

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES

UMR 7140 – Chimie de la matière complexe

THÈSE présentée par :

Thomas MEYER

soutenue le : **19 février 2015**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : Chimie

**Caractérisation électrochimique et
spectroscopique de protéines
membranaires immobilisées sur des
nanomatériaux**

THÈSE dirigée par :

Pr. Dr. HELLWIG Petra

Professeur, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Dr. BALLAND Véronique

Maître de conférences, Université Paris Diderot

Dr. LEGER Christophe

Directeur de recherche, Université Aix-Marseille

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Pr. Dr. RUHLMANN Laurent

Professeur, Université de Strasbourg

TABLE DES MATIERES

<i>Résumé</i>	VII
<i>Remerciements</i>	XI
<i>Liste des abréviations</i>	XIII
<i>Les 20 acides aminés</i>	XV
<i>Liste des figures</i>	XVI
<i>Liste des tables</i>	XXIV
<i>Publications</i>	XXVII

Chapitre I : Introduction

1.1.	Motivation de la thèse	2
1.2.	La production d'énergie dans les cellules : la phosphorylation oxydative	3
1.3.	Les différents complexes de la chaîne respiratoire bactérienne	4
	• Complexe I : NADH ubiquinone oxydoréductase	4
	• Complexe II : succinate déshydrogénase ou succinate quinone réductase (SQR)	5
	• Complexe III : complexe bc_1	7
	• Complexe IV : cytochrome c oxydase ou quinol oxydase	8
	• Complexe V : ATP synthase	9
1.4.	La superfamille des oxydases hème-cuivre	10
1.4.1.	<u>Considérations évolutives</u>	10
1.4.2.	<u>Les différentes familles d'oxydases terminales</u>	10
	• Type A	11
	• Type B	12
	• Type C	13
1.4.3.	<u>Cycle catalytique</u>	13
	• Type A	14
	• Type B	15
1.4.4.	<u>Transfert d'électrons et coopérativité</u>	17
1.5.	Le transfert d'électrons dans les protéines	19
1.5.1.	<u>La théorie de Marcus</u>	19
1.5.2.	<u>La théorie de la barrière uniforme</u>	20
1.5.3.	<u>La théorie du chemin tunnel</u>	21
1.5.4.	<u>La théorie du saut d'électron</u>	21
1.6.	L'électrochimie des protéines	22

1.6.1.	<u>La difficulté de l'électrochimie des protéines</u>	22
1.6.2.	<u>Transfert d'électron direct ou transfert d'électron médié ?</u>	24
	• Transfert d'électron direct	24
	• Transfert d'électron médié	25
1.6.3.	<u>Les méthodes d'immobilisation</u>	25
1.6.3.1.	<i>Adsorption physique</i>	26
1.6.3.2.	<i>Attachement orienté à la surface d'un métal</i>	26
1.6.3.3.	<i>Piégeage dans une matrice de polymères conducteurs</i>	26
1.6.3.4.	<i>Adsorption sur une surface métallique modifiée par une monocouche auto-assemblée</i>	27
	• L'adsorption non orientée	27
	• L'adsorption orientée	27
1.6.4.	<u>L'utilisation des nanoparticules d'or</u>	28
1.6.5.	<u>Les apports de la technique</u>	28
1.6.5.1.	<i>Les biocapteurs et les biopiles</i>	28
	• Les biocapteurs	28
	• Les biopiles à combustible	29
1.6.5.2.	<i>Les études mécanistiques</i>	30
1.7.	Buts de la thèse	33
1.8.	Références	35

Chapitre II : Techniques de caractérisation

2.1.	Electrochimie	45
2.1.1.	<u>Voltampérométrie cyclique</u>	45
2.1.2.	<u>Voltampérométrie stationnaire</u>	49
2.2.	Spectroscopies	50
2.2.1	<u>Spectroscopie UV-Visible</u>	51
2.2.1.1	<i>Spectroscopie UV-Visible des protéines hémiques</i>	52
2.2.1.2.	<i>La spectroscopie UV-Visible couplée à l'électrochimie</i>	53
	a. La cellule électrochimique en couche mince	53
	b. Les titrations potentiométriques	55
2.2.2.	<u>Spectroscopie infrarouge</u>	57
2.2.2.1.	<i>Appareillage</i>	58
2.2.2.2.	<i>La spectroscopie infrarouge des protéines</i>	60
	a. Mesures en transmission	62
	• Spectroscopie d'absorption	62
	• Spectroscopie différentielle induite par électrochimie	63
	b. Mesures en réflexion	64
	• Spectroscopie d'absorption	64

• La spectroscopie infrarouge exaltée de surface	65
2.2.3. Spectroscopie de résonance Raman	67
2.2.3.1. <i>L'effet Raman</i>	67
2.2.3.2. <i>L'effet de résonance</i>	68
2.2.3.3. <i>Appareillage</i>	69
2.2.3.4. <i>La spectroscopie de résonance Raman des protéines hémiques</i>	69
2.3 Références	72

Chapitre III : Protocoles expérimentaux

3.1. Préparation des échantillons	76
3.1.1. <u>Cytochrome bo_3 oxydase d'<i>E. coli</i></u>	76
3.1.2. <u>Cytochrome aa_3 oxydase de <i>P. denitrificans</i></u>	76
3.1.3. <u>Cytochrome ba_3 oxydase de <i>T. thermophilus</i></u>	76
3.1.4. <u>Les deux isoformes de la cytochrome cbb_3 oxydase de <i>P. stutzeri</i></u>	77
3.1.5. <u>Cytochromes c_4, c_5 et c_{551} de <i>P. stutzeri</i></u>	78
3.2. Electrochimie	78
3.2.1. <u>Préparation de l'électrode</u>	78
3.2.1.1. <i>Synthèse des nanoparticules d'or</i>	78
3.2.1.2. <i>Fonctionnalisation de l'électrode</i>	79
3.3. Spectroscopies	80
3.3.1. <u>Spectroscopie UV-Visible</u>	80
3.3.3.1. <i>Mesures d'absorption</i>	80
3.3.3.2. <i>Titrations potentiométriques</i>	81
3.3.2. <u>Spectroscopie infrarouge</u>	83
3.3.2.1. <i>Mesures en transmission</i>	83
a. Spectroscopie d'absorption	83
b. Spectroscopie infrarouge différentielle induite par électrochimie	83
3.3.2.2. <i>Mesures en réflexion</i>	84
a. Spectroscopie d'absorption	84
b. Spectroscopie infrarouge en réflexion totale atténuée exaltée de surface	85
3.3.3. <u>Spectroscopie de résonance Raman</u>	85
3.4. Références	86

Chapitre IV : Développement de la méthode : immobilisation de la cytochrome bo_3 oxydase

4.1. Introduction	88
4.2. Etude de la cytochrome bo_3 oxydase immobilisée sur des nanoparticules d'or de 15 nm	89

4.3.	Estimation de l'orientation de la protéine sur la surface modifiée	90
4.3.1.	<u>Etude de l'inhibition de la protéine par du cyanure</u>	90
4.3.2.	<u>Etude la dépendance pH</u>	92
4.3.3.	<u>Etude de la cytochrome <i>bo</i>₃ oxydase sans quinone</u>	93
4.3.4.	<u>Etude par spectroscopie infrarouge en réflexion totale atténuée exaltée de surface (ATR-SEIRAS)</u>	94
4.4.	Etude de l'influence de la taille des nanoparticules	96
4.4.1.	<u>Détermination de la taille des nanoparticules d'or</u>	96
4.4.2.	<u>Augmentation de la surface de l'électrode</u>	98
4.4.3.	<u>Influence de la taille des nanoparticules sur la catalyse</u>	99
4.5.	Conclusion	100
4.6.	Références	101

Chapitre V : Etude de l'inhibition de la cytochrome *aa*₃ oxydase

5.1.	Introduction	105
5.2.	Etude de l'inhibition de la cytochrome <i>aa</i>₃ oxydase par le cyanure	106
5.3.	Etude de l'inhibition de la cytochrome <i>aa</i>₃ oxydase par divers mutants des chemins de protons	108
5.4.	Etude de l'inhibition de la cytochrome <i>aa</i>₃ oxydase par le zinc	110
5.5.	Conclusion	112
5.6.	Références	114

Chapitre VI : Comparaison de deux isoformes de la cytochrome *cbb*₃ oxydase

6.1.	Introduction	118
6.2.	Comparaison des deux isoformes de la cytochrome <i>cbb</i>₃ oxydase	119
6.2.1.	<u>Etude par spectroscopie UV-Visible</u>	119
6.2.2.	<u>Etude par électrochimie directe</u>	124
6.2.2.1.	<i>En absence d'oxygène</i>	124
6.2.2.2.	<i>En présence d'oxygène</i>	129
6.2.2.3.	<i>Stabilité thermique</i>	131
6.2.3.	<u>Etude par spectroscopie de résonance Raman</u>	132
6.2.4.	<u>Etude par spectroscopie infrarouge différentielle</u>	134
6.2.5.	<u>Etude de la stabilité thermique par spectroscopie infrarouge</u>	139
6.3.	Caractérisation et identification des donneurs naturels d'électrons de la cytochrome <i>cbb</i>₃ oxydase	141
6.3.1.	<u>Titration potentiométrique par spectroscopie UV-Visible</u>	141
6.3.2.	<u>Détermination des potentiels d'oxydoréduction par électrochimie directe</u>	144
6.4.	Conclusion	146

6.5.	Références	147
------	-------------------	-----

Chapitre VII : Comparaison d'oxydases terminales de différents types

7.1.	Introduction	152
7.2.	Caractérisation des surfaces modifiées	153
7.2.1.	<u>Caractérisation par spectroscopie infrarouge en réflexion totale atténuée</u>	153
7.2.2.	<u>Mesure par électrochimie directe en absence d'oxygène</u>	155
7.3	Etude comparative de la réaction de réduction de l'oxygène	157
7.4	Etude comparative de la stabilité thermique	160
7.4.1	<u>Comparaison par voltampérométrie stationnaire</u>	160
7.4.2	<u>Comparaison par spectroscopie infrarouge</u>	161
7.5	Etude de la cytochrome <i>ba</i>₃ oxydase par spectroscopie infrarouge différentielle	164
7.6	Conclusion	171
7.7	Références	172

Chapitre VIII: Conclusion	176
----------------------------------	-----

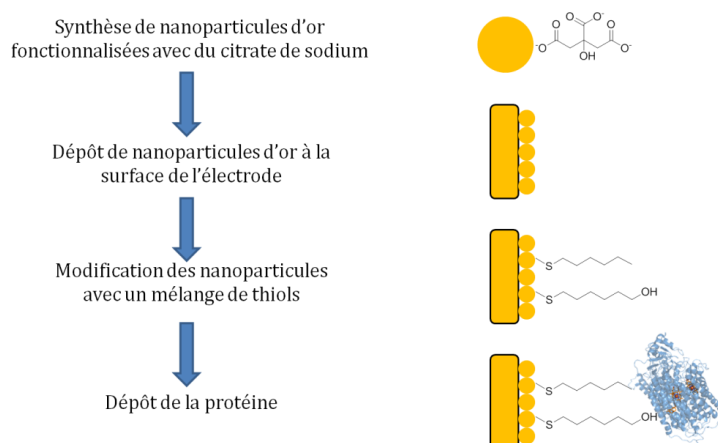
Annexes	179
----------------	-----

Résumé

Les oxydases terminales sont les derniers complexes de la chaîne respiratoire et catalysent la réduction de l'oxygène en eau. La plupart des oxydases terminales sont membres de la famille des oxydases hème-cuivre. Elles sont ainsi nommées car elles ont en commun un centre actif binucléaire composé d'un hème et d'un centre cuivre Cu_B. Les donneurs d'électrons de ces protéines peuvent être soit des cytochromes *c* soit des quinols. Toutes ces protéines sont connues pour coupler la réaction de réduction de l'oxygène au pompage de protons à travers la membrane. Il en résulte un gradient de protons transmembranaire utilisé par l'ATP synthase pour phosphoryler l'ADP en ATP. Les oxydases hème-cuivre se divisent en 3 types A, B et C en fonction, entre autre, de la structure primaire des acides aminés. Ces différences de structures primaires engendrent notamment des différences concernant leur nombre de chemins de protons et leur affinité pour l'oxygène et c'est pourquoi il est intéressant d'étudier leurs différences. Ces protéines présentent également des différences dépendant de l'organisme duquel elles sont issues ; en effet, les oxydases terminales sont présentes dans tous les organismes aérobies, qu'ils soient mésophiles ou extrêmophiles. Les organismes mésophiles sont des organismes vivant dans des conditions modérées, c'est-à-dire à des températures inférieures à 40 °C et dans des conditions de pH proche de neutre alors que les organismes thermophiles sont capables de vivre dans des conditions extrêmes, par exemple, dans des sources acides à haute température (comme c'est le cas pour *Thermus thermophilus*). Ce sujet de thèse est basé sur l'utilisation de nanoparticules d'or dans le but d'immobiliser des protéines membranaires, plus particulièrement des oxydases terminales, à la surface d'une électrode. Les nanoparticules d'or sont connues comme étant particulièrement adaptées pour des études bioélectrochimiques car elles permettent d'obtenir un grand ratio surface/volume et sont particulièrement biocompatibles. L'immobilisation de protéines membranaires sur une électrode pourrait permettre d'utiliser cette classe importante de protéines dans des biopiles ou des biocapteurs. C'est pourquoi nous nous sommes intéressés, dans un premier temps, au développement d'une méthode permettant d'immobiliser des protéines membranaires, en particulier des oxydases terminales, à la surface d'une électrode.

Aussi, l'intérêt de cette méthode réside dans l'utilisation de techniques électrochimiques pour la compréhension de mécanismes catalytiques propres à ces enzymes. Cet aspect est développé dans cette thèse afin d'étudier le comportement électrochimique d'oxydases terminales issues de différents organismes, qui sont capables d'effectuer la réduction de l'oxygène en eau, dans différentes conditions de pH et d'oxygénation.

Par conséquent, cette thèse se divise en cinq parties. La première partie est consacrée au développement de la méthode ayant permis l'immobilisation d'oxydases terminales et l'influence de la taille des nanoparticules sera discutée. Elle permettra ainsi de poser les bases pour la compréhension des autres systèmes étudiés grâce à l'identification des points clefs de la fonctionnalisation comme la taille des nanoparticules, le choix du modifiant, et la méthode de préparation de l'échantillon. Les oxydases terminales sont des enzymes possédant plusieurs centres redox, c'est-à-dire qu'une des difficultés rencontrées est la caractérisation du cofacteur impliqué dans le transfert d'électron entre l'électrode et la protéine. Cette partie aura donc également pour but de trouver des moyens de caractériser cet échange d'électron par l'étude de l'inhibition, de la dépendance pH et de mutants. La caractérisation de surface par spectroscopie infrarouge par réflexion totale atténuée exaltée de surface sera également discutée.



La deuxième partie est dédiée à l'étude de l'inhibition de la cytochrome *aa*₃ oxydase par le zinc. En effet, il a été montré dans plusieurs publications que les ions divalents tel que Zn²⁺ possédait la faculté de se coordiner aux sites d'entrées des chemins de protons de la cytochrome *aa*₃ oxydase. La chélation de ces ions divalents semble donc être un moyen d'inhiber le pompage de protons ainsi que la réaction de réduction de l'oxygène. Par l'intermédiaire de l'étude de la protéine sauvage en présence et en absence de zinc et de plusieurs mutants cruciaux pour le pompage de protons par voltampérométrie cyclique, nous avons pu montrer que le zinc ne semblait pas seulement se chélater aux sites d'entrée des protons, mais qu'il pourrait également bloquer le chemin de sortie des protons.

La troisième partie de la thèse est consacrée à une étude comparative de deux isoformes de la cytochrome *cbb*₃ oxydase de *Pseudomonas stutzeri*. Ce travail a été fait en collaboration avec le laboratoire du Pr. Dr. Hartmut Michel (Department of Molecular Membrane Biology, Max Planck Institute of Biophysics, Frankfurt/Main, Allemagne). Il a en effet été constaté que cet

organisme était en mesure d'exprimer deux isoformes nommés *cbb*₃-1 et *cbb*₃-2. Ces deux isoformes de la même protéine diffèrent d'un point de vue structural par la présence ou non d'une sous-unité CcoQ. Le but de cette étude a donc été de comprendre pourquoi cet organisme a la nécessité d'exprimer deux isoformes différents et quel était le rôle de la sous-unité supplémentaire dans le cas de la *cbb*₃-2. Par spectroscopie UV-Visible différentielle couplée à l'électrochimie, nous avons pu déterminer les potentiels à l'équilibre des différents cofacteurs redox présents dans cette protéine. Des méthodes électrochimiques ont permis de déterminer les potentiels de réduction de l'oxygène. Par ces deux méthodes, nous n'avons pas observé de différences significatives. Dans une deuxième approche, il était possible d'observer les changements, au niveau moléculaire, entre la forme oxydée et la forme réduite grâce à la spectroscopie infrarouge différentielle couplée à l'électrochimie. Dans ce cas, des différences ont été observées dans la région spectrale caractéristique des acides aspartiques et des acides glutamiques ; des études approfondies sur des mutants seront nécessaires afin de déterminer ces acides aminés. Nous nous sommes également intéressés aux donneurs d'électrons potentiels de la cytochrome *cbb*₃ oxydase. Des études ont été menées au sein du laboratoire du Pr. Dr. Hartmut Michel et trois donneurs potentiels ont été identifiés : les cytochromes *c*₄, *c*₅ et *c*₅₅₁. Ils ont constaté que le cytochrome *c*₅ réduisait moins efficacement la cytochrome *cbb*₃ oxydase que les cytochromes *c*₄ et *c*₅₅₁. Afin de pouvoir expliquer cette observation, nous avons effectué des dosages potentiométriques par spectroscopie UV-Visible ainsi que des mesures par électrochimie directe. Nous avons constaté que le cytochrome *c*₅ possédait des potentiels d'oxydoréduction supérieurs aux cytochromes *c*₄ et *c*₅₅₁ et nous avons déduit que le cytochrome *c*₅, du fait de son potentiel élevé, n'était pas en mesure de transférer les électrons à la cytochrome *cbb*₃ oxydase de manière aussi efficace que les cytochromes *c*₄ et *c*₅₅₁.

Le quatrième chapitre de la thèse consiste en une étude comparative entre des oxydases terminales des différentes familles (A, B et C) et de différentes origines par électrochimie et spectroscopie infrarouge. Il a en effet été constaté que les hèmes au sein de la cytochrome *ba*₃ oxydase de *Thermus thermophilus* possédait une dépendance pH particulière par rapport à la plupart des oxydases. De plus, l'organisme *Thermus thermophilus* est un organisme extrêmophile, c'est-à-dire qu'il a la capacité de vivre dans des sources acides à haute température. Sur la base de ces différences, nous avons choisi de comparer cette oxydase (de type B) avec une oxydase de type A et une oxydase de type C. Le premier but de cette étude était de constater si la dépendance pH particulière de la cytochrome *ba*₃ oxydase affectait la réduction de l'oxygène. La voltampérométrie stationnaire nous a permis d'établir un lien entre

la dépendance pH particulière et la réduction de l'oxygène. En effet, nous avons pu constater que la cytochrome *ba₃* oxydase était plus active à pH acide et qu'elle était capable de réduire l'oxygène avec une surtension plus faible que les autres oxydases de l'étude. Le deuxième but de cette étude était de vérifier si ces enzymes étaient également adaptées au milieu dans lequel ces organismes évoluent. Pour cela, nous avons étudié ces enzymes à différentes températures par voltampérométrie stationnaire et par spectroscopie infrarouge. Chacune de ces études a permis de montrer, que la cytochrome *ba₃* oxydase (issue d'un organisme thermophile), était plus stable que les autres oxydases aux températures élevées. A partir de cette étude, nous avons conclu que les oxydases terminales étaient en mesure de s'adapter à différents milieux. La dernière partie est dédiée à l'étude de la cytochrome *ba₃* oxydase par spectroscopie infrarouge différentielle couplée à l'électrochimie. Comme mentionné précédemment, cette protéine possède une dépendance pH particulière ; nous nous sommes donc intéressés aux changements au sein de la protéine au niveau moléculaire observés en fonction du pH. La spectroscopie infrarouge différentielle nous permet de discuter les changements conformationnels, la redistribution des charges à proximité des cofacteurs et les contributions des acides aminés impliqués dans la réaction d'oxydoréduction. De plus, grâce à la possibilité de séparer les contributions des différents hèmes, il est possible de discuter individuellement des influences du pH sur chacun des cofacteurs et des acides aminés.

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier chaleureusement le Pr. Dr. Petra Hellwig pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire pendant cinq années. Je garderai de mon passage le souvenir d'une personne agréable et toujours prête à me conseiller dans les moments difficiles. Merci pour ta gentillesse et ta patience!

Je veux également remercier les membres du jury, le Dr. Véronique Balland, le Dr. Christophe Léger et le Pr. Dr. Laurent Ruhlmann, pour avoir accepté de juger mon travail.

Je souhaite aussi remercier infiniment le Dr. Frédéric Melin alias Fred. Merci pour tes conseils tout au long de ces cinq ans. Nous avons passé énormément de temps à discuter de mes projets et ton soutien m'a été précieux. Au-delà du domaine scientifique, j'ai rencontré un ami avec qui j'aurai passé des moments mémorables!

Je voudrais également exprimer ma gratitude envers les Dr. Sébastien Kriegel et Dr. Yashvin Neehaul pour les bons moments passés au cours de mes stages et de ma thèse. Je n'oublierai pas les moments de franches rigolades et les soirées UNO et Tarot que nous avons passé après les journées au laboratoire.

Un merci particulier pour ma voisine et bouc-émissaire de bureau Alicia ! Tu as passé un an à me supporter et à m'aider à trouver les réponses aux « Blind tests » de Fred. Je repenserai avec nostalgie à tous les bons moments passés au bureau.

Aussi, je voudrais remercier tous mes collègues au laboratoire avec qui j'ai partagé le quotidien: Batoul, Julien, Léa, Michelle, Mireille, Sinan, Youssef et Zahia. Merci d'avoir été là et d'avoir rendu encore plus agréable la vie au laboratoire ! J'ai également une pensée pour tous les stagiaires qui ont effectués un passage par le laboratoire.

Merci aux secrétaires du laboratoire, Sandra et Soumia, pour s'être occupées des différentes tâches administratives.

Je tiens encore à remercier les différents collaborateurs qui ont joué un rôle important dans ma thèse. Merci aux groupes du Pr. Dr. Hartmut Michel, du Pr. Dr. Robert Gennis, du Pr. Dr. Tewfik Soulimane et du Pr. Dr. Bernd Ludwig pour leur réactivité et leur souci d'envoyer des échantillons de la meilleure qualité possible.

Merci à l'Université de Strasbourg et aux différents soutiens financiers.

Enfin, parce qu'il n'y a rien de plus important que la famille, je voudrais dédier cette thèse aux gens qui ont toujours été là pour moi quelque soit les circonstances et je veux qu'ils soient assurés que je serais toujours là pour eux : merci à mes parents, Patricia et Michel, et à ma compagne Laetitia. Sans votre présence et votre soutien, je n'aurais sans doute pas été capable d'aller aussi loin.

J'aimerais également remercier chaleureusement Liliane et François pour leur soutien au quotidien

Je voudrais finir par remercier tous les membres de ma famille avec qui je passe toujours d'agréables moments.

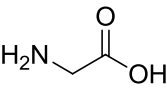
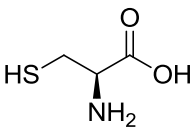
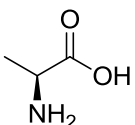
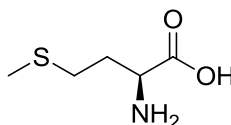
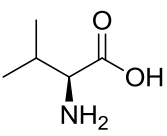
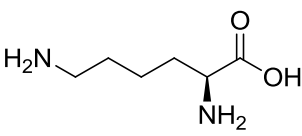
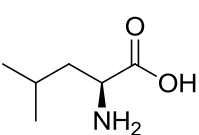
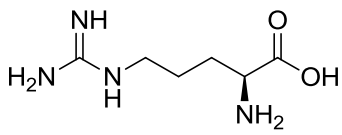
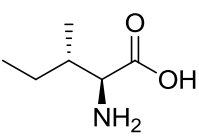
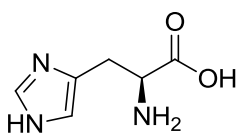
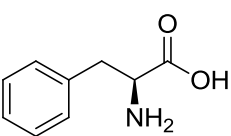
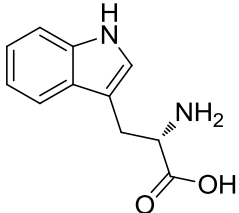
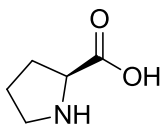
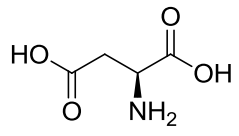
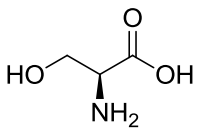
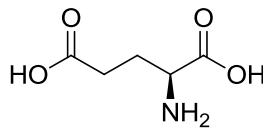
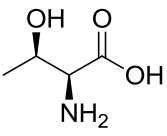
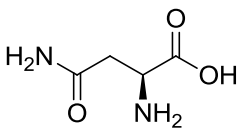
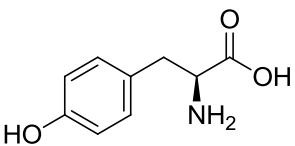
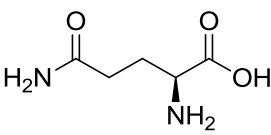
MEYER Thomas

Liste des abréviations

<i>A. ambivalens</i>	<i>Acidianus ambivalens</i>
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADP	Adénosine diphosphate
ANTA	Acide nitriloacétique
Ar	Argon
ATP	Adénosine triphosphate
<i>B. japonicum</i>	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>
CCD	Charge-coupled device
<i>CcO</i>	Cytochrome <i>c</i> oxydase
CE	Electrode auxiliaire
CI 50	Concentration inhibitrice 50
CN⁻	Cyanure
Cyt <i>c</i>	Cytochrome <i>c</i>
DDM	Dodécyl maltoside
E_{1/2}	Potentiel de demi-vague
E_{cat}	Potentiel catalytique
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ER	Electrode de référence
ESH	Electrode standard à hydrogène
ET	Electrode de travail
FAD	Flavine adénine dinucléotide oxydé
FADH₂	Flavine adénine dinucléotide réduit
FeS	Cluster fer-soufre
FMN	Flavine mononucléotide
FWMH	Largeur de pic à mi-hauteur
<i>H. pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
His-Tag	Histidine-Tag
k_B	Constante de Boltzmann
kDa	Kilo Dalton
K_I	Constante d'inhibition
K_M	Constante de Michaelis
KPi	Phosphate de potassium

NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide réduit
NO	Monoxyde d'azote
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>P. denitrificans</i>	<i>Paracoccus denitrificans</i>
<i>P. stutzeri</i>	<i>Pseudomonas stutzeri</i>
Q	Quinone
Q⁻	Semiquinone
QH₂	Quinol
<i>R. capsulatus</i>	<i>Rhodobacter capsulatus</i>
<i>R. marinus</i>	<i>Rhodothermus marinus</i>
<i>R. sphaeroides</i>	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>
SAH	Site d'ancrage de protons
SQR	Succinate quinone réductase
<i>T. thermophilus</i>	<i>Thermus thermophilus</i>
TEM	Microscopie électronique à transmission
TMPD	N,N,N',N'-tetraméthyl-p-phenylènediamine
Tris	Tris(hydroxyméthyl) aminoéthane
Γ	Taux de couverture
δ	Vibration de déformation
v	Vibration d'élongation
v^{as}	Vibration d'élongation antisymétrique
v^s	Vibration d'élongation symétrique
ΔE_P	Séparation des potentiels de pic

Les 20 acides aminés

<i>Acide aminé</i>	<i>Structure</i>	<i>Abréviation</i>	<i>Acide aminé</i>	<i>Structure</i>	<i>Abréviation</i>
Glycine		Gly G	Cystéine		Cys C
Alanine		Ala A	Méthionine		Met M
Valine		Val V	Lysine		Lys K
Leucine		Leu M	Arginine		Arg R
Isoleucine		Ile I	Histidine		His H
Phénylalanine		Phe F	Tryptophane		Trp W
Proline		Pro P	Acide aspartique		Asp D
Sérine		Ser S	Acide glutamique		Glu E
Thréonine		Thr T	Asparagine		Asn N
Tyrosine		Tyr Y	Glutamine		Gln Q

Liste des figures

Figure 1.1	Diversité des environnements conduisant à la diversité des oxydases terminales.	2
Figure 1.2	Exemple de modèle de la chaîne respiratoire aérobie contenant les quatre complexes transmembranaires et l'ATP synthase. Les différentes structures correspondent aux PDB 4HEA, 1NEK, 1ZRT, 3HB3 et 2XOK.	3
Figure 1.3	Diversité de modulation pour la chaîne respiratoire de <i>P. denitrificans</i> .	4
Figure 1.4	Structure du complexe I de la chaîne respiratoire de <i>T. thermophilus</i> et représentation du transfert d'électrons et de protons. Les cofacteurs redox sont tous situés dans la partie soluble alors que les chemins de protons sont localisés dans la partie membranaire.	5
Figure 1.5	La chaîne de transfert d'électrons de la succinate déshydrogénase d' <i>E. coli</i> . Les électrons issus de l'oxydation du succinate permettent de réduire l'ubiquinone sans translocation de protons à travers la membrane (PDB : 1NEK).	6
Figure 1.6	Organisation des cofacteurs au sein du cytochrome <i>bc</i> ₁ de <i>R. capsulatus</i> et représentation schématique du cycle Q.	8
Figure 1.7	Structure de la cytochrome <i>aa</i> ₃ de <i>P. denitrificans</i> (PDB : 3HB3). Les électrons issus de l'oxydation du cytochrome <i>c</i> sont utilisés pour la réduction de l'oxygène. Cette réaction est couplée au pompage de protons à travers la membrane.	9
Figure 1.8	La structure des différents types d'oxydases. La répartition des cofacteurs redox est présentée dans la partie supérieure et les résidus impliqués dans les chemins de protons sont illustrés sur la partie inférieure de la figure. Les PDB 3HB3 pour l' <i>aa</i> ₃ de <i>P. denitrificans</i> , 1EHK pour la <i>ba</i> ₃ de <i>T. thermophilus</i> et 3MK7 pour la <i>cbb</i> ₃ de <i>P. stutzeri</i> ont été utilisés.	11
Figure 1.9	Un des cycles catalytiques possibles de la cytochrome <i>aa</i> ₃ oxydase à l'état réduit. Le site actif implique une tyrosine. Les cercles bleus pleins correspondent aux cofacteurs à l'état réduit, les cercles vides à ceux à l'état oxydé, les cercles ombragés à un état d'équilibre. L'étoile correspond à un site d'ancrage de protons. Les flèches rouges correspondent aux transitions impliquant un pompage de protons (la flèche épaisse correspond au pompage de deux protons). Les indications sur les flèches	15

correspondent aux changements observés au niveau du site actif. L'exposant correspond au nombre d'électrons transférés au site actif à partir de l'état O.

- Figure 1.10** Cycle catalytique de la cytochrome *ba₃* oxydase à l'état réduit. Le site actif prend en compte la présence de la tyrosine. Les cercles bleus pleins correspondent aux cofacteurs à l'état réduit, les cercles vides à ceux à l'état oxydé. Les flèches rouges correspondent aux transitions impliquant un pompage de protons. L'étoile rouge correspond au site d'ancrage des protons dans la forme protonée. Les indications sur les flèches correspondent aux changements observés au niveau du site actif. 16
- Figure 1.11** Représentation schématique du modèle de coopérativité proposé par Nicholls et Petersen en 1974. 17
- Figure 1.12** Représentation schématique du modèle de coopérativité proposé par Verkhovsky en 1995. 18
- Figure 1.13** La difficulté de l'électrochimie des protéines provient de leur taille. Le squelette peptidique isolant représente la plus grande proportion de la structure. La protéine illustrée pour l'exemple est la cytochrome *aa₃* oxydase (PDB : 1QLE). 23
- Figure 1.14** Le transfert d'électron direct a lieu entre l'électrode et la protéine. Le transfert d'électron médié passe par un relais d'électron. 24
- Figure 1.15** Différentes méthodes d'immobilisation de protéines sur une surface. (A) Adsorption physique (B) Attachement orienté à la surface (C) Piégeage dans une matrice de polymères conducteurs (D,E) Adsorption non orientée sur une monocouche auto-assemblée (F) Adsorption orientée sur une monocouche auto-assemblée. Inspirée de la référence. 25
- Figure 1.16** Principe du biocapteur. 29
- Figure 1.17** Principe d'une biopile à combustible basée sur l'oxydation du glucose à l'anode et la réduction de l'oxygène à la cathode. Les flèches rouges représentent le trajet des électrons et les cercles rouges et verts représentent les protéines effectuant respectivement l'oxydation du glucose et la réduction de l'oxygène. 30
- Figure 1.18** Représentation schématique des événements observés dans un système non catalytique et dans un système catalytique (exemple 31

d'une oxydase).

Figure 2.1	Montage d'une cellule électrochimique à 3 électrodes connectée sur un potentiostat. CE correspond à la contre-électrode, ET à l'électrode de travail et ER à l'électrode de référence.	45
Figure 2.2	Schéma récapitulatif des mesures des différentes constantes cinétiques par électrochimie.	50
Figure 2.3	Spectre électromagnétique représentant les différents domaines en fonction de leur fréquence et de leur longueur d'onde.	51
Figure 2.4	Représentation des hèmes <i>a</i> , <i>b</i> et <i>c</i> .	53
Figure 2.5	Schéma de la cellule électrochimique en couche mince.	54
Figure 2.6	Représentation schématique de la grille d'or modifiée avec le mélange de cystéamine et d'acide mercaptopropionique.	55
Figure 2.7	A gauche, un exemple de titration potentiométrique par spectroscopie UV-Visible. A droite, un exemple de graphique représentant ΔAbs en fonction du potentiel appliqué à 418 nm (bande de Soret).	57
Figure 2.8	Modes normaux de vibrations.	58
Figure 2.9	Schéma du principe d'un spectromètre infrarouge à transformée de Fourier.	59
Figure 2.10	Représentation de la cytochrome <i>aa</i> ₃ oxydase (PDB : 3HB3) et des différentes contributions observables en spectroscopie infrarouge.	61
Figure 2.11	Spectre d'absorption infrarouge caractéristique d'une protéine en moyen infrarouge et contributions des vibrations des molécules d'eau.	61
Figure 2.12	A gauche, les spectres d'absorption des formes oxydées et réduites d'une protéine. A droite, le spectre différentiel entre la forme oxydée et la forme réduite.	64
Figure 2.13	Principe de la spectroscopie infrarouge en réflexion totale atténuée.	65
Figure 2.14	Schéma expliquant l'exaltation de surface observée par spectroscopie infrarouge. Cette figure est tirée de la référence.	66
Figure 2.15	Les trois types de transitions rencontrés dans la diffusion Raman.	67

Figure 2.16	Principe de la spectroscopie Raman et de la spectroscopie de résonance Raman.	68
Figure 2.17	Schéma du principe d'un spectromètre Raman dispersif.	69
Figure 2.18	Nomenclature des carbones du cycle porphyrinique.	70
Figure 3.1	Cyclovoltammogramme de l'activation des nanoparticules d'or de 15 nm effectuée dans une solution d'acide sulfurique 0.1 M.	79
Figure 3.2	Les différentes étapes de la fonctionnalisation d'électrode pour les mesures électrochimiques.	80
Figure 4.1	Superposition de la structure cristallographique de la cytochrome <i>bo</i> ₃ oxydase et de sa surface électrostatique (calculée dans le vide). La surface hydrophobe est représentée en gris.	89
Figure 4.2	Cyclovoltammogrammes de la cytochrome <i>bo</i> ₃ oxydase immobilisée sur des nanoparticules d'or de 15 nm en présence (courbe bleue) et en absence d'oxygène (courbe rouge), de la cytochrome <i>bo</i> ₃ en présence d'oxygène et sans nanoparticules (courbe verte) et des nanoparticules d'or en absence de protéines (courbe noire). Toutes les mesures ont été effectuées dans un tampon phosphate (50 mM, pH 7) à $v=0.02$ V/s.	89
Figure 4.3	Cyclovoltammogrammes à différentes concentrations en CN^- de la cytochrome <i>bo</i> ₃ oxydase immobilisée sur des nanoparticules d'or de 15 nm (A); influence de la concentration en cyanure sur le courant catalytique (B).	91
Figure 4.4	Cyclovoltammogrammes de la cytochrome <i>bo</i> ₃ oxydase en présence (courbe rouge) et en absence de CN^- (courbe noire). Les mesures ont été effectuées dans un tampon phosphate dégazé à l'argon (50 mM, pH 7) à $v=0.02$ V/s.	92
Figure 4.5	Cyclovoltammogrammes de la cytochrome <i>bo</i> ₃ oxydase immobilisée sur des nanoparticules d'or de 15 nm à pH 6 (courbe noire), pH 7 (courbe rouge) et pH 8 (courbe bleue) à $v=0.02$ V/s.	93
Figure 4.6	Cyclovoltammogrammes de la cytochrome <i>bo</i> ₃ oxydase sans quinone immobilisée sur des nanoparticules d'or de 15 nm en présence (courbe rouge) et en absence d'oxygène (courbe noire). Les mesures ont été effectuées dans un tampon phosphate (50 mM, pH 7) à $v=0.02$ V/s.	94
Figure 4.7	Suivi par spectroscopie infrarouge en réflexion totale atténuée exaltée de surface des différentes étapes de la modification de surface effectuée en électrochimie. L'insert correspond aux	95

signaux $\nu(\text{C-H})$ aux différentes étapes de la modifications observés entre entre 3000 et 2800 cm^{-1} .

- Figure 4.8** Spectres Visible de différentes synthèses de nanoparticules d'or avec 4 équivalents de citrates (courbe noire), 1 équivalent de citrate (courbe rouge) et 0.8 équivalents de citrate (courbe bleue) et images TEM confirmant la taille et la monodispersité des particules. 97
- Figure 4.9** Cyclovoltammogrammes obtenus après 3 dépôts de nanoparticules d'or de 15 nm (courbe noire), de 35 nm (courbe rouge) et de 55 nm (courbe bleue). Mesures effectuées dans H_2SO_4 0.1 M à $v=0.1$ V/s. 98
- Figure 4.10** Cyclovoltammogrammes avant dépôt de la protéine (courbes noires) et après dépôt de la cytochrome bo_3 oxydase en absence (courbes rouges) et en présence d'oxygène (courbes bleues). Les mesures ont été effectuées dans un tampon phosphate (50 mM, pH 7) à $v=0.02$ V/s. 99
- Figure 5.1** Structure cristallographique de la cytochrome aa_3 oxydase avec les chemins de protons D et K. Les trois sites possibles de coordination de zinc sont représentés par les cercles en pointillés noirs. 106
- Figure 5.2** Cyclovoltammogrammes de la cytochrome aa_3 oxydase immobilisée sur des nanoparticules d'or de 15 nm en absence d'oxygène et de cyanure (courbe noire), en présence d'oxygène (courbe bleue) et en présence de cyanure (courbe rouge). Toutes les mesures ont été effectuées dans un tampon phosphate (50 mM, pH 7) à $v=0.02$ V/s. 107
- Figure 5.3** Cyclovoltammogrammes de la cytochrome aa_3 oxydase sous forme native (courbe verte) et sous différentes formes mutées: K354M (courbe noire), D124N (courbe rouge) et D124N/K354M (courbe bleue) immobilisées sur des nanoparticules d'or de 15 nm en présence d'oxygène. Toutes les mesures ont été effectuées dans un tampon phosphate (50 mM) à pH 7 et à $v=0.02$ V/s. 109
- Figure 5.4** Cyclovoltammogrammes de la cytochrome aa_3 oxydase immobilisée sur des nanoparticules d'or de 15 nm à différentes concentrations en Zn^{2+} . Les mesures ont été effectuées dans un tampon Tris (50 mM) à pH 7 et $v=0.02$ V/s. 110
- Figure 5.5** Influence de la concentration en Zn^{2+} sur le courant catalytique 112

mesuré à -0.19 V.

Figure 5.6	Structure cristallographique de la cytochrome <i>aa₃</i> oxydase représentée avec les probables sites de coordination du zinc.	113
Figure 6.1	Comparaison des sous-unités des deux isoformes de la cytochrome <i>cbb₃</i> oxydase. Schéma préparé par Hao Xie.	118
Figure 6.2	Structure cristallographique de la cytochrome <i>cbb₃</i> oxydase (PDB : 3MK7). Cette structure correspond à l'isoforme 1 où la sous-unité <i>ccoQ</i> est absente. Les cytochromes <i>c₄</i> , <i>c₅</i> et <i>c₅₅₁</i> sont également représentés (PDB : 1ETP, 1CC5 et 1CCH).	119
Figure 6.3	Spectres différentiels UV-Visible de la forme oxydée moins réduite et de la forme réduite moins oxydée de la <i>cbb₃</i> -1. L'encart correspond aux bandes β utilisées pour différencier les hèmes et tracer les courbes de Nernst. Les mesures ont été effectuées entre -0.09 et 0.51 V à pH 7.5.	120
Figure 6.4	Spectres différentiels successifs obtenus au cours de la titration potentiométrique par spectroscopie UV-Visible de l'isoforme 1. La référence a été mesurée à -0.09 V.	121
Figure 6.5	Courbes expérimentales et courbes de Nernst simulées pour les hèmes <i>b</i> et <i>c</i> des deux isoformes de la cytochrome <i>cbb₃</i> oxydase mesurées respectivement à 560 nm et 550 nm.	122
Figure 6.6	Cyclovoltammogrammes des deux isoformes de la cytochrome <i>cbb₃</i> oxydase immobilisées sur des nanoparticules d'or de 15 nm. L'isoforme 1 correspond à la courbe noire et l'isoforme 2 à la courbe rouge. Les mesures ont été effectuées dans un tampon phosphate (50 mM, pH 7) et à $v=0.1$ V/s.	125
Figure 6.7	Cyclovoltammogrammes de la sous-unité <i>ccoP</i> (courbe noire) et de la <i>cbb₃</i> -1 (courbe rouge) immobilisées sur des nanoparticules d'or de 15 nm. Les mesures ont été effectuées dans un tampon phosphate (50 mM, pH 7) à $v=0.1$ V/s.	126
Figure 6.8	Déconvolution à l'aide de fonctions gaussiennes des signaux électrochimiques obtenus pour la <i>cbb₃</i> -1 en voltampérométrie cyclique en absence d'oxygène. Les signaux déconvolués des hèmes <i>b</i> sont représentés en bleu et ceux obtenus pour l'hème <i>c</i> sont représentés en rouge.	128
Figure 6.9	Déconvolution à l'aide de fonctions gaussiennes des signaux électrochimiques obtenus pour la <i>cbb₃</i> -2 en voltampérométrie cyclique en absence d'oxygène. Les signaux déconvolués des	128

hèmes *b* sont représentés en bleu et ceux obtenus pour l'hème *c* sont représentés en rouge.

- Figure 6.10** Déconvolution à l'aide de fonctions gaussiennes des signaux électrochimiques obtenus pour la *ccoP* en voltampérométrie cyclique en absence d'oxygène. Les signaux déconvolués pour les hèmes *c* sont représentés en rouge. 129
- Figure 6.11** Activité relative et activité de réduction de l'oxygène des deux isoformes de la cytochrome *cbb₃* oxydase en présence de TMPD. Graphique et mesures réalisés par Hao Xie (Max Planck Institute of Biophysics, Frankfurt/Main). 130
- Figure 6.12** Cyclovoltammogrammes des deux isoformes de la cytochrome *cbb₃* oxydase immobilisés sur des nanoparticules d'or de 15 nm en présence d'oxygène. La *cbb₃-1* correspond à la courbe noire et la *cbb₃-2* correspond à la courbe rouge. Les mesures ont été effectuées dans un tampon phosphate (50 mM, pH 7) à $v=0.02$ V/s. 130
- Figure 6.13** Influence de la température sur l'activité catalytique des deux isoformes de la cytochrome *cbb₃* oxydase mesuré par voltampérométrie cyclique. Les mesures ont été effectuées dans un tampon phosphate (50 mM, pH 7) à $v=0.02$ V/s. 131
- Figure 6.14** Spectres Raman des deux isoformes de la cytochrome *cbb₃* oxydase obtenus avec une excitation à 457 nm. Les mesures ont été effectuées dans un tampon phosphate(50 mM) à pH 7. 132
- Figure 6.15** Comparaison des deux isoformes de la cytochrome *cbb₃* oxydase par spectroscopie infrarouge différentielle. Les mesures ont été effectuées entre -0.09 et +0.51 V dans un tampon Tris à pH 7.5. 134
- Figure 6.16** Représentation de la conservation des arginines pontantes dans les oxydases terminales de type A (PDB : 1M56) et B (PDB : 1EHK) et comparaison avec les oxydases de type C (PDB : 3MK7). Dans les oxydases de type C, l'arginine pontant les deux hèmes est remplacée par un atome de calcium. 139
- Figure 6.17** Comparaison de la stabilité thermique des deux isoformes de la cytochrome *cbb₃* oxydase entre 15°C et 75°C par spectroscopie infrarouge en transmission. Les mesures en gras représentent les températures extrêmes (15°C en bleu et 75°C en rouge). 140
- Figure 6.18** Spectres différentiels UV-Visible de la forme oxydée moins réduite et de la forme réduite moins oxydée du cytochrome *c₄*. Les mesures ont été effectuées entre -0.19 et 0.51 V dans un 142

tampon Tris à pH 7.5.

Figure 6.19	Titration potentiométriques des cytochromes c_4 , c_5 et c_{551} . Les titrations réductrices sont représentées en noir et les titrations oxydatives sont représentées en rouge. Toutes les mesures ont été effectuées dans un tampon Tris (50 mM) à pH 7.5.	143
Figure 6.20	Activité enzymatique relative des deux isoformes de la cytochrome cbb_3 oxydase en présence de cytochrome c_4 , c_5 ou c_{551} . Graphiques et mesures réalisés par Hao Xie.	144
Figure 6.21	Cyclovoltammogrammes des trois substrats potentiels de la cytochrome cbb_3 oxydase. Les mesures ont été effectuées dans un tampon phosphate (50 mM) à pH 7.5.	145
Figure 7.1	Dépendance pH des potentiels de demi-vague de la cytochrome aa_3 oxydase de <i>P. denitrificans</i> , de la cytochrome ba_3 oxydase de <i>T. thermophilus</i> et de la cytochrome cbb_3 oxydase de <i>B. japonicum</i> obtenus par titrations potentiométriques.	152
Figure 7.2	Suivi par spectroscopie infrarouge en réflexion totale atténuée exaltée de surface des différentes étapes de la modification de surface effectuées en électrochimie.	153
Figure 7.3	Représentation de la liaison peptidique et de la variation du moment dipolaire d'une hélice α . L'orientation de la protéine à la surface engendre une exaltation différente des hélices α à la surface ne permettant pas de déduire sa structure secondaire.	154
Figure 7.4	Cyclovoltammogrammes des cytochromes aa_3 , ba_3 et cbb_3 oxydases en absence d'oxygène. Les mesures ont été effectuées dans un tampon phosphate à pH 7 à $v=0.02$ V/s.	155
Figure 7.5	Voltammogrammes des cytochromes aa_3 , ba_3 et cbb_3 oxydases de pH 6.5 à pH 8.5. La mesure à pH 6.5 est représentée en noir et la mesure à pH 8.5 est représentée en rouge. Les mesures ont été effectuées en présence d'oxygène dans un tampon phosphate 50 mM ($v=0.02$ V/s).	157
Figure 7.6	Voltammogrammes des cytochromes aa_3 , ba_3 et cbb_3 oxydases à différentes températures. Les mesures ont été effectuées en présence d'oxygène dans un tampon phosphate 50 mM ($v=0.02$ V/s).	161
Figure 7.7	Evolution des bandes Amide I, Amide II et Amide II' des cytochromes aa_3 , ba_3 et cbb_3 oxydases en fonction de la température. Les mesures ont été effectuées dans un tampon	162

phosphate deutéré (0.02 % DDM, pD 7) de 15°C à 75°C.

Figure 7.8	Déconvolution de la bande Amide I pour les cytochromes <i>aa₃</i> , <i>ba₃</i> et <i>cbb₃</i> oxydases à 15°C et 75°C.	162
Figure 7.9	Comparaison des spectres oxydés moins réduits (+0.51V/-0.19V) de la cytochrome <i>ba₃</i> oxydase à pH 6.5, 7, 7.5, 8 et 8.5. Les mesures ont été effectuées dans un tampon phosphate (50 mM).	165
Figure 7.10	Spectres différentiels oxydés moins réduits de la cytochrome <i>ba₃</i> oxydase à pH 6.5, 7, 7.5 et 8.5 avec une contribution majoritaire de l'hème <i>b</i> .	169
Figure 7.11	Spectres différentiels oxydés moins réduits de la cytochrome <i>ba₃</i> oxydase à pH 6.5, 7, 7.5 et 8.5 avec une contribution majoritaire de l'hème <i>a₃</i> .	170
Liste des tables		
Tableau 2.1	Tables compilant les valeurs de 1/m en fonction de l'écart entre les pics anodiques et cathodiques ΔE_p et le nombre d'électrons transférés.	48
Tableau 2.2	Principales contributions du squelette polypeptidique en infrarouge moyen.	62
Tableau 2.3	Position de la bande Amide I en fonction de la structure secondaire.	63
Tableau 2.4	Principales bandes marqueurs des hèmes en spectroscopie Raman.	70
Tableau 3.1	Liste des médiateurs utilisés pour la cellule électrochimique en couche mince.	82
Tableau 3.2	Tableau récapitulatif des conditions de travail utilisées pour les différentes titrations.	82
Tableau 3.3	Conditions expérimentales des différentes expériences de spectroscopie infrarouge différentielle induite par électrochimie effectuées au cours de la thèse.	84
Tableau 4.1	Caractéristiques des spectres Visible des différentes synthèses de nanoparticules d'or et estimation de leur taille.	97
Tableau 5.1	Comparaison des valeurs de potentiels obtenus par titration potentiométrique et électrochimie directe de la cytochrome <i>aa₃</i>	108

oxydase de différents organismes.

Tableau 6.1	Tableau récapitulatif des potentiels redox des différents cofacteurs de la cytochrome <i>cbb</i> ₃ oxydase mesurés pour différents organismes. Les potentiels redox déterminés pour la cytochrome <i>aa</i> ₃ de <i>P. denitrificans</i> sont mentionnés à titre de comparaison. Les valeurs mentionnées dans le tableau ont été déterminées à pH 7 sauf mention contraire.	123
Tableau 6.2	Potentiels de demi-vague, séparation des potentiels de pic ΔE_p et largeur de pic à mi-hauteur (FWHM) déterminés par déconvolution des différents signaux électrochimiques obtenus par voltampérométrie cyclique.	127
Tableau 6.3	Attributions des différentes bandes observées en spectroscopie de résonance Raman pour les deux isoformes de la cytochrome <i>cbb</i> ₃ oxydase. L'excitation a été effectuée à 457 nm.	133
Tableau 6.4	Récapitulatif des bandes observées sur les spectres différentiels induits par électrochimie des deux isoformes de la cytochrome <i>cbb</i> ₃ oxydase et tentatives d'attributions.	136
Tableau 6.5	Changements de structures secondaires observés au cours de l'augmentation de température. Les résultats ont été obtenus par déconvolution de la bande Amide I à la température correspondante.	141
Tableau 6.6	Maxima des bandes de Soret, α et β pour chaque substrat en spectroscopie UV-Visible différentiel induit par électrochimie.	142
Tableau 6.7	Potentiels d'oxydoréduction obtenus par titration potentiométrique de chaque donneur d'électrons probables.	143
Tableau 6.8	Potentiels de demi-vague obtenus par voltampérométrie de chaque donneur d'électrons probables.	145
Tableau 7.1	Potentiels d'oxydoréduction observés pour les différents cofacteurs des trois types d'oxydases. Toutes les valeurs ont été obtenues à pH 7 sauf pour la cytochrome <i>cbb</i> ₃ oxydases dont les valeurs sont obtenues à pH 7.5 en solution.	157
Tableau 7.2	Potentiel de réduction des trois types d'oxydases à différents pH mesurés par voltampérométrie stationnaire.	159
Tableau 7.3	Résultats de la déconvolution de la bande Amide I des trois types d'oxydases terminales à 15°C et 75°C.	163

Tableau 7.4	Récapitulatif des bandes observées sur les spectres différentiels de la cytochrome <i>ba</i> ₃ oxydase et tentatives d'attributions.	165
--------------------	---	-----

Liste des publications

Articles publiés

1. Evidence for distinct electron transfer processes in terminal oxidases from different origin by means of protein film voltammetry, *J. Am. Chem. Soc.* (2014) *136*, 10854-10857.
Thomas Meyer, Frédéric Melin, Hao Xie, Iris von der Hocht, Sylvia K. Choi, Mohamed R. Noor, Hartmut Michel, Robert B. Gennis, Tewfik Soulimane, Petra Hellwig.
2. Direct electrochemistry of cytochrome *bo*₃ oxidase at a series of gold nanoparticles modified electrodes, *Electrochem. Commun.* (2013) *26*, 105-108.
Frédéric Melin, Thomas Meyer, Styven Lankiang, Sylvia K. Choi, Robert B. Gennis, Christian Blanck, Marc Schmutz, Petra Hellwig.
3. Electrochemistry of cytochrome *c*₁, *c*₅₅₂ and Cu_A from the respiratory chain of *Thermus thermophilus* immobilized on gold nanoparticles, *J. Phys. Chem. B* (2011) *115*(21), 7165-7170.
Thomas Meyer, Julien Gross, Christian Blanck, Marc Schmutz, Bernd Ludwig, Petra Hellwig, Frédéric Melin.

Articles en préparation

1. Electrochemical evidence for the access of protons from the exit site during turnover in D124N and K354M mutant cytochrome *c* oxidase from *P. denitrificans*.
Thomas Meyer, Frédéric Melin, Oliver-M.H. Richter, Bernd Ludwig, Aimo Kannt, Hanne Müller, Hartmut Michel, Petra Hellwig

Chapitre I

Introduction

1.1. Motivation de la thèse

Les organismes bactériens sont en mesure d'adapter leur chaîne respiratoire en fonction des conditions de leur habitat naturel. C'est pourquoi des organismes vivants, comme *Thermus thermophilus*, qui vit dans des sources acides à 80°C, sont présents dans des milieux de vie extrêmes. La diversité des environnements disponibles est donc responsable de la diversité de protéines exprimées par les organismes aérobiques (Figure 1.1). Au cours de cette thèse, nous nous sommes particulièrement intéressés au dernier accepteur d'électrons de la chaîne respiratoire : les oxydases terminales. Ces enzymes réduisent l'oxygène en eau et pompent des protons à travers la membrane contre le gradient de concentration. Leur adaptation à différents environnements implique notamment des différences de stabilité à haute température ainsi qu'une affinité accrue pour leur substrat naturel : l'oxygène.

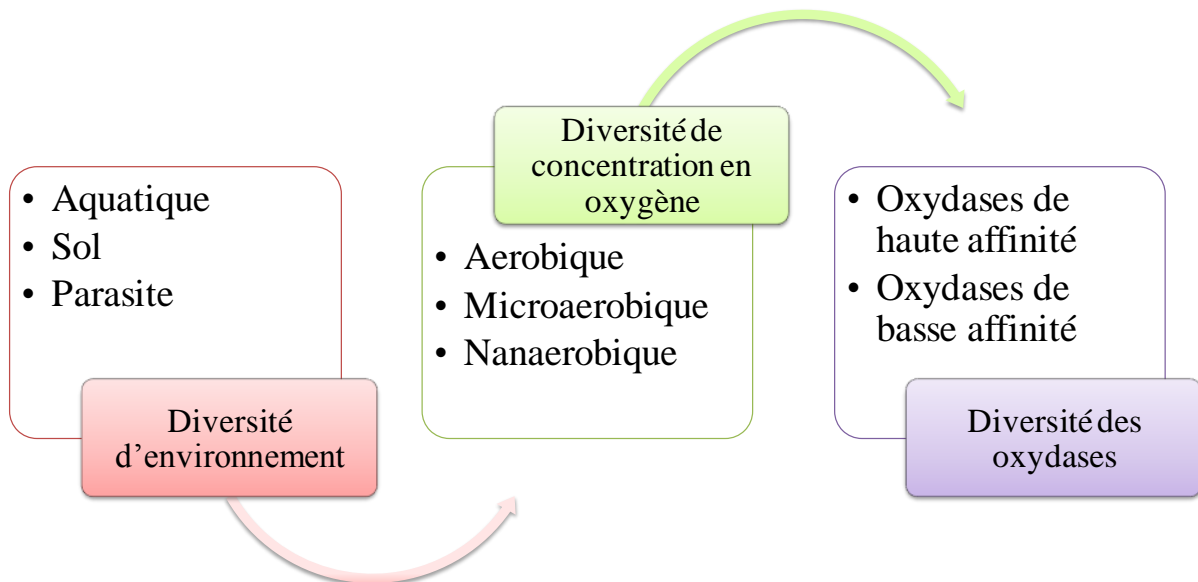


Figure 1.1: Diversité des environnements conduisant à la diversité des oxydases terminales.

Cette thèse s'articule autour de l'étude de différentes propriétés des oxydases terminales pouvant influencer le transfert d'électrons et de protons grâce à des techniques électrochimiques. Cette étude nécessite le développement d'une méthode permettant d'immobiliser des enzymes à la surface d'une électrode pour des analyses par électrochimie directe et devrait permettre l'observation des propriétés intrinsèques des enzymes (vitesse de transfert d'électron de l'étape cinétiquement limitante, constantes d'inhibition...).

1.2. La production d'énergie dans les cellules : la phosphorylation oxydative

La phosphorylation oxydative permet d'exploiter les molécules de NADH et de FADH₂ produites au cours de la glycolyse et du cycle de Krebs pour la synthèse de l'ATP afin d'améliorer le rendement d'énergie chimique par molécule de glucose. La phosphorylation oxydative consiste en une cascade de réactions d'oxydoréduction commençant par l'oxydation d'une espèce de bas potentiel d'oxydoréduction, le NADH, et finissant par la réduction d'une espèce à haut potentiel d'oxydoréduction, l'oxygène⁽¹⁾. Cette suite de réactions d'oxydoréduction est effectuée par des complexes protéiques transmembranaires dont l'ensemble forme la chaîne respiratoire (Figure 1.2)⁽²⁾. Ces édifices protéiques sont situés dans la membrane interne des bactéries ou dans la membrane interne des mitochondries pour les cellules eucaryotes. L'énergie libre dégagée par les réactions d'oxydoréduction successives est utilisée pour le pompage des protons dans l'espace intermembranaire (contre le gradient de concentration) créant une force protomotrice utilisée par l'ATP synthase pour la production d'ATP⁽²⁾. Le bilan global pour la production d'énergie chimique passe, en présence d'une chaîne respiratoire, à 36 molécules d'ATP produites par molécule de glucose dégradée. Ce chiffre est valable pour la chaîne respiratoire mitochondriale mais peut légèrement varier pour les chaînes respiratoires bactériennes.

