A Cramer and David B Knaff. pp 545. Springer-Verlag, Heidelberg. 1990. DM198 ISBN 3-540-96761-3, *Biochemical Education 19*, 101-101.
- 38. Mao, J., Hauser, K., and Gunner, M. R. (2003) How cytochromes with different folds control heme redox potentials, *Biochemistry 42*, 9829-9840.
- 39. Tiesjema, R. H., Muijsers, A. O., and Van Gelder, B. F. (1973) Biochemical and biophysical studies on cytochrome c oxidase. X. Spectral and potentiometric properties of the hemes and coppers, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Bioenergetics 305*, 19-28.
- 40. Verkhovsky, M. I., Morgan, J. E., and Wikstroem, M. (1995) Control of electron delivery to the oxygen reduction site of cytochrome c oxidase: A role for protons, *Biochemistry 34*, 7483-7491.
- 41. Nyquist, R. M., Heitbrink, D., Bolwien, C., Gennis, R. B., and Heberle, J. (2003) Direct observation of protonation reactions during the catalytic cycle of cytochrome c oxidase, *Proceedings of the National Academy of Sciences 100*, 8715-8720.
- 42. Koutsoupakis, C., Kolaj-Robin, O., Soulimane, T., and Varotsis, C. (2011) Probing Protonation/Deprotonation of Tyrosine Residues in Cytochrome ba3 Oxidase from Thermus thermophilus by Time-resolved Step-scan Fourier Transform Infrared Spectroscopy, *Journal* of Biological Chemistry 286, 30600-30605.
Chapitre V : Interaction protéine-protéine

1. Introduction

Dans ce chapitre, l'interaction protéine-protéine est étudiée. Le complexe bc_1 ou complexe III est la troisième composante de la chaîne respiratoire. La structure cristalline du complexe bc_1 de *T.thermophilus* n'est à ce jour toujours pas connue. Il contient quatre sous-unités : le cytochrome c_1 , la protéine Rieske, le cytochrome b et un opéron nommé FbcX.(1) Le fragment soluble utilisé ici contient uniquement l'hème c. Le cytochrome c_1 a été découvert en 1940 de façon indépendante.(2, 3) Il contient deux domaines: un domaine N-terminale et C-terminale. C'est ce dernier domaine qui est intéressant car il contient le site de liaison qui interagira avec le cytochrome c_{552} .

Le cytochrome c_{552} est un transporteur mobile de la chaîne respiratoire. Il est le substrat naturel de la cytochrome c oxydase. Sa particularité est qu'il ne possède pas de résidus chargés à sa surface à proximité de l'hème.(4) Sa structure cristallographique est très bien caractérisée,(5) cependant, son spectre infrarouge couplée à l'électrochimie n'est à ce jour pas encore connu. Une autre grande caractéristique est sa thermostabilité qui la rend intéressante pour des applications d'ingénierie moléculaire.



Figure 5.1.1 : Schéma du transfert d'électrons dans *T. thermophilus* ; les flèches indiquent le passage d'un électron.(6)

Trois complexes différents sont donc formés dans le but de prouver que l'interaction entre le cytochrome c_1 et c_{552} est bien réelle. Pour cela, du cytochrome c du cœur de cheval est utilisée, une protéine bien étudiée et qui sert de modèle à de nombreuses études. Une interaction entre ces deux cytochromes précédemment étudiés et ce cytochrome c est intéressante. Le complexe c-c₅₅₂, le complexe c_1 -c et le complexe c_1 -c₅₅₂ sont donc étudiés (voir figure 5.1.1). Pour chaque complexe, le potentiel de demi-vague est trouvé et le spectre différentiel est effectué dans le but de voir et de comprendre la contribution de chaque cytochrome.

Le complexe c-c₅₅₂ est un système de contrôle, aucune interaction n'est possible.

Le complexe c_1 -c sert à mieux comprendre le mécanisme par lequel le cytochrome c transporte des électrons du cytochrome c_1 à la cytochrome c oxydase.(7) Rieder et Bosshard ont montré que les Lysines qui entourent la cavité de l'hème du cytochrome c sont protégées de l'acétylation par la formation de ce complexe.(8) De plus, en modifiant certaines Lysines, la vitesse de réaction diminue de façon significative.(9)

Le complexe c_1 - c_{552} sert également à mieux comprendre le transfert d'électrons qui se produit entre le cytochrome c_1 et son partenaire redox, le cytochrome c_{552} . L'interaction est de nature hydrophobe d'après la nature de la surface des protéines.(*10*, *11*)

Le cytochrome c₁, fragment soluble du complexe bc₁ de Thermus thermophilus Spectre UV/Visible

Un spectre UV/Visible a été mesuré pour le cytochrome c_1 à pH 8 pour la forme oxydée et réduite de la protéine. Le passage à la forme réduite se fait de manière réversible par un ajout de dithionite de sodium (Na₂S₂O₄.2H₂O). Ce spectre sert, d'une part à contrôler l'état redox de la protéine et d'autre part à déterminer sa concentration. La figure 5.2.1 présente les spectres du cytochrome c_1 pour sa forme oxydée et réduite.



Figure 5.2.1: Spectres UV/Visible du cytochrome c_1 à pH 8 dans sa forme oxydée (en noir) et dans sa forme réduite (en rouge) après ajout de dithionite. En encart, un zoom entre 500 et 600 nm.

Trois bandes peuvent être distinguées pour ce spectre. Tout d'abord la bande γ , appelée également bande de Soret, est observée à 408 nm pour la forme oxydée et à 422 nm pour la forme réduite. Cette bande, qui est la plus intense, est caractéristique des hémoprotéines et elle est généralement constitué de toutes les bandes γ de tous les cofacteurs présents. Dans notre cas, il y a un seul cofacteur qui contribue. Puis, la contribution de la bande α aussi appelée bande Q à 528 nm pour la forme oxydée est visible. Or, pour la forme réduite, le déplacement de cette bande Q à 523 nm est caractéristique des hèmes réduits est constaté.(*12*) La bande qui apparaît à 552 nm est spécifique de l'hème c_1 . (*13*) Ce spectre est typique pour les protéines avec un hème c.

2.2. Spectroscopie différentielle UV/Visible : détermination du potentiel de demivague

Le potentiel de demi-vague de la protéine est effectué dans le but de le comparer à celui obtenu pour le complexe. Ce potentiel est très différent et plus bas que celui du cytochrome c_1 dans le complexe $bc_1.(13)$ Il est normal que le potentiel d'une sous-unité isolée se déplace par rapport à sa valeur dans la protéine. La cause principale de ce déplacement est la perte des interactions avec la protéine. La figure 5.2.2 montre les spectres du dosage du cytochrome c_1 dans la cellule OTTLE pour des potentiels entre de -300 à +300 mV. La bande de Soret se situe, dans ce cas-là à 417 nm. Les bandes Q sont situées à 520, 547 et 552 nm.

Le calcul du potentiel se fait donc sur la bande de Soret et sur les deux bandes situées à 547 et 552 nm. Après application du potentiel, la forme pleinement oxydée a été obtenue en 5 min et la forme réduite en 4 min. Cependant, le temps d'équilibre peut varier lorsque la valeur du potentiel de demi-vague de la protéine est proche. Il est alors ici de 15 min, lorsque le spectre UV/Visible est stable et ne subit plus de changements.

Le potentiel obtenu pour le cytochrome c_1 est E_m =-60 mV±5.7 pour n=1 (voir figure 5.2.3). Cette valeur est proche de celle obtenue par Ritter et al. (*13*) pour l'organisme *P*. *denitrificans* : E_m =-45 mV. Si le dosage est oxydatif ou réductif, la valeur du potentiel est rigoureusement la même.



Figure 5.2.2 : Spectres du dosage du cytochrome c_1 à pH 8 pour un potentiel de -300 à +300 mV entre 400 et 600 nm. Le dosage est ici réductif.



Figure 5.2.3 : Courbe de titration redox du cytochrome c_1 à pH 8 effectuée sur la bande de Soret, le potentiel de demi-vague obtenu est : E_m =-60 mV±5.7 pour n=1.

2.3. Spectroscopie différentielle infrarouge

Le spectre du cytochrome c_1 de *T. thermophilus* a été enregistré à pH 8 dans une zone spectrale allant de 1800 à 1200 cm⁻¹ entre -500 et +500 mV.



Figure 5.2.4 : Spectre différentiel infrarouge (ox-red) du cytochrome c_1 à pH 8 dans la région spectrale comprise entre 1800 et 1200 cm⁻¹ entre -500 et +500 mV.

Dans le spectre de la forme oxydée moins réduite, les signaux positifs sont associés à l'état oxydé de la protéine et les signaux négatifs à l'état réduit. Lors de la réaction redox, le spectre donne de précieuses informations sur les modifications structurales de la protéine, sur les réactions de protonation et de déprotonation, ce spectre étant dominé par les bandes Amide I, II et par divers acides aminés. Les différentes bandes sont répertoriées dans le tableau 5.2.1. Des contributions des différents modes de l'hème et de l'environnement entourant l'unique cofacteur sont attendues. Ce spectre n'a jamais été décrit auparavant pour cet organisme, toutefois il a été partiellement attribué pour l'organisme *P. denitrificans.(13)* La nomenclature utilisée ici pour les modes des hèmes a été décrite par Spiro et Li.(*14*)

Position de la bande (cm^{-1})	Etat	Tentative d'attribution	
	redox		
1690	Ox	v(C=O) propionates des hèmes / Amide I	
1671	Red	v(CN ₃ H ₅) ^{as} Arg /Amide I	
1657	Ox	Amide I	
1645	Red	Amide I/ vibration $CaCm(v_{37})$	
1630	Ox	$\nu(CN_3H_5)^{s}$ Arg $/\delta(NH_3^+)^{as}$ Lys/ Amide I	
1610	Red	Vibration CaCm (v_{37}) /Amide I	
1593	Ox	Vibration $CaCm(v_{37})$	
1570	Ox	$v(COO^{-})^{as}$ propionates des hèmes / $v(COO^{-})^{as}$	
1535	Red	Asp+Glu/ vibration CbCb (v_{38})/ Amide II $v(COO^{-})^{as}$ propionates des hèmes / $v(COO^{-})^{as}$	
1520	Ox	Asp+Glu/Amide II Tyr-OH	
1504	Ox	Tyr-O ⁻	
1434	Red	v(COO ⁻) ^s Asp+Glu	
1420	Ox	v(COO ⁻) ^s Asp+Glu	
1407	Red	v(COO ⁻) ^s Asp+Glu	
1393	Ox	Vibration CaN (v_{41})	
1358	Red	$v(COO^{-})^{s}$ propionates des hèmes	
1331	Ox	$v(COO^{-})^{s}$ propionates des hèmes	
1310	Ox	$v(COO^{-})^{s}$ propionates des hèmes	
1290	Ox	v(CC) Glu	
1260	Ox	Vibration $CmH(\delta_{42})$	
1250	Red	δ(COH) Tyr	
1240	Red	Vibration $CmH(\delta_{42})$	
1220	Red	Vibration $CmH(\delta_{42})$	

Tableau 5.2.1 : Tentative d'assignements pour le spectre différentiel infrarouge (ox-red) du cytochrome c_1 de T. *thermophilus* à pH 8.

Ce spectre se décompose en trois zones spectrales bien distinctes : entre 1700 et 1600 cm⁻¹, entre 1600 et 1200 cm⁻¹ et entre 1200 et 1000 cm⁻¹. Entre 1800 et 1700 cm⁻¹, aucune contribution n'est à noter (voir figure 5.2.4).



Figure 5.2.5 : Spectre différentiel infrarouge (ox-red) du cytochrome c_1 à pH 8 dans la région spectrale comprise entre 1720 et 1600 cm⁻¹ entre -500 et +500 mV.

Entre 1700 et 1600 cm⁻¹, des signaux typiques de la réorganisation des éléments structuraux couplés au transfert d'électrons sont aussi attendus (voir figure 5.2.5). Ils proviennent de la bande nommée Amide I, qui est composée à 80 % de l'élongation de C=O du squelette peptidique.

Dans la région de l'Amide I, comprise entre 1700 et 1610 cm⁻¹, six bandes sont distinguées. La bande positive, située à 1657 cm⁻¹, est celle qui est la plus intéressante. En effet, elle représente les éléments structuraux de type hélice α .(*14, 15*) Il faut savoir que le cytochrome c_1 est dominé par ces hélices α .(*16*). A 1690 cm⁻¹, la contribution des boucles est visible, et à 1630 cm⁻¹, celle des feuillets β . Des signaux négatifs sont aussi visibles et caractérisent la structure secondaire. La contribution des boucles est visible à 1671 cm⁻¹. Enfin à 1645 cm⁻¹, la participation de la structure aléatoire issue du squelette peptidique est attendue.

Cependant, des signaux de l'hème *c* sont aussi attendus. Une bande positive à 1690 cm⁻¹ représente la vibration v(C=O) d'un des propionates des hèmes protonés.(*17, 18*) A 1645 cm⁻¹, outre la contribution de la structure secondaire, la vibration de type CaCm de l'anneau porphyrine de l'hème nommé v₃₇ est présente.(*19*)

Pour les acides aminés à 1671 cm⁻¹, la contribution de la vibration $v(CN_3H_5)$ asymétrique de l'Arginine et sa vibration associée $v(CN_3H_5)$ symétrique à 1630 cm⁻¹ est attendue.

Les chaînes latérales de cet acide aminé peuvent être trouvées à proximité des centres actifs. A 1630 cm⁻¹, une bande qui correspond à une vibration $\delta(NH_3^+)$ asymétrique de la Lysine, mais avec un coefficient d'absorption molaire très faible, est visible.(20)



Figure 5.2.6 : Spectre différentiel infrarouge (ox-red) du cytochrome c_1 à pH 8 dans la région spectrale comprise entre 1600 et 1200 cm⁻¹ entre -500 et +500 mV.

Dans la deuxième région située entre 1610 et 1200 cm⁻¹, d'autres contributions de l'hème sont à espérer (voir figure 5.2.6). La vibration CaCm (v₃₇) est visible à 1610 cm⁻¹ par une bande négative et à 1593 cm⁻¹ par une bande positive.

La région des vibrations de type Amide II se situe entre 1570 et 1520 cm⁻¹.Cette bande est composée à 60 % de déformation N-H et à 40 % d'élongation C-N. Les propionates des hèmes déprotonés sont attendus dans la région Amide II mais ces bandes se chevauchent avec la contribution de chaines latérales des acides aminés déprotonées.

Une bande négative présente à 1535 cm⁻¹ est probablement relative à la vibration $v(\text{COO}^-)$ asymétriques des propionates des hèmes. Une autre bande, positive est attendue à 1570 cm⁻¹.(*18*) Quant à la vibration $v(\text{COO}^-)$ symétriques, elle est attendue entre 1358 et 1310 cm⁻¹.

A 1570 cm⁻¹, la contribution de la vibration C*b*C*b* de l'anneau porphyrine de l'hème nommé v_{38} est discernable.(*17*)

Un signal positif à 1393 cm⁻¹ est dans la zone où la vibration CaN nommé v_{41} est située.

Enfin, la vibration de type C*mH* nommé δ_{42} de l'hème *c* a un signal positif à 1260 cm⁻¹ et négatif à 1240 et 1220 cm⁻¹ qui dépend de l'environnement des liaisons Hydrogène.(21)

Les Tyrosines contribuent avec la vibration du cycle (C-C) vers 1520 et 1504 cm⁻¹. Il reflète la sensibilité des modes de l'anneau lors de la protonation du groupe phénol. D'autres bandes peuvent être attribuées à des vibrations de la Tyrosine. Enfin à 1250, la vibration δ (COH) de la Tyrosine est présente.(22)

Dans cette zone spectrale, des signaux typiques de la contribution des chaînes latérales d'autres acides aminés sont attendus (voir chapitre II Techniques de caractérisation). Le signal positif à 1570 cm⁻¹ et négatif à 1535 cm⁻¹ reflètent les vibrations v(COO⁻) asymétrique d'acides Aspartique et Glutamique. Les bandes correspondantes aux vibrations v(COO⁻) symétrique des acides aminés de type Aspartique et Glutamique se situent entre 1434 cm⁻¹ et à 1407 cm⁻¹.(*23*) Ces deux acides aminés sont forcément déprotonés à ce pH. Pour l'acide Glutamique, une bande à 1290 cm⁻¹ représentant la vibration v(CC) est observée. Cependant, la contribution d'autres bandes sont également à prendre en compte. Pour pouvoir avoir une assignation précise de chaque acide aminé, l'étude de différents mutants est à envisager.

Dans la région spectrale comprise entre 1200 et 1000 cm⁻¹, la contribution du tampon phosphate est la seule attendue (voir annexe 1). Ce tampon cause des vibrations P=O spécifiques à 1160 et 1088 cm⁻¹ (voir figure 5.2.7). Elles sont dues à la déprotonation du tampon et corrélées aux échanges de protons avec la protéine et les médiateurs suite au transfert d'électrons.(24)



Figure 5.2.7 : Spectre différentiel infrarouge (ox-red) du cytochrome c_1 à pH 8 dans la région spectrale comprise entre 1200 et 1000 cm⁻¹ entre -500 et +500 mV.

Le cytochrome c₅₅₂, substrat naturel de la cytochrome c oxydase Spectre UV/Visible

Un spectre UV/Visible pour le cytochrome c_{552} à pH 8 a été réalisé pour la forme oxydée et réduite de la protéine. Les conditions sont les mêmes que précédemment. Ce spectre sert à contrôler l'état redox de la protéine et à déterminer sa concentration.



Figure 5.3.1 : Spectres UV/Visible du cytochrome c_{552} à pH 8 dans sa forme oxydée (en noir) et dans sa forme réduite (en rouge) après ajout de dithionite. En encart un zoom entre 500 et 600 nm.

Le spectre présente une bande d'absorption intense nommée bande de Soret, à 415 nm dans la forme oxydée et à 416 nm pour la forme réduite (voir figure 5.3.1). Pour les bandes Q, il y a une contribution très faible dans le spectre de la forme oxydée. Pour la forme réduite, une première bande se situe à 520 nm. La deuxième bande comporte une contribution majoritaire à 552 nm et un épaulement à 548 nm. C'est cette bande qui sera à l'origine du nom de la protéine.(*5*, *25*).

3.2. Spectroscopie différentielle UV/Visible : détermination du potentiel de demivague

Le potentiel de demi-vague de la protéine est effectué dans le but de le comparer à celui de la littérature et à celui obtenu pour le complexe.

La figure 5.3.2 montre les spectres du dosage du cytochrome c_{552} dans la cellule OTTLE pour des potentiels allant de -500 à +500 mV. Deux bandes sont utilisées parmi les cinq pour la détermination du potentiel de demi-vague. A 423 nm, la contribution de la bande de Soret qui permet de trouver ce potentiel est visible. Comme vu précédemment les bandes Q se scindent en deux bandes. L'épaulement a une intensité plus faible car son coefficient d'absorption molaire est trop faible.

Le temps d'équilibre pour la forme entièrement oxydée est de 5 min et pour la forme entièrement réduite de 4 min après application du potentiel. Il est ici de 15 min lorsque la valeur du potentiel de demi-vague est proche.

Le potentiel obtenu pour le cytochrome c_{552} est E_m =-29 mV± 2.8 pour n=1 (voir figure 5.3.3). La valeur trouvée par Fee et al. qui est de -49 mV, potentiel déterminé par adsorption sur une surface d'or.(5) La différence entre les deux potentiels peut s'expliquer par la méthode utilisée, en effet l'adsorption modifie le potentiel de façon conséquente. Si le dosage est oxydatif ou réductif, la valeur du potentiel est rigoureusement la même.



Figure 5.3.2 : Spectres du dosage du cytochrome c_{552} à pH 8 pour un potentiel de -500 à +500 mV entre 400 et 600 nm. Le dosage est ici oxydatif.



Figure 5.3.3 : Courbe de titration redox du cytochrome c_{552} à pH 8 effectuée sur la bande de Soret, le potentiel de demi-vague est : E_m =-29 mV±2.8 pour n=1.

3.3. Spectroscopie différentielle infrarouge

Le spectre du cytochrome c_{552} de *T. thermophilus* a été enregistré entre 1800 et 1200 cm⁻¹ à pH 8 entre -500 et +500 mV. Les différentes bandes sont répertoriées dans le tableau 5.3.1. Des contributions des différents modes de l'hème et de l'environnement entourant l'unique cofacteur sont attendues. Ce spectre n'a jamais été décrit auparavant.



Figure 5.3.4 : Spectre différentiel infrarouge (ox-red) du cytochrome c_{552} à pH 8 dans la région spectrale comprise entre 1800 et 1200 cm⁻¹ entre -500 et +500 mV.

1716Ox $v(C=O)$ Asp+Glu1707Red $v(C=O)$ propionates des hèmes1695Ox $v(C=O)$ propionates des hèmes1686Red $v(C=O)$ propionates des hèmes /Amide I1674Ox $v(CN_3H_5)^{as}$ Arg/Amide I/ $v(C=O)$ propionates	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	rodov	Tentative d'attribution	
1710 OX $v(C=O)$ Aspirola1707Red $v(C=O)$ propionates des hèmes1695 Ox $v(C=O)$ propionates des hèmes1686Red $v(C=O)$ propionates des hèmes /Amide I1674 Ox $v(CN_3H_5)^{as}$ Arg/Amide I/ $v(C=O)$ propionatedes hèmes	1716		v(C=O) Asn+Glu	
1707Red $v(C=O)$ proproducts des hemes1695Ox $v(C=O)$ proproducts des hèmes1686Red $v(C=O)$ proproducts des hèmes /Amide I1674Ox $v(CN_3H_5)^{as}$ Arg/Amide I/ $v(C=O)$ proproductsdes hèmes	1710	Red	v(C-O) propionates des hèmes	
1686Red $v(C=O)$ propionates des hèmes /Amide I1674Ox $v(CN_3H_5)^{as}$ Arg/Amide I/ $v(C=O)$ propionatedes hèmes	1695	Ox	v(C=O) propionates des hèmes	
1674 $V(C=O)$ proproduces des hemes /Amide T des hèmes	1686	Dad	v(C=0) propionates des hèmes /Amide I	
des hèmes	1674	Ov	$v(CN, H)^{as} Arg/Amide I/v(C-O)$ propionates	
	1074	ŪX.	des hèmes	
1665-1650 Red/Ox Amide I	1665-1650	Red/Ox	Amide I	
1645RedAmide I/ vibration $CaCm(v_{37})$	1645	Red	Amide I/ vibration $CaCm$ (v_{37})	
1640 Ox Amide I	1640	Ox	Amide I	
1630 Red $v(CN_3H_5)^s \operatorname{Arg} / \delta(NH_3^+)^{as} Lys / Amide I$	1630	Red	$v(CN_3H_5)^s$ Arg $/\delta(NH_3^+)^{as}$ Lys/Amide I	
1625 Ox $\delta(NH_2)$ Asn+Gln/Amide I	1625	Ox	$\delta(NH_2)$ Asn+Gln/Amide I	
1610 Red Vibration $CaCm(v_{37})$ /Amide I	1610	Red	Vibration CaCm (v_{37}) /Amide I	
1597 Ox Vibration $CaCm(v_{37})$	1597	Ox	Vibration $CaCm(v_{37})$	
1577 Red $v(COO^{-})^{as}$ Asp+Glu	1577	Red	v(COO ⁻) ^{as} Asp+Glu	
1565 Ox $v(COO^{-})^{as}$ propionates des hèmes / $v(COO^{-})^{a}$	1565	Ox	$v(COO^{-})^{as}$ propionates des hèmes / $v(COO^{-})^{as}$	
Asp+Glu/ CbCb vibration (v_{38}) /Amide II			Asp+Glu/ CbCb vibration (v ₃₈) /Amide II	
1554 Red Amide II	1554	Red	Amide II	
1545 Ox Amide II	1545	Ox	Amide II	
1535 Red $v(COO^{-})^{as}$ propionates des hèmes / $v(COO^{-})^{s}$	1535	Red	$v(COO^{-})^{as}$ propionates des hèmes / $v(COO^{-})^{as}$	
Asp+Glu/Amide II	1520	Ov	Asp+Glu/Amide II	
$1520 \qquad Ox \qquad Tyr O^{-}$	1504	Ox		
$1304 \qquad OX \qquad 1yr-O$	1425	Ox	$y(COO^{-})^{s}$ A sp Clu	
$1430 \qquad \text{Pod} \qquad \nu(\text{COC})^{\text{S}} \text{Asp} \text{-} \text{Glu}$	1435	Dad	$v(COC)^{s}$ Asp+Glu	
$\frac{1430}{1420} \qquad O_{\rm X} \qquad \qquad \nu({\rm COO})^{\rm S} {\rm App} {\rm Gh}$	1430	Ov	$v(COO^{-})^{s}$ A sp + Glu	
1420 $V(COO)$ Asp+Glu 1410 Ped $V(COO)^{s}$ Asp+Clu	1420	Dad	$v(COO^{-})^{s}$ A sp + Chu	
1410 Red $V(COO)$ Asp+Olu 1402 Ox $V(COO)^{5}$ Asp	1410	Neu Ov	$v(COO^{-18} A cm)$	
$1402 OX V(COO) Asp$ $1284 Ded Vibration CaN(u_{1})$	1402	Dad	V(COO) Asp	
1384 Red vibration $Caiv(v_{41})$	1364	Red	vibration Calv (v_{41})	
1366 Ox V(COO) propionales des nemes	1300		v(COO) propionales des nemes	
1346 Red $\gamma(CH_2)$ Lys	1346	Red	$\gamma(CH_2)$ Lys	
1333 Red $v(COO)^{\circ}$ propionates des hemes	1333	Red	v(COO) [*] propionates des hemes	
1310 Ox v(COO) ^o propionates des hèmes	1310	Ox	v(COU) ^o propionates des hêmes	
1295 Ox $v(CC), \delta(CH)$ Tyr	1295	Ox	ν(CC), δ(CH) Tyr	
1260 Ox Vibration $CmH(\delta_{42})$	1260	Ox	Vibration $CmH(\delta_{42})$	
1250 Red $\delta(COH)$ Tyr	1250	Red	δ(COH) Tyr	
1240 Red Vibration $CmH(\delta_{42})$	1240	Red	Vibration $CmH(\delta_{42})$	

Tableau 5.3.1 : Tentative d'assignements pour le spectre différentiel infrarouge (ox-red) du cytochrome c_{552} de T.thermophilus à pH 8.

Ce spectre se décompose en trois zones spectrales bien distinctes : entre 1720 et 1600 cm⁻¹, entre 1600 et 1200 cm⁻¹ et entre 1200 et 1000 cm⁻¹. Entre 1800 et 1720 cm⁻¹, aucune contribution n'est à noter (voir figure 5.3.4).



Figure 5.3.5 : Spectre différentiel infrarouge (ox-red) du cytochrome c_{552} à pH 8 dans la région spectrale comprise entre 1720 et 1600 cm⁻¹ entre -500 et +500 mV.

Dans cette première région, des contributions des vibrations C=O du squelette peptidique qui caractérisent la structure secondaire de la protéine sont attendues (voir figure 5.3.5). Cette protéine est majoritairement composée d'hélices α comme le suggère la structure cristalline.(5) Sept bandes sont mises en avant qui décrivent chacune des éléments structuraux. La bande négative à 1665 cm⁻¹ représente la participation des hélices α . Les feuillets β contribuent par des bandes négatives à 1645, 1630 et 1610 cm⁻¹ et positives à 1640 et 1625 cm⁻¹ D'autres contributions sont bien entendu attendues, comme celles des boucles et de la structure aléatoire du squelette peptidique. A 1686 et à 1674 cm⁻¹, l'apport des boucles est visible. La structure aléatoire contribue elle à 1650 cm⁻¹.(*14, 15, 26*)

Dans cette région, des signaux typiques pour la vibration v(C=O) des propionates des hèmes protonés sont présents. Des signaux négatifs à 1707 et 1686 cm⁻¹ et positifs à 1695 et 1674 cm⁻¹ sont caractéristiques de cette vibration.

Des modes de l'anneau porphyrine sont aussi visibles comme la vibration CaCm (v37). Généralement, sa contribution est attendue entre 1655 et 1586 cm⁻¹, dans notre cas elle est à 1645 cm⁻¹.(27)

Pour finir, des contributions des modes principaux d'acides aminés sont claires. Les vibrations v(C=O) des chaînes latérales de l'acide Aspartique et Glutamique protonées sont présentes à 1718 cm⁻¹. Cette vibration dépend des liaisons Hydrogène formées avec les groupes COOH. Comme dans le cytochrome c_1 , la contribution d'acides aminés qu'ont les deux protéines en commun se retrouve ici. L'Arginine contribue via deux modes de vibrations distinctes, une vibration v(CN₃H₅) asymétrique à 1674 cm⁻¹ et sa vibration associée v(CN₃H₅) symétrique à 1630 cm⁻¹. L'Asparagine et la Glutamine ont une bande à 1630 cm⁻¹ qui représente la vibration v(C=O) et à 1625 cm⁻¹ pour la vibration δ (NH₂). Enfin, dans cette zone spectrale, un dernier acide aminé la Lysine a une bande à 1630 cm⁻¹ grâce à sa vibration δ (NH₃⁺) asymétrique mais avec un coefficient d'absorption plus faible que la bande de l'Arginine.(*28, 29*)



Figure 5.3.6 : Spectre différentiel infrarouge (ox-red) du cytochrome c_{552} à pH 8 dans la région spectrale comprise entre 1600 et 1200 cm⁻¹ entre -500 et +500 mV.

Cette seconde région voit la contribution de diverses vibrations de l'hème et de divers acides aminés (voir figure 5.3.6). Pour commencer, la bande Amide II a plusieurs bandes positives et négatives dans une région allant de 1570 à 1520 cm⁻¹.

Comme vue dans la première région spectrale, la contribution de l'anneau porphyrine, grâce à la vibration v_{37} à 1610 et 1597 cm⁻¹, se retrouve ici.(27)

La vibration v_{38} est présente à 1565 cm⁻¹(*17*) ainsi que la vibration v_{41} à 1384 cm⁻¹.(*30*) Enfin, une bande positive à 1260 cm⁻¹ et négative à 1240 cm⁻¹ caractérise la vibration δ_{42} .(*17*)

D'autres signaux complémentaires sont aussi espérés dans cette zone comme la vibration $v(COO^{-})$ asymétrique des propionates des hèmes qui a une bande positive à 1565 cm⁻¹ et négative à 1535 cm⁻¹. De plus, sa vibration associée $v(COO^{-})$ symétrique est attendue entre 1366 et 1310 cm⁻¹.

La dernière contribution provient des différents acides aminés. Pour commencer, une bande positive à 1520 cm⁻¹ et une négative à 1504 cm⁻¹ décrit la vibration de l'anneau de la Tyrosine. Ces bandes ont un coefficient d'absorption très fort.(*31*) D'autres signaux de Tyrosine sont visibles. A 1295 cm⁻¹, la vibration v(CC) et δ (CH) et à 1250 cm⁻¹ celle de la vibration δ (COH) sont présentes.(*22*) Puis, la contribution des acides Aspartiques et Glutamique est présente. La contribution de la vibration v(COO⁻) asymétrique est généralement espérée entre 1580 et 1560 cm⁻¹. Une bande est présente à 1577 et à 1565 cm⁻¹ mais également à 1535 cm⁻¹ avec un coefficient d'absorption plus faible. La vibration associée v(COO⁻) symétrique donne quatre bandes à 1435 et 1410 cm⁻¹. Cependant, à 1402 cm⁻¹ la vibration v(COO⁻) symétrique est visible uniquement pour l'acide Glutamique.(*20, 28*) Ces différentes attributions sont basées sur l'étude des acides aminés individuels. Pour finir, la contribution d'autres acides aminés comme par exemple, la Lysine qui a une contribution à 1346 cm⁻¹ avec sa vibration γ (CH₂).(*32*) Enfin, l'Histidine contribue dans ce spectre à 1217 cm⁻¹ grâce à sa vibration δ (CH).(*33*)

Dans la dernière région spectrale comprise entre 1200 et 1000 cm⁻¹, la contribution des vibrations P=O spécifiques du tampon est la seule attendue. Elles sont dues à la déprotonation du tampon et corrélées à l'absorption de protons par la protéine et des médiateurs suite au transfert d'électrons.(24)

L'étude des différents complexes est maintenant possible.

4. Les complexes

4.1. Le complexe *c*-*c*₅₅₂

D'après la littérature, il n'existe aucune interaction possible entre le cytochrome c mitochondrial et le cytochrome c_{552} de *T.thermophilus*. Leur surface n'est pas optimale pour une telle interaction, le cytochrome c étant composé de résidus Lysine qui entoure la cavité de l'hème.(*34*) Le cytochrome c_{552} nécessite une surface hydrophobe pour qu'une interaction soit possible. Il s'agit d'un système de contrôle. On doit observer une simple superposition des deux signaux. Pour corroborer ces informations, le potentiel de demi-vague du complexe formé est étudié.

4.1.1. Spectroscopie différentielle UV/Visible : détermination du potentiel de demi-vague

Le potentiel de demi-vague du complexe est comparé à celui des deux cytochromes isolés. La figure 5.4.1 montre les spectres du dosage du complexe c-c₅₅₂ dans la cellule OTTLE pour des potentiels allant de -500 à +500 mV.



Figure 5.4.1 : Spectres du dosage du complexe c-c₅₅₂ à pH 8 pour un potentiel de -500 à +500 mV entre 350 et 600 nm. Le dosage est ici oxydatif.

Tout d'abord la bande de Soret possède deux bandes à 419 et à 402 nm. Enfin, les bandes Q présentent également deux bandes à 549 et 519 nm (voir figure 5.4.1).

Le temps d'équilibre pour la forme entièrement oxydée est de 5 min et pour la forme entièrement réduite de 4 min après application du potentiel II est ici de 15 min lorsque la valeur du potentiel de demi-vague est proche.

Les valeurs trouvées sont de : E_{m1} = -35 mV±10.9 pour n=1 et E_{m2} = 50 mV±1.9 pour n=1 (voir figure 5.4.2). Ces valeurs sont à rapprocher de celles obtenues par nos soins pour le cytochrome *c* et *c*₁ et celles obtenus par Moss et al. avec la même cellule (*35*) ($E_m(c_{552})$ = -29 mV et $E_m(c)$ = 45 mV).

Si les deux cytochromes isolés ont des valeurs très éloignées l'une de l'autre, les deux potentiels sont donc observés. A l'inverse, si les potentiels sont séparés par moins de 50 mV d'écart, un signal large et moyen est visible car ils ne peuvent pas être différenciés. Ici, les potentiels sont suffisamment éloignés, ils peuvent donc être différenciés. Un calcul pour trouver une seule valeur du potentiel marche également dans ce cas.

Nos premières conclusions sont que les deux potentiels des deux cytochromes sont présents et ne sont pratiquement pas influencés car leurs potentiels sont retrouvés. Le cytochrome c_{552} s'oxyde et se réduit également vu qu'il n'y a pas d'interaction. En regardant le spectre du dosage, la bande à 419 nm a d'abord une décroissance avant de croitre lorsque le potentiel augmente. Si le dosage est oxydatif ou réductif, la valeur du potentiel est rigoureusement la même.



Potentiel / mV vs. Ag/AgCl 3M KCl

Figure 5.4.2 : Courbe de titration redox du cytochrome c-c₅₅₂ à pH 8 effectuée sur la bande de Soret, les potentiels de demi-vague sont : E_{m1} =-35 mV±10.9 pour n=1 et E_{m2} = 50 mV±1.9 pour n=1.

4.1.2. Spectroscopie différentielle infrarouge-comparaison avec l'addition arithmétique

Le spectre du complexe *c*- c_{552} de *T. thermophilus* a été enregistré à pH 8 entre 1800 et 1200 cm⁻¹ entre -500 et +500 mV (voir figure 5.4.3). Ce spectre est directement comparé à l'addition arithmétique, car les potentiels de demi-vague ne sont pas affectés.

Les deux spectres sont comparés dans la figure 5.4.3. Le spectre arithmétique est pris comme référence et est normalisé par rapport à la bande à 1692 cm⁻¹ pour pouvoir mieux comparer les deux spectres.

Le spectre infrarouge de l'addition arithmétique des deux cytochromes est identique à celui du complexe formé. Comme constaté précédemment avec les potentiels de demi-vague, les spectres se ressemblent ce qui confirme qu'il n'y a pas d'interaction entre ces deux cytochromes.



Figure 5.4.3 : Spectres différentiels infrarouge (ox-red) du complexe c-c₅₅₂ (en rouge) et de l'addition arithmétique (en noir) à pH 8 dans la région spectrale comprise entre 1800 et 1200 cm⁻¹ entre -500 et +500 mV.

4.2. Le complexe c_1 -c

De nombreuses études ont été effectuées sur l'interaction entre le cytochrome c_1 de différents organismes, comme la levure, *P. denitrificans, Rhodobacter sphaeroides*, mais jamais *T.thermophilus* et le cytochrome *c* de avec diverses techniques comme la RMN,(*36*) la cristallographie(*37*) et la RPE.(*38*)

Le cytochrome c possède majoritairement des résidus Lysines chargés positivement à sa surface. Ces charges apparaissent comme étant assez flexibles ce qui rend les interactions électrostatiques à longue distance faible.(39) Il doit réagir avec des groupes carboxylates issus de son partenaire redox. Il est aussi connu que le cytochrome c subit un changement de conformation minime pendant le transfert d'électrons et donc pendant la formation du complexe.(39) Dans le cytochrome c_1 , les résidus localisés autour de la crevasse de l'hème contribuent à cette interaction.(40) D'après des études de différents mutants, l'interaction est donc purement électrostatique et de nature coulombienne.(8, 41-43) Le transfert d'électrons se fait d'hème à hème. Cette interaction est décrite depuis 1976 mais sans l'apport de la structure cristalline elle était difficilement explicable.(44)

La première structure cristalline a été réalisée en 2002 par Lange et Hunte (voir figure 5.4.4), mais pour le cytochrome bc_1 de l'organisme *Saccharomyces cerevisiae*.(45) Dans ce cas-là, l'interaction est gouvernée par des forces non polaires et donc les interactions sont hydrophobes créant un site de contact très compact important pour l'orientation du complexe. Les contacts directs sont dominés par des forces électrostatiques qui stabilisent le complexe. De plus, des interactions cations- π sont très importantes pour la liaison du complexe.(46) II en résulte donc qu'un modèle à deux pas est nécessaire pour décrire l'association entre deux partenaires redox.

Le rapprochement des deux partenaires se fait par des interactions électrostatiques à longue distance. Une fois les deux partenaires assez proches, des interactions hydrophobes à courte distance entrent en jeu pour permettre un transfert d'électron rapide. Ces interactions ne conduisent à aucun changement dans les potentiels redox des deux hèmes.(47, 48)

Dans notre cas, un fragment soluble du cytochrome c_1 est utilisé et surtout avec un autre organisme que ceux des études menées.



Figure 5.4.4 : Description de l'interaction hème-hème entre le cytochrome c_1 de *Saccharomyces cerevisiae* et c de cœur de bœuf.(45)

4.2.1. Spectroscopie différentielle UV/Visible : détermination du potentiel de demi-vague

Le ou les potentiels de demi-vague du complexe sont déterminés et comparés à celui des deux cytochromes isolés. La figure 5.4.5 montre les dosages du complexe c_1 -c dans la cellule OTTLE pour des potentiels allant de -500 à +500 mV.

Comme précédemment, quatre bandes sont mises en avant. La bande la plus intense est la bande de Soret, elle a deux bandes à 417 et à 402 nm. Enfin, les bandes Q sont visibles à 550 et 520 nm.

Le calcul du potentiel se fait sur les quatre bandes. Après 5 min, la forme oxydée est visible et après 6 min la forme réduite. Un temps d'attente de 20 min est nécessaire lorsque le potentiel de demi-vague est proche de sa valeur.



Figure 5.4.5 : Spectres du dosage du complexe c_1 -c à pH 8 pour un potentiel de -500 à +500 mV entre 400 et 600 nm. Le dosage est ici oxydatif.

Les valeurs trouvées sont : E_{m1} = -82 mV± 12.1 pour n=1 et E_{m2} =70 mV± 4.9 pour n=1 (voir figure 5.4.6). Ces valeurs sont à rapprocher de celles trouvées pour les hèmes individuels ($E_m(c_1)$ = -60 mV et $E_m(c)$ = 45 mV). Un calcul pour trouver une seule valeur du potentiel marche également dans ce cas. Si le dosage est oxydatif ou réductif, la valeur du potentiel est rigoureusement la même. Nous constatons que les potentiels sont légèrement perturbés.



Potentiel / mV vs. Ag/AgCl 3M KCl

Figure 5.4.6 : Courbe de titration redox du complexe c_1 -c à pH 8 effectuée sur la bande de Soret, les potentiels de demi-vague sont : E_{m1} =-82 mV±12.1 pour n=1 et E_{m2} = 70 mV±4.9 pour n=1.

4.2.2. Spectroscopie différentielle infrarouge

Le spectre du complexe c_1 -c de T. thermophilus entre 1800 et 1200 cm⁻¹ à pH 8 entre -500 et +500 mV est réalisé. Il serait aussi intéressant de le comparer à l'addition arithmétique des deux cytochromes. Les bandes observées ont été consignées dans le tableau 5.4.1.



Figure 5.4.7 : Spectre différentiel infrarouge (ox-red) du complexe c_1 -c à pH 8 dans la région spectrale comprise entre 1800 et 1200 cm⁻¹ entre -500 et +500 mV.

Trois zones spectrales sont distinctes : de 1710 à 1615 cm⁻¹, de 1610 cm⁻¹ à 1200 cm⁻¹ et de 1200 à 1000 cm⁻¹. Aucune contribution n'est visible entre 1800 et 1705 cm⁻¹ (voir figure 5.4.7).

Position de la bande (cm^{-1})	Etat	Tentative d'attribution	Cytochrome	Cytochrome
Danue (chi)	Teutox		c_1	L
1702	Ox	v(C=O) propionates des		
		hèmes		
1693	Red	v(C=O) propionates des		Х
1.004	0	hèmes / Amide I		
1684	Ox	v(C=O) propionates des		
1667	Red	hemes / Amide I		
1657	Ox	Amide I	x	
1645	Red	Amide I/ vibration CaCm	X	
		(v ₃₇)		
1630	Ox	$\nu(CN_3H_5)^s \operatorname{Arg} / \delta(NH_3^+)^{as}$	Х	
		Lys/ Amide I		
1621	Red	$\delta(\mathrm{NH}_3^{T})^{\mathrm{as}}$ Lys/Amide I		
1615	Ox	Amide I		Х
1610	Red	Vibration $CaCm(v_{37})$	X	
1593	Ox	vibration $CaCm(v_{37})$	А	X(Red)
1375	ŬX.	ham $\sqrt{v(COO)}$ proproduces des		
		$A \operatorname{sp}(\operatorname{Glu}/\operatorname{vibration} \operatorname{CbCh})$		
		$(v_{reo})/A$ mide II		
1535	Red	$v(COO^{-})^{as}$ propionates des	x	x
1000	neu	hèmes / $v(COO^{-})^{as}$	1	11
		Asn+Glu/Amide II		
1520	Ox	Tyr-OH	Х	Х
1513	Red	Tyr-OH		Х
1504	Ox	Tvr-O ⁻	Х	Х
1430	Red	$v(COO^{-})^{s}$ Asp+Glu		Х
1420	Ox	$v(COO^{-})^{s}$ Asp+Glu	x	X
1393	Ox	Vibration $CaN(y_{ij})$	X	1
1395	Pad	Vibration $CaN(v_{41})$	A	v
1276	Ov	Vibration $CaN(v_{41})$	\mathbf{v}	Λ
1370	Ox Or	$v_{101} = (COO^{-1})^{s}$	Λ	V
1300	UX	v(COO) propionates des		X
1358	Red	nemes v(COO ⁻) ^s propionates des	х	Х
1000	1100	hèmes	<u>.</u>	
1310	Ox	$v(COO^{-})^{s}$ propionates des		
		hèmes		
1252	Ox	Vibration CmH (δ_{42})		
1237	Red	Vibration $CmH(\delta_{42})$		

Tableau 5.4.1 : Tentative d'assignements pour le spectre différentiel infrarouge (ox-red) du complexe c_1 -c de T.*thermophilus* avec l'attribution individuelle des bandes pour le cytochrome c_1 et c à pH 8.