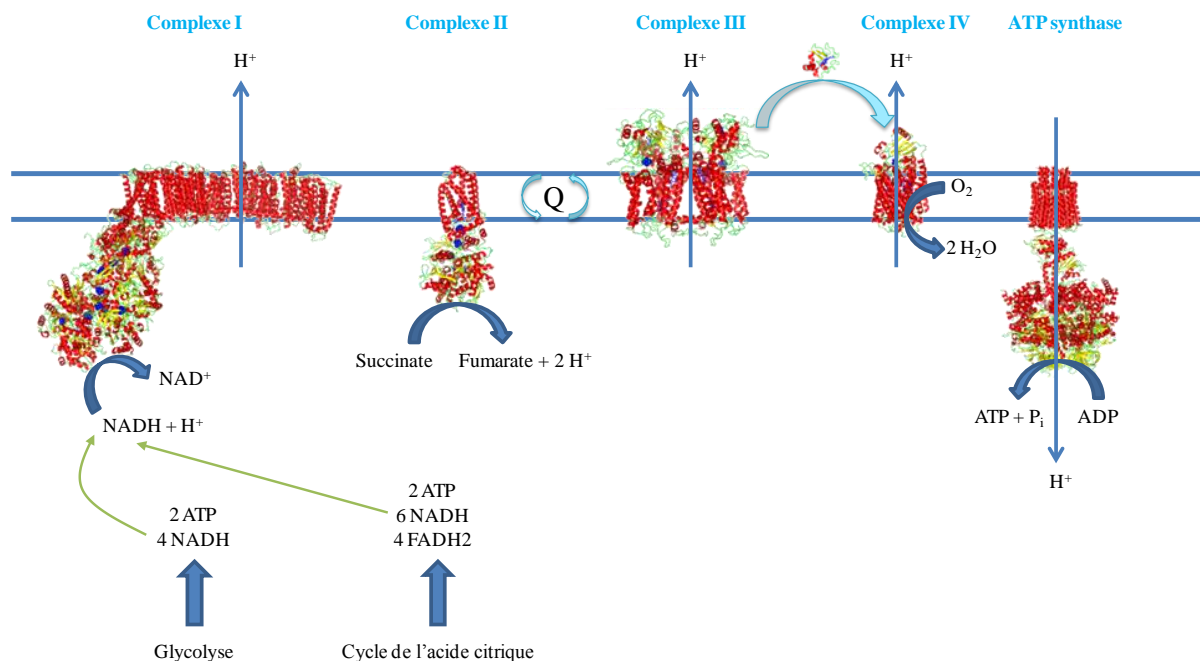


Figure 1.2 : Exemple de modèle de la chaîne respiratoire aérobie contenant les quatre complexes transmembranaires et l'ATP synthase. Les différentes structures correspondent aux PDB 4HEA⁽³⁾, 1NEK⁽⁴⁾, 1ZRT⁽⁵⁾, 3HB3⁽⁶⁾ et 2XOK⁽⁷⁾.

Dans les cellules eucaryotes, la majorité de l'énergie d'une cellule est produite par les mitochondries qui sont des générateurs d'énergie chimique. Ceci représente un problème majeur d'un point de vue expérimental puisqu'il n'est pas possible d'introduire des gènes mutants dans l'ADN des mitochondries. Il est donc impossible d'étudier leur fonctionnement grâce à des mutations dirigées. Afin de pallier à cette difficulté, l'attention de plusieurs groupes de recherche s'est portée sur l'étude de chaînes respiratoires bactériennes⁽¹⁾. En effet, les cellules procaryotes ne possèdent pas d'organites et tout leur ADN est contenu dans le cytosol rendant plus facile l'introduction de gènes mutants. Contrairement à la chaîne respiratoire mitochondriale qui présente très peu de diversité dans sa composition, les chaînes respiratoires bactériennes présentent une grande variété de possibilités dans leur composition leur permettant de s'adapter à des conditions différentes en fonction de leur habitat naturel (Figure 1.3). C'est cette diversité de composition au niveau de la chaîne respiratoire qui fait que les bactéries sont présentes dans tous types d'environnement.

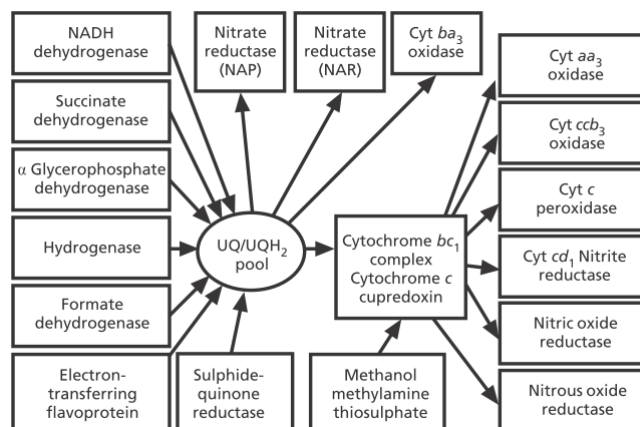


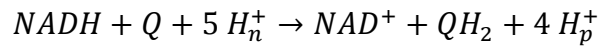
Figure 1.3: Diversité de modulation pour la chaîne respiratoire de *P. denitrificans*. Ce schéma est issu de la référence⁽⁸⁾.

1.3. Les différents complexes de la chaîne respiratoire bactérienne

- Complexe I : NADH ubiquinone oxydoréductase

Le complexe I est le plus grand complexe de la chaîne respiratoire (Figure 1.4). Il accepte deux électrons provenant du NADH et représente le point d'entrée des électrons dans la chaîne respiratoire^(9, 10). Les électrons sont transmis à l'ubiquinone grâce à une suite de cofacteurs constituée d'une FMN (flavine mononucléotide), qui constitue le premier accepteur d'électrons, et de huit centres FeS, tous situés dans la partie soluble de la protéine^(3, 11, 12). Un neuvième centre FeS est également présent dans la protéine mais il est séparé de plus de 20 Å

du reste de la chaîne de transfert d'électrons et ne participe donc pas au relais d'électrons. La réduction de l'ubiquinone libère de l'énergie permettant la translocation de 4 protons à travers la membrane contre le gradient de concentration. La réaction globale effectuée par le complexe I peut être résumée comme suit :



Où H_n représente les protons situés du côté cytoplasmique et H_p les protons du côté périplasmique.

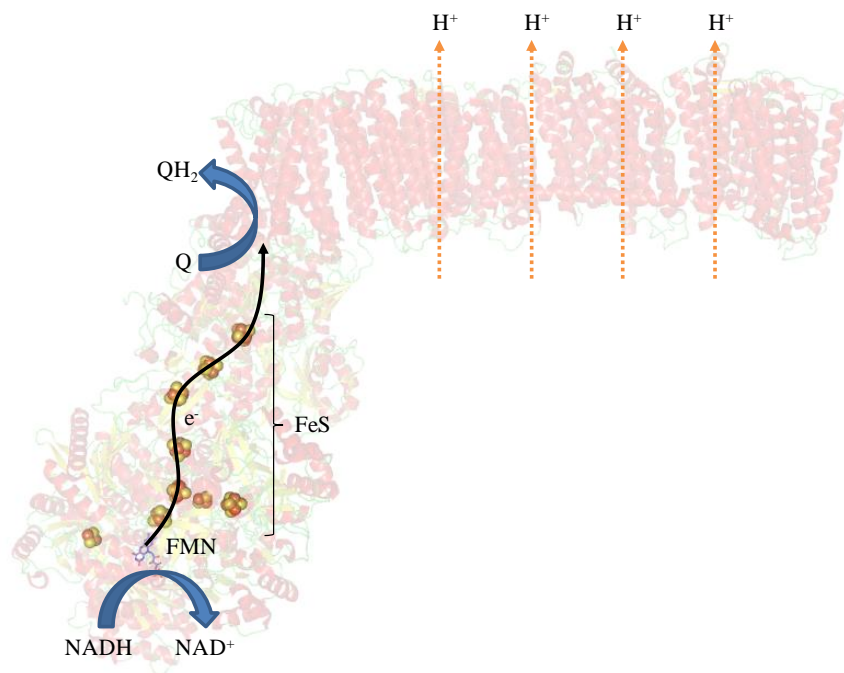


Figure 1.4 : Structure du complexe I de la chaîne respiratoire de *T. thermophilus* et représentation du transfert d'électrons et de protons. Les cofacteurs redox sont tous situés dans la partie soluble alors que les chemins de protons sont localisés dans la partie membranaire.

- Complexe II : succinate déshydrogénase ou succinate quinone réductase (SQR)

La succinate déshydrogénase est un complexe qui intervient dans deux chemins métaboliques nécessaires à la production d'énergie dans les cellules : le cycle de l'acide citrique et la phosphorylation oxydative. Cette protéine transmembranaire couple l'oxydation du succinate en fumarate à la réduction de l'ubiquinone⁽¹³⁻¹⁶⁾. Chez *E. coli*, les électrons issus de l'oxydation du succinate sont transmis à la FAD qui est le premier accepteur d'électrons de la succinate déshydrogénase (Figure 1.5). Ces électrons sont alors transmis à une suite de relais FeS qui vont permettre de réduire l'ubiquinone. Il est à noter que la SQR d'*E. coli* possède

également un hème *b* qui semble jouer un rôle uniquement dans la stabilisation de la partie transmembranaire ; en effet, des études de protéines mutées ne possédant pas l'hème *b* n'ont pas permis de mettre en avant une différence au niveau de la réaction de réduction de l'ubiquinone⁽¹⁴⁾.

Une autre particularité de cette protéine réside dans le fait qu'elle est également en mesure de réaliser l'oxydation d'une quinone pour réduire le fumarate en succinate⁽¹⁴⁾ ; la fonction de la protéine étant défini par la disponibilité en donneur et en accepteur d'électrons. Certaines bactéries possèdent également la possibilité de varier la nature du complexe II à exprimer en fonction de la quantité d'oxygène présente dans le milieu. Dans des milieux riches en oxygène, la SQR sera préférentiellement exprimée pour participer à la respiration aérobie alors que dans des milieux pauvres en oxygène, la quinone fumarate réductase sera plutôt exprimée⁽¹⁴⁾. La quinone fumarate réductase est principalement exprimée avec des quinols de bas potentiel permettant au fumarate d'être l'accepteur d'électrons final d'une chaîne respiratoire anaérobie⁽¹⁶⁾.

Le complexe II est également le seul complexe de la chaîne respiratoire qui ne pompe pas de protons à travers la membrane.

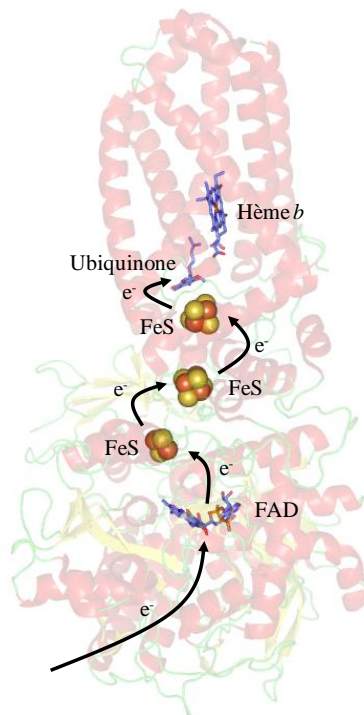
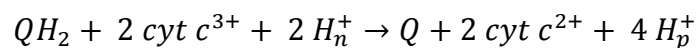


Figure 1.5 : La chaîne de transfert d'électrons de la succinate déshydrogénase d'*E. coli*. Les électrons issus de l'oxydation du succinate permettent de réduire l'ubiquinone sans translocation de protons à travers la membrane (PDB : 1NEK).

- Complexe III : complexe bc_1

Le complexe bc_1 accepte les électrons provenant de l'ubiquinone pour effectuer la réduction du cytochrome c (Figure 1.6)⁽¹⁷⁻¹⁹⁾. Ce transfert d'électrons est couplé à la translocation de deux protons à travers la membrane par l'intermédiaire du cycle Q. Ce complexe contient deux hèmes de types b , l'un haut spin b_H et l'autre bas spin b_L , un cytochrome c_1 et un centre Fe-S et deux sites de coordination de quinones, Q_0 et Q_i .

Le cycle Q est basé sur une bifurcation d'électrons entre l'hème b_L et le centre Fe-S du cytochrome bc_1 ⁽²⁰⁾. Ce cycle est divisé en deux parties. Au cours de la première partie du cycle, la quinone réduite se lie au site Q_0 . Les électrons provenant du quinol permettent de réduire successivement le centre FeS puis le cytochrome c_1 ainsi que l'hème b_L . Les deux protons issus de l'oxydation du quinol sont transloqués dans l'espace intermembranaire ou dans le périplasma. La quinone oxydée diffuse alors vers le site Q_i où elle récupère l'électron cédé à l'hème b_L . La deuxième partie du cycle est commune à la première partie du cycle Q jusqu'à la réduction de l'hème b_L par la semiquinone. La différence entre les deux cycles se situe au niveau de la réduction de la quinone puisque l'électron transféré à travers les hèmes b est transmis à la semiquinone pour former la quinone réduite QH_2 grâce à la translocation de deux protons provenant du cytoplasme. Le bilan du cycle Q peut finalement se résumer comme suit :



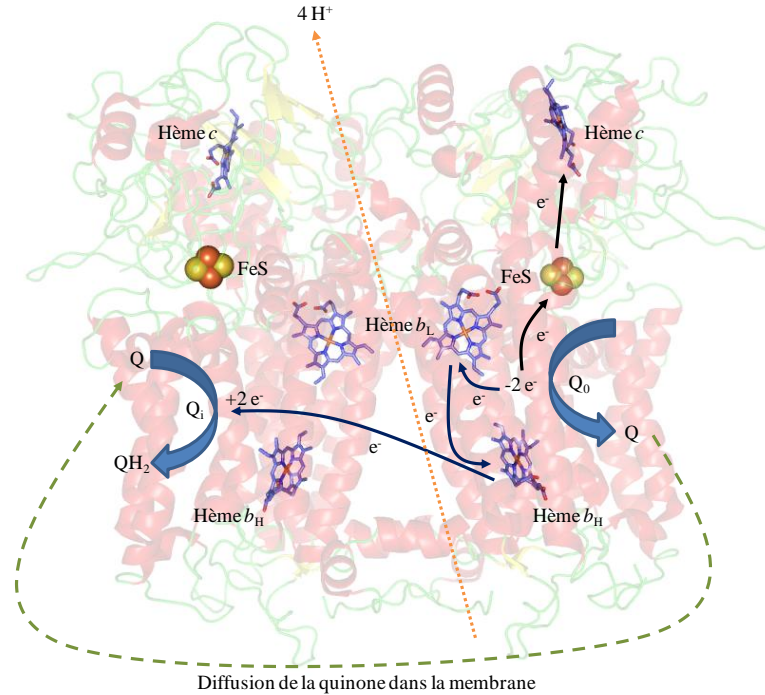
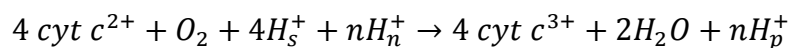


Figure 1.6 : Organisation des cofacteurs au sein du cytochrome bc_1 de *R. capsulatus* et représentation schématique du cycle Q.

- Complexe IV: cytochrome *c* oxydase ou quinol oxydase

Le complexe IV est connu sous le nom de cytochrome *c* oxydase ou quinol oxydase en fonction du donneur d'électrons. L'oxydation du quinol ou du cytochrome *c* est couplé à la réduction de l'oxygène. Cette réaction d'oxydoréduction s'accompagne du pompage de n protons à travers la membrane (Figure 1.7)⁽²¹⁻²⁴⁾. La valeur de n est dépendante de la nature de l'oxydase terminale. Les électrons provenant du donneur d'électrons sont transmis au premier accepteur d'électrons qui peut être soit un hème, soit un centre cuivre. Les électrons sont ensuite transférés au site actif composé d'un hème haut-spin et d'un centre cuivre mononucléaire, communément appelé centre actif binucléaire, par l'intermédiaire d'un hème bas-spin (qui peut être de différent type en fonction de la nature de l'enzyme). Le bilan de la réaction enzymatique peut se résumer comme suit :



où H_s correspond aux protons utilisés par la réaction d'oxydoréduction, H_n et H_p correspondent aux protons se situant respectivement du côté cytoplasmique et périplasmique.

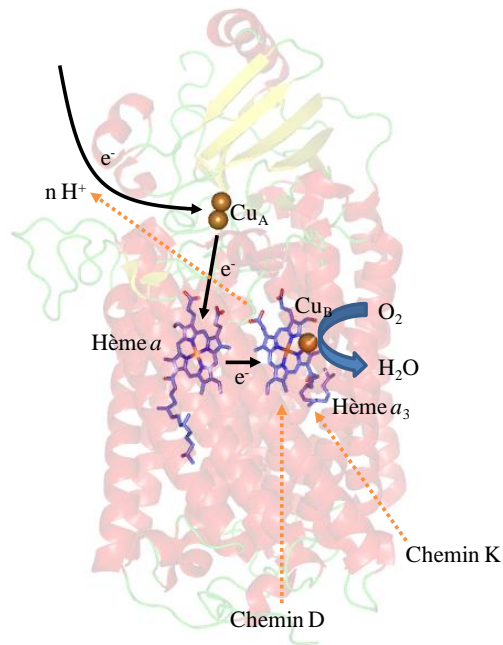


Figure 1.7 : Structure de la cytochrome aa_3 de *P. denitrificans* (PDB : 3HB3⁽⁶⁾). Les électrons issus de l'oxydation du cytochrome *c* sont utilisés pour la réduction de l'oxygène. Cette réaction est couplée au pompage de protons à travers la membrane.

- Complexe V : ATP synthase

Le complexe V de la chaîne respiratoire est l'ATP synthase. Sa fonction est de synthétiser l'ATP en exploitant le gradient de protons formé par les complexes I, III et IV. La partie membranaire, appelée F_0 contient les chemins de protons alors que la partie soluble F_1 contient les parties catalytiques permettant de phosphoryler l'ADP⁽²⁵⁾. La partie catalytique est composée des sous-unités α , β , δ , γ et ϵ dans une stoechiométrie 3 : 3 : 1 : 1 : 1. La phosphorylation de l'ADP s'effectue dans les parties β d'après un mécanisme en trois temps décrit P. Boyer⁽²⁶⁻²⁹⁾ : le premier correspond à la sous-unité catalytique en absence de substrat, le deuxième correspond à l'état où l'ADP est lié en présence de phosphate et le dernier stade correspond à la transformation de l'ADP en ATP. Il est intéressant de noter que la réaction de phosphorylation ne requiert pas d'énergie mais que les seules étapes nécessitant de l'énergie sont la coordination de l'ADP et la décoordination de l'ATP.

1.4. La superfamille des oxydases hème-cuivre

1.4.1. Considérations évolutives

Les oxydases terminales sont généralement séparées en trois familles A, B et C. Il existe plusieurs théories concernant l'évolution de cette superfamille d'enzymes⁽³⁰⁾.

La première hypothèse consiste à considérer que les NO réductases sont phylogénétiquement proches des oxydases de type C et que les oxydases de type A et B en sont plus éloignées^(31, 32). D'un point de vue phylogénétique, cela revient à considérer un arbre sans racine où les NO réductases et les oxydases de type C partagent un ancêtre commun et les oxydases de type A et B partagent un autre ancêtre commun.

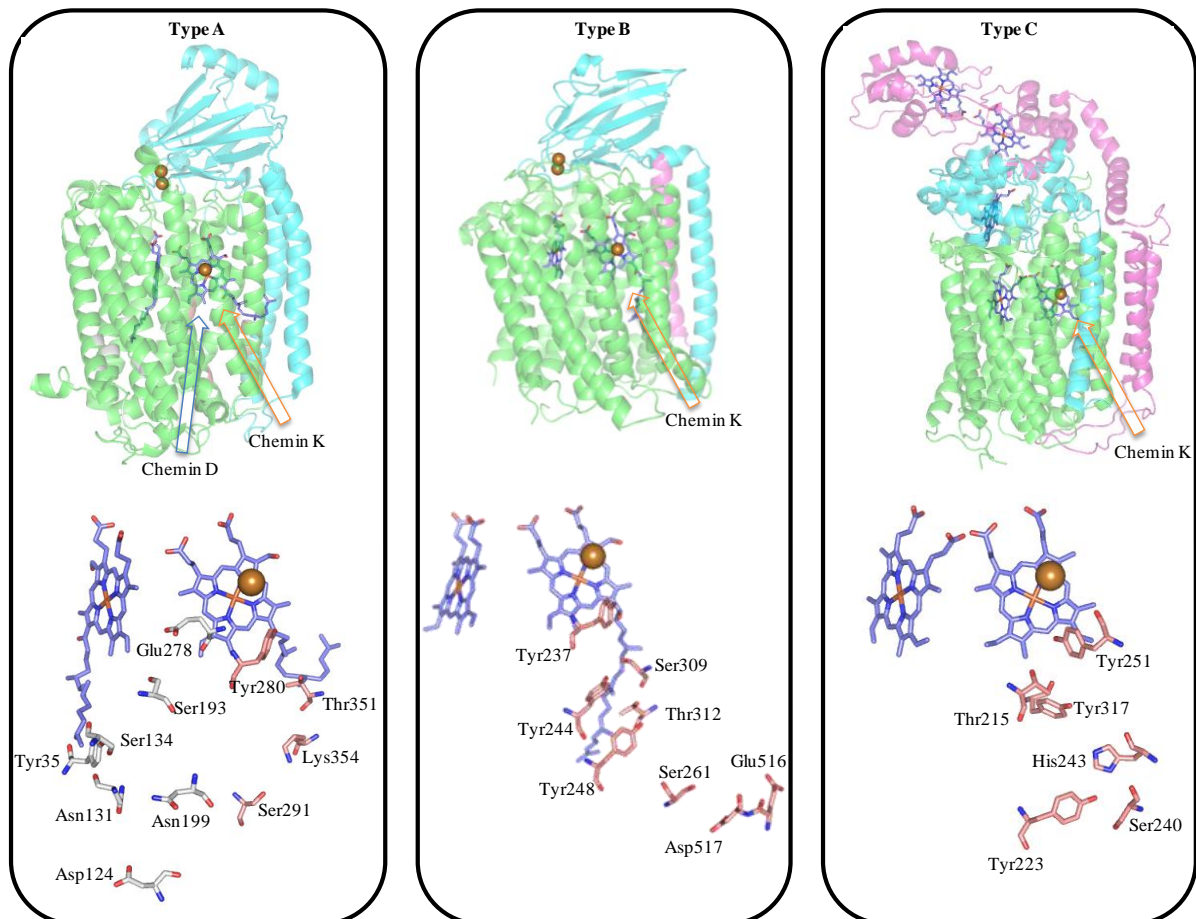
Une deuxième hypothèse consiste à penser que les O₂ réductases dérivent toutes d'enzymes dénitrifiantes⁽³³⁾. Il en résulte que la première duplication du gène de l'ancêtre commun a entraîné l'émergence des NO réductases. La duplication du gène codant pour les NO réductases a entraîné l'apparition des oxydases de type C. Finalement, le gène codant pour les oxydases de type C a été dupliqué et est à l'origine des oxydases de type A et B. Dans cette hypothèse, il est stipulé que la distinction entre organismes bactériens et archées est subvenue après l'apparition des O₂ réductases ce qui veut dire que la respiration aérobie est observée plus tôt dans le cycle de l'évolution que les bactéries. Cependant, aucun consensus n'a été trouvé sur cette dernière observation puisque Pereira et al. proposent que les archées ont acquis la respiration aérobie par transfert génétique des bactéries Gram positives et que par conséquent, l'ancêtre commun aux bactéries et aux archées n'effectuait pas la respiration aérobie.

De même, il faut également distinguer les oxydases terminales issues d'organismes mésophiles ou thermophiles⁽³⁴⁾ (vivants à haute température). Cependant, l'évolution de ces organismes ne peut pas être corrélée à l'évolution directe des oxydases hème-cuivre.

1.4.2. Les différentes familles d'oxydases terminales

Les oxydases terminales peuvent également être classifiées suivant trois familles A, B et C dépendant du nombre de chemins de protons et de leur homologie de structure (Figure 1.8)^(35, 36). Ces homologies de structures sont directement liées à leur évolution. Toutes les oxydases hème-cuivre réduisent l'oxygène en eau et pompent des protons à travers la membrane. Les

trois familles d'oxydases terminales discutées dans ce manuscrit possèdent aussi des points communs structuraux puisque la sous-unité I est toujours constituée d'un hème relais bas-spin permettant de transférer les électrons vers le centre actif binucléaire toujours composé d'un hème haut-spin et d'un centre cuivre mononucléaire Cu_B . De plus, toutes les oxydases hème-cuivre possède au moins un chemin de protons homologues au chemin K observé chez les oxydases de type A.



- Type A

Les oxydases hème-cuivre de type A sont des oxydases présentes dans plusieurs domaines de la vie puisqu'on les trouve chez les eucaryotes et chez les procaryotes. C'est dans cette famille que se trouvent aussi les oxydases mitochondriales. D'un point de vue structural, elles possèdent deux sous-unités fonctionnelles. La sous-unité I est composée de 12 hélices

transmembranaires contenant le site actif binucléaire et un hème bas-spin et la sous-unité II est composée d'une partie soluble contenant le premier accepteur d'électrons, le Cu_A, et deux hélices transmembranaires permettant l'ancrage de la sous-unité dans la membrane^(6, 39). Elles sont principalement exprimées à concentration élevée en oxygène et possèdent une faible affinité pour l'oxygène^(40, 41) (K_M de l'ordre du μM).

Ces oxydases sont aussi caractérisées par la présence de deux chemins de protons D et K⁽⁴²⁻⁴⁵⁾. Le chemin D est ainsi nommé dû à la présence d'un acide aminé hautement conservé à l'entrée de ce chemin : Asp124 (dénombrement de *P. denitrificans*). D'autres acides aminés participant au transfert de protons au sein du chemin D sont également hautement conservés comme Asn199, Asn113, Asn131, Tyr35, Ser134 et Ser193. Le chemin K est appelé ainsi en raison de la Lys354 hautement conservée. Les autres résidus conservés dans le chemin K sont Ser291, Thr351 et Tyr280. Cette dernière tyrosine est directement liée à His276 qui est elle-même reliée au centre Cu_B et participe directement au mécanisme catalytique de l'enzyme.

Les oxydases de type A peuvent encore être divisées en deux types A1 et A2 en fonction de la structure de chemin de protons D. En effet, les oxydases de type A1 sont caractérisées par la présence d'un acide glutamique à la fin du chemin D alors que les oxydases de type A2 possèdent deux résidus sérine-tyrosine capable d'effectuer le transfert de protons à la fin du chemin D^(35, 46).

- Type B

Les oxydases hème-cuivre de type B se retrouvent principalement chez les archéobactéries⁽³⁰⁾. Les oxydases de type B possèdent une sous-unité I avec 13 hélices transmembranaires dont les hélices I à XII sont homologues à celles des oxydases de type A. La sous-unité II dispose d'une hélice transmembranaire permettant l'accrochage à la membrane et une partie soluble contenant le Cu_A, le premier accepteur d'électrons.

Cette famille se distingue également des oxydases de type A par la présence d'un unique chemin de protons homologue au chemin K⁽⁴⁷⁾. Chez *T. thermophilus*, qui est la seule structure cristallographique connue d'une oxydase de type B à ce jour⁽³⁷⁾, ce chemin est composé de Asp517, Glu516, Ser261, Tyr248, Thr312, Tyr244, Ser309 et Tyr237⁽⁴⁸⁻⁵⁰⁾. De la même façon que pour les oxydases de type A, Tyr237 est liée à His233 qui coordine le centre Cu_B. Cette tyrosine semble également impliquée dans le cycle catalytique^(47, 51, 52).

Ces oxydases terminales possèdent une forte affinité pour l'oxygène et sont préférentiellement exprimées à faible concentration en oxygène⁽⁴¹⁾.

- Type C

Les oxydases hème-cuivre de type C sont essentiellement représentées dans les organismes bactériens. Cette famille présente uniquement des cytochromes *cbb₃* oxydases. Ces protéines sont caractérisées par une sous-unité catalytique CcoN qui présente un hème *b* bas-spin et site catalytique composé d'un hème *b* haut-spin et d'un centre cuivre mononucléaire Cu_B. Deux autres sous-unités, CcoO et CcoP, contiennent respectivement un et deux hèmes *c*. La différence principale de cette famille de protéines comparées aux oxydases de types A et B concerne le premier accepteur d'électrons qui est dans ce cas un hème de type *c*⁽³⁸⁾.

Comme les oxydases de type B, elles ne présentent qu'un unique chemin de protons homologue au chemin K. Pour la cytochrome *cbb₃* oxydase de *P. stutzeri*, qui est la seule structure cristallographique connue d'une oxydase de type C⁽³⁸⁾, ce chemin est composé de Ser240, Tyr 223, His243, Tyr317, Thr215 et Tyr251. Contrairement aux oxydases de type A et B, la tyrosine impliquée dans le cycle catalytique située à proximité du Cu_B est inexistante^(35, 46).

Elles sont exprimées majoritairement à faibles tensions en oxygène et présentent une forte affinité pour l'oxygène⁽⁵³⁾ (de l'ordre du nM).

1.4.3. Cycle catalytique

Le cycle catalytique des oxydases terminales est déterminé à partir de techniques spectroscopiques (essentiellement la spectroscopie Raman⁽⁵⁴⁾ et UV-Visible) et d'expériences « flow-flash »⁽⁵⁵⁾. Concrètement, la protéine est maintenue à l'état réduit grâce à la ligation de monoxyde de carbone (CO) sur l'hème du site actif. La protéine est ensuite mélangée à une solution tampon oxygénée et le site actif à l'état réduit est libéré par photodissociation du CO. L'oxygène peut alors se fixer sur le site catalytique et les différents intermédiaires peuvent être observés par différentes techniques spectroscopiques comme la spectroscopie UV-Visible ou la spectroscopie Raman. Cependant, les cycles catalytiques de ces enzymes restent largement débattus.

Le cycle catalytique des oxydases de type C n'est pas présenté car il n'est pas connu à ce jour.

- Type A

Le cycle catalytique observé pour les oxydases hème-cuivre de type A est très similaire quelque soit l'organisme dont l'enzyme est issue (Figure 1.9)⁽⁵⁶⁻⁶⁰⁾. Après photodissociation du CO, l'oxygène se lie à l'hème a_3 conduisant à la formation de l'état A^2 « adduit ». L'exposant 2 correspond au nombre d'électrons transférés au centre binucléaire à partir de l'état O^0 oxydé. L'addition d'oxygène entraîne le transfert d'un électron de l'hème a vers le site actif et le transfert d'un proton de la Tyr280 vers le site actif. Cet état est nommé « peroxy » ou P^3 même s'il s'agit en réalité d'un oxoferryl puisque l'oxygène est déjà dissocié. La formation de l'état F^3 est liée au transfert d'un électron du Cu_A vers l'hème a entraînant la réduction d'environ 50% de l'hème a et de l'assimilation de deux protons provenant du côté N. Un des protons est utilisé pour la réaction de réduction de l'oxygène alors que l'autre est transloqué de l'autre côté de la membrane^(61, 62) (il correspond donc à un proton pompé). La dernière étape du cycle catalytique correspond au passage de l'état F^3 vers l'état O^4 . Cet état est corrélé au transfert d'un électron issu de l'équilibre entre le Cu_A et l'hème a vers le site catalytique et de l'assimilation de deux protons provenant du côté N. Comme précédemment, un proton est délivré au site catalytique pour la réaction de réduction de l'oxygène et le deuxième est pompé à travers la membrane. La régénération de l'état R^2 à partir de l'état O^4 est obtenue après le transfert des deux derniers électrons et des deux derniers protons chimiques entraînant la réduction du site actif et le relargage des deux molécules d'eau résultantes, du pompage de deux protons à travers la membrane et du transfert de deux nouveaux électrons entraînant la réduction du Cu_A et de l'hème a .

Concernant le rôle des chemins de protons, il est aujourd'hui bien établi que les deux premiers protons chimiques sont assimilés à travers le chemin K alors que les deux derniers protons chimiques et les protons pompés sont tous fournis par le chemin D^(63, 64). Il faut aussi noter que, dans le cas des oxydases hème-cuivre de type A, chaque transfert d'électron est relié au transfert d'un proton chimique et d'un proton pompé à travers la membrane.

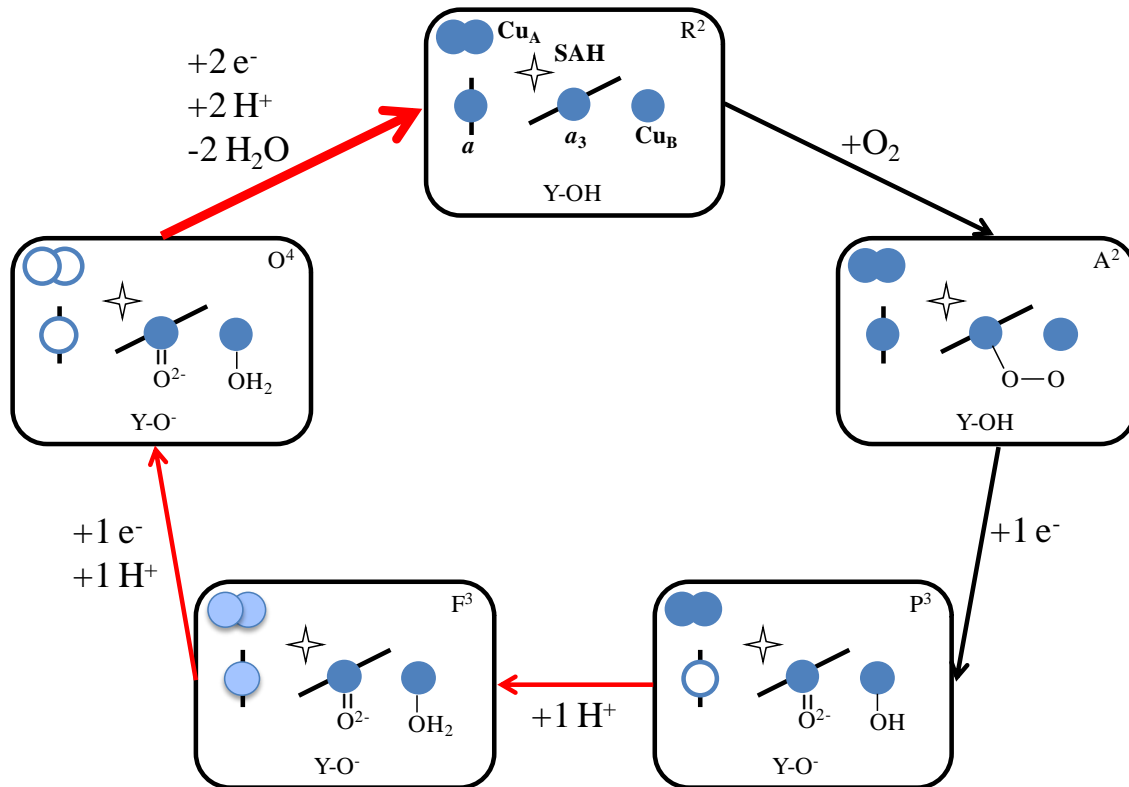


Figure 1.9 : Un des cycles catalytiques possibles de la cytochrome aa_3 oxydase à l'état réduit. Le site actif implique une tyrosine. Les cercles bleus pleins correspondent aux cofacteurs à l'état réduit, les cercles vides à ceux à l'état oxydé, les cercles ombragés à un état d'équilibre. L'étoile correspond à un site d'ancrage de protons. Les flèches rouges correspondent aux transitions impliquant un pompage de protons (la flèche épaisse correspond au pompage de deux protons). Les indications sur les flèches correspondent aux changements observés au niveau du site actif. L'exposant correspond au nombre d'électrons transférés au site actif à partir de l'état O.

- Type B

Le cycle catalytique proposé pour les oxydases de type B a été déduit à partir d'expériences « flow-flash » sur la cytochrome ba_3 oxydase de *T. thermophilus* (Figure 1.10)^(50, 51, 65). Jusqu'à la formation de l'état P^3 , le mécanisme réactionnel est en tout point identique à celui observé pour les oxydases hème-cuivre de type A. Les différences majeures entre les deux cycles catalytiques interviennent au moment de l'implication du pompage de protons. En effet, la formation de l'état F^3 est liée au transfert d'électron entre le Cu_A et l'hème b et à l'assimilation de deux protons provenant du côté N. La première différence constatée par rapport aux oxydases de type A est que l'équilibre de la réaction de réduction de l'hème b favorise largement la réduction de ce dernier ; aussi, l'assimilation des deux protons engendre la liaison à un site d'ancrage de protons (SAH) dans un premier temps alors que le deuxième proton est utilisé pour la réduction de l'oxygène. La formation de l'état O^4 est corrélée au transfert d'un électron de l'hème a vers le site actif, à l'assimilation d'un proton provenant du

côté N servant à la réduction de l'oxygène et de l'éjection du proton lié au site d'ancrage. La régénération de l'état R^2 est obtenue de la même façon que pour les oxydases hème-cuivre de type A excepté qu'un seul proton est pompé à travers la membrane pour les oxydases de type B (2 pour les oxydases de type A).

Il est ici important de remarquer une différence mécanistique importante entre les oxydases de type A et celles de type B. En effet, pour les oxydases de type A, chaque transfert de proton chimique est lié à la translocation d'un proton à travers la membrane alors que pour les oxydases de type B, la plus faible stoechiométrie du pompage de proton est liée à un pompage en deux étapes entraînant la liaison à un site d'ancrage dans un premier temps avant le relargage du côté P de la membrane.

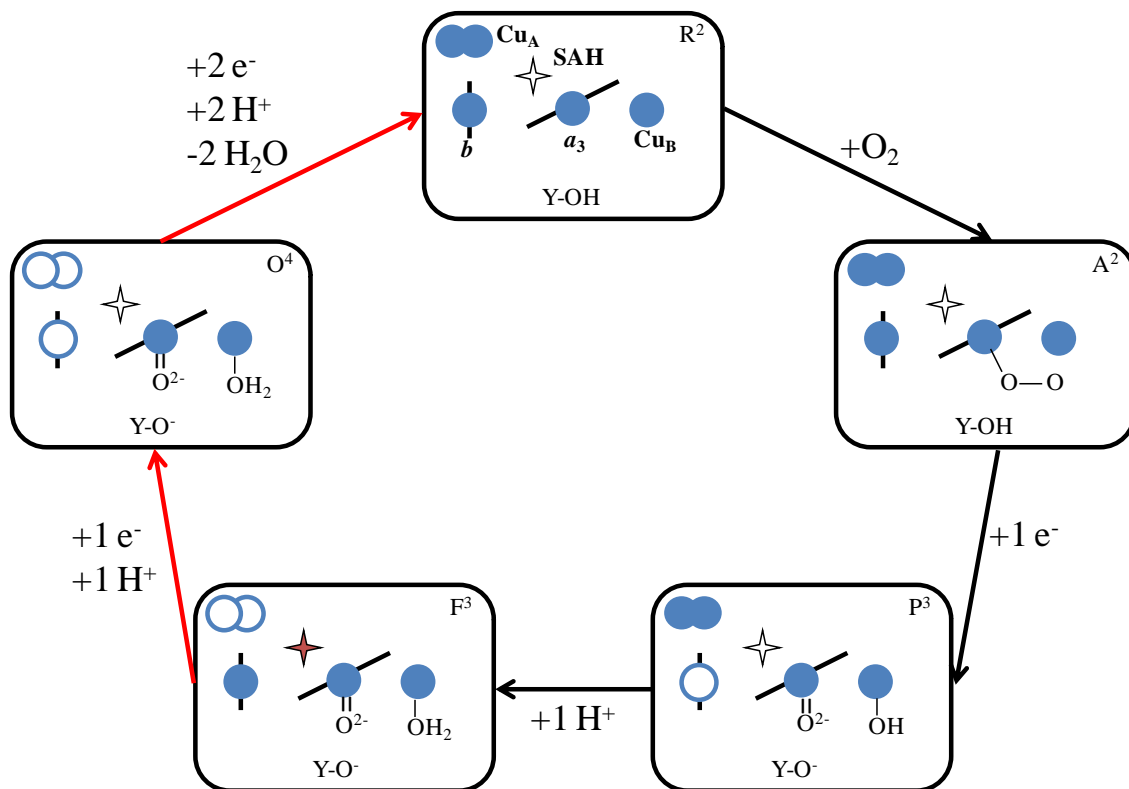


Figure 1.10 : Cycle catalytique de la cytochrome ba_3 oxydase à l'état réduit. Le site actif prend en compte la présence de la tyrosine. Les cercles bleus pleins correspondent aux cofacteurs à l'état réduit, les cercles vides à ceux à l'état oxydé. Les flèches rouges correspondent aux transitions impliquant un pompage de protons. L'étoile rouge correspond au site d'ancrage des protons dans la forme protonée. Les indications sur les flèches correspondent aux changements observés au niveau du site actif.

1.4.4. Transfert d'électrons et coopérativité

Une des grandes problématiques des oxydases terminales concerne le transfert d'électrons au sein de la protéine⁽⁶⁶⁾. En effet, même si le chemin de transfert d'électron est bien défini et suit un chemin en 2 étapes $\text{Cu}_A \rightarrow \text{Hème } a \rightarrow \text{Hème } a_3\text{-Cu}_B$ ⁽⁶⁷⁻⁷⁰⁾, des propriétés spectroscopiques particulières ont pu être observées lors de la titration électrochimique de la cytochrome aa_3 oxydase mitochondriale puisqu'elle résultait en une contribution de 50% de chaque cofacteur^(71, 72) au niveau de la bande $\Delta A(605\text{-}630 \text{ nm})$ alors que des contributions de l'ordre de 80% pour l'hème a et 20% pour l'hème a_3 étaient attendues⁽⁷³⁻⁷⁵⁾. Cette différence a dans un premier temps été expliquée comme une conséquence d'un changement de coefficient d'extinction molaire de l'hème a lorsqu'un ligand était coordonné à l'hème a_3 posant les prémices d'une interaction entre les hèmes⁽⁷⁶⁻⁷⁸⁾ (homocoopérativité).

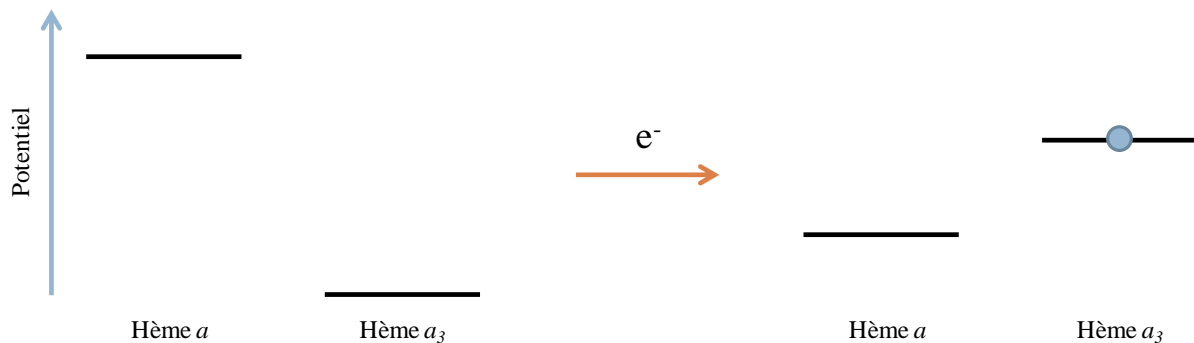


Figure 1.11: Représentation schématique du modèle de coopérativité proposé par Nicholls et Petersen en 1974.

Le modèle d'homocoopérativité le plus communément discuté dans la littérature est un modèle proposé par Nicholls et Petersen en 1974⁽⁷⁹⁾. Ce modèle a été proposé à partir de données expérimentales obtenues sur la cytochrome aa_3 oxydase mitochondriale et prend en compte une interaction homotropique à deux centres entre l'hème a et l'hème a_3 . Elle est basée sur l'idée que l'état d'oxydation d'un hème influe sur le potentiel de demi-vague de l'autre hème. D'un point de vue expérimental, ce modèle a été démontré à partir d'expériences spectroscopiques (UV-Visible) permettant de relier le pourcentage de réduction des différents hèmes en présence de différentes concentrations en oxygène et en présence de cytochrome c réduit. Il a été observé qu'à faible concentration en oxygène, une plus grande proportion d'hèmes a_3 était réduite par rapport à l'hème a . A haute concentration en oxygène, l'effet inverse était observé. Nicholls et Petersen ont donc proposé que l'état d'oxydation de l'hème a_3 contrôle le potentiel de demi-vague de l'hème a et que la cytochrome aa_3 oxydase est un système anticoopératif. Cela implique que la réduction de l'hème a rend la réduction de

l'hème a_3 plus difficile^(79, 80). Le défaut de ce modèle est qu'il ne prend pas en compte les interactions avec le centre Cu_B faisant partie du site actif.

Le modèle initial a donc été raffiné par Nicholls et Wrigglesworth en 1989 en utilisant un modèle d'interactions à trois centres incluant le Cu_B ⁽⁸¹⁾. Ce modèle décrit une diminution du potentiel de l'hème a et du Cu_B au cours de la réduction de la protéine. L'évolution du potentiel de l'hème a_3 est moins triviale puisqu'un potentiel très faible est décrit dans le cas de la protéine oxydée ; une augmentation du potentiel est observée lors de la réduction à un électron puis une diminution après ajout d'un deuxième électron. Cette description possède toujours un point faible puisqu'elle ne décrit pas la réoxydation de l'hème a_3 observé par certains groupes lors de titrations réductives entre 200 et 450 mV.

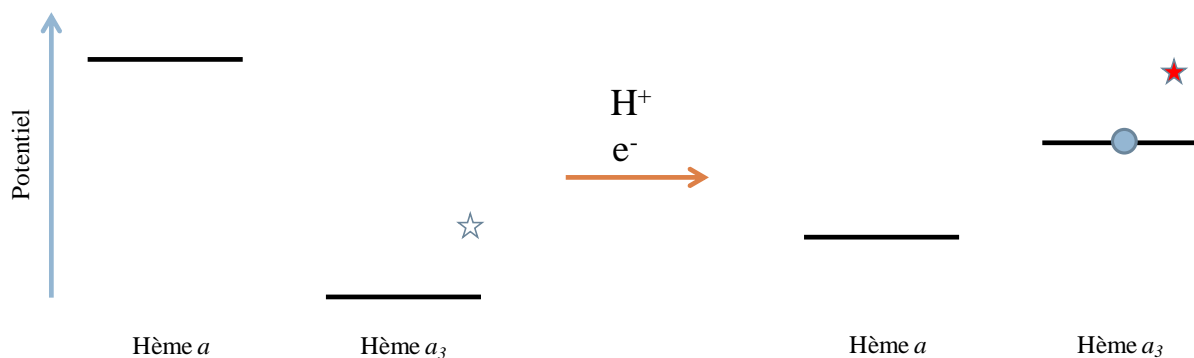


Figure 1.12 : Représentation schématique du modèle de coopérativité proposé par Verkhovsky en 1995.

Un autre type de coopérativité impliqué dans les oxydases hème-cuivre est l'hétérocoopérativité. Contrairement aux interactions homotropiques qui font intervenir les interactions entre les différents cofacteurs, les interactions hétérotropiques correspondent aux interactions entre les électrons et les protons. Cette coopérativité est basée sur le principe d'électroneutralité proposé par Mitchell et Rich qui stipule que la charge d'un électron doit être compensée par la charge d'un proton^(82, 83). Dans les oxydases terminales, ce mécanisme est souvent discuté comme provenant du couplage entre la réaction de réduction de l'oxygène et le pompage de protons. En 1995, Verkhovsky et al. ont proposé un mécanisme thermodynamique utilisant l'hétérocoopérativité⁽⁸⁴⁾. Ils ont montré que dans la forme oxydée de la protéine, les potentiels thermodynamiques relatifs des hèmes a et a_3 dans la cytochrome aa_3 oxydase de cœur de bœuf favorise la réduction de l'hème a mais que la réduction de l'hème a_3 n'était pas limitée cinétiquement par le transfert d'électron entre l'hème a et l'hème a_3 . Basé sur ces résultats et sur les résultats obtenus par Mitchell et al.⁽⁸²⁾ et Hallen et al.⁽⁸⁵⁾ où il a été montré que la réduction du site actif s'accompagnait de l'assimilation d'un proton au

niveau du site actif, il a été suggéré que l'inversion des potentiels thermodynamiques entre l'hème a et l'hème a_3 était opérée après le transfert d'un proton vers le site actif. Cette inversion de potentiel a pour conséquence de modifier les populations relatives des hèmes a et a_3 en favorisant la réduction de l'hème a_3 . L'étape cinétiquement limitante de ce processus est le transfert de proton vers le site actif.

D'autres études proposent également une hétérocoopérativité à l'origine du contrôle des potentiels thermodynamiques des centres Cu_A et hème a basée sur le changement de pK_A de deux résidus acido-basiques non identifiés⁽⁸⁶⁻⁸⁹⁾.

1.5. Le transfert d'électrons dans les protéines

1.5.1. La théorie de Marcus

La théorie de Marcus décrit la vitesse de transfert d'électron dans une paire donneur-accepteur en fonction de la distance entre le donneur et l'accepteur d'électrons, de l'énergie de réorganisation de la molécule au cours du transfert d'électrons λ et du changement d'énergie libre engendré par la réaction d'oxydoréduction ΔG^0 :

$$k_{ET} = \sqrt{\frac{4\pi^3}{h^2 \lambda k_B T}} H_{AB}^2 \exp\left[-\frac{(\lambda + \Delta G^0)^2}{4\lambda k_B T}\right]$$

où h , k_B et T représente respectivement la constante de Planck, la constante de Boltzmann et la température^(90, 91).

Cette équation compare deux termes :

- Un premier terme de couplage électronique entre le donneur et l'accepteur où H_{AB} correspond à la matrice de couplage électronique ; en d'autres termes, ce facteur représente la probabilité du transfert d'électrons entre le donneur et l'accepteur et est directement dépendant de la distance entre les deux entités.
- Un deuxième terme qui représente la balance énergétique entre l'énergie de réorganisation des atomes et l'énergie motrice libéré par le transfert d'électron.

Il est intéressant de constater que la vitesse de transfert d'électron est maximale lorsque $\lambda + \Delta G^0 = 0$ c'est-à-dire lorsque $\lambda = -\Delta G^0$. En clair, cela signifie que la vitesse maximale de transfert d'électron est atteinte lorsque l'énergie motrice libéré par le transfert d'électron

compense exactement l'énergie nécessaire à la réorganisation des atomes. Dans le cas où $-\Delta G^0 > \lambda$, la vitesse de transfert d'électrons est diminuée puisqu'il est nécessaire de dissiper l'énergie excédentaire pour favoriser le transfert d'électrons (région inverse de Marcus).

1.5.2. La théorie de la barrière uniforme

Le modèle de la barrière uniforme a été introduit par Moser et al. en 1992⁽⁹²⁾. Il démontre que la vitesse de transfert d'électrons entre un donneur et un accepteur d'électrons dans une protéine dépend uniquement de la distance entre les deux entités. Le squelette polypeptidique y est décrit comme une barrière isolante uniforme indépendante de la composition en acides aminés entre le donneur et l'accepteur. Cette théorie se base sur l'observation que la vitesse de transfert d'électrons intramoléculaire est bien plus importante que la vitesse de transfert d'électrons entre le substrat et la protéine (intermoléculaire). Moser et al. ont donc proposé que les protéines n'avaient pas besoin d'optimiser le chemin de transfert d'électron intramoléculaire et que la vitesse de transfert d'électrons était uniquement dépendante de la distance entre les cofacteurs d , de la force électromotrice ΔG^0 et de l'énergie de réorganisation de la protéine λ . La vitesse de transfert d'électrons à température ambiante a été définie comme suit⁽⁹³⁾ :

$$\log k_{ET} = 15 - 0.6(d - 3.6) - 3.1(\Delta G^0 + \lambda)^2/\lambda$$

Cependant, ce modèle ne prend pas en compte les variations de structures polypeptidiques permettant d'optimiser la vitesse de transfert d'électrons. C'est pourquoi Page et al.⁽⁹⁴⁾ ont raffiné ce modèle en rajoutant un terme prenant en compte la densité atomique de l'édifice polypeptidique ρ :

$$\log k_{ET}^{ex} = 13 - (1.2 - 0.8\rho)(d - 3.6) - 3.1(\Delta G^0 + \lambda)^2/\lambda$$

ρ est compris entre 0 et 1 en fonction de la structure atomique reliant les deux cofacteurs redox.

La théorie de la barrière uniforme stipule également que la nature a favorisé les structures protéiques de façon à ce que la distance maximale des relais d'électrons soit de 14Å ⁽⁹⁴⁾. Au-delà de cette distance, la vitesse de transfert d'électron est moins élevée et la flexibilité du système ne permet pas de compenser un facteur de façon à favoriser un transfert d'électron optimal (supérieur à la vitesse de transformation d'un substrat). C'est pourquoi dans la plupart

des cas, lorsque deux sites catalytiques sont séparés de plus de 14 Å, le transfert d'électrons se fait par l'intermédiaire de relais. Même si certaines étapes de ce transfert d'électrons sont endergoniques, des taux de transfert d'électrons de l'ordre de 10^7 s^{-1} ont pu être calculés dans certains cas. Page et al.⁽⁹⁴⁾ ont donc étendu le modèle de barrière uniforme aux transferts d'électrons endergoniques :

$$\log k_{ET}^{en} = 13 - (1.2 - 0.8\rho)(d - 3.6) - 3.1(-\Delta G^0 + \lambda)^2/\lambda - \Delta G^0/0.06$$

1.5.3. La théorie du chemin tunnel

La théorie du chemin tunnel a été proposée par Beratan et al. en 1987⁽⁹⁵⁾. Cette théorie a été proposée suite à des travaux de Gray et al.⁽⁹⁶⁾ où un complexe de ruthénium a été coordonné à une histidine à différentes positions sur différentes métalloprotéines. Ces différentes coordinations ont permis d'accumuler des vitesses de transfert d'électrons en fonction de la distance entre le complexe de ruthénium et le cofacteur redox. Ces travaux montrent que certains taux de transfert d'électrons dans les protéines ne peuvent pas être simplement expliqués par la distance entre le donneur et l'accepteur d'électron. Contrairement à la théorie de la barrière uniforme⁽⁹²⁾, celle-ci prend donc en compte les propriétés structurales du squelette polypeptidique entre le donneur et l'accepteur⁽⁹⁷⁾. Ce modèle inclut les interactions de type covalentes, les liaisons hydrogènes et les interactions à travers l'espace comme les interactions de Van der Waals. Pour chaque type d'interaction, une constante de couplage électronique est attribuée qui correspond à un facteur décrivant la diminution de la vitesse de transfert d'électron en fonction de la distance et est exprimé en Å⁻¹. Celle-ci est plus faible pour les interactions covalentes que pour les interactions à travers l'espace. Le développement d'un algorithme à partir de modèle permet de déterminer le chemin de transfert d'électron permettant d'obtenir une vitesse de transfert optimale.

Cette théorie conduit à des transferts d'électrons entre deux sites catalytiques séparés d'un maximum 25 Å⁽⁹⁸⁾.

1.5.4. La théorie du saut d'électron

La théorie du saut d'électron montre que les transferts d'électrons à longue distance peuvent être établis par une suite de transferts d'électrons à courte distance par l'intermédiaire de porteurs de charges⁽⁹⁹⁻¹⁰¹⁾. Cette théorie a été proposée par le groupe du Pr. Giese à partir de

travaux sur l'ADN⁽¹⁰²⁻¹⁰⁶⁾ et a par la suite pu être étendu aux protéines grâce à des travaux expérimentaux développés sur des systèmes modèles⁽¹⁰⁷⁾. Ces travaux ont montré l'importance de la structure secondaire⁽¹⁰⁸⁾, de la charge⁽¹⁰⁹⁾ et de la nature des acides aminés⁽¹¹⁰⁻¹¹³⁾ sur le taux de transfert d'électrons entre un donneur et un accepteur.

Contrairement aux deux théories précédentes, celle-ci ne possède pas une dépendance exponentielle par rapport à la distance puisque la vitesse du transfert d'électron est proportionnelle à la vitesse individuelle des sauts k_n et au nombre de sauts n ⁽⁹⁹⁾ :

$$k_{ET} \propto k_n n^{-\eta}$$

η est un facteur compris entre 1 et 2 traduisant la faculté de déplacement d'un porteur de charge ; plus la directionalité du porteur de charge est faible, plus la valeur de η est élevée et ralentit le transfert d'électrons⁽¹¹⁴⁾.

1.6. L'électrochimie des protéines

Beaucoup de protéines sont capables d'effectuer des réactions d'oxydoréduction. Ces protéines sont généralement en mesure de fixer un substrat et de le transformer par une réaction d'oxydoréduction. C'est pourquoi l'électrochimie est devenue un outil de premier choix dans l'étude de systèmes biologiques redox.

1.6.1. La difficulté de l'électrochimie des protéines

Une protéine effectuant des réactions d'oxydoréduction est majoritairement constituée de trois éléments :

- Le site catalytique où se passe la réaction d'oxydoréduction avec le substrat,
- Les relais d'électrons qui participent au transfert d'électrons vers le site actif,
- Le squelette polypeptidique qui constitue une barrière isolante.

L'électrochimie des protéines en solution est généralement difficile en raison de leur faible diffusion des protéines puisqu'il engendre une limitation par le transfert de masse^(115, 116). De plus, dans la plupart des cas, il faut faire face à la faible quantité d'échantillons disponibles. C'est pourquoi, il est intéressant des méthodes d'immobilisation permettant d'obtenir un transfert d'électron direct entre l'électrode et la protéine.

Cependant, une des difficultés à prendre en considération est la distance entre la surface de l'électrode et un cofacteur de la protéine (Figure 1.11). En effet, puisque les cofacteurs redox sont le plus souvent enfouis au cœur du squelette polypeptidique, il est difficile d'obtenir un transfert direct d'électrons entre la surface de l'électrode et la protéine^(115, 117, 118).

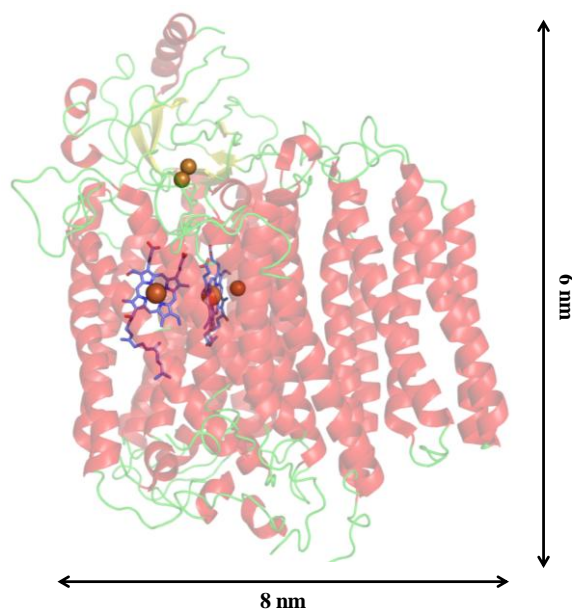


Figure 1.13 : La difficulté de l'électrochimie des protéines provient de leur taille. Le squelette peptidique isolant représente la plus grande proportion de la structure. La protéine illustrée pour l'exemple est la cytochrome aa_3 oxydase (PDB : 1QLE⁽¹¹⁹⁾).

La structure des protéines permet également de n'immobiliser que de faibles concentrations d'entités électrochimiquement actives à la surface. En conséquence, seul des signaux de faible intensité sont généralement observables.

Une autre difficulté de l'électrochimie des protéines provient du contrôle de l'orientation de la protéine puisqu'il s'agit d'un facteur primordial pour deux raisons. L'obtention d'une orientation correcte permet l'obtention d'un transfert d'électron direct entre l'enzyme et l'électrode. Il faut également veiller à obtenir une orientation homogène sur la surface modifiée puisque l'inhomogénéité des protéines à la surface peut provoquer un changement de l'allure des signaux les rendant difficile à interpréter^(115, 116, 118, 120-122).

En résumé, l'étude électrochimique des oxydases hème-cuivre passe par le développement d'une méthode permettant d'immobiliser une grande quantité de protéines sur une petite surface, dans une orientation homogène permettant le transfert direct d'électrons.

1.6.2. Transfert d'électron direct ou transfert d'électron médié ?

- Transfert d'électron direct

Le transfert d'électron direct implique un transfert d'électron entre un cofacteur de la protéine et l'électrode (Figure 1.12)^(123, 124). Ce type de transfert est difficile à obtenir compte-tenu de la distance entre les cofacteurs électrochimiquement actifs et la surface de l'électrode. Pour que le transfert puisse avoir lieu, la distance maximum entre la surface de l'électrode et le cofacteur de la protéine ne doit pas dépasser une quinzaine d'angströms. Dans la conception de biopiles et de biocapteurs utilisant ce type de transfert, la protéine joue le rôle d'électrocatalyseur facilitant le transfert d'électron entre l'électrode et un substrat donné sans ajout de médiateurs c'est-à-dire que le processus global menant à la réduction d'un substrat est catalysé par l'immobilisation d'une protéine pouvant effectuer une réduction spécifique à sa surface. Ce processus peut également être envisagé dans le cas d'une oxydation de substrat.