Figure 5.4.8 : Spectre différentiel infrarouge (ox-red) du complexe c_1 -c à pH 8 dans la région spectrale comprise entre 1710 et 1600 cm⁻¹ entre -500 et +500 mV.

Les deux cytochromes sont majoritairement dominés par des hélices α , il n'est donc pas étonnant d'en trouver dans ce complexe (voir figure 5.4.8).(5, 16) La bande Amide I contribue entre 1690 et 1610 cm⁻¹. Il faut noter également que le nombre de bandes présentes pour chaque élément structural n'a pas de rapport avec son pourcentage dans la structure secondaire mais a un rapport avec les changements qui interviennent en fonction de la réaction redox. Les feuillets β contribuent avec plusieurs bandes à 1693, 1630, 1621 et 1615 cm⁻¹. A 1684, 1667 et 1645 cm⁻¹, la présence des boucles et de la structure aléatoire du squelette peptidique est claire. Enfin, les hélices α participent avec la bande à 1657 cm⁻¹.

Les propionates des hèmes sont également présents à 1702 et 1684 cm⁻¹ avec des bandes positives correspondant à la vibration v(C=O) et à 1693 cm⁻¹ avec une bande négative issue de la même vibration.

Outre ces bandes, des vibrations provenant de l'anneau porphyrine et des chaînes latérales d'acides aminés sont attendues. La vibration v_{37} caractéristique de l'anneau porphyrine est présente à 1645 cm⁻¹.(27) L'acide aminé Arginine contribue à 1630 cm⁻¹ grâce à sa vibration $v(CN_3H_5)$ symétrique et l'acide aminé Lysine a deux bandes à 1630 et 1621 cm⁻¹ dues à sa vibration $\delta(NH_3^+)$ asymétrique.(49)



Figure 5.4.9 : Spectre différentiel infrarouge (ox-red) du complexe c_1 -c à pH 8 dans la région spectrale comprise entre 1600 et 1200 cm⁻¹ entre -500 et +500 mV.

Pour la seconde région entre 1610 et 1200 cm⁻¹, la bande Amide II contribue principalement entre 1575 et 1520 cm⁻¹ (voir figure 5.4.9).

Des vibrations associées aux propionates des hèmes sont visibles dans la région amide II, mais il y a un chevauchement de certaines bandes avec les vibrations des chaînes latérales des acides aminés. La vibration v(COO⁻) asymétrique des propionates des hèmes est caractérisée par deux bandes. Une bande positive est présente à 1575 cm⁻¹ et une autre négative à 1535 cm⁻¹. La vibration v(COO⁻) symétrique est visible à 1366 et 1310 cm⁻¹ avec une bande positive et à 1358 cm⁻¹ avec une bande négative.

Des vibrations de l'anneau porphyrine sont aussi visibles dans cette zone spectrale. La vibration CaCm (v_{37}) contribue à 1610 et 1593 cm⁻¹. A 1575 cm⁻¹, la vibration CbCb (v_{38}) est visible. Puis la vibration CaN (v_{41}) participe au spectre grâce à trois bandes 1393, 1384 et 1376 cm⁻¹. Enfin, à 1252 et 1237 cm⁻¹, la contribution de la vibration CmH (δ_{42}) est visible.

Pour finir, la présence de vibrations des chaînes latérales d'acides aminés est claire. Les vibrations v(COO⁻) asymétriques de l'acide Aspartique et Glutamique se retrouvent à 1575 et 1535 cm⁻¹, ainsi que leurs vibrations v(COO⁻) symétriques à 1430 et 1420 cm⁻¹.

La Tyrosine est visible à 1520, 1513 et 1504 cm⁻¹ grâce à sa vibration de l'anneau Tyrosine. D'autres acides aminés sont présents comme l'Alanine et la Valine. Pour la région entre 1200 et 1000 cm⁻¹, la contribution des vibrations P=O spécifiques du tampon domine le spectre comme dans les autres protéines.

Il est intéressant à présent de comparer ce spectre du complexe avec l'addition arithmétique des deux cytochromes isolés.

4.2.3. Comparaison avec l'addition arithmétique

Les deux spectres sont comparés dans la figure 5.4.10. Les spectres ne se ressemblent pas ce qui confirme qu'une interaction est présente.



Figure 5.4.10 : Spectres différentiels infrarouge (ox-red) du complexe c_1 -c (en rouge) et de l'addition arithmétique (en noir) à pH 8 dans la région spectrale comprise entre 1750 et 1550 cm⁻¹ entre -500 et +500 mV.

Le spectre arithmétique est pris comme référence et est normalisé par rapport à la bande à 1692 cm⁻¹ pour pouvoir mieux comparer les deux spectres.

On note quelques différences principalement dans la zone spectrale comprise entre 1684 et 1575 cm⁻¹ (voir figure 5.4.10). Cette zone spectrale regroupe les bandes Amide I et Amide II et d'autres bandes comme les propionates des hèmes. Ce changement dans cette zone spectrale n'a rien d'étonnant puisqu'un changement de conformation est attendue pour la formation de ce complexe.

Les différences et les nouvelles bandes sont consignées dans le tableau 5.4.2. Trois nouvelles bandes apparaissent qui ne sont pas présentes pour le complexe mais qui apparaissent lors de l'addition arithmétique. Ces bandes sont situées à 1600, 1565 et 1554 cm⁻¹ et proviennent toutes du cytochrome *c*. Elles sont attribuées principalement aux vibrations $v(COO^{-})$ asymétriques de type carboxylate pour les acides Aspartique et Glutamique. Il n'est pas étonnant de voir ces vibrations dans cette zone spectrale, elles sont généralement situées dans une gamme très large. De plus, ces bandes dépendent également des liaisons Hydrogène. Les liaisons Hydrogène jouant un rôle dans la structure tertiaire du complexe, un changement de la structure du complexe est donc envisagé. Cependant, cette conclusion n'est pas définitive, ces trois bandes se situant dans une région spectrale complexe, un assignement définitif ne peut se faire que grâce à un marquage de ces deux acides aminés.

Position de la bande dans le complexe (cm ⁻¹)	Etat redox	Position de la bande pour l'addition arithmétique (cm ⁻¹)	Etat redox	Tentative d'attribution
1684	Ox	1675	Ox	<i>v</i> (C=O) propionates des hèmes /
				Amide I
1667	Red	1663	Red	Amide I
1657	Ox	1652	Ox	Amide I
1645	Red	1644	Red	Amide I/ CaCm vibration (v_{37})
1621	Red	1625	Red	$\delta(\mathrm{NH_3}^+)^{\mathrm{as}}$ Lys/Amide I
1615	Ox	1614	Ox	Amide I
1610	Red	1607	Red	Vibration CaCm (v_{37})
		1600	Ox	v(COO ⁻) ^{as} Asp+Glu (carboxylates)
1593	Ox	1596	Red	Vibration $CaCm(v_{37})$
1575	Ox	1580	Ox	$v(COO^{-})^{as}$ propionates des hèmes /
				v(COO ⁻) ^{as} Asp+Glu/ vibration
				$CbCb$ (v_{38})/Amide II
		1565	Red	v(COO ⁻) ^{as} Asp+Glu/Amide II
		1554	Ox	v(COO ⁻) ^{as} Asp+Glu/Amide II
1252	Ox	1250	Ox	Vibration $CmH(\delta_{42})$
1237	Red	1244	Red	Vibration $CmH(\delta_{42})$

Tableau 5.4.2 : Tentative d'assignements pour le spectre différentiel infrarouge (ox-red) du complexe c_1 -c comparé avec son addition arithmétique de *T. thermophilus* à pH 8.

D'autres bandes sont bien entendues communes aux deux spectres, certaines subissent un décalage. Il est intéressant de noter que certaines de ces bandes ne sont pas issues des deux cytochromes isolés ce qui renforce notre hypothèse qu'une interaction existe bel et bien.

De plus, certains cytochromes *c* mitochondriales subissent un changement de conformation dont le plus important se situe à la base de l'hème et localisé dans les groupes propionates. En conséquence, un changement de conformation entraîne une modification dans les propionates des hèmes et donc dans le potentiel de demi-vague. Un déplacement de ces bandes ou un changement d'état redox peut expliquer ce phénomène.

Les décalages les plus flagrants ont lieu pour les propionates des hèmes. Tout d'abord la bande à 1684 cm⁻¹ est déplacée à 1675 cm⁻¹. Cette bande est à attribuer à la vibration v(C=O) des propionates des hèmes. De même, un déplacement est noté de 1575 à 1580 cm⁻¹ pour la vibration $v(COO^-)$ asymétrique des propionates des hèmes. Ces diminutions de la longueur d'onde lors de l'addition arithmétique montrent un changement d'environnement pour les propionates des hèmes.

Le potentiel de demi-vague d'une protéine est déterminé par la nature du ligand axial relié à l'hème mais également par les groupes fonctionnels ionisables situés loin ou à proximité de l'hème.(50) L'absence ou la présence de sous-unités affecte également le potentiel. Il a été proposé que l'interaction entre les chaînes latérales des propionates des hèmes et les charges positives des ions ferriques détermine la valeur du potentiel et joue un rôle dans le changement de conformation dû à l'état redox. Ce potentiel varie avec le pH à cause de la présence de l'anion propionate qui régule le potentiel.(51-53) L'étude de l'hémine et du cytochrome c a montré que la protonation/déprotonation des propionates influence le potentiel de demi-vague de la protéine.(54, 55)

D'après nos études, il y a bien une interaction entre ces deux hèmes et donc les potentiels sont légèrement modifiés. Or, un changement d'environnement ou d'état redox des propionates des hèmes est visible ce qui implique une modification de potentiel constatée ici. Les cytochromes c_1 et c ne peuvent pas être partenaires car ils ont tout simplement la même fonction.

Pour confirmer nos conclusions, il est intéressant d'étudier la structure cristalline de ce complexe. Cette interaction est bien connue pour différents organismes mais pas pour le cytochrome c_1 de *T. thermophilus.*(45)

4.3. Etude de l'interaction entre le cytochrome c1 et c552 4.3.1. Introduction

Janzon et al. présentent l'interaction entre le cytochrome c_1 et c_{552} pour l'organisme *P*. *denitrificans*.(56) L'organisme *P*. *denitrificans* est utilisé parce qu'il est analogue au système mitochondrial et permet de créer des mutants avec des spécificités très différentes.(57) Il est capable également de réduire l'oxygène moléculaire pour une large gamme de concentrations en oxygène.(58) Le cytochrome c_{552} est un donneur dédié pour le cytochrome c oxydase de type aa_3 . Le super complexe formé par le cytochrome aa_3 et le cytochrome bc_1 participe au transfert d'électrons.(59-61) Le cytochrome c_1 a comme partenaire redox le cytochrome c_{552} . Une récente étude a montré un transfert d'électrons très efficace entre ces deux partenaires. Il est aussi apparu qu'il n'y a pas d'implication directe du groupe N-terminale du cytochrome c_1 dans l'attraction électrostatique avec le cytochrome $c_{552}.(62)$

Dans *T.thermophilus*, l'interaction entre ces deux cytochromes est hydrophobe d'après la nature de la surface de ces deux protéines.(*10*, *11*) Le cytochrome c_{552} ne possède pas de résidus chargés à sa surface à proximité de l'hème.(*4*) Les résidus Lysine présents autour de la crevasse de l'hème c_1 jouent un rôle central dans cette interaction.(*16*) Cette conclusion est soutenue par différentes études de détermination de structures de complexes qui relèvent que des petits sites de contact existent et interagissent grâce à des interactions hydrophobes.(*37*, *45*, *63*) Ces interactions hydrophobes ont pour effet un transfert d'électrons rapide car l'organisation spatiale autour de l'hème est favorable. La pénurie de charges dans cette interaction montre l'importance des forces non-électrostatiques durant cette réaction. La même situation est rencontrée pour l'interaction entre le c_{552} et le Cu_A.(*64*) Ainsi, la constante d'équilibré de l'interaction entre ces deux protéines a été calculée : K_{eq} = 1.1. La réaction est donc équilibrée et suggère qu'elle approche la limite imposée par la diffusion, on peut donc en conclure que les deux cytochromes sont physiologiquement partenaires.(*10*)

4.3.2. Détermination de la structure secondaire du complexe grâce à l'étude de la bande Amide I

Pour déterminer la structure secondaire de ce complexe, une déconvolution sur la bande Amide I issue d'un spectre RTA est effectuée (voir figure 5.4.11).



Figure 5.4.11 : Spectres infrarouge de la bande Amide I pour le complexe c_1 - c_{552} (en rouge), le cytochrome c_1 (en noir) et c_{552} (en bleu) à pH 8.

Cette bande se situe entre 1700 et 1600 cm⁻¹ et correspond aux vibrations v(C=O) du squelette peptidique qui donnent sur les différents pourcentages des éléments structuraux.(65) La figure 5.4.12 présente ces différentes bandes normalisées. Elles n'ont pas toutes le même maximum. Ce maximum renseigne sur l'élément de structure secondaire prédomine. Le cytochrome c_1 a une bande plus large avec un maximum qui se situe vers 1655 cm⁻¹ qui représente les hélices α . Pour le cytochrome c_{552} et le complexe, le maximum se situe vers 1660 et 1658 cm⁻¹. Ces deux longueurs d'ondes sont caractéristiques des hélices α mais également de la structure aléatoire.(*15, 66, 67*)

En utilisant la dérivée seconde de chaque spectre et en calculant quantitativement la superficie de chaque composante représentant un type de structure secondaire, le pourcentage de chaque élément structural pour ces trois protéines est en déduit.

Les résultats sont consignés dans le tableau 5.4.3. Avant de commenter le tableau, il est important de souligner que ces valeurs servent juste de contrôle et permettent éventuellement de justifier nos conclusions. Il faut savoir que l'erreur de calcul est de l'ordre de 10 % ce qui empêche de conclure sur le réel pourcentage de chaque élément structural. Cependant, une composante se détache dans chaque cas. Pour le cytochrome c_1 , il est clair que les hélices α prédomineront la structure avec une contribution d'environ 60 %. Pour le cytochrome c_{552} , une domination des hélices α avec un pourcentage non négligeable de feuillets β est constatée. D'après la structure cristalline, les hélices α dominent principalement la structure.(5) Enfin, pour le complexe c_1 - c_{552} , il y a un pourcentage très important de d'hélices α et de feuillets β qui prévalent dans la structure. Grâce à ces calculs, le complexe est bien formé car il n'a pas les mêmes pourcentages qu'un des deux cytochromes isolés. En outre, sa structure secondaire est prédominée par les hélices α , une modification de la structure n'est pas énergétiquement favorable.

Structure secondaire	Hélice α	Feuillets β	Boucles+
en %			Structure aléatoire
Cytochrome c_1	59	30	11
Cytochrome <i>c</i> ₅₅₂	55	38	7
Complexe c_1 - c_{552} 1:1	60	35	5

Tableau 5.4.3 : Pourcentage des différents éléments structuraux issus de la structure secondaire pour le complexe c_1 - c_{552} , les cytochromes c_1 et c_{552} à pH 8.

4.3.3. Spectre UV/Visible

Pour le complexe c_1 - c_{552} à pH 8, un spectre UV/Visible a été réalisé pour la forme oxydée et réduite de la protéine. Le passage à la forme réduite se fait de manière réversible par un ajout de dithionite de sodium (Na₂S₂O₄.2H₂O). Ce spectre permet de le comparer à celui des cytochromes isolés (voir figure 5.4.12).



Figure 5.4.12 : Spectres UV/Visible du complexe c_1 - c_{552} à pH 8 dans sa forme oxydée (en noir) et dans sa forme réduite (en rouge) après ajout de dithionite.

La bande de Soret est la bande la plus intense, elle se situe à 411 nm dans sa forme oxydée et à 418 nm dans sa forme réduite. Pour cette bande, la contribution des deux hèmes est claire. Pour les bandes Q, il y a une contribution très faible dans le spectre de la forme oxydée. Pour la forme réduite de la protéine, des bandes plus intenses à 520 et 552 nm sont visibles. Ce spectre est comparé par rapport au spectre des deux protéines isolées. Pour la bande Q, le spectre est quasiment identique. En revanche, pour la bande de Soret, un décalage est présent par rapport aux deux protéines d'environ 3 nm pour la forme oxydée et de 4 nm pour la forme réduite. Le complexe a donc son spectre d'absorption qui lui est propre avec la contribution des deux hèmes.

4.3.4. Spectroscopie différentielle UV/Visible : détermination du potentiel de demi-vague

Le potentiel de demi-vague du complexe est déterminé. Il est ensuite comparé à celui des deux cytochromes isolés. La figure montre les spectres du dosage du complexe c_1 - c_{552} pour des potentiels allant de -500 à +500 mV dans la cellule OTTLE.



Figure 5.4.13 : Spectres du dosage du complexe c_1 - c_{552} à pH 8 pour un potentiel de -500 à +500 mV entre 350 et 600 nm. Le dosage est ici réductif.

La bande la plus intense est la bande de Soret qui se situe à 418 nm. La bande Q quant à elle a deux bandes à 521 et 551 nm. Le calcul du potentiel se fait donc sur la bande de Soret et sur la bande Q (voir figure 5.4.13).

Après 15 min, la forme complètement oxydée est atteinte et après 10 min la forme complètement réduite. Un temps d'attente de 60 min est nécessaire lorsque les deux valeurs sont proches de celles des potentiels de demi-vague.

Ce spectre ressemble plus à celui du cytochrome c_{552} , cependant deux potentiels bien distincts sont trouvés : E_{m1} = -275 mV±11.6 pour n=0,9 et E_{m2} = 19 mV±4.5 pour n=0,9 (voir figure 5.4.14). Ces deux potentiels sont très différents de ceux des deux cytochromes isolés ($E_m(c_1)$ = -60 mV et $E_m(c_{552})$ = -29 mV). Une interaction existe bel et bien, les deux potentiels sont donc déplacés mais il est impossible de savoir, pour le moment, à quel cytochrome est relié chaque potentiel. Si le dosage est oxydatif ou réductif, la valeur du potentiel est rigoureusement la même.



Figure 5.4.14 : Courbe de titration redox du complexe c_1 - c_{552} à pH 8 effectuée sur la bande de Soret, les potentiels de demi-vague sont de : E_{m1} =-275 mV±11.6 pour n=0,9 et E_{m2} = 19 mV±4.5 pour n=0,9.

4.3.5. Spectroscopie différentielle infrarouge

Le spectre du complexe c_1 - c_{552} de *T. thermophilus* a été enregistré entre 1800 et 1200 cm⁻¹ à pH 8 entre -500 et +500 mV. Les différentes bandes sont répertoriées dans le tableau 5.4.4. Des contributions entre autres des différents modes des hèmes et de son environnement sont attendues. Il est comparé au spectre arithmétique des deux cytochromes. Or, comme ce complexe possède deux potentiels de demi-vague, il est possible, dans une gamme de potentiel choisi, d'obtenir la contribution d'un des deux hèmes uniquement.

Un potentiel entre -500 et +500 mV est appliqué pour avoir la contribution des deux hèmes. Puis des pas sont effectués entre -500 et -50 mV et entre -50 et + 500 mV pour voir une contribution d'un des deux hèmes uniquement.



Figure 5.4.15 : Spectre différentiel infrarouge (ox-red) du complexe c_1 - c_{552} à pH 8 dans la région spectrale comprise entre 1800 et 1200 cm⁻¹ entre -500 et +500 mV.

Trois zones spectrales sont distinctes : de 1750 à 1600 cm⁻¹, de 1600 à 1200 cm⁻¹ et de 1200 à 1000 cm⁻¹. Aucune contribution n'est attendue entre 1800 et 1750 cm⁻¹ (voir figure 5.4.15).
Position de	Etat	Tentative d'attribution	Cytochrome c_1	Cytochrome c_{552}
la bande	redox			
(cm^{-1})				
1735	Ox	v(C=O) Asp+Glu		
1716	Ox	v(C=O) Asp+Glu		Х
1707	Red	v(C=O) propionates des		Х
		hèmes		
1695	Ox	v(C=O) propionates des		Х
		hèmes /Amide I		
1686	Red	v(C=O) propionates des		Х
		hèmes /Amide I		
1665	Red	Amide I		Х
1657	Ox	Amide I	Х	Х
1645	Red	Vibration CaCm	Х	Х
		(v ₃₇)/Amide I		
1630	Ox	$\delta(NH_3^+)^{as}$ Lys/Amide I	Х	Х
1625	Red	$\delta(NH_2)$ Asn+Gln/Amide I		X(Ox)
1610	Red	Vibration CaCm	Х	X
		(v_{37}) /Amide I		
1593	Ox	Vibration $CaCm(v_{37})$	Х	
1577	Ox	v(COO ⁻) ^{as} Asp+Glu		X(Red)
1550	Red	Vibration $CaCm(v_{37})/$		
		Amide II		
1535	Red	$v(COO^{-})^{as}$ propionates des	Х	Х
		hèmes / $v(COO^{-})^{as}$		
		Asp+Glu / Amide II		
1520	Ox	Tvr-OH	X	X
1504	Ox	Tyr-O	X	X
1420	Ox	$v(COO)^{as}$ Asp+Glu	X	X
1407	Red	$v(COO^{-})^{s}$ Asp+Glu	X	
1393	Ox	Vibration $CaN(v_{41})$	X	
1384	Red	$v(COO^{-})^{s}$ propionates des		Х
1001		hèmes		
1366	Ox	$v(COO^{-})^{s}$ propionates des		Х
1000	0.1	hèmes		
1346	Red	$\gamma(CH_2)$ Lys		Х
1331	Ox	$v(COO-)^{s}$ propionates des	Х	
		hèmes	_	
1310	Ox	v(COO-) ^s propionates des	Х	Х
		hèmes		
1260	Ox	Vibration $CmH(\delta_{42})$	Х	Х
1240	Red	Vibration $CmH(\delta_{42})$	Х	Х
1217	Ox	δ(CH) His		Х

Tableau 5.4.4 : Tentative d'assignements pour le spectre différentiel infrarouge (ox-red) du complexe c_1 - c_{552} de *T. thermophilus* avec l'attribution individuelle des bandes pour le cytochrome c_1 et c_{552} à pH 8 entre -500 et +500



Figure 5.4.16 : Spectre différentiel infrarouge (ox-red) du complexe c_1 - c_{552} à pH 8 dans la région spectrale comprise entre 1750 et 1600 cm⁻¹ entre -500 et +500 mV.

Entre 1750 et 1600 cm⁻¹, des signaux typiques de la réorganisation des éléments structuraux couplés au transfert d'électrons sont présents (voir figure 5.4.16). Cependant, des signaux des hèmes sont aussi espérés dans cette zone spectrale. Une bande positive à 1695 cm⁻¹ représente la vibration v(C=O) d'un des propionates des hèmes. A 1707 et 1686 cm⁻¹, deux bandes négatives sont également caractéristiques des propionates des hèmes.(*17*) Outre la contribution de la structure secondaire, à 1645, 1610 et 1594 cm⁻¹ la vibration de type CaCm de l'anneau porphyrine de l'hème nommé v₃₇ est attendue.(*19*)

Enfin, dans cette zone spectrale, il y a également des contributions des chaînes latérales des acides aminés. A 1735 et 1716 cm⁻¹, les vibrations v(C=O) protonés des acides Aspartique et Glutamique sont présentes. A 1630 cm⁻¹, une bande correspond à une vibration $\delta(NH_3^+)$ asymétrique de la Lysine mais avec un coefficient d'absorption molaire très faible. Enfin, les vibrations $\delta(NH_2)$ de l'Asparagine et de la Glutamine sont visibles à 1625 cm⁻¹.(20)



Figure 5.4.17 : Spectre différentiel infrarouge (ox-red) du complexe c_1 - c_{552} à pH 8 dans la région spectrale comprise entre 1600 et 1200 cm⁻¹ entre -500 et +500 mV.

Dans la deuxième région située entre 1600 et 1200 cm⁻¹, d'autres contributions de l'hème sont à espérer ainsi que celle des vibrations d'Amide II (voir figure 5.4.17). Ces vibrations se situent entre 1570 et 1520 cm⁻¹.

Ici, les propionates des hèmes déprotonés sont attendus dans la région Amide II mais ces bandes se chevauchent avec la contribution de chaines latérales des acides aminés déprotonées. Une bande négative est présente à 1535 cm⁻¹ et décrit la vibration $v(COO^-)$ asymétrique des propionates des hèmes. Sa vibration associée $v(COO^-)$ symétrique est attendue entre 1384 et 1310 cm⁻¹.(*18*)

Comme dans la première zone spectrale, des contributions de l'anneau porphyrine avec les vibrations v_{37} entre 1610 et 1550 cm⁻¹, v_{41} à 1393 cm⁻¹ et δ_{42} à 1262 et 1240 cm⁻¹ sont espérées.(*17*)

Pour terminer, une contribution très grande des acides aminés est attendue. La vibration du cycle (C-C) des Tyrosines a une bande à 1520 et 1504 cm⁻¹. Il reflète la sensibilité des modes de l'anneau lors de la protonation du groupe phénol. Le signal positif à 1577 cm⁻¹ et négatif à 1535 cm⁻¹ reflètent les vibrations v(COO⁻) asymétrique des acides Aspartique et Glutamique. Les vibrations v(COO⁻) symétrique associées se situent à 1420 et 1407 cm⁻¹.(23)

Pour la Lysine, la vibration γ (CH₂) est visible à 1346 cm⁻¹. Pour l'Histidine, une bande à 1217 cm⁻¹ représentant la vibration δ (CH) est observée.

Dans la dernière zone spectrale entre 1200 et 1000 cm⁻¹, la contribution du tampon avec ses vibrations P=O spécifiques du tampon est la seule présente ici. Elles sont dues à la déprotonation du tampon et corrélées par l'absorption de protons par la protéine et des médiateurs suite au transfert d'électrons.(24)

Il est intéressant à présent de comparer ce spectre avec l'addition arithmétique des deux cytochromes isolés.

4.3.5.1. Comparaison avec l'addition arithmétique

La figure 5.4.18 présente la comparaison entre ces deux spectres. A première vue les deux spectres ne se ressemblent pas ce qui signifie qu'une interaction existe. Cette conclusion est renforcée par les deux potentiels de demi-vague trouvés précédemment.



Figure 5.4.18 : Spectres différentiels infrarouge (ox-red) du complexe c_1 - c_{552} (en rouge) et de l'addition arithmétique (en noir) à pH 8 dans la région spectrale comprise entre 1720 et 1500 cm⁻¹ entre -500 et +500 mV.

Le spectre arithmétique est pris comme référence et est normalisé par rapport à la bande à 1708 cm⁻¹ pour pouvoir mieux comparer les deux spectres.

On note quelques différences principalement dans la zone spectrale comprise entre 1700 et 1500 cm⁻¹ (voir figure 5.4.18). Cette zone spectrale regroupe principalement les bandes Amide I et Amide II et d'autres bandes plus importantes comme les propionates des hèmes.

Les différences et les nouvelles bandes sont consignées dans le tableau 5.4.5. Trois nouvelles bandes apparaissent qui ne sont pas présentes lors de l'addition arithmétique.

Il s'agit des bandes à 1686, 1625 et 1550 cm⁻¹. La première bande représente la vibration v(C=O) des propionates des hèmes. La deuxième bande à 1625 cm⁻¹ contient la contribution de la bande Amide I et de la vibration $\delta(NH_2)$ de l'Asparagine et de la Glutamine. La dernière bande à 1550 cm⁻¹ caractérise la vibration C*a*C*m* de l'anneau porphyrine (v₃₇). De plus un décalage attire notre attention. Il s'agit de la bande qui passe de 1695 à 1693 cm⁻¹. Elle est attribuée à la vibration v(C=O) des propionates des hèmes, ce décalage est dû à l'environnement des propionates des hèmes qui est différent dans le complexe. L'interaction a donc modifié les potentiels de demi-vague des deux hèmes.

Position de la bande dans le complexe (cm ⁻¹)	Etat redox	Position de la bande pour l'addition arithmétique (cm ⁻¹)	Etat redox	Tentative d'attribution
1695	Ox	1693	Ox	v(C=O) propionates des hèmes /
1686	Red			Amide I v(C=O) propionates des hèmes
				/Amide I
1645	Red	1646	Red	Vibration CaCm (v_{37}) /Amide I
1625	Red			$\delta(NH_2)$ Asn+Gln/Amide I
1594	Ox	1592	Ox	Vibration $CaCm(v_{37})$
1577	Ox	1568	Ox	v(COO ⁻) ^{as} Asp+Glu
1550	Red			Vibration $CaCm(v_{37})$ /Amide II

Tableau 5.4.5 : Tentative d'assignements pour le spectre différentiel infrarouge (ox-red) du complexe c_1 - c_{552} comparé avec son addition arithmétique de *T. thermophilus* à pH 8.

Cette comparaison a déjà permis de mieux comprendre cette interaction, l'étude des pas de potentiel permet de mieux comprendre le phénomène. Le spectre différentiel est, à présent, effectué entre -500 et -50 mV puis entre -50 et + 500 mV.

4.3.6. Etude du premier pas : -500/-50 mV

Ces spectres sont bien entendus comparés à ceux des protéines seules. Le but est de trouver quel cytochrome prédomine dans ce cas et ainsi pouvoir identifier chaque potentiel de demivague. Le temps d'équilibre pour obtenir la forme pleinement oxydée est de 13 min et pour la forme pleinement réduite de 12 min après application du potentiel pour les deux plages.



Figure 5.4.19 : Spectre différentiel infrarouge (ox-red) du complexe c_1 - c_{552} à pH 8 dans la région spectrale comprise entre 1800 et 1200 cm⁻¹ de -500 à -50 mV.

Les bandes sont consignées dans le tableau 5.4.6.

Ce spectre se décompose en trois zones spectrales bien distinctes: de 1730 à 1600 cm⁻¹, de 1600 à 1200 cm⁻¹ et de 1200 à 1000 cm⁻¹. Aucune contribution n'est constatée entre 1800 et 1730 cm^{-1} (voir figure 5.4.19).

Position de la	Etat	Tentative d'attribution	Cytochrome c_1	Cytochrome <i>c</i> ₅₅₂
bande (cm ⁻¹)	redox			
1719	Ox	v(C=O) Asp+Glu		
1700	Ox	v(C=0) propionates des hèmes		
1707	Red	v(C=O) propionates des hèmes		Х
1682	Ox	v(C=0) propionates des hèmes		
1665	Red	Amide I		Х
1655	Ox	Amide I		
1645	Red	Vibration CaCm (v_{37}) /Amide I	Х	Х
1635	Ox	Amide I		
1584	Red	$v(COO^{-})^{as}$ propionates des hèmes		
1557	Ox	$v(COO^{-})^{as}$ propionates des hèmes		
		/ Amide II		
1545	Ox	$v(COO^{-})^{as}$ propionates des hèmes		Х
1505		/ Amide II	T 7	•
1535	Red	$v(COO)^{as}$ propionates des hémes	Х	Х
1515	Red	/ V(COO) Asp+Glu/Amide II Tvr-OH		
1504	Ox	Tyr-OH		
1490	Red	Tvr-O		
1434	Ox	v(COO ⁻) ^s Asp+Glu	X(Red)	
1424	Ox	$v(COO^{-})^{s}$ Asp+Glu	× ,	
1377	Ox	Vibration $CaN(v_{41})$		
1366	Ox	v(COO ⁻) ^s propionates des hèmes		Х
1333	Red	$v(COO^{-})^{s}$ propionates des hèmes		Х
1310	Ox	$v(COO^{-})^{s}$ propionates des hèmes	Х	Х
1280	Red	v(CO ⁻) ^s Tyr		
1262	Ox	Vibration $CmH(\delta_{42})$		Х
1240	Red	Vibration $CmH(\delta_{42})$		Х
1215	Ox	δ(CH) His		

Tableau 5.4.6 : Tentative d'assignements pour le spectre différentiel infrarouge (ox-red) du complexe c_1 - c_{552} de*T. thermophilus* entre -500 et -50 mV avec l'attribution individuelle des bandes pour le cytochrome c_1 et c_{552} entre -500 et -500 mV à pH 8.



Figure 5.4.20 : Spectre différentiel infrarouge (ox-red) du complexe c_1 - c_{552} à pH 8 dans la région spectrale comprise entre 1730 et 1600 cm⁻¹ de -500 à -50 mV.

Dans cette première région, les bandes représentant la structure secondaire de la protéine sont caractérisées (voir figure 5.4.20). Toutefois, les pourcentages des différents éléments structuraux ne peuvent pas être déterminés. Une bande positive à 1682 cm⁻¹ et une négative à 1645 cm⁻¹ représentent les boucles et la structure aléatoire issue du squelette peptidique. D'autres contributions sont bien attendues, comme celles des feuillets β à 1635 cm⁻¹. Enfin, à 1665 et 1655 cm⁻¹, la participation des hélices α est attendue.(*14, 15, 26*)

Dans cette région, il y a également la présence de signaux typiques pour la vibration v(C=O) des groupes carboxyliques protonés avec des bandes positives à 1700 et 1682 cm⁻¹ et une bande négative à 1707 cm⁻¹.

Des modes de l'anneau porphyrine sont aussi visibles comme la vibration CaCm (v_{37}). Sa contribution est attendue entre 1655 et 1586 cm⁻¹, ici elle est à 1645 cm⁻¹.(27)

Pour finir, des contributions des modes principaux d'acides aminés sont présentes. Les vibrations v(C=O) des chaînes latérales de l'acide Aspartique et Glutamique protonées sont prévues à 1719 cm⁻¹.



Figure 5.4.21 : Spectre différentiel infrarouge (ox-red) du complexe c_1 - c_{552} à pH 8 dans la région spectrale comprise entre 1600 et 1200 cm⁻¹ de -500 à -50 mV.

Cette deuxième région voit la contribution de la vibration de l'hème et de divers acides aminés (voir figure 5.4.21). La bande Amide II a plusieurs bandes positives et négatives dans une région allant de 1570 à 1520 cm⁻¹.

Comme dans la première région spectrale, l'anneau porphyrine contribue grâce à la vibration v_{41} à 1377 cm⁻¹.(*30*) Enfin, une bande positive à 1262 et une négative à 1240 cm⁻¹ caractérisent la vibration δ_{42} .(*17*)

D'autres signaux complémentaires sont aussi espérés dans cette zone comme la vibration $v(COO^{-})$ asymétrique des propionates des hèmes qui a plusieurs bandes positives à 1557 et 1545 cm⁻¹ et négatives à 1584 et 1535 cm⁻¹. De plus, sa vibration associée $v(COO^{-})$ symétrique est attendue entre 1366 et 1310 cm⁻¹.

La dernière contribution provient des chaînes latérales des différents acides aminés. La région discutée est très complexe et de nombreux signaux de différents acides aminés se superposent. Ces différentes attributions sont basées sur l'étude des acides aminés individuels. Pour commencer, deux bandes positives à 1515 et 1504 cm⁻¹ et une négative à 1490 cm⁻¹ décrivent la vibration de la Tyrosine. Ces signaux observés sont probablement dus à une Tyrosine suite au transfert d'électron et étaient observés pour plusieurs cytochromes de type c.(68) Un autre signal à 1280 cm⁻¹ provient de la Tyrosine avec la vibration v(CO⁻) symétrique.(22)

Ensuite, la contribution des acides Aspartiques et Glutamique est attendue avec leurs vibrations v(COO⁻) asymétrique à 1535 cm⁻¹. Les vibrations associées v(COO⁻) symétrique donnent deux bandes à 1435 et 1424 cm⁻¹.(20, 28) Pour finir, l'Histidine contribue dans ce spectre grâce à sa vibration δ (CH).(33)

Entre 1200 et 1000 cm⁻¹, comme précédemment, la seule contribution est celle du tampon phosphate.

4.3.6.1. Comparaison du spectre avec les deux cytochromes isolés

D'après le tableau 5.4.7, il est clair que le spectre différentiel (de -500 à -50 mV) partage plus de bandes avec le cytochrome c_{552} qu'avec le cytochrome c_1 .



Figure 5.4.22 : Spectres différentiels infrarouge du complexe c_1 - c_{552} (en noir) de -500 à -50 mV, du cytochrome c_1 (en rouge) de -500 à +500 mV et c_{552} (en bleu) de -500 à +500 mV entre 1800 et 1200 cm⁻¹ à pH 8.

Position de la	Etat	Position de la	Etat	Tentative d'attribution
bande dans le	redox	bande dans le	redox	
complexe (cm^{-1})		cytochrome c_{552}		
		(cm^{-1})		
1719	Ox	1716	Ox	v(C=O) Asp+Glu
1700	Ox	1707	Red	v(C=O) propionates des hèmes
1682	Ox	1686	Red	$v(COO^{-})^{as}$ propionates des hèmes
1557	Ox	/	/	v(COO ⁻) ^s Asp+Glu/Amide II
1424	Ox	1420	Ox	v(COO ⁻) ^s Asp+Glu

Tableau 5.4.7 : Tentative d'assignements pour le spectre différentiel infrarouge (ox-red) du complexe c_1 - c_{552} de *T. thermophilus* entre -500 et -50 mV comparé avec l'attribution individuelle pour le cytochrome c_{552} à pH 8 entre -500 et +500 mV. Pour le cytochrome c_1 , les bandes en communes sont principalement des bandes que l'on retrouve dans tous les spectres (voir figure 5.4.22). Les vibrations de l'anneau porphyrine v_{37} , des hèmes, de certains acides aminés et des bandes attribuées à Amide II sont les bandes concernées. Elles sont également présentes dans le cytochrome c_{552} . Néanmoins, pour le cytochrome c_{552} , de nombreuses bandes sont en communs et certaines ont subit d'importants décalages.

Par la suite, plusieurs décalages de 7 à 4 cm⁻¹ sont clairs pour la vibration v(C=O) des propionates des hèmes. Un changement est constaté à 1686 cm⁻¹ et une nouvelle bande apparaît à 1557 cm⁻¹, montrant encore une fois les différences avec le cytochrome c_{552} .

Un changement, dans la région Amide I, traduit également un changement dans la structure de la protéine.

L'apparition et le décalage de ces bandes permettent d'affirmer que ce changement influe sur le potentiel de demi-vague du cytochrome c_{552} . Des autres changements sont à noter comme par exemple au niveau des acides aminés. Le changement le plus important se situe pour les acides Aspartique et Glutamique. Leurs positions dépendent des liaisons Hydrogène. Une bande correspondant à la vibration v(C=O) subit un déplacement de 3 cm⁻¹. La vibration v(COO⁻) symétriques a quant à elle déplacée de 4 cm⁻¹ dans le complexe. Ces changements montrent une modification dans l'environnement de la protéine avec un changement des liaisons Hydrogène qui contrôlent la structure tertiaire de la protéine. Un changement dans la structure secondaire est donc envisagé. Ces acides aminés sont alors plus accessibles et auront une influence différente sur le complexe.

Entre -500 et -50 mV, le fragment d'interaction du cytochrome c_{552} a une contribution plus importante dans cette gamme. Le cytochrome c_1 est présent mais le fragment présent n'a pas d'interaction dans ce cas.

4.3.7. Etude du second pas : -50/+500 mV

Le spectre se découpe en trois zones spectrales bien distinctes : entre 1730 et 1600 cm⁻¹, entre 1600 et 1200 cm⁻¹ et entre 1200 et 1000 cm⁻¹. Aucune contribution n'est constatée entre 1800 et 1730 cm⁻¹ (voir figure 5.4.23).



Figure 5.4.23 : Spectre différentiel infrarouge (ox-red) du complexe c_1 - c_{552} à pH 8 dans la région spectrale comprise entre 1800 et 1200 cm⁻¹ de -50 à +500 mV.

Les bandes sont consignées dans le tableau 5.4.8.

Position de la	Etat	Tentative d'attribution	Cytochrome c_1	Cytochrome <i>c</i> ₅₅₂
bande (cm ⁻¹)	redox			-
1716	Ox	v(C=O) Asp+Glu X		Х
1695	Red	v(C=O) propionates des hèmes X(C		X(Ox)
1.00.0	~	/ Amide I		
1686	Ox	v(C=O) propionates des hèmes		X(Red)
1.671	0	/ Amide I	$\mathbf{V}(\mathbf{D},\mathbf{I})$	
10/1	OX D	$V(CN_3H_5)$ Arg/Amide I	X(Red)	
1657	Red	Amide I	X(Ox)	X(Ox)
1645	Ox D	Amide I/ vibration $CaCm(v_{37})$	X(Red)	
1635	Rea	Amide I S(NUL) A cm + Clm / A mide I		
1620	Dx	$O(NH_2)$ ASII+GIII/AIIIIde I Vibration $C_{a}C_{m}$ (y-		
1585	Ox	$v(COO^{-})^{as}$ propionates des		
1565	Ол	hàmas		
1556	Ox	$v(COO^{-})^{as}$ propionates des		
1000	On	hèmes / Amide II		
1540	Red	$v(COO^{-})^{as}$ propionates des		
		hèmes / v(COO ⁻) ^{as} Asp+Glu /		
		Amide II		
1527	Red	$v(COO^{-})^{as}$ propionates des		
		hèmes / $v(COO^{-})^{as}$		
		Asp+Glu/Amide II		
1512	Ox	Tyr-OH		
1490	Ox	Tvr-O ⁻		
1439	Ox	$v(COO^{-})^{s}$ Asp+Glu		
1410	Ox	$v(COO^{-})^{s}$ Asp+Glu		X(Red)
1397	Red	Vibration $CaN(v_{41})$		
1382	Ox	Vibration CaN (v_{41})		
1371	Red	$v(COO^{-})^{s}$ propionates des		
1571	Rea	hèmes		
1358	Ox	$v(COO^{-})^{s}$ propionates des	X(Red)	
		hèmes	~ /	
1339	Red	$v(COO^{-})^{s}$ propionates des		
		hèmes		
1325	Ox	$v(COO^{-})^{s}$ propionates des		
		hèmes		
1310	Ox	$v(COO^{-})^{s}$ propionates des		
100/	~	hèmes		
1284	Ox	v(CO) [°] Tyr		
1269	Ox	Vibration CmH (δ_{42})		
1229	Red	δ(CH) His		

Tableau 5.4.8 : Tentative d'assignements pour le spectre différentiel infrarouge (ox-red) du complexe c_1 - c_{552} de *T. thermophilus* entre -50 et +500 mV avec l'attribution individuelle des bandes pour le cytochrome c_1 et c_{552} entre -500 et +500 mV entre -500 et +500 mV à pH 8.



Figure 5.4.24 : Spectre différentiel infrarouge (ox-red) du complexe c_1 - c_{552} à pH 8 dans la région spectrale comprise entre 1730 et 1600 cm⁻¹ de -50 à +500 mV.

Entre 1730 et 1600 cm⁻¹, plusieurs contributions sont visibles (voir figure 5.4.24). Comme précédemment, il est impossible de dire quel élément prédomine. A 1695, 1635 et 1620 cm⁻¹ la contribution des feuillets β est attendue. La contribution des boucles est visible à 1686 et à 1671 cm⁻¹. Puis à 1645 cm⁻¹, la structure aléatoire issue du squelette peptidique participe. Pour finir une bande représentant les hélices α est visible à 1657 cm⁻¹.(*14, 15, 66, 67*)

Cependant, des signaux des hèmes sont aussi attendus. Une bande positive à 1686 cm⁻¹ et négative à 1695 cm⁻¹ représentent la vibration v(C=O) d'un des propionates des hèmes.(*17*) A 1645 et 1600 cm⁻¹, outre la contribution de la structure secondaire, les vibrations de type C*a*C*m* de l'anneau porphyrine de l'hème nommé v₃₇ sont visibles.(*19*)

Les vibrations v(C=O) de l'acide Aspartique et Glutamique donnent une bande à 1716 cm⁻¹. A 1671 cm⁻¹, la vibration v(CN₃H₅) asymétrique de l'Arginine est visible. Les chaînes latérales de cet acide aminé peuvent être trouvées à proximité des centres actifs. A 1620 cm⁻¹, une bande correspond à une vibration δ (NH₂) de l'Asparagine et de la Glutamine mais avec un coefficient d'absorption molaire très faible.(*20*)



Figure 5.4.25 : Spectre différentiel infrarouge (ox-red) du complexe c_1 - c_{552} à pH 8 dans la région spectrale comprise entre 1600 et 1200 cm⁻¹ de -50 à +500 mV.