Les protéines les plus adaptées à ce type de transfert sont soit des petites protéines dont le cofacteur redox est facilement accessible, soit des systèmes qui possèdent un cofacteur en périphérie du squelette polypeptidique. Ce critère n'étant pas satisfait dans la plupart des cas, ce type de transfert est le plus difficile à mettre en œuvre.

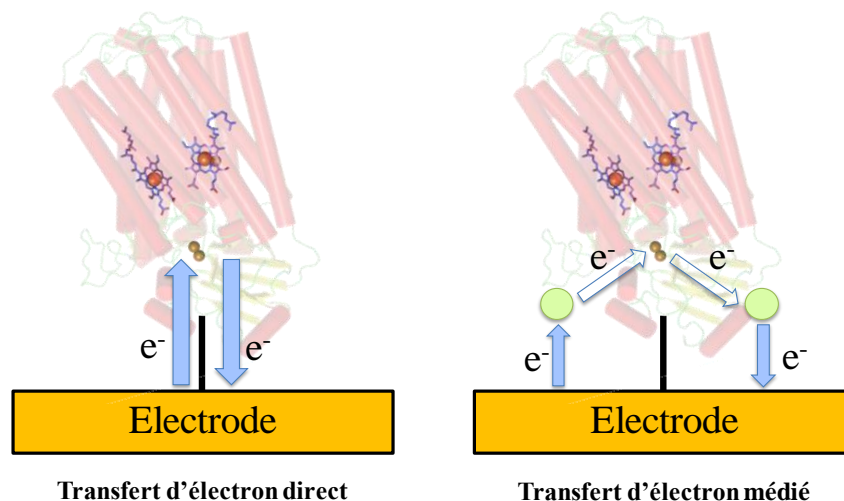


Figure 1.14 : Le transfert d'électron direct a lieu entre l'électrode et la protéine. Le transfert d'électron médié passe par un relais d'électron.

- Transfert d'électron médié

Le squelette polypeptidique représente une barrière cinétique au transfert d'électrons. C'est pourquoi l'établissement d'un lien entre le site actif d'une protéine et l'électrode passe par l'utilisation d'un médiateur (Figure 1.12). Les médiateurs sont généralement de petites molécules électrochimiquement actives permettant d'effectuer un transfert d'électrons réversible entre l'enzyme et la surface de l'électrode⁽¹²⁵⁾. Ces molécules peuvent être ajoutées dans la solution (le transport d'électron est donc régi par les phénomènes de diffusion) ou être co-immobilisés à la surface de l'électrode⁽¹²⁶⁾.

Le médiateur idéal doit répondre à plusieurs caractéristiques puisqu'il doit être stable aux conditions de travail utilisées, ne pas réagir avec d'autres espèces que le cofacteur de la protéine, avoir un potentiel thermodynamique adapté et avoir une cinétique de transfert d'électrons rapide.

1.6.3. Les méthodes d'immobilisation

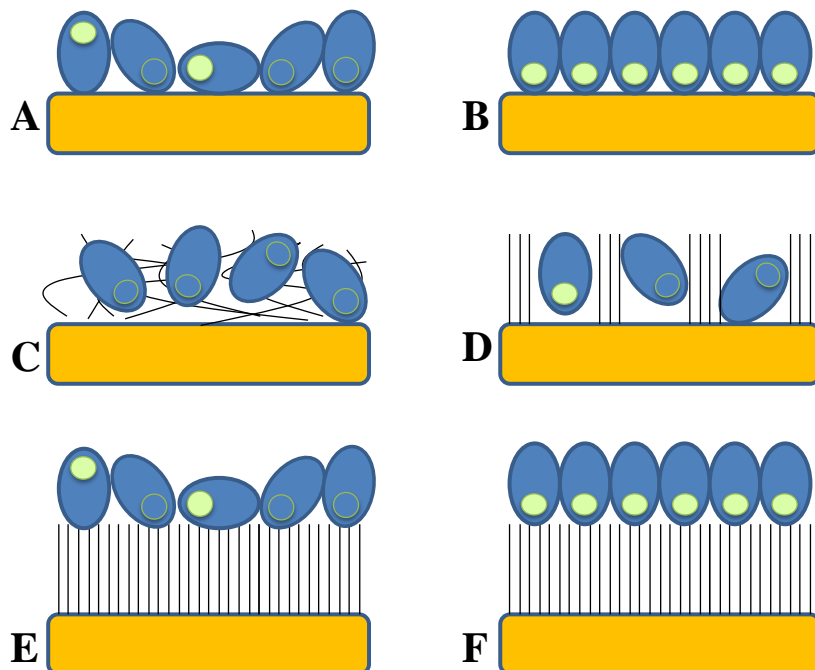


Figure 1.15 ; Différentes méthodes d'immobilisation de protéines sur une surface. (A) Adsorption physique (B) Attachement orienté à la surface (C) Piégeage dans une matrice de polymères conducteurs (D,E) Adsorption non orientée sur une monocouche auto-assemblée (F) Adsorption orientée sur une monocouche auto-assemblée. Inspirée de la référence⁽¹²⁷⁾.

1.6.3.1. *Adsorption physique*

La méthode la plus simple d'immobilisation d'une protéine est l'adsorption physique. Cette adsorption est effectuée directement à la surface de l'électrode. La nature de l'interaction entre la surface et l'enzyme dépend de la nature de l'enzyme et de la surface ; les enzymes présentant de larges domaines hydrophobes vont être immobilisées grâce à des interactions hydrophobes alors que les protéines solubles, qui présentent majoritairement des domaines hydrophiles, seront majoritairement adsorbées via des interactions électrostatiques. Cette méthode possède l'avantage d'être très simple à mettre en œuvre. Cependant, beaucoup d'inconvénients sont à prendre en compte :

- L'immobilisation d'enzymes sur une surface métallique peut induire la dénaturation en raison de la rupture de ponts disulfures nécessaire à la conservation de la structure de la protéine,
- L'immobilisation par simple adsorption physique est peu stable,
- L'orientation de la protéine n'est pas contrôlable et ne permet pas d'obtenir des résultats reproductibles.

1.6.3.2. *Attachement orienté à la surface d'un métal*

Cette méthode consiste à greffer une cystéine unique à la surface d'une protéine permettant la formation d'une liaison covalente entre un métal et la fonction thiol de la cystéine. Du fait de la présence d'une seule cystéine à la surface, l'orientation de la protéine est aisément estimable⁽¹²⁸⁾.

1.6.3.3. *Piégeage dans une matrice de polymères conducteurs*

Cette technique permet de piéger une grande quantité de protéines au sein d'une matrice conductrice. Cette technique possède l'avantage de limiter le phénomène de diffusion des enzymes et offre une grande stabilité^(129, 130). Ce type d'immobilisation possède néanmoins l'inconvénient de ne pas pouvoir contrôler l'orientation des protéines et dans les cas de réaction catalytique, la diffusion du substrat est ralenti dans la matrice de polymères.

1.6.3.4. Adsorption sur une surface métallique modifiée par une monocouche auto-assemblée

Dans ce type de modifications, deux catégories d'adsorption peuvent être distinguées en fonction de la structure de la protéine et de la modification⁽¹³¹⁾.

- L'adsorption non orientée

L'adsorption non orientée contient l'inclusion de protéines au sein d'une couche d'alcanethiols formant une structure de type membranaire⁽¹³²⁾. Ce type d'adsorption est essentiellement utilisé pour des protéines possédant de larges domaines hydrophobes.

L'adsorption non spécifique peut également impliquer des interactions électrostatiques entre les groupements chargés d'une protéine et la modification de surface adaptée à la charge présente à la surface du squelette polypeptidique. Ce type de fonctionnalisation entraîne une adsorption non spécifique et est souvent utilisé pour des systèmes solubles de faible masse moléculaire⁽¹³³⁾.

- L'adsorption orientée

L'adsorption orientée consiste en l'établissement d'une interaction entre la surface modifiée et la protéine. Cela implique que l'interaction entre la couche auto-assemblée et la protéine ne peut se faire qu'à un unique site de liaison.

Une première possibilité consiste à utiliser l'Histidine-Tag introduit sur certaines protéines pour faciliter leur extraction et purification⁽¹³⁴⁻¹³⁸⁾. Pour ce faire, une surface métallique est modifiée avec de l'acide nitriloacétique (ANTA). L'ajout de Ni^{2+} permet ensuite de former un complexe Ni-NTA. Une protéine modifiée avec un motif de six histidines consécutives à la partie N- ou C- terminale peut alors s'adsorber par affinité au complexe de nickel.

La deuxième possibilité d'obtenir une adsorption orientée a été mise au point par le groupe du Pr. Willner⁽¹³⁹⁻¹⁴²⁾. Elle a été développée sur la glucose déshydrogénase d'*E. coli* qui possède un cofacteur, la pyrroloquinoline quinone, localisé proche de la surface de la protéine. Le principe de cette méthode consiste à immobiliser de façon covalente le cofacteur de la protéine à la surface de l'électrode puis de reconstituer l'enzyme par dépôt de l'apoprotéine.

L'adsorption orientée possède l'avantage de pouvoir créer une monocouche de protéines adsorbée de façon stable avec une orientation bien déterminée. Cependant, cette méthode n'est exploitable qu'avec des protéines modifiées avec un His-Tag ou possédant un cofacteur à proximité de la surface de la protéine.

1.6.4. L'utilisation des nanoparticules d'or

L'utilisation des nanoparticules d'or est stimulée par la création de systèmes hybrides protéines-nanoparticules afin d'utiliser les propriétés électroniques des nanoparticules et de les combiner avec les propriétés catalytiques et la sélectivité des protéines redox^(140, 143, 144). Compte-tenu des difficultés engendrées par l'électrochimie des protéines, l'utilisation de nanoparticules d'or est une alternative (ou un complément) crédible aux méthodes d'immobilisation communément utilisées. En effet, les nanoparticules possèdent différentes avantages comme :

- Une bonne biocompatibilité permettant d'augmenter la durée de vie des protéines immobilisées à leur surface,
- Une grande surface spécifique favorisant l'adsorption d'une grande quantité de protéines à la surface,
- Leur conductivité leur permettant de se comporter comme des nanoélectrodes,
- Leur taille leur conférant un rôle de relais d'électron par la diminution de la distance vis-à-vis du centre actif.

En raison des différents avantages conférés par l'utilisation des nanoparticules d'or, ces nanomatériaux sont souvent utilisés pour augmenter la sensibilité des mesures dans les biocapteurs.

1.6.5. Les apports de la technique

1.6.5.1. *Les biocapteurs et les biopiles*

- Les biocapteurs

Le principe du biocapteur est de mesurer la concentration d'un analyte dans un échantillon^(145, 146). Ce dispositif doit répondre de façon continue et réversible sans interférences avec d'autres éléments présents dans l'échantillon à analyser. Les capteurs biochimiques sont

composés d'un transducteur recouvert d'une couche permettant la reconnaissance d'un analyte spécifique, typiquement une enzyme dans le cas d'un biocapteur. L'interaction entre l'enzyme et l'analyte à étudier produit un signal biochimique qui est traduit en signal chimique par le transducteur. Ce signal chimique peut ensuite être interprété pour obtenir la concentration en analyte recherchée.

L'intérêt de l'utilisation des enzymes pour des capteurs provient de leur importante sélectivité prévenant les risques d'interférences provoqués par la reconnaissance d'autres analytes.

Différents exemples de biocapteurs électrochimiques sont décrits dans la littérature. On peut notamment citer les capteurs à glucose⁽¹⁴⁷⁾ ou à ADN⁽¹⁴⁸⁾.

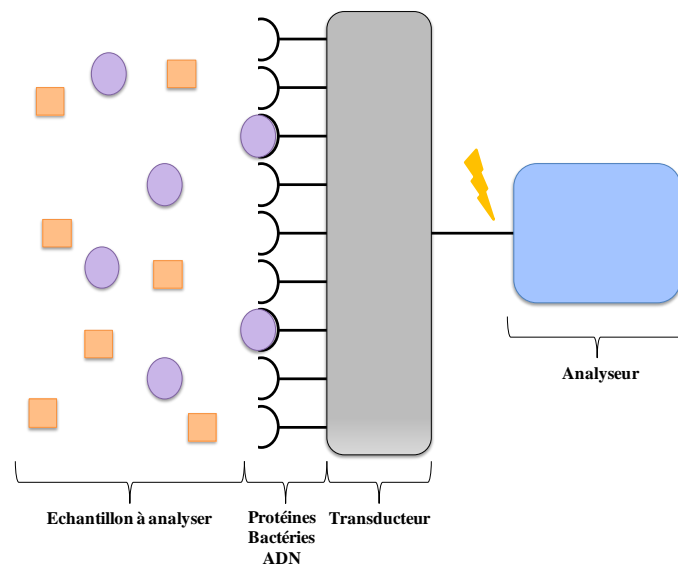


Figure 1.16 : Principe du biocapteur.

- Les biopiles à combustible

Les biopiles peuvent être divisées en deux catégories : les biopiles enzymatiques et les biopiles microbiennes^(124, 149). Le principe de fonctionnement est le même que celui des piles à combustibles « classiques » puisqu'un carburant est oxydé à l'anode et les électrons issus de cette réaction d'oxydation passe à travers un circuit externe pour atteindre la cathode où a lieu la réduction d'un oxydant.

Les biopiles à combustible possèdent l'avantage de pouvoir fonctionner avec de nouveaux types de carburants dépendant de l'enzyme utilisée et de pouvoir être produites à faible coût puisqu'elle ne nécessite pas de métaux nobles ni de membrane de séparation. Elles possèdent

cependant aussi deux inconvénients majeurs : leur puissance maximale de l'ordre de la μW et leur durée de vie qui excède rarement quelques jours.

Les enzymes couramment utilisées dans la conception des biopiles à combustibles sont la glucose oxydase⁽¹⁵⁰⁻¹⁵⁷⁾ ou la glucose déshydrogénase⁽¹⁵⁸⁾ à l'anode et la laccase^(156, 159), la microperoxydase^(150, 151) ou la bilirubine oxydase^(152-155, 157, 158) à la cathode.

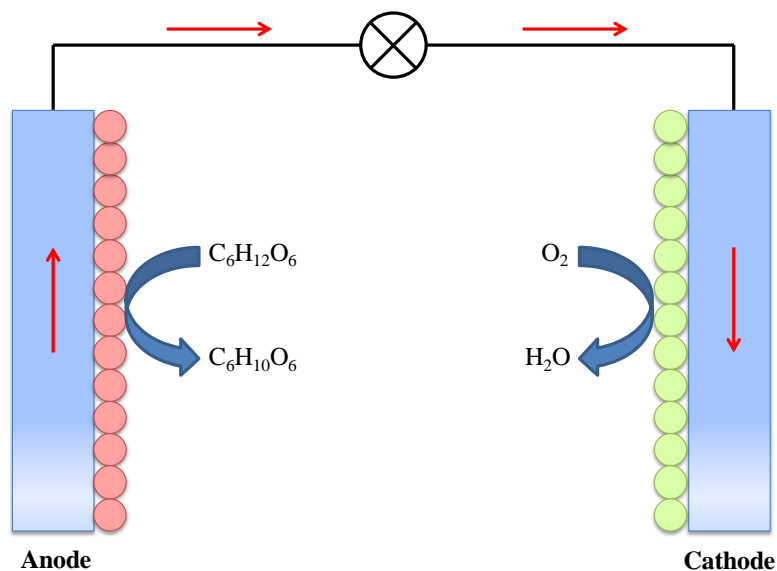


Figure 1.17 : Principe d'une biopile à combustible basée sur l'oxydation du glucose à l'anode et la réduction de l'oxygène à la cathode. Les flèches rouges représentent le trajet des électrons et les cercles rouges et verts représentent les protéines effectuant respectivement l'oxydation du glucose et la réduction de l'oxygène.

1.6.5.2. Les études mécanistiques

Les études mécanistiques d'enzymes par électrochimie directe des protéines ont pris leur essor avec le développement de méthodes d'immobilisation permettant le transfert d'électrons direct entre l'électrode et l'enzyme. Les techniques voltampérométriques permettent, en plus d'une étude en fonction du temps et de la concentration, d'ajouter la variable du potentiel électrique^(118, 120, 121, 160). Il en résulte qu'il devient possible d'étudier l'activité de l'enzyme en fonction du potentiel appliqué. Un point crucial rendant possible l'étude mécanistique des protéines concerne l'observation des propriétés intrinsèques de l'enzyme. Ce dernier point implique que le courant et/ou le potentiel observé ne doit être dépendant ni du transfert d'électron interfacial (qui correspond au transfert d'électron entre l'électrode et la protéine), ni de la diffusion du substrat (dans le cas d'observation de mécanismes catalytiques par exemple). La première limitation est dépassée par le contrôle de l'orientation de la protéine

sur la surface modifiée. Celle-ci doit permettre un transfert d'électron rapide entre l'électrode et la protéine et passe donc par le contrôle de la distance entre la surface de l'électrode et un cofacteur redox de la protéine. La deuxième limitation est généralement surmontée par l'utilisation d'une électrode tournante.

Dans le cas d'études mécanistiques, l'électrode est perçue comme un possible substrat de la protéine immobilisée et peut jouer le rôle d'accepteur ou de donneur d'électron. Deux types d'études sont envisageables concernant les études mécanistiques des protéines. Le premier type correspond aux études non-catalytiques alors que le deuxième type intègre les données catalytiques.

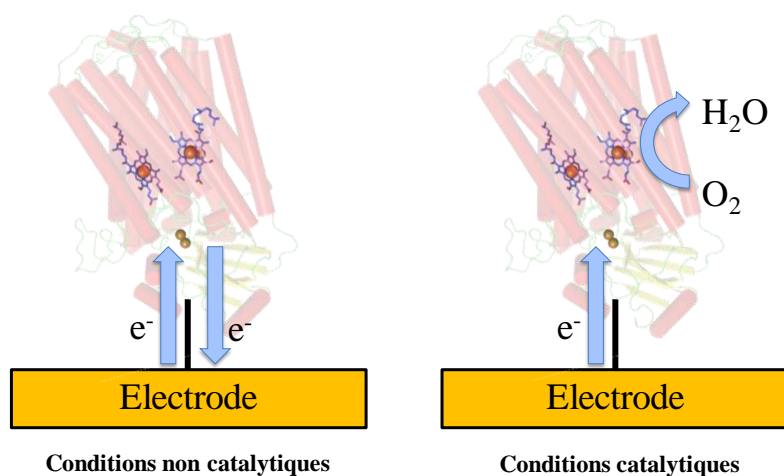


Figure 1.18 : Représentation schématique des évènements observés dans un système non catalytique et dans un système catalytique (exemple d'une oxydase).

Les études non catalytiques concernent des protéines redox catalysant ou non l'oxydoréduction d'un substrat. Dans ce dernier cas, les mesures sont effectuées en absence de substrat, en présence d'inhibiteur ou à une vitesse de balayage suffisamment élevée ne permettant pas à l'enzyme d'effectuer un cycle catalytique. Concernant l'étude des systèmes non catalytiques, les expériences voltampérométriques menées à faible vitesse de balayage conduisent généralement à l'obtention de pics réversibles. En théorie, si la vitesse de balayage choisie est suffisamment faible et que l'enzyme est immobilisée à la surface de l'électrode, la position des pics anodique et cathodique doit être identique et le potentiel formel du cofacteur sondé peut être déterminé par la moyenne de ces signaux.

Cette méthode permet de caractériser l'orientation de la protéine possédant plusieurs centres redox puisqu'elle permet l'obtention d'une « signature » (le potentiel formel) du cofacteur

impliqué dans l'échange d'électron. Cette technique permet également de déterminer la cinétique de transfert d'électron interfacial par l'utilisation de la théorie de Laviron⁽¹⁶¹⁾. Plus spécifiquement, les études en absence de substrat offrent l'accès à l'établissement d'interactions coopératives ou anticoopératives entre les cofacteurs grâce à l'exploitation de l'intensité du courant et de la largeur de pics à mi-hauteur.

Toutefois, ces études nécessitent une concentration surfacique en enzymes suffisante pour obtenir des signaux exploitables.

Les études catalytiques concernent l'observation de la réaction d'oxydoréduction électrocatalytique d'un substrat par une enzyme. Contrairement aux études en absence de substrat où des signaux de faible intensité sont observés, ces études impliquent l'apparition d'un signal sigmoïdal (si la mesure est faite avec une électrode tournante) de forte intensité et ne nécessitent donc pas une grande concentration surfacique d'enzymes. Le signal observé dans le cas d'un signal de réduction électrocatalytique correspond à la transmission des électrons de l'électrode vers le substrat par l'intermédiaire du site actif de l'enzyme (l'inverse est observé dans le cas d'une oxydation). L'étape du cycle catalytique observée est celle correspondant à l'étape cinétiquement déterminante et peut provenir soit du transfert d'électron interfacial, soit d'une étape de transfert d'électron intramoléculaire ou peut être liée directement au site actif (la diffusion du substrat est également à prendre en compte si une électrode tournante n'est pas utilisée). Il est donc nécessaire que la vitesse de transfert d'électron interfacial soit plus rapide que l'étape cinétiquement déterminante de l'enzyme afin que les propriétés électrocatalytiques sondées soient le reflet des propriétés enzymatiques.

Les études en présence de substrat permettent également d'accéder à des informations quant à certaines données thermodynamiques des enzymes comme la constante de Michaelis qui peut être obtenue en variant la concentration en substrat à vitesse de rotation d'électrode constante. De même, il est possible de mesurer des constantes d'inhibition (CI50 : concentration inhibitrice 50) en titrant l'enzyme à différentes concentrations en inhibiteur à concentration de substrat constante.

Des méthodes permettant de coupler les techniques électrochimiques à des techniques spectroscopiques d'étude de surface telles que la spectroscopie UV/Visible⁽¹⁶²⁾, Infrarouge^(135, 163, 164) ou Raman^(163, 165) ont également été mises au point par certains groupes afin de caractériser les changements observés au cours du transfert d'électron.

1.7. Buts de la thèse

Cette thèse vise à comprendre les facteurs qui régissent la réduction de l'oxygène au sein des oxydases hème-cuivre, notamment le transfert d'électrons et de protons. En effet, l'évolution de cette superfamille de protéines montre des différences notamment au niveau du nombre de chemins de protons et au niveau de l'affinité pour l'oxygène. Afin d'étudier ces systèmes, l'électrochimie directe sera exploitée. D'autre part, des méthodes spectroscopiques seront utilisées pour comprendre au niveau moléculaire les phénomènes observés. Ce travail se décompose donc en quatre parties :

1. Le développement de la méthode

L'étude du transfert d'électrons dans les oxydases terminales passe par le développement d'une méthode d'immobilisation permettant l'échange d'électrons entre l'électrode et la protéine mais aussi l'observation de la réaction de réduction de l'oxygène. La première partie sera dédiée au développement de la méthode avec l'immobilisation de la cytochrome b_0_3 oxydase. Ce chapitre visera à concevoir une méthode permettant l'immobilisation de cette famille de protéines et à caractériser la surface modifiée par spectroscopie et par électrochimie grâce à la modification de différents facteurs.

2. Etude comparative de plusieurs modes d'inhibition

Les oxydases terminales sont des protéines qui couplent la réduction de l'oxygène au pompage de protons à travers la membrane. La méthode d'immobilisation développée peut alors être utilisée afin d'étudier l'influence du transfert de protons et d'électrons sur la réaction de réduction de l'oxygène. Pour ce faire, des études en présence de CN^- (bloquant la coordination de l'oxygène au site actif) et en présence de zinc seront comparées (bloquant le transfert de protons). De même, des études de protéines mutées seront utilisées à des fins comparatives. Ces différentes données nous permettront de proposer une discussion autour des sites de coordination du zinc.

3. Comparaison de deux isoformes de la cytochrome cbb_3 oxydase

Les différentes techniques électrochimiques et spectroscopiques seront utilisées pour la comparaison de deux isoformes de la cytochrome cbb_3 oxydase. Ces deux isoformes sont exprimées par *P. stutzeri*. L'idée principale de ce projet consiste à comprendre pourquoi *P. stutzeri* exprime deux isoformes de cette oxydase. Plusieurs hypothèses peuvent être

envisagées comme une adaptation à différentes concentrations en oxygène ou à haute température. Ces propositions seront discutées grâce à des caractérisations électrochimiques et spectroscopiques permettant de mettre en avant d'éventuelles différences structurales, des différences mécanistiques et de stabilité thermique.

4. Comparaison des oxydases de trois types

Une comparaison par électrochimie directe entre les oxydases terminales de trois types sera effectuée. Cette étude portera sur la cytochrome *aa₃* oxydase de *P. denitrificans*, la cytochrome *ba₃* oxydase de *T. thermophilus* et la cytochrome *cbb₃* oxydase de *P. stutzeri*. La comparaison a pour but de comparer les stabilités thermiques de chaque enzyme ainsi que leur dépendance pH. Les oxydases hème-cuivre de chaque type sont caractérisées par des propriétés différentes en fonction de l'environnement dans lequel évolue l'organisme et peuvent donc présenter des thermostabilités ou des affinités pour l'oxygène différentes. C'est pourquoi des enzymes de chaque famille provenant d'organismes évoluant dans différents milieux sont choisies. L'étude de la dépendance pH est, quant à elle, motivée par la différence relative des potentiels thermodynamiques de l'hème relais d'électron par rapport à l'hème du site actif. L'influence de cette différence sur la réaction de réduction de l'oxygène sera étudiée. Des études par spectroscopie infrarouge couplée à l'électrochimie sur la cytochrome *ba₃* oxydase seront également réalisées en raison des propriétés thermodynamiques particulières des hèmes de cette enzyme. Des différences, notamment au niveau de l'état de protonation de certains résidus à proximité des cofacteurs, peuvent être envisagées.

1.8. Références

1. Saraste, M. (1999) Oxidative phosphorylation at the fin de siècle, *Science* 283, 1488-1493.
2. Mitchell, P. (1979) Keilin's respiratory chain concept and its chemiosmotic consequences, *Science (Washington, D. C.)* 206, 1148-1159.
3. Baradaran, R., Berrisford, J. M., Minhas, G. S., and Sazanov, L. A. (2013) Crystal structure of the entire respiratory complex I, *Nature (London, U. K.)* 494, 443-448.
4. Yankovskaya, V., Horsefield, R., Tornroth, S., Luna-Chavez, C., Miyoshi, H., Leger, C., Byrne, B., Cecchini, G., and Iwata, S. (2003) Architecture of succinate dehydrogenase and reactive oxygen species generation, *Science* 299, 700-704.
5. 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 bc1: Comparison with its Mitochondrial and Chloroplast Counterparts, *Photosynth. Res.* 81, 251-275.
6. Koepke, J., Olkhova, E., Angerer, H., Müller, H., Peng, G., and Michel, H. (2009) High resolution crystal structure of Paracoccus denitrificans cytochrome c oxidase: New insights into the active site and the proton transfer pathways, *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* 1787, 635-645.
7. Stock, D., Leslie, A. G. W., and Walker, J. E. (1999) Molecular architecture of the rotary motor in ATP synthase, *Science (Washington, D. C.)* 286, 1700-1705.
8. Richardson, D. J. (2000) Bacterial respiration: a flexible process for a changing environment, *Microbiology (Reading, U. K.)* 146, 551-571.
9. Friedrich, T. (2014) On the mechanism of respiratory complex I, *J. Bioenerg. Biomembr.* 46, 255-268.
10. Sazanov, L. A. (2014) The mechanism of coupling between electron transfer and proton translocation in respiratory complex I, *J. Bioenerg. Biomembr.* 46, 247-253.
11. Sazanov, L. A., and Hinchliffe, P. (2006) Structure of the hydrophilic domain of respiratory complex I from Thermus thermophilus, *Science (Washington, DC, U. S.)* 311, 1430-1436.
12. Efremov, R. G., and Sazanov, L. A. (2011) Structure of the membrane domain of respiratory complex I, *Nature (London, U. K.)* 476, 414-420.
13. Cecchini, G. (2003) Function and structure of complex II of the respiratory chain, *Annu. Rev. Biochem.* 72, 77-109.
14. Maklashina, E., Cecchini, G., and Dikanov, S. A. (2013) Defining a direction: Electron transfer and catalysis in Escherichia coli complex II enzymes, *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* 1827, 668-678.
15. Cecchini, G. (2013) Respiratory complex II: Role in cellular physiology and disease, *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* 1827, 541-542.
16. Lancaster, C. R. D. (2013) The di-heme family of respiratory complex II enzymes, *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* 1827, 679-687.
17. 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.
18. Berry, E. A., Guergova-Kuras, M., Huang, L.-S., and Crofts, A. R. (2000) Structure and function of cytochrome bc complexes, *Annu. Rev. Biochem.* 69, 1005-1075.
19. Crofts, A. R. (2004) The cytochrome bc1 complex: Function in the context of structure, *Annu. Rev. Physiol.* 66, 689-733, 684 plates.

20. Voet, D., Voet, J. G., and Pratt, C. W. (2011) *Fundamentals of Biochemistry: Life at the Molecular Level, 4th Edition: Life at the Molecular Level*, Wiley Global Education.
21. Michel, H., Behr, J., Harrenga, A., and Kannt, A. (1998) Cytochrome c oxidase: structure and spectroscopy, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 27, 329-356.
22. Branden, G., Gennis, R. B., and Brzezinski, P. (2006) Transmembrane proton translocation by cytochrome c oxidase, *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* 1757, 1052-1063.
23. Wikstrom, M. (2004) Cytochrome c oxidase: 25 years of the elusive proton pump, *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* 1655, 241-247.
24. Babcock, G. T., and Wikstrom, M. (1992) Oxygen activation and the conservation of energy in cell respiration, *Nature (London)* 356, 301-309.
25. Walker, J. E. (2013) The ATP synthase: the understood, the uncertain and the unknown, *Biochem. Soc. Trans.* 41, 1-16.
26. Boyer, P. D. (1993) The binding change mechanism for ATP synthase - Some probabilities and possibilities, *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* 1140, 215-250.
27. Boyer, P. D. (1997) The ATP synthase - a splendid molecular machine, *Annu. Rev. Biochem.* 66, 717-749.
28. Boyer, P. D. (1998) ATP synthase-past and future, *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* 1365, 3-9.
29. Stock, D., Gibbons, C., Arechaga, I., Leslie, A. G. W., and Walker, J. E. (2000) The rotary mechanism of ATP synthase, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 10, 672-679.
30. Gribaldo, S., Talla, E., and Brochier-Armanet, C. (2009) Evolution of the heme copper oxidases superfamily: a rooting tale, *Trends Biochem. Sci.* 34, 375-381.
31. Saraste, M., and Castresana, J. (1994) Cytochrome oxidase evolved by tinkering with denitrification enzymes, *FEBS Lett.* 341, 1-4.
32. Ducluzeau, A.-L., van Lis, R., Duval, S., Schoepp-Cothenet, B., Russell, M. J., and Nitschke, W. (2009) Was nitric oxide the first deep electron sink?, *Trends Biochem. Sci.* 34, 9-15.
33. Castresana, J., Luebben, M., Saraste, M., and Higgins, D. G. (1994) Evolution of cytochrome oxidase, an enzyme older than atmospheric oxygen, *EMBO J.* 13, 2516-2525.
34. Radzi, N. M., and Soulimane, T. (2012) Bioenergetics at extreme temperature: *Thermus thermophilus* ba3- and caa3-type cytochrome c oxidases, *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* 1817, 638-649.
35. Pereira, M. M., Santana, M., and Teixeira, M. (2001) A novel scenario for the evolution of heme-copper oxygen reductases, *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* 1505, 185-208.
36. Sousa, F. L., Alves, R. J., Ribeiro, M. A., Pereira-Leal, J. B., Teixeira, M., and Pereira, M. M. (2012) The superfamily of heme-copper oxygen reductases: Types and evolutionary considerations, *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* 1817, 629-637.
37. 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.
38. Buschmann, S., Warkentin, E., Xie, H., Langer, J. D., Ermler, U., and Michel, H. (2010) The structure of cbb3 cytochrome oxidase provides insights into proton pumping, *Science* 329, 327-330.
39. Iwata, S., Ostermeier, C., Ludwig, B., and Michel, H. (1995) Structure at 2.8 Å resolution of cytochrome c oxidase from *Paracoccus denitrificans*, *Nature* 376, 660-669.

40. Rice, C. W., and Hempfling, W. P. (1978) Oxygen-limited continuous culture and respiratory energy conservation in *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.* *134*, 115-124.
41. Morris, R. L., and Schmidt, T. M. (2013) Shallow breathing: bacterial life at low O₂, *Nat. Rev. Microbiol.* *11*, 205-212.
42. Lee, H. J., Reimann, J., Huang, Y., and Adelroth, P. (2011) Functional proton transfer pathways in the heme-copper oxidase superfamily, *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* *1817*, 537-544.
43. Fetter, J. R., Qian, J., Shapleigh, J., Thomas, J. W., Garcia-Horsman, A., Schmidt, E., Hosler, J., Babcock, G. T., Gennis, R. B., and Ferguson-Miller, S. (1995) Possible proton relay pathways in cytochrome c oxidase, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *92*, 1604-1608.
44. Brzezinski, P., and Adelroth, P. (1998) Pathways of proton transfer in cytochrome c oxidase, *J. Bioenerg. Biomembr.* *30*, 99-107.
45. Pfitzner, U., Odenwald, A., Ostermann, T., Weingard, L., Ludwig, B., and Richter, O.-M. H. (1998) Cytochrome c oxidase (heme aa₃) from *Paracoccus denitrificans*: analysis of mutations in putative proton channels of subunit I, *J. Bioenerg. Biomembr.* *30*, 89-97.
46. Pereira, M. M., and Teixeira, M. (2004) Proton pathways, ligand binding and dynamics of the catalytic site in heme-copper oxygen reductases: a comparison between the three families, *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* *1655*, 340-346.
47. 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, S16169/16161-S16169/16120.
48. Chang, H.-Y., Choi, S. K., Vakkasoglu, A. S., Chen, Y., Hemp, J., Fee, J. A., and Gennis, R. B. (2012) Exploring the proton pump and exit pathway for pumped protons in cytochrome ba₃ from *Thermus thermophilus*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, 5259-5264, S5259/5251-S5259/5255.
49. 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.
50. Smirnova, I., Zaslavsky, D., Fee, J., Gennis, R., and Brzezinski, P. (2008) Electron and proton transfer in the ba₃ oxidase from *Thermus thermophilus*, *J. Bioenerg. Biomembr.* *40*, 281-287.
51. von Ballmoos, C., Adelroth, P., Gennis, R. B., and Brzezinski, P. (2012) Proton transfer in ba₃ cytochrome c oxidase from *Thermus thermophilus*, *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* *1817*, 650-657.
52. von Ballmoos, C., Gennis, R. B., Adelroth, P., and Brzezinski, P. (2011) Kinetic design of the respiratory oxidases, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 11057-11062.
53. Preisig, O., Zufferey, R., Thoeny-Meyer, L., Appleby, C. A., and Hennecke, H. (1996) A high-affinity cbb₃-type cytochrome oxidase terminates the symbiosis-specific respiratory chain of *Bradyrhizobium japonicum*, *J. Bacteriol.* *178*, 1532-1538.
54. Ferguson-Miller, S., and Babcock, G. T. (1996) Heme/Copper Terminal Oxidases, *Chem. Rev. (Washington, D. C.)* *96*, 2889-2907.
55. Gibson, Q. H., and Greenwood, C. (1963) Reactions of cytochrome oxidase with oxygen and carbon monoxide, *Biochem. J.* *86*, 541-554.
56. Michel, H. (1999) Cytochrome c Oxidase: Catalytic Cycle and Mechanisms of Proton Pumping-A Discussion, *Biochemistry* *38*, 15129-15140.

57. Bloch, D., Belevich, I., Jasaitis, A., Ribacka, C., Puustinen, A., Verkhovsky, M. I., and Wikstroem, M. (2004) The catalytic cycle of cytochrome c oxidase is not the sum of its two halves, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 529-533.
58. Konstantinov, A. A. (2012) Cytochrome c oxidase: Intermediates of the catalytic cycle and their energy-coupled interconversion, *FEBS Lett.* 586, 630-639.
59. Wikstrom, M., and Verkhovsky, M. I. (2002) Proton translocation by cytochrome c oxidase in different phases of the catalytic cycle, *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* 1555, 128-132.
60. Ruitenberg, M., Kannt, A., Bamberg, E., Fendler, K., and Michel, H. (2002) Reduction of cytochrome c oxidase by a second electron leads to proton translocation, *Nature* 417, 99-102.
61. Faxen, K., Gilderson, G., Adelroth, P., and Brzezinski, P. (2005) A mechanistic principle for proton pumping by cytochrome c oxidase, *Nature* 437, 286-289.
62. Belevich, I., Verkhovsky, M. I., and Wikstroem, M. (2006) Proton-coupled electron transfer drives the proton pump of cytochrome c oxidase, *Nature* 440, 829-832.
63. Wikstrom, M., Jasaitis, A., Backgren, C., Puustinen, A., and Verkhovsky, M. I. (2000) The role of the D- and K-pathways of proton transfer in the function of the haem-copper oxidases, *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* 1459, 514-520.
64. Ruitenberg, M., Kannt, A., Bamberg, E., Ludwig, B., Michel, H., and Fendler, K. (2000) Single-electron reduction of the oxidized state is coupled to proton uptake via the K pathway in *Paracoccus denitrificans* cytochrome c oxidase, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 4632-4636.
65. von Ballmoos, C., Lachmann, P., Gennis, R. B., Adelroth, P., and Brzezinski, P. (2012) Timing of electron and proton transfer in the ba3 cytochrome c oxidase from *Thermus thermophilus*, *Biochemistry* 51, 4507-4517.
66. Hendler, R. W., and Westerhoff, H. V. (1992) Redox interactions in cytochrome c oxidase: from the "neoclassical" toward "modern" models, *Biophys J* 63, 1586-1604.
67. Hill, B. C. (1991) The reaction of the electrostatic cytochrome c-cytochrome oxidase complex with oxygen, *J. Biol. Chem.* 266, 2219-2226.
68. Hill, B. C. (1994) Modeling the sequence of electron transfer reactions in the single turnover of reduced, mammalian cytochrome c oxidase with oxygen, *J. Biol. Chem.* 269, 2419-2425.
69. Lucas, M. F., Rousseau, D. L., and Guallar, V. (2011) Electron transfer pathways in cytochrome c oxidase, *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* 1807, 1305-1313.
70. Medvedev, D. M., Daizadeh, I., and Stuchebrukhov, A. A. (2000) Electron Transfer Tunneling Pathways in Bovine Heart Cytochrome c Oxidase, *J. Am. Chem. Soc.* 122, 6571-6582.
71. Tsudzuki, T., and Wilson, D. F. (1971) The oxidation-reduction potentials of the hemes and copper of cytochrome oxidase from beef heart, *Arch Biochem Biophys* 145, 149-154.
72. Wilson, D. F., and Dutton, P. L. (1970) The oxidation-reduction potentials of cytochromes a and a3 in intact rat liver mitochondria, *Arch Biochem Biophys* 136, 583-585.
73. Vanneste, W. (1966) The stoichiometry and absorption spectra of components a and a3 in cytochrome c oxidase, *Biochemistry* 5, 838-848.
74. Yonetani, T. (1960) Cytochrome oxidase. I. Absolute and difference absorption spectra, *J. Biol. Chem.* 235, 845-852.
75. Horie, S., and Morrison, M. (1963) Cytochrome c oxidase components. III. Spectral properties of cytochromes a and a3, *J. Biol. Chem.* 238, 2859-2865.

76. Wilson, D. F., Lindsay, J. G., and Brocklehurst, E. S. (1972) Heme-heme interaction in cytochrome oxidase, *Biochim Biophys Acta* 256, 277-286.
77. Leigh, J. S., Jr., Wilson, D. F., Owen, C. S., and King, T. E. (1974) Heme-heme interaction in cytochrome c oxidase: the cooperativity of the hemes of cytochrome c oxidase as evidenced in the reaction with CO, *Arch Biochem Biophys* 160, 476-486.
78. Wilson, D. F., and Leigh, J. S. (1974) Heme-heme interaction between the cytochromes of the mitochondrial respiratory chain, *Ann N Y Acad Sci* 227, 630-635.
79. Nicholls, P., and Petersen, L. C. (1974) Haem-haem interactions in cytochrome aa3 during the anaerobic-aerobic transition, *Biochim Biophys Acta* 357, 462-467.
80. Wikstrom, M. K. F., Harmon, H. J., Ingledew, W. J., and Chance, B. (1976) A re-evaluation of the spectral, potentiometric and energy-linked properties of cytochrome c oxidase in mitochondria, *FEBS Lett.* 65, 259-277.
81. Nicholls, P., and Wrigglesworth, J. M. (1988) Routes of cytochrome a3 reduction. The neoclassical model revisited, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 550, 59-67.
82. Mitchell, R., and Rich, P. R. (1994) Proton uptake by cytochrome c oxidase on reduction and on ligand binding, *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* 1186, 19-26.
83. Rich, P. R. (1995) Towards an understanding of the chemistry of oxygen reduction and proton translocation in the iron-copper respiratory oxidases, *Aust. J. Plant Physiol.* 22, 479-486.
84. 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.
85. Hallen, S., Brzezinski, P., and Malmstroem, B. G. (1994) Internal Electron Transfer in Cytochrome c Oxidase Is Coupled to the Protonation of a Group Close to the Bimetallic Site, *Biochemistry* 33, 1467-1472.
86. Capitanio, N., Capitanio, G., Minuto, M., De Nitto, E., Palese, L. L., Nicholls, P., and Papa, S. (2000) Coupling of Electron Transfer with Proton Transfer at Heme a and CuA (Redox Bohr Effects) in Cytochrome c Oxidase. Studies with the Carbon Monoxide Inhibited Enzyme, *Biochemistry* 39, 6373-6379.
87. Capitanio, N., Capitanio, G., Boffoli, D., and Papa, S. (2000) The Proton/Electron Coupling Ratio at Heme a and CuA in Bovine Heart Cytochrome c Oxidase, *Biochemistry* 39, 15454-15461.
88. Papa, S., Capitanio, N., Capitanio, G., and Palese, L. L. (2004) Protonmotive cooperativity in cytochrome c oxidase, *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* 1658, 95-105.
89. Papa, S., Capitanio, G., and Luca, M. P. (2006) Concerted involvement of cooperative proton-electron linkage and water production in the proton pump of cytochrome c oxidase, *Biochim Biophys Acta* 1757, 1133-1143.
90. Marcus, R. A. (1956) The theory of oxidation-reduction reactions involving electron transfer. I, *J. Chem. Phys.* 24, 966-978.
91. Marcus, R. A., and Sutin, N. (1985) Electron transfers in chemistry and biology, *Biochim. Biophys. Acta, Rev. Bioenerg.* 811, 265-322.
92. Moser, C. C., Keske, J. M., Warncke, K., Farid, R. S., and Dutton, P. L. (1992) Nature of biological electron transfer, *Nature (London)* 355, 796-802.
93. Moser, C. C., and Dutton, P. L. (1992) Engineering protein structure for electron transfer function in photosynthetic reaction centers, *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* 1101, 171-176.
94. Page, C. C., Moser, C. C., Chen, X., and Dutton, P. L. (1999) Natural engineering principles of electron tunneling in biological oxidation-reduction, *Nature (London)* 402, 47-52.

95. Beratan, D. N., Onuchic, J. N., and Hopfield, J. J. (1987) Electron tunneling covalent and noncovalent pathways in proteins, *J. Chem. Phys.* *86*, 4488-4498.
96. Gray, H. B., and Winkler, J. R. (2003) Electron tunneling through proteins, *Q. Rev. Biophys.* *36*, 341-372.
97. Winkler, J. R. (2000) Electron tunneling pathways in proteins, *Curr. Opin. Chem. Biol.* *4*, 192-198.
98. Winkler, J. R., and Gray, H. B. (2014) Electron flow through metalloproteins, *Chem. Rev. (Washington, DC, U. S.)* *114*, 3369-3380.
99. Cordes, M., and Giese, B. (2009) Electron transfer in peptides and proteins, *Chem. Soc. Rev.* *38*, 892-901.
100. Giese, B., Kracht, S., and Cordes, M. (2013) The search for relay stations. Long-distance electron transfer in peptides, *Chimia* *67*, 855-858.
101. Giese, B., Graber, M., and Cordes, M. (2008) Electron transfer in peptides and proteins, *Curr. Opin. Chem. Biol.* *12*, 755-759.
102. Meggers, E., Michel-Beyerle, M. E., and Giese, B. (1998) Sequence Dependent Long Range Hole Transport in DNA, *J. Am. Chem. Soc.* *120*, 12950-12955.
103. Giese, B., Wessely, S., Spormann, M., Lindemann, U., Meggers, E., and Michel-Beyerle, M. E. (1999) On the mechanism of long-range electron transfer through DNA, *Angew. Chem., Int. Ed.* *38*, 996-998.
104. Giese, B. (2002) Electron transfer in DNA, *Curr. Opin. Chem. Biol.* *6*, 612-618.
105. Giese, B. (2006) Electron transfer through DNA and peptides, *Bioorg. Med. Chem.* *14*, 6139-6143.
106. Giese, B., Amaudrut, J., Kohler, A.-K., Spormann, M., and Wessely, S. (2001) Direct observation of hole transfer through DNA by hopping between adenine bases and by tunnelling, *Nature (London, U. K.)* *412*, 318-320.
107. Cordes, M., Jacques, O., Kottgen, A., Jasper, C., Boudebous, H., and Giese, B. (2008) Development of a model system for the study of long distance electron transfer in peptides, *Adv. Synth. Catal.* *350*, 1053-1062.
108. Lauz, M., Eckhardt, S., Fromm, K. M., and Giese, B. (2012) The influence of dipole moments on the mechanism of electron transfer through helical peptides, *Phys. Chem. Chem. Phys.* *14*, 13785-13788.
109. Gao, J., Mueller, P., Wang, M., Eckhardt, S., Lauz, M., Fromm, K. M., and Giese, B. (2011) Electron Transfer in Peptides: The Influence of Charged Amino Acids, *Angew. Chem., Int. Ed.* *50*, 1926-1930, S1926/1921-S1926/1920.
110. Wang, M., Gao, J., Muller, P., and Giese, B. (2009) Electron Transfer in Peptides with Cysteine and Methionine as Relay Amino Acids, *Angew. Chem., Int. Ed.* *48*, 4232-4234, S4232/4231-S4232/4212.
111. Cordes, M., Kottgen, A., Jasper, C., Jacques, O., Boudebous, H., and Giese, B. (2008) Influence of amino acid side chains on long-distance electron transfer in peptides: electron hopping via "Stepping stones", *Angew. Chem., Int. Ed.* *47*, 3461-3463.
112. Shih, C., Museth, A. K., Abrahamsson, M., Blanco-Rodriguez, A. M., Di Bilio, A. J., Sudhamsu, J., Crane, B. R., Ronayne, K. L., Towrie, M., Vlcek, A., Jr., Richards, J. H., Winkler, J. R., and Gray, H. B. (2008) Tryptophan-Accelerated Electron Flow Through Proteins, *Science (Washington, DC, U. S.)* *320*, 1760-1762.
113. Warren, J. J., Winkler, J. R., and Gray, H. B. (2012) Redox properties of tyrosine and related molecules, *FEBS Lett.* *586*, 596-602.
114. Jortner, J., Bixon, M., Langenbacher, T., and Michel-Beyerle, M. E. (1998) Charge transfer and transport in DNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *95*, 12759-12765.
115. Armstrong, F. A. (1990) Probing metalloproteins by voltammetry, *Struct. Bonding (Berlin)* *72*, 137-221.

116. Armstrong, F. A. (2002) Insights from protein film voltammetry into mechanisms of complex biological electron-transfer reactions, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 661-671.
117. Hirst, J., Sucheta, A., Ackrell, B. A. C., and Armstrong, F. A. (1996) Electrocatalytic Voltammetry of Succinate Dehydrogenase: Direct Quantification of the Catalytic Properties of a Complex Electron-Transport Enzyme, *J. Am. Chem. Soc.* *118*, 5031-5038.
118. Léger, C., Elliott, S. J., Hoke, K. R., Jeuken, L. J. C., Jones, A. K., and Armstrong, F. A. (2003) Enzyme Electrokinetics: Using Protein Film Voltammetry To Investigate Redox Enzymes and Their Mechanisms, *Biochemistry* *42*, 8653-8662.
119. Harrenga, A., and Michel, H. (1999) The cytochrome c oxidase from *Paracoccus denitrificans* does not change the metal center ligation upon reduction, *J. Biol. Chem.* *274*, 33296-33299.
120. Butt, J. N., and Armstrong, F. A. (2008) Voltammetry of adsorbed redox enzymes: mechanisms in the potential dimension, pp 91-128, Springer.
121. Leger, C., and Bertrand, P. (2008) Direct Electrochemistry of Redox Enzymes as a Tool for Mechanistic Studies, *Chem. Rev.* *108*, 2379-2438.
122. Leger, C., Jones, A. K., Albracht, S. P. J., and Armstrong, F. A. (2002) Effect of a Dispersion of Interfacial Electron Transfer Rates on Steady State Catalytic Electron Transport in [NiFe]-hydrogenase and Other Enzymes, *J. Phys. Chem. B* *106*, 13058-13063.
123. Ghindilis, A. L., Atanasov, P., and Wilkins, E. (1997) Enzyme-catalyzed direct electron transfer. Fundamentals and analytical applications, *Electroanalysis* *9*, 661-674.
124. Barton, S. C., Gallaway, J., and Atanassov, P. (2004) Enzymatic biofuel cells for implantable and microscale devices, *Chem. Rev. (Washington, DC, U. S.)* *104*, 4867-4886.
125. Bartlett, P. N., Tebbutt, P., and Whitaker, R. G. (1991) Kinetic aspects of the use of modified electrodes and mediators in bioelectrochemistry, *Prog. React. Kinet.* *16*, 55-155.
126. Willner, I., and Katz, E. (2000) Integration of layered redox proteins and conductive supports for bioelectronic applications, *Angew. Chem., Int. Ed.* *39*, 1181-1218.
127. Gilardi, G., and Fantuzzi, A. (2001) Manipulating redox systems: application to nanotechnology, *Trends Biotechnol.* *19*, 468-476.
128. Chi, Q., Zhang, J., Nielsen, J. U., Friis, E. P., Chorkendorff, I., Canters, G. W., Andersen, J. E. T., and Ulstrup, J. (2000) Molecular Monolayers and Interfacial Electron Transfer of *Pseudomonas aeruginosa* Azurin on Au(111), *J. Am. Chem. Soc.* *122*, 4047-4055.
129. Braun, S., Rappoport, S., Zusman, R., Avnir, D., and Ottolenghi, M. (1990) Biochemically active sol-gel glasses: the trapping of enzymes, *Mater. Lett.* *10*, 1-5.
130. Avnir, D., Braun, S., Lev, O., and Ottolenghi, M. (1994) Enzymes and Other Proteins Entrapped in Sol-Gel Materials, *Chem. Mater.* *6*, 1605-1614.
131. Ferretti, S., Paynter, S., Russell, D. A., Sapsford, K. E., and Richardson, D. J. (2000) Self-assembled monolayers: a versatile tool for the formulation of bio-surfaces, *TrAC, Trends Anal. Chem.* *19*, 530-540.
132. Cullison, J. K., Hawkrige, F. M., Nakashima, N., and Yoshikawa, S. (1994) A Study of Cytochrome c Oxidase in Lipid Bilayer Membranes on Electrode Surfaces, *Langmuir* *10*, 877-882.
133. Eddowes, M. J., and Hill, H. A. O. (1977) Novel method for the investigation of the electrochemistry of metalloproteins: cytochrome c, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 771-772.

134. Kroger, D., Liley, M., Schiweck, W., Skerra, A., and Vogel, H. (1999) Immobilization of histidine-tagged proteins on gold surfaces using chelator thioalkanes, *Biosens. Bioelectron.* *14*, 155-161.
135. 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.
136. Nowak, C., Schach, D., Gebert, J., Grosserueschkamp, M., Gennis, R. B., Ferguson-Miller, S., Knoll, W., Walz, D., and Naumann, R. L. C. (2011) Oriented immobilization and electron transfer to the cytochrome c oxidase, *J. Solid State Electrochem.* *15*, 105-114.
137. Jeuken, L. J. C., Connell, S. D., Henderson, P. J. F., Gennis, R. B., Evans, S. D., and Bushby, R. J. (2006) Redox Enzymes in Tethered Membranes, *J. Am. Chem. Soc.* *128*, 1711-1716.
138. Weiss, S. A., Bushby, R. J., Evans, S. D., and Jeuken, L. J. C. (2010) A study of cytochrome bo3 in a tethered bilayer lipid membrane, *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* *1797*, 1917-1923.
139. Zayats, M., Katz, E., Baron, R., and Willner, I. (2005) Reconstitution of Apo-Glucose Dehydrogenase on Pyrroloquinoline Quinone-Functionalized Au Nanoparticles Yields an Electrically Contacted Biocatalyst, *J. Am. Chem. Soc.* *127*, 12400-12406.
140. 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.
141. Patolsky, F., Weizmann, Y., and Willner, I. (2004) Long-range electrical contacting of redox enzymes by SWCNT connectors, *Angew. Chem., Int. Ed.* *43*, 2113-2117.
142. Willner, I., Heleg-Shabtai, V., Blonder, R., Katz, E., Tao, G., Bueckmann, A. F., and Heller, A. (1996) Electrical Wiring of Glucose Oxidase by Reconstitution of FAD-Modified Monolayers Assembled onto Au-Electrodes, *J. Am. Chem. Soc.* *118*, 10321-10322.
143. Willner, B., Katz, E., and Willner, I. (2006) Electrical contacting of redox proteins by nanotechnological means, *Curr. Opin. Biotechnol.* *17*, 589-596.
144. Willner, I., and Willner, B. (2010) Biomolecule-Based Nanomaterials and Nanostructures, *Nano Lett.* *10*, 3805-3815.
145. Wang, J. (2005) Carbon-nanotube based electrochemical biosensors: a review, *Electroanalysis* *17*, 7-14.
146. Heller, A. (1990) Electrical wiring of redox enzymes, *Acc. Chem. Res.* *23*, 128-134.
147. Wang, J. (2008) Electrochemical Glucose Biosensors, *Chem. Rev. (Washington, DC, U. S.)* *108*, 814-825.
148. Drummond, T. G., Hill, M. G., and Barton, J. K. (2003) Electrochemical DNA sensors, *Nat. Biotechnol.* *21*, 1192-1199.
149. Bullen, R. A., Arnot, T. C., Lakeman, J. B., and Walsh, F. C. (2006) Biofuel cells and their development, *Biosens. Bioelectron.* *21*, 2015-2045.
150. Willner, I., Arad, G., and Katz, E. (1998) A biofuel cell based on pyrroloquinoline quinone and microperoxidase-11 monolayer-functionalized electrodes, *Bioelectrochem. Bioenerg.* *44*, 209-214.
151. Katz, E., Filanovsky, B., and Willner, I. (1999) A biofuel cell based on two immiscible solvents and glucose oxidase and microperoxidase-11 monolayer-functionalized electrodes, *New J. Chem.* *23*, 481-487.
152. Mano, N., Mao, F., and Heller, A. (2002) A Miniature Biofuel Cell Operating in A Physiological Buffer, *J. Am. Chem. Soc.* *124*, 12962-12963.

153. Mao, F., Mano, N., and Heller, A. (2003) Long tethers binding redox centers to polymer backbones enhance electron transport in enzyme "wiring" hydrogels, *J. Am. Chem. Soc.* *125*, 4951-4957.
154. Mano, N., Mao, F., and Heller, A. (2003) Characteristics of a miniature compartment-less glucose-O₂ biofuel cell and its operation in a living plant, *J. Am. Chem. Soc.* *125*, 6588-6594.
155. Mano, N., and Heller, A. (2003) A miniature membraneless biofuel cell operating at 0.36 V under physiological conditions, *J. Electrochem. Soc.* *150*, A1136-A1138.
156. 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, *J. Am. Chem. Soc.* *126*, 8368-8369.
157. Gao, F., Viry, L., Maugey, M., Poulin, P., and Mano, N. (2010) Engineering hybrid nanotube wires for high-power biofuel cells, *Nat Commun* *1*, 1-7.
158. Sakai, H., Nakagawa, T., Tokita, Y., Hatazawa, T., Ikeda, T., Tsujimura, S., and Kano, K. (2009) A high-power glucose/oxygen biofuel cell operating under quiescent conditions, *Energy Environ. Sci.* *2*, 133-138.
159. Palmore, G. T. R., and Kim, H.-H. (1999) Electro-enzymic reduction of dioxygen to water in the cathode compartment of a biofuel cell, *J. Electroanal. Chem.* *464*, 110-117.
160. Armstrong, F. A. (2005) Recent developments in dynamic electrochemical studies of adsorbed enzymes and their active sites, *Curr. Opin. Chem. Biol.* *9*, 110-117.
161. Laviron, E. (1979) General expression of the linear potential sweep voltammogram in the case of diffusionless electrochemical systems, *J. Electroanal. Chem.* *101*, 19-28.
162. Renault, C., Andrieux, C. P., Tucker, R. T., Brett, M. J., Balland, V., and Limoges, B. (2012) Unraveling the Mechanism of Catalytic Reduction of O₂ by Microperoxidase-11 Adsorbed within a Transparent 3D-Nanoporous ITO Film, *J. Am. Chem. Soc.* *134*, 6834-6845.
163. Murgida, D. H., and Hildebrandt, P. (2005) Redox and redox-coupled processes of heme proteins and enzymes at electrochemical interfaces, *Phys. Chem. Chem. Phys.* *7*, 3773-3784.
164. Ataka, K., Kottke, T., and Heberle, J. (2010) Thinner, Smaller, Faster: IR Techniques To Probe the Functionality of Biological and Biomimetic Systems, *Angew. Chem., Int. Ed.* *49*, 5416-5424.
165. Hrabakova, J., Ataka, K., Heberle, J., Hildebrandt, P., and Murgida, D. H. (2006) Long distance electron transfer in cytochrome c oxidase immobilised on electrodes. A surface enhanced resonance Raman spectroscopic study, *Phys. Chem. Chem. Phys.* *8*, 759-766.

Chapitre II

Techniques de caractérisation

2.1. Electrochimie

Toutes les méthodes utilisées au cours de cette thèse ont nécessité un montage à trois électrodes. Nos études ont été basées sur deux techniques : la voltampérométrie cyclique et la voltampérométrie stationnaire. Dans chacune d'elles, il est nécessaire de contrôler le potentiel appliqué et de mesurer le courant résultant. Ceci est difficile avec un système à deux électrodes car le fait d'imposer une tension et de mesurer un courant entre ces mêmes électrodes va engendrer une chute ohmique. Cette chute ohmique sera d'autant plus importante que le courant imposé sera important c'est-à-dire qu'il sera ainsi impossible d'appliquer un potentiel constant. L'introduction d'une troisième électrode, nommée contre-électrode ou électrode auxiliaire, va permettre d'éviter que l'électrode de référence soit parcourue par la même intensité de courant que l'électrode de travail et pour permettre de diminuer le phénomène de chute ohmique. En résumé, le courant sera mesuré entre l'électrode de travail (ET) et l'électrode auxiliaire (CE) et le potentiel sera appliqué entre l'électrode de travail et l'électrode de référence (ER)⁽¹⁾.

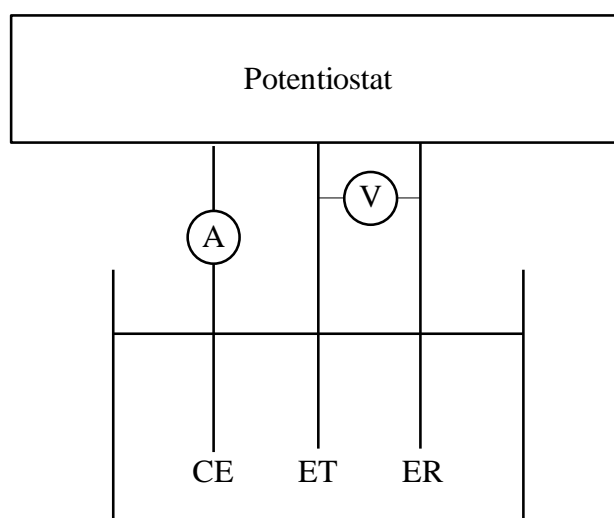


Figure 2.1: Montage d'une cellule électrochimique à 3 électrodes connectée sur un potentiostat. CE correspond à la contre-électrode, ET à l'électrode de travail et ER à l'électrode de référence.