Dans la deuxième région située entre 1600 et 1200 cm⁻¹, d'autres contributions des hèmes sont à espérer (voir figure 5.4.25). La région des vibrations de type Amide II se situe entre 1570 et 1520 cm⁻¹.

Les propionates des hèmes déprotonés sont attendus dans la région Amide II mais ces bandes se chevauchent avec la contribution de chaines latérales des acides aminés. Deux bandes positives à 1585 et 1556 cm⁻¹ et deux négatives à 1540 et 1527 cm⁻¹ décrivent donc les vibrations v(COO⁻) asymétriques des propionates des hèmes.(*18*) Quant aux vibrations v(COO⁻) symétriques, elles sont espérés entre 1371 et 1310 cm⁻¹.

Une seule vibration de l'anneau porphyrine nommée v_{41} se trouve à 1397 et 1382 cm⁻¹.(*17*) A 1269 cm-1, la vibration δ_{42} est attendue.

Les Tyrosines contribuent avec la vibration du cycle (C-C) à 1512 et 1490 cm⁻¹. Il reflète la sensibilité des modes de l'anneau lors de la protonation du groupe phénol. D'autres bandes peuvent être attribuées à des vibrations de la Tyrosine. A 1284 cm⁻¹, la participation de la vibration $v(CO^-)$ symétrique est prévue.(22) Les signaux à 1540 et 1527 cm⁻¹ reflètent les vibrations $v(COO^-)$ asymétrique des acides Aspartique et Glutamique. Les bandes correspondantes aux vibrations $v(COO^-)$ symétrique des acides aminés de type Aspartique et Glutamique se situent à 1439 et 1410 cm⁻¹.(23) Enfin, l'Histidine contribue à 1229 cm⁻¹ avec sa vibration $\delta(CH).(33)$

Entre 1200 et 1000 cm⁻¹, comme précédemment, l'unique contribution est celle du tampon phosphate.

4.3.7.1. Comparaison du spectre avec les deux cytochromes isolés

La figure 5.4.26 présente ces différents spectres. Après la conclusion pour le premier pas, il est possible d'avoir ici une influence plus forte pour le cytochrome c_1 que pour le cytochrome c_{552} . Le spectre ressemble même plus à celui du cytochrome c_{552} avec un décalage de plusieurs bandes. Beaucoup des bandes subiront un changement d'état redox (voir tableau 5.4.9).



Figure 5.4.26 : Spectres différentiels infrarouge du complexe c_1 - c_{552} (en noir) de -50 à +500 mV, du cytochrome c_1 (en rouge) de -500 à +500 mV et c_{552} (en bleu) à pH 8 entre 1800 et 1200 cm⁻¹ de -500 à +500 mV.

Position de la bande dans le complexe (cm ⁻¹)	Etat redox	Position de la bande dans le cytochrome c_{552}/c_1 (cm ⁻¹)	Etat redox	Tentative d'attribution
/	/	1707	Red	v(C=O) propionates des hèmes
1695	Red	1695/1690	Ox	v(C=O) propionates des hèmes
1686	Ox	1686	Red	v(C=O) propionates des hèmes
/	/	1674	Red	v(C=O) propionates des hèmes
1556	Ox		/	v(COO ⁻) ^{as} propionates des hèmes
1540	Red	1535/1535	Red	v(COO ⁻) ^{as} propionates des hèmes
1366	Red	1371/1358	Red	v(COO ⁻) ^s propionates des hèmes

Tableau 5.4.9 : Analyse pour la contribution des propionates pour le spectre différentiel infrarouge (ox-red) du complexe c_1 - c_{552} de *T. thermophilus* entre -50 et +500 mV comparé avec l'attribution individuelle pour le cytochrome c_{552} et c_1 à pH 8 entre -500 et +500 mV.

Comme avant, l'étude des propionates des hèmes est la plus intéressante. Ces changements d'état redox concernent donc surtout le cytochrome c_{552} . Tout d'abord deux bandes, qui sont attribuées aux vibrations v(C=O) des propionates des hèmes, n'apparaissent pas dans ce spectre mais sont présentes pour le cytochrome c_{552} . Il s'agit des bandes à 1707 et 1674 cm⁻¹. Leur disparition donne déjà des indices sur la modification du potentiel. Le changement le plus flagrant se situe au niveau des deux autres bandes à 1695 et 1686 cm⁻¹. Elles changent toutes les deux d'état redox lors de la formation du complexe. Le passage d'un état à l'autre modifie donc le potentiel.

Concernant les vibrations v(COO⁻) asymétriques, elles sont clairement déplacées dans le complexe. Tout d'abord, une nouvelle bande apparaît à 1556 cm⁻¹. Puis, la bande à 1535 cm⁻¹ est décalée de subit 5 cm⁻¹. Enfin, leurs vibrations associées a une bande à 1371 cm⁻¹ qui est déplacée de 6 cm⁻¹.

Des changements dans la conformation sont également attendus avec des modifications dans la région Amide I.

Dans cette gamme de potentiel de -50 à +500 mV, plusieurs contributions sont à noter. La contribution du cytochrome c_1 et c_{552} seule, c'est-à-dire sans interaction l'un avec l'autre. Une autre contribution est celle du fragment du cytochrome c_1 qui interagit.

5. Conclusion

Les différentes études ont montré la complexité du phénomène d'interaction entre deux protéines. Ce phénomène est encore mal connu et met en jeu beaucoup d'interactions qui influencent de façon notable sur le complexe et sur ces caractéristiques spectroscopiques (voir tableau 5.5.1). Grâce à l'apport de spectres différentiels, l'influence de l'interaction des deux cytochromes sur divers bandes a pu être démontrée.

	Potentiel de demi-vague
	(mV)
Cytochrome c_1	-60±6
Cytochrome c_{552}	-29±3
Complexe c - c ₅₅₂	-35±11/ 50±2
Cytochrome c	47±7
Complexe c_1 - c	-82±12 / 70±5
Complexe c_1 - c_{552}	-275±12 / 19±5

Tableau 5.5.1 : Récapitulatif des différents potentiels de demi-vague (vs. Ag/AgCl 3M KCl) pour les cytochromes c_1 et c_{552} et les complexes c- c_{552} c_1 -c et c_1 - c_{552} de T. thermophilus à pH 8.

L'étude du complexe c-c₅₅₂ a permis de voir qu'un complexe ne se forme pas toujours, les deux potentiels des deux hèmes ne sont pas modifiés. Le résultat obtenu n'est pas forcément interprétable.

Pour le complexe c_1 -c, les potentiels sont légèrement modifiés qui est probablement dus aux changements d'environnements des propionates des hèmes est visible ce qui implique un changement de potentiel probable.

Pour le complexe c_1 - c_{552} , les deux potentiels trouvés sont très éloignés des valeurs pour les hèmes individuels.

Pour le premier pas (de -500 à -50 mV), le fragment d'interaction du cytochrome c_{552} a donc une contribution majeure dans le spectre différentiel. Le potentiel trouvé E_{m1} = -275 mV±11.6 pour n=0,9 est vraisemblablement celui du cytochrome c_{552} . En effet les interactions diverses ont modifié l'influence sur l'hème et sur son environnement. Ce complexe apporte inévitablement des contributions qui n'existaient pas dans les deux cytochromes isolés.

Pour le deuxième pas (de -50 à +500 mV), le potentiel trouvé E_m =-4 mV±2.7 pour n=1 est un mélange de plusieurs contributions des deux hèmes. Le cytochrome c_1 et c_{552} sont présents mais ils n'interagissent pas l'un avec l'autre. Le fragment d'interaction du cytochrome c_1 contribue également ici.

Ainsi, les deux potentiels trouvés ne peuvent pas être attribués à un hème en particulier, ils résultent d'un effet coopératif entre les deux hèmes présents. Il est convenu que les propionates des hèmes jouent ici un rôle prépondérant dans le changement des potentiels de demi-vague. L'environnement est clairement modifié avec un changement de liaisons Hydrogène. Cet effet peut être dû au cytochrome c_1 , qui est isolé de son complexe bc_1 . En effet, le contrôle du potentiel peut être régulé par d'autres éléments du complexe qui ne sont pas présents dans le fragment seul.

Cependant, cette étude mérite d'être complétée, entre autres, par une structure cristallographique de ces complexes et qui permet de mettre en avant, plus précisément, les propionates impliqués ici.

6. Références

- 1. Mooser, D., Maneg, O., MacMillan, F., Malatesta, F., Soulimane, T., and Ludwig, B. (2006) The menaquinol-oxidizing cytochrome bc complex from Thermus thermophilus: protein domains and subunits, *Biochim Biophys Acta* 1757, 1084-1095.
- 2. Yakushiji, E., and Okunuki, K. (1940) Über eine neue Cytochromkomponente und ihre Funktion, *Proceedings of the Imperial Academy (Japon)* 16, 4.
- 3. Keilin, D., and Hartree, E. F. (1940) Succinic Dehydrogenase-Cytochrome System of Cells Intracellular Respiratory System Catalysing Aerobic Oxidation of Succinic Acid, *Proceedings of the Royal Society of London. Series B - Biological Sciences 129*, 277-306.
- 4. Muresanu, L., Pristovsek, P., Lohr, F., Maneg, O., Mukrasch, M. D., Ruterjans, H., Ludwig, B., and Lucke, C. (2006) The electron transfer complex between cytochrome c552 and the CuA domain of the Thermus thermophilus ba3 oxidase. A combined NMR and computational approach, *J Biol Chem 281*, 14503-14513.
- Fee, J. A., Chen, Y., Todaro, T. R., Bren, K. L., Patel, K. M., Hill, M. G., Gomez-Moran, E., Loehr, T. M., Ai, J., Thony-Meyer, L., Williams, P. A., Stura, E., Sridhar, V., and McRee, D. E. (2000) Integrity of thermus thermophilus cytochrome c552 synthesized by Escherichia coli cells expressing the host-specific cytochrome c maturation genes, ccmABCDEFGH: biochemical, spectral, and structural characterization of the recombinant protein, *Protein Sci 9*, 2074-2084.
- 6. Richter, O.-M. H., and Ludwig, B. (2009) Electron transfer and energy transduction in the terminal part of the respiratory chain -- Lessons from bacterial model systems, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Bioenergetics 1787*, 626-634.
- 7. Saraste, M. (1999) Oxidative phosphorylation at the fin de siecle, *Science 283*, 1488-1493.
- 8. Rieder, R., and Bosshard, H. R. (1980) Comparison of the binding sites on cytochrome c for cytochrome c oxidase, cytochrome bc1, and cytochrome c1. Differential acetylation of lysyl residues in free and complexed cytochrome c, *J Biol Chem* 255, 4732-4739.
- 9. Smith, H. T., Ahmed, A. J., and Millett, F. (1981) Electrostatic interaction of cytochrome c with cytochrome c1 and cytochrome oxidase, *J Biol Chem 256*, 4984-4990.
- 10. Mooser, D., Maneg, O., Corvey, C., Steiner, T., Malatesta, F., Karas, M., Soulimane, T., and Ludwig, B. (2005) A four-subunit cytochrome bc(1) complex complements the respiratory chain of Thermus thermophilus, *Biochim Biophys Acta 1708*, 262-274.
- 11. Soulimane, T., Buse, G., Bourenkov, G. P., Bartunik, H. D., Huber, R., and Than, M. E. (2000) Structure and mechanism of the aberrant ba₃-cytochrome *c* oxidase from thermus thermophilus, *EMBO J 19*, 1766-1776.
- 12. Shinkarev, V. P., Crofts, A. R., and Wraight, C. A. (2006) Spectral and kinetic resolution of the bc1 complex components in situ: A simple and robust alternative to the traditional difference wavelength approach, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Bioenergetics 1757*, 273-283.
- 13. Ritter, M., Anderka, O., Ludwig, B., Mantele, W., and Hellwig, P. (2003) Electrochemical and FTIR spectroscopic characterization of the cytochrome bc1 complex from Paracoccus denitrificans: evidence for protonation reactions coupled to quinone binding, *Biochemistry 42*, 12391-12399.
- 14. Dong, A. C., Huang, P., and Caughey, W. S. (1992) Redox-dependent changes in betaextended chain and turn structures of cytochrome c in water solution determined by second derivative amide I infrared spectra, *Biochemistry 31*, 182-189.
- 15. Goormaghtigh, E., Cabiaux, V., and Ruysschaert, J. M. (1994) Determination of soluble and membrane protein structure by Fourier transform infrared spectroscopy. III. Secondary structures, *Subcell Biochem 23*, 405-450.
- 16. Iwata, S., Lee, J. W., Okada, K., Lee, J. K., Iwata, M., Rasmussen, B., Link, T. A., Ramaswamy, S., and Jap, B. K. (1998) Complete structure of the 11-subunit bovine mitochondrial cytochrome bc1 complex, *Science 281*, 64-71.

- 17. Berthomieu, C., Boussac, A., Mantele, W., Breton, J., and Nabedryk, E. (1992) Molecular changes following oxidoreduction of cytochrome b559 characterized by Fourier transform infrared difference spectroscopy and electron paramagnetic resonance: photooxidation in photosystem II and electrochemistry of isolated cytochrome b559 and iron protoporphyrin IX-bisimidazole model compounds, *Biochemistry 31*, 11460-11471.
- 18. Behr, J., Hellwig, P., Mantele, W., and Michel, H. (1998) Redox dependent changes at the heme propionates in cytochrome c oxidase from Paracoccus denitrificans: direct evidence from FTIR difference spectroscopy in combination with heme propionate 13C labeling, *Biochemistry 37*, 7400-7406.
- 19. Hellwig, P., Grzybek, S., Behr, J., Ludwig, B., Michel, H., and Mantele, W. (1999) Electrochemical and ultraviolet/visible/infrared spectroscopic analysis of heme a and a3 redox reactions in the cytochrome c oxidase from Paracoccus denitrificans: separation of heme a and a3 contributions and assignment of vibrational modes, *Biochemistry 38*, 1685-1694.
- 20. Wolpert, M., and Hellwig, P. (2006) Infrared spectra and molar absorption coefficients of the 20 alpha amino acids in aqueous solutions in the spectral range from 1800 to 500 cm(-1), *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc 64*, 987-1001.
- 21. Schlereth, D. D., Fernandez, V. M., and Mantele, W. (1993) Protein conformational changes in tetraheme cytochromes detected by FTIR spectroelectrochemistry: Desulfovibrio desulfuricans Norway 4 and Desulfovibrio gigas cytochromes c3, *Biochemistry 32*, 9199-9208.
- 22. Hienerwadel, R., Boussac, A., Breton, J., Diner, B. A., and Berthomieu, C. (1997) Fourier transform infrared difference spectroscopy of photosystem II tyrosine D using site-directed mutagenesis and specific isotope labeling, *Biochemistry 36*, 14712-14723.
- 23. Hellwig, P., Scheide, D., Bungert, S., Mantele, W., and Friedrich, T. (2000) FT-IR spectroscopic characterization of NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) from Escherichia coli: oxidation of FeS cluster N2 is coupled with the protonation of an aspartate or glutamate side chain, *Biochemistry 39*, 10884-10891.
- 24. Hellwig, P., Rost, B., Kaiser, U., Ostermeier, C., Michel, H., and Mantele, W. (1996) Carboxyl group protonation upon reduction of the Paracoccus denitrificans cytochrome c oxidase: direct evidence by FTIR spectroscopy, *FEBS Lett 385*, 53-57.
- 25. Soulimane, T., von Walter, M., Hof, P., Than, M. E., Huber, R., and Buse, G. (1997) Cytochrome-c552 from Thermus thermophilus: a functional and crystallographic investigation, *Biochem Biophys Res Commun 237*, 572-576.
- 26. Lecomte, S., Hilleriteau, C., Forgerit, J. P., Revault, M., Baron, M. H., Hildebrandt, P., and Soulimane, T. (2001) Structural changes of cytochrome c(552) from Thermus thermophilus adsorbed on anionic and hydrophobic surfaces probed by FTIR and 2D-FTIR spectroscopy, *Chembiochem 2*, 180-189.
- 27. Li, X. Y., Czernuszewicz, R. S., Kincaid, J. R., Su, Y. O., and Spiro, T. G. (1990) Consistent porphyrin force field. 1. Normal-mode analysis for nickel porphine and nickel tetraphenylporphine from resonance Raman and infrared spectra and isotope shifts, *The Journal of Physical Chemistry 94*, 31-47.
- 28. Venyaminov, S., and Kalnin, N. N. (1990) Quantitative IR spectrophotometry of peptide compounds in water (H2O) solutions. I. Spectral parameters of amino acid residue absorption bands, *Biopolymers 30*, 1243-1257.
- 29. Nabedryk, E., Berthomieu, C., Vermeglio, A., and Breton, J. (1991) Photooxidation of highpotential (c559, c556) and low-potential (c552) hemes in the cytochrome subunit of Rhodopseudomonas viridis reaction center. Characterization by FTIR spectroscopy, *FEBS Lett* 293, 53-58.
- 30. Heibel, G. E., Hildebrandt, P., Ludwig, B., Steinrucke, P., Soulimane, T., and Buse, G. (1993) Comparative Resonance Raman-Study of Cytochrome-C-Oxidase from Beef-Heart and Paracoccus-Denitrificans, *Biochemistry 32*, 10866-10877.

- 31. Venyaminov, S., and Kalnin, N. N. (1990) Quantitative IR spectrophotometry of peptide compounds in water (H2O) solutions. II. Amide absorption bands of polypeptides and fibrous proteins in alpha-, beta-, and random coil conformations, *Biopolymers 30*, 1259-1271.
- 32. Overman, S. A., and Thomas, G. J., Jr. (1999) Raman markers of nonaromatic side chains in an alpha-helix assembly: Ala, Asp, Glu, Gly, Ile, Leu, Lys, Ser, and Val residues of phage fd subunits, *Biochemistry 38*, 4018-4027.
- 33. Hasegawa, K., Ono, T.-a., and Noguchi, T. (2000) Vibrational Spectra and Ab Initio DFT Calculations of 4-Methylimidazole and Its Different Protonation Forms: Infrared and Raman Markers of the Protonation State of a Histidine Side Chain, *The Journal of Physical Chemistry B* 104, 4253-4265.
- 34. Wei, J. J., Liu, H., Niki, K., Margoliash, E., and Waldeck, D. H. (2004) Probing Electron Tunneling Pathways: Electrochemical Study of Rat Heart Cytochrome c and Its Mutant on Pyridine-Terminated SAMs, *The Journal of Physical Chemistry B 108*, 16912-16917.
- 35. Moss, D., Nabedryk, E., Breton, J., and Mantele, W. (1990) Redox-linked conformational changes in proteins detected by a combination of infrared spectroscopy and protein electrochemistry. Evaluation of the technique with cytochrome c, *Eur J Biochem 187*, 565-572.
- 36. Wienk, H., Maneg, O., Lucke, C., Pristovsek, P., Lohr, F., Ludwig, B., and Ruterjans, H. (2003) Interaction of cytochrome c with cytochrome c oxidase: an NMR study on two soluble fragments derived from Paracoccus denitrificans, *Biochemistry 42*, 6005-6012.
- 37. Axelrod, H. L., Abresch, E. C., Okamura, M. Y., Yeh, A. P., Rees, D. C., and Feher, G. (2002) Xray structure determination of the cytochrome c2: reaction center electron transfer complex from Rhodobacter sphaeroides, *J Mol Biol 319*, 501-515.
- 38. Sarewicz, M., Borek, A., Daldal, F., Froncisz, W., and Osyczka, A. (2008) Demonstration of short-lived complexes of cytochrome c with cytochrome bc1 by EPR spectroscopy: implications for the mechanism of interprotein electron transfer, *J Biol Chem 283*, 24826-24836.
- 39. Koppenol, W. H., and Margoliash, E. (1982) The asymmetric distribution of charges on the surface of horse cytochrome c. Functional implications, *J Biol Chem* 257, 4426-4437.
- 40. Nakai, M., Endo, T., Hase, T., Tanaka, Y., Trumpower, B. L., Ishiwatari, H., Asada, A., Bogaki, M., and Matsubara, H. (1993) Acidic regions of cytochrome c1 are essential for ubiquinolcytochrome c reductase activity in yeast cells lacking the acidic QCR6 protein, *J Biochem 114*, 919-925.
- 41. Speck, S. H., Ferguson-Miller, S., Osheroff, N., and Margoliash, E. (1979) Definition of cytochrome c binding domains by chemical modification: kinetics of reaction with beef mitochondrial reductase and functional organization of the respiratory chain, *Proc Natl Acad Sci U S A 76*, 155-159.
- 42. Hall, J., Zha, X. H., Yu, L., Yu, C. A., and Millett, F. (1987) The binding domain on horse cytochrome c and Rhodobacter sphaeroides cytochrome c2 for the Rhodobacter sphaeroides cytochrome bc1 complex, *Biochemistry 26*, 4501-4504.
- 43. Hall, J., Zha, X. H., Yu, L., Yu, C. A., and Millett, F. (1989) Role of specific lysine residues in the reaction of Rhodobacter sphaeroides cytochrome c2 with the cytochrome bc1 complex, *Biochemistry 28*, 2568-2571.
- 44. Chiang, Y. L., Kaminsky, L. S., and King, T. E. (1976) A complex of cardiac cytochrome c1 and cytochrome c, *Journal of Biological Chemistry 251*, 29-36.
- 45. Lange, C., and Hunte, C. (2002) Crystal structure of the yeast cytochrome bc1 complex with its bound substrate cytochrome c, *Proc Natl Acad Sci U S A 99*, 2800-2805.
- 46. Hunte, C., Solmaz, S., and Lange, C. (2002) Electron transfer between yeast cytochrome bc1 complex and cytochrome c: a structural analysis, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Bioenergetics 1555*, 21-28.

- 47. Ubbink, M., Ejdebäck, M., Karlsson, B. G., and Bendall, D. S. (1998) The structure of the complex of plastocyanin and cytochrome f, determined by paramagnetic NMR and restrained rigid-body molecular dynamics, *Structure (London, England : 1993) 6*, 323-335.
- 48. Volkov, A. N., Worrall, J. A., Holtzmann, E., and Ubbink, M. (2006) Solution structure and dynamics of the complex between cytochrome c and cytochrome c peroxidase determined by paramagnetic NMR, *Proc Natl Acad Sci U S A 103*, 18945-18950.
- 49. Barth, A. (2000) The infrared absorption of amino acid side chains, *Prog Biophys Mol Biol* 74, 141-173.
- 50. Kadenbach, B. (1992) Book Review: Cytochromes C. Evolutionary, Structural and Physicochemical Aspects. (Springer Series in Molecular Biology). By G. R. Moore And G. W. Pettigrew, *Angewandte Chemie International Edition in English 31*, 1098-1098.
- 51. Moore, G. R. (1983) Control of redox properties of cytochrome c by special electrostatic interactions, *FEBS Letters 161*, 171-175.
- 52. Moore, G. R., Williams, R. J., Peterson, J., Thomson, A. J., and Mathews, F. S. (1985) A spectroscopic investigation of the structure and redox properties of Escherichia coli cytochrome b-562, *Biochim Biophys Acta 829*, 83-96.
- 53. Moore, G. R., Harris, D. E., Leitch, F. A., and Pettigrew, G. W. (1984) Characterisation of ionisations that influence the redox potential of mitochondrial cytochrome c and photosynthetic bacterial cytochromes c2, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Bioenergetics* 764, 331-342.
- 54. Das, D. K., and Medhi, O. K. (1998) The role of heme propionate in controlling the redox potential of heme: Square wave voltammetry of protoporphyrinato IX iron(III) in aqueous surfactant micelles, *Journal of Inorganic Biochemistry 70*, 83-90.
- 55. Mao, J., Hauser, K., and Gunner, M. R. (2003) How cytochromes with different folds control heme redox potentials, *Biochemistry 42*, 9829-9840.
- 56. Janzon, J., Yuan, Q., Malatesta, F., Hellwig, P., Ludwig, B., Durham, B., and Millett, F. (2008) Probing the Paracoccus denitrificans cytochrome c(1)-cytochrome c(552) interaction by mutagenesis and fast kinetics, *Biochemistry* 47, 12974-12984.
- 57. Baker, S. C., Ferguson, S. J., Ludwig, B., Page, M. D., Richter, O.-M. H., and van Spanning, R. J. M. (1998) Molecular Genetics of the Genus Paracoccus: Metabolically Versatile Bacteria with Bioenergetic Flexibility, *Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62*, 1046-1078.
- 58. de Gier, J. W., Lubben, M., Reijnders, W. N., Tipker, C. A., Slotboom, D. J., van Spanning, R. J., Stouthamer, A. H., and van der Oost, J. (1994) The terminal oxidases of Paracoccus denitrificans, *Mol Microbiol* 13, 183-196.
- 59. Berry, E. A., and Trumpower, B. L. (1985) Isolation of ubiquinol oxidase from Paracoccus denitrificans and resolution into cytochrome bc1 and cytochrome c-aa3 complexes, *J Biol Chem 260*, 2458-2467.
- 60. Haltia, T., Puustinen, A., and Finel, M. (1988) The Paracoccus denitrificans cytochrome aa3 has a third subunit, *European Journal of Biochemistry* 172, 543-546.
- 61. Otten, M. F., van der Oost, J., Reijnders, W. N. M., Westerhoff, H. V., Ludwig, B., and Van Spanning, R. J. M. (2001) Cytochromes c550, c552, and c1 in the Electron Transport Network of Paracoccus denitrificans: Redundant or Subtly Different in Function?, *J. Bacteriol.* 183, 7017-7026.
- 62. Janzon, J., Eichhorn, A. C., Ludwig, B., and Malatesta, F. (2008) Electron transfer kinetics between soluble modules of Paracoccus denitrificans cytochrome c1 and its physiological redox partners, *Biochim Biophys Acta* 1777, 250-259.
- 63. Pelletier, H., and Kraut, J. (1992) Crystal structure of a complex between electron transfer partners, cytochrome c peroxidase and cytochrome c, *Science 258*, 1748-1755.
- 64. Maneg, O., Ludwig, B., and Malatesta, F. (2003) Different interaction modes of two cytochrome-c oxidase soluble CuA fragments with their substrates, *J Biol Chem 278*, 46734-46740.

- 65. Barth, A. (2007) Infrared spectroscopy of proteins, *Biochimica et Biophysica Acta Bioenergetics* 1767, 1073-1101.
- 66. Goormaghtigh, E., Cabiaux, V., and Ruysschaert, J. M. (1994) Determination of soluble and membrane protein structure by Fourier transform infrared spectroscopy. II. Experimental aspects, side chain structure, and H/D exchange, *Subcell Biochem 23*, 363-403.
- 67. Goormaghtigh, E., Cabiaux, V., and Ruysschaert, J. M. (1994) Determination of soluble and membrane protein structure by Fourier transform infrared spectroscopy. I. Assignments and model compounds, *Subcell Biochem 23*, 329-362.
- 68. Schlereth, D. D., and Maentele, W. (1993) Electrochemically induced conformational changes in cytochrome c monitored by Fourier transform infrared difference spectroscopy: Influence of temperature, pH, and electrode surfaces, *Biochemistry 32*, 1118-1126.

Chapitre VI : Création de réseau de nanoparticules pour l'étude de protéines membranaires

1. Introduction

L'immobilisation de protéines sur la surface d'une électrode est une méthode efficace pour une éventuelle application dans des biopiles futures. Dans les précédents chapitres, des systèmes catalytiques ayant une application potentielle pour une biopile ont été étudiés et caractérisés. Ils seront utilisés ici afin de mieux comprendre le mécanisme des protéines membranaires et mettre en avant leur éventuelle efficacité catalytique dans une biopile. Cette nouvelle méthode permet également de travailler avec des protéines dont le coefficient d'extinction molaire est trop faible en UV/Visible, comme par exemple, la laccase de Bacillus subtilis. Cette glycoprotéine est essentiellement trouvée dans des champignons responsables de l'humification, mais aussi dans les plantes où elle intervient dans la synthèse de la lignine ainsi que dans les bactéries. Elle appartient à la famille des oxydoréductases et contient quatre cofacteurs de cuivre Cu²⁺/Cu⁺ de trois types différents (T1, T2 et T3) qui catalysent la réduction de l'oxygène moléculaire en eau.(1) La bande du site T1 présente un coefficient d'absorption molaire trop faible qui varie de 3500 à 6000 $M^{-1}cm^{-1}$ (2) et de ce fait l'intensité du spectre différentiel (oxydé-réduit) en UV/Visible est trop faible pour la détermination du potentiel. Les deux sites T2 et T3, qui ne sont visibles que dans la forme réduite de la protéine, sont masqués par le médiateur utilisé ici, l'ABTS qui présente une forte absorption dans cette région ($\epsilon = 35\ 000\ \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ à 340 nm) (voir annexe 2).(3) Elle est également caractérisée pour mettre en avant son éventuelle efficacité catalytique.

Selon la nature des acides aminés présents en surface dans la protéine, des modifiants différents sont utilisés. Le cytochrome c_1 , qui est une sous-unité du complexe bc_1 , possède des résidus Lysine à sa surface, contrairement au cytochrome c_{552} ou à la cytochrome c oxydase de type ba_3 qui ne possède pas de résidus chargés.(4-6)

1.1. Préparation de l'électrode

L'électrode d'or polycristalline est nettoyée selon le protocole décrit dans le chapitre III Matériels & Méthodes. Un voltampérogramme est enregistré pour s'assurer que la surface d'or est bien propre. Une fois le bon voltampérogramme obtenu, un dépôt des nanoparticules est fait comme décrit dans le chapitre III Matériels & Méthodes.

Les propriétés des nanoparticules d'or étant différentes en fonction de leur taille et de leur morphologie, celles-ci sont contrôlées par UV/Visible et par TEM.

1.2. Détermination de la taille des nanoparticules fonctionnalisées

Des nanoparticules de différentes tailles ont été synthétisées dans le but d'optimiser la distance entre la nanoparticule et le cofacteur de la protéine. Celles-ci ont été fonctionnalisées avec de l'acide- \pm - α -lipoïque (également appelée acide thioctique) ou du citrate de sodium dans le but d'éviter leur agrégation grâce à la répulsion électrostatique engendrée. La taille des nanoparticules obtenue par les différentes synthèses effectuées a été déterminé par spectroscopie UV/visible (7) et confirmée par TEM dans le cas des nanoparticules fonctionnalisées avec du citrate de sodium (voir figures 6.1.1 et 6.1.2).



Figure 6.1.1 : Spectres UV/Visible des nanoparticules d'or fonctionnalisées avec du citrate de sodium (en noir) et de l'acide thioctique (en rouge). La bande à 521 nm représente la bande plasmonique.

Pour la première synthèse, son spectre UV/Visible montre clairement une bande plasmonique (8) située à 521 nm caractéristique des nanoparticules ayant une taille supérieure à 2 nm (voir figure 6.1.1).

La taille estimée à partir de ce spectre est d'environ 15 nm (voir chapitre III Matériels & Méthodes). Ces nanoparticules sont utilisées pour l'étude des différentes protéines membranaires.



Figure 6.1.2 : Images du TEM des nanoparticules fonctionnalisées avec du citrate de sodium.

L'estimation faite en UV/Visible est confirmée par les mesures en TEM (voir figure 6.1.2). Sur 305 nanoparticules, le diamètre mesuré est de $14,6 \pm 2,3$ nm.

Cependant, pour l'étude de la laccase, des nanoparticules avec de l'acide thioctique sont synthétisées.(9) Ces nanoparticules ne présentent pas de bande plasmonique, leur taille étant inférieure à 2 nm (voir figure 6.1.1).

Il a été constaté que cette taille est optimale pour notre étude et permet d'avoir des résultats reproductibles et avec des coefficients de transfert très grands. Or, une publication de Griva et al.(*10*) a montré, que pour une bactérie photosynthétique, la taille optimale des nanoparticules se situerait entre 5 et 8 nm pour avoir un transfert idéal d'après des calculs théoriques. Cet exemple montre que la taille des nanoparticules est donc à optimiser selon le type de protéines étudiées.

1.3. Dépôt des nanoparticules d'or

La figure 6.1.3 montre un voltampérogramme obtenu après le 20^{ième} cycle de mesure d'une électrode d'or modifiée après dépôt de nanoparticules d'or fonctionnalisées avec du citrate de sodium. Deux pics d'oxydations bien définis sont visibles à 1.2 et 1.4 V. Le pic de réduction à 0.9 V quant à lui ne subit pas de décalage. Ils sont caractéristiques d'une surface modifiée avec des nanoparticules d'or et permettent de confirmer leur présence.(*11*) Une fois ce voltampérogramme obtenu, la surface peut être modifiée.



Figure 6.1.3 : Voltampérogramme de l'électrode d'or après déposition des nanoparticules d'or fonctionnalisées avec du citrate de sodium à une vitesse de balayage de 0.1 V.s⁻¹ (dans H_2SO_4 0.1 M).

Le problème principal de l'étude est la nature très différente des surfaces des protéines étudiées. Plusieurs types de modifiants sont essayés après avoir étudié la nature de la surface de chaque protéine. Un réseau 3D se forme alors uniquement avec les nanoparticules fonctionnalisées avec du citrate de sodium.(*11*)

2. Electrochimie et caractérisation des enzymes immobilisés

2.1. Etude de la laccase de Bacillus subtilis

2.1.1. Introduction

Dans le cas de la laccase de *Bacillus subtilis* du biphényl-4,4'-dithiol a été utilisé pour modifier la surface. Cette méthode, qui utilise une monocouche auto-assemblée, s'inspire de celle employée par Abad et al. pour obtenir un contact électrochimique avec le centre actif de la galactose oxydase.(*12, 13*) Le but est d'établir une liaison électrostatique entre la protéine et la surface modifiée (voir figure 6.2.1).



Figure 6.2.1 : Schéma de la modification de la surface d'or avec la présence de nanoparticules d'or fonctionnalisées avec de l'acide thioctique, du biphényl-4,4'-dithiol et de la laccase de *Bacillus subtilis*.

2.1.2. Caractérisation de la surface modifiée : étude par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier par réflexion totale atténuée exaltée de surface

La procédure d'immobilisation a été suivie par réflexion totale atténuée exaltée de surface sur une surface de Silicium sur laquelle une couche de 20 nm d'or est déposée (voir chapitre III Matériels & Méthodes). Cette technique est très sélective car elle montre des signaux provenant uniquement de molécules adsorbées et permet d'obtenir des spectres à partir seulement d'une monocouche de protéines.(*14, 15*) Ici l'intensité des bandes n'est pas une fonction linéaire de l'épaisseur du film obtenu.



Figure 6.2.2 : Spectres infrarouge obtenus par réflexion totale atténuée exaltée de surface sur une surface d'or de 20 nm après dépôt du modifiant (en noir), des nanoparticules d'or fonctionnalisées avec de l'acide thioctique (en rouge), et de la laccase à pH 8 (en bleu).

En premier, le dépôt du biphényl-4,4'dithiol sur la surface laisse apparaître une bande spécifique à 1473 cm⁻¹. Elle correspond à la vibration d'élongation des liaisons C=C aromatiques. Par la suite, des bandes larges caractérisent le spectre des nanoparticules d'or fonctionnalisées avec de l'acide thioctique sur la surface préalablement modifiée. A 2925 et 2852 cm⁻¹, les vibrations d'élongation C-H des chaînes alkyles de l'acide thioctique sont présentes. Les vibrations C=O des chaînes alkyles contribuent également à 1653 et 1559 cm⁻¹. La présence de la bande Amide I et II respectivement à 1655 et 1548 cm⁻¹, prouvent que la protéine est bien adsorbée à la surface même après lavage (voir figure 6.2.2). Le maximum des bandes Amide I et II est le même que celui obtenu avec un spectre RTA effectué sur un cristal de diamant.

2.1.3. Voltampérogramme de la protéine : détermination du potentiel de demivague et caractérisation de l'immobilisation

Le voltampérogramme de la figure 6.2.3 montre une vague anodique et une vague cathodique séparée de plus de 300 mV. Un tel comportement suggère un transfert d'électron très lent entre l'électrode et le centre actif de la protéine.



Figure 6.2.3 : Voltampérogramme de la laccase immobilisée à pH 8 sur une monocouche auto-assemblée de nanoparticules d'or fonctionnalisées avec de l'acide thioctique à une vitesse de balayage de 0.1 V.s⁻¹. Le spectre en rouge correspond au voltampérogramme avant l'immobilisation de la protéine.

Différentes raisons peuvent expliquer ce comportement : une distance encore trop grande entre l'électrode et le cofacteur redox actif provenant d'une mauvaise orientation de la protéine sur l'électrode. Le potentiel formel calculé est de +190 mV vs. Ag/AgCl 3M KCl qui est proche de celui publié pour le site T1.(*16*) Cependant, il n'est pas possible de conclure clairement quant à la provenance du potentiel trouvé. Malheureusement, le voltampérogramme obtenu ne peut pas être amélioré à l'aide du réseau 3D de nanoparticules fonctionnalisées avec du citrate de sodium. Les conditions optimales n'ont pas été trouvées pour cette protéine.

La monocouche auto-assemblée de nanoparticules n'est pas une méthode efficace pour l'immobilisation de protéines. Le réseau 3D est donc utilisé pour toutes les autres protéines étudiées.

2.2. Etude du cytochrome c_1 de Thermus thermophilus

Dans le cas du cytochrome c_1 , le réseau 3D de Murata est utilisé.(*11*) L'électrode a été modifié avec du DTSP (dithiobis(succinimidyle propionate)), qui en enlevant le groupe succinimidyle, permet, à pH 8, de former une liaison covalente avec un groupement de type amine, comme par exemple les résidus de type Lysine ou Arginine. Le cytochrome c_1 possède des résidus Lysine à sa surface qui, grâce à son groupement NH₂ terminal, permet de faire une liaison covalente. (*17-19*) (voir figure 6.2.4) Le groupement terminal NH₂ forme une surface idéale pour notre immobilisation.(*19*) La liaison formée entre la surface modifiée et la protéine est probablement une liaison amide.



Figure 6.2.4 : Schéma de la modification de la surface d'or avec la présence de nanoparticules d'or fonctionnalisées avec du citrate de sodium, du DTSP et du cytochrome c_1 de *T. thermophilus*.

2.2.1. Caractérisation de la surface modifiée : étude par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier par réflexion totale atténuée exaltée de surface

Après déposition des nanoparticules, des bandes larges sont visibles ici caractéristiques des citrates utilisés dans la synthèse de ces nanoparticules et qui stabilisent les particules (voir figure 6.2.5).



Figure 6.2.5 : Spectres infrarouge obtenus par réflexion totale atténuée exaltée de surface sur une surface d'or de 20 nm après dépôt des nanoparticules d'or fonctionnalisées avec du citrate de sodium (en noir), du modifiant (en rouge) et du cytochrome c_1 à pH 8 (en bleu).

Les bandes à 1599, 1424 et 1403 cm⁻¹ proviennent des vibrations des groupes carboxylates.(20) La bande à 1599 cm⁻¹ correspond à la vibration v(COO⁻) asymétrique du carboxylate du citrate de sodium déprotoné et celles à 1424 et 1403 cm⁻¹ représentent les vibrations v(COO⁻) symétrique associées. Les bandes des nanoparticules sont remplacées par celles des groupements ester succinimidyle provenant du DTSP. Plusieurs bandes caractérisent ce spectre. Tout d'abord, à 2992 et 2911 cm⁻¹, la présence des vibrations d'élongation des groupes C-H de l'anneau succinimidyle et de l'ester sont visibles. Puis, les vibrations d'élongation C=O de l'anneau succinimidyle et de l'ester sont discernables à 1810, 1782 et 1749 cm⁻¹.(*14*) Les bandes à 1437, 1410 et 1367 cm⁻¹ coïncident respectivement avec la déformation angulaire du groupement C-H de l'anneau succinimidyle et avec les vibrations d'élongation COO⁻ des esters. Toutes ces vibrations montrent bien que le DTSP s'est correctement lié à la surface modifiée. Notons la présence de deux bandes négatives à 1599 et 1424 cm⁻¹ qui correspondent à la désorption des citrates. En effet, le spectre des nanoparticules a été pris comme référence avant le dépôt du modifiant.

L'immobilisation du cytochrome c_1 est caractérisée par la présence de la bande Amide I de cette protéine entre 1700 et 1600 cm⁻¹ et de la bande Amide II entre 1600 et 1500 cm⁻¹. Ces signaux sont typiques d'une protéine et proviennent du squelette polypeptidique de celle-ci.(21, 22)

Le maximum de la bande Amide I se situe ici à 1652 cm⁻¹ ce qui signifie que les hélices α prédominent dans cette protéine. Ainsi, le cytochrome c_1 est majoritairement constitué par des hélices α .(*19*) Les bandes négatives présentes à 1749 et 1437 cm⁻¹ prouvent que le groupement succidinimyl a bien été enlevé de la surface, car le spectre du modifiant a été pris comme référence. Ces spectres sont obtenus après nettoyage de la surface et après 1 heure d'attente. Les bandes de la protéine sont toujours présentes ce qui prouve que l'immobilisation a réussi et que la protéine n'est pas dénaturée. Le maximum des bandes Amide I et II est en accord avec le spectre RTA obtenu sur un cristal de diamant.

2.2.2. Voltampérogramme de la protéine : détermination du potentiel de demivague et caractérisation de l'immobilisation

Les différents calculs effectués sur ce cytochrome sont consignés dans le tableau 6.2.1.

Le voltampérogramme présente deux pics symétriques bien définis, ce qui montre que le cytochrome c_1 est bien adsorbé à la surface de l'électrode (voir figure 6.2.6).

La faible séparation entre les pics cathodiques et anodiques indique un transfert d'électrons rapide. Le potentiel trouvé est de $E_{1/2}$ = -48 mV vs. Ag/AgCl 3M KCl. La faible différence entre le potentiel de la protéine immobilisée et celui trouvé en solution suggère que les protéines conservent leur structure après leur immobilisation. La faible différence provient de l'interaction covalente malgré que les nanoparticules ne soient pas si proches du cofacteur.



Figure 6.2.6: Voltampérogramme du cytochrome c_1 à pH 8 (en noir) immobilisé sur les nanoparticules d'or fonctionnalisées avec du DTSP à une vitesse de balayage de 0.1 V.s⁻¹. Le voltampérogramme en rouge correspond à celui obtenu avant l'immobilisation de la protéine.

Protéine	E _{1/2} immobilisée	$E_{1/2}$ en solution	LMH	Taux de	Vitesse de	
	(mV)	(mV) (mV)		couverture	transfert	
				(pmol/cm ²)	(s^{-1})	
Cytochrome	-48	-60	101	2000	23	-
<i>c</i> ¹ pH 8						

Tableau 6.2.1 : Potentiel de demi-vague (vs. Ag/AgCl 3M KCl) de la protéine immobilisée comparé à la valeur en solution (voir chapitre précédent), la largeur à mi-hauteur du pic cathodique, le taux de couverture et la vitesse de transfert d'électrons pour le cytochrome c_1 à pH 8 (voir annexe 3).


Figure 6.2.7 : Influence de la vitesse de balayage sur le courant de pic cathodique (valeur absolue) du cytochrome c_1 à pH 8.

Ce signal peut être attribué au couple $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ de l'hème du cytochrome c_1 . Le taux de couverture et la vitesse de transfert sont suffisants. Pour des espèces redox immobilisées sur la surface et qui ont un signal électrochimique réversible, la valeur de la largeur à mi-hauteur doit être de 90.6 mV pour une monocouche idéale.(23) La valeur trouvée ici est proche ce qui montre la bonne communication électrique entre la protéine et l'électrode.

La dépendance quasi-linéaire entre le courant de pic et la vitesse de balayage est caractéristique d'espèces électroactives confinées à la surface de l'électrode (voir figure 6.2.7).

2.2.3. Images TEM de l'immobilisation de la protéine

La figure 6.2.8 montre les nanoparticules avec les protéines greffées à la surface, qui sont visibles grâce à la couronne organique blanche qui entoure la nanoparticule. Cette couleur est due au marquage par l'acétate d'uranyle. Le background présente également des protéines non attachées qui n'ont pas totalement été enlevées après la dernière centrifugation. Le diamètre extérieur est de $22,4 \pm 4,2$ nm alors que celui des nanoparticules est de $14,6 \pm 2,3$ nm ce qui montre que la protéine est bien greffée sur la nanoparticule.