2.1.1. Voltampérométrie cyclique

La voltampérométrie cyclique est une technique électrochimique où la solution n'est pas agitée. Dans cette technique, le potentiel varie linéairement entre des bornes définies par l'utilisateur de manière triangulaire. Il en résulte une courbe $i=f(E)$ appelé voltammogramme. Il est également possible de varier la vitesse de balayage en fonction de l'échelle de temps que

l'on veut observer c'est-à-dire que pour des systèmes lents, il sera possible de balayer à des vitesses très faibles (de l'ordre de quelques mV/S) alors qu'il sera possible de balayer à des vitesses très élevées pour des systèmes rapides (de l'ordre de plusieurs V/s).

Un voltammogramme correspond à la somme de deux composantes : le courant capacitif et le courant faradique :

$$I = i_c + i_f = \frac{dQ_c}{dt} + \frac{dQ_f}{dt} \quad \text{Equation 2.1}$$

Le courant capacitif i_c correspond à une accumulation de charges à l'interface métal/solution alors que la composante faradique i_f est liée à la consommation d'espèces électroactives à la surface de l'électrode. Ce dernier va nous intéresser plus particulièrement puisque c'est à partir de celui-ci qu'il sera possible de déterminer des informations importantes aussi bien au niveau de la caractérisation de la surface qu'au niveau mécanistique.

En ce qui concerne la caractérisation de la surface, il est par exemple à noter que la composante faradique est directement proportionnelle à la quantité d'espèces oxydées ou réduites à l'électrode ; or, en électrochimie directe de protéines, les enzymes électroactives sont généralement adsorbées à l'électrode si bien qu'en absence de substrat, il devient possible de relier la quantité d'espèces électroactives adsorbées à la surface avec l'aire du pic observé en voltampérométrie cyclique grâce à la relation suivante :

$$\Gamma = \frac{Q_F}{nFA} \quad \text{Equation 2.2}$$

où Q_F représente la charge obtenue par intégration du pic de réduction ou d'oxydation de l'enzyme étudiée en absence de substrat, n le nombre d'électrons échangés, F la constante de Faraday et A l'aire de l'électrode.

Il est également possible de déterminer l'homogénéité de la surface après adsorption d'enzymes car une des principales difficultés de l'électrochimie des protéines réside dans le fait qu'il est très difficile de contrôler leur orientation à la surface de l'électrode. Cette information peut être déduite de la largeur de pic à mi-hauteur. En effet, pour une monocouche parfaite et une réaction nécessitant un transfert d'un électron, cette largeur de pic à mi-hauteur est de 90,6 mV.

$$\Delta E_{p,1/2} = 3.53 \frac{RT}{nF} = \frac{90.6}{n} \quad \text{Equation 2.3}$$

D'après l'équation ci-dessus, on peut également prendre en compte que la largeur de pic à mi-hauteur $\Delta E_{p,1/2}$ sera sensible au nombre d'électrons transférés au cours de la réaction d'oxydoréduction⁽²⁾. Cette information possède un intérêt dans l'étude de protéines possédant plusieurs centres redox puisqu'elle peut permettre soit de déterminer le cofacteur auquel l'électron est transféré soit d'en tirer une information mécanistique quant à la coopérativité impliquée dans le transfert d'électron⁽³⁾. En effet, dans le cas de certains cofacteurs comme les flavines ou les quinones, une valeur de n comprise entre 1 et 2 est souvent observée ; cette valeur traduit la stabilité de l'intermédiaire à un électron puisque pour un intermédiaire à un électron instable, nous observerons préférentiellement une valeur de n proche de 2 (l'intermédiaire instable va en fait impliquer une coopérativité rendant le transfert du 2^e électron servant à stabiliser la structure plus facile) alors que pour un intermédiaire à un électron stable, une valeur de n proche de 1 sera observée (la stabilité de l'intermédiaire monoélectronique se traduisant par un transfert du 2^e électron plus difficile)⁽³⁾.

A partir de la voltampérométrie cyclique, il est également possible de déterminer la constante de vitesse de transfert d'électron interfacial k_{ET} . Pour ce faire, nous utiliserons ici la théorie de Laviron⁽⁴⁾. Ce modèle offre une description mathématique des voltammogrammes en l'absence de diffusion dans le but de déduire le taux de transfert d'électron à la surface de l'électrode. La théorie de Laviron se base sur l'écart entre les pics anodiques et cathodiques ΔE_p en fonction de la vitesse de balayage pour déterminer un facteur m . Ce facteur m a été obtenu grâce à l'expression du courant par une fonction sans dimension :

$$\psi = \frac{i}{\left(\frac{F^2}{RT}\right) n^2 v A \Gamma_T} = m \left[\left(\frac{\Gamma_O}{\Gamma_T}\right) \eta^{-\alpha} - \left(\frac{\Gamma_R}{\Gamma_T}\right) \eta^{1-\alpha} \right] \quad \text{Equation 2.4}$$

où i est l'intensité du courant, F est la constante de Faraday, R est la constante des gaz parfaits, T est la température, n le nombre d'électrons échangés, v la vitesse de balayage, A la surface de l'électrode, Γ_T la somme des taux de couverture de la forme oxydée Γ_O et de la forme réduite Γ_R , η la surtension, α le coefficient de transfert et m :

$$m = \frac{RTk_{ET}}{Fnv} \quad \text{Equation 2.5}$$

Ce facteur m est directement relié à la cinétique de transfert d'électron entre l'électrode et le cofacteur oxydé ou réduit k_{ET} ; à travers cette expression, on constate qu'il tend vers 0 pour des systèmes totalement irréversibles (k_{ET} faible) et vers l'infini pour des pics réversibles (k_{ET} élevé). Sur un cyclovoltammogramme d'une espèce adsorbée, l'augmentation de k_{ET} et par conséquent du facteur m se traduira par une symétrie des pics d'oxydation et de réduction à fortes vitesses de balayage.

Pour définir cette constante de vitesse interfaciale k_{ET} , il suffira ensuite de tracer le graphique :

$$\frac{1}{m} = f(v) \quad \text{Equation 2.6}$$

Les valeurs de $1/m$ sont compilées dans des tables et sont définies en fonction du nombre d'électrons transférés et du ΔE_p .

1/m	0.5	0.75	1	1.5	2	2.5	3	3.5	4
nΔE_p (mV)	18.8	27	34.8	48.8	61.2	72.2	82.4	91.8	100.6

1/m	5	6	7	8	9	10	11	12	13
nΔE_p (mV)	116.2	130	142.4	153.8	164	173.4	182	190	197.6

Tableau 2.1: Tables compilant les valeurs de $1/m$ en fonction de l'écart entre les pics anodiques et cathodiques ΔE_p et le nombre d'électrons transférés⁽⁴⁾.

La résultante du graphique est une droite de type $y = ax$ dont la pente a correspondra à :

$$a = \frac{Fn}{RTk_{ET}} \quad \text{Equation 2.7}$$

A partir de cette pente, il sera possible de déduire directement la constante de transfert d'électrons interfaciale k_{ET} . Cette information permet d'estimer, d'un point de vue qualitatif, la distance entre le cofacteur impliqué dans l'échange d'électrons et la surface de l'électrode et permet d'obtenir une vision de l'orientation de la protéine sur la surface modifiée.

2.1.2. Voltampérométrie stationnaire

Contrairement à la voltampérométrie cyclique, la voltampérométrie stationnaire est une technique électrochimique où la solution est agitée grâce à la rotation de l'électrode. Il s'agit d'une technique couramment utilisée pour étudier les propriétés électrocatalytiques des enzymes. Ces mesures sont effectuées en présence de substrat. La vitesse de balayage est toujours choisie comme étant suffisamment lente pour que le système soit à l'équilibre en tout point c'est-à-dire que le courant catalytique mesuré doit être indépendant de la vitesse de balayage utilisée. Il s'agit alors de varier la vitesse de rotation de l'électrode afin de déterminer si la diffusion du substrat est une étape cinétiquement limitante. Si l'étape cinétiquement limitante correspond à la diffusion du substrat, le plateau de courant sera proportionnel à la racine carrée de la vitesse de rotation de l'électrode comme l'indique la théorie de Léovich^(5, 6):

$$i_{lim} = 0.62nFAD^{2/3}\omega^{1/2}\nu^{-1/6}C \quad \text{Equation 2.8}$$

où n est au nombre d'électrons échangés au cours de la réaction catalytique, F la constante de Faraday, A la surface de l'électrode, D le coefficient de diffusion, ω la vitesse angulaire de rotation de l'électrode, ν la viscosité cinématique et C la concentration de l'espèce électroactive.

Si on extrapôle à une vitesse de rotation ω infinie, l'étape cinétiquement limitante ne correspondra plus à la diffusion du substrat mais à la cinétique de la réaction enzymatique comme le montre l'équation de Koutecky-Levich⁽⁷⁾ :

$$\frac{1}{i_{lim}} = \frac{1}{i_{max}} + \frac{1}{0.62nFAD^{2/3}\omega^{1/2}\nu^{-1/6}C} \quad \text{Equation 2.9}$$

où i_{max} représente le courant maximum lorsque l'étape limitante est la cinétique. Il devient alors possible d'estimer la constante de vitesse catalytique k_{cat} qui correspond au nombre de moles de produits formés par seconde puisque :

$$\frac{1}{i_{max}} = \frac{C + K_M}{nF\Gamma k_{cat}C} \quad \text{Equation 2.10}$$

où K_M correspond à la constante de Michaelis-Menten. Dans notre cas, la concentration en substrat étant bien supérieure au K_M , ce dernier facteur sera négligé.

En traçant i_{lim}^{-1} vs. $\omega^{-1/2}$, il devient possible d'accéder à la valeur du courant limite i_{max} et par conséquent de déduire k_{cat} .

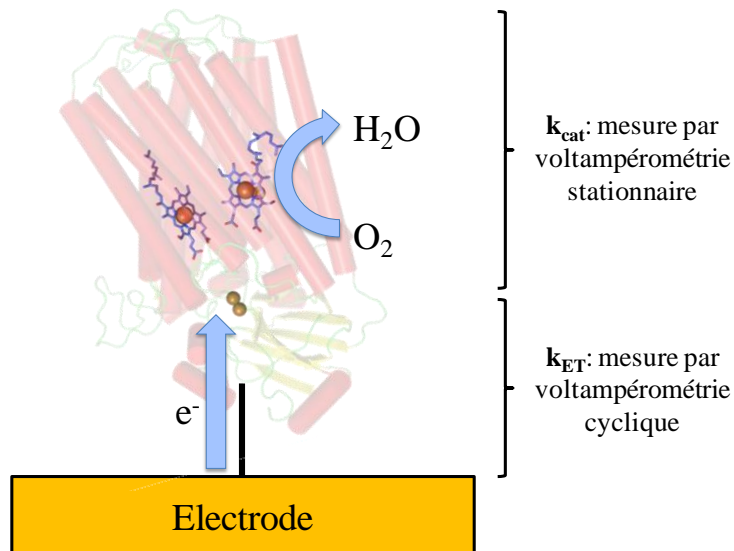


Figure 2.2: Schéma récapitulatif des mesures des différentes constantes cinétiques par électrochimie.

En résumé, la voltampérométrie cyclique permet de déterminer la constante de transfert d'électron interfacial k_{ET} alors que la voltampérométrie stationnaire renseigne sur la constante de vitesse catalytique k_{cat} (cette constante peut cependant également être déduite d'expériences de voltampérométrie cyclique⁽⁸⁾). Ces valeurs permettent donc d'apporter des informations quant à l'étape cinétiquement limitante au sein de l'enzyme (Figure 2.2).

2.2. Spectroscopies

Cette thèse se base principalement sur trois techniques spectroscopiques :

- La spectroscopie UV-Visible,
- La spectroscopie infrarouge,
- La spectroscopie de résonance Raman.

Les techniques spectroscopiques sont basées sur l'interaction entre le rayonnement électromagnétique et la matière (l'échantillon à analyser). Cette interaction peut engendrer différents phénomènes tels que l'absorption, l'émission ou la diffusion. Le spectre

électromagnétique (Figure 2.3) correspond à la répartition des ondes électromagnétiques en fonction de leur longueur d'onde (ou en fonction de leur énergie). L'énergie du rayonnement électromagnétique peut s'exprimer de la manière suivante :

$$E = h\nu \quad \text{Equation 2.11}$$

$$\text{avec } \nu = \frac{c}{\lambda} \quad \text{Equation 2.12}$$

avec E l'énergie du rayonnement, h la constante de Planck $6.62 \cdot 10^{-34}$ J.s, ν la fréquence et λ la longueur d'onde.

L'interaction entre la matière et le rayonnement électromagnétique engendre différents événements en fonction de l'énergie de ce rayonnement. Ces événements sont directement reliés aux niveaux d'énergie. En effet, une molécule est reliée à des états discrets possédant des énergies bien définies E_1, E_2, \dots . La spectroscopie d'absorption consiste en l'absorption d'un quanta d'énergie correspondant à l'énergie nécessaire pour effectuer une transition d'un état d'énergie E_J vers un état d'énergie E_{J+1} .

$$\Delta E = E_{J+1} - E_J = h\nu \quad \text{Equation 2.13}$$

Le phénomène observé sera directement lié à l'énergie du rayonnement utilisé pour sonder l'échantillon. Par exemple, les changements de spin sont observés grâce à des rayonnements de faible énergie de type radiofréquence alors que des rayonnements de très haute énergie seront impliqués dans le changement de configuration du noyau.

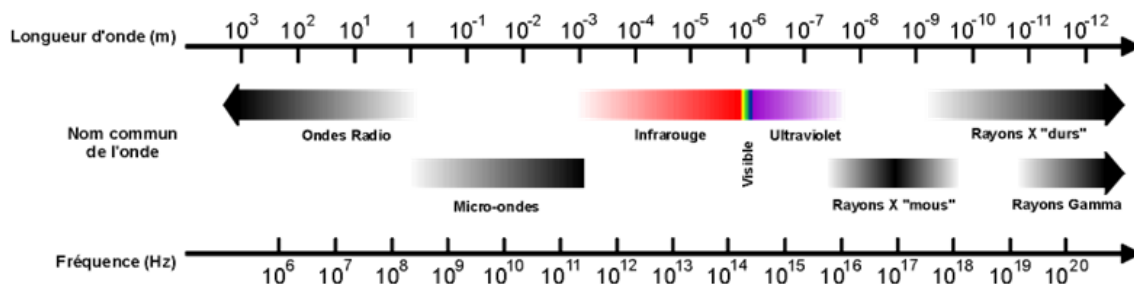


Figure 2.3 : Spectre électromagnétique représentant les différents domaines en fonction de leur fréquence et de leur longueur d'onde⁽⁹⁾.

2.2.1. Spectroscopie UV-Visible

La spectroscopie UV-Visible correspond à l'interaction entre la matière et le rayonnement UV-Visible. Typiquement, à cette échelle énergétique, des transitions électroniques sont observées. L'absorption ou émission d'énergie est liée à la redistribution des électrons au sein de la molécule. En spectroscopie UV-Visible, on mesure l'absorbance A en fonction de la longueur d'onde λ et il en résulte un spectre d'absorption. L'absorbance est liée à la capacité d'un échantillon à absorber un rayonnement. Le spectromètre va mesurer le ratio de l'intensité faisceau transmis I par rapport à l'intensité du faisceau incident I_0 , cette valeur est appelée transmittance T .

$$T = \frac{I}{I_0} \quad \text{Equation 2.14}$$

La valeur de transmittance est directement liée à l'absorbance par la formule :

$$A = -\log T = \log \frac{I_0}{I} \quad \text{Equation 2.15}$$

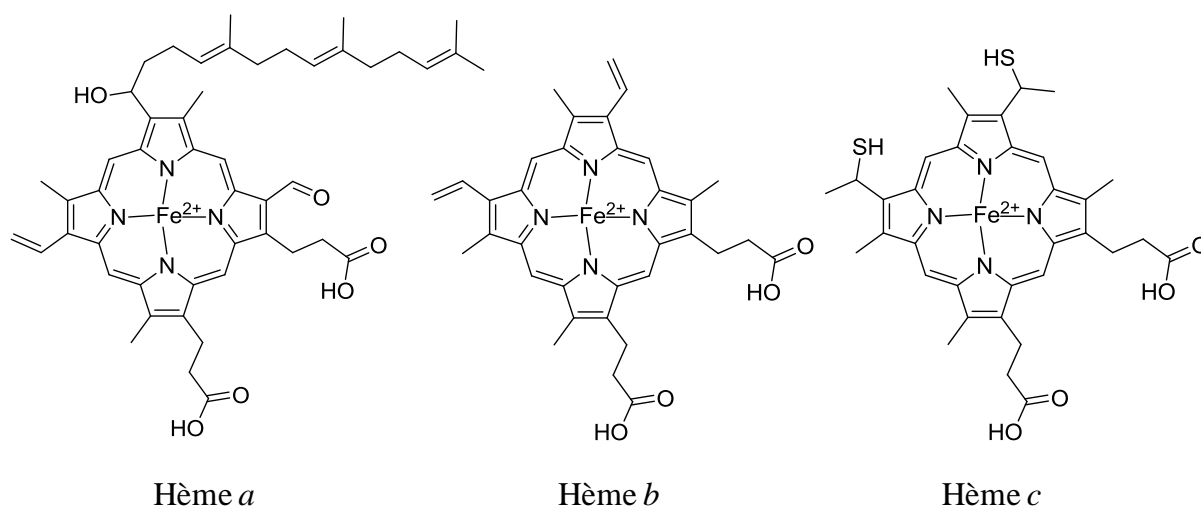
L'absorbance est reliée à la concentration de l'échantillon C et au coefficient d'extinction molaire ϵ_λ qui est spécifique à chaque molécule et à chaque longueur d'onde :

$$A = \epsilon_\lambda Cl \quad \text{Equation 2.16}$$

avec l le trajet optique.

2.2.1.1. Spectroscopie UV-Visible des protéines hémiques

La spectroscopie UV-Visible est couramment utilisée pour l'étude des protéines de la chaîne respiratoire et possède un intérêt particulier pour l'étude d'oxydases terminales puisque ces enzymes possèdent des hèmes. En effet, les hèmes sont des structures porphyriniques substituées contenant un atome de fer et possèdent par conséquent des signaux caractéristiques en spectroscopie UV-Visible (Figure 2.4).

Figure 2.4: Représentation des hèmes *a*, *b* et *c*.

Le signal de forte intensité situé aux alentours de 400 nm correspond à une transition $\pi \rightarrow \pi^*$ typique des cycles porphyriniques ; il est communément appelé bande de Soret.

Une série de bandes de plus faible intensité est présente aux plus grandes longueurs d'ondes, les bandes Q. Ces bandes correspondent également à des transitions $\pi \rightarrow \pi^*$. On distingue 4 bandes Q dans le cas de porphyrines bases libres et entre 1 et 4 pour les porphyrines métallées. Dans le cas des hèmes, deux bandes Q sont observées. Ces deux bandes sont appelées α et β (β étant observé à une longueur d'onde plus élevée qu' α).

L'intérêt de ces bandes réside dans leur forte sensibilité à l'environnement puisqu'aussi bien leur intensité que leur longueur d'onde dans le spectre UV-Visible va dépendre de l'état d'oxydation du métal (en l'occurrence le fer dans le cas des hèmes), de la présence de ligands sur le cycle porphyrinique ou sur le métal et de la symétrie de la porphyrine^(10, 11). Ces caractéristiques permettent donc de distinguer les différents types d'hèmes sur un spectre UV-Visible et donc d'étudier leurs contributions individuelles.

2.2.1.2. La spectroscopie UV-Visible couplée à l'électrochimie

Afin de déterminer les potentiels d'oxydoréduction de chaque cofacteur au sein des oxydases terminales, une cellule électrochimique en couche mince a été utilisée.

a. La cellule électrochimique en couche mince

La cellule électrochimique en couche mince permet de coupler différentes méthodes de spectroscopie optiques à l'électrochimie⁽¹²⁾. Cette cellule correspond à un montage à trois électrodes : l'électrode de travail est une grille d'or, la contre-électrode est une pièce de platine et l'électrode de référence est une électrode de chlorure d'argent (Ag/AgCl 3M KCl). Afin de pouvoir connecter la cellule électrochimique au potentiostat, l'électrode de travail et la contre électrode sont connectées à l'aide de fil de platine. Le corps en PVC possède quatre entrées : deux d'entre elles servent à visser les supports contenant les fils de platine à relier à l'électrode de travail et à la contre-électrode, un troisième sert à visser l'électrode de référence et la quatrième permet de compléter le compartiment de mesure avec une solution tampon (Figure 2.5). Le dispositif électrochimique est maintenu dans le corps en PVC entre deux fenêtres de CaF₂ et deux joints en caoutchouc assurent l'étanchéité. Les fenêtres en CaF₂ sont utilisées car elles sont transparentes en infrarouge moyen et en UV-Visible. Pendant les mesures, la cellule est maintenue dans un dispositif métallique permettant de la refroidir à une température fixe (entre 5°C et 12°C en fonction de la mesure).

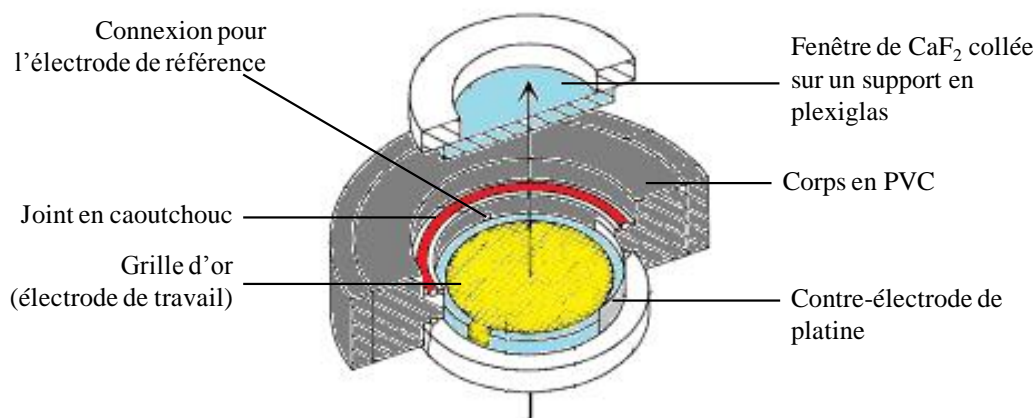


Figure 2.5: Schéma de la cellule électrochimique en couche mince⁽¹²⁾.

La grille d'or utilisée comme électrode de travail est modifiée au préalable avec une solution d'acide mercaptopropionique (2 mM) et de cystéamine (2 mM). La modification de cette grille permet de créer un réseau de fonctions -COOH et -NH₂ dans le but de prévenir l'adsorption de la protéine à sa surface pour ainsi éviter sa dénaturation.

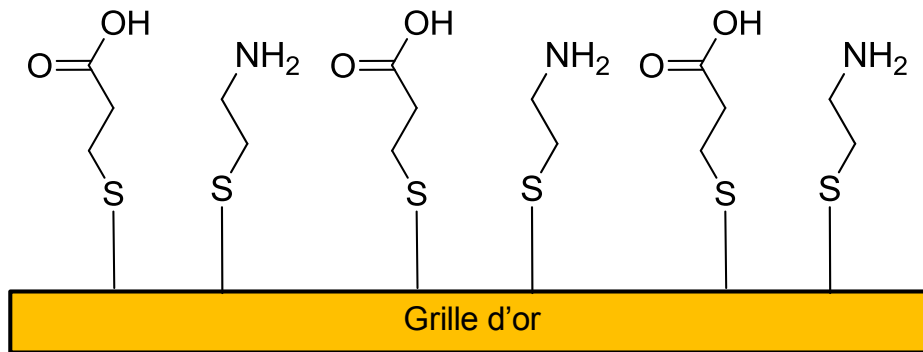


Figure 2.6: Représentation schématique de la grille d'or modifiée avec le mélange de cystéamine et d'acide mercaptopropionique.

b. Les titrations potentiométriques

Nous avons vu dans la section 2.2.1.1. que les propriétés spectrales des hèmes étaient différentes en fonction de leur état d'oxydation et qu'il était également possible de différencier les hèmes en fonction de leur nature. Ces propriétés peuvent être exploitées en couplant la spectroscopie UV-Visible à la cellule électrochimique en couche mince afin de déterminer les potentiels de demi-vague de chaque cofacteur présent dans l'enzyme.

Cette méthode de titration s'effectue en prenant une mesure de référence soit dans l'état oxydé, soit dans l'état réduit (en fonction du sens de la titration redox que l'on souhaite effectuer). Des mesures sont ensuite effectuées à différents potentiels afin d'observer les changements d'absorbance relatifs aux changements d'états d'oxydation des cofacteurs au sein de la protéine. Il en résulte une série de spectres qui permet d'obtenir les potentiels d'équilibre de chaque cofacteur redox présents dans la protéine et ayant des bandes d'absorption distinguables sur un spectre UV-Visible.

L'exploitation des résultats commence par l'alignement des spectres qui s'effectue en choisissant un point où aucun cofacteur ne contribue. Cet alignement est nécessaire puisque la mesure de référence est effectuée au début de la titration ; ces mesures durant généralement plusieurs heures, un décalage thermique peut être observé au cours du temps.

La deuxième étape consiste en l'identification des bandes d'intérêts c'est-à-dire des bandes sensibles à l'état d'oxydation des cofacteurs. Ici, s'agissant de protéines hémiques, nous nous sommes particulièrement intéressés à l'exploitation des bandes de Soret ainsi que des bandes Q.

La troisième étape a pour but de tracer les graphiques des ΔAbs des bandes d'intérêt en fonction du potentiel appliqué. Une fois ces graphiques obtenus (Figure 2.7), un traitement mathématique est effectué à l'aide du logiciel Origin. En effet, la courbe de titration obtenue suit la loi de Nernst :

$$E_{eq} = E^0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{\prod_i a_i(\text{Ox})^\alpha}{\prod_j a_j(\text{Red})^\beta} \quad \text{Equation 2.17}$$

avec E^0 le potentiel standard du couple étudié, $\prod_i a_i(\text{Ox})^\alpha$ le produit des activités à l'équilibre de toutes les espèces oxydantes intervenant dans la demi-réaction et $\prod_j a_j(\text{Red})^\beta$ le produit des activités à l'équilibre de toutes les espèces réductrices intervenant dans la demi-équation.

En assimilant activité et concentration, il est possible de modifier cette équation en exprimant les concentrations à l'aide de la loi de Beer-Lambert:

$$E_{eq} = E^0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{\Delta A}{A_{ox} - A_{red} - \Delta A} \quad \text{Equation 2.18}$$

où A_{ox} et A_{red} correspondent respectivement à l'absorbance de la forme oxydée et de la forme réduite et ΔA correspond à la différence d'absorbance observée sur le spectre (qui représente donc la quantité d'oxydant formé et de réducteur consommé dans le cas d'une titration oxydative par exemple). Cette équation est modifiée afin d'exprimer ΔA en fonction du potentiel appliquée :

$$\Delta A = A_{red} + \frac{(A_{ox} - A_{red})}{1 + \exp\left(\frac{E_{appl} - E_{eq}}{\frac{RT}{nF}}\right)} \quad \text{Equation 2.19}$$

où E_{appl} est le potentiel appliqué.

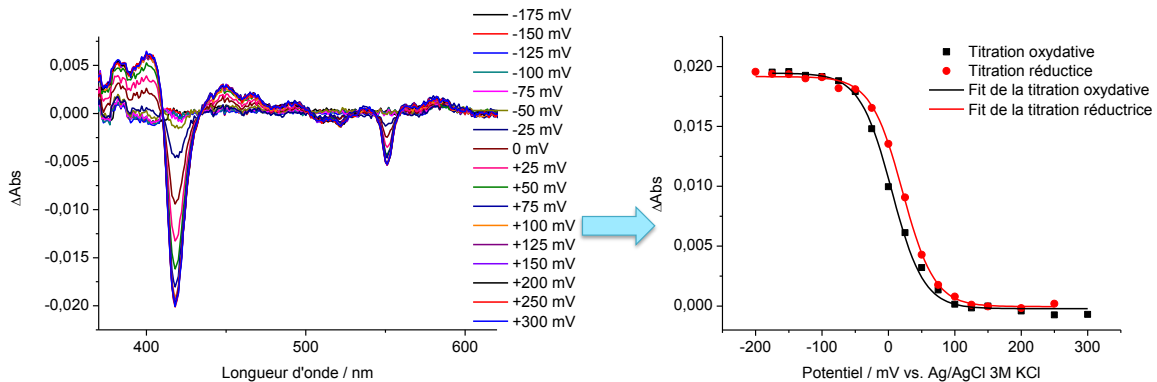


Figure 2.7: A gauche, un exemple de titration potentiométrique par spectroscopie UV-Visible. A droite, un exemple de graphique représentant ΔAbs en fonction du potentiel appliqué à 418 nm (bande de Soret).

La courbe est modulable en fonction du nombre d'électrons transférés ; la valeur de n est modifiée afin d'obtenir le meilleur fit possible. Cette méthode est adaptée à l'étude de protéine possédant des cofacteurs discernables en spectroscopie UV-Visible où la méthode peut apporter une précision de l'ordre de ± 15 mV. Cependant, dans le cas de protéines possédant plusieurs centres redox similaires, la précision des valeurs obtenues va dépendre du nombre de cofacteurs de même nature impliqués dans une transition puisqu'il sera difficile de séparer les contributions de deux cofacteurs ayant des potentiels de demi-vague proches. La précision de la mesure sera donc plus faible.

De plus, les oxydases terminales étant des systèmes coopératifs, les transitions observées ne sont pas toujours attribuables à un cofacteur mais correspondent plutôt à la moyenne de plusieurs transitions impliquant plusieurs cofacteurs ^(9, 13-15).

2.2.2. Spectroscopie infrarouge

L'infrarouge correspond au domaine du spectre électromagnétique compris entre le Visible et les micro-ondes. Ce domaine est divisé en 3 régions : le proche infrarouge (125000 à 4000 cm^{-1}), l'infrarouge moyen (4000 cm^{-1} à 800 cm^{-1}) et l'infrarouge lointain (800 cm^{-1} à 10 cm^{-1}). La spectroscopie infrarouge correspond à l'étude de l'interaction entre la matière et le rayonnement infrarouge. Ici, on s'intéresse au changement d'état vibrationnel et rotationnel d'une molécule. Pour une molécule polyatomique non-linéaire, il existe $3N-6$ modes normaux de vibrations mais qui ne sont pas nécessairement tous actifs en infrarouge. Un mode normal correspond à l'absorption d'un quanta d'énergie permettant la transition entre l'état fondamental et le premier état vibrationnel excité. Pour qu'une transition soit dite active en

infrarouge, il faut que le mouvement des atomes au sein de la molécule s'accompagne d'une variation du moment dipolaire électrique.

Les modes normaux de vibration sont divisés en deux catégories suivant le changement observé. Les vibrations d'élongation correspondent à un changement de longueur de liaison alors que les vibrations de déformation correspondent à des changements d'angles de liaison.

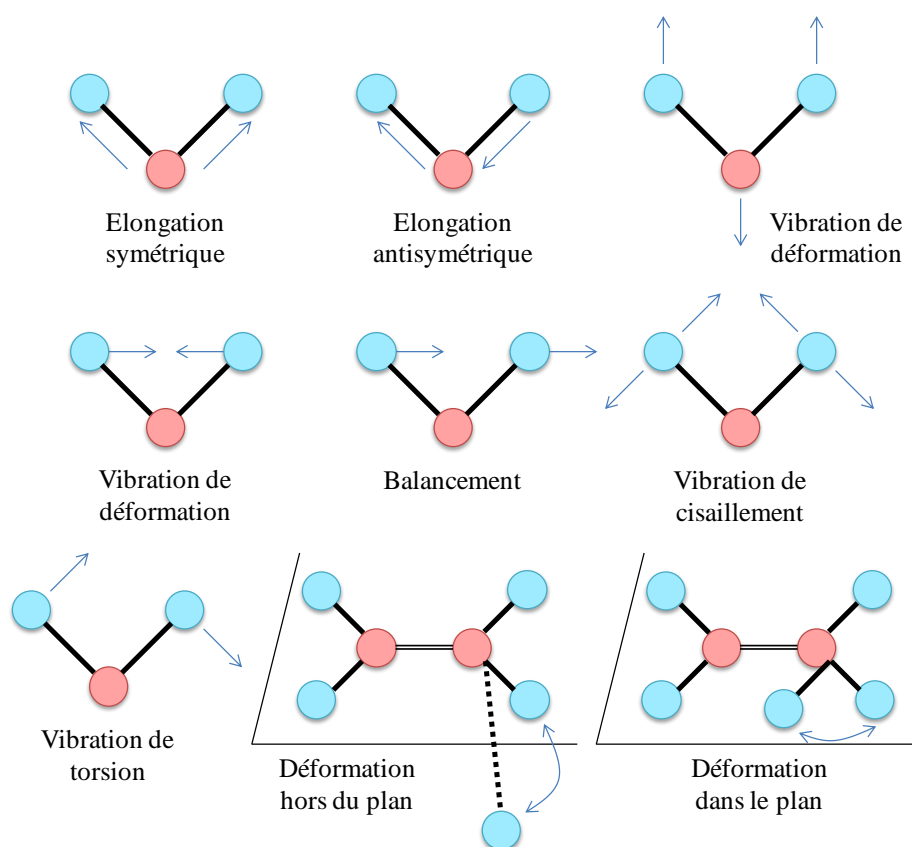


Figure 2.8: Modes normaux de vibrations.

2.2.2.1. Appareillage

Toutes les mesures effectuées au cours de cette thèse ont été réalisées sur un spectromètre infrarouge à transformée de Fourier Bruker Vertex 70 (Allemagne).

Un spectromètre infrarouge à transformée de Fourier génère un interférogramme à partir d'un interféromètre de Michelson. Le principe de la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier repose donc sur l'interféromètre de Michelson qui est constitué de deux miroirs, l'un fixe et l'autre mobile, et d'une lame semi-réfléchissante appelée lame séparatrice.

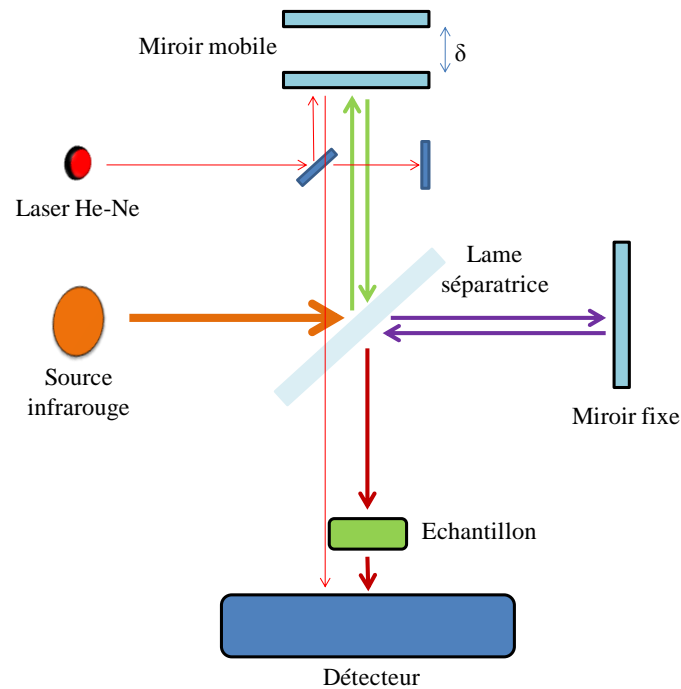


Figure 2.9: Schéma du principe d'un spectromètre infrarouge à transformée de Fourier⁽¹⁶⁾.

La source émet un rayonnement infrarouge polychromatique séparé en deux par une lame séparatrice. Il en résulte que 50% du rayonnement est transmis au miroir fixe et 50% est réfléchi sur le miroir mobile. Ces 2 faisceaux sont alors réfléchis par les miroirs respectifs vers la lame séparatrice. C'est à ce moment qu'on observe une combinaison des faisceaux lumineux donnant lieu soit à des interférences constructives, soit à des interférences destructives en fonction de la différence de marche induite par le miroir mobile. C'est cette combinaison de faisceau qui sera transmise à l'échantillon avant d'arriver au détecteur. La différence de marche peut être déterminée par l'appareil à l'aide d'un laser hélium-néon permettant de connaître la position du miroir mobile (Figure 2.9). En effet, l'utilisation d'une lumière monochromatique (caractérisée pour une longueur d'onde λ_0) permet de relier la différence de marche à l'intensité de l'interférogramme :

$$I(\delta) = B(\tilde{\nu}_0) \cos(2\pi\tilde{\nu}_0\delta) \quad \text{Equation 2.20}$$

avec I l'intensité de l'interférogramme, B l'intensité de la source, $\tilde{\nu}_0$ le nombre d'onde du laser et δ la différence de marche.

La source étant quant à elle une source polychromatique continue, l'expression de l'intensité de l'interférogramme devient :

$$I(\delta, \tilde{\nu}) = \int_0^{\infty} B(\tilde{\nu}) \cos(2\pi\delta\tilde{\nu}) d\tilde{\nu} \quad \text{Equation 2.21}$$

Par cette équation, on peut constater que l'intensité maximale de l'interférogramme est obtenue pour une différence de marche nulle (c'est-à-dire lorsque la distance entre le miroir fixe et le miroir mobile est la même) ; il s'agit du point où toutes les ondes sont en phase.

La problématique consiste donc à transformer cet interférogramme en un spectre infrarouge. Il faut pour cela appliquer une transformée de Fourier à l'interférogramme obtenu :

$$B(\tilde{\nu}) = \int_0^{+\infty} I(\delta) \cos(2\pi\delta\tilde{\nu}) d\tilde{\nu} \quad \text{Equation 2.22}$$

Si on considère que la vitesse de déplacement du miroir mobile est uniforme, la transformée de Fourier permet de passer de l'espace du temps à l'espace des nombres d'onde (et donc d'obtenir le spectre infrarouge final).

La résolution du spectre est quant à elle définie par la différence de marche induite par le miroir mobile ; plus la différence de marche est grande, meilleure est la résolution spectrale :

$$\Delta\tilde{\nu} = \frac{1}{2\delta} \quad \text{Equation 2.23}$$

2.2.2.2. La spectroscopie infrarouge des protéines

Les protéines sont des polymères d'acides aminés reliés entre eux par des liaisons peptidiques. Ces protéines peuvent également posséder des cofacteurs dans leur structure. La spectroscopie infrarouge possède l'avantage de sonder les différents constituants d'une protéine (Figure 2.10). En effet, cette technique permet notamment d'étudier des contributions du squelette polypeptidique⁽¹⁷⁻¹⁹⁾, d'acides aminés^(20, 21), des cofacteurs^(22, 23) et même des molécules d'eau qui peuvent composer certaines structures^(24, 25).

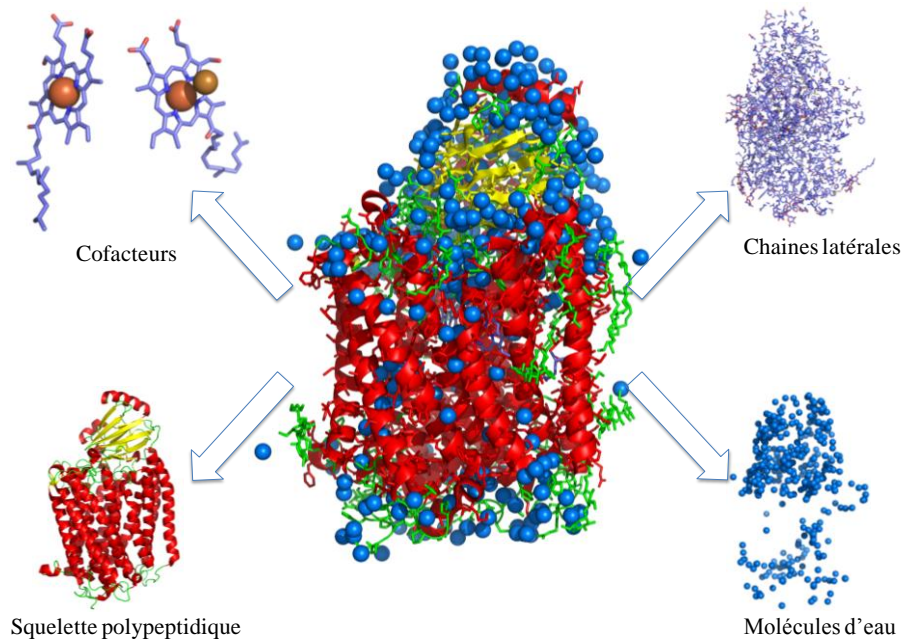


Figure 2.10: Représentation de la cytochrome aa_3 oxydase⁽²⁶⁾ (PDB : 3HB3) et des différentes contributions observables en spectroscopie infrarouge.

Ce principal avantage de la spectroscopie infrarouge est également son principal inconvénient puisque les contributions des différents constituants ont tendance à se superposer.

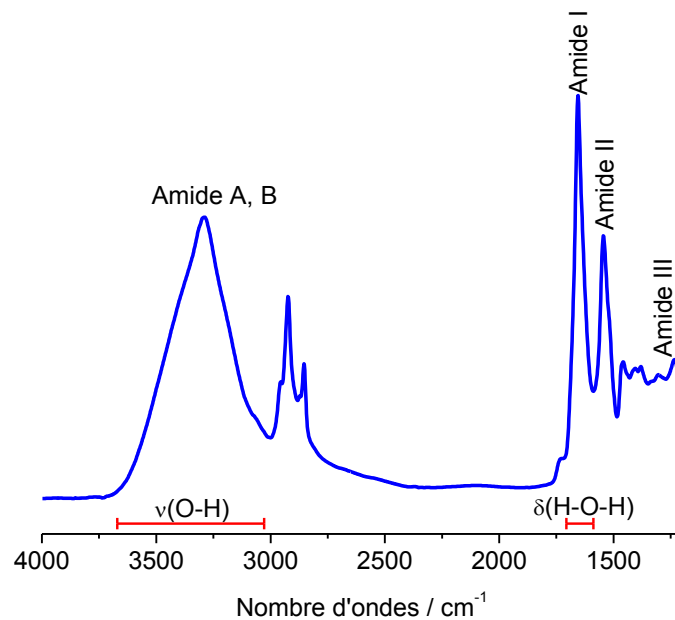


Figure 2.11: Spectre d'absorption infrarouge caractéristique d'une protéine en moyen infrarouge et contributions des vibrations des molécules d'eau.

Le spectre d'absorption en infrarouge moyen d'une protéine est complètement dominé par les contributions du squelette peptidique. Les bandes observées dans ces spectres proviennent

essentiellement de la multitude de liaisons peptidiques présentes dans les protéines. Ces liaisons correspondent à des fonctions amide.

Nomenclature	Fréquence / cm^{-1}	Modes vibrationnels
Amide A	≈ 3300	$\nu(\text{N-H})$
Amide B	≈ 3100	$\nu(\text{N-H})$
Amide I	1610-1695	$\nu(\text{C=O})$, $\nu(\text{C-N})$, $\delta(\text{CCN})$, $\delta(\text{N-H})$
Amide II	1480-1575	$\delta(\text{N-H})$, $\nu(\text{C-N})$, $\delta(\text{C=O})$, $\nu(\text{C-C})$, $\nu(\text{C-N})$
Amide III	1220-1320	$\delta(\text{N-H})$, $\nu(\text{C-N})$, $\delta(\text{C=O})$, $\nu(\text{C-C})$

Tableau 2.2: Principales contributions du squelette polypeptidique en infrarouge moyen⁽¹⁴⁾.

a. Mesures en transmission

- Spectroscopie d'absorption

La spectroscopie d'absorption en transmission consiste à placer l'échantillon dans une cellule et à enregistrer le spectre en solution. Les spectres d'absorption des protéines permettent de déterminer la structure secondaire d'une protéine à partir de la bande Amide I. Cependant, il faut, pour ce faire, être en mesure de s'affranchir de la contribution de l'eau qui se situe vers 1645 cm^{-1} , au niveau de la bande Amide I. En pratique, pour limiter l'absorption de l'eau, les échantillons sont préparés dans une solution tampon deutérée et le trajet optique est choisi le plus faible possible.

La détermination de la structure secondaire est basée sur la déconvolution de la bande Amide I. Cette méthode est largement utilisée dans la littérature puisque la bande Amide I est connue comme étant largement influencée par la structure secondaire d'une protéine^(17, 18). L'interprétation des données consiste, dans un premier temps, à normaliser la bande Amide I en vue de préparer sa déconvolution en corrigeant la ligne de base. La deuxième étape est de calculer la dérivée seconde de cette bande. La résultante de cette dérivée seconde consiste en une série de pics négatifs correspondant, pour chacun d'entre eux, à une structure secondaire spécifique. La position de ces pics négatifs est finalement indiquée dans un programme

permettant de calculer la déconvolution. La déconvolution est jugée satisfaisante lorsque le coefficient de corrélation R^2 entre la courbe expérimentale et la courbe théorique est supérieur à 0.999. Le résultat final obtenu permet de déterminer la proportion de chaque structure secondaire dans la structure globale par intégration des contributions individuelles.

Structure secondaire	Positions H ₂ O / cm ⁻¹	Positions D ₂ O / cm ⁻¹
Hélices α	1648 - 1657	1642 - 1660
Feuillets β	1623-1641 / 1674 - 1695	1615 – 1638 / 1672 - 1694
Coudes	1662 – 1686	1653 - 1691
Pelote	1642 - 1657	1639 - 1654

Tableau 2.3: Position de la bande Amide I en fonction de la structure secondaire^(17, 18).

- Spectroscopie différentielle induite par électrochimie

Toutes les protéines étudiées au cours de cette thèse sont impliquées dans le transfert d'électrons. Il est donc possible de les étudier par spectroscopie infrarouge différentielle induite par électrochimie. La spectroscopie infrarouge différentielle induite par électrochimie consiste à étudier un échantillon sous la forme oxydée et sous la forme réduite. Cependant, l'étude d'une protéine par cette méthode ne peut pas se faire par simple comparaison des spectres d'absorption de chaque forme. En effet, comme cela a été mentionné dans la partie 2.3.2.2., le spectre d'absorption est entièrement dominé par les contributions du squelette polypeptidique or celui-ci n'est pas électrochimiquement actif. Afin de pallier à cette difficulté, la forme oxydée peut être soustraite à la forme réduite pour obtenir un spectre différentiel oxydé-réduit. Le problème majeur de ce genre d'étude provient de la faible intensité du spectre différentiel puisque son intensité est environ 1000 fois inférieure à celle d'un spectre d'absorption. Pour s'assurer que les signaux observés sont bien réels, il faut cycloser l'expérience plusieurs fois et moyenniser les données afin d'augmenter le rapport signal/bruit.

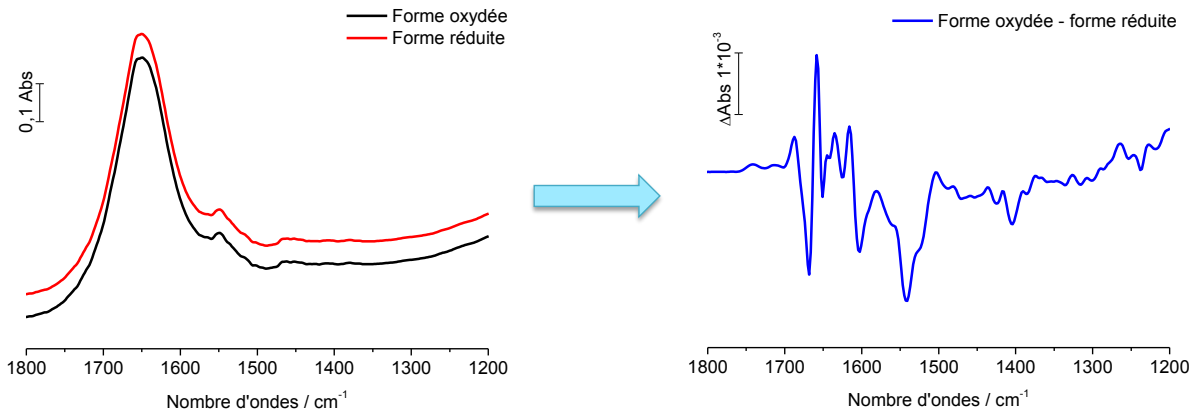


Figure 2.12: A gauche, les spectres d'absorption des formes oxydées et réduites d'une protéine. A droite, le spectre différentiel entre la forme oxydée et la forme réduite⁽¹²⁾.

L'attribution des signaux est effectuée à l'aide d'études déjà établies dans la littérature. Les signaux des hèmes peuvent être attribués à partir de systèmes modèles^(27, 28) mais également à partir d'études déjà établies sur les systèmes étudiés^(23, 29). D'autre part, les contributions des chaînes latérales des acides aminés peuvent être déterminées à l'aide d'une table établie par Hellwig et al. décrivant les positions des bandes ainsi que les coefficients d'extinction des acides aminés individuels⁽³⁰⁾.

b. Mesures en réflexion

- Spectroscopie d'absorption

La spectroscopie d'absorption en réflexion constitue une alternative à son homologue en transmission. Ici, l'échantillon est déposé sur un cristal transparent en infrarouge. Celui-ci peut être de différentes natures : diamant, silicium, germanium... Le principe de cette mesure repose sur l'utilisation de deux milieux d'indice de réfraction très différent de façon à ce que le faisceau infrarouge puisse subir une réflexion totale. Cette réflexion se produit au-delà d'un certain angle critique. Cependant, même si la quasi-totalité du faisceau est réfléchi, une partie du faisceau est transmise dans le milieu d'indice de réfraction le plus faible: c'est l'onde évanescente. Cette onde évanescente pénètre dans le milieu d'indice de réfraction le plus faible (sur une profondeur de quelques micromètres dépendant de la longueur d'onde du rayonnement), c'est-à-dire le milieu où se situe l'échantillon en solution, où elle est partiellement absorbée.

Cette technique est particulièrement adaptée pour l'étude d'un film sur une surface. De plus, elle nécessite très peu d'échantillon. Elle souffre cependant aussi de quelques défauts puisque, même s'il est théoriquement possible de mesurer des échantillons en solution, cela s'avère souvent compliqué en raison de la contribution du solvant. Aussi, la mesure d'échantillons séchés sur une surface peut engendrer des changements de structures secondaires pouvant provenir soit du séchage, soit de l'interaction avec le cristal.

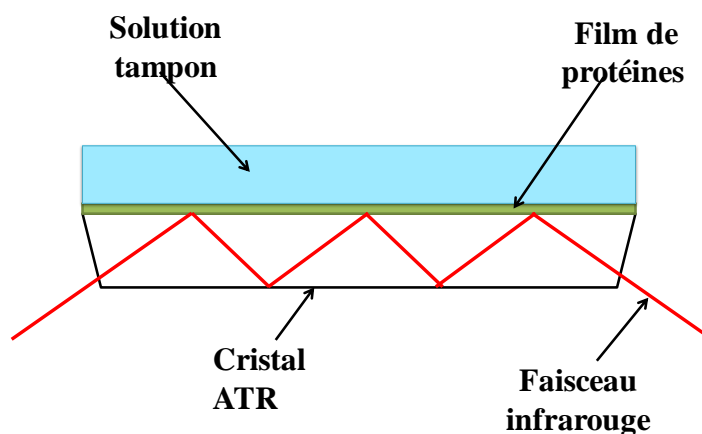


Figure 2.13: Principe de la spectroscopie infrarouge en réflexion totale atténuée.

- La spectroscopie infrarouge exaltée de surface

L'exaltation de surface en spectroscopie infrarouge consiste à déposer des îlots métalliques à la surface d'un cristal afin d'obtenir un signal de 10 à 1000 fois plus intense comparé à un signal sans exaltation. Le mécanisme provoquant cette exaltation est encore très largement débattu mais il semblerait que deux mécanismes en soient à l'origine : un mécanisme électromagnétique et un mécanisme chimique⁽³¹⁾.

Le mécanisme électromagnétique peut lui-même se diviser en 2 « sous-effets ». Le premier facteur d'exaltation est induit par le faisceau infrarouge qui polarise les particules métalliques grâce à l'excitation collective des électrons dans le métal (les plasmons de surface). L'induction de ce moment dipolaire engendre une augmentation du champ électrique à proximité des îlots métalliques. Cependant, ce phénomène ne peut pas expliquer à lui seul l'exaltation observée puisqu'il serait responsable, au maximum, d'une augmentation de signal de l'ordre de 10 fois. Le deuxième facteur d'exaltation concerne l'adsorbat à la surface des îlots métalliques ; en effet, l'oscillation des molécules d'adsorbats va induire la formation

d'un autre dipôle au sein du métal. Cette perturbation se retrouve accentuée aux fréquences de vibration des molécules. De plus, les îlots métalliques sont présents en grande quantité à la surface du cristal et leur absorptivité molaire est supérieure à celle des molécules dans l'infrarouge moyen. La mesure infrarouge sera donc essentiellement dominée par les changements de moments dipolaires des îlots métalliques c'est-à-dire que le métal jouera le rôle d'amplificateur de signal.

Le mécanisme chimique concerne les molécules chimisorbées à la surface d'îlots métalliques puisque celles-ci possèdent des exaltations supérieures comparées aux molécules physisorbées. Ce phénomène pourrait provenir de l'orientation des molécules puisque seules les molécules dont la variation de moment dipolaire est orientée perpendiculairement à la surface subissent l'exaltation maximum. De plus, l'interaction entre le métal et la molécule entraîne une augmentation de la variation du moment dipolaire.

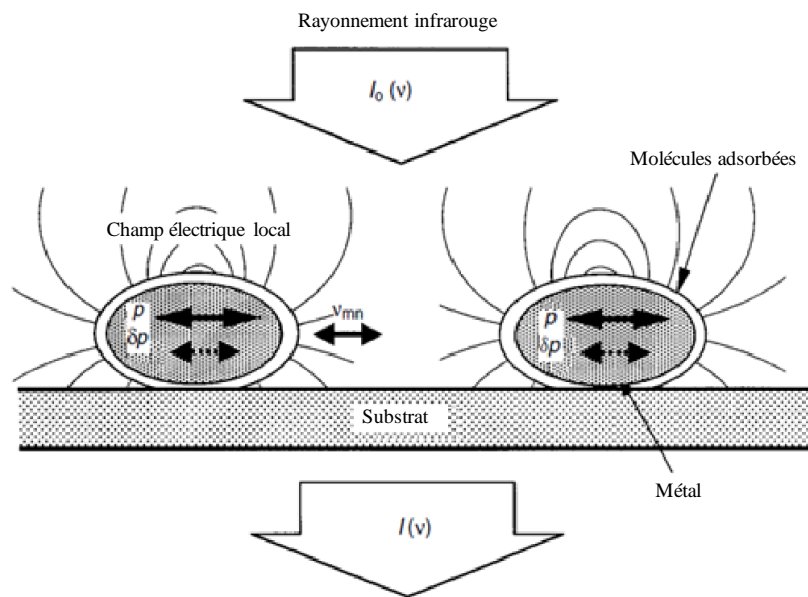


Figure 2.14 : Schéma expliquant l'exaltation de surface observée par spectroscopie infrarouge. Cette figure est tirée de la référence ⁽³¹⁾.

En résumé, les facteurs influant sur l'exaltation de surfaces sont indiqués dans l'équation suivante :

$$A \propto \Gamma \left| \frac{d\mu}{dQ} \cdot \mathbf{E} \right|^2 = \Gamma \left| \frac{d\mu}{dQ} \right|^2 |\mathbf{E}|^2 \cos^2 \alpha \quad \text{Equation 2.24}$$

Avec A l'absorbance, Γ le taux de couverture, $d\mu/dQ$ la variation de moment dipolaire, E le champ électrique à la surface et α l'angle entre le moment dipolaire et le champ électrique. Le facteur $\cos^2 \alpha$ fait donc office de règle de sélection de l'exaltation c'est-à-dire que lorsque $\alpha=0^\circ$ l'exaltation est maximum alors que lorsque $\alpha=90^\circ$ aucun signal n'est observé.

2.2.3. Spectroscopie de résonance Raman

2.2.3.1. L'effet Raman

La spectroscopie Raman est basée sur l'effet Raman qui correspond au changement de fréquence de la lumière lorsqu'elle est diffusée par une molécule (diffusion inélastique). En effet, lorsqu'un échantillon est irradié par un faisceau lumineux incident, il peut diffuser la lumière soit à la même fréquence (diffusion Rayleigh), soit à une fréquence inférieure (diffusion Stokes), soit à une fréquence supérieure (diffusion Anti-Stokes). La diffusion Stokes permet, par conséquent, la création d'une excitation alors que la diffusion Anti-Stokes engendre une destruction d'excitation (Figure 2.15).

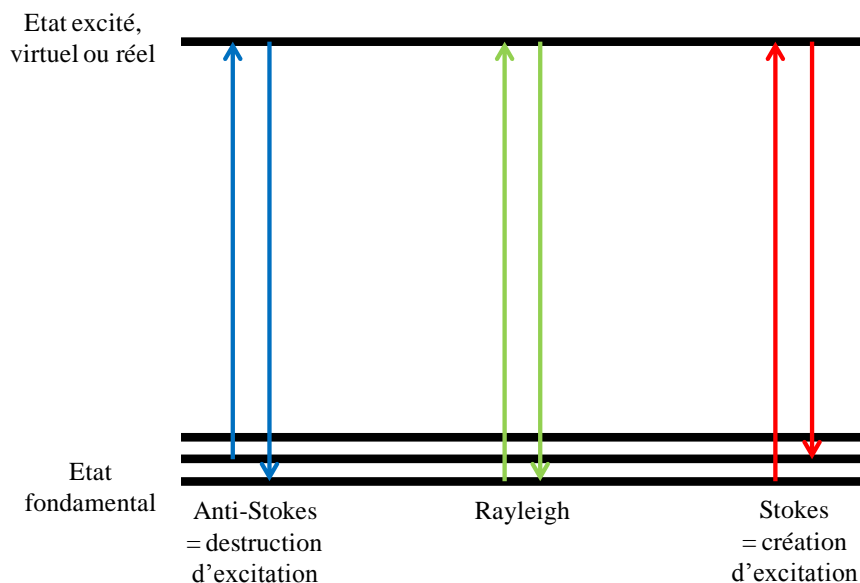


Figure 2.15: Les trois types de transitions rencontrés dans la diffusion Raman.

La spectroscopie Raman est une technique complémentaire à la spectroscopie infrarouge. Contrairement à la spectroscopie infrarouge où la mesure reflète un changement de moment dipolaire, la spectroscopie Raman rend compte d'un changement de polarisabilité. Cette technique possède également un intérêt majeur provenant de la faible diffusion de l'eau permettant ainsi d'envisager des mesures en solution. Elle possède malheureusement aussi un

inconvenient majeur puisque très peu de photons subissent une diffusion inélastique ($1/100000000$); ceci engendre donc des spectres Raman de faible intensité rendant difficile la mesure d'échantillons peu concentrés.

2.2.3.2. L'effet de résonance

Pour pallier à ce problème, la spectroscopie Raman de résonance constitue un atout majeur. La différence entre la spectroscopie Raman et la spectroscopie Raman de résonance réside dans l'excitation de l'échantillon : alors que la spectroscopie Raman est basée sur l'excitation d'un niveau d'énergie « virtuel », la spectroscopie de résonance Raman est basée sur l'excitation du premier niveau électronique (Figure 2.16). Cette excitation est à l'origine d'une amplification de signal, appelée effet de résonance. Cette méthode possède l'avantage de pouvoir exciter sélectivement une molécule au sein d'un édifice complexe et prend donc tout son sens pour l'étude de protéines possédant des chromophores. De plus, les modes amplifiés dépendent de l'excitation effectuée puisque seuls les modes vibrationnels associés à la transition électronique vont être amplifiés⁽³²⁾. Ceci permet donc l'étude sélective du chromophore et de son environnement qui correspond généralement au « cœur réactif » des molécules biologiques.