Figure 6.2.8 : Images du TEM des nanoparticules fonctionnalisées avec du citrate de sodium après immobilisation de la protéine.

2.3. Etude du cytochrome c₅₅₂ de Thermus thermophilus

Dans le cas du cytochrome c_{552} , le réseau 3D de Murata est de nouveau utilisé.(11) L'électrode a été modifiée avec un mélange de deux monocouches auto assemblées (SAMs) le 6-mercaptohexan-1-ol polaire et l'hexanethiol hydrophobe pour un ratio 1:1 (voir figure 6.2.9). Cette modification a montré quel est le support idéal pour l'immobilisation de cette protéine car elle imite l'interaction de surface avec son partenaire redox naturel le Cu_A.(5, 6) La nature de la surface du cytochrome ba_3 autour du Cu_A est principalement non chargée du fait qu'il s'agisse d'une protéine membranaire.(24) Or, l'hème de ce cytochrome est protégé par un réseau de feuillets β qui est à la fois hydrophobique et non chargé.(25, 26)

Le mélange de deux SAMs promet une orientation favorable de la protéine. Les fonctions polaires du SAMs empêchent une modification de la structure de la protéine causée par les interactions hydrophobes avec les groupes terminaux CH₃. Ces interactions hydrophobes favorisent l'adsorption de la protéine mais donnent une orientation défavorable pour le transfert d'électrons.(*25*) il est donc nécessaire d'avoir les deux modifiants. La modification avec le DTSP ne donne pas une interaction favorable, car il y a moins de protéines à la surface, les signaux électrochimiques sont donc moins intenses.



Figure 6.2.9 : Schéma de la modification de la surface d'or avec la présence de nanoparticules d'or fonctionnalisées avec du citrate de sodium, du mélange de deux SAMs et du cytochrome c_{552} de *T. thermophilus*.

2.3.1. Caractérisation des surfaces modifiées : étude par spectroscopie infrarouge par transformée de Fourier par réflexion totale atténuée exaltée de surface

Après déposition des nanoparticules, des bandes larges caractéristiques des citrates sont visibles (voir figure 6.2.10).



Figure 6.2.10 : Spectres infrarouge obtenus par réflexion totale atténuée exaltée de surface sur une surface d'or de 20 nm après dépôt des nanoparticules d'or fonctionnalisées avec du citrate de sodium (en noir), du modifiant (en rouge) et du cytochrome c_{552} à pH 8 (en bleu).

Les bandes à 1599, 1424 et 1403 cm⁻¹ proviennent des vibrations des groupes carboxylates.(20) La bande à 1599 cm⁻¹ correspond à la vibration v(COO⁻) asymétrique du carboxylate du citrate de sodium déprotonée et celles à 1424 et 1403 cm⁻¹ représentent les vibrations associées v(COO⁻) symétrique. Puis, la surface est modifiée avec le mélange de deux thiols. Seulement trois bandes caractérisent le spectre. A 2977, 2920 et 2860 cm⁻¹, la vibration d'élongation C-H est présente. La présence de ces bandes montre que le mélange de ces thiols est sur la surface. Les bandes des citrates sont négatives dans le spectre dues à leur désorption. L'immobilisation du cytochrome c_{552} est prouvée par la présence de la bande Amide I entre 1700 et 1600 cm⁻¹ et de la bande Amide II entre 1600 et 1500 cm⁻¹ (voir figure 3.2.10). Ces signaux sont typiques d'une protéine et proviennent du squelette polypeptidique de celle-ci.(*21, 22*) A 1660 cm⁻¹, le maximum de la bande Amide I est typique des hélices α . Ces hélices prédominent la structure secondaire de la protéine.(*27*) Ces spectres prouvent l'immobilisation du cytochrome c_{552} car ils sont obtenus après nettoyage de la surface et après avoir effectué un spectre RTA sur un cristal de diamant.

2.3.2. Voltampérogramme de la protéine : détermination du potentiel de demivague et caractérisation de l'immobilisation

La protéine immobilisée présente deux pics symétriques bien définis qui montrent que le signal est dû à l'immobilisation de la protéine sur la surface de l'électrode (voir figure 6.2.11).

Un transfert d'électrons rapide se fait ici car la séparation entre les pics cathodiques et anodiques est faible. Le potentiel trouvé est de $E_{1/2}= 2 \text{ mV vs. Ag/AgCl 3M KCl.}$



Potentiel / mV vs. Ag/ACI 3M KCI

Figure 6.2.11 : Voltampérogramme du cytochrome c_{552} à pH 8 (en noir) immobilisé sur les nanoparticules d'or fonctionnalisées avec le mélange de deux thiols à une vitesse de balayage de 0.1 V.s⁻¹. Le voltampérogramme en rouge correspond à celui obtenu avant l'immobilisation de la protéine.

Protéine	E _{1/2} immobilisée	$E_{1/2}$ en solution	LMH	Taux de	Vitesse de
	(mV)	(mV)	(mV)	couverture	transfert
				(pmol/cm ²)	(s^{-1})
Cytochrome	2	-29	135	1000	18
<i>c</i> ₅₅₂ pH 8					

Tableau 6.2.2 : Potentiel de demi-vague (vs. Ag/AgCl 3M KCl) de la protéine immobilisé comparé à la valeur en solution (voir chapitre précédent), la largeur à mi-hauteur du pic cathodique, le taux de couverture et la vitesse de transfert d'électrons pour le cytochrome c_{552} à pH 8 (voir annexe 3).



Figure 6.2.12 : Influence de la vitesse de balayage sur le courant de pic cathodique (valeur absolue) du cytochrome c_{552} à pH 8.

La différence entre le potentiel de la protéine immobilisée et celui trouvé en solution est assez grande (31 mV) ce qui est probablement due à l'interaction qui est principalement hydrophobe dans ce cas (voir tableau 6.2.2). La crevasse de l'hème peut être plus exposée au solvant.

Le signal peut être attribué au couple Fe^{3+}/Fe^{2+} de l'hème du cytochrome c_{552} . Le taux de couverture et la vitesse de transfert sont élevés, ce qui suggère que la surface spécifique est très grande grâce au réseau 3D de nanoparticules. La valeur de la largeur à mi-hauteur, qui doit être de 90.6 mV dans un cas idéal, est ici plus grande. La protéine est donc orientée de manière plus aléatoire sur la surface.(28) Les espèces électroactives sont confinées à la surface de l'électrode d'après la dépendance linéaire entre le courant de pic cathodique et la vitesse de balayage (voir figure 6.2.12).

2.4. Etude de la cytochrome c oxydase de type ba₃ de Thermus thermophilus

Pour l'étude de la cytochrome c oxydase de type ba_3 , un protocole spécifique pour pouvoir enlever le détergent, ajouté pour solubiliser la protéine, est mis en place. En effet, le détergent va entourer la protéine en interagissant avec ses parties hydrophobes, dans sa conformation native. En fait, l'ajout de détergents non dénaturants à une membrane biologique en solution provoque l'insertion de molécules de détergents dans la membrane, et le départ de constituants membranaires, qui s'assemblent en micelles, jusqu'à un équilibre membranaire saturée en détergent-micelles et saturés en protéines. Les protéines sont transférées de la membrane à une micelle, et mises en suspension sans dénaturation. On obtient alors des protéines membranaires cristallisables, pour étudier leur structure par diffraction des rayons X. Cependant, ce détergent empêche l'immobilisation de la protéine sur l'électrode car le détergent agit comme une bouée autour de la protéine.(29, 30) Il est donc nécessaire de la laver avec du tampon sans détergent. Or, après un lavage de la protéine avec son tampon sans détergent, aucune immobilisation n'est constatée.

Après huit lavages successifs avec un tampon sans détergent, la protéine peut s'immobiliser car la concentration en détergent est suffisamment faible même s'il reste toujours des traces dans l'échantillon. En effet, la protéine se dénature sans la présence de ce détergent. Il est donc nécessaire de trouver un compromis entre la quantité de détergent servant à conserver l'intégrité de la protéine et permettant d'obtenir un transfert électronique. Il est impossible de savoir quelle concentration de détergent est encore présente dans l'échantillon. La centrifugation ne permet pas de la contrôler mais elle est au départ de l'ordre de 0.05 %.



Figure 6.2.13 : Schéma de la modification de la surface d'or avec la présence de nanoparticules d'or fonctionnalisées avec du citrate de sodium, du mélange de deux SAMs et du cytochrome ba_3 de *T. thermophilus*. La flèche indique l'hème qui est affecté par cette immobilisation.

L'électrode a été modifiée avec un mélange de deux SAMs le 6-mercaptohexan-1-ol et l'hexanethiol pour un ratio 1:1 (voir figure 6.2.13), la même modification et le même réseau 3D de nanoparticules que pour le cytochrome c_{552} . La nature de la surface du cytochrome ba_3 est principalement non chargée car le domaine de liaison autour du Cu_A ne possède aucun résidu chargé négativement. (24) Le cytochrome c_{552} est le substrat naturel du cytochrome ba_3 ce qui a amené à utiliser le même modifiant. Cette modification est le support idéal car elle imite l'interaction de surface avec son partenaire redox naturel le Cu_A.(5, 6) La modification avec le DTSP donne des signaux électrochimiques peu intenses.

2.4.1. Caractérisation des surfaces modifiées : étude par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier par réflexion totale atténuée exaltée de surface

Des bandes larges caractéristiques des citrates utilisés dans la synthèse de ces nanoparticules sont présentes (voir figure 6.2.14).



Figure 6.2.14 : Spectres infrarouge obtenus par réflexion totale atténuée exaltée de surface sur une surface d'or de 20 nm après dépôt des nanoparticules d'or fonctionnalisées avec du citrate de sodium (en noir), du modifiant (en rouge) et du cytochrome ba_3 (en bleu).

Les bandes à 1599, 1424 et 1403 cm⁻¹ proviennent des vibrations des groupes carboxylates.(20)

La bande à 1599 cm⁻¹ correspond à la vibration v(COO⁻) asymétrique et celles à 1424 et 1403 cm⁻¹ représentent les vibrations associées v(COO⁻) symétrique du carboxylate du citrate de sodium déprotoné. Le mélange de deux thiols, montre seulement trois bandes. A 2977, 2920 et 2860 cm⁻¹, la vibration d'élongation C-H est visible. Ici encore, les bandes des citrates sont de nouveau négatives dans le spectre. Le cytochrome *ba*₃ a été immobilisé sur la surface. Ces spectres sont obtenus après nettoyage de la surface et après 1 heure d'attente. La présence de la bande Amide I à 1655 cm⁻¹, de la bande Amide II à 1551 cm⁻¹ ainsi que la bande caractéristique des Tyrosines protonées à 1513 cm⁻¹ confirment cette immobilisation. Le maximum de la bande Amide I se situe ici à 1655 cm⁻¹ ce qui signifie que les hélices *a* prédominent dans cette protéine. D'après nos estimations, les hélices *a* sont bien majoritaires. Ces prédictions sont effectuées à partir du PDB (1EHK) du cytochrome *ba*₃ de *T.thermophilus*.

2.4.2. Voltampérogramme de la protéine : détermination du potentiel de demivague et caractérisation de l'immobilisation



Figure 6.2.15 : Voltampérogrammes du cytochrome ba_3 à pH 6.4 (en noir), 7.5 (en rouge), 8 (en bleu) et 8.5 (en vert) immobilisés sur les nanoparticules d'or fonctionnalisées avec le mélange de deux thiols à une vitesse de balayage de 0.2 V.s⁻¹. Le voltampérogramme en magenta correspond à celui obtenu avant l'immobilisation de la protéine.

Protéine	$E_{1/2}$ solution	E _{1/2} immobilisée	LMH	Taux de	Vitesse de
	(mV)	(mV)	(mV)	couverture	transfert
	(hème b/a_3)(31)			(pmol/cm ²)	(s^{-1})
Cytochrome	30/115	75	>140	1700	20
<i>ba</i> ₃ pH 6.4					
Cytochrome	10/43	56	>140	1600	25
<i>ba</i> ₃ pH 7.5					
Cytochrome	23/14	41	>140	1600	20
<i>ba</i> ₃ pH 8					
Cytochrome	38/-9	47	>140	1700	31
<i>ba</i> ₃ pH 8.5					

Tableau 6.2.3 : Potentiels de demi-vague (vs. Ag/AgCl 3M KCl) de la protéine immobilisée comparés aux valeurs en solution, la largeur à mi-hauteur du pic cathodique, le taux de couverture et la vitesse de transfert d'électrons pour le cytochrome *ba*₃ à pH 6.4, 7.5, 8 et 8.5 (voir annexe 4).



Figure 6.2.16 : Influence de la vitesse de balayage sur le courant de pic cathodique (valeur absolue) du cytochrome ba_3 à pH 6.4 (en noir), 7.5 (en rouge), 8 (en bleu) et 8.5 (en vert).

2.4.2.1. Variation du potentiel de demi-vague de la cytochrome *c* oxydase de type *ba*₃ en fonction du pH

Pour le cytochrome ba_3 , deux méthodes différentes sont utilisées. Soit l'immobilisation s'est faite de manière individuelle pour chaque pH, soit le cytochrome ba_3 à pH 6.4 a été immobilisé sur la surface et le changement de pH se fait en modifiant le tampon. Le temps d'équilibre de la solution est alors de 30 min



Figure 6.2.17 : Influence du pH sur les potentiels de demi-vague du cytochrome ba_3 . La courbe en noire représente les potentiels après adsorption de la protéine sur la surface. Les courbes en bleu et en rouge représentent respectivement les potentiels de l'hème a_3 et b.

Quelle est l'orientation préférentielle de la protéine sur la surface modifiée ? D'après le tableau 6.2.3, seulement un potentiel est visible. Les deux hèmes b et a_3 mais également le Cu_A sont susceptibles d'être proches de la surface. Or, le Cu_A ne présente pas de dépendance pH, alors que d'après la publication de Sousa et al., il y en aurait une pour les hèmes b et $a_3.(31)$ Grâce à cette dépendance, l'immobilisation d'un des deux hèmes est confirmée. La figure 6.2.17 montre la dépendance pH issue de l'immobilisation de la protéine. Le potentiel chute donc jusqu'à pH 8, puis remonte pour le pH 8,5. Ce comportement se rapproche de celui de l'hème b même si dans la publication, entre le pH 7.5 et 8, il y a une augmentation du potentiel. Cependant, le faible écart entre ces deux potentiels (environ 10 mV) ne peut pas être distingué dans notre cas. De ce fait, l'immobilisation se fait de manière préférentielle vers

l'hème *b* et sa dépendance est retrouvée. Pour confirmer cette hypothèse, l'activité catalytique et l'effet du cyanure sur la protéine sont mesurés.

Pour tous les pH, la séparation entre les pics cathodiques et anodiques est faible, ce qui montre que le transfert d'électrons est rapide (voir figure 6.2.15). La différence entre le potentiel de l'hème *b* de la protéine immobilisée et celui trouvé en solution est assez grande. La dépendance linéaire entre le courant de pic cathodique et la vitesse de balayage est caractéristique d'espèces électroactives confinées à la surface de l'électrode (voir figure 6.2.16). Le taux de couverture et la vitesse de transfert sont élevés, ce qui suggère que la surface spécifique est très grande grâce au réseau 3D de nanoparticules. Comme précédemment, la valeur de la largeur à mi-hauteur est plus grande montrant que la protéine est orientée de manière plus aléatoire sur la surface (voir tableau 6.2.3). (28)

2.4.2.2. Mesure de l'activité catalytique de la cytochrome *c* oxydase de type *ba*₃ de *Thermus thermophilus*

Pour mesurer l'activité catalytique de la protéine immobilisée, de l'oxygène est directement injectée dans la solution pendant 5 min. La réaction avec l'oxygène intervient dans le cycle catalytique.(32) Malheureusement, dans notre cas, la réaction catalytique n'aura pas lieu. Seul un des hèmes est accessible dans notre cas.(33-35) Il a été montré que les électrons sont transférés du Cu_A à l'hème b puis l'hème a_3 . Il faut donc que ces deux hèmes soient accessibles pour que la réaction catalytique puisse se faire. D'après le mécanisme catalytique, l'immobilisation se fait bien au niveau de l'hème b. En effet, quand l'hème b est réduit, l'hème a_3 n'est pas perturbé, il reste de ce fait dans son état oxydé comme c'est le cas pour le Cu_{A} .(36) Par conséquence, comme l'hème b est déjà dans son état réduit, l'oxygène n'a aucun effet. Une étude similaire d'un autre organisme de cytochrome c oxydase a déjà été effectuée par Nowak et al..(37). La protéine est immobilisée avec un mélange de DTSP et d'ANTA (acide iminodiacétique). Cette immobilisation est répétée en utilisant uniquement le DTSP, mais sans résultat. Dans son cas, une activité catalytique peut se manifester vers -700 mV vs. Ag/AgCl 3M KCl avec un pic représentant le transfert d'électrons et de protons.(32) Un balayage entre -1 V et +300 mV est effectué et aucun pic supplémentaire n'est apparu. Cependant, dans les conditions de notre laboratoire, une désorption de la protéine est intervenue pour les bas potentiels car les thiols immobilisés à la surface se sont détachés. Cette désorption des thiols a lieu vers -600 mV vs. Ag/AgCl 3M KCl. Ce constat a été fait sur tous les pH.

2.4.2.3. Effet du cyanure sur le cytochrome c oxydase de type ba_3 de *Thermus thermophilus*

Le cyanure ainsi que le monoxyde de carbone sont des inhibiteurs possibles pour cette protéine. En effet, ils se lient à l'hème a_3 à la sixième position de coordination axiale. Ils préviennent la réaction de l'enzyme avec l'oxygène sur ce site. Le cyanure a une préférence pour la liaison avec l'hème ferrique. Le ligand convertit alors l'hème a_3 à un état bas spin et devient ainsi hexacoordiné. Cette mesure permet de confirmer l'immobilisation au niveau de l'hème *b*. En effet, si la protéine est immobilisée par le Cu_A, il n'y a pas d'effet du cyanure. Différentes concentrations de cyanure dissout sont à chaque fois ajoutées dans le tampon de la protéine immobilisée. Une mesure de pH est effectuée après l'addition de cyanure. Une concentration de 100 mM pour 100 μ L de cyanure dans 20 mL de tampon permet la désorption de la protéine immobilisée (voir figure 6.2.18). Le temps d'attente est de 10 min.



Figure 6.2.18 : Voltampérogrammes du cytochrome *ba*₃ à pH 6.4 (en noir) immobilisés sur les nanoparticules d'or fonctionnalisées avec le mélange de deux thiols à une vitesse de balayage de 0.005 V.s⁻¹ et après ajout de 100mM de KCN (en rouge). Le temps d'attente est de 10 min.

Le résultat est identique pour chaque pH. Ceci est une preuve supplémentaire que l'immobilisation se fait au niveau de l'hème *b*. Les mêmes mesures ont été effectuées sur le cytochrome c_1 et c_{552} sans aucune désorption de la protéine. Or, le cytochrome c_1 et c_{552} ont la particularité d'avoir leur hème qui est hexacoordiné comme tous les hèmes *b* et *c* de classe I (*38, 39*) ce qui implique qu'il n'y a pas de ligand libre. La conséquence est que le cyanure n'a pas d'effet sur ces différents hèmes. Pourquoi l'hème *b* du cytochrome ba_3 réagit-il ? Il faut savoir que les hèmes *b* et a_3 sont couplés dans cette protéine. Leur interaction est de type électrostatique et un changement de potentiel de l'un implique un changement de potentiel pour l'autre. Le cyanure a donc un effet sur l'hème a_3 , qui est pentacoordiné. Ainsi, par interaction, le cyanure a un effet sur l'hème *b*.

A l'aide de la structure cristalline, les différents sites d'interactions possibles peuvent être mis en avant (voir figure 6.2.19).(40) Deux sites d'interactions sont seulement probables. Ils sont situés à gauche de la protéine, avec des distances inférieures à 30 Å. Une distance trop grande ne permet pas un transfert d'électrons efficace. Il n'est pas exclu qu'un autre site d'interaction soit possible grâce à la présence du détergent qui peut en créer un.



Figure 6.2.19 : Structure du cytochrome c oxydase de type ba_3 , les pointillés montrent les limites de l'espace périplasmique. Les trois sous-unités (Cu_A, hèmes b et a_3) sont mises en avant. Les distances sont mesurées entre l'hème b et la surface. Les deux flèches indiquent les deux sites d'interactions probables. (code PDB :3S8F).(40)

2.4.2.4. Superposition des bandes Amide I et II pour la cytochrome *c* oxydase de type *ba*₃ immobilisée à différents pH

Le spectre obtenu par réflexion totale atténuée exaltée de surface est effectué pour chaque pH. Pour chaque pH, les signaux typiques d'une protéine sont retrouvés : la bande Amide I, la bande Amide II et la bande des Tyrosines protonées. A chaque fois l'immobilisation est prouvée et obtenue après lavage de la surface après le dernier dépôt (voir figure 6.2.20).



Figure 6.2.20: Spectres infrarouge obtenus par réflexion totale atténuée exaltée de surface sur une surface d'or de 20 nm après rinçage pour le cytochrome ba_3 à pH 6.4 (en noir), 7.5 (en rouge), 8 (en bleu) et 8.5 (en vert).

3. Comparaison des immobilisations de protéines

De manière générale, il y a une différence assez faible entre le potentiel de la protéine en solution et celui trouvé après immobilisation de la protéine. Cependant, il y a une plus grande différence quand le mélange de deux thiols est utilisé (de 10 à 49 mV). Cet écart est dû aux différences d'interactions entre la protéine et l'électrode (voir tableau 6.3.1). La valeur de la largeur à mi-hauteur n'est pas proche de la valeur idéale qui est de 90.6 mV (23) sauf pour le cytochrome c_1 . La modification avec les deux thiols présente une valeur plus grande ce qui suggère une orientation plus aléatoire des protéines sur la surface de l'électrode.

Cytochrome	$E_{1/2}$ solution	E _{1/2} immobilisée	LMH	Modifiants
	(mV)	(mV)	(mV)	utilisés
	(hème b/a_3)			
<i>c</i> ¹ pH 8	-60	-48	101	DTSP
<i>c</i> ₅₅₂ pH 8	-29	2	135	SAM's
<i>ba</i> ₃ pH 6.4	30/115	75	>140	SAM's
	(hème b/a_3)			
<i>ba</i> ₃ pH 7.5	10/43	56	>140	SAM's
	(hème b/a_3)			
<i>ba</i> ₃ pH 8	23/14	41	>140	SAM's
	(hème b/a_3)			
<i>ba</i> ₃ pH 8.5	38/-9	47	>140	SAM's
	(hème b/a_3)			

Tableau 6.3.1 : Potentiels de demi-vague (vs.Ag/AgCl 3M KCl) de la protéine immobilisée comparés aux valeurs en solution, la largeur à mi-hauteur du pic cathodique, le taux de couverture et la vitesse de transfert d'électrons pour le cytochrome c_1 , c_{552} et ba_3 à pH 6.4, 7.5, 8 et 8.5.

La méthode de Murata et al., qui utilise une réseau 3D de nanoparticules, peut donc être étendue à diverses sortes de protéines.(11)

3.1. Durée de vie de la protéine immobilisée

Il était important de savoir combien de temps la protéine est adsorbée sur la surface en vue d'une application future pour une biopile. Or, un autre critère rentre ici en jeu qui est la dénaturation éventuelle de la protéine.

En effet, les protéines sont très sensibles, entre autres, à la température et à l'environnement. Peu de protéines peuvent survivre à une température ambiante sans connaître une dénaturation rapide même pour les organismes extrêmophiles. Après 5 jours, la protéine est encore immobilisée, mais avec une diminution de l'intensité du signal. L'électrode a été stockée dans son tampon à 4°C.

4. Conclusion

L'électrochimie de protéines adsorbées sur un réseau de nanoparticules d'or est décrite. Cette démarche a été mise en place à la suite de l'impossibilité de déterminer le potentiel de demivague d'une laccase bactérienne avec nos méthodes habituelles. En effet, le coefficient d'extinction molaire de la protéine est trop faible pour que le signal soit exploitable. Ainsi une approche plus classique est développée en utilisant un réseau de nanoparticules attaché à une électrode qui se comporte comme un relais entre le centre actif de la protéine et l'électrode.(*41-44*)

Dans cette partie, l'étude de la laccase montre donc l'impossibilité de déterminer le potentiel de demi-vague dans les conditions de travail choisies. La méthode de dépôt des nanoparticules et l'application de cette méthode à l'étude des protéines précédemment caractérisées sont mises en place. Pour chaque protéine, une caractérisation de la surface obtenue est effectuée, grâce à la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier par réflexion totale atténuée exaltée de surface et ainsi prouver que le signal est bien celui de la protéine adsorbée sur la surface. Dans ce chapitre, l'immobilisation de la laccase de Bacillus subtilis, de deux protéines solubles issues de la chaîne respiratoire de T.thermophilus, le cytochrome c_1 et le cytochrome c_{552} (45) ainsi qu'une protéine membranaire la cytochrome coxydase de type ba₃ à quatre pH différents est étudiée. Cette immobilisation est caractérisée en déterminant le potentiel de demi-vague, la vitesse de transfert d'électrons, la largeur à mihauteur (LMH) ainsi que le taux de couverture. L'activité redox des protéines immobilisées en solution est comparée afin d'exploiter leur efficacité catalytique dans des futurs biopiles. Cependant, l'immobilisation de la laccase a donné des résultats peu probants qui sont moins intéressants que ceux obtenues pour les autres protéines issues de la chaîne respiratoire. L'immobilisation grâce au réseau 3D de nanoparticules a donc une efficacité supérieure à celle avec une monocouche auto-assemblée. Il est, tout d'abord, intéressant de varier la taille des nanoparticules déposées afin de voir leur influence sur les différents paramètres et pouvoir optimiser le dépôt de manière optimale. Puis, une immobilisation différente du cytochrome ba₃ est envisagée. Dans ce cas, l'immobilisation doit se faire à partir du Cu_A et ainsi avoir une activité catalytique.(37) Enfin, si le cytochrome ba_3 présente les caractéristiques suffisantes, une future biopile peut être mise en place à partir du moment où une activité catalytique a lieu. Cependant, la dénaturation rapide de la protéine à température ambiante est toujours un problème pour notre future biopile.

5. Références

- 1. Enguita, F. J., Marcal, D., Martins, L. O., Grenha, R., Henriques, A. O., Lindley, P. F., and Carrondo, M. A. (2004) Substrate and dioxygen binding to the endospore coat laccase from Bacillus subtilis, *J Biol Chem* 279, 23472-23476.
- 2. Zhukhlistova, N., Zhukova, Y., Lyashenko, A., Zaĭtsev, V., and Mikhaĭlov, A. (2008) Threedimensional organization of three-domain copper oxidases: A review, *Crystallography Reports 53*, 92-109.
- 3. Kim, Y., Cho, N.-S., Eom, T.-J., and Shin, W. (2002) *Purification and characterization of a laccase from Cerrena unicolor and its reactivity in lignin degradation*, Vol. 23, Korean Chemical Society, Seoul, COREE, REPUBLIQUE DE.
- 4. Muresanu, L., Pristovsek, P., Lohr, F., Maneg, O., Mukrasch, M. D., Ruterjans, H., Ludwig, B., and Lucke, C. (2006) The electron transfer complex between cytochrome c552 and the CuA domain of the Thermus thermophilus ba3 oxidase. A combined NMR and computational approach, *J Biol Chem 281*, 14503-14513.
- 5. Bernad, S., Soulimane, T., and Lecomte, S. (2004) Redox and conformational equilibria of cytochrome c(552) from Thermus thermophilus adsorbed on a chemically modified silver electrode probed by surface-enhanced resonance Raman spectroscopy, *J Raman Spectrosc* 35, 47-54.
- 6. Bernad, S., Leygue, N., Korri-Youssoufi, H., and Lecomte, S. (2007) Kinetics of the electron transfer reaction of Cytochrome c (552) adsorbed on biomimetic electrode studied by time-resolved surface-enhanced resonance Raman spectroscopy and electrochemistry, *Eur Biophys J 36*, 1039-1048.
- 7. Haiss, W., Thanh, N. T., Aveyard, J., and Fernig, D. G. (2007) Determination of size and concentration of gold nanoparticles from UV-vis spectra, *Anal Chem 79*, 4215-4221.
- 8. Alvarez, M. M., Khoury, J. T., Schaaff, T. G., Shafigullin, M. N., Vezmar, I., and Whetten, R. L. (1997) Optical Absorption Spectra of Nanocrystal Gold Molecules, *The Journal of Physical Chemistry B* 101, 3706-3712.
- 9. Brust, M., Walker, M., Bethell, D., Schiffrin, D. J., and Whyman, R. (1994) Synthesis of thiolderivatised gold nanoparticles in a two-phase Liquid-Liquid system, *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, 801-802.
- 10. Griva, I., Schnur, J. M., and Lebedev, N. (2010) The role of electrode curvature in controlling electron transfer between the photosynthetic reaction center protein and gold nanoelectrodes, *Chemphyschem* 11, 3589-3591.
- 11. Murata, K., Kajiya, K., Nukaga, M., Suga, Y., Watanabe, T., Nakamura, N., and Ohno, H. (2010) A Simple Fabrication Method for Three-Dimensional Gold Nanoparticle Electrodes and Their Application to the Study of the Direct Electrochemistry of Cytochrome c, *Electroanalysis 22*, 185-190.
- 12. Abad, J. M., Gass, M., Bleloch, A., and Schiffrin, D. J. (2009) Direct electron transfer to a metalloenzyme redox center coordinated to a monolayer-protected cluster, *J Am Chem Soc 131*, 10229-10236.
- 13. Abad, J. M., Mertens, S. F. L., Pita, M., Fernández, V. M., and Schiffrin, D. J. (2005) Functionalization of Thioctic Acid-Capped Gold Nanoparticles for Specific Immobilization of Histidine-Tagged Proteins, *Journal of the American Chemical Society* 127, 5689-5694.
- 14. Ataka, K., Giess, F., Knoll, W., Naumann, R., Haber-Pohlmeier, S., Richter, B., and Heberle, J. (2004) Oriented attachment and membrane reconstitution of His-tagged cytochrome c oxidase to a gold electrode: in situ monitoring by surface-enhanced infrared absorption spectroscopy, *J Am Chem Soc 126*, 16199-16206.
- 15. Ataka, K., and Heberle, J. (2007) Biochemical applications of surface-enhanced infrared absorption spectroscopy, *Anal Bioanal Chem 388*, 47-54.

- Shleev, S., Tkac, J., Christenson, A., Ruzgas, T., Yaropolov, A. I., Whittaker, J. W., and Gorton, L. (2005) Direct electron transfer between copper-containing proteins and electrodes, *Biosens Bioelectron 20*, 2517-2554.
- 17. Arya, S. K., Pandey, P., Singh, S. P., Datta, M., and Malhotra, B. D. (2007) Dithiobissuccinimidyl propionate self assembled monolayer based cholesterol biosensor, *Analyst 132*, 1005-1009.
- 18. Chen, X. J., West, A. C., Cropek, D. M., and Banta, S. (2008) Detection of the Superoxide Radical Anion Using Various Alkanethiol Monolayers and Immobilized Cytochrome c, *Analytical Chemistry 80*, 9622-9629.
- 19. Iwata, S., Lee, J. W., Okada, K., Lee, J. K., Iwata, M., Rasmussen, B., Link, T. A., Ramaswamy, S., and Jap, B. K. (1998) Complete structure of the 11-subunit bovine mitochondrial cytochrome bc1 complex, *Science 281*, 64-71.
- 20. Ojea-Jiménez, I., Romero, F. M., Bastús, N. G., and Puntes, V. (2010) Small Gold Nanoparticles Synthesized with Sodium Citrate and Heavy Water: Insights into the Reaction Mechanism, *The Journal of Physical Chemistry C 114*, 1800-1804.
- 21. Barth, A. (2007) Infrared spectroscopy of proteins, *Biochim Biophys Acta* 1767, 1073-1101.
- 22. Oberg, K. A., Ruysschaert, J. M., and Goormaghtigh, E. (2004) The optimization of protein secondary structure determination with infrared and circular dichroism spectra, *Eur J Biochem 271*, 2937-2948.
- 23. Bard, A. J. (1980) *Electrochemical methods : fundamentals and applications / Allen J. Bard, Larry R. Faulkner*, Wiley, New York :.
- 24. Soulimane, T., Buse, G., Bourenkov, G. P., Bartunik, H. D., Huber, R., and Than, M. E. (2000) Structure and mechanism of the aberrant ba₃-cytochrome *c* oxidase from thermus thermophilus, *EMBO J* 19, 1766-1776.
- 25. Bernad, S., Soulimane, T., Mehkalif, Z., and Lecomte, S. (2006) Characterization and redox properties of cytochrome c552 from Thermus thermophilus adsorbed on different self-assembled thiol monolayers, used to model the chemical environment of the redox partner, *Biopolymers 81*, 407-418.
- 26. Than, M. E., Hof, P., Huber, R., Bourenkov, G. P., Bartunik, H. D., Buse, G., and Soulimane, T. (1997) Thermus thermophilus cytochrome-c552: A new highly thermostable cytochrome-c structure obtained by MAD phasing, *J Mol Biol 271*, 629-644.
- 27. Fee, J. A., Chen, Y., Todaro, T. R., Bren, K. L., Patel, K. M., Hill, M. G., Gomez-Moran, E., Loehr, T. M., Ai, J., Thony-Meyer, L., Williams, P. A., Stura, E., Sridhar, V., and McRee, D. E. (2000) Integrity of thermus thermophilus cytochrome c552 synthesized by Escherichia coli cells expressing the host-specific cytochrome c maturation genes, ccmABCDEFGH: biochemical, spectral, and structural characterization of the recombinant protein, *Protein Sci 9*, 2074-2084.
- 28. Clark, R. A., and Bowden, E. F. (1997) Voltammetric Peak Broadening for Cytochrome c/Alkanethiolate Monolayer Structures: Dispersion of Formal Potentials, *Langmuir* 13, 559-565.
- 29. Pebay-Peyroula, E., Garavito, R. M., Rosenbusch, J. P., Zulauf, M., and Timmins, P. A. (1995) Detergent structure in tetragonal crystals of OmpF porin, *Structure 3*, 1051-1059.
- 30. Penel, S., Pebay-Peyroula, E., Rosenbusch, J., Rummel, G., Schirmer, T., and Timmins, P. A. Detergent binding in trigonal crystals of OmpF porin from Escherichia coli, *Biochimie 80*, 543-543.
- Sousa, F. L., Verissimo, A. F., Baptista, A. M., Soulimane, T., Teixeira, M., and Pereira, M. M. (2008) Redox properties of Thermus thermophilus ba3: different electron-proton coupling in oxygen reductases?, *Biophys J 94*, 2434-2441.
- 32. Friedrich, M. G., Robertson, J. W. F., Walz, D., Knoll, W., and Naumann, R. L. C. (2008) Electronic Wiring of a Multi-Redox Site Membrane Protein in a Biomimetic Surface Architecture, *Biophysical journal 94*, 3698-3705.

- 33. Popovic, D. M., and Stuchebrukhov, A. A. (2004) Proton pumping mechanism and catalytic cycle of cytochrome c oxidase: Coulomb pump model with kinetic gating, *FEBS Lett 566*, 126-130.
- 34. Pereira, M. M., Sousa, F. L., Verissimo, A. F., and Teixeira, M. (2008) Looking for the minimum common denominator in haem-copper oxygen reductases: towards a unified catalytic mechanism, *Biochim Biophys Acta* 1777, 929-934.
- 35. Michel, H. (1999) Cytochrome c Oxidase:Catalytic Cycle and Mechanisms of Proton Pumping-A Discussion, *Biochemistry 38*, 15129-15140.
- 36. Farver, O., Chen, Y., Fee, J. A., and Pecht, I. (2006) Electron transfer among the CuA-, heme band a3-centers of Thermus thermophilus cytochrome ba3, *FEBS Lett 580*, 3417-3421.
- 37. Nowak, C., Santonicola, M. G., Schach, D., Zhu, J., Gennis, R. B., Ferguson-Miller, S., Baurecht, D., Walz, D., Knoll, W., and Naumann, R. L. C. (2010) Conformational transitions and molecular hysteresis of cytochrome c oxidase: Varying the redox state by electronic wiring, *Soft Matter 6*, 5523-5532.
- 38. Ambler, R. P. (1991) Sequence variability in bacterial cytochromes c, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Bioenergetics 1058*, 42-47.
- 39. Pettigrew, G. W., and Moore, G. R. (1989) Cytochromes C Biological Aspects (Springer Series in Molecular Biology, Editor: A. RICH). XIV + 282 S., 68 Abb., 31 Tab. Berlin-Heidelberg-New York-London Paris-Tokyo 1987., *Journal of Basic Microbiology 29*, 191-191.
- 40. Tiefenbrunn, T., Liu, W., Chen, Y., Katritch, V., Stout, C. D., Fee, J. A., and Cherezov, V. (2011) High Resolution Structure of the ba3 Cytochrome c Oxidase from Thermus thermophilus in a Lipidic Environment, *PLoS One 6*, e22348.
- 41. Xiao, Y., Patolsky, F., Katz, E., Hainfeld, J. F., and Willner, I. (2003) "Plugging into Enzymes": Nanowiring of Redox Enzymes by a Gold Nanoparticle, *Science 299*, 1877-1881.
- 42. Willner, I., Basnar, B., and Willner, B. (2007) Nanoparticle-enzyme hybrid systems for nanobiotechnology, *Febs J 274*, 302-309.
- 43. Kim, J., Grate, J. W., and Wang, P. (2008) Nanobiocatalysis and its potential applications, *Trends in Biotechnology 26*, 639-646.
- 44. Yáñez-Sedeño, P., and Pingarrón, J. M. (2005) Gold nanoparticle-based electrochemical biosensors, *Analytical and Bioanalytical Chemistry 382*, 884-886.
- 45. Meyer, T., Gross, J., Blanck, C., Schmutz, M., Ludwig, B., Hellwig, P., and Melin, F. (2011) Electrochemistry of Cytochrome c1, Cytochrome c552, and CuA from the Respiratory Chain of Thermus thermophilus Immobilized on Gold Nanoparticles, *The Journal of Physical Chemistry B 115*, 7165-7170.

Chapitre VII : Conclusion

La thèse s'articulait autour de la caractérisation et de la recherche de systèmes catalytiques ayant une application potentielle pour une future biopile. La spectroscopie infrarouge couplée à l'électrochimie a permis de décrire ces différentes protéines. Deux protéines solubles, le cytochrome c_1 et c_{552} et une protéine membranaire le cytochrome c oxydase de type ba_3 , toutes les trois de *Thermus thermophilus* ont été utilisées. Une glycoprotéine la laccase de Bacillus subtilis a également été caractérisée.

Tout d'abord, dans une première partie, la cytochrome c oxydase de type ba_3 et plus particulièrement de sa dépendance pH est étudiée. Le cytochrome ba₃ de Thermus thermophilus est la plus petite cytochrome c oxydase connue. Il est alors intéressant, grâce à l'infrarouge couplé à l'électrochimie, de montrer les conséquences de ce changement d'un point de vue conformationel sur l'ensemble de la protéine et sur chaque hème de façon individuelle. Cette inversion de potentiel engendre donc des changements structuraux qui influent sur la structure de la protéine, de nombreux changements dans la région des bandes Amide I et II confirme cette hypothèse. Cependant, ce changement de conformation est minime mais est suffisant pour influencer le potentiel de demi-vague. Un changement au niveau des propionates a d'abord été constaté. Les changements des bandes des propionates des hèmes à différents pH peuvent être dus à la déprotonation et à la protonation ou causés par un changement d'environnement des propionates des hèmes respectivement protonés ou déprotonés. Puis, de nombreux acides aminés peuvent subir un changement d'état de protonation. Pour l'hème b, des Tyrosines changent probablement d'état de protonation au cours de la dépendance en pH. Plus surprenant aucun changement n'est constaté pour l'hème a_3 , qui est entouré de Tyrosines cruciaux pour le mécanisme de la protéine. Le rôle de l'état de protonation est encore peu clair sur les potentiels de demi-vague des hèmes comme l'influence des interactions entre les hèmes sur les potentiels de demi-vague.

Dans une seconde partie, l'interaction protéine-protéine a été étudiée. Ce phénomène est encore mal connu et met en jeu beaucoup d'interactions qui influencent de façon notable sur le complexe et sur ces caractéristiques spectroscopiques. Grâce à l'apport de spectres différentiels, l'influence de l'interaction des deux cytochromes sur divers bandes a pu être montrée. L'étude du complexe c- c_{552} a permis de voir qu'un complexe ne se forme pas toujours, les deux potentiels des deux hèmes ne sont pas modifiés. Pour le complexe c_1 -c, les potentiels ne peuvent pas être distingués car l'écart entre leurs valeurs est trop faible. Un changement d'environnement des propionates des hèmes est visible ce qui implique un changement de potentiel probable. Pour le complexe c_1 - c_{552} , les deux potentiels trouvés sont très éloignés des valeurs pour les hèmes individuels. Les interactions diverses ont modifié l'influence sur l'hème et sur son environnement. Ce complexe apporte inévitablement des contributions qui n'existaient pas dans les deux cytochromes isolés. Ainsi, les deux potentiels trouvés ne peuvent pas être attribués à un hème en particulier, ils résultent d'un effet coopératif entre les deux hèmes présents.

Dans une troisième partie, l'électrochimie de protéines adsorbées sur un réseau de nanoparticules d'or est décrite. Cette démarche a été mise en place à la suite de l'impossibilité de déterminer le potentiel de demi-vague d'une laccase bactérienne. Ainsi une approche plus classique est développée en utilisant un réseau de nanoparticules attaché à une électrode qui se comporte comme un relais entre le centre actif de la protéine et l'électrode. La méthode de dépôt des nanoparticules et l'application de cette méthode à l'étude des protéines précédemment caractérisées sont mises en place. Pour chaque protéine, une caractérisation de la surface obtenue est effectuée, grâce à la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier par réflexion totale atténuée exaltée de surface et ainsi prouver que le signal est bien celui de la protéine adsorbée sur la surface. Cette immobilisation est caractérisée en déterminant le potentiel de demi-vague, la vitesse de transfert d'électrons, la largeur à mi-hauteur (LMH) ainsi que le taux de couverture. L'activité redox des protéines immobilisées en solution est comparée afin d'exploiter leur efficacité catalytique dans des futurs biopiles. Cependant, l'immobilisation de la laccase a donné des résultats peu probants qui sont moins intéressants que ceux obtenues pour les autres protéines issues de la chaîne respiratoire. L'immobilisation grâce au réseau 3D de nanoparticules a donc une efficacité supérieure à la monocouche autoassemblée.

Les protéines immobilisées présentent des caractéristiques suffisantes pour une application à une future biopile. Cependant, les différents systèmes sont encore à optimiser. Cette étude ouvre la voie à l'immobilisation d'autres protéines membranaires qui peuvent avoir les caractéristiques suffisantes. D'autres paramètres sont à prendre en compte. La température est un élément important, la biopile doit pouvoir résister à des températures extrêmes. La stabilité de la protéine dans le temps et plus particulièrement des protéines membranaires est un autre facteur qui est un élément critique pour une future biopile. Tous ces paramètre sont donc à optimiser.

Annexes



Annexe 1 : Spectre infrarouge du tampon phosphate 50 mM et KCl 100 mM en présence de médiateurs entre -500 et +500 mV dans une région spectrale comprise entre 1800 et 1000 cm⁻¹ à pH 8. Les deux bandes à 1160 et 1088 cm⁻¹ caractérisent les vibrations P=O du tampon.



Annexe 2 : Spectres UV/Visible de la lacasse de Bacillus subtilis dans sa forme oxydée (en rouge) et dans sa forme réduite (en noire) après ajout d'ABTS à pH 8.



Annexe 3 : Courbe de Laviron pour le cytochrome c_1 (en noir) et c_{552} (en rouge) à pH 8.



Annexe 4 : Courbe de Laviron pour le cytochrome ba_3 à pH 6.4 (en noir), 7.5 (en rouge), 8 (en bleu) et 8.5 (en vert).