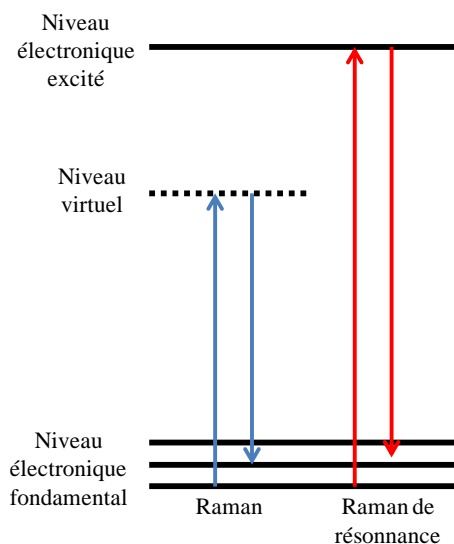


Figure 2.16: Principe de la spectroscopie Raman et de la spectroscopie de résonance Raman.

2.2.3.3. Appareillage

Un spectromètre Raman est composé d'une source laser dont la lumière aura pour rôle d'exciter l'échantillon à analyser. La lumière peut être amenée à l'échantillon soit par un chemin optique (à l'aide de miroirs) ou par l'intermédiaire d'une fibre optique. La lumière est recueillie par un séparateur (filtre) afin de séparer les contributions de la lumière excitatrice et de la lumière diffusée. La lumière diffusée sera alors diffractée par un réseau pour arriver à un détecteur de type caméra CCD (Figure 2.17).

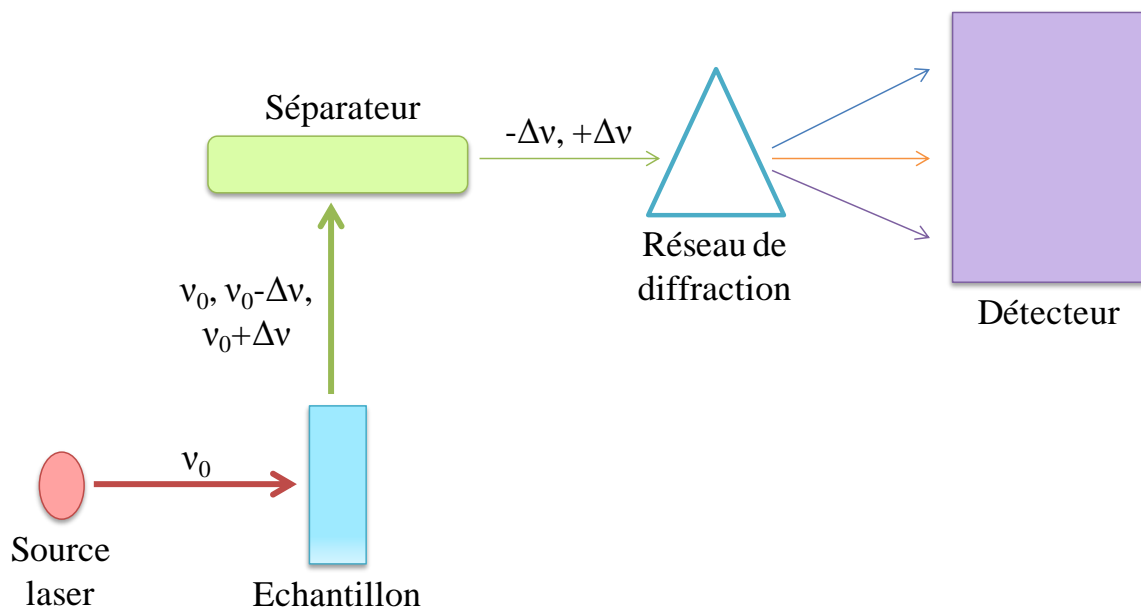


Figure 2.17 : Schéma du principe d'un spectromètre Raman dispersif.

Finalement, le spectromètre Raman mesure la différence de fréquence entre la raie excitatrice et la raie de diffusion. Cette différence correspond au déplacement Raman.

$$\Delta\nu = \nu_0 - \nu_{diffusé} \quad \text{Equation 2.25}$$

où $\Delta\nu$ correspond au déplacement Raman, ν_0 à la fréquence d'excitation et $\nu_{diffusé}$ à la fréquence de la lumière diffusée.

2.3.3.4. La spectroscopie de résonance Raman des protéines hémiques

Cette technique a permis beaucoup d'avancées dans l'étude des systèmes biologiques. Elle a notamment été exploitée pour l'étude de molécules impliquées dans la photosynthèse⁽³³⁾ ou de protéines possédant des centres de type cuivre^(34, 35). Une importante littérature est également

disponible pour l'étude de protéines hémiqes comme l'hémoglobine^(36, 37) et la myoglobine⁽³⁸⁻⁴⁰⁾ ainsi que pour des protéines plus complexes comme le cytochrome *c*⁽⁴¹⁻⁴³⁾ et les oxydases terminales⁽⁴⁴⁻⁴⁷⁾; en effet, les hèmes sont caractérisées par des bandes marqueurs de l'état de spin et de l'état d'oxydation (Tableau 2.4) qui font de la spectroscopie Raman une méthode de choix pour l'étude des intermédiaires des oxydases terminales.

Mode	Information	Etat d'oxydation ou de spin	Fréquence / cm ⁻¹	Coordination
ν_2 (C _b C _b)	Spin	Haut spin	≈1565	
		Bas spin	≈1585	
ν_3 (C _a C _m)	Oxydation et spin	Fe ²⁺ haut spin	1472	5
		Fe ²⁺ bas spin	≈1490	6
		Fe ³⁺ haut spin	≈1480	6
		Fe ³⁺ bas spin	≈1505	6
ν_4 (C _a N)	Oxydation	Fe ³⁺	≈1370	
		Fe ²⁺	≈1360	
ν_{10} (C _a C _m , C=C)	Spin	Haut spin	≈1610	6
		Haut spin	≈1630	5
		Bas spin	≈1640	6

Tableau 2.4: Principales bandes marqueurs des hèmes en spectroscopie Raman.

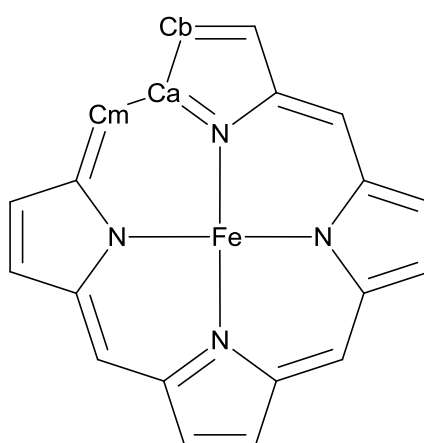


Figure 2.18 : Nomenclature des carbones du cycle porphyrinique.

Concernant les bandes marqueurs de l'état d'oxydation, il a été déterminé des fréquences généralement plus basses lorsque l'hème est à l'état réduit. Il est proposé que cet effet est lié à

la rétrodonation des électrons π du métal vers le ligand qui peuple les orbitales π^* de l'anneau porphyrinique. En conséquence, la réduction du centre métallique de la porphyrine est directement liée à l'augmentation de la taille du cycle porphyrinique en raison de l'augmentation de la taille des liaisons⁽⁴¹⁾.

Pour les bandes marqueurs de l'état de spin, une fréquence plus faible est observée pour les hèmes haut spin. Des calculs théoriques ont démontrés que Fe^{3+} (bas spin et haut spin) et Fe^{2+} (haut spin) sont des accepteurs d'électrons π alors que Fe^{2+} bas spin est un donneur d'électrons π . Une donation d'électrons π du cycle porphyrinique vers le métal devrait donc engendrer une diminution des fréquences des liaisons du cycle porphyrinique. Ces effets électroniques couplés à l'état d'oxydation du métal engendre donc une compétition entre le dépeuplement des orbitales π liées au l'état de spin et au peuplement des orbitales π^* liés à la réduction du métal. D'après ces considérations électroniques, peu de changements de fréquences sont attendus. Les fortes variations observées peuvent en fait s'expliquer par des changements structuraux liés à un changement de la symétrie du macrocycle porphyrinique.

Ces études ont servies de base pour l'attribution des bandes des spectres de résonance Raman effectuées au cours de la thèse.

2.3. Références

1. Miomandre, F., Sadki, S., Audebert, P., and Méallet-Renault, R. (2011) *Electrochimie - 2e édition - Des concepts aux applications: Des concepts aux applications*, Dunod.
2. Butt, J. N., and Armstrong, F. A. (2008) Voltammetry of adsorbed redox enzymes: mechanisms in the potential dimension, pp 91-128, Springer.
3. Léger, C., Elliott, S. J., Hoke, K. R., Jeuken, L. J. C., Jones, A. K., and Armstrong, F. A. (2003) Enzyme Electrokinetics: Using Protein Film Voltammetry To Investigate Redox Enzymes and Their Mechanisms, *Biochemistry* 42, 8653-8662.
4. Laviron, E. (1979) General expression of the linear potential sweep voltammogram in the case of diffusionless electrochemical systems, *Journal of Electroanalytical Chemistry* 101, 19-28.
5. Bard, A. J., and Faulkner, L. R. (1982) *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*, Masson.
6. Levich, V. G. (1966) Present state of the theory of oxidation-reduction in solution (bulk and electrode reactions), *Adv. Electrochem. Electrochem. Eng.* 4, 249-371.
7. Koutecky, J., and Levich, V. G. (1958) The use of a rotating disk electrode in the study of electrochemical kinetics and electrolytic processes, *Zh. Fiz. Khim.* 32, 1565-1575.
8. Costentin, C., Drouet, S., Robert, M., and Savéant, J.-M. (2012) Turnover Numbers, Turnover Frequencies, and Overpotential in Molecular Catalysis of Electrochemical Reactions. Cyclic Voltammetry and Preparative-Scale Electrolysis, *J. Am. Chem. Soc.* 134, 11235-11242.
9. Hielscher, R. G. (2009) The role of lipids and nucleotides in the catalytic mechanism of proteins from the respiratory chain: an electrochemical and infrared approach, Université Louis Pasteur.
10. Williams, R. J. P. (1956) The Properties Of Metalloporphyrins, *Chem. Rev.* 56, 299-328.
11. Gouterman, M. (1961) Spectra of porphyrins, *Journal of Molecular Spectroscopy* 6, 138-163.
12. Moss, D., Nabedryk, E., Breton, J., and Maentele, 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.
13. Nicholls, P., and Petersen, L. C. (1974) Heme-heme interactions in cytochrome aa3 during the anaerobic-aerobic transition, *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* 357, 462-467.
14. Fabian, H., and Mäntele, W. (2002) Infrared spectroscopy of proteins, *Handbook of vibrational spectroscopy*.
15. Keilin, D., and Hartree, E. F. (1939) Cytochrome and cytochrome oxidase, *Proc. R. Soc. London, Ser. B* 127, 167-191.
16. Hollas, J. M. (2004) *Modern spectroscopy*, John Wiley & Sons.
17. Arrondo, J. L. R., Muga, A., Castresana, J., and Goni, F. M. (1993) Quantitative studies of the structure of proteins in solution by Fourier-transform infrared spectroscopy, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 59, 23-56.
18. Barth, A. (2007) Infrared spectroscopy of proteins, *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* 1767, 1073-1101.
19. Goormaghtigh, E., Cabiaux, V., and Ruyschaert, J.-M. (1994) Determination of soluble and membrane protein structure by Fourier transform infrared spectroscopy. III. Secondary structures, *Subcell. Biochem.* 23, 405-450.

20. Hellwig, P., Pfitzner, U., Behr, J., Rost, B., Pesavento, R. P., von Donk, W., Gennis, R. B., Michel, H., Ludwig, B., and Maentele, 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.
21. Hellwig, P., Behr, J., Ostermeier, C., Richter, O.-M. H., Pfitzner, U., Odenwald, A., Ludwig, B., Michel, H., and Maentele, 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.
22. Hellwig, P., Mogi, T., Tomson, F. L., Gennis, R. B., Iwata, J., Miyoshi, H., and Maentele, W. (1999) Vibrational modes of ubiquinone in cytochrome bo3 from *Escherichia coli* identified by Fourier transform infrared Difference spectroscopy and specific ¹³C labeling, *Biochemistry* 38, 14683-14689.
23. Hellwig, P., Grzybek, S., Behr, J., Ludwig, B., Michel, H., and Maentele, 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.
24. Marechal, A., and Rich, P. R. (2011) Water molecule reorganization in cytochrome c oxidase revealed by FTIR spectroscopy, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 8634-8638, S8634/8631-S8634/8632.
25. Garczarek, F., and Gerwert, K. (2006) Functional waters in intraprotein proton transfer monitored by FTIR difference spectroscopy, *Nature (London, U. K.)* 439, 109-112.
26. Koepke, J., Olkhova, E., Angerer, H., Müller, H., Peng, G., and Michel, H. (2009) High resolution crystal structure of *Paracoccus denitrificans* cytochrome c oxidase: New insights into the active site and the proton transfer pathways, *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* 1787, 635-645.
27. 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, *JBIC, J. Biol. Inorg. Chem.* 11, 811-823.
28. Berthomieu, C., Boussac, A., Maentele, 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.
29. Hellwig, P., Soulimane, T., Buse, G., and Maentele, W. (1999) Electrochemical, FTIR, and UV/VIS Spectroscopic Properties of the ba₃ Oxidase from *Thermus thermophilus*, *Biochemistry* 38, 9648-9658.
30. 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 500cm⁻¹, *Spectrochim. Acta, Part A* 64A, 987-1001.
31. Osawa, M. (2006) Surface-Enhanced Infrared Absorption Spectroscopy, In *Handbook of Vibrational Spectroscopy*, John Wiley & Sons, Ltd.
32. Albrecht, A. C. (1961) The theory of Raman intensities, *J. Chem. Phys.* 34, 1476-1484.
33. Robert, B. (2009) Resonance Raman spectroscopy, *Photosynth. Res.* 101, 147-155.
34. Solomon, E. I. (2006) Spectroscopic Methods in Bioinorganic Chemistry: Blue to Green to Red Copper Sites, *Inorg. Chem.* 45, 8012-8025.

35. Solomon, E. I., and Hadt, R. G. (2011) Recent advances in understanding blue copper proteins, *Coord. Chem. Rev.* 255, 774-789.
36. Streckas, T. C., and Spiro, T. G. (1972) Hemoglobin. Resonance Raman spectra, *Biochim. Biophys. Acta, Protein Struct.* 263, 830-833.
37. Streckas, T. C., Packer, A. J., and Spiro, T. G. (1973) Resonance Raman spectra of ferri-hemoglobin fluoride. Three scattering regimes, *J. Raman Spectrosc.* 1, 197-206.
38. Kitagawa, T., Nagai, K., and Tsubaki, M. (1979) Assignment of the iron-nitrogen (His F8) stretching band in the resonance Raman spectra of deoxymyoglobin, *FEBS Lett.* 104, 376-378.
39. Walters, M. A., and Spiro, T. G. (1982) Resonance Raman spectroscopic studies of axial ligation in oxyhemoglobin and oxymyoglobin, and nitrosylmyoglobin, *Biochemistry* 21, 6989-6995.
40. Morikis, D., Champion, P. M., Springer, B. A., and Sligar, S. G. (1989) Resonance Raman investigations of site-directed mutants of myoglobin: effects of distal histidine replacement, *Biochemistry* 28, 4791-4800.
41. Spiro, T. G., and Streckas, T. C. (1974) Resonance Raman spectra of heme proteins. Effects of oxidation and spin state, *J. Amer. Chem. Soc.* 96, 338-345.
42. Streckas, T. C., and Spiro, T. G. (1972) Cytochrome c. Resonance Raman spectra, *Biochim. Biophys. Acta, Protein Struct.* 278, 188-192.
43. Spiro, T. G., and Streckas, T. C. (1972) Resonance Raman spectra of hemoglobin and cytochrome c. Inverse polarization and vibronic scattering, *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* 69, 2622-2626.
44. Choi, S., and Spiro, T. G. (1983) Out-of-plane deformation modes in the resonance Raman spectra of metalloporphyrins and heme proteins, *J. Am. Chem. Soc.* 105, 3683-3692.
45. Choi, S., Lee, J. J., Wei, Y. H., and Spiro, T. G. (1983) Resonance Raman and electronic spectra of heme a complexes and cytochrome oxidase, *J. Am. Chem. Soc.* 105, 3692-3707.
46. Varotsis, C., Babcock, G. T., Garcia-Horsman, J. A., and Gennis, R. B. (1995) Resonance Raman Spectroscopy of the Heme Groups of Cytochrome cbb3 in *Rhodobacter sphaeroides*, *J. Phys. Chem.* 99, 16817-16820.
47. Ogura, T. (2012) Resonance Raman applications in investigations of cytochrome c oxidase, *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* 1817, 575-578.

Chapitre III

Protocoles expérimentaux

3.1. Préparation des échantillons

3.1.1. Cytochrome bo_3 oxydase d'*E. coli*

La cytochrome bo_3 oxydase a été préparée par Sylvia K. Choi au sein de laboratoire du Pr. Robert B. Gennis ⁽¹⁾(Center of Biophysics and Computational Biology, University of Illinois, Urbana Champaign, USA). Au cours de cette thèse, la cytochrome bo_3 oxydase a été utilisée sous forme native et sous une forme native ne possédant pas le premier accepteur d'électron, la quinone. Pour les études électrochimiques et pour la caractérisation de surface par spectroscopie infrarouge, il a fallu diminuer la quantité de dodécyl maltoside (DDM) de façon à adsorber la protéine sur un réseau tridimensionnel de nanoparticules d'or. Cette diminution de la quantité de détergent a été effectuée en échangeant le tampon initial de la protéine contenant du détergent par un tampon phosphate de potassium (KPi, 50 mM, pH 7). Cet échange a été fait à l'aide d'un dispositif de filtration Amicon Ultra possédant un seuil de passage de 50 kDa et un volume de 500 μ L (Millipore, Billerica, MA 01821, USA) et d'une centrifuge 5804 R (Eppendorf, Le Pecq, France). L'échange de tampon a été effectué à une vitesse de 7000 tours/min pendant une durée de 20 min. La concentration finale de l'échantillon obtenue est d'environ 100 μ M.

3.1.2. Cytochrome aa_3 oxydase de *P. denitrificans*

La cytochrome aa_3 oxydase a été préparée par Hao Xie au sein de laboratoire du Pr. Hartmut Michel ⁽²⁾(Department of Molecular Membrane Biology, Max Planck Institute of Biophysics, Frankfurt/Main, Allemagne). Cette protéine ayant été utilisée dans le but de faire des mesures électrochimiques, le procédé de préparation de l'échantillon est le même que celui utilisé précédemment. Les mesures électrochimiques effectuées ont porté sur la dépendance pH ainsi que sur l'inhibition par le zinc et par le cyanure. Concernant la dépendance pH, les échantillons ont été préparés dans un tampon KPi (50 mM) à pH 6.5, 7, 7.5, 8 et 8.5. Les échantillons utilisés pour les mesures d'inhibition ont été préparés dans un tampon tris(hydroxyméthyl) aminoéthane (Tris) à pH 7 parce que le phosphate coordine le zinc.

3.1.3. Cytochrome ba_3 oxydase de *T. thermophilus*

La cytochrome ba_3 oxydase a été préparée par le Dr. Mohamed R. Noor au sein de laboratoire du Pr. Tewfik Soulimane ⁽³⁾(Department of Chemical and Environmental Sciences and

Materials & Surface Science Institute (MSSI), University of Limerick, Limerick, Ireland). Cette protéine a été préparée pour étudier sa dépendance pH par spectroscopie infrarouge différentielle et par électrochimie directe. En ce qui concerne l'électrochimie directe, les échantillons ont été préparés de la même manière que la cytochrome *aa₃* oxydase de *P. denitrificans* afin de faire une étude comparative. Pour les études par spectroscopie infrarouge différentielle, il a été nécessaire d'utiliser un tampon avec du détergent et un sel de fond, puisque contrairement aux études par électrochimie directe, il s'agit d'une étude électrochimique en solution. Le sel de fond permet de rendre la solution conductrice alors que le détergent permet de solubiliser la protéine et de conserver son intégrité au cours de la mesure. Dans notre cas, nous avons utilisé un tampon KPi (50 mM), NaCl (100 mM), 0.02% DDM à pH 6, 6.5, 7, 7.5, 8 et 8.5. Afin de concentrer l'échantillon et de faire l'échange de tampon, 3 lavages à 7000 tours/min pendant 20 min ont été effectués avec le dispositif de filtration mentionné ci-dessus. La concentration finale des échantillons a été déterminée par spectroscopie UV-Visible. Pour ce faire, un spectre UV-Visible de l'échantillon a été établi à l'état réduit. L'état réduit est obtenu par adjonction d'une faible quantité de dithionite de sodium. Le calcul de la concentration se fait alors en mesurant la différence d'absorbance à 560 nm et 590 nm avec $\Delta\epsilon=26 \text{ mM}^{-1}.\text{cm}^{-1(4)}$. La concentration finale des échantillons obtenus est d'environ 0.8 mM.

3.1.4. Les deux isoformes de la cytochrome *cbb₃* oxydase de *P. stutzeri*

Les deux isoformes de la cytochrome *cbb₃* oxydase ont été préparées par Hao Xie au sein du laboratoire du Pr. Hartmut Michel ⁽⁵⁾(Department of Molecular Membrane Biology, Max Planck Institute of Biophysics, Frankfurt/Main, Allemagne). Ces deux isoformes ont été préparées dans le but de faire une étude comparative par électrochimie directe, dosage électrochimique par spectroscopie UV-Visible, spectroscopie infrarouge différentielle et spectroscopie de résonance Raman. Pour les mesures par électrochimie directe et par spectroscopie de résonance Raman, les échantillons ont été préparées de la même façon que mentionné précédemment dans un tampon KPi (50 mM, pH 7). Pour les mesures par spectroscopie infrarouge différentielle, les dosages électrochimiques par spectroscopie UV-Visible et la mesure d'absorption par spectroscopie infrarouge, les protéines sont préparées de la même manière que spécifié précédemment. Dans ce cas, nous utilisons un tampon Tris (20 mM), NaCl (100 mM), 0.02% DDM à pH 7.5. La concentration des échantillons obtenus est mesurée à l'aide du spectre oxydée de chaque isoforme en prenant un coefficient d'extinction

molaire de $5.85 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ à 411 nm⁽⁵⁾. La concentration finale ainsi établie est d'environ 0.7 mM.

3.1.5. Cytochromes c_4 , c_5 et c_{551} de *P. stutzeri*

Les cytochromes c_4 , c_5 et c_{551} ont été préparés par Hao Xie au laboratoire du Pr. Hartmut Michel (Department of Molecular Membrane Biology, Max Planck Institute of Biophysics, Frankfurt/Main, Allemagne). Ces échantillons ont ensuite été conditionnés afin de faire des dosages électrochimiques par spectroscopie UV-Visible et pour l'électrochimie directe. S'agissant ici de protéines solubles, l'adjonction de détergent n'est ici pas nécessaire. Pour les dosages électrochimiques par spectroscopie UV-Visible, les échantillons ont été préparés à l'aide de 3 lavages successifs à 7000 tours/min pendant 20 min dans un tampon Tris (20 mM), NaCl (100 mM) à pH 7.5 avec un dispositif de filtration possédant un seuil de passage de 10 kDa. Pour les mesures en électrochimie directe, les échantillons ont été conditionnés en faisant un lavage à 7000 tours/min pendant 20 min avec un tampon KPi (50 mM, pH 7.5).

3.2. **Electrochimie**

3.2.1. Préparation de l'électrode

3.2.1.1. *Synthèse des nanoparticules d'or*

La synthèse des nanoparticules d'or est inspirée de la méthode proposée par Turkevich⁽⁶⁾ et adaptée par Frens⁽⁷⁾. Une solution de citrate de sodium (>99%, 12.5 mL, 39 mM, Sigma-Aldrich) est ajoutée à une solution d'acide tétrachloroaurique (>99%, 125 mL, 1 mM, Sigma-Aldrich) préalablement portée à ébullition et sous agitation. Après apparition de la couleur rouge intense, la solution est maintenue à ébullition sous agitation pendant 15 min avant d'être refroidie à température ambiante. Excepté pour l'étude concernant l'influence de la taille des nanoparticules, les nanoparticules d'or utilisées ont un diamètre d'environ 15 nm. Le contrôle de la taille des nanoparticules a été effectué par spectroscopie UV-Visible en effectuant un ratio A_{max}/A_{450} où A_{max} correspond à la valeur de l'absorbance au maximum de la bande plasmonique et A_{450} correspond à l'absorbance à 450 nm. La valeur du quotient obtenu est alors comparé aux valeurs établies dans les tables de références par Haiss et al.⁽⁸⁾.

3.2.1.2. Fonctionnalisation de l'électrode

Une électrode d'or polycristalline de 2 mm de diamètre est polie à l'aide d'une pâte diamantée de 1 μm et 0.5 μm avant d'être placée dans une cuve à ultrasons pendant 15 min. Cette électrode est ensuite activée en maintenant le potentiel à +2.21 V pendant 5 s, -0.14 V pendant 10 s puis en cyclant 100 fois entre -0.14 V et 1.71 V à une vitesse de 4 $\text{V}\cdot\text{s}^{-1}$ dans une solution d'acide sulfurique 0.1 M. Afin de vérifier la propreté de l'électrode, un dernier cycle est effectué entre ces mêmes bornes de potentiel mais à une vitesse de 0.1 $\text{V}\cdot\text{s}^{-1}$. Après nettoyage de l'électrode, 3 dépôts successifs de 3 μL de nanoparticules d'or stabilisées avec du citrate de sodium sont effectués avant d'être séchés à l'air. L'électrode modifiée est ensuite activée grâce à 20 cycles de voltampérométrie cyclique effectués entre -0.14 V et 1.71 V à 0.1 $\text{V}\cdot\text{s}^{-1}$ dans une solution de H_2SO_4 0.1 M. La surface de l'électrode ainsi modifiée peut être estimée par intégration du pic de réduction de Au-O à environ 1 V en prenant $390 \mu\text{C}\cdot\text{cm}^{-2(9)}$ comme charge surfacique de référence pour une monocouche d'oxyde d'or.

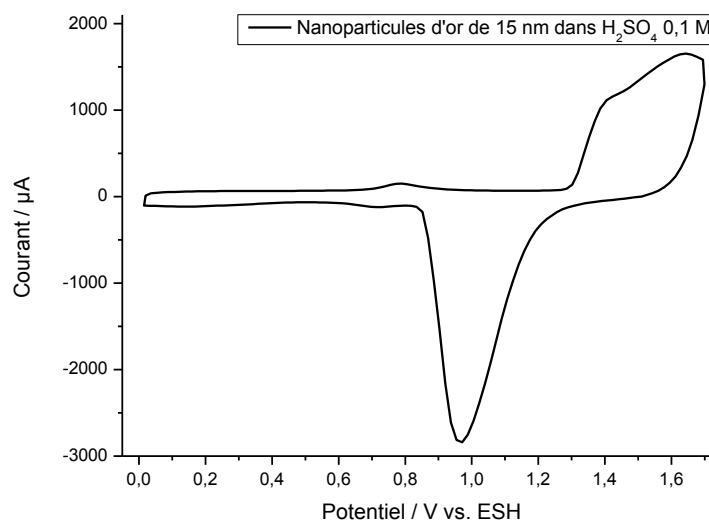


Figure 3.1: Cyclovoltammogramme de l'activation des nanoparticules d'or de 15 nm effectuée dans une solution d'acide sulfurique 0.1 M.

Après activation des nanoparticules, l'électrode est séchée puis immergée pendant 12 h dans une solution éthanolique 1:1 de mercaptohexanol et d'hexanethiol (1 mM) à 4°C. L'électrode nouvellement modifiée est ensuite rincée dans l'éthanol afin d'enlever les thiols non spécifiquement adsorbés sur la surface. Dans le but de vérifier qu'aucun signal ne provienne de la modification de la surface, un voltammogramme de référence est mesuré entre les bornes d'études dans le tampon dans lequel la protéine a été préparée. La surface de

l'électrode est ensuite séchée afin de pouvoir déposer 3 μL de protéine. Pour permettre l'adsorption de la protéine, l'électrode est laissée à 4°C pendant 12 h. Avant la mesure avec l'échantillon, l'électrode est rincée dans la solution tampon ayant servi à la préparation de la protéine avant la mesure afin de supprimer les protéines adsorbées non spécifiquement sur la surface modifiée. Toutes les mesures présentées dans ce manuscrit ont été effectués avec un montage classique à 3 électrodes connecté à un potentiostat Princeton Applied Research VERSASTAT 4. L'électrode auxiliaire utilisée est un fil de platine et l'électrode de référence est une électrode Ag/AgCl 3M KCl. Les potentiels mentionnés dans ce manuscrit seront donnés par rapport à une électrode standard à hydrogène (ESH). Les mesures électrocatalytiques ont été faites à une vitesse de 0.02 $\text{V}\cdot\text{s}^{-1}$.

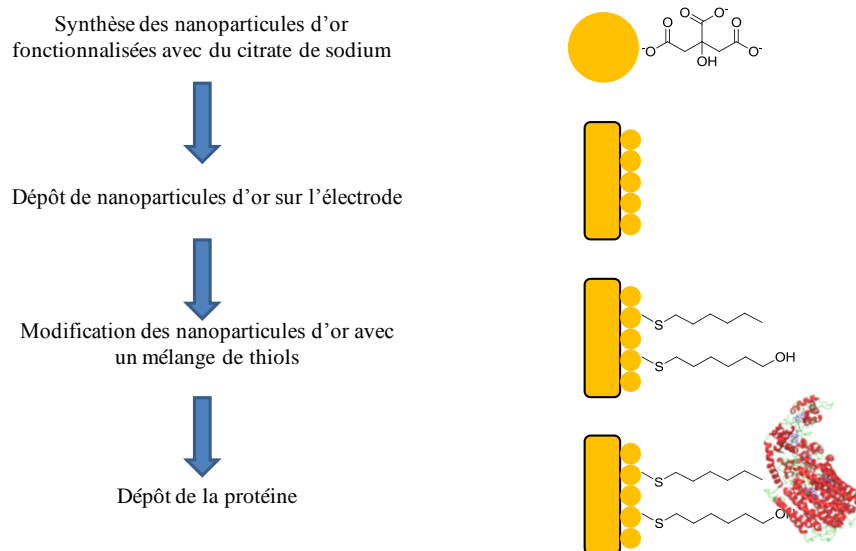


Figure 3.2: Les différentes étapes de la fonctionnalisation d'électrode pour les mesures électrochimiques.

3.3. Spectroscopies

3.3.1. Spectroscopie UV-Visible

3.3.1.1. *Mesures d'absorption*

Des mesures d'absorption ont été effectuées afin de déterminer la concentration des échantillons et pour déterminer la taille des nanoparticules⁽⁸⁾. Pour la détermination de la concentration des protéines, 1 μL de solution de protéine est ajouté à 600 μL de la solution tampon dans laquelle a été préparé l'échantillon. La mesure de référence est effectuée sur la solution tampon seule. La procédure permettant d'obtenir la valeur de la concentration en protéines est détaillée dans la section 3.1..

Pour déterminer la taille des nanoparticules, une quantité suffisante (environ 5 μL) de la solution mère de nanoparticules (c'est-à-dire avant concentration) est ajoutée à 600 μL d'eau pour observer convenablement la bande plasmonique provenant des nanoparticules. La mesure de référence est effectuée sur de l'eau. La méthode de détermination de la taille des nanoparticules est détaillée dans la section 3.3.1.1..

Toutes les mesures d'absorption ont été effectuées avec un spectromètre UV-Visible VARIAN Cary 300 et des cellules en quartz ayant un trajet optique de 1 cm.

3.3.1.2. Titrations potentiométriques

Les titrations potentiométriques sont effectuées à l'aide de la cellule électrochimie en couche mince décrite dans la section 2.2.1.2. Afin de conditionner l'échantillon pour les expériences électrochimiques en solution, celui-ci est mélangé à un mélange de 18 médiateurs. Ces médiateurs couvrent une large gamme de potentiels qui permettent de faciliter le transfert d'électrons entre les différents cofacteurs de la protéine redox et l'électrode de travail. Une concentration de 25 μM est utilisée pour chaque médiateur afin de ne pas observer leur contribution dans le spectre UV-Visible.

Médiateur	E_m (vs. ESH) / mV	Solvant
Iodure de (ferrocènyleméthyle)triméthylammonium	+815	Ethanol
Acide 1,1'-ferrocène dicarboxylique	+644	Ethanol
Hexacyanoferrate(II) de potassium trihydraté	+420	Eau
1,1'-diméthylferrocène	+341	Ethanol
Tetrachloro-1,4-benzoquinone	+280	Acétone
Quinhydrone	+278	Ethanol
N,N,N',N'-tétraméthyl-p-phénylènediamine	+270	Eau
2,6-dichlorophénolindophénol de sodium	+217	Ethanol
Chlorure d'hexaamineruthénium(III)	+200	Eau
Acide anthraquinone sulfonique	+185	Ethanol
1,4-naphtoquinone hydratée	+145	Ethanol
Anthraquinone	+100	Ethanol
5-hydroxy-1,4-naphtoquinone	+50	Ethanol
Duroquinone	+10	Ethanol
Ménadione	-12	Acétone

2-hydroxy-1,4-naphtoquinone	-125	Ethanol
Acide 9,10-anthraquinone-2,6-disulfonique	-225	Ethanol
Rouge neutre	-307	Ethanol
Dichlorure de méthylviologène hydraté	-420	Eau

Tableau 3.1: Liste des médiateurs utilisés pour la cellule électrochimique en couche mince.

Pour la titration potentiométrique de la cytochrome *cbb₃* oxydase, les mesures ont été effectuées dans un intervalle de potentiel compris entre -0.09 V et +0.51 V. Le potentiel appliqué est contrôlé manuellement à l'aide d'un potentiostat spécifique. Dans le cas d'une titration oxydative (c'est-à-dire allant des potentiels les plus faibles vers les potentiels les plus élevées), la protéine est complètement réduite (-0.092V pendant environ 10 min) avant de prendre le spectre de référence. Des pas de 25 mV sont ensuite effectués et des temps d'équilibration compris entre 5 min et 60 min sont nécessaires. Pour définir le temps d'équilibration, des spectres successifs sont pris toutes les 5 min jusqu'à ce que le spectre UV-Visible ne présente plus de changements à un potentiel donné (prouvant ainsi que l'équilibre est atteint).

Les conditions pour l'ensemble des titrations potentiométriques effectuées au cours de cette thèse sont données dans un tableau récapitulatif (Tableau 3.2). Toutes les titrations potentiométriques ont été réalisées sur un spectromètre VARIAN Cary 300 avec la cellule électrochimique en couche mince et des fenêtres de CaF₂ de 4 mm.

Enzyme	Titration oxydative (vs. ESH) / V	Titration réductrice (vs. ESH) / V	pH
Cytochrome <i>cbb₃</i>-I	-0.09→+0.51	/	7.5
Cytochrome <i>cbb₃</i>-II	-0.09→+0.51	/	7.5
Cytochrome <i>c₄</i>	-0.19→+0.51	+0.51→-0.19	7.5
Cytochrome <i>c₅</i>	+0.01→+0.51	+0.51→+0.01	7.5
Cytochrome <i>c₅₅₁</i>	+0.01→+0.51	+0.51→+0.01	7.5

Tableau 3.2: Tableau récapitulatif des conditions de travail utilisées pour les différentes titrations.

3.3.2. Spectroscopie infrarouge

3.3.2.1. Mesures en transmission

a. Spectroscopie d'absorption

Cette méthode a été utilisée au cours de cette thèse afin de déterminer la structure secondaire de certaines oxydases terminales en fonction de la température. Pour cela, les échantillons ont été préparés dans un tampon deutéré (KPi 50 mM, 0.02% DDM, pD 7). Ces échantillons sont alors introduits dans une cellule de transmission connectée à un thermostat. Des spectres sont enregistrés à des intervalles de 10 °C entre 5°C et 75°C jusqu'à entière stabilité du spectre obtenu. La détermination de la structure secondaire est ensuite obtenue par déconvolution de la bande Amide I. Cette procédure est détaillée dans la section 2.2.2.2.

Toutes les mesures d'absorption ont été effectuées sur un spectromètre BRUKER Vertex 70 avec une cellule de transmission composée de deux fenêtres de CaF₂, l'une plate, l'autre biseautée. Les spectres obtenus correspondent à une accumulation de 256 scans à une résolution de 4 cm⁻¹.

b. Spectroscopie infrarouge différentielle induite par électrochimie

Au cours de cette thèse, la spectroscopie infrarouge différentielle a été utilisée pour l'étude de plusieurs oxydases terminales. La première étude a permis l'étude de deux isoformes de la cytochrome *cbb*₃ oxydase de *P. stutzeri* alors que la seconde a consisté en l'étude de l'influence du pH sur la cytochrome *ba*₃ oxydase de *T. thermophilus*. Les conditions expérimentales sont mentionnées dans le tableau 3.3. Les expériences ont été menées avec la cellule électrochimique en couche mince décrite dans la section 2.2.1.2. Les solutions tampon utilisées dans chaque cas sont mentionnées dans la section 3.1.

Protéine	Température / °C	pH	Potentiel / V	Temps d'équilibration / min
<i>cbb</i> ₃ -I	12	7.5	-0.19→+0.61	7
<i>cbb</i> ₃ -II	12	7.5	-0.19→+0.61	7
<i>ba</i> ₃	5	6.5-7-7.5-8-8.5	-0.19→+0.61	5
<i>ba</i> ₃ , step hème <i>b</i>	5	6.5	-0.19→+0.28	10
<i>ba</i> ₃ , step hème <i>a</i> ₃	5	6.5	+0.28→+0.61	12
<i>ba</i> ₃ , step hème <i>b</i>	5	7	-0.19→+0.25	10
<i>ba</i> ₃ , step hème <i>a</i> ₃	5	7	+0.25→+0.61	12
<i>ba</i> ₃ , step hème <i>b</i>	5	7.5	-0.19→+0.23	10
<i>ba</i> ₃ , step hème <i>a</i> ₃	5	7.5	+0.23→+0.61	12
<i>ba</i> ₃ , step hème <i>b</i>	5	8.5	+0.22→+0.61	10
<i>ba</i> ₃ , step hème <i>a</i> ₃	5	8.5	-0.19→+0.22	12

Tableau 3.3: Conditions expérimentales des différentes expériences de spectroscopie infrarouge différentielle induite par électrochimie effectuées au cours de la thèse.

Toutes les mesures de spectroscopie infrarouge différentielle induite par électrochimie ont été réalisées à l'aide d'un spectromètre BRUKER Vertex 70 avec la cellule électrochimique en couche mince et de fenêtre de CaF₂ de 4 mm. Les spectres obtenus correspondent à un moyennage d'au moins 10 spectres pris avec 256 scans à une résolution de 4 cm⁻¹.

3.2.2.2. Mesures en réflexion

Les mesures en réflexion ont été effectuées sur un spectromètre BRUKER Vertex 70 modifié avec une cellule de réflexion ATR HARRICK équipé d'un cristal de diamant ou de silicium (pour les mesures nécessitant une exaltation de surface). Tous les spectres ont été mesurés à une résolution de 4 cm⁻¹ et correspondent à une accumulation de 256 scans.

a. Spectroscopie d'absorption

La spectroscopie d'absorption a été utilisée pour mesurer les spectres d'absorption des 2 isoformes de la cytochrome *cbb*₃ oxydase. Pour ce faire, 3 µL de cytochrome *cbb*₃ oxydase sont déposés sur un cristal de diamant avant d'y être séchés. La mesure de référence est prise

sur le cristal nu. La tampon dans lequel a été préparé l'échantillon est spécifié dans la section 3.1.4..

b. Spectroscopie infrarouge en réflexion totale atténuée exaltée de surface

Au cours de cette thèse, la spectroscopie infrarouge en réflexion totale atténuée exaltée de surface a été utilisée pour caractériser les surfaces modifiées pour les mesures électrochimiques. Pour ce faire, un cristal ATR en silicium a été modifié avec une couche d'or de 20 nm d'épaisseur à l'aide d'un métalliseur. 3 μL d'une solution de nanoparticules d'or sont ensuite déposés avant d'être séchés à l'air. 10 μL d'une solution éthanolique à 1 mM de mercaptohexanol et d'hexanethiol sont alors ajoutés sur la surface modifiée. Après 30 min, la surface est rincée afin d'enlever l'excédent de thiols non spécifiquement adsorbés. Pour finir, 3 μL d'une solution à 100 μM de protéines préparés dans le même tampon que pour les mesures électrochimiques sont déposés sur la surface. Après adsorption de l'enzyme, l'excès non spécifiquement adsorbé est supprimé par lavages successifs avec une solution tampon.

3.3.3. Spectroscopie de résonance Raman

La spectroscopie de résonance Raman a été utilisée afin de comparer les deux isoformes de la cytochrome *cbb*₃ oxydase. Pour ce faire, les échantillons ont été séchés sur une fenêtre en silicium. Les deux isoformes de la cytochrome *cbb*₃ oxydase ont été préparées dans un tampon KPi 50 mM (pH7).

Les mesures ont été faites sur un spectromètre Raman Renishaw Invia Raman Microscope à une résolution de 1 cm^{-1} . Pour chaque isoforme, l'excitation a été effectuée à l'aide d'un laser Ar à 457 nm à une puissance de 970 μW afin d'obtenir des signaux exaltés pour les cofacteurs. Un temps d'exposition de 15 s a été utilisé.

3.4. Références

1. Hellwig, P., Yano, T., Ohnishi, T., and Gennis, R. B. (2002) Identification of the Residues Involved in Stabilization of the Semiquinone Radical in the High-Affinity Ubiquinone Binding Site in Cytochrome bo₃ from *Escherichia coli* by Site-Directed Mutagenesis and EPR Spectroscopy, *Biochemistry* *41*, 10675-10679.
2. Kleymann, G., Ostermeier, C., Ludwig, B., Skerra, A., and Michel, H. (1995) Engineered Fv fragments as a tool for the one-step purification of integral multisubunit membrane protein complexes, *Biotechnology (NY)* *13*, 155-160.
3. 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.
4. 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 Expression Purif.* *40*, 299-318.
5. Xie, H., Buschmann, S., Langer, J. D., Ludwig, B., and Michel, H. (2014) Biochemical and biophysical characterization of the two isoforms of cbb₃-type cytochrome c oxidase from *Pseudomonas stutzeri*, *J. Bacteriol.* *196*, 472-482, 412 pp.
6. Turkevich, J., Stevenson, P. C., and Hillier, J. (1951) The nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold, *Discuss. Faraday Soc. No. 11*, 55-75.
7. Frens, G. (1973) Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions, *Nature (London), Phys. Sci.* *241*, 20-22.
8. Haiss, W., Thanh, N. T. K., Aveyard, J., and Fernig, D. G. (2007) Determination of size and concentration of gold nanoparticles from UV-Vis spectra, *Analytical Chemistry* *79*, 4215-4221.
9. Trasatti, S., and Petrii, O. A. (1991) Real surface area measurements in electrochemistry, *Pure Appl. Chem.* *63*, 711-734.

Chapitre IV

Développement de la
méthode : immobilisation de la
cytochrome *b*₀₃ oxydase

4.1. Introduction

Ce chapitre est dédié au développement de la méthode d'immobilisation de protéines membranaires à la surface d'électrodes modifiées avec des nanoparticules d'or. De précédentes études ont déjà été établies concernant l'immobilisation de protéines solubles sur des nanomatériaux, notamment sur des nanoparticules d'or⁽¹⁻⁴⁾ ou des nanotubes de carbone⁽⁵⁻⁸⁾. Cependant, l'immobilisation de protéines membranaires représente un vrai challenge puisque plusieurs difficultés sont à surmonter (voir section 1.6.1.). La stratégie la plus communément employée dans la littérature consiste en l'immobilisation de l'enzyme via un hexa-histidine Tag (His-Tag) qui est traditionnellement utilisé par les biologistes lors de l'étape de purification de la protéine. Cet His-Tag permet d'obtenir un parfait contrôle de l'orientation de la protéine à la surface de l'électrode ainsi que la reconstruction d'un environnement biomimétique par la reconstitution d'une membrane lipidique⁽⁹⁻¹¹⁾. Il possède malheureusement l'inconvénient de ne pas être applicable à toutes les enzymes puisque celui-ci doit être placé de façon à permettre le transfert d'électron. C'est pourquoi, au cours de cette thèse, nous avons choisi de développer une méthode ne nécessitant pas l'introduction d'un His-Tag dans la protéine et permettant ainsi de pallier cette difficulté. Elle se base sur l'exploitation de la large surface hydrophobe de cette classe de protéines⁽¹²⁾ grâce à l'utilisation d'un mélange d'hexanethiol et de mercaptohexanol. Cette méthode a été développée sur la cytochrome *bo*₃ oxydase. Ce système a été choisi car il a déjà été immobilisé par Jeuken et al.⁽¹³⁾ et il nous a donc été possible de comparer nos résultats avec la littérature. Afin d'obtenir une meilleure compréhension de notre système, nous sommes également intéressés à l'influence de la taille des nanoparticules⁽¹⁴⁻¹⁶⁾ sur les signaux électrochimiques obtenus.

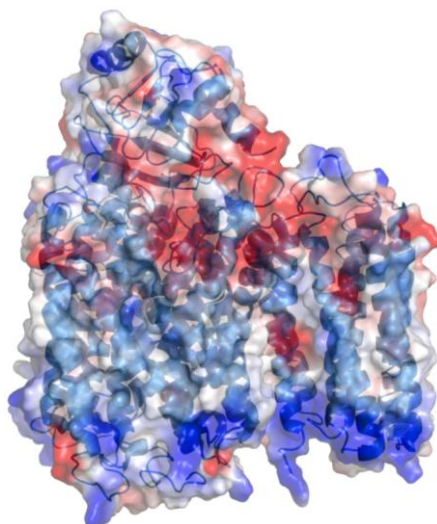


Figure 4.1 : Superposition de la structure cristallographique de la cytochrome bo_3 oxydase⁽¹²⁾ et de sa surface électrostatique (calculée dans le vide). La surface hydrophobe est représentée en gris.

4.2. Etude de la cytochrome bo_3 oxydase immobilisés sur des nanoparticules d'or de 15 nm

La figure 4.2 montre les cyclovoltammogrammes de la cytochrome bo_3 oxydase en présence et en absence d'oxygène à pH 7. Les mesures en absence de protéine et en absence de nanoparticules sont également présentées.

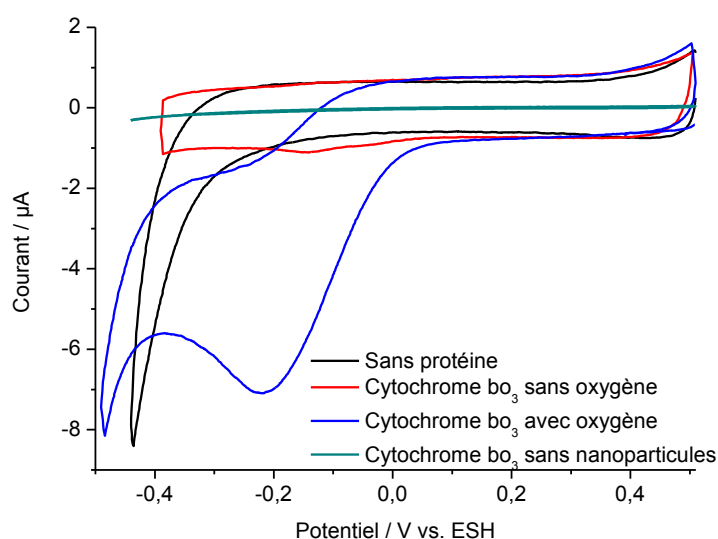


Figure 4.2 : Cyclovoltammogrammes de la cytochrome bo_3 oxydase immobilisée sur des nanoparticules d'or de 15 nm en présence (courbe bleue) et en absence d'oxygène (courbe rouge), de la cytochrome bo_3 en présence d'oxygène et sans nanoparticules (courbe verte) et des nanoparticules d'or en absence de protéines (courbe noire). Toutes les mesures ont été effectuées dans un tampon phosphate (50 mM, pH 7) à $v=0.02$ V/s.

Le cyclovoltammogramme en absence d'oxygène présente un large signal cathodique et un très faible signal anodique à environ -0.13 V. En présence d'oxygène, le signal cathodique se transforme en une large vague cathodique à -0.22 V. Le signal anodique a, quant à lui, totalement disparu et traduit ainsi l'irréversibilité du transfert d'électrons. Ces deux observations semblent traduire l'apparition d'un signal électrocatalytique en présence d'oxygène. La cytochrome *bo*₃ oxydase étant en mesure de réduire l'oxygène en eau, le signal électrocatalytique observé en présence d'oxygène semble correspondre à ce phénomène. La protéine a également été immobilisée en absence de nanoparticules mais dans ce cas, aucun signal n'est observé.

Les nanoparticules d'or étant connues pour réduire l'oxygène électrocatalytiquement⁽¹⁷⁻²⁰⁾, une mesure de contrôle a été effectuée. Le signal observé à -0.22 V en présence de la protéine n'est cependant pas observé sur les nanoparticules seules et prouve, par conséquent, que la vague cathodique observée est bien due à la réduction électrocatalytique de l'oxygène par la cytochrome *bo*₃ oxydase.

La méthode d'immobilisation utilisée permet l'immobilisation d'oxydases terminales tout en conservant leur activité. Toutefois, une des problématiques majeures de l'électrochimie directe de protéines immobilisées sur une électrode est le contrôle de l'orientation. Notre méthode étant basée sur l'utilisation de la large surface hydrophobe présente sur les protéines membranaires, le contrôle de l'orientation est beaucoup plus aléatoire comparativement aux méthodes utilisant l'His-Tag. C'est pourquoi il est nécessaire de s'intéresser plus particulièrement à cette question par l'intermédiaire de différentes caractérisations.

4.3. Estimation de l'orientation de la protéine sur la surface modifiée

4.3.1. Etude de l'inhibition de la protéine par du cyanure

Les oxydases hèmes-cuivre sont connues comme étant sensibles à au cyanure (CN⁻)⁽²¹⁾. Celui-ci se fixe sur le centre actif bimétallique pour remplacer l'oxygène. Cette mesure a donc pour but de confirmer que la réduction de l'oxygène observé correspond à celle catalysée par la cytochrome *bo*₃ oxydase, de déterminer si des signaux des hèmes peuvent être observés sous la large vague cathodique et d'estimer quel est l'hème observé le cas échéant puisque le cyanure ne peut se coordonner qu'à l'hème haut spin (hème *o*₃). La figure 4.3 montre

l'évolution du courant catalytique en fonction de la concentration en CN^- observé par voltampérométrie cyclique.

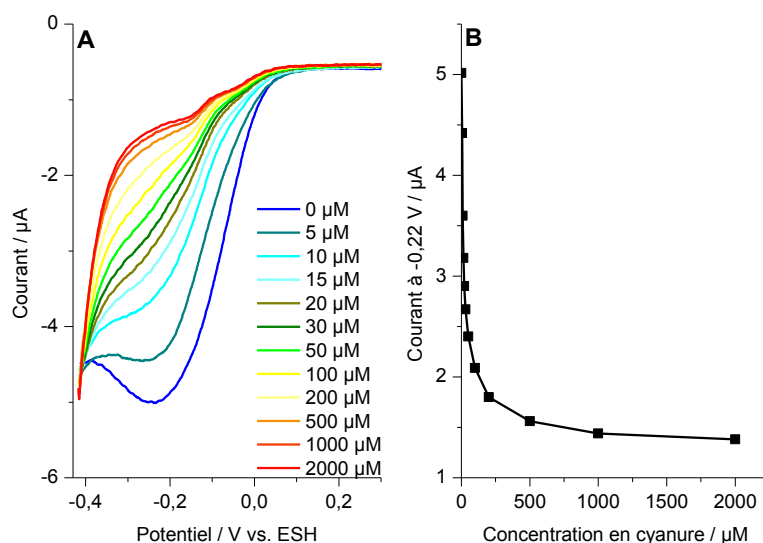


Figure 4.3 : Cyclovoltammogrammes à différentes concentrations en CN^- de la cytochrome bo_3 oxydase immobilisée sur des nanoparticules d'or de 15 nm (A); influence de la concentration en cyanure sur le courant catalytique (B).

Par mesure de clarté, seul le cycle allant des potentiels positifs aux potentiels négatifs est représenté. L'addition de CN^- dans la solution tampon a engendré une diminution continue du courant catalytique jusqu'à atteindre un plateau aux fortes concentrations en CN^- . Cette diminution du courant catalytique est également accompagnée d'un décalage de la vague catalytique vers des potentiels plus faibles. Ces observations sont une preuve supplémentaire que la réduction electrocatalytique de l'oxygène observée provient bien de la protéine. Lors de l'inhibition complète, des faibles signaux sont toujours présents. Il est à noter que ceux-ci sont comparables aux signaux obtenus en absence d'oxygène et en absence de CN^- (Figure 4.4).

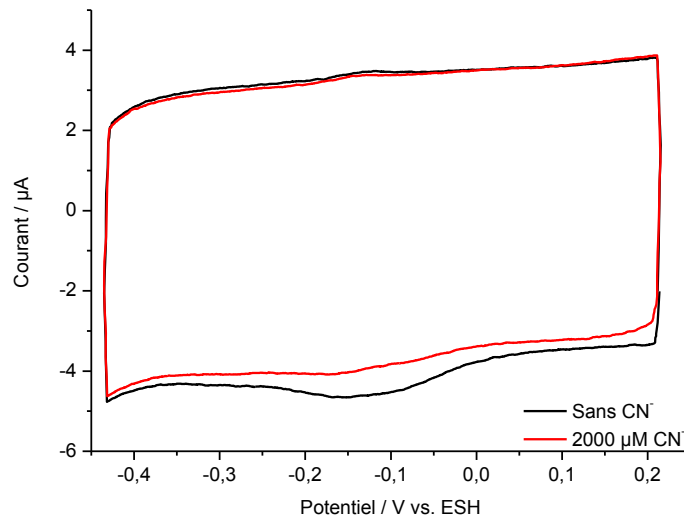


Figure 4.4 : Cyclovoltammogrammes de la cytochrome bo_3 oxydase en présence (courbe rouge) et en absence de CN^- (courbe noire). Les mesures ont été effectuées dans un tampon phosphate dégazé à l'argon (50 mM, pH 7) à $v=0.02$ V/s.

Cette observation semble donc montrer que l'hème o_3 n'est pas impliqué dans le signal obtenu puisque l'addition de CN^- aurait dû entraîner un décalage de son potentiel.

A partir des mesures effectuées, il a également été possible de déterminer la concentration inhibitrice 50 (CI 50) qui correspond à la concentration en cyanure nécessaire pour inhiber 50% de la protéine à la surface de l'électrode. Celle-ci a été obtenue à 15 μM . Cette CI 50 est supérieure aux 8 μM obtenus par Weiss et al.⁽¹¹⁾ mais reste toutefois dans le même ordre de grandeur. Cette différence peut s'expliquer par la plus grande concentration surfacique de protéines obtenue sur les nanoparticules ou éventuellement par l'orientation de la protéine dans la modification de surface rendant l'accès du CN^- plus difficile.

4.3.2. Etude de la dépendance pH

La figure 4.5 montre les cyclovoltammogrammes de la cytochrome bo_3 oxydase sur des nanoparticules d'or de 15 nm à différents pH en absence d'oxygène.

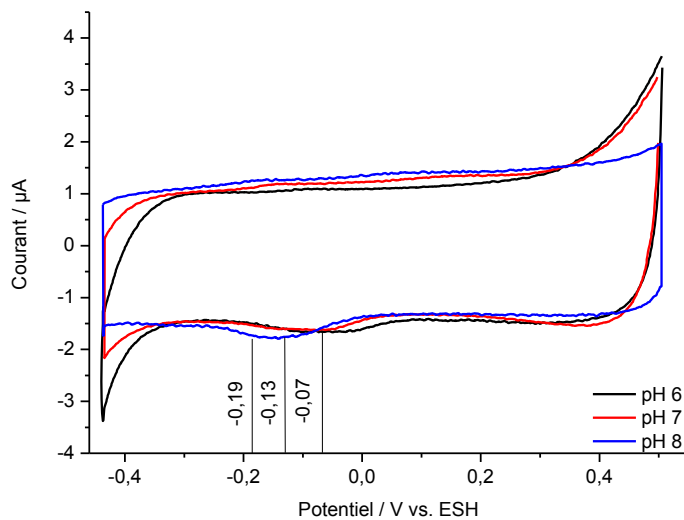


Figure 4.5 : Cyclovoltammogrammes de la cytochrome bo_3 oxydase immobilisée sur des nanoparticules d'or de 15 nm à pH 6 (courbe noire), pH 7 (courbe rouge) et pH 8 (courbe bleue) à $v=0.02$ V/s.

Dans les trois cas, un large signal cathodique et un très faible signal anodique sont observés. Un décalage du potentiel de 60 mV par unité de pH est observé entre pH 6 et pH 8. Ce décalage de potentiel peut typiquement être observé lors de la réaction d'oxydoréduction de la quinone Q/QH_2 qui implique deux électrons et deux protons. Cependant, le potentiel redox observé ne correspond pas au potentiel redox de la quinone libre Q/QH_2 qui est de l'ordre de 100 mV à pH 7⁽²²⁾. Cette différence peut s'expliquer par l'environnement électrostatique de la quinone puisque celle-ci, présente en tant que substrat dans la cytochrome bo_3 oxydase, peut-être dans un environnement possédant des résidus chargés mais également interagir avec d'autres cofacteurs présents dans la protéine la rendant ainsi plus difficile à réduire contrairement à la quinone libre.

4.3.3. Etude de la cytochrome bo_3 oxydase sans quinone

La figure 4.7 montre les cyclovoltammogrammes de la cytochrome bo_3 oxydase sans quinone immobilisée sur des nanoparticules d'or de 15 nm en présence et en absence d'oxygène à pH 7.

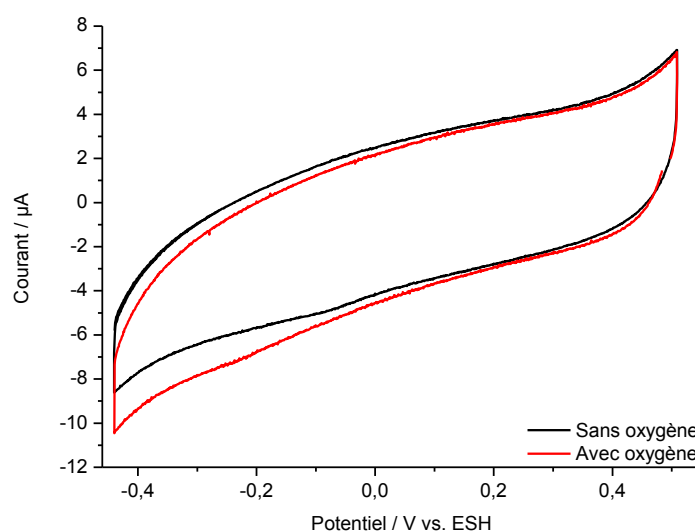


Figure 4.6 : Cyclovoltammogrammes de la cytochrome *bo*₃ oxydase sans quinone immobilisée sur des nanoparticules d'or de 15 nm en présence (courbe rouge) et en absence d'oxygène (courbe noire). Les mesures ont été effectuées dans un tampon phosphate (50 mM, pH 7) à $v=0.02$ V/s.

Un faible signal cathodique est observé en absence d'oxygène. En présence d'oxygène, ce faible signal disparaît et une très faible vague apparaît. Cette faible vague semble traduire une très faible activité de la protéine pour la réduction de l'oxygène et confirme un transfert d'électron initial de l'électrode à la quinone. Ces résultats pourraient également traduire un transfert d'électrons vers un autre cofacteur que la quinone, par exemple l'hème *b*. Cependant, il est impossible de dire avec certitude qu'une partie de la protéine est orientée de façon à transférer les électrons directement à l'hème *b* car il se peut qu'une faible proportion de protéine contienne toujours de la quinone.

4.3.4. Etude par spectroscopie infrarouge en réflexion totale atténuée exaltée de surface (ATR-SEIRAS)

La modification de surface effectuée sur une électrode peut être suivie par spectroscopie infrarouge (Figure 4.7)^(23, 24).

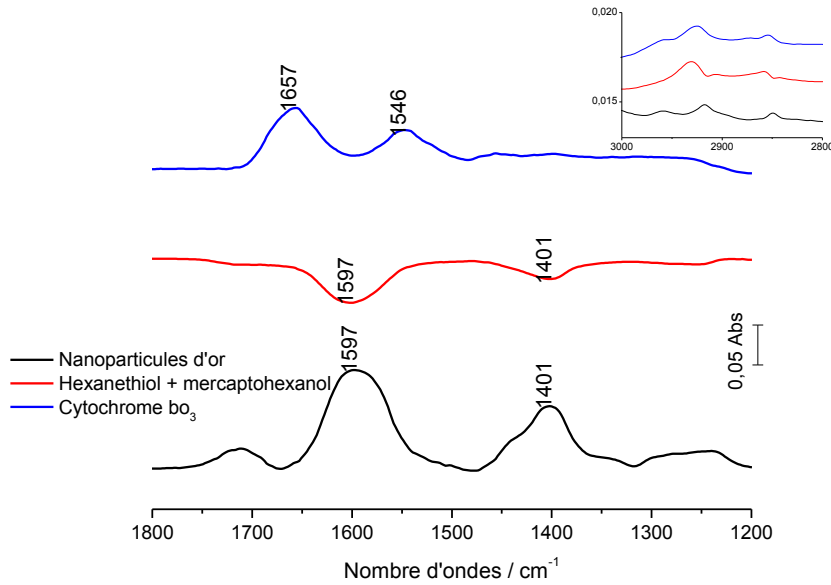


Figure 4.7 : Suivi par spectroscopie infrarouge en réflexion totale atténuée exaltée de surface des différentes étapes de la modification de surface effectuée en électrochimie. L'insert correspond aux signaux $\nu(\text{C-H})$ aux différentes étapes de la modifications observés entre entre 3000 et 2800 cm^{-1} .

Pour cela, un cristal de silicium modifié avec une couche d'or de 20 nm d'épaisseur est utilisé. Dans un premier temps, les nanoparticules sont déposées sur la surface et les signaux caractéristiques des citrates de sodium servant à stabiliser les nanoparticules sont visibles à 1597 cm^{-1} et 1401 cm^{-1} ⁽²⁵⁾. Ces nanoparticules sont ensuite modifiées avec le mélange d'hexanethiol et de mercaptohexanol. Cette modification engendre l'apparition de bandes négatives correspondant à la désorption des citrates et de bandes positives à 2930 cm^{-1} et 2858 cm^{-1} prouvant l'adsorption du mélange de thiols. La dernière étape de la modification correspond au dépôt de la protéine et est caractérisée par l'apparition de deux bandes caractéristiques des protéines : la bande Amide I à 1657 cm^{-1} et la bande Amide II à 1546 cm^{-1} . La bande Amide I est caractéristique de la structure secondaire de la protéine et permet donc d'obtenir des informations quant à l'intégrité de la structure sur les nanoparticules modifiées⁽²⁶⁻²⁸⁾. Un signal à 1657 cm^{-1} est typiquement observé pour des protéines principalement constituées par des hélices α , ce qui est bien le cas pour la cytochrome bo_3 oxydase.

Cette technique peut apporter des informations quant à l'orientation de la protéine sur la surface modifiée puisque de par la nature du phénomène d'exaltation (qui privilégie l'exaltation des changements de moments dipolaires perpendiculaires à la surface), il est possible d'estimer l'orientation de la protéine sur une surface modifiée en déterminant le rapport Amide I/Amide II⁽²⁹⁾. Plus ce rapport est grand, plus la protéine est orientée

perpendiculairement à la surface. En effet, la bande Amide I est composée essentiellement de la vibration $\nu(\text{C}=\text{O})$ dont les changements de moments dipolaires sont parallèles à l'axe des hélices alors que la bande Amide II contient principalement les vibrations $\delta(\text{N-H})$ et $\nu(\text{C-N})$ dont les changements de moments dipolaires sont perpendiculaires à l'axe des hélices. Sachant que l'exaltation des signaux est observée pour les modes perpendiculaires à la surface, le rapport Amide I/Amide II devrait être d'autant plus grand que la protéine est orientée perpendiculairement à la surface⁽³⁰⁾. Typiquement, des valeurs supérieures à 1.5 sont observées pour une orientation des hélices perpendiculaires à la surface⁽²⁹⁾. Dans notre cas, un rapport de 1.6 est obtenu montrant donc que la protéine semble être orientée de façon à ce que les hélices α soient perpendiculaires à la surface.

Toutes les observations discutées dans la partie 4.3 semblent donc converger vers une immobilisation de la cytochrome *bo*₃ oxydase permettant un transfert d'électrons entre la surface de l'électrode et la quinone. Une très faible proportion du signal immobilisation permettant un transfert d'électrons vers l'hème *b* est envisageable mais ne peut pas être attribué avec certitude. La présence du signal de l'hème *b* pourrait présenter deux explications :

- La protéine est orientée de façon inhomogène à la surface avec une majeure partie de la protéine orientée de façon à permettre le transfert d'électrons vers la quinone et une partie minoritaire permettant un transfert vers l'hème *b*.
- La protéine est orientée de façon homogène à la surface mais la quinone est située à une distance plus faible de la surface de l'électrode que l'hème *b* facilitant ainsi cinétiquement le transfert d'électrons par effet tunnel vers la quinone plutôt que vers l'hème *b*.

4.4. Etude de l'influence de la taille des nanoparticules

4.4.1. Détermination de la taille des nanoparticules d'or

Afin de synthétiser des nanoparticules d'or de tailles différentes, la méthode de synthèse des nanoparticules d'or de 15 nm a été adaptée^(31, 32). Pour la synthèse des nanoparticules d'or de 15 nm, 4 équivalents de citrates de sodium pour un équivalent d'acide tétrachloroaurique sont

utilisés. Pour obtenir des nanoparticules d'or de taille supérieure, le nombre d'équivalents de citrate de sodium est diminué.

La taille des nanoparticules d'or et leur dispersité est estimée par spectroscopie UV-Visible⁽³³⁾. La figure 4.8 présente les spectres UV-Visible des trois synthèses de nanoparticules d'or obtenus en faisant varier le nombre d'équivalents en citrate de sodium.

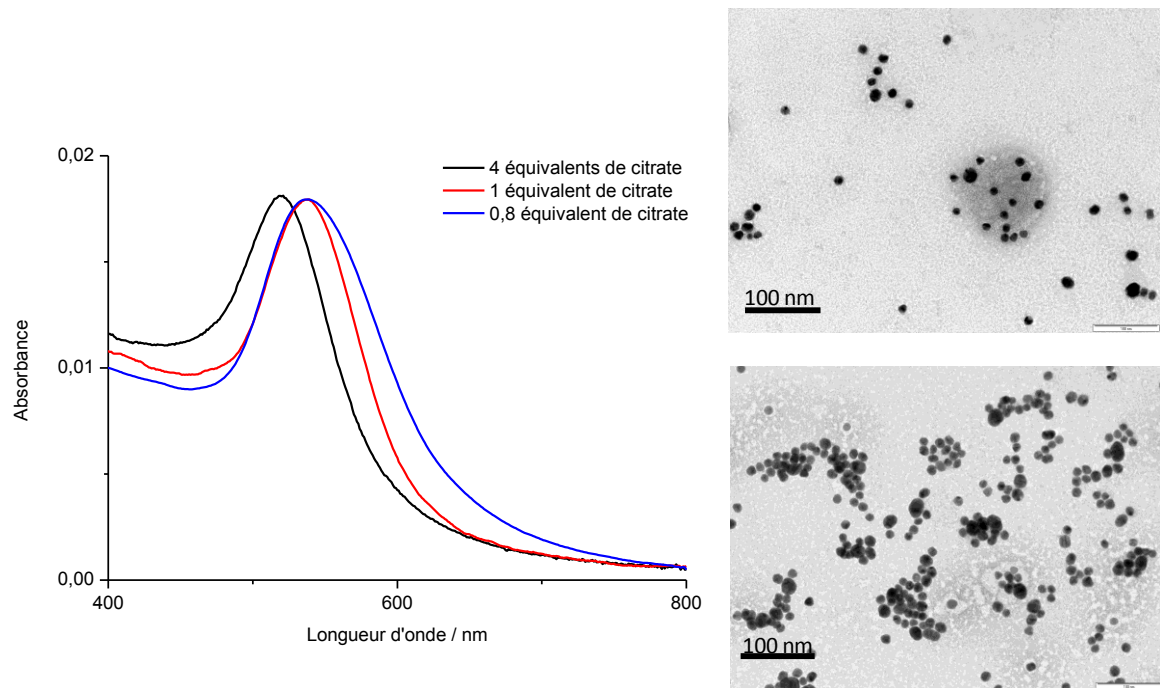


Figure 4.8 : Spectres Visible de différentes synthèses de nanoparticules d'or avec 4 équivalents de citrates (courbe noire), 1 équivalent de citrate (courbe rouge) et 0.8 équivalents de citrate (courbe bleue) et images TEM confirmant la taille et la monodispersité des particules.

Dans chaque cas, une bande plasmonique est observée prouvant que des nanoparticules d'or ont bien été obtenues. La taille de ces nanoparticules est alors déterminée grâce à la méthode élaborée par Haiss et al.⁽³⁴⁾.

Nombre d'équivalents de citrates	A_{\max}/A_{450}	Position de A_{\max}	Taille des nanoparticules / nm
4	1.62	520	14-16
1	1.87	537	30-35
0.8	2.04	540	50-55

Tableau 4.1 : Caractéristiques des spectres Visible des différentes synthèses de nanoparticules d'or et estimation de leur taille.

Il est ici bien constaté que plus le nombre d'équivalents en citrates de sodium augmente, plus la taille des nanoparticules diminue. Cette diminution de la taille plasmonique est bien corrélée avec un déplacement hypsochrome du maximum de la bande plasmonique (A_{max}).

La dispersité peut, quant à elle, être estimée à partir de la largeur de la bande plasmonique⁽³³⁾. Des nanoparticules d'or assez monodisperses sont obtenues dans chaque cas. Cependant, il est constaté que la polydispersité augmente lorsque la taille des nanoparticules augmente.

Les résultats obtenus par spectroscopie UV-Vis ont pu être confirmés par des analyses par microscopie électronique à transmission (mesures effectuées par les Dr. Marc Schmutz et Christian Blanck à la Plateforme de Microscopie Electronique de Cronenbourg).

4.4.2. Augmentation de la surface de l'électrode

Les nanoparticules d'or sont communément utilisées afin d'augmenter la surface électroactive d'une électrode. Cette caractéristique est particulièrement intéressante en ce qui concerne l'étude de protéines membranaires puisque celles-ci ne sont généralement disponibles qu'en faibles volumes et faibles concentrations. La figure 4.9 présente les cyclovoltammogrammes obtenus après 3 dépôts de nanoparticules d'or de 15 nm, 35 nm et 55 nm.

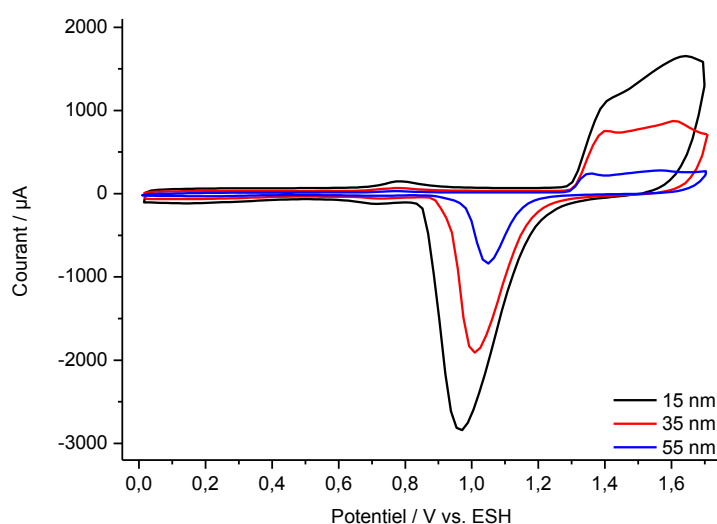


Figure 4.9 : Cyclovoltammogrammes obtenus après 3 dépôts de nanoparticules d'or de 15 nm (courbe noire), de 35 nm (courbe rouge) et de 55 nm (courbe bleue). Mesures effectuées dans H₂SO₄ 0.1 M à v=0.1 V/s.

La taille de la surface électroactive peut être déduite à partir de l'intégration du pic de réduction situé aux alentours de 1 V. Les surfaces obtenues pour les nanoparticules de 15 nm, 35 nm et 55 nm sont respectivement de 15 cm^2 , 8 cm^2 et 2.5 cm^2 . On constate donc que la surface obtenue après dépôt est inversement proportionnelle à la taille des nanoparticules.

4.4.3. Influence de la taille des nanoparticules sur la catalyse

La figure 4.10 présente les cyclovoltammogrammes avant dépôt de la cytochrome bo_3 oxydase et après dépôt de la cytochrome bo_3 oxydase en présence et en absence d'oxygène sur des nanoparticules d'or de différentes tailles.

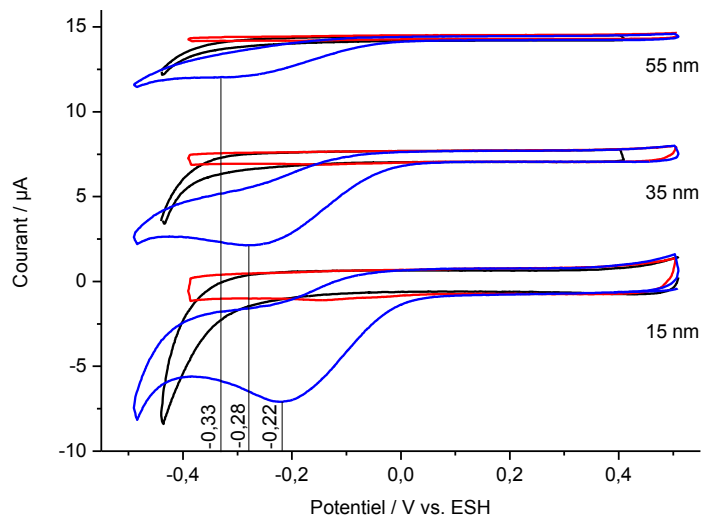


Figure 4.10 : Cyclovoltammogrammes avant dépôt de la protéine (courbes noires) et après dépôt de la cytochrome bo_3 oxydase en absence (courbes rouges) et en présence d'oxygène (courbes bleues). Les mesures ont été effectuées dans un tampon phosphate (50 mM, pH 7) à $v=0.02$ V/s.

Dans les trois cas, aucun signal n'est observé en absence de protéine. Après dépôt de la protéine, un large signal cathodique et un plus faible signal anodique sont présents dans chaque cas en absence d'oxygène. Les taux de couverture observés sont de l'ordre de 3-4 $pmol/cm^2$ dans chaque cas. En présence d'oxygène, le faible signal anodique disparaît et le signal cathodique se transforme en une large vague typique d'une réduction électrocatalytique. Cependant, plus la taille des nanoparticules augmente, plus le potentiel de réduction de l'oxygène est décalé vers les potentiels plus faibles c'est-à-dire que lorsque la protéine est immobilisée sur des nanoparticules de diamètre élevé, la réduction de l'oxygène est obtenue avec une surtension plus élevée. On peut donc penser que les nanoparticules d'or

de faible diamètre permettent d'obtenir des taux de transfert d'électrons plus élevés. Toutefois, en prenant en compte que les taux de couverture sont du même ordre de grandeur dans chaque cas alors que la surface électroactive disponible induite par les nanoparticules est différente, il est possible de penser que la différence de potentiel observée peut provenir d'une différence de compacité.

Une étude comparable a été proposée par Suzuki et al. en immobilisant le cytochrome c , la bilirubine oxydase et la fructose déshydrogénase sur des nanoparticules de 7 nm, 15 nm et 70 nm⁽¹⁴⁾. Dans chaque cas, les plus fortes densités de courant ont été obtenues lorsque la taille des nanoparticules était supérieure à la taille des protéines. Ils ont donc démontré l'importance de la distance entre les protéines. La taille optimale des nanoparticules pour l'immobilisation du cytochrome c a été proposée à 15 nm alors qu'elle est de 70 nm pour la bilirubine oxydase et la fructose déshydrogénase. Ces résultats ne vont pas dans le sens des résultats présentés ici puisque la cytochrome bo_3 possède une taille comparable à celle de la bilirubine oxydase. Par conséquent, de meilleurs résultats sur des nanoparticules de 55 nm étaient attendus.

4.5. Conclusion

Ce chapitre décrit la mise au point d'une méthode permettant l'immobilisation d'oxydases terminales tout en conservant leur activité catalytique. Une des principales questions concernant l'immobilisation d'enzymes sur des surfaces est de connaître leur orientation. Nous avons essayé d'apporter une réponse à cette question à travers diverses expériences permettant de discriminer les cofacteurs un par un : quinone, hème b , hème o_3 . De plus, nous avons utilisé la spectroscopie infrarouge afin de pouvoir caractériser l'orientation et l'intégrité de la structure sur la surface modifiée. Ces différents éléments nous ont apporté des réponses nous permettant de penser que le transfert d'électron interfacial s'effectue essentiellement entre l'électrode et la quinone.

L'étude de l'influence de la taille des nanoparticules d'or a également permis de montrer que ce point était crucial dans l'observation du potentiel de réduction de l'oxygène puisque celui-ci est décalé vers les potentiels plus faibles lorsque la taille des nanoparticules augmente.

Ce chapitre pose donc les bases pour les études d'autres oxydases terminales qui seront discutées dans les chapitres à suivre.

4.6. Références

1. 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, *J. Phys. Chem. B* 115, 7165-7170.
2. Murata, K., Kajiya, K., Nukaga, M., Suga, Y., Watanabe, T., Nakamura, N., and Ohno, H. (2009) 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.
3. 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.
4. Zayats, M., Katz, E., Baron, R., and Willner, I. (2005) Reconstitution of Apo-Glucose Dehydrogenase on Pyrroloquinoline Quinone-Functionalized Au Nanoparticles Yields an Electrically Contacted Biocatalyst, *J. Am. Chem. Soc.* 127, 12400-12406.
5. Patolsky, F., Weizmann, Y., and Willner, I. (2004) Long-range electrical contacting of redox enzymes by SWCNT connectors, *Angew. Chem., Int. Ed.* 43, 2113-2117.
6. Katz, E., and Willner, I. (2004) Biomolecule-functionalized carbon nanotubes: Applications in nanobioelectronics, *ChemPhysChem* 5, 1084-1104.
7. Guiseppi-Elie, A., Lei, C., and Baughman, R. H. (2002) Direct electron transfer of glucose oxidase on carbon nanotubes, *Nanotechnology* 13, 559-564.
8. Liu, J., Chou, A., Rahmat, W., Paddon-Row, M. N., and Gooding, J. J. (2005) Achieving direct electrical connection to glucose oxidase using aligned single walled carbon nanotube arrays, *Electroanalysis* 17, 38-46.
9. 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.
10. 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, *Biophys. J.* 94, 3698-3705.
11. Weiss, S. A., Bushby, R. J., Evans, S. D., and Jeuken, L. J. C. (2010) A study of cytochrome bo₃ in a tethered bilayer lipid membrane, *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* 1797, 1917-1923.
12. Abramson, J., Riistama, S., Larsson, G., Jasaitis, A., Svensson-Ek, M., Laakkonen, L., Puustinen, A., Iwata, S., and Wikstrom, M. (2000) The structure of the ubiquinol oxidase from *Escherichia coli* and its ubiquinone binding site, *Nat. Struct. Biol.* 7, 910-917.
13. Jeuken, L. J. C., Connell, S. D., Henderson, P. J. F., Gennis, R. B., Evans, S. D., and Bushby, R. J. (2006) Redox Enzymes in Tethered Membranes, *J. Am. Chem. Soc.* 128, 1711-1716.
14. Suzuki, M., Murata, K., Nakamura, N., and Ohno, H. (2012) The effect of particle size on the direct electron transfer reactions of metalloproteins using Au nanoparticle-modified electrodes, *Electrochemistry (Tokyo, Jpn.)* 80, 337-339.
15. Shang, W., Nuffer, J. H., Muniz-Papandrea, V. A., Colon, W., Siegel, R. W., and Dordick, J. S. (2009) Cytochrome c on silica nanoparticles: influence of nanoparticle size on protein structure, stability, and activity, *Small* 5, 470-476.

16. Jiang, X., Jiang, J., Jin, Y., Wang, E., and Dong, S. (2005) Effect of Colloidal Gold Size on the Conformational Changes of Adsorbed Cytochrome c: Probing by Circular Dichroism, UV-Visible, and Infrared Spectroscopy, *Biomacromolecules* 6, 46-53.
17. El-Deab, M. S., and Ohsaka, T. (2002) An extraordinary electrocatalytic reduction of oxygen on gold nanoparticles-electrodeposited gold electrodes, *Electrochem. Commun.* 4, 288-292.
18. Zhang, Y., Suryanarayanan, V., Nakazawa, I., Yoshihara, S., and Shirakashi, T. (2004) Electrochemical behavior of Au nanoparticle deposited on as-grown and O-terminated diamond electrodes for oxygen reduction in alkaline solution, *Electrochim. Acta* 49, 5235-5240.
19. Bruelle, T., Ju, W., Niedermayr, P., Denisenko, A., Paschos, O., Schneider, O., and Stimming, U. (2011) Size-dependent electrocatalytic activity of gold nanoparticles on HOPG and highly boron-doped diamond surfaces, *Molecules* 16, 10059-10077.
20. Hernandez, J., Solla-Gullon, J., and Herrero, E. (2004) Gold nanoparticles synthesized in a water-in-oil microemulsion: electrochemical characterization and effect of the surface structure on the oxygen reduction reaction, *J. Electroanal. Chem.* 574, 185-196.
21. Tsubaki, M., Mogi, T., Hori, H., Sato-Watanabe, M., and Anraku, Y. (1996) Infrared and EPR studies on cyanide binding to the heme-copper binuclear center of cytochrome bo-type ubiquinol oxidase from Escherichia coli. Release of a CuB-cyano complex in the partially reduced state, *J. Biol. Chem.* 271, 4017-4022.
22. Urban, P. F., and Klingenberg, M. (1969) Redox potentials of ubiquinone and cytochrome β in the respiratory chain, *Eur. J. Biochem.* 9, 519-525.
23. Ataka, K., Kottke, T., and Heberle, J. (2010) Thinner, Smaller, Faster: IR Techniques To Probe the Functionality of Biological and Biomimetic Systems, *Angew. Chem., Int. Ed.* 49, 5416-5424.
24. Ataka, K., and Heberle, J. (2007) Biochemical applications of surface-enhanced infrared absorption spectroscopy, *Anal. Bioanal. Chem.* 388, 47-54.
25. Ojea-Jimenez, I., Romero, F. M., Bastus, N. G., and Puntès, V. (2010) Small Gold Nanoparticles Synthesized with Sodium Citrate and Heavy Water: Insights into the Reaction Mechanism, *J. Phys. Chem. C* 114, 1800-1804.
26. Goormaghtigh, E., Cabiaux, V., and Ruyschaert, J.-M. (1994) Determination of soluble and membrane protein structure by Fourier transform infrared spectroscopy. III. Secondary structures, *Subcell. Biochem.* 23, 405-450.
27. Arrondo, J. L. R., Muga, A., Castresana, J., and Goni, F. M. (1993) Quantitative studies of the structure of proteins in solution by Fourier-transform infrared spectroscopy, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 59, 23-56.
28. Barth, A., and Zscherp, C. (2002) What vibrations tell about proteins, *Q. Rev. Biophys.* 35, 369-430.
29. Todorovic, S., Verissimo, A., Wisitruangsakul, N., Zebger, I., Hildebrandt, P., Pereira, M. M., Teixeira, M., and Murgida, D. H. (2008) SERR-Spectroelectrochemical Study of a cbb3 Oxygen Reductase in a Biomimetic Construct, *J. Phys. Chem. B* 112, 16952-16959.
30. Marsh, D., Muller, M., and Schmitt, F.-J. (2000) Orientation of the infrared transition moments for an α -helix, *Biophys. J.* 78, 2499-2510.
31. Frens, G. (1973) Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions, *Nature (London), Phys. Sci.* 241, 20-22.
32. Panigrahi, S., Basu, S., Praharaj, S., Pande, S., Jana, S., Pal, A., Ghosh, S. K., and Pal, T. (2007) Synthesis and Size-Selective Catalysis by Supported Gold Nanoparticles:

- Study on Heterogeneous and Homogeneous Catalytic Process, *J. Phys. Chem. C* *111*, 4596-4605.
33. Daniel, M.-C., and Astruc, D. (2004) Gold Nanoparticles: Assembly, Supramolecular Chemistry, Quantum-Size-Related Properties, and Applications toward Biology, Catalysis, and Nanotechnology, *Chem. Rev. (Washington, DC, U. S.)* *104*, 293-346.
34. Haiss, W., Thanh, N. T. K., Aveyard, J., and Fernig, D. G. (2007) Determination of size and concentration of gold nanoparticles from UV-Vis spectra, *Anal. Chem.* *79*, 4215-4221.

Chapitre V

Etude de l'inhibition de la cytochrome *aa*₃ oxydase

5.1. Introduction

Dans ce chapitre, une étude de l'inhibition de la cytochrome *aa*₃ oxydase de *P. denitrificans* par le zinc (Zn^{2+}) est envisagée.

L'inhibition des fonctions de la cytochrome *aa*₃ oxydase peut être obtenue par deux voies. La première méthode consiste à coordiner une autre molécule que l'oxygène au niveau du site actif de façon à bloquer la réduction catalytique de l'oxygène⁽¹⁾ ; les molécules typiquement utilisées pour ce type d'inhibition sont le monoxyde de carbone (CO)^(2, 3), le cyanure (CN)^(4, 5), le sulfure d'hydrogène (H₂S)⁽⁶⁻⁸⁾ ou le monoxyde d'azote (NO)⁽⁹⁾.

La deuxième méthode consiste à bloquer les chemins de protons par des cations divalents comme le zinc ou le cadmium. Ce mode d'inhibition a été discuté dans la littérature pour d'autres systèmes impliquant un transfert d'électrons et de protons concertés, notamment au niveau de la chaîne respiratoire, comme la NADH:ubiquinone reductase^(10, 11) ou le complexe *bc*₁^(12, 13). L'inhibition par le zinc de la cytochrome *aa*₃ oxydase, aussi bien bactérienne⁽¹⁴⁻¹⁷⁾ que mitochondriale⁽¹⁸⁻²¹⁾, est aujourd'hui bien acceptée par la communauté même si les conditions de coordination et les sites de liaisons restent controversés. En effet, il est communément discuté que Zn^{2+} peut se lier aux sites d'entrée des chemins de protons par contre, la coordination du Zn^{2+} à la sortie des chemins de protons est plus mal acceptée. Ce travail est en plus rendu difficile par le fait que la structure du chemin de sortie des protons n'est pas connue à ce jour. D'autre part, les conditions de liaisons du Zn^{2+} semblent mal connues puisque la nécessité d'un potentiel de membrane reste matière à débat.

Afin de répondre à ces questions, nous proposons l'utilisation de l'électrochimie directe des protéines. Pour ce faire, l'électrochimie de la cytochrome *aa*₃ oxydase inhibée par le zinc sera comparée à celle inhibée par le cyanure. Une étude de certains mutants bloquant les chemins de protons sera présentée. La comparaison des différents effets nous permettra d'apporter des éléments de réponse à cette problématique.

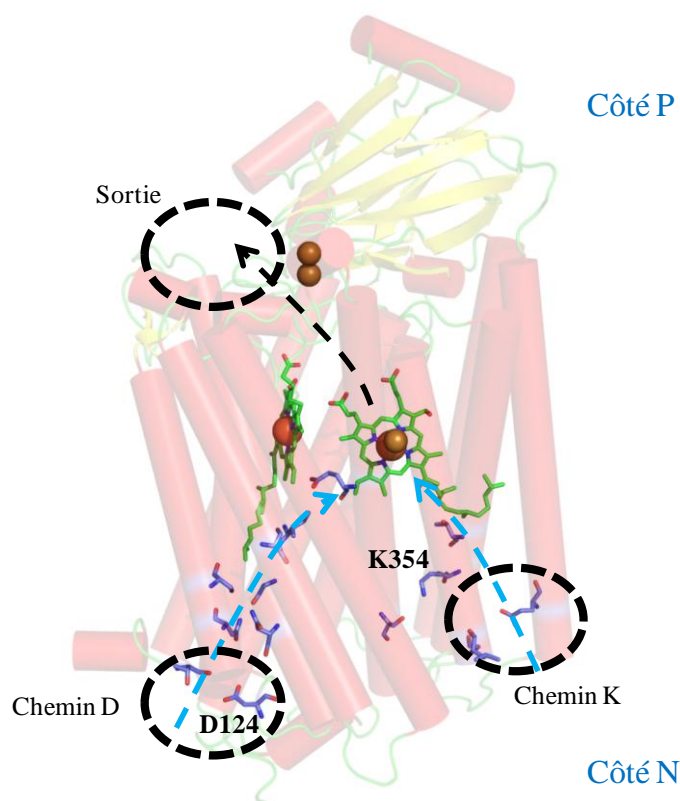


Figure 5.1 : Structure cristallographique de la cytochrome aa_3 oxydase⁽²²⁾ avec les chemins de protons D et K. Les trois sites possibles de coordination de zinc sont représentés par les cercles en pointillés noirs.

5.2. Etude de l'inhibition de la cytochrome aa_3 oxydase par le cyanure

Le cyanure est un inhibiteur classique des oxydases hème-cuivre. Celui-ci peut se fixer sur le centre actif de la cytochrome aa_3 oxydase de façon plus ou moins stable et plus ou moins rapide en fonction de l'état dans lequel se trouve la protéine^(5, 23). Le cyanure a été utilisé ici comme mesure de référence de l'inhibition de la cytochrome aa_3 oxydase. La figure 5.2 présente les cyclovoltammogrammes de la cytochrome aa_3 oxydase en absence d'oxygène (courbe noire), en présence d'oxygène (courbe bleue) et en présence de CN^- (courbe rouge) à pH 7.

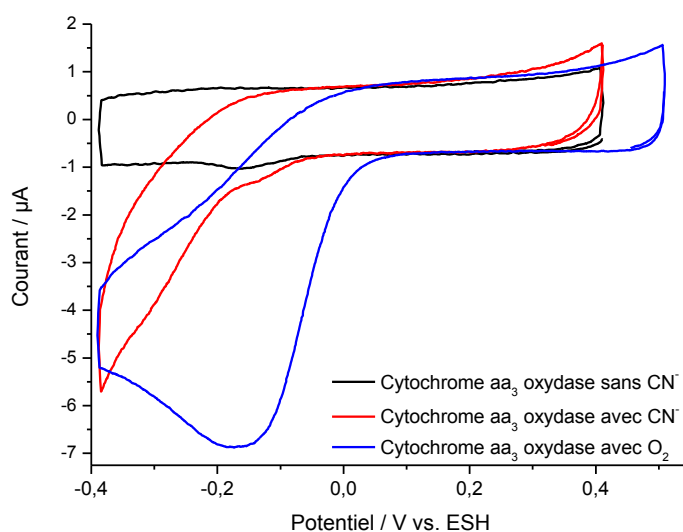


Figure 5.2 : Cyclovoltammogrammes de la cytochrome aa_3 oxydase immobilisée sur des nanoparticules d'or de 15 nm en absence d'oxygène et de cyanure (courbe noire), en présence d'oxygène (courbe bleue) et en présence de cyanure (courbe rouge). Toutes les mesures ont été effectuées dans un tampon phosphate (50 mM, pH 7) à $v=0.02$ V/s.

En absence d'oxygène, un signal cathodique et un très faible signal anodique sont observés à environ -0.18 V. En présence d'oxygène, le signal anodique disparaît alors que le signal cathodique se transforme en une large vague typique d'une réduction électrocatalytique de l'oxygène par la protéine. Après ajout de CN^- , la large vague cathodique disparaît au profit d'un faible signal cathodique dans la même région que celui observé en absence d'oxygène comme cela a été observé dans le cas de la cytochrome bo_3 oxydase.

Dans un premier temps, nous pouvons constater que le signal en absence d'oxygène est très peu réversible. Ce signal peut traduire la présence d'une faible quantité d'oxygène dans la solution tampon n'ayant pas permis de sonder la protéine en conditions non catalytiques. Cette observation permet également d'expliquer le décalage en potentiel observé par rapport aux potentiels des cofacteurs déterminés dans de précédents travaux^(24, 25) puisque celui-ci a déjà été mentionné par Friedrich et al.⁽²⁶⁾. En effet, les potentiels thermodynamiques des hèmes dans les oxydases terminales sont généralement déterminés en conditions non catalytiques par des titrations potentiométriques UV/Vis en absence de ligand. Ces mesures conduisent à des valeurs de potentiels formels résumés dans le tableau 5.1. Les mesures électrochimiques effectuées sur la cytochrome aa_3 oxydase conduisent à des valeurs plus négatives. Ces différences ont été discutées dans un article de Friedrich et al. où la cytochrome aa_3 oxydase est immobilisée via un His-Tag, il est stipulé que le décalage en potentiel observé provient du faible potentiel du couple Ni^{2+}/Ni^+ utilisé pour la

fonctionnalisation de l'électrode. Néanmoins, dans un article plus récent publié par le même groupe proposant une simulation pour ce même système⁽²⁷⁾, il est suggéré que le décalage en potentiel observé provient de la transition entre un état non-activé et un état activé qui correspond à la protéine fonctionnant dans les conditions catalytiques. Cette transition est obtenue en effectuant une réduction de l'enzyme suivi de son oxygénation⁽²⁸⁻³⁰⁾.

Organisme	Technique	Potentiel / V	pH	Référence
<i>P. denitrificans</i>	Electrochimie directe	-0.18	7	Notre étude
<i>R. sphaeroides</i>	Electrochimie directe	-0.20	8	⁽²⁶⁾
<i>P. denitrificans</i>	Titration potentiométrique	+0.19 (hème a_3) / +0.43 (hème a)	6.9	⁽²⁴⁾

Tableau 5.1 : Comparaison des valeurs de potentiels obtenus par titration potentiométrique et électrochimie directe de la cytochrome aa_3 oxydase de différents organismes.

En présence d'oxygène, la transformation du faible signal cathodique en une large vague cathodique prouve que l'enzyme immobilisée sur la surface conserve sa fonction puisque une réduction électrocatalytique de l'oxygène est observée. Ce signal ne peut pas être attribué aux nanoparticules d'or (explications dans la section 4.2).

Après ajout de 2 mM de CN^- , la large vague cathodique disparaît alors qu'un faible signal apparaît à environ -0.17 V. La disparition de la vague cathodique suggère que le cyanure est bien coordonné au centre actif puisque la réduction électrocatalytique n'a plus lieu. Si l'hème observé en absence d'oxygène devait correspondre au signal de l'hème a_3 , un décalage du potentiel thermodynamique vers des valeurs plus négatives serait attendu⁽³¹⁾. Le très faible décalage en potentiel observé ne peut cependant pas être considéré comme significatif et il est donc très peu probable que le signal du cofacteur observé corresponde à l'hème a_3 .

5.3. Etude de l'inhibition de la cytochrome aa_3 oxydase par divers mutants des chemins de protons

Un autre moyen d'inhiber la cytochrome aa_3 oxydase consiste à muter des acides aminés clefs dans le transfert de protons. Afin d'étudier l'effet de ces mutations sur la réduction de l'oxygène, trois mutants ont été étudiés⁽³²⁻³⁴⁾ :

- K354M où la lysine 354 du chemin K est remplacée par une méthionine ; cette mutation inhibe entièrement l'enzyme,

- D124N où l'acide aspartique 124 du chemin D est remplacé par une asparagine qui conduit à une perte d'activité de 95% comparé à la forme native,
- D124N/K354M qui correspond au double mutant inhibant les deux chemins de protons mais dont l'activité n'a pas été mesurée.

La figure 5.3 présente les cyclovoltammogrammes en présence d'oxygène de la forme native (courbe verte) et des mutants K354M (courbe noire), D124N (courbe rouge) et D124N/K354M (courbe bleue) à pH 7.

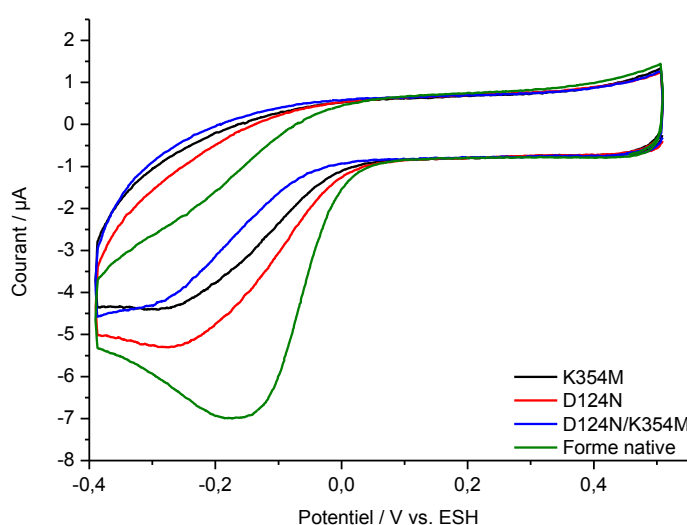


Figure 5.3 : Cyclovoltammogrammes de la cytochrome aa_3 oxydase sous forme native (courbe verte) et sous différentes formes mutées: K354M (courbe noire), D124N (courbe rouge) et D124N/K354M (courbe bleue) immobilisées sur des nanoparticules d'or de 15 nm en présence d'oxygène. Toutes les mesures ont été effectuées dans un tampon phosphate (50 mM) à pH 7 et à $v=0.02$ V/s.

En présence d'oxygène, la forme native présente une large vague cathodique à environ -0.19 V typique d'une réduction électrocatalytique de l'oxygène. Les formes mutées mono-substituées D124N et K354M présentent quant à elle un potentiel de réduction de l'oxygène d'environ -0.28 V et la forme bi-substituée D124N/K354M un potentiel de -0.31 V.

L'observation d'un courant catalytique pour les formes mutées est surprenante puisque ces formes ont été décrites dans la littérature comme étant complètement inactives ou au moins partiellement inactives⁽³²⁾. Cependant, certains travaux ont décrit la possibilité pour les protons d'entrer par le chemin de sortie⁽¹⁶⁾. Cette fonction peut permettre à l'enzyme de réduire l'oxygène avec une efficacité moindre même si les chemins D et K sont inhibés. Selon le principe d'électroneutralité qui stipule que la charge de chaque électron entrant dans la

partie membranaire doit être compensée par une charge positive⁽³⁵⁾, cette diminution d'efficacité peut également expliquer le décalage en potentiel observé pour les formes mutées puisque si la vitesse de formation d'un intermédiaire est limitée par l'assimilation d'un proton, cela peut se traduire sur le cyclovoltammogramme par un décalage vers des potentiels plus négatifs.

5.4. Etude de l'inhibition de la cytochrome aa_3 oxydase par le zinc

La figure 5.4 présente les cyclovoltammogrammes en présence d'oxygène de la cytochrome aa_3 oxydase à différentes concentrations en Zn^{2+} . Ces mesures ont été effectuées dans un tampon Tris afin d'éviter que le phosphate ne coordine le zinc.

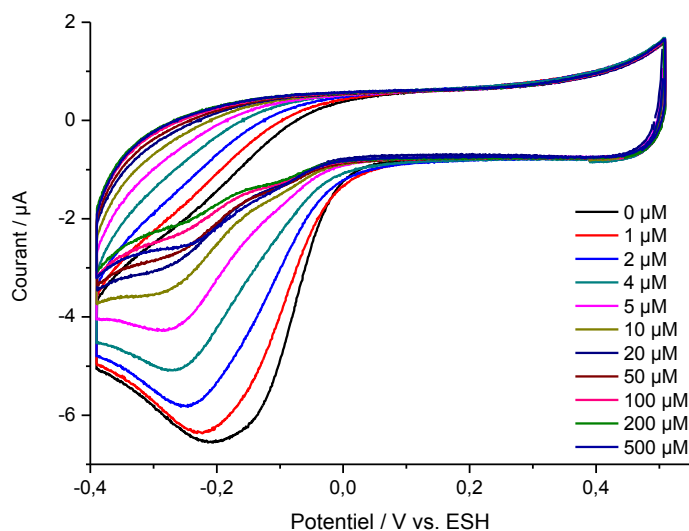


Figure 5.4 : Cyclovoltammogrammes de la cytochrome aa_3 oxydase immobilisée sur des nanoparticules d'or de 15 nm à différentes concentrations en Zn^{2+} . Les mesures ont été effectuées dans un tampon Tris (50 mM) à pH 7 et $v=0.02$ V/s.

En absence d'oxygène, un signal comparable à celui obtenu dans un tampon phosphate est observé. L'ajout de zinc entraîne un décalage de la vague de réduction cathodique vers les potentiels plus faibles ainsi qu'une diminution de l'intensité du courant jusqu'à disparition de la vague catalytique. Après disparition de la vague cathodique, un faible signal de réduction résiduel reste cependant apparent à environ -0.11 V.

Contrairement aux différents mutants où la réduction de l'oxygène était toujours observée, celle-ci est complètement inhibée à forte concentration en Zn^{2+} . Cette différence suggère que le blocage des chemins de protons D et K ne suffit pas à lui seule à complètement inhiber les

fonctions de la protéine et que les protons peuvent bien être délivrés par la sortie. En comparant les résultats obtenus pour les différents mutants et celui de l'inhibition par le zinc, l'existence de sites de coordination à l'entrée des chemins de protons D et K mais également au niveau du chemin de sortie peuvent être envisagées. Le décalage du potentiel de réduction de l'oxygène observé en présence de Zn^{2+} semble corrélérer avec les observations effectuées pour les mutants. En effet, dans chaque cas, le transfert de protons est inhibé soit par mutation, soit par adjonction de Zn^{2+} . Parallèlement, en comparaison à l'inhibition en présence de cyanure, ce décalage semble être en lien avec l'assimilation de protons par la protéine. L'observation de ce décalage peut être lié au fait que l'assimilation d'un proton représente l'étape limitante observée sur le cyclovoltammogramme.

Ces observations semblent confortées par les résultats obtenus par Kirchberg et al. qui proposent que l'injection d'un électron au niveau du Cu_A coïncide avec un transfert de protons provenant des deux côtés de la membrane⁽³⁶⁾. Le transfert du côté P a pour but de préparer le transfert du côté N grâce à des effets à longue distance. Cet effet a été observé en présence et en absence de membrane. Par conséquent, le zinc, de par sa nature compétitive avec les protons, peut bloquer la préparation du transfert du côté N en se coordonnant au niveau du côté P mais peut également empêcher l'adressage de protons au site actif par l'intermédiaire du chemin de sortie.

A partir des résultats obtenus à différentes concentrations en Zn^{2+} , il est possible de déterminer la CI 50. La figure 5.5 présente le courant observé à -0.19 V en fonction de la concentration en zinc. Le courant maximal observé peut-être assimilé à l'activité de la protéine en fonction de la concentration en Zn^{2+} . La valeur de la CI 50 obtenue est d'environ 5 μ M.

La courbe de détermination de la CI 50 présentée est comparable à celle proposée par Kuznetsova et al. qui rapporte une inhibition par le Zn^{2+} similaire entre l'enzyme mitochondriale et bactérienne (mesures effectuées sur *R. sphaeroides*)⁽²⁰⁾. Kuznetsova et al. suggèrent de diviser cette courbe en deux composantes: une composante lente (à des concentrations élevées en Zn^{2+} , $K_I = 9 \mu$ M) et une composante rapide (à faible concentration en Zn^{2+} , $K_I = 230 \mu$ M) ; ils suggèrent par conséquent que le zinc possède deux sites de liaisons, un au niveau de l'entrée du chemin D et l'autre au chemin de sortie. Ils constatent également que la composante rapide est observée dans l'enzyme solubilisée (c'est-à-dire en absence de potentiel de membrane) contrairement à Mills et al. qui proposent qu'en absence d'un

potentiel de membrane, des concentrations en Zn^{2+} de l'ordre du mM sont nécessaires pour inhiber l'enzyme⁽¹⁶⁾.

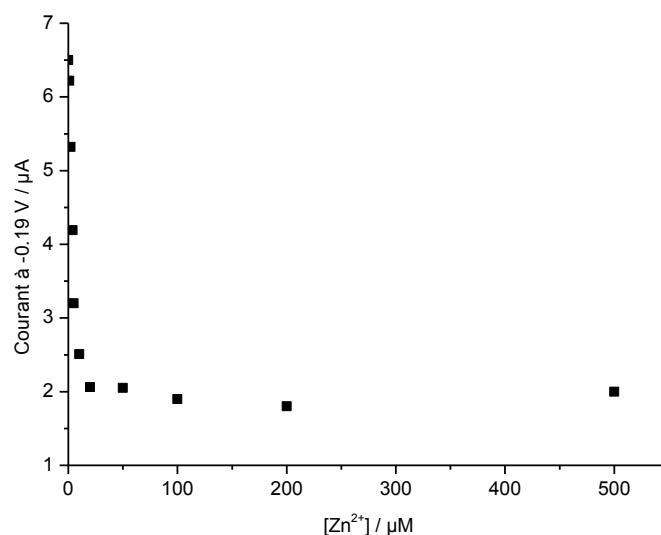


Figure 5.5 : Influence de la concentration en Zn^{2+} sur le courant catalytique mesuré à -0.19 V.

5.5. Conclusion

Ce chapitre montre que l'électrochimie directe de protéine a pu être utilisée afin d'étudier l'inhibition de la cytochrome *aa*₃ oxydase par le zinc. Dans un premier temps, l'effet de l'inhibition du transfert de proton nous a permis d'étudier son influence sur les cyclovoltammogrammes. Ensuite, grâce à une étude comparative de différents types d'inhibition, il a été possible d'émettre des hypothèses quant aux probables sites et conditions de coordination du zinc au sein de la protéine. Nous avons notamment pu mettre en évidence la nécessité de trois sites de coordination afin de complètement inhiber l'enzyme.

Néanmoins, des études complémentaires peuvent être réalisées afin de confirmer ces hypothèses comme par exemple :

- L'étude de mutants de résidus pouvant coordonner Zn^{2+} aux entrées des chemins D et K comme cela a été fait par Qin et al.⁽¹⁵⁾. En effet, ce groupe a suggéré que les acides aminés E101 et H96 était responsables de la coordination du zinc à l'entrée du chemin K chez *R. sphaeroides*. Ils ont aussi proposé qu'un résidu de la sous-unité III à

proximité de l'entrée du chemin D pouvait coordonner le zinc et inhiber le chemin D. Ces différents aspects pourraient donc permettre de compléter notre étude.

- L'étude de mutants du chemin de sortie pourrait également apporter des indications. Cependant, les acides aminés impliqués ne sont pas précisément connus à ce jour et rend donc l'étude difficile.

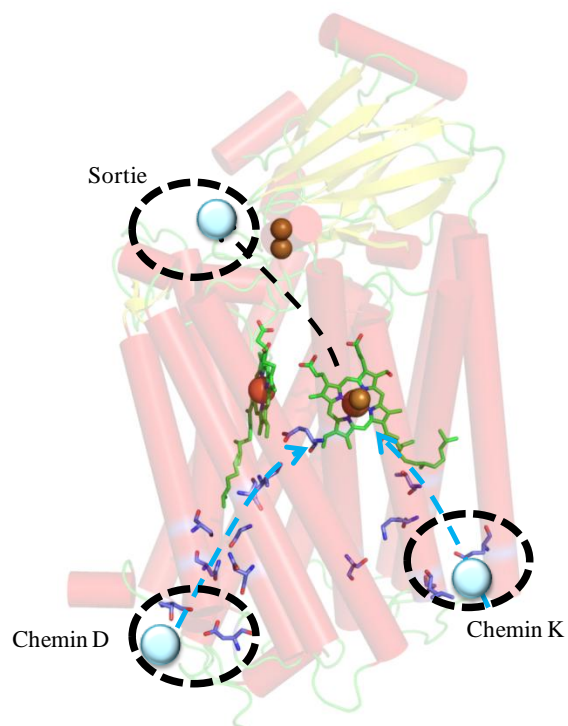


Figure 5.6 : Structure cristallographique de la cytochrome aa_3 oxydase représentée avec les probables sites de coordination du zinc.

5.6. Références

1. Cooper, C. E., and Brown, G. C. (2008) The inhibition of mitochondrial cytochrome oxidase by the gases carbon monoxide, nitric oxide, hydrogen cyanide and hydrogen sulfide: chemical mechanism and physiological significance, *J. Bioenerg. Biomembr.* 40, 533-539.
2. Chance, B., Erecinska, M., and Wagner, M. (1970) Mitochondrial responses to carbon monoxide toxicity, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 174, 193-204.
3. Nicholls, P. (1979) Effects of inhibitory ligands on the aerobic carbon monoxide complex of cytochrome c oxidase, *Biochem. J.* 183, 519-529.
4. Antonini, E., Brunori, M., Greenwood, C., Malmstrom, B. G., and Rotilio, G. C. (1971) Interaction of cyanide with cytochrome oxidase, *Eur. J. Biochem.* 23, 396-400.
5. Nicholls, P., Van Buuren, K. J. H., and Van Gelder, B. F. (1972) Biochemical and biophysical studies on cytochrome *aa₃*. VIII. Effect of cyanide on the catalytic activity, *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* 275, 279-287.
6. Wever, R., Van Gelder, B. F., and Dervartanian, D. V. (1975) Biochemical and biophysical studies on cytochrome c oxidase. XX. Reaction with sulfide, *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* 387, 189-193.
7. Hill, B. C., Woon, T., Nicholls, P., Peterson, J., Greenwood, C., and Thomson, A. J. (1984) Interactions of sulfide and other ligands with cytochrome c oxidase. An electron paramagnetic resonance study, *Biochem. J.* 224, 591-600.
8. Nicholls, P., and Kim, J. K. (1981) Oxidation of sulfide by cytochrome *aa₃*, *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* 637, 312-320.
9. Brown, G. C., and Cooper, C. E. (1994) Nanomolar concentrations of nitric oxide reversibly inhibit synaptosomal respiration by competing with oxygen at cytochrome oxidase, *FEBS Lett.* 356, 295-298.
10. Sharpley, M. S., and Hirst, J. (2006) The inhibition of mitochondrial complex I (NADH:ubiquinone oxidoreductase) by Zn²⁺, *J. Biol. Chem.* 281, 34803-34809.
11. Schulte, M., Mattay, D., Kriegel, S., Hellwig, P., and Friedrich, T. (2014) Inhibition of *Escherichia coli* respiratory complex I by Zn²⁺, *Biochemistry* 53, 6332-6339.
12. Link, T. A., and von Jagow, G. (1995) Zinc ions inhibit the QP center of bovine heart mitochondrial bc₁ complex by blocking a protonatable group, *J. Biol. Chem.* 270, 25001-25006.
13. Lee, D.-W., El Khoury, Y., Francia, F., Zambelli, B., Ciurli, S., Venturoli, G., Hellwig, P., and Daldal, F. (2011) Zinc Inhibition of Bacterial Cytochrome bc₁ Reveals the Role of Cytochrome b E295 in Proton Release at the Qo Site, *Biochemistry* 50, 4263-4272.
14. Kannt, A., Ostermann, T., Muller, H., and Ruitenber, M. (2001) Zn²⁺ binding to the cytoplasmic side of *Paracoccus denitrificans* cytochrome c oxidase selectively uncouples electron transfer and proton translocation, *FEBS Lett.* 503, 142-146.
15. Qin, L., Mills, D. A., Hiser, C., Murphree, A., Garavito, R. M., Ferguson-Miller, S., and Hosler, J. (2007) Crystallographic Location and Mutational Analysis of Zn and Cd Inhibitory Sites and Role of Lipidic Carboxylates in Rescuing Proton Path Mutants in Cytochrome c Oxidase, *Biochemistry* 46, 6239-6248.
16. Mills, D. A., Schmidt, B., Hiser, C., Westley, E., and Ferguson-Miller, S. (2002) Membrane potential-controlled inhibition of cytochrome c oxidase by zinc, *J. Biol. Chem.* 277, 14894-14901.
17. Aagaard, A., and Brzezinski, P. (2001) Zinc ions inhibit oxidation of cytochrome c oxidase by oxygen, *FEBS Lett.* 494, 157-160.

18. Francia, F., Giachini, L., Boscherini, F., Venturoli, G., Capitanio, G., Martino, P. L., and Papa, S. (2007) The inhibitory binding site(s) of Zn^{2+} in cytochrome c oxidase, *FEBS Lett.* 581, 611-616.
19. Martino, P. L., Capitanio, G., Capitanio, N., and Papa, S. (2011) Inhibition of proton pumping in membrane reconstituted bovine heart cytochrome c oxidase by zinc binding at the inner matrix side, *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* 1807, 1075-1082.
20. Kuznetsova, S. S., Azarkina, N. V., Vygodina, T. V., Siletsky, S. A., and Konstantinov, A. A. (2005) Zinc ions as cytochrome c oxidase inhibitors: two sites of action, *Biochemistry (Moscow)* 70, 128-136.
21. Vygodina, T. V., Zakirzianova, W., and Konstantinov, A. A. (2008) Inhibition of membrane-bound cytochrome c oxidase by zinc ions: High-affinity Zn^{2+} -binding site at the P-side of the membrane, *FEBS Lett.* 582, 4158-4162.
22. Koepke, J., Olkhova, E., Angerer, H., Müller, H., Peng, G., and Michel, H. (2009) High resolution crystal structure of *Paracoccus denitrificans* cytochrome c oxidase: New insights into the active site and the proton transfer pathways, *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* 1787, 635-645.
23. Nicholls, P., and Soulimane, T. (2004) The mixed valence state of the oxidase binuclear centre: how *Thermus thermophilus* cytochrome ba_3 differs from classical aa_3 in the aerobic steady state and when inhibited by cyanide, *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* 1655, 381-387.
24. Hellwig, P., Grzybek, S., Behr, J., Ludwig, B., Michel, H., and Maentele, W. (1999) Electrochemical and Ultraviolet/Visible/Infrared Spectroscopic Analysis of Heme a and a_3 Redox Reactions in the Cytochrome c Oxidase from *Paracoccus denitrificans*: Separation of Heme a and a_3 Contributions and Assignment of Vibrational Modes, *Biochemistry* 38, 1685-1694.
25. Pardhasaradhi, K., Ludwig, B., and Hendler, R. W. (1991) Potentiometric and spectral studies with the two-subunit cytochrome aa_3 from *Paracoccus denitrificans*. Comparison with the 13-subunit beef heart enzyme, *Biophys. J.* 60, 408-414.
26. 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, *Biophys. J.* 94, 3698-3705.
27. Schach, D., Nowak, C., Gennis, R. B., Ferguson-Miller, S., Knoll, W., Walz, D., and Naumann, R. L. C. (2010) Modeling direct electron transfer to a multi-redox center protein: Cytochrome c oxidase, *J. Electroanal. Chem.* 649, 268-276.
28. Antonini, E., Brunori, M., Colosimo, A., Greenwood, C., and Wilson, M. T. (1977) Oxygen "pulsed" cytochrome c oxidase: Functional properties and catalytic relevance, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 74, 3128-3132.
29. Brandt, U., Schaegger, H., and Von Jagow, G. (1989) Purification of cytochrome c oxidase retaining its pulsed form, *Eur. J. Biochem.* 182, 705-711.
30. Moody, A. J., Cooper, C. E., and Rich, P. R. (1991) Characterisation of 'fast' and 'slow' forms of bovine heart cytochrome-c oxidase, *Biochim Biophys Acta* 1059, 189-207.
31. Hendler, R. W., and Westerhoff, H. V. (1992) Redox interactions in cytochrome c oxidase: from the "neoclassical" toward "modern" models, *Biophys J* 63, 1586-1604.
32. Pfitzner, U., Odenwald, A., Ostermann, T., Weingard, L., Ludwig, B., and Richter, O.-M. H. (1998) Cytochrome c oxidase (heme aa_3) from *Paracoccus denitrificans*: analysis of mutations in putative proton channels of subunit I, *J. Bioenerg. Biomembr.* 30, 89-97.
33. Fetter, J. R., Qian, J., Shapleigh, J., Thomas, J. W., Garcia-Horsman, A., Schmidt, E., Hosler, J., Babcock, G. T., Gennis, R. B., and Ferguson-Miller, S. (1995) Possible

- proton relay pathways in cytochrome c oxidase, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 1604-1608.
34. Forte, E., Scandurra, F. M., Richter, O.-M. H., D'Itri, E., Sarti, P., Brunori, M., Ludwig, B., and Giuffre, A. (2004) Proton Uptake upon Anaerobic Reduction of the *Paracoccus denitrificans* Cytochrome c Oxidase: A Kinetic Investigation of the K354M and D124N Mutants, *Biochemistry* 43, 2957-2963.
 35. Rich, P. R. (1995) Towards an understanding of the chemistry of oxygen reduction and proton translocation in the iron-copper respiratory oxidases, *Aust. J. Plant Physiol.* 22, 479-486.
 36. Kirchberg, K., Michel, H., and Alexiev, U. (2012) Net Proton Uptake Is Preceded by Multiple Proton Transfer Steps upon Electron Injection into Cytochrome c Oxidase, *J. Biol. Chem.* 287, 8187-8193.

Chapitre VI

Comparaison de deux isoformes de la cytochrome *cbb*₃ oxydase

6.1. Introduction

Ce chapitre est dédié à l'étude de la cytochrome *cbb*₃ oxydase et sera divisé en deux parties.

La première partie sera consacrée à la comparaison de deux isoformes de cette oxydase de type C présente chez *P. stutzeri* par des méthodes électrochimiques et spectroscopiques. Ce type d'oxydases n'est présent que chez les bactéries dont certains organismes pathogènes comme, par exemple, *H. pylori*. Elles sont exprimées à faible tension en oxygène et sont par conséquent caractérisées par leur haute affinité pour l'oxygène.

Deux isoformes de la cytochrome *cbb*₃ oxydase ont également été découvertes chez *P. aeruginosa*. Il a été montré que l'isoforme 1 était exprimée principalement en présence de fortes concentrations en oxygène alors que l'isoforme 2 était plus abondamment exprimée à faible concentration en oxygène. La différence majeure entre les deux isoformes résidait donc dans leur affinité pour l'oxygène⁽¹⁾.

D'un point de vue structural, les deux isoformes de la cytochrome *cbb*₃ oxydase de *P. stutzeri* sont caractérisés par une forte homologie de séquence au niveau de leur sous-unités communes. Cependant, la *cbb*₃-2 possède une sous-unité qui n'est pas présente dans la *cbb*₃-1 : la *ccoQ*. Le rôle de cette sous-unité n'est pas connue à ce jour mais des différences de stabilité thermique ont été observées par Xie et al.⁽²⁾.

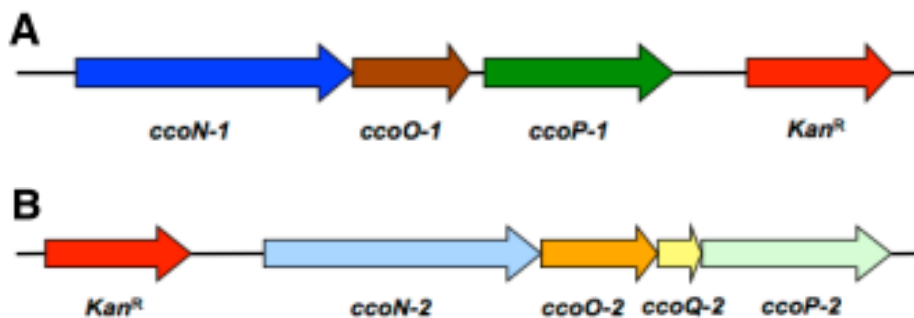


Figure 6.1: Comparaison des sous-unités des deux isoformes de la cytochrome *cbb*₃ oxydase. Schéma préparé par Hao Xie.

La deuxième partie concernera la caractérisation des donneurs d'électron de cette enzyme par des mesures potentiométriques. En effet, il est connu que les électrons sont transférés à la cytochrome *cbb*₃ oxydase par l'intermédiaire d'un cytochrome *c* cependant plusieurs protéines de ce type ont été isolées chez *P. stutzeri* (données non publiées). Des mesures d'activité ont été effectuées par l'équipe du Pr. Dr. Hartmut Michel en présence des différents donneurs probables afin d'évaluer les candidats intéressants. Deux cytochromes ont permis

d'obtenir une activité de réduction de l'oxygène élevée, les cytochromes *c*₄ et *c*₅₅₁, alors que les mesures effectuées en présence de cytochrome *c*₅ ont montré une activité beaucoup plus faible. Des mesures potentiométriques ont ensuite été effectuées au sein de notre laboratoire afin de corréliser les résultats obtenus avec ceux du laboratoire du Pr. Dr. Hartmut Michel.

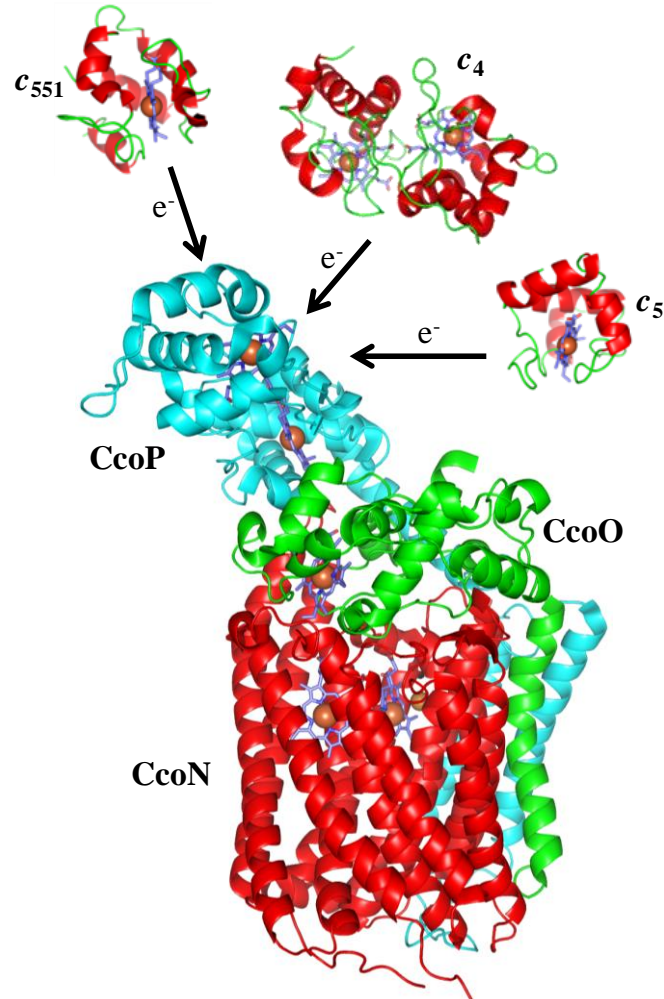


Figure 6.2 : Structure cristallographique de la cytochrome *cbb*₃ oxydase⁽³⁾ (PDB : 3MK7). Cette structure correspond à l'isoforme 1 où la sous-unité *ccoQ* est absente. Les cytochromes *c*₄, *c*₅ et *c*₅₅₁ sont également représentés (PDB : 1ETP⁽⁴⁾, 1CC5⁽⁵⁾ et 1CCH⁽⁶⁾).

6.2. Comparaison des deux isoformes de la cytochrome *cbb*₃ oxydase

6.2.1. Etude par spectroscopie UV-Visible

Avant toute titration potentiométrique, un spectre différentiel est effectué en prenant comme référence le plus faible potentiel appliqué moins le spectre du plus haut potentiel appliqué. Ce spectre correspond à la contribution des hèmes de la forme réduite moins la forme oxydée. Le

spectre inverse correspondant à la forme oxydée moins la forme réduite est également effectué. Cette vérification est faite dans deux buts :

- Vérifier que tous les hèmes à titrer sont visibles sur le spectre différentiel UV-Visible et donc que les bornes sont choisies de manière suffisamment larges pour titrer tous les chromophores présents dans l'enzyme,
- Vérifier la réversibilité de la réaction montrant que la protéine est stable au cours de la réaction d'oxydoréduction.

La figure 6.3 montre les spectres de la forme oxydée moins la forme réduite et de la forme réduite moins la forme oxydée de l'isoforme 1 de la cytochrome *cbb*₃ oxydase à pH 7.5. Ces deux spectres différentiels sont complètement symétriques et indiquent une réversibilité complète de la réaction d'oxydoréduction. La bande de Soret et les bandes Q, sensibles à l'état d'oxydoréduction sont bien présentes sur le spectre différentiel ; la bande β présente un pic à 550 nm et un épaulement à 560 nm caractéristique des hèmes *c* et *b* respectivement⁽⁷⁻⁹⁾. La présence de ces signaux confirme que tous les hèmes à titrer ont un potentiel redox compris dans la gamme de potentiel choisie.

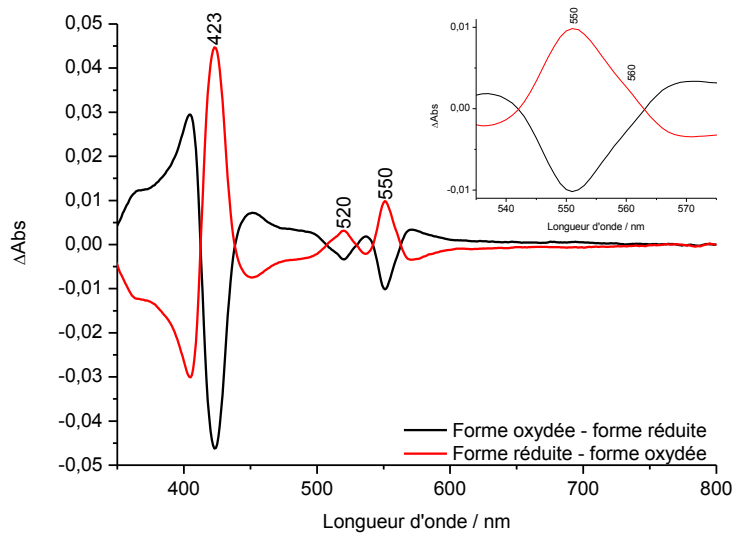


Figure 6.3 : Spectres différentiels UV-Visible de la forme oxydée moins réduite et de la forme réduite moins oxydée de la *cbb*₃-1. L'encart correspond aux bandes β utilisées pour différencier les hèmes et tracer les courbes de Nernst. Les mesures ont été effectuées entre -0.09 et 0.51 V à pH 7.5.

Les potentiels redox de chaque chromophore ont pu être déterminés grâce à des titrations potentiométriques par spectroscopie UV-Visible. La figure 6.4 représente les spectres différentiels de l'isoforme 1 de la cytochrome *cbb*₃ oxydase aux différents potentiels

appliqués pour effectuer la titration. La mesure de référence a été effectuée de façon à ce que tous les cofacteurs se trouvent à l'état réduit au début de la titration. Le spectre différentiel présente différents signaux caractéristiques des hèmes. Le premier correspond à la bande de Soret qui se situe à environ 400 nm et regroupe les signaux des différents hèmes présents dans la protéine ; compte-tenu de la superposition des signaux et du nombre d'hèmes présents, celui-ci ne sera pas utilisé dans l'interprétation des données. L'interprétation des données se fera par l'utilisation des bandes Q et plus particulièrement des bandes β . Cette bande possède l'avantage de pouvoir discriminer les hèmes de différents types puisqu'elle est située à environ 550 nm pour les hèmes *c* et à 560 nm pour les hèmes *b*⁽⁹⁾.

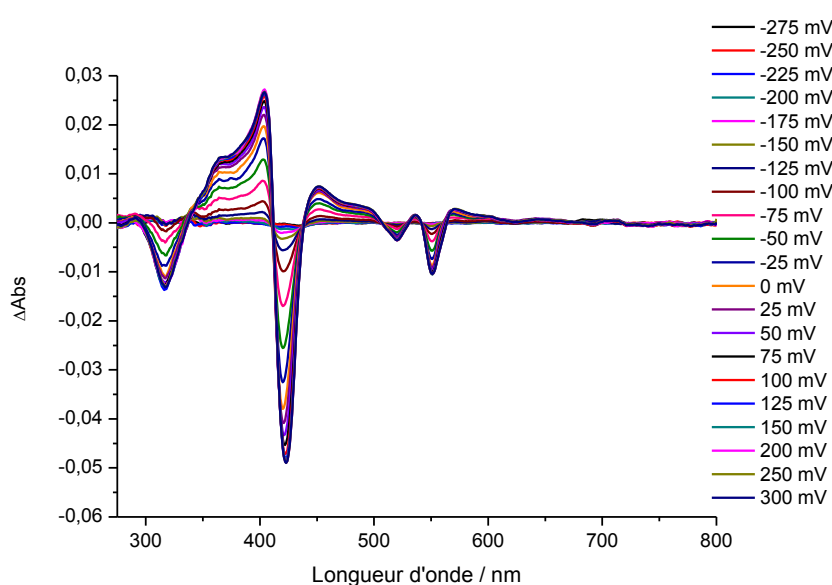


Figure 6.4 : Spectres différentiels successifs obtenus au cours de la titration potentiométrique par spectroscopie UV-Visible de l'isoforme 1. La référence a été mesurée à -0.09 V.

Pour chaque isoforme, les graphiques ΔAbs vs. E_{app} ont été tracés à la longueur d'onde caractéristique de chaque cofacteur ; il en résulte une courbe sigmoïdale dont les potentiels sont déductibles grâce à une simulation de courbe faite à l'aide de l'équation de Nernst. La figure 6.5 montre les courbes expérimentales et simulées obtenues pour les différents cofacteurs des deux isoformes de la cytochrome *cbb*₃ oxydase.

Concernant les hèmes *c*, les courbes ont été simulées en utilisant une équation prenant en compte trois transferts d'un électron et non un transfert de trois électrons puisqu'il s'agit de transferts d'électrons vers des cofacteurs différents. Cependant, même si la courbe simulée propose trois valeurs de potentiels très différentes, ces valeurs sont moyennées et trois potentiels identiques sont attribués aux hèmes *c*. En effet, l'allure des courbes ne permet pas

de discriminer trois cofacteurs différents puisque trois hèmes c avec des potentiels très différents présenteraient des plateaux sur la courbe de titration ; ceci est probablement dû au fait que les potentiels des différents hèmes c sont trop proches pour être différenciés.

Les courbes expérimentales des hèmes b ont été simulées avec une équation prenant en compte deux transferts d'un électron. L'allure des courbes permet cette fois-ci de distinguer deux transitions. Compte-tenu de la coopérativité souvent impliquée dans les oxydases terminales, il est difficile d'attribuer les transitions à un hème en particulier⁽¹⁰⁻¹²⁾. Cependant, d'après les études déjà publiées dans la littérature, le potentiel redox de l'hème b est supérieur au potentiel redox de l'hème b_3 ⁽¹³⁾. Des mesures en présence de CN^- qui ne se lie qu'à l'hème b_3 pourraient éventuellement permettre le découplage des hèmes et apporter des informations complémentaires quant aux interactions modifiant les potentiels redox des hèmes⁽¹¹⁾.

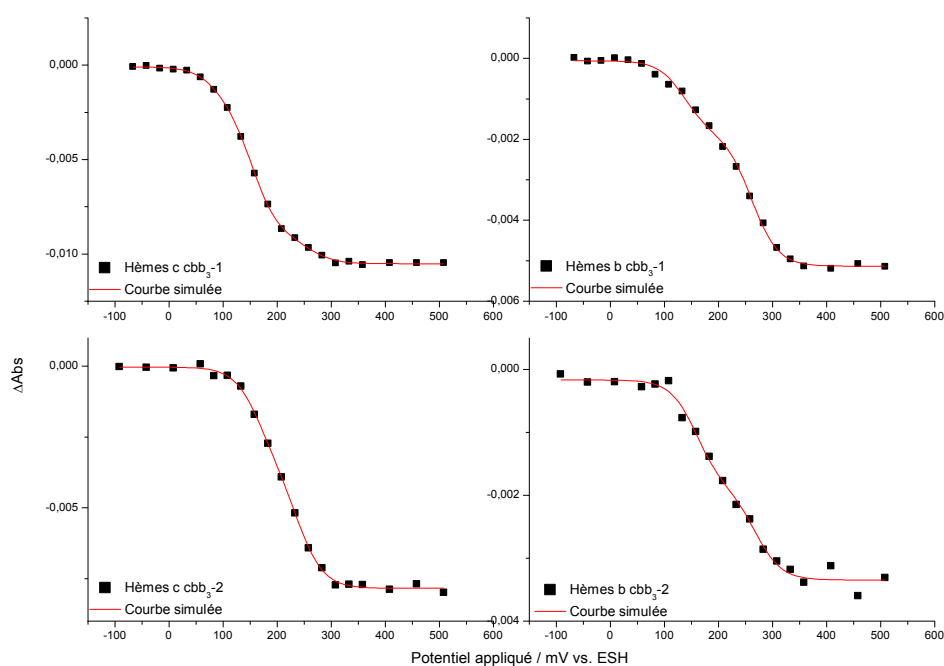


Figure 6.5 : Courbes expérimentales et courbes de Nernst simulées pour les hèmes b et c des deux isoformes de la cytochrome cbb_3 oxydase mesurées respectivement à 560 nm et 550 nm.

Le tableau 6.1 regroupe les potentiels redox des différents hèmes présents dans les deux isoformes de la cytochrome cbb_3 oxydase et les valeurs obtenues pour d'autres organismes ; les valeurs de potentiels des cofacteurs de la cytochrome aa_3 oxydase sont précisées à titre de comparaison.

		E_{1/2} hèmes c / mV	E_{1/2} hème b / mV	E_{1/2} hème b₃ / mV
<i>P. stutzeri</i>	Isoforme 1 (pH 7.5)	+170 ±50	+260 ±10	+140 ±20
	Isoforme 2 (pH 7.5)	+210 ±50	+270 ±20	+160 ±20
	Pitcher et al. ⁽¹³⁾	+185, +245	+310	+225
<i>B. japonicum</i> (pH 7.14)⁽⁹⁾		+230, +300, +400	+425	+275
<i>R. capsulatus</i>⁽¹⁴⁾		+265, +320	+385	
<i>R. sphaeroides</i>⁽¹⁵⁾		+234, +320, +351	+418	-59
<i>R. marinus</i>⁽¹⁶⁾		-50, +195	+120	-50
<i>aa</i>₃ <i>P. denitrificans</i> (pH 6.9)⁽¹⁷⁾		/	+430 (Hème a)	+190 (Hème a ₃)

Tableau 6.1 : Tableau récapitulatif des potentiels redox des différents cofacteurs de la cytochrome *cbb*₃ oxydase mesurés pour différents organismes. Les potentiels redox déterminés pour la cytochrome *aa*₃ de *P. denitrificans* sont mentionnés à titre de comparaison. Les valeurs mentionnées dans le tableau ont été déterminées à pH 7 sauf mention contraire.

Une différence de 40 mV est observée entre les hèmes *c* présents dans les deux isoformes mais les valeurs obtenues restent de l'ordre de grandeur de ceux déterminés par Pitcher et al. ⁽¹³⁾. Néanmoins, la différence de 40 mV observée entre les 2 isoformes peut difficilement être considérée comme significative puisque les valeurs obtenus correspondent à une moyenne des potentiels redox des trois hèmes *c*. Ces valeurs sont également comparables avec les valeurs obtenues pour les premiers accepteurs d'électrons de cytochrome *cbb*₃ d'autres organismes^(9, 13-16). Cette constatation peut s'expliquer par la nature du donneur d'électron naturel qui est un cytochrome de type *c* dont le potentiel redox est généralement d'environ +200 mV^(7, 18-22).

Les valeurs de potentiels redox déterminés pour les hèmes *b* et *b*₃ sont également très proches pour les deux isoformes. Les potentiels ont été attribués d'après les données déjà existantes dans la littérature montrant que la transition à haut potentiel correspond majoritairement à l'oxydation de l'hème *b* alors que la transition à bas potentiel correspond à l'oxydation de l'hème *b*₃. Une différence de 10 mV est observé pour l'hème *b* et de 20 mV pour l'hème *b*₃. Ces faibles différences ne peuvent pas être considérées comme significatives. Les valeurs observées sont ici plus négatives que celles déterminées par Pitcher et al. pour le même organisme⁽¹³⁾ mais reste dans le même ordre de grandeur. De plus, une des grandes caractéristiques observée pour les oxydases de type C est la grande différence de potentiel entre les hèmes *b* et *b*₃^(9, 13). Cette différence est également observée pour les deux isoformes de cytochrome *cbb*₃ oxydase de *P. stutzeri* puisqu'elle est de 120 mV pour l'isoforme 1 et 110 mV pour l'isoforme 2. De plus, la cytochrome *cbb*₃ oxydase étant un système anticoopératif,

les différences de potentiels observées entre les hèmes *b* et *b*₃ sont certainement sous-estimées. Pereira et al. ont estimé un potentiel d'interaction entre les deux hèmes *b* à partir de titrations UV-Visible pour la cytochrome *cbb*₃ de *B. japonicum* à l'aide d'un modèle décrivant des interactions à deux centres⁽⁹⁾. Ce potentiel d'interaction a été estimé à une valeur moyenne de -30 mV c'est-à-dire que la différence de potentiel entre l'hème *b* et *b*₃ sera augmentée de 30 mV. Cependant, il est précisé que des simulations incluant des potentiels d'interactions compris entre 0 et -60 mV étaient de qualité équivalente. Des résultats obtenus par simulation de courbes de Nernst individuelles peuvent donc être considérés comme fiables. Les valeurs de potentiels redox obtenus pour les hèmes *b* sont dans le même ordre de grandeur quelque soit l'organisme étudié même si celui de *R. marinus* possède un potentiel étonnamment faible (+120 mV) comparé à celui d'autres cytochromes *cbb*₃ oxydases. Concernant l'hème *b*₃, aucun consensus ne semble avoir été trouvé puisque des valeurs allant de -59 mV à +275 mV ont été déterminées en fonction des organismes étudiés. La seule explication suggérée concernant les potentiels redox extrêmement faibles observés pour l'hème *b*₃ consiste à prendre en compte l'évolution de la famille des oxydases hèmes-cuivre. En effet, les cytochromes *cbb*₃ oxydases sont les membres les plus distants de la famille des oxydases hèmes-cuivre et possèdent une plus grande corrélation avec l'évolution des NO réductases^(23, 24).

6.2.2. Etude par électrochimie directe

6.2.2.1. *En absence d'oxygène*

Les deux isoformes ont été comparées en absence d'oxygène par voltampérométrie cyclique. Pour ce faire, chaque protéine a été immobilisée sur des nanoparticules d'or de 15 nm selon un mode opératoire similaire à celui utilisé pour les protéines décrites dans les chapitres précédents. La figure 6.6 présente les cyclovoltammogrammes des deux isoformes de la cytochrome *cbb*₃ oxydase obtenus en absence d'oxygène à pH 7.

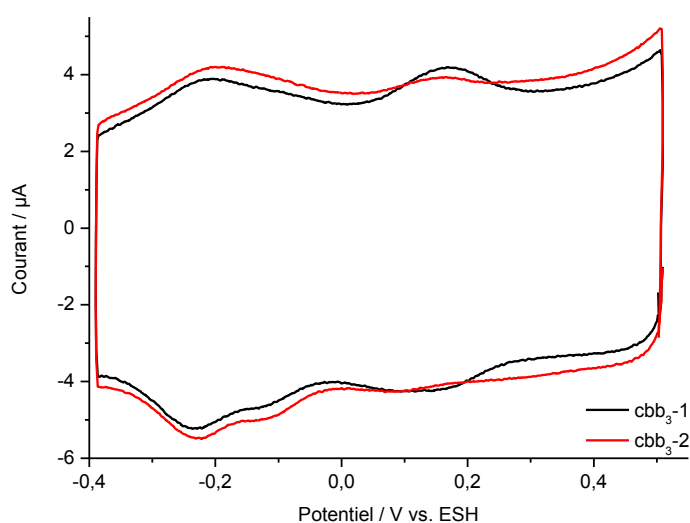


Figure 6.6 : Cyclovoltammogrammes des deux isoformes de la cytochrome *cbb*₃ oxydase immobilisées sur des nanoparticules d'or de 15 nm. L'isoforme 1 correspond à la courbe noire et l'isoforme 2 à la courbe rouge. Les mesures ont été effectuées dans un tampon phosphate (50 mM, pH 7) et à $v=0.1$ V/s.

Dans les deux cas, de larges signaux réversibles sont observés permettant de déterminer des potentiels de demi-vague à +0.11 V, -0.11 V et -0.22 V pour l'isoforme 1 et +0.12 V, -0.11 V et -0.22 V pour l'isoforme 2.

En absence d'oxygène, aucune différence notable n'est constatée entre les deux isoformes. La largeur des signaux suggère que soit la protéine est orientée de façon inhomogène ou encore que les signaux de plusieurs cofacteurs sont observables.

Afin d'attribuer plus précisément les signaux obtenus, la sous-unité *ccoP* qui contient deux hèmes *c* a pu être isolée et immobilisée sur la même surface que la cytochrome *cbb*₃ oxydase. Les signaux observés ont été comparés à ceux obtenus pour la protéine native contenant toutes les sous-unités. La figure 6.7 propose une comparaison entre la sous-unité *ccoP* et la *cbb*₃-1. Le signal observé pour la sous-unité coïncide partiellement avec le large signal réversible à -0.22 V obtenu pour la *cbb*₃-1.

La présence de ce signal pour la sous-unité suggère que la large vague observée à des potentiels négatifs correspond à la superposition de plusieurs signaux correspondant aux hèmes *c*.

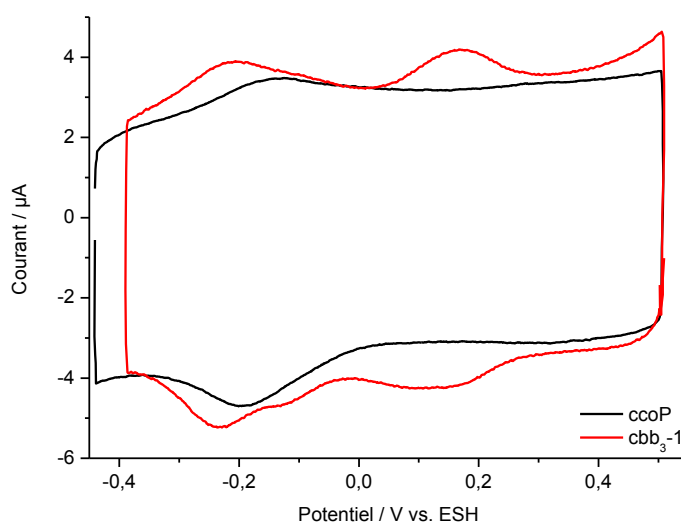


Figure 6.7 : Cyclovoltammogrammes de la sous-unité $ccoP$ (courbe noire) et de la cbb_3-1 (courbe rouge) immobilisées sur des nanoparticules d'or de 15 nm. Les mesures ont été effectuées dans un tampon phosphate (50 mM, pH 7) à $v=0.1$ V/s.

Dans le but de déterminer les potentiels de demi-vague de chaque cofacteur observé et d'obtenir une vision de l'homogénéité de l'orientation de la protéine à la surface, des déconvolutions de chaque signaux observés sur les cyclovoltammogrammes ont été effectuées. Pour l'isoforme 1 (Figure 6.8), le large signal à +0.11 V a pu être attribué à deux composantes et il apparaît, par conséquent, que ce signal correspond aux deux hèmes b . Comme dans le cas de la titration potentiométrique, il est difficile d'attribuer un potentiel de demi-vague à chacun d'eux en raison de la coopérativité⁽¹⁰⁻¹²⁾. Pour l'isoforme 2 (Figure 6.9), la déconvolution n'a permis d'attribuer qu'un seul signal correspondant probablement à un hème b . Il n'est pas possible d'écarter le fait que la coopérativité de cette oxydase n'engendre l'apparition que d'un seul signal correspondant à l'hème b et b_3 simultanément. Cependant, des mesures effectuées par spectroscopie de résonance Raman par Hrabakhova et al. sur la cytochrome aa_3 oxydase de *R. sphaeroides* ont montré qu'il était difficile de réduire l'hème du site actif probablement en raison de la perturbation du réseau de coopérativité⁽²⁵⁾. Une différence dans la structure du réseau de coopérativité peut donc être envisagée expliquant la présence de deux signaux électrochimiques dans le cas de l'isoforme 1 et d'un seul pour l'isoforme 2.

Dans les deux cas, les signaux négatifs ont pu être déconvolués avec trois composantes laissant penser que ces signaux correspondent bien aux trois hèmes c comme cela a pu être déduit à partir du cyclovoltammogramme de la $ccoP$. Par ailleurs, les signaux de la $ccoP$ ont

aussi été déconvolués et deux hèmes *c* ont pu être distingués. Les valeurs des potentiels de demi-vague, la séparation des potentiels de pics ΔE_p à 0.1 V/s et la largeur de pic à mi-hauteur de chaque contribution calculée sont compilées dans le tableau 6.2.

		$E_{1/2} / \text{mV vs. ESH}$	$\Delta E_p / \text{mV}$	FWHM / mV
Isoforme 1	Hème <i>c</i>	-270	5	105
	Hème <i>c</i>	-210	15	95
	Hème <i>c</i>	-125	15	115
	Hèmes <i>b/b</i> ₃	110	50	100
		185	25	95
Isoforme 2	Hème <i>c</i>	-260	5	105
	Hème <i>c</i>	-200	20	95
	Hème <i>c</i>	-120	10	110
	Hèmes <i>b/b</i> ₃	115	60	100
CcoP	Hème <i>c</i>	-195	35	140
	Hème <i>c</i>	-120	50	160

Tableau 6.2 : Potentiels de demi-vague, séparation des potentiels de pic ΔE_p et largeur de pic à mi-hauteur (FWHM) déterminés par déconvolution des différents signaux électrochimiques obtenus par voltampérométrie cyclique.

La déconvolution des bandes des différentes protéines a également permis d'obtenir une idée de l'orientation de la protéine à la surface et de son homogénéité. En effet, la séparation des potentiels de pics permet d'estimer quels sont les cofacteurs situés à proximité de la surface de l'électrode et la largeur de pic à mi-hauteur permet de caractériser l'homogénéité de la surface⁽²⁶⁾. D'après les ΔE_p , il apparaît que les hèmes de types *c* sont proches de la surface c'est-à-dire que le premier accepteur d'électron est proche de la surface de l'électrode. Cependant, une différence est constatée entre les deux isoformes puisque, pour l'isoforme 2, soit un hème de type *b* n'échange pas d'électrons parce que celui-ci se situe trop loin de la surface de l'électrode (à une distance supérieure à 14 Å⁽²⁷⁻³⁰⁾), soit un réseau de coopérativité différent est impliqué.

L'homogénéité de l'orientation de la *cbb*₃-1 et de la *cbb*₃-2 semble similaire puisque les largeurs de pics à mi-hauteur se situent dans le même ordre de grandeur. Des largeurs supérieures ont été observées pour la sous-unité *ccoP* montrant une plus grande inhomogénéité de l'orientation de l'enzyme. Cette constatation n'est cependant pas étonnante puisque la *ccoP* est une partie soluble de la cytochrome *cbb*₃ oxydase ; or, elle a été ici immobilisée à l'aide d'une fonctionnalisation composée d'un mélange de molécules polaires et hydrophobes ne permettant pas d'obtenir une orientation homogène. Il est donc

possible de penser que l'orientation de la cytochrome *cbb*₃ oxydase à la surface de l'électrode est majoritairement contrôlée par la large partie membranaire de ces protéines.

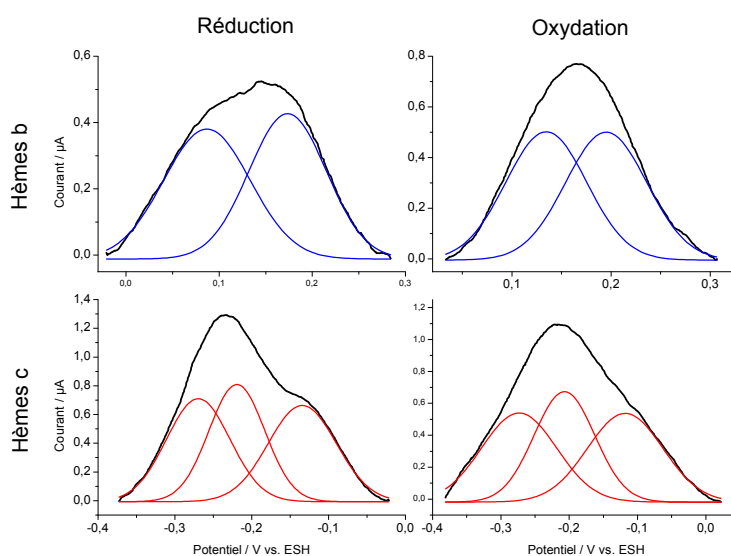


Figure 6.8 : Déconvolution à l'aide de fonctions gaussiennes des signaux électrochimiques obtenus pour la *cbb*₃-1 en voltampérométrie cyclique en absence d'oxygène. Les signaux déconvolués des hèmes *b* sont représentés en bleu et ceux obtenus pour l'hème *c* sont représentés en rouge.

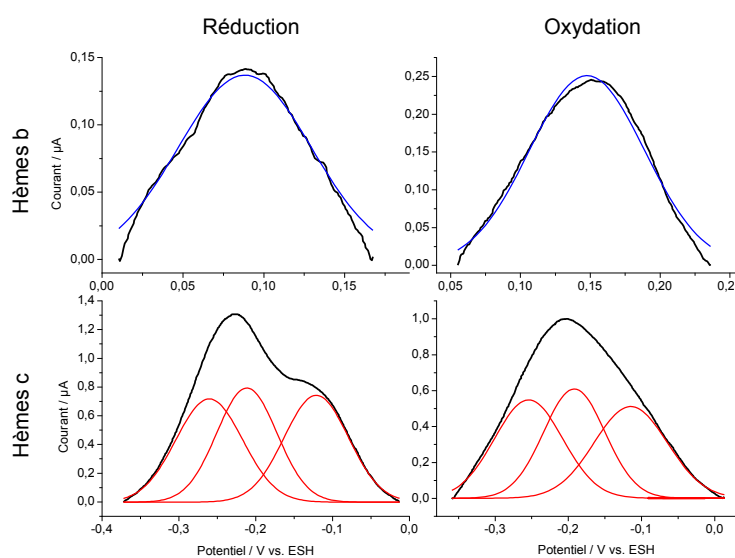


Figure 6.9 : Déconvolution à l'aide de fonctions gaussiennes des signaux électrochimiques obtenus pour la *cbb*₃-2 en voltampérométrie cyclique en absence d'oxygène. Les signaux déconvolués des hèmes *b* sont représentés en bleu et ceux obtenus pour l'hème *c* sont représentés en rouge.

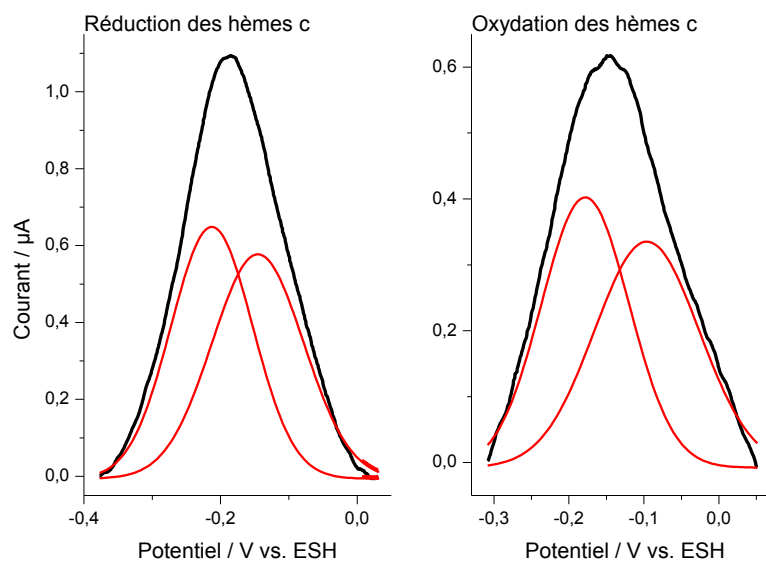


Figure 6.10 : Déconvolution à l'aide de fonctions gaussiennes des signaux électrochimiques obtenus pour la *ccoP* en voltampérométrie cyclique en absence d'oxygène. Les signaux déconvolués pour les hèmes c sont représentés en rouge.

6.2.2.2. En présence d'oxygène

Les deux isoformes de la cytochrome *cbb*₃ oxydase ont également été comparées par voltampérométrie cyclique en présence d'oxygène. La figure 6.12 correspond aux cyclovoltammogrammes observés pour chaque isoforme de la cytochrome *cbb*₃ oxydase immobilisés sur des nanoparticules d'or de 15 nm en présence d'oxygène à pH 7. Dans chaque cas, les signaux réversibles observés en absence d'oxygène se sont transformés en large vague cathodique typique d'une réduction électrocatalytique de l'oxygène. Le potentiel de réduction de l'oxygène se situe dans chaque cas à -0.12 V.

En présence d'oxygène, aucune différence n'est observée entre les deux isoformes de la cytochrome *cbb*₃ oxydase. Ce résultat corrèle avec ceux obtenus par Xie et al. (Figure 6.11) qui n'observent aucune différence concernant l'activité de réduction de l'oxygène mesurée en présence de N,N,N',N'-tetraméthyl-p-phenylènediamine (TMPD)⁽²⁾. Par conséquent, la sous-unité *ccoQ* ne semble modifier ni l'affinité pour l'oxygène de la protéine ni son activité catalytique.

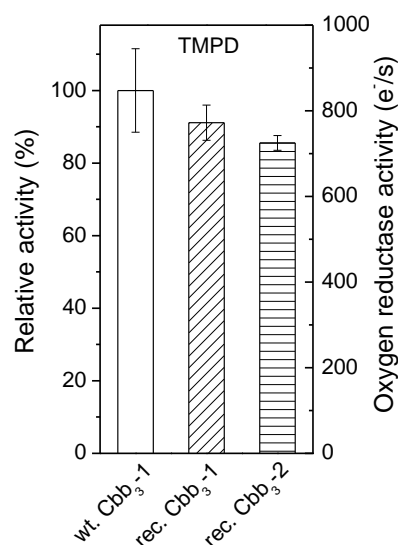


Figure 6.11 : Activité relative et activité de réduction de l'oxygène des deux isoformes de la cytochrome cbb_3 oxydase en présence de TMPD. Graphique et mesures réalisés par Hao Xie (Max Planck Institute of Biophysics, Frankfurt/Main).

Il est également à noter que le potentiel de réduction déterminé n'est pas relié au potentiel redox observé en absence d'oxygène ou par une titration potentiométrique. En effet, les oxydases terminales effectuent la réduction de l'oxygène d'après un « cycle catalytique ». Le potentiel catalytique observé sera donc en lien avec l'étape cinétiquement limitante de ce « cycle catalytique »⁽³¹⁾.

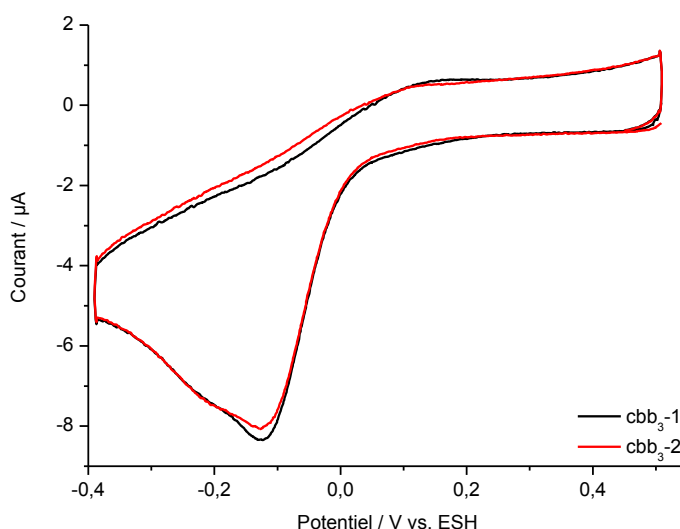


Figure 6.12 : Cyclovoltammogrammes des deux isoformes de la cytochrome cbb_3 oxydase immobilisées sur des nanoparticules d'or de 15 nm en présence d'oxygène. La cbb_3-1 correspond à la courbe noire et la cbb_3-2 correspond à la courbe rouge. Les mesures ont été effectuées dans un tampon phosphate (50 mM, pH 7) à $v=0.02$ V/s.

6.2.2.3. Stabilité thermique

Les deux isoformes de la cytochrome *cbb*₃ oxydase ont été étudiées par voltampérométrie stationnaire à différentes températures afin de comparer leur stabilité thermique. La figure 6.13 présente les voltammogrammes des deux isoformes de la cytochrome *cbb*₃ oxydase à différentes températures à pH 7 et en présence d'oxygène; ces mesures ont été effectuées à 1000 t/s. Dans les deux cas, une large vague sigmoïdale typique d'une réduction électrocatalytique de l'oxygène est observée. Le point d'inflexion de cette vague sigmoïdale, qui correspond au potentiel catalytique⁽³¹⁾, est observé à -50 mV pour les deux isoformes. Pour la *cbb*₃-1, l'activité catalytique augmente entre 25°C et 35°C puis est constante jusqu'à 45°C ; une diminution du courant catalytique est observée après cette température. Concernant la *cbb*₃-2, le courant catalytique reste constant dans un intervalle de température compris entre 25°C et 45°C et diminue à partir de 55°C.

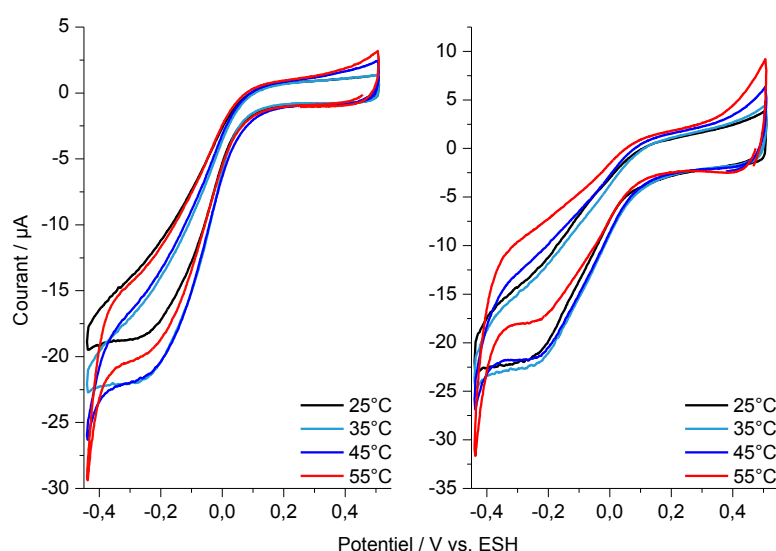


Figure 6.13 : Influence de la température sur l'activité catalytique des deux isoformes de la cytochrome *cbb*₃ oxydase mesuré par voltampérométrie cyclique. Les mesures ont été effectuées dans un tampon phosphate (50 mM, pH 7) à $v=0.02$ V/s.

Xie et al. ont également comparé la thermostabilité des deux isoformes de la cytochrome *cbb*₃ oxydase par calorimétrie différentielle à balayage⁽²⁾. Pour chaque isoforme, deux températures de transition ont été observées. L'isoforme 1 a présenté une stabilité légèrement supérieure à l'isoforme 2 puisque des températures de transition de 51.2 et 75.0°C ont été observées pour la *cbb*₃-1 alors qu'elles étaient de 41.4 et 65.1°C pour l'isoforme 2. Les valeurs déterminées dans notre cas sont proches de celles observées par Xie et al. concernant la première température de transition⁽²⁾. Cependant, nous n'observons pas de diminution d'activité

catalytique dès 41°C pour l'isoforme 2. Cette différence peut s'expliquer par la nature de la transition observée puisque la mesure électrochimique est directement reliée à l'activité catalytique de l'enzyme alors que la mesure par calorimétrie différentielle est liée aux changements structuraux de l'enzyme. Nos résultats montrent que la première température de transition observée par Xie et al. est liée à une dénaturation partielle de l'enzyme entraînant une diminution d'activité catalytique sans engendrer une perte totale de celle-ci. On peut donc penser que le site actif n'est pas impacté au cours de cette première température de transition.

6.2.3. Etude par spectroscopie de résonance Raman

Les deux isoformes de la cytochrome *cbb*₃ oxydase ont été comparées par spectroscopie de résonance Raman. Cette technique permet d'identifier la coordination des hèmes et l'état de spin des cofacteurs. La figure 6.14 présente les spectres Raman des deux isoformes de la cytochrome *cbb*₃ oxydase obtenus avec une excitation à 457 nm.

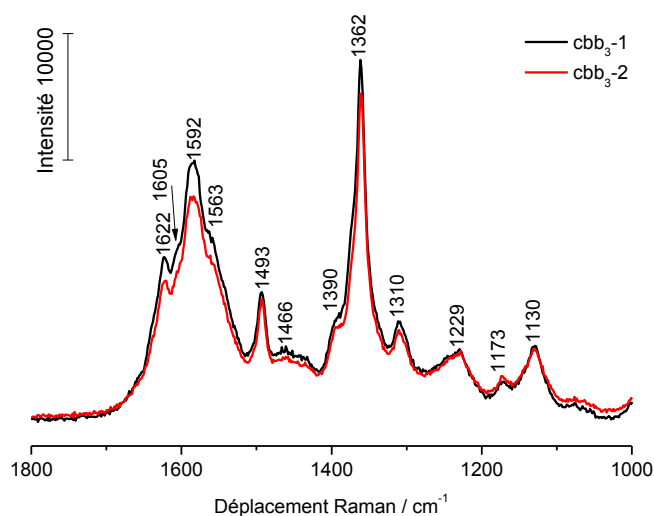


Figure 6.14 : Spectres Raman des deux isoformes de la cytochrome *cbb*₃ oxydase obtenus avec une excitation à 457 nm. Les mesures ont été effectuées dans un tampon phosphate(50 mM) à pH 7.

Dans les deux isoformes, les principales bandes marqueurs de l'état de spin et d'oxydation des hèmes ont pu être observées. L'allure des spectres obtenus est comparable à celle de Varotsis et al.⁽³²⁾ et Pinakoulaki et al.⁽³³⁾ pour la cytochrome *cbb*₃ oxydase de *R. sphaeroides* et *P. stutzeri* avec une excitation à 413 nm. Les bandes ont ainsi pu être attribuées à partir des ces travaux. Les bandes obtenues à 1622 cm⁻¹ et 1605 cm⁻¹ peuvent être attribuées respectivement au mode ν_{10} des hèmes *b* et *c* à l'état réduit et à l'hème *b*₃. L'état d'oxydation de l'hème *b*₃ ne

peut pas être déduit à ce stade puisqu'aucun décalage de cette bande n'est observé en fonction de l'état d'oxydation⁽³²⁾. Deux bandes sont également visibles à 1592 cm⁻¹ et 1563 cm⁻¹ et correspondent au mode ν_2 qui est un marqueur de l'état de spin. Les positions de ces bandes montrent que les hèmes *b* et *c* sont bas spin et que l'hème *b*₃ est haut spin. L'attribution aux hèmes a pu être déduite à partir de la littérature où des mesures en présence de ligands se coordonnant spécifiquement à l'hème *b*₃, comme le monoxyde de carbone ou le cyanure, ont permis d'en séparer certaines contributions marqueurs de l'état de spin comme les bandes ν_2 , ν_3 et ν_{10} . Deux bandes marqueurs de l'état d'oxydation sont également visibles : la bande ν_3 à 1493 cm⁻¹ et 1468 cm⁻¹ et la bande ν_4 à 1362 cm⁻¹. La position de ces deux modes montre que tous les hèmes contenus dans l'enzyme sont à l'état réduit. Cependant, cet effet peut être attribué à la photoréduction des hèmes engendrée par le laser⁽³⁴⁾. D'autres modes caractéristiques des hèmes sont également distinguables et ont été attribués dans le tableau 6.3.

Déplacement Raman / cm ⁻¹	Tentative d'attribution
	Isoforme 1/2
1622	ν_{10}
1605	ν_{10} (hème <i>b</i> ₃)
1592	ν_2
1563	ν_2 (hème <i>b</i> ₃)
1493	ν_3
1466	ν_3 (hème <i>b</i> ₃)
1390	ν_{29}
1362	ν_4
1310	$\delta(\text{CH})$
1229	?
1173	ν_{30}
1130	ν_{44}

Tableau 6.3 : Attributions des différentes bandes observées en spectroscopie de résonance Raman pour les deux isoformes de la cytochrome *cbb*₃ oxydase. L'excitation a été effectuée à 457 nm.

On ne remarque pas de différence notable entre les spectres des deux isoformes. Ces éléments confirment que l'environnement des cofacteurs est similaire dans les deux isoformes. Une attribution plus rigoureuse des bandes observées peut être effectuée par l'obtention des spectres à l'état oxydé ou en présence de ligands comme CO et CN⁻ qui pourrait permettre de

mieux distinguer l'hème b_3 . Une excitation sélective des hèmes b et des hèmes c paraît difficile à envisager compte-tenu de la proximité des bandes observées en spectroscopie UV-Visible⁽²⁾.

6.2.4. Etude par spectroscopie infrarouge différentielle

Afin de caractériser les changements observés au niveau moléculaire dans l'environnement des cofacteurs, du squelette polypeptique et les changements d'état de protonation au cours de la réaction d'oxydoréduction, une étude par spectroscopie infrarouge différentielle induite par électrochimie a été effectuée. La figure 6.15 représente les spectres de la forme oxydée moins la forme réduite des deux isoformes de la cytochrome cbb_3 oxydase.

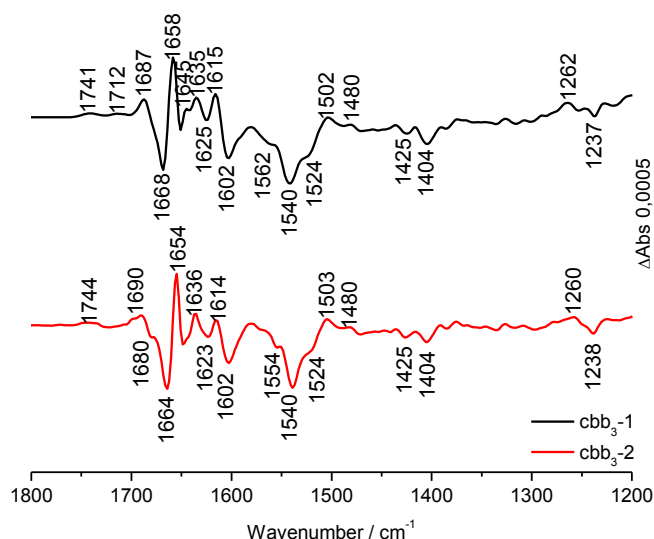


Figure 6.15 : Comparaison des deux isoformes de la cytochrome cbb_3 oxydase par spectroscopie infrarouge différentielle. Les mesures ont été effectuées entre -0.09 et +0.51 V dans un tampon Tris à pH 7.5.

Les signaux positifs correspondent aux changements ayant lieu au cours de l'oxydation et les signaux négatifs reflètent les changements se produisant au cours de la réaction de réduction. L'attribution des signaux a été effectuée à partir d'études déjà publiées pour d'autres oxydases terminales^(8, 17, 35, 36), de systèmes modèles possédant des hèmes b ⁽³⁷⁾ et c ⁽⁷⁾ et d'études par spectroscopie de résonance Raman effectuées sur la cytochrome cbb_3 oxydase^(32, 33). L'allure générale des spectres observés pour les deux isoformes est typique pour les oxydases terminales.

- Squelette polypeptidique

Les contributions majeures du squelette peptidique sont observées entre 1680 cm⁻¹ et 1620 cm⁻¹(³⁸). Ces signaux correspondent à la bande Amide I et sont typiques d'une réorganisation du squelette peptidique. La réorganisation des feuilletts β peut être observée entre 1690-1680 cm⁻¹ et entre 1645-1620 cm⁻¹; celle des hélices α est majoritairement observée entre 1670 et 1650 cm⁻¹. Des signaux correspondant à Amide II sont aussi attendus entre 1570 cm⁻¹ et 1520 cm⁻¹ et sont caractéristiques du couplage des vibrations ν(C-N) et δ(N-H).

- Cofacteurs

Les vibrations typiques des hèmes sont observées entre 1620 cm⁻¹ et 1500 cm⁻¹ (³⁹). Les bandes ν₃₇ sont visibles entre 1620 cm⁻¹ et 1560 cm⁻¹. Une étude par spectroscopie Raman sur la cytochrome *cbb*₃ oxydase de *P. stutzeri* dans sa forme réduite a montré la présence de ce signal à 1605 cm⁻¹ pour les hèmes bas spin(³³). Dans notre cas, ces bandes ont été observées à 1615 cm⁻¹ en oxydation et 1602 cm⁻¹ en réduction. Une autre bande caractéristique des protéines hémiques est ν₃₈ et se situe entre 1535 cm⁻¹ et 1570 cm⁻¹. Pour la cytochrome *ba*₃ oxydase de *T. thermophilus*, cette bande a pu être attribué pour l'hème *b* à 1554 cm⁻¹ pour la forme réduite et à 1533 cm⁻¹ dans la forme oxydée(⁴⁰). Cette bande est difficile à attribuer puisqu'il faut prendre en compte l'existence d'autres contributions dans cette zone spectrale. Cependant, des positions plausibles de cette bande se trouvent à 1562 cm⁻¹ et 1540 cm⁻¹ pour l'isoforme 1 et 1554 cm⁻¹ et 1540 cm⁻¹ pour l'isoforme 2.

- Propionates des hèmes

Les bandes correspondant aux propionates des hèmes dans leur forme protonée sont généralement présentes entre 1710 cm⁻¹ et 1675 cm⁻¹. Une étude de Behr et al. (⁴¹) présentant un marquage spécifique des quatre propionates des hèmes au ¹³C dans la cytochrome *aa*₃ oxydase de *P. denitrificans* a montré une diminution de l'intensité d'une bande négative à 1676 cm⁻¹ dans le spectre réduit moins oxydé afin de prouver l'existence des signaux des propionates à cette position. Dans notre étude, une bande à 1690 cm⁻¹ pour l'isoforme 1 et une à 1687 cm⁻¹ pour l'isoforme 2 dans leur forme oxydée sont attribuées à la vibration ν(C=O) des propionates des hèmes. Les bandes des propionates des hèmes dans leur forme déprotonée sont observées entre 1570 cm⁻¹ et 1530 cm⁻¹ pour la vibration ν(COO⁻)^{as} et aux environs de

1400 cm⁻¹ pour $\nu(\text{COO}^-)^s$. Dans la cytochrome *aa*₃ oxydase de *P. denitrificans*, ces signaux ont été visualisés respectivement à 1538 cm⁻¹ et 1390 cm⁻¹⁽⁴¹⁾. Sur les spectres différentiels des deux isoformes de la cytochrome *cbb*₃ oxydase, des signaux à 1562 cm⁻¹ et 1404 cm⁻¹ et à 1554 cm⁻¹ et 1404 cm⁻¹ sont présents respectivement pour la *cbb*₃-1 et pour la *cbb*₃-2.

- Acides aminés individuels

Les arginines présentent des modes vibrationnels $\nu(\text{CN}_3\text{H}_5)^{as}$ vers 1675 cm⁻¹ et $\nu(\text{CN}_3\text{H}_5)^s$ vers 1635 cm⁻¹⁽³⁸⁾. Dans notre étude, une arginine pourrait contribuer aux vibrations à 1680 cm⁻¹ et 1636 cm⁻¹ en réduction pour l'isoforme 2.

Les acides aspartiques et glutamiques possèdent également des modes de vibration visibles sur le spectre différentiel. La vibration $\nu(\text{C}=\text{O})$ de l'état protoné est visible entre 1790 cm⁻¹ et 1710 cm⁻¹ alors que l'état déprotoné est caractérisée par les vibrations $\nu(\text{COO}^-)^{as}$ entre 1590 cm⁻¹ et 1530 cm⁻¹ et $\nu(\text{COO}^-)^s$ entre 1430 cm⁻¹ et 1380 cm⁻¹⁽⁴²⁾. Pour la cytochrome *cbb*₃ oxydase oxydée, des acides aspartiques ou glutamiques protonés sont observés à 1741 cm⁻¹ et 1712 cm⁻¹ pour la *cbb*₃-1 et à 1744 cm⁻¹ pour la *cbb*₃-2. Les formes déprotonées peuvent être identifiées en réduction à 1562 cm⁻¹, 1540 cm⁻¹, 1425 cm⁻¹ et 1404 cm⁻¹ pour l'isoforme 1 et à 1554 cm⁻¹, 1540 cm⁻¹, 1425 cm⁻¹ et 1404 cm⁻¹ pour l'isoforme 2 dans la cytochrome *cbb*₃ oxydase réduite.

Les bandes des tyrosines peuvent également être visibles sur un spectre différentiel. Elles sont souvent observées dans leur forme protonée vers 1520 cm⁻¹ et entre 1270 cm⁻¹ et 1235 cm⁻¹ alors que les formes déprotonées sont observées vers 1500 cm⁻¹ et 1270 cm⁻¹⁽⁴²⁾. L'isoforme 1 possède un signal de Tyr-OH à 1237 cm⁻¹ en réduction et de Tyr-O⁻ à 1502 cm⁻¹ et 1262 cm⁻¹ en oxydation. Les signaux similaires sont observés pour l'isoforme 2 à 1238 cm⁻¹ et à 1503 cm⁻¹ et 1260 cm⁻¹.

Fréquence isoforme 1 / cm ⁻¹		Fréquence isoforme 2 / cm ⁻¹		Tentative d'attribution
+	-	+	-	
		1744		$\nu(\text{C}=\text{O})$ Asp/Glu
1741				$\nu(\text{C}=\text{O})$ Asp/Glu
1712				$\nu(\text{C}=\text{O})$ Asp/Glu
		1690		$\nu(\text{C}=\text{O})$ propionates des hèmes

Comparaison de deux isoformes de la cytochrome *cbb*₃ oxydase

		Amide I (feuillet β)
1687		$\nu(\text{C}=\text{O})$ propionates des hèmes Amide I (feuillet β)
	1680	$\nu(\text{CN}_3\text{H}_5)^{\text{as}}$ Arg Amide I (coudes, feuillet β)
1668		Amide I (coudes, hélices α)
	1664	Amide I (coudes, hélices α)
1658		Amide I (hélices α)
	1654	Amide I (hélices α)
1645		Amide I (feuillet β)
	1636	Amide I (feuillet β) $\nu(\text{CN}_3\text{H}_5)^{\text{s}}$ Arg
1635		Amide I (feuillet β)
	1625	Amide I (feuillet β)
	1623	Amide I (feuillet β)
1615		ν_{37} hèmes <i>b/c</i>
	1614	ν_{37} hèmes <i>b/c</i>
	1602	ν_{37} hèmes <i>b/c</i>
	1562	ν_{38} hèmes <i>b/c</i> $\nu(\text{COO}^-)^{\text{as}}$ Asp/Glu $\nu(\text{COO}^-)^{\text{as}}$ propionates des hèmes Amide II
	1554	ν_{38} hèmes <i>b/c</i> $\nu(\text{COO}^-)^{\text{as}}$ Asp/Glu $\nu(\text{COO}^-)^{\text{as}}$ propionates des hèmes Amide II
	1540	ν_{38} hèmes <i>b/c</i> $\nu(\text{COO}^-)^{\text{as}}$ Asp/Glu $\nu(\text{COO}^-)^{\text{as}}$ propionates des hèmes Amide II
	1524	Amide II
	1503	Tyr-O ⁻
1502		Tyr-O ⁻

1480	1480	ν_{39} hèmes <i>b/c</i>
1425	1425	$\nu(\text{COO}^-)^s$ Asp/Glu
1404	1404	$\nu(\text{COO}^-)^s$ propionates des hèmes $\nu(\text{COO}^-)^s$ Asp/Glu
1262		Tyr-O ⁻
	1260	Tyr-O ⁻
	1238	Tyr-OH
1237		Tyr-OH

Tableau 6.4: Récapitulatif des bandes observées sur les spectres différentiels induits par électrochimie des deux isoformes de la cytochrome *cbb*₃ oxydase et tentatives d'attributions.

En résumé, les vibrations $\nu(\text{C}=\text{O})$ des acides aspartiques, glutamiques et des propionates des hèmes protonés sont observées à des nombres d'ondes plus élevées dans le cas de l'isoforme 2. Cette différence implique que les résidus protonables engagés dans la réaction d'oxydoréduction sont situés dans des environnements plus hydrophobes pour la *cbb*₃-2. Les acides glutamiques/aspartiques et les propionates des hèmes peuvent être impliqués dans des échanges de protons au cours de la réaction d'oxydoréduction afin de maintenir l'électroneutralité au cours de la réduction⁽⁴³⁾. Les meilleurs candidats pour l'attribution de ces signaux sont donc les acides situés à proximité des hèmes comme Glu122 ou Glu323 qui sont situés dans un environnement hydrophobe et pourrait participer au maintien de l'électroneutralité dans l'environnement de l'hème b_3 ⁽³⁾ mais d'autres candidats ne sont pas à exclure. Il a été montré que la mutation de l'équivalent de Glu122 chez *V. cholerae* et *R. sphaeroides* induisait une perte d'activité et la perte d'un Ca^{2+} pontant les propionates des hèmes *b* et b_3 ⁽⁴⁴⁾. Cet atome de calcium remplace l'arginine pontant les propionates sur les deux hèmes voisins dans les oxydases de type A et B (Figure 6.16). Il a donc été proposé que cet acide glutamique participait au maintien de l'intégrité structurale de l'enzyme et qu'il ne participait donc pas au pompage de protons⁽⁴⁴⁾. Le pK_a de cet acide aminé essentiel est donc probablement faible afin de le maintenir dans un état déprotoné permettant la coordination du Ca^{2+} et peut être écarté avec certitude dans l'attribution du signal observé.

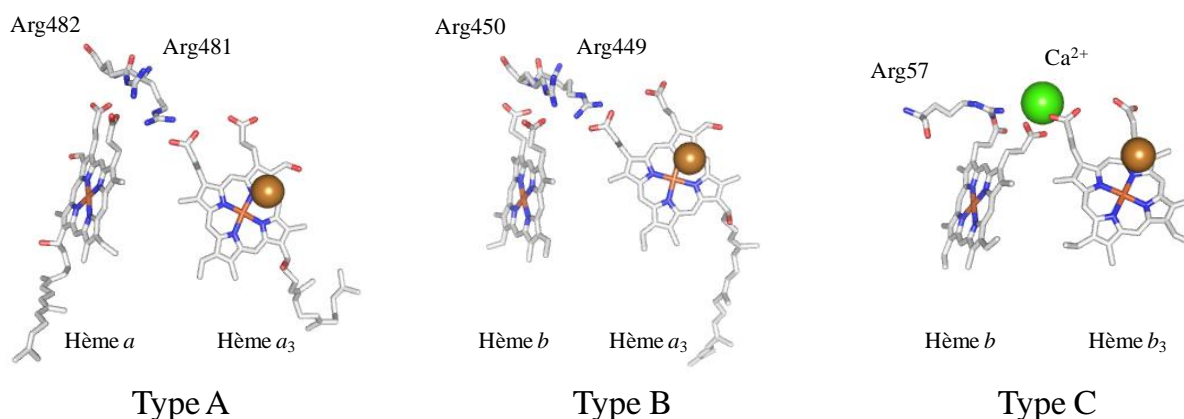


Figure 6.16 : Représentation de la conservation des arginines pontantes dans les oxydases terminales de type A (PDB : 1M56⁽⁴⁵⁾) et B (PDB : 1EHK⁽⁴⁶⁾) et comparaison avec les oxydases de type C (PDB : 3MK7⁽³⁾). Dans les oxydases de type C, l'arginine pontant les deux hèmes est remplacée par un atome de calcium.

La deuxième différence notable entre les deux isoformes est la possible présence d'une arginine sur le spectre différentiel de la *cbb*₃-2. La candidate la plus probable est Arg57 pontant deux propionates de l'hème *b* par liaisons hydrogènes⁽³⁾. Cette arginine est largement conservée dans les oxydases terminales. Il faut cependant garder à l'esprit que la structure cristallographique de la *cbb*₃-2 n'est pas connue à ce jour et que cette interprétation est basée sur la structure de la *cbb*₃-1. Qian et al. ont proposé que cette arginine jouait un rôle important dans le transfert d'électrons entre le Cu_A et l'hème *a* dans la cytochrome *aa*₃ oxydase de *R. sphaeroides* puisque sa mutation engendre une diminution de la différence de potentiel entre ces deux relais d'électrons et donc une diminution de la cinétique de transfert d'électrons⁽⁴⁷⁾. La différence observée entre les deux isoformes permet d'envisager un rôle différent de cet acide aminé dans les deux isoformes.

Les tentatives d'attributions ainsi que les différences observées entre les deux isoformes ont été établies à partir de deux protéines dans la forme native. Il reste évident que cette étude ne permet pas d'établir avec certitude la raison des différences observées et il est par conséquent nécessaire de compléter cette étude en comparant ces données avec celles de mutants des acides aminés discutés.

6.2.5. Etude de la stabilité thermique par spectroscopie infrarouge

Afin d'étudier les changements de structures secondaires induits par la température, les deux isoformes ont été comparées par spectroscopie infrarouge en transmission à différentes

températures (Figure 6.17). Ces mesures ont été effectuées en solution tampon deutérée afin de s'affranchir de la contribution de l'eau sous la bande Amide I.

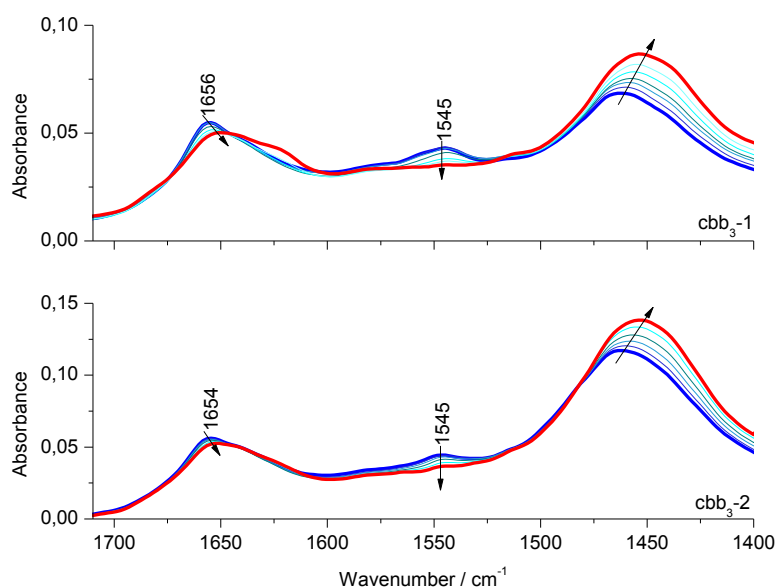


Figure 6.17 : Comparaison de la stabilité thermique des deux isoformes de la cytochrome *cbb*₃ oxydase entre 15°C et 75°C par spectroscopie infrarouge en transmission. Les mesures en gras représentent les températures extrêmes (15°C en bleu et 75°C en rouge).

La première différence notable entre les deux isoformes concerne la position Amide I à 1656 cm^{-1} pour l'isoforme 1 et à 1654 cm^{-1} pour l'isoforme 2 (qui possède une sous-unité CcoQ supplémentaire) laissant présager une plus grande proportion d'hélices α pour la *cbb*₃-I à 15°C. Cette observation est vérifiée par la déconvolution de la bande Amide I⁽⁴⁸⁾ à 15°C résultant en une différence de 10 % d'hélices α entre les deux isoformes (60 % pour la *cbb*₃-1 et 50 % pour la *cbb*₃-2). Pour les deux isoformes, la bande Amide I est décalée vers les basses fréquences au cours de l'augmentation de température traduisant la diminution de la proportion d'hélices α . Ce changement de structure secondaire est également confirmé par la déconvolution de la bande Amide I puisque une perte de 10 % est constatée entre 15°C et 75°C pour chaque isoforme.

La mesure en solvant deutéré permet également d'obtenir des informations grâce à la bande Amide II⁽⁴⁹⁾. En effet, l'échange H/D découple les vibrations $\nu(\text{C-N})$ et $\delta(\text{N-H})$ et il en résulte un décalage de la vibration $\nu(\text{C-N})$ vers 1460 cm^{-1} et de $\delta(\text{N-H})$ vers 1070-900 cm^{-1} . Le déplieement de la structure tertiaire de la protéine (permettant l'échange H/D d'éléments structuraux non accessibles dans la structure de départ) peut par conséquent être sondé par la décroissance de la bande Amide II et l'augmentation de la bande Amide II' résultant du

découplage des vibration $\nu(\text{C-N})$ et $\delta(\text{N-H})$. Pour chaque isoforme, la disparition de la bande Amide II couplée à une augmentation de la bande Amide II' est observée traduisant l'ouverture de la structure.

En comparaison aux données publiées par Xie et al.⁽²⁾ qui suggèrent une stabilité thermique de l'isoforme 1 supérieure de 10°C, il est dans notre cas difficile d'estimer des changements structuraux majeurs induisant la dénaturation puisque seul 10% d'hélices α sont perdus au cours de l'augmentation de température. De plus, la disparition de la bande Amide II est observée dans les deux cas.

La corrélation des résultats obtenus par spectroscopie infrarouge avec les données obtenues par électrochimie directe montre que la diminution d'activité peut essentiellement être corrélée à des changements de structures tertiaires puisqu'aucune transition particulière ne peut être observée par spectroscopie infrarouge entre 45°C et 55°C.

Isoforme	Température / °C	Hélices α / %	Coudes / %	Feuillets β + désorganisés / %
<i>cbb₃-1</i>	15	60	5	35
	75	50	5	45
<i>cbb₃-2</i>	15	50	15	35
	75	40	10	50

Tableau 6.5 : Changements de structures secondaires observés au cours de l'augmentation de température. Les résultats ont été obtenus par déconvolution de la bande Amide I à la température correspondante⁽⁴⁸⁾.

6.3. Caractérisation et identification des donneurs naturels d'électrons de la cytochrome *cbb₃* oxydase

6.3.1. Titration potentiométrique par spectroscopie UV-Visible

Les titrations potentiométriques des différents donneurs d'électrons naturels d'électrons ont été effectuées par spectroscopie UV-Visible afin de déterminer les potentiels d'oxydoréduction de chacun d'entre eux. La figure 6.18 présente le spectre différentiel du cytochrome *c₄* obtenu pour la forme oxydée moins la forme réduite et inversement à pH 7.5. Les spectres différentiels des deux autres donneurs d'électrons sont présentés en annexe et présentent des bandes similaires. Les spectres différentiels de chaque donneur sont comparables à ceux obtenus pour d'autres protéines contenant des hèmes *c* avec une bande β

caractéristique à environ 550 nm, une bande α vers 520 nm et une bande de Soret entre 400 et 425 nm ^(7, 50, 51) (Tableau 6.6). Dans chaque cas, le spectre différentiel est parfaitement réversible et présente tous les signaux des hèmes à titrer. Compte-tenu de la présence d'un seul type d'hème dans chaque cas, le maximum de la bande de Soret est utilisé pour la détermination des potentiels d'oxydoréduction.

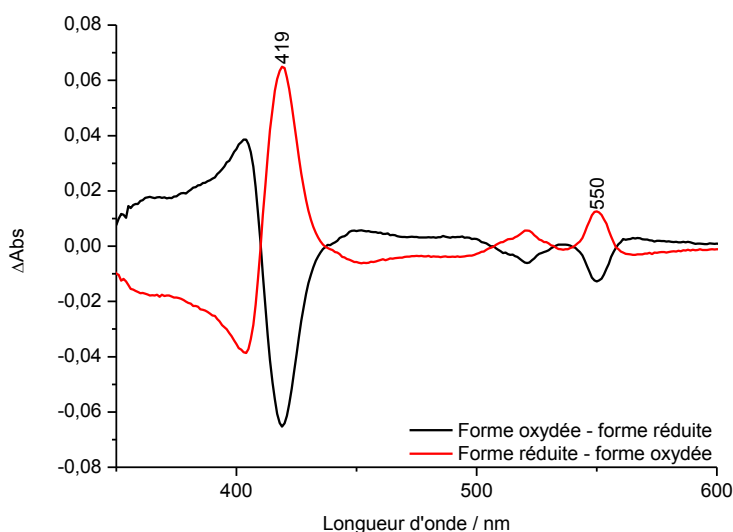


Figure 6.18 : Spectres différentiels UV-Visible de la forme oxydée moins réduite et de la forme réduite moins oxydée du cytochrome *c*₄. Les mesures ont été effectuées entre -0.19 et 0.51 V dans un tampon Tris à pH 7.5.

	Soret / nm	α / nm	β / nm
Cytochrome <i>c</i>₄	419	521	550
Cytochrome <i>c</i>₅	421	524	554
Cytochrome <i>c</i>₅₅₁	418	520	551

Tableau 6.6 : Maxima des bandes de Soret, α et β pour chaque substrat en spectroscopie UV-Visible différentiel induit par électrochimie.

La détermination des potentiels d'oxydoréduction a été effectuée selon le même principe que pour la cytochrome *cbb*₃ oxydase c'est-à-dire en traçant les graphiques Δ Abs vs. E_{app} puis en simulant les courbes obtenues à l'aide d'une équation de Nernst (Figure 6.19). Comme les cytochromes *c*₅ et *c*₅₅₁ ne possèdent qu'un seul hème, une équation proposant une transition à un électron a été utilisée. Pour le cytochrome *c*₄ qui possède deux hèmes, une équation impliquant deux transitions à un électron a été appliquée pour la simulation. Les résultats obtenus sont compilés dans le tableau 6.7.

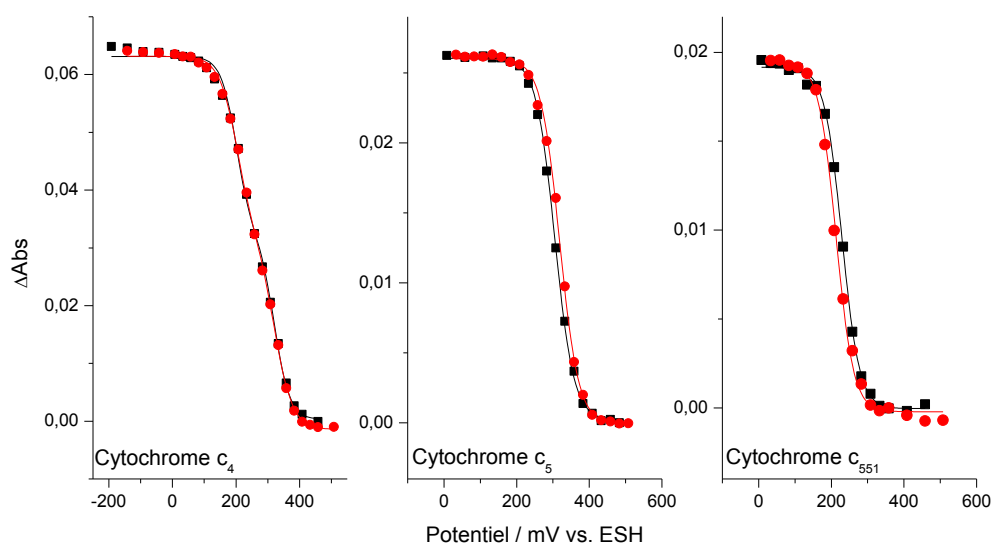


Figure 6.19 : Titrations potentiométriques des cytochromes *c*₄, *c*₅ et *c*₅₅₁. Les titrations réductrices sont représentées en noir et les titrations oxydatives sont représentées en rouge. Toutes les mesures ont été effectuées dans un tampon Tris (50 mM) à pH 7.5.

	Potentiel / mV vs. ESH
Cytochrome <i>c</i> ₄	210 / 310
Cytochrome <i>c</i> ₅	310
Cytochrome <i>c</i> ₅₅₁	225

Tableau 6.7 : Potentiels d'oxydoréduction obtenus par titration potentiométrique de chaque donneur d'électrons probables.

Les potentiels d'oxydoréduction déterminés par spectroscopie UV-Visible montrent que le potentiel du cytochrome *c*₅ est supérieur à ceux des cytochromes *c*₄ et *c*₅₅₁. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Hao Xie du laboratoire du Pr. Dr. Hartmut Michel à Frankfurt montrant que l'activité de réduction de l'oxygène est largement supérieure en présence des cytochromes *c*₄ ou *c*₅₅₁ qu'en présence du cytochrome *c*₅. La raison de cette différence semble donc provenir du potentiel d'oxydoréduction du donneur d'électron puisque l'augmentation de ce potentiel engendre une diminution de la capacité de transfert d'électron aux hèmes *c* de l'enzyme qui présentent un potentiel voisin de +200 mV.

Une étude du même type concernant la caractérisation du donneur d'électron naturel de la cytochrome *cbb*₃ oxydase de *V. cholerae* a été proposée par Chang et al.⁽²¹⁾. Des mesures d'activité de la cytochrome *cbb*₃ oxydase en présence de cytochrome *c*₄ et *c*₅ ont été

effectuées. Il a été montré que le cytochrome *cbb*₃ oxydase présentait une activité de réduction de l'oxygène en présence de cytochrome *c*₄ uniquement mais ils n'ont pas exclu que d'autres cytochromes de type *c* pouvaient jouer le rôle de substrat naturel. Notre étude semble montrer, qu'en plus du cytochrome *c*₄, le cytochrome *c*₅₅₁ peut potentiellement jouer le rôle de substrat naturel de la cytochrome *cbb*₃ oxydase.

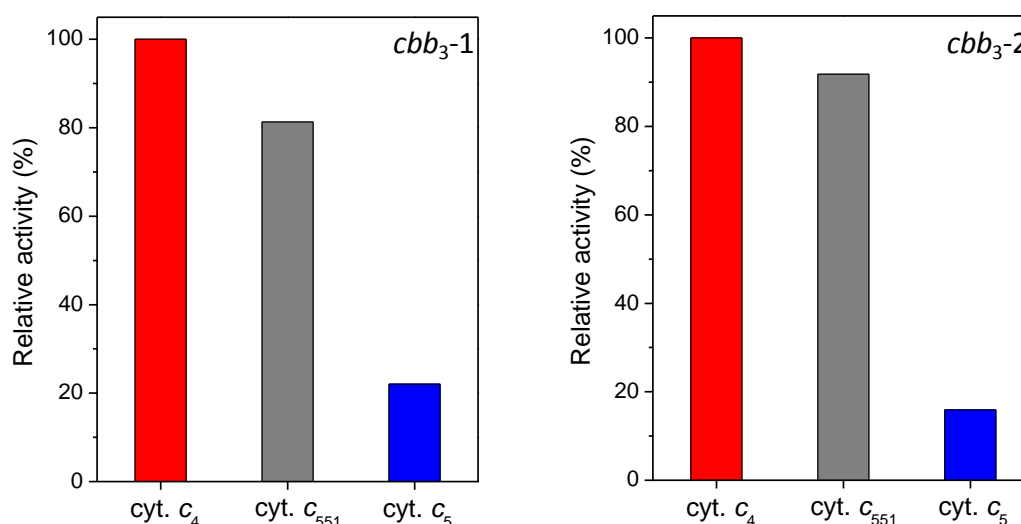


Figure 6.20 : Activité enzymatique relative des deux isoformes de la cytochrome *cbb*₃ oxydase en présence de cytochrome *c*₄, *c*₅ ou *c*₅₅₁. Graphiques et mesures réalisés par Hao Xie.

6.3.2. Détermination des potentiels d'oxydoréduction par électrochimie directe

Afin de compléter les données obtenues par titrations potentiométriques, les trois substrats de la cytochrome *cbb*₃ oxydase ont été caractérisés par électrochimie directe. La figure 6.21 montre les cyclovoltammogrammes obtenus pour les cytochromes *c*₄, *c*₅ et *c*₅₅₁ immobilisés sur des nanoparticules d'or de 15 nm à pH 7.5. Les cytochromes *c*₅ et *c*₅₅₁ présentent chacun un pic réversible typique d'une protéine monohémique alors que le cytochrome *c*₄ présente deux pics réversibles caractéristiques d'une protéine dihémique. Ces caractéristiques montrent que dans chaque cas, l'immobilisation permet le transfert d'électrons entre les cofacteurs présents dans chaque substrat.

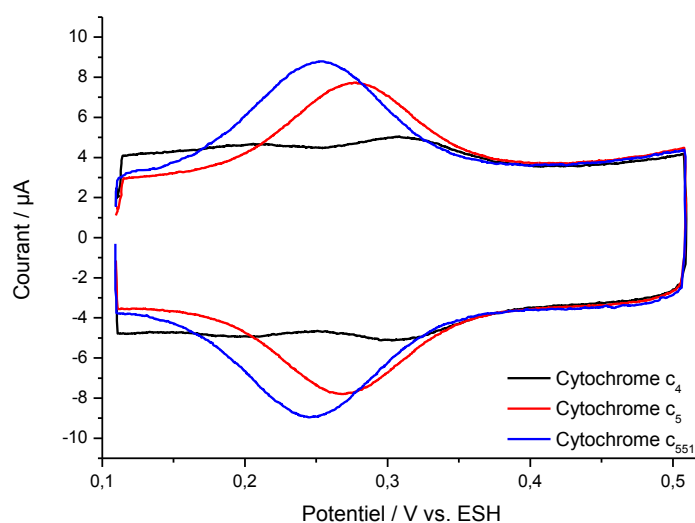


Figure 6.21 : Cyclovoltammogrammes des trois substrats potentiels de la cytochrome *cbb*₃ oxydase. Les mesures ont été effectuées dans un tampon phosphate (50 mM) à pH 7.5.

Les potentiels de demi-vague ont été déterminés pour chaque donneur d'électrons et sont compilés dans le tableau 6.8.

	Potentiel / mV vs. ESH
Cytochrome c₄	210 / 310
Cytochrome c₅	275
Cytochrome c₅₅₁	250

Tableau 6.8 : Potentiels de demi-vague obtenus par voltampérométrie de chaque donneur d'électrons probables.

Comme observé par titration potentiométrique, les cytochromes *c*₄ et *c*₅₅₁ possèdent au moins un cofacteur avec un potentiel de demi-vague plus négatif que le cytochrome *c*₅. Ceci explique les résultats observés lors des mesures d'activités effectués par Hao Xie. Il est également intéressant d'observer la corrélation entre la force électromotrice entre le donneur et l'accepteur d'électron et l'activité puisque l'activité enzymatique la plus élevée a été obtenue en présence de cytochrome *c*₄ qui possède l'hème avec le potentiel le plus bas. Pour le cytochrome *c*₅, dont le potentiel de demi-vague est le plus positif des trois donneurs, l'activité est drastiquement diminuée (Figure 6.20). Le potentiel d'oxydoréduction de l'hème *c* de chaque substrat semble avoir une influence cruciale dans la cinétique de réduction de l'oxygène par la cytochrome *cbb*₃ oxydase.

Il est également à noter qu'une différence est observée dans les valeurs de potentiels d'oxydoréduction obtenus par titration potentiométrique et par voltampérométrie cyclique même si les valeurs restent proches puisque le plus grand changement est observé pour le cytochrome *c*₅ (35 mV). Les trois protéines conservent donc leur intégrité structurale sur la surface modifiée et les dissimilitudes observées peuvent être attribuées à l'interaction entre la protéine et le support ou encore aux interactions protéines-protéines^(19, 52-54).

6.4. Conclusion

La comparaison des deux isoformes à travers différentes techniques de caractérisation complète les données publiées par Xie et al. et confirme que les deux isoformes de la cytochrome *cbb*₃ oxydases sont très semblables concernant leur activité de réduction de l'oxygène et les propriétés de leurs cofacteurs redox. Cependant, la spectroscopie infrarouge différentielle couplée à l'électrochimie montre des différences au niveau des résidus acides et de possibles acides aminés impliquant des différences mécanistiques. Afin de confirmer le rôle des acides aminés proposés, des études de protéines mutées seront nécessaires dans le futur.

L'étude des cytochromes *c*₄, *c*₅ et *c*₅₅₁ comme potentiels donneurs d'électrons à la cytochrome *cbb*₃ oxydase a permis d'apporter une explication quant à la différence d'activité de réduction de l'oxygène observée en présence de chaque substrat. Le cytochrome *c*₅, dont le potentiel d'oxydoréduction est plus élevé que celui des cytochromes *c*₄ et *c*₅₅₁, donne lieu à une activité plus faible de la cytochrome *cbb*₃ oxydase. Cette différence peut être expliquée par la différence de force électromotrice engendrée par la différence de potentiel de chaque donneur d'électrons.

6.5. Références

1. Comolli, J. C., and Donohue, T. J. (2004) Differences in two *Pseudomonas aeruginosa* *cbb*₃ cytochrome oxidases, *Mol. Microbiol.* *51*, 1193-1203.
2. Xie, H., Buschmann, S., Langer, J. D., Ludwig, B., and Michel, H. (2014) Biochemical and biophysical characterization of the two isoforms of *cbb*₃-type cytochrome c oxidase from *Pseudomonas stutzeri*, *J. Bacteriol.* *196*, 472-482, 412 pp.
3. Buschmann, S., Warkentin, E., Xie, H., Langer, J. D., Ermler, U., and Michel, H. (2010) The structure of *cbb*₃ cytochrome oxidase provides insights into proton pumping, *Science* *329*, 327-330.
4. Kadziola, A., and Larsen, S. (1997) Crystal structure of the diheme cytochrome c₄ from *Pseudomonas stutzeri* determined at 2.2 Å resolution, *Structure (London)* *5*, 203-216.
5. Carter, D. C., Melis, K. A., O'Donnell, S. E., Burgess, B. K., Furey, W. F., Jr., Wang, B. C., and Stout, C. D. (1985) Crystal structure of *Azotobacter* cytochrome c₅ at 2.5-Å resolution, *J. Mol. Biol.* *184*, 279-295.
6. Cai, M., Bradford, E. G., and Timkovich, R. (1992) Investigation of the solution conformation of cytochrome c-551 from *Pseudomonas stutzeri*, *Biochemistry* *31*, 8603-8612.
7. Moss, D., Nabadryk, E., Breton, J., and Maentele, 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.
8. Hellwig, P., Soulimane, T., Buse, G., and Maentele, W. (1999) Electrochemical, FTIR, and UV/VIS Spectroscopic Properties of the *ba*₃ Oxidase from *Thermus thermophilus*, *Biochemistry* *38*, 9648-9658.
9. Verissimo, A. F., Sousa, F. L., Baptista, A. M., Teixeira, M., and Pereira, M. M. (2007) Thermodynamic Redox Behavior of the Heme Centers of *cbb*₃ Heme-Copper Oxygen Reductase from *Bradyrhizobium japonicum*, *Biochemistry* *46*, 13245-13253.
10. Wikstrom, M. K. F., and Saari, H. T. (1977) The mechanism of energy conservation and transduction by mitochondrial cytochrome c oxidase, *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* *462*, 347-361.
11. Nicholls, P., Van Buuren, K. J. H., and Van Gelder, B. F. (1972) Biochemical and biophysical studies on cytochrome aa₃. VIII. Effect of cyanide on the catalytic activity, *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* *275*, 279-287.
12. Nicholls, P. (1979) Effects of inhibitory ligands on the aerobic carbon monoxide complex of cytochrome c oxidase, *Biochem. J.* *183*, 519-529.
13. Pitcher, R. S., and Watmough, N. J. (2004) The bacterial cytochrome *cbb*₃ oxidases, *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* *1655*, 388-399.
14. Gray, K. A., Grooms, M., Myllykallio, H., Moomaw, C., Slaughter, C., and Daldal, F. (1994) *Rhodobacter capsulatus* Contains a Novel cb-Type Cytochrome c Oxidase without a CuA Center, *Biochemistry* *33*, 3120-3127.
15. Rauhamaeki, V., Bloch, D. A., Verkhovsky, M. I., and Wikstroem, M. (2009) Active Site of Cytochrome *cbb*₃, *J. Biol. Chem.* *284*, 11301-11308.
16. Pereira, M. M., Carita, J. N., Anglin, R., Saraste, M., and Teixeira, M. (2000) Heme centers of *Rhodothermus marinus* respiratory chain. Characterization of its *cbb*₃ oxidase, *J. Bioenerg. Biomembr.* *32*, 143-152.
17. Hellwig, P., Grzybek, S., Behr, J., Ludwig, B., Michel, H., and Maentele, 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.
18. 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.
 19. Meyer, T., Gross, J., Blanck, C., Schmutz, M., Ludwig, B., Hellwig, P., and Melin, F. (2011) 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* 115, 7165-7170.
 20. Bernad, S., Soulimane, T., Mehkali, Z., and Lecomte, S. (2006) Characterization and redox properties of cytochrome *c*₅₅₂ from *Thermus thermophilus* adsorbed on different self-assembled thiol monolayers, used to model the chemical environment of the redox partner, *Biopolymers* 81, 407-418.
 21. Chang, H.-Y., Ahn, Y., Pace, L. A., Lin, M. T., Lin, Y.-H., and Gennis, R. B. (2010) The Diheme Cytochrome *c*₄ from *Vibrio cholerae* Is a Natural Electron Donor to the Respiratory *cbb*₃ Oxygen Reductase, *Biochemistry* 49, 7494-7503.
 22. Monari, S., Battistuzzi, G., Borsari, M., Di Rocco, G., Martini, L., Ranieri, A., and Sola, M. (2009) Heterogeneous Electron Transfer of a Two-Centered Heme Protein: Redox and Electrocatalytic Properties of Surface-Immobilized Cytochrome *c*₄, *J. Phys. Chem. B* 113, 13645-13653.
 23. Ducluzeau, A.-L., Ouchane, S., and Nitschke, W. (2008) The *cbb*₃ oxidases are an ancient innovation of the domain Bacteria, *Mol. Biol. Evol.* 25, 1158-1166.
 24. Castresana, J., and Saraste, M. (1995) Evolution of energetic metabolism: the respiration-early hypothesis, *Trends Biochem. Sci.* 20, 443-448.
 25. Hrabakova, J., Ataka, K., Heberle, J., Hildebrandt, P., and Murgida, D. H. (2006) Long distance electron transfer in cytochrome *c* oxidase immobilised on electrodes. A surface enhanced resonance Raman spectroscopic study, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 8, 759-766.
 26. Leger, C., Jones, A. K., Albracht, S. P. J., and Armstrong, F. A. (2002) Effect of a Dispersion of Interfacial Electron Transfer Rates on Steady State Catalytic Electron Transport in [NiFe]-hydrogenase and Other Enzymes, *J. Phys. Chem. B* 106, 13058-13063.
 27. Page, C. C., Moser, C. C., Chen, X., and Dutton, P. L. (1999) Natural engineering principles of electron tunneling in biological oxidation-reduction, *Nature (London)* 402, 47-52.
 28. Moser, C. C., Anderson, J. L. R., and Dutton, P. L. (2010) Guidelines for tunneling in enzymes, *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* 1797, 1573-1586.
 29. Winkler, J. R. (2000) Electron tunneling pathways in proteins, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 4, 192-198.
 30. Cordes, M., and Giese, B. (2009) Electron transfer in peptides and proteins, *Chem. Soc. Rev.* 38, 892-901.
 31. Leger, C., and Bertrand, P. (2008) Direct Electrochemistry of Redox Enzymes as a Tool for Mechanistic Studies, *Chem. Rev.* 108, 2379-2438.
 32. Varotsis, C., Babcock, G. T., Garcia-Horsman, J. A., and Gennis, R. B. (1995) Resonance Raman Spectroscopy of the Heme Groups of Cytochrome *cbb*₃ in *Rhodobacter sphaeroides*, *J. Phys. Chem.* 99, 16817-16820.
 33. Pinakoulaki, E., and Varotsis, C. (2008) Resonance Raman spectroscopy of nitric oxide reductase and *cbb*₃ heme-copper oxidase, *J. Phys. Chem. B* 112, 1851-1857.

34. Gu, Y., Li, P., Sage, J. T., and Champion, P. M. (1993) Photoreduction of heme proteins: spectroscopic studies and cross-section measurements, *J. Am. Chem. Soc.* *115*, 4993-5004.
35. Hellwig, P., Soulimane, T., and Mantele, W. (2002) Electrochemical, FT-IR and UV/VIS spectroscopic properties of the *caa3* oxidase from *T. thermophilus*, *Eur. J. Biochem.* *269*, 4830-4838.
36. Gorbikova, E. A., Vuorilehto, K., Wikstroem, M., and Verkhovsky, M. I. (2006) Redox Titration of All Electron Carriers of Cytochrome *c* Oxidase by Fourier Transform Infrared Spectroscopy, *Biochemistry* *45*, 5641-5649.
37. Berthomieu, C., Boussac, A., Maentele, W., Breton, J., and Navedryk, 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.
38. Barth, A. (2001) The infrared absorption of amino acid side chains, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* *74*, 141-173.
39. Hellwig, P., and Melin, F. (2010) Recent applications of infrared spectroscopy and microscopy in chemistry, biology and medicine', pp 437-492, World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd.
40. Gerscher, S., Hildebrandt, P., Buse, G., and Soulimane, T. (1999) The active site structure of *ba3* oxidase from *Thermus thermophilus* studied by resonance Raman spectroscopy, *Biospectroscopy* *5*, S53-S63.
41. 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.
42. 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 500cm⁻¹, *Spectrochim. Acta, Part A* *64A*, 987-1001.
43. Rich, P. R. (1995) Towards an understanding of the chemistry of oxygen reduction and proton translocation in the iron-copper respiratory oxidases, *Aust. J. Plant Physiol.* *22*, 479-486.
44. Ouyang, H., Han, H., Roh, J. H., Hemp, J., Hosler, J. P., and Gennis, R. B. (2012) Functional importance of a pair of conserved glutamic acid residues and of Ca(2+) binding in the *cbb(3)*-type oxygen reductases from *Rhodobacter sphaeroides* and *Vibrio cholerae*, *Biochemistry* *51*, 7290-7296.
45. Svensson-Ek, M., Abramson, J., Larsson, G., Tornroth, S., Brzezinski, P., and Iwata, S. (2002) The X-ray Crystal Structures of Wild-type and EQ(I-286) Mutant Cytochrome *c* Oxidases from *Rhodobacter sphaeroides*, *J. Mol. Biol.* *321*, 329-339.
46. 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.
47. Qian, J., Mills, D. A., Geren, L., Wang, K., Hoganson, C. W., Schmidt, B., Hiser, C., Babcock, G. T., Durham, B., Millett, F., and Ferguson-Miller, S. (2004) Role of the Conserved Arginine Pair in Proton and Electron Transfer in Cytochrome *c* Oxidase, *Biochemistry* *43*, 5748-5756.
48. Arrondo, J. L. R., Muga, A., Castresana, J., and Goni, F. M. (1993) Quantitative studies of the structure of proteins in solution by Fourier-transform infrared spectroscopy, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* *59*, 23-56.

49. Barth, A. (2007) Infrared spectroscopy of proteins, *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* 1767, 1073-1101.
50. Cerda, J. F., Guzman, C. X., Zhang, H., Amendola, E. J., Castorino, J. D., Millet, N., Fritz, A. L., Houchins, D. N., and Roeder, M. H. (2013) Spectroelectrochemical measurements of redox proteins by using a simple UV/visible cell, *Electrochem. Commun.* 33, 76-79.
51. Di Rocco, G., Battistuzzi, G., Bortolotti, C. A., Borsari, M., Ferrari, E., Monari, S., and Sola, M. (2011) Cloning, expression, and physicochemical characterization of a new diheme cytochrome c from *Shewanella baltica* OS155, *JBIC, J. Biol. Inorg. Chem.* 16, 461-471.
52. Jiang, X., Jiang, J., Jin, Y., Wang, E., and Dong, S. (2005) Effect of Colloidal Gold Size on the Conformational Changes of Adsorbed Cytochrome c: Probing by Circular Dichroism, UV-Visible, and Infrared Spectroscopy, *Biomacromolecules* 6, 46-53.
53. Petrovic, J., Clark, R. A., Yue, H., Waldeck, D. H., and Bowden, E. F. (2005) Impact of Surface Immobilization and Solution Ionic Strength on the Formal Potential of Immobilized Cytochrome c, *Langmuir* 21, 6308-6316.
54. Zanetti-Polzi, L., Daidone, I., Bortolotti, C. A., and Corni, S. (2014) Surface Packing Determines the Redox Potential Shift of Cytochrome c Adsorbed on Gold, *J. Am. Chem. Soc.*, Ahead of Print.

Chapitre VII

Comparaison d'oxydases terminales de différents types

7.1. Introduction

Ce chapitre est consacré à la comparaison d'oxydases terminales des différentes familles : la cytochrome aa_3 oxydase de type A, la cytochrome ba_3 oxydase de type B et la cytochrome cbb_3 oxydase de type C.

Ce travail de comparaison a pour but d'étudier l'influence des potentiels d'oxydoréduction des différents cofacteurs sur la réaction de réduction de l'oxygène à travers l'étude de l'influence du pH. En effet, ces trois oxydases terminales ne présentent ni la même dépendance vis-a-vis du pH ni le même ordre relatif des potentiels d'oxydoréduction. La cytochrome ba_3 oxydase est atypique en ce sens puisque le potentiel de demi-vague de l'hème b , qui joue le rôle de relais d'électron vers le site actif, possède un potentiel d'oxydoréduction inférieur à celui de l'hème a_3 du site actif⁽¹⁾. Aucune oxydase terminale de type A ou de type C n'a présenté cette dépendance particulière à ce jour puisqu'il est généralement observé qu'à l'équilibre, le potentiel d'oxydoréduction du relais d'électron est supérieur à celui de l'hème présent dans le site actif⁽²⁾. Les seuls exemples connus d'oxydases terminales présentant cette dépendance particulière sont la cytochrome ba_3 oxydase de *T. thermophilus*^(1, 3) et la cytochrome aa_3 oxydase d'*A. ambivalens*⁽⁴⁾.

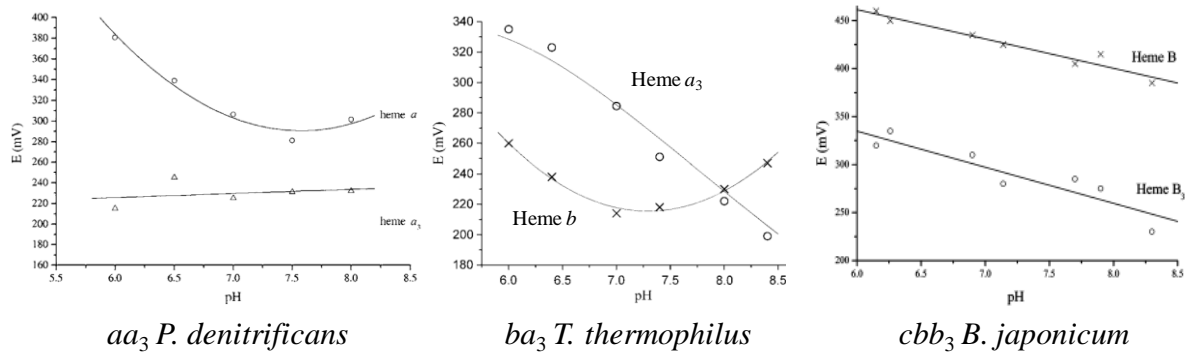


Figure 7.1 : Dépendance pH des potentiels de demi-vague de la cytochrome aa_3 oxydase de *P. denitrificans*⁽⁵⁾, de la cytochrome ba_3 oxydase de *T. thermophilus*⁽³⁾ et de la cytochrome cbb_3 oxydase de *B. japonicum*⁽⁶⁾ obtenus par titrations potentiométriques.

Certaines protéines présentent également des propriétés particulières dépendant des organismes dans lesquels elles ont été exprimées⁽⁷⁾. Contrairement aux oxydases terminales présentes dans les organismes mésophiles, comme *P. denitrificans* ou *P. stutzeri*, la cytochrome ba_3 oxydase de *T. thermophilus* doit pouvoir s'adapter à des températures extrêmes. Cette adaptation implique la conservation de son intégrité structurale à haute température. Elle doit aussi s'adapter à la plus faible concentration en oxygène soluble

présente à haute température. Ces propriétés seront développées et comparées entre les différentes oxydases dans ce chapitre à travers des méthodes électrochimiques et spectroscopiques.

7.2. Caractérisation des surfaces modifiées

7.2.1. Caractérisation par spectroscopie infrarouge en réflexion totale atténuée

Toutes les étapes de la modification de surface ont été suivies par spectroscopie infrarouge en réflexion totale atténuée exaltée de surface. Les spectres correspondants sont représentés sur la figure 7.2..

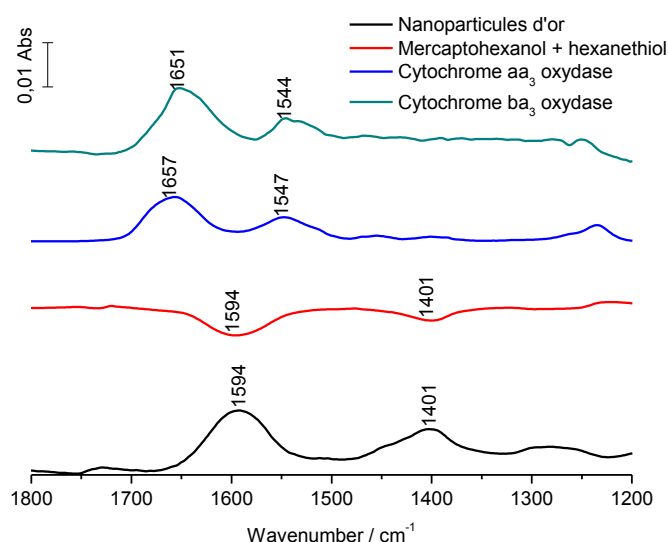


Figure 7.2 : Suivi par spectroscopie infrarouge en réflexion totale atténuée exaltée de surface des différentes étapes de la modification de surface effectuées en électrochimie.

Les spectres de la modification ont été décrits dans le chapitre IV où des résultats similaires sont observés. Après modification de la surface, 3 μL d'un échantillon de protéine ($\approx 100 \mu\text{M}$) ont été déposés avant d'être rincé afin de n'observer que la protéine adsorbée. Il en résulte l'apparition de bandes caractéristiques, notamment Amide I entre 1700 cm^{-1} et 1600 cm^{-1} et Amide II entre 1600 cm^{-1} et 1500 cm^{-1} ^(8, 9). La bande Amide I est observée à 1657 cm^{-1} pour la cytochrome aa_3 oxydase et à 1651 cm^{-1} pour la cytochrome ba_3 oxydase. La bande Amide II apparaît, quant à elle, à 1547 cm^{-1} pour la cytochrome aa_3 oxydase et à 1544 cm^{-1} pour la cytochrome ba_3 oxydase.

La bande Amide I est connue pour être sensible à la structure secondaire des protéines⁽¹⁰⁾. Pour des structures principalement constituées d'hélices α comme les oxydases terminales, ce maximum est attendu entre 1648 cm^{-1} et $1657\text{ cm}^{-1(9)}$. Les valeurs observées prouvent donc que l'intégrité structurale des protéines est conservée sur la surface modifiée.

Le calcul d'une déconvolution sur cette bande est difficile à envisager puisqu'il s'agit de résultats obtenus pour une molécule adsorbée avec une exaltation de surface. L'adsorption de la molécule entraîne l'invalidité de la loi de Beer-Lambert. De plus, l'exaltation de modes spécifiques dépend de règles de sélection de surface(Figure 7.3)⁽¹¹⁾ (ceux dont la variation du moment dipolaire électrique sont perpendiculaires à la surface, voir section 2.2.2.2.b) et engendre une image erronée de la structure secondaire calculée par déconvolution. Cette image provient de la surestimation ou de la sous-estimation des hélices α en fonction de l'orientation de la protéine à la surface.

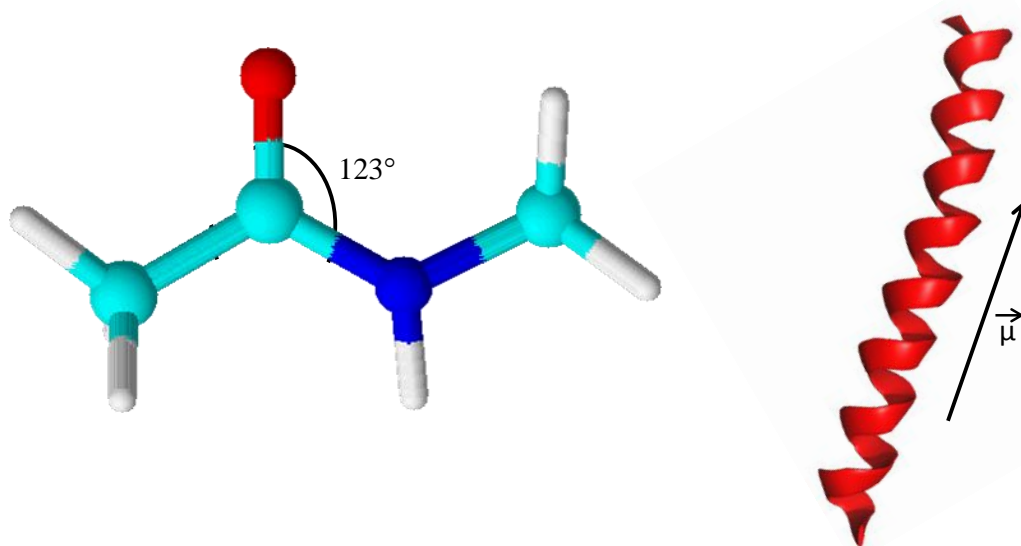


Figure 7.3 : Représentation de la liaison peptidique et de la variation du moment dipolaire d'une hélice α . L'orientation de la protéine à la surface engendre une exaltation différente des hélices α à la surface ne permettant pas de déduire sa structure secondaire.

Aussi, le ratio Amide I/Amide II renseigne sur l'orientation de la protéine sur la surface modifiée. En effet, l'exaltation spécifique des signaux en fonction de l'orientation de la protéine entraîne l'apparition d'un ratio Amide I/ Amide II élevé puisque la bande Amide I est composée essentiellement de la vibration $\nu(\text{C}=\text{O})$ dont les changements de moments dipolaires sont parallèles à l'axe des hélices alors que la bande Amide II contient principalement les vibrations $\delta(\text{N-H})$ et $\nu(\text{C-N})$ dont les changements de moments dipolaires sont perpendiculaires à l'axe des hélices. Il se trouve par conséquent que lorsque Amide I est

exalté, Amide II ne l'est pas. C'est pourquoi le ratio Amide I/Amide II augmente. Todorovic et al. ont ainsi constaté un ratio Amide I/Amide II d'environ 1.5 pour la cytochrome *cbb₃* oxydase orientée uniformément à l'aide d'un His-Tag (c'est-à-dire avec les hélices α perpendiculaires à la surface) alors que ce rapport était de 1 lorsque la protéine était orientée de manière non spécifique sur une surface d'or modifiée avec du détergent⁽⁴⁾. Les rapports Amide I/ Amide II mesurés dans notre cas (environ 3 pour la cytochrome *aa₃* oxydase, 2 pour la cytochrome *ba₃* oxydase) suggèrent que les protéines sont préférentiellement orientées de façon à ce que les hélices α se trouvent perpendiculaire à la surface.

7.2.2. Mesure par électrochimie directe en absence d'oxygène

Afin de déterminer quel est le cofacteur impliqué dans le transfert d'électrons, des mesures de voltampérométrie cyclique en absence d'oxygène ont été effectuées. La figure 7.4 présente les cyclovoltammogrammes obtenus pour les oxydases terminales de types A, B et C à pH 7 et 8.

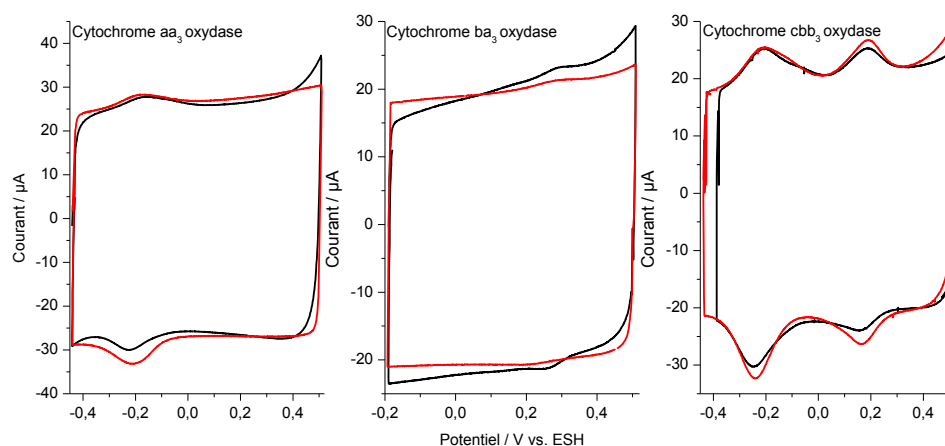


Figure 7.4 : Cyclovoltammogrammes des cytochromes *aa₃*, *ba₃* et *cbb₃* oxydases en absence d'oxygène. Les mesures ont été effectuées dans un tampon phosphate à pH 7 (courbes rouges) et à pH 8 (courbes noires) à $v=0.5$ V/s.

Pour les oxydases de type A et B, un seul signal est visible sur le cyclovoltammogramme en absence d'oxygène. Il est proche des potentiels thermodynamiques des hèmes observés pour la cytochrome *ba₃* oxydase mais décalé d'environ 400 mV par rapport au potentiel thermodynamique de l'hème *a₃* observé en solution pour la cytochrome *aa₃* oxydase, rendant difficile l'attribution du signal. Cette différence pourrait s'expliquer par le fait que le système n'est pas à l'équilibre au cours des mesures de voltampérométrie cyclique alors que dans les titrations potentiométriques en solution, les cofacteurs sont à l'équilibre. Ce phénomène a déjà été observé par Friedrich et al.⁽¹²⁾ qui ont proposé que la différence de potentiel observé

provient de la transition vers un état activé. Le décalage de potentiel observé pour la cytochrome aa_3 oxydase est également observé pour la cytochrome cbb_3 oxydase. Un phénomène lent semble donc accompagner le transfert d'électron dans ces deux protéines. La différence majeure observée dans les deux cas correspond à l'inversion des potentiels d'oxydoréduction relatifs entre le relais d'électron (l'hème a pour la cytochrome aa_3 oxydase ou l'hème b pour la cytochrome ba_3 et la cytochrome cbb_3 oxydase) et l'hème du site actif. En effet, contrairement aux cytochromes aa_3 et cbb_3 oxydases, les potentiels relatifs des hèmes b et a_3 sont inversés puisque dans ce cas, le potentiel de l'hème b est inférieur au potentiel de l'hème a_3 ^(1, 3). Cette différence peut expliquer que la valeur du potentiel d'oxydoréduction trouvée dans ce cas est plus proche de celle trouvée en solution puisque l'équilibre entre l'hème b et l'hème a_3 est atteint plus rapidement.

Une autre explication possible concerne la différence d'interaction entre la protéine et la surface et entre les protéines entre elles⁽¹³⁻¹⁹⁾. Il a en effet été montré sur le cytochrome c que la densité surfacique de protéine pouvait induire une différence de potentiel de l'ordre de la centaine de mV^(15, 19). Cette différence a été attribuée à la différence de polarisabilité de l'environnement de la protéine due à l'exposition plus faible aux molécules d'eau pour de fortes densités surfaciques⁽¹⁶⁾. Dans notre cas, des taux de couverture de l'ordre 1 à 2 pmol/cm² ont été déterminés par intégration des pics d'oxydation ou de réduction sur les cyclovoltammogrammes mesurés en absence de substrat. Cependant, les distances entre les hèmes de deux cytochrome c oxydases sont supérieures à celles observées avec une forte densité surfacique de cytochrome c en raison du volume relatif de chaque protéine. De plus, cette différence de potentiel redox implique un changement d'environnement des cofacteurs. Dans notre cas, le site actif et les relais d'électrons sont situés au cœur du squelette peptidique et sont donc dans un environnement bien défini. La différence de potentiel observée par rapport aux potentiels d'oxydoréduction en solution peut donc difficilement être imputée aux changements de polarisabilité au niveau des cofacteurs.

	$E_{1/2} aa_3 / \text{mV}$	$E_{1/2} ba_3 / \text{mV}$	$E_{1/2} cbb_3 / \text{mV}$
Premier accepteur ($\text{Cu}_A / \text{hème } c$)	/	/	+170
Relais d'électrons (Hème a / b)	+322	+213	+260
Hème du site actif (Hème a_3 / b_3)	+225	+285	+140
Signal observé en voltampérométrie cyclique	-190	+273	-270, -210, -125, +110, +185

Tableau 7.1 : Comparaison des potentiels d'oxydoréduction observés pour les différents cofacteurs des trois types d'oxydases par titration potentiométrique et par voltampérométrie cyclique. Toutes les valeurs ont été obtenues à pH 7 sauf pour la cytochrome cbb_3 oxydases dont les valeurs sont obtenues à pH 7.5 en solution.

7.3. Etude comparative de la réaction de réduction de l'oxygène

Dans le but d'étudier l'influence de la différence de potentiel entre le relais d'électron et le site actif sur la réaction de réduction de l'oxygène, des mesures par voltampérométrie stationnaire ont été effectuées. La figure 7.5 présente les résultats obtenus en voltampérométrie stationnaire pour les cytochromes aa_3 , ba_3 et cbb_3 oxydase en présence d'oxygène.

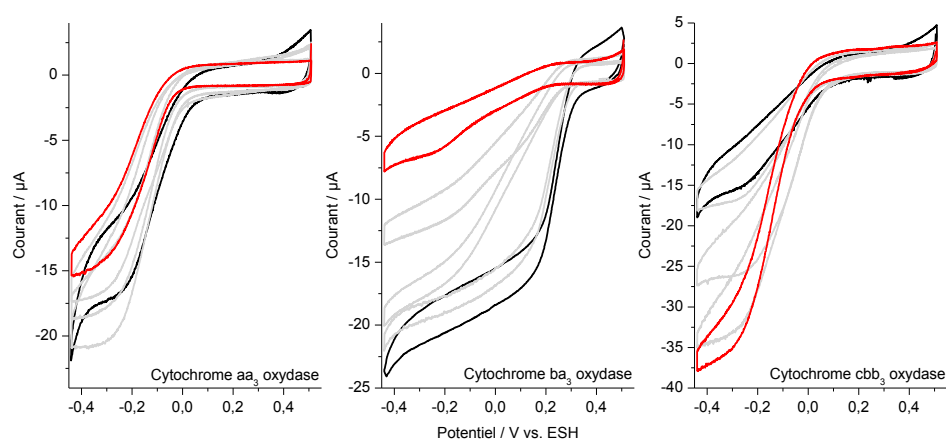


Figure 7.5 : Voltammogrammes des cytochromes aa_3 , ba_3 et cbb_3 oxydases de pH 6.5 à pH 8.5. La mesure à pH 6.5 est représentée en noir et la mesure à pH 8.5 est représentée en rouge. Les mesures ont été effectuées en présence d'oxygène dans un tampon phosphate 50 mM ($v=0.02 \text{ V/s}$).

Dans les trois cas, les signaux cathodiques observés en absence d'oxygène se transforment en une large vague cathodique caractéristique d'une réduction électrocatalytique de l'oxygène. Cette observation signifie que les trois protéines conservent une activité catalytique après immobilisation sur des nanoparticules d'or même si les constantes de vitesses catalytiques sont faibles (de l'ordre de 1 à 10 s⁻¹). Ces faibles constantes de vitesse catalytiques pourraient être dues à la lenteur du transfert d'électron interfacial qui est du même ordre de grandeur. Ces constantes de vitesses ont cependant conduit à des potentiels catalytiques du même ordre de grandeur que ceux obtenus par Friedrich et al.⁽¹²⁾ qui montrent un potentiel de réduction de l'oxygène de -200 mV à pH 8 et suggèrent des taux de transfert interfaciaux supérieurs à 4000 s⁻¹. Ces indications conduisent donc à penser qu'une étape cinétiquement plus lente est à envisager. Etant donné l'implication des protons dans le transfert des électrons, un transfert de protons lent ne peut pas être exclu.

Dans chaque cas, il est possible de distinguer un plateau de courant avec une pente modérée (Figure 7.5). Le pente du courant de plateau est le reflet d'une distribution de vitesse de transfert d'électron interfacial dépendant des distances entre les cofacteurs et la surface de l'électrode. Ceci signifie que cette pente est une indication de la distribution de l'orientation des enzymes à la surface de l'électrode⁽²⁰⁾. La pente modérée observée dans notre cas montre donc une distribution d'orientation à la surface relativement homogène dans chaque cas.

Concernant les potentiels catalytiques, de larges différences sont observées entre les trois types d'oxydases. En prenant l'exemple des trois enzymes à pH 7, la cytochrome *ba*₃ oxydase effectue la réduction de l'oxygène à un potentiel catalytique de +0.2 V alors que les cytochromes *aa*₃ et *cbb*₃ oxydases l'effectuent respectivement à -0.12 V et -0.06 V. Des différences de potentiels de l'ordre des 200 à 300 mV sont observées entre le potentiel catalytique et le potentiel thermodynamique du site actif pour les cytochromes *aa*₃ et *cbb*₃ oxydases alors qu'elle est seulement d'environ 80 mV pour la cytochrome *ba*₃ oxydase. Ce phénomène a déjà été observé précédemment pour la cytochrome *aa*₃ oxydase de *R. sphaeroides* par le groupe de Pr. Naumann qui expliquait dans un premier temps cette différence par la fonctionnalisation à l'His-Tag impliquant un résidu de nickel⁽¹²⁾ avant de proposer que les résultats provenaient de la transition entre un état non activé vers un état activé et d'un transfert d'électron séquentiel^(21, 22). Cet état activé est obtenu lorsque la protéine a effectué un cycle catalytique et se retrouve dans l'état oxydé en présence d'oxygène⁽²³⁾. Il a d'ailleurs été montré qu'une fois l'état activé atteint, il est très difficile de retrouver l'état non-activé puisque la protéine devait alors être incubée en conditions

strictement anaérobiques pendant au moins 60 min⁽²¹⁾. Cet état n'a jamais été décrit pour la cytochrome *cbb*₃ oxydase mais compte-tenu du décalage des potentiels thermodynamiques observés, il est possible d'envisager que le même type de transition peut être observé dans ce cas. Il est intéressant de constater que ce type de transition n'est pas observé pour la cytochrome *ba*₃ oxydase puisqu'un décalage beaucoup plus faible est obtenu entre le potentiel catalytique de réduction de l'oxygène et le potentiel thermodynamique de l'hème *a*₃ entre pH 6.5 et pH 7.5. Ce changement majeur peut être la conséquence de la diminution de la différence de potentiels d'équilibre relatifs des hèmes. En effet, dans la cytochrome *aa*₃ oxydase, le potentiel de l'hème *a* change après le transfert du premier électron afin de permettre le transfert d'un second électron car les potentiels relatifs des deux hèmes ne permettent pas le transfert d'électron de l'hème *a* vers l'hème *a*₃^(2, 24). Contrairement à la cytochrome *aa*₃ oxydase, le potentiel d'équilibre de l'hème *a*₃ est plus positif que celui de l'hème *b* jusqu'à pH 8, ce qui favorise le transfert d'électron vers le site actif⁽³⁾. Une forte chute du potentiel catalytique (0.14 V entre pH 7 et pH 7.5) est cependant observée pour la cytochrome *ba*₃ à partir du pH 7.5. Cette diminution du potentiel catalytique semble donc corrélée avec l'inversion du potentiel d'équilibre des hèmes qui entraîne soit une diminution de la force électromotrice, soit une inversion de celle-ci empêchant ainsi le transfert d'électron vers le site actif⁽²⁵⁾.

pH	$E_{\text{cat } aa_3} / \text{V}$	$E_{\text{cat } ba_3} / \text{V}$	$E_{\text{cat } cbb_3} / \text{V}$
6.5	-0.1	0.22	-0.06
7	-0.12	0.2	-0.06
7.5	-0.12	0.06	-0.08
8	-0.12	0.02	-0.09
8.5	-0.15	-0.02	-0.13

Tableau 7.2 : Potentiel de réduction des trois types d'oxydases à différents pH mesurés par voltampérométrie stationnaire.

Un autre fait marquant concerne la dépendance pH des potentiels catalytiques de chaque oxydase. En effet, les cytochromes *aa*₃ et *cbb*₃ oxydases présentent une différence de potentiel catalytique de respectivement 50 mV et 70 mV entre pH 6.5 et pH 8.5 mais toujours avec une forte surtension par rapport au potentiel thermodynamique du site actif. La cytochrome *ba*₃ oxydase présente, quant à elle, une dépendance pH beaucoup plus marquée puisqu'elle est de l'ordre de 240 mV entre pH 6.5 et pH 8.5. Ces observations peuvent être corrélées avec la diminution ou l'inversion des potentiels d'équilibre entre l'hème *b* et l'hème *a*₃ aux

différentes valeurs de pH. Par conséquent, le transfert d'électron de l'hème *b* vers l'hème *a*₃ est plus difficile à pH élevé et entraîne une réduction électrocatalytique de l'oxygène plus difficile pour la cytochrome *ba*₃ oxydase.

Tous ces résultats suggèrent que le transfert d'électron entre le dernier donneur d'électron et le site actif joue un rôle crucial dans la vitesse de réduction de l'oxygène. Nos résultats vont dans le sens de ceux publiés par Todorovic et al. montrant que l'inversion des potentiels thermodynamiques ne nécessitait pas un réseau complexe de coopérativité puisque l'ordre relatif des potentiels permet le transfert d'électrons vers le site actif⁽⁴⁾. A titre de comparaison, Hrabakova et al.⁽²⁶⁾ ont immobilisés la cytochrome *aa*₃ oxydase de *R. sphaeroides* sur une électrode d'Ag à l'aide d'un His-Tag mais n'ont pas été en mesure de réduire l'hème du site actif ; ils ont par conséquent proposé que le réseau de coopérativité nécessaire au transfert de l'électron de l'hème *a* vers l'hème *a*₃ était perturbé.

Nos résultats sont également en accord avec ceux publiés par von Ballmoos et al. montrant une diminution de la vitesse de formation de l'état **O** lorsque le pH augmente^(27, 28). Toutes ces indications suggèrent que chaque organisme exprime des oxydases terminales différentes afin de s'adapter à l'environnement dans lequel il évolue. En effet, *T. thermophilus* est présent principalement dans des sources acides à de faibles concentrations en oxygène. Cette différence de potentiel catalytique peut être une conséquence de l'adaptation de *T. thermophilus* à des conditions extrêmes (températures élevées, pH acides). *P. denitrificans* et *P. stutzeri* sont, quant à elles, des bactéries essentiellement trouvées dans les eaux marines et les sols qui sont des environnements moins acides ; les enzymes exprimées par ces deux organismes ne nécessitent donc pas une telle adaptation.

7.4. Etude comparative de la stabilité thermique

7.4.1. Comparaison par voltampérométrie stationnaire

Les stabilités thermiques de chaque oxydase terminales ont été comparées par voltampérométrie stationnaire. La figure 7.6 montre les voltammogrammes à différentes températures des cytochromes *aa*₃, *ba*₃ et *cbb*₃ oxydases à pH 7. Les mesures ont été effectuées entre 10°C et 70°C pour les cytochromes *aa*₃ et *ba*₃ oxydases et de 25°C à 55°C pour la cytochrome *cbb*₃ oxydase avec une vitesse de rotation de l'électrode de 1000 tours/min.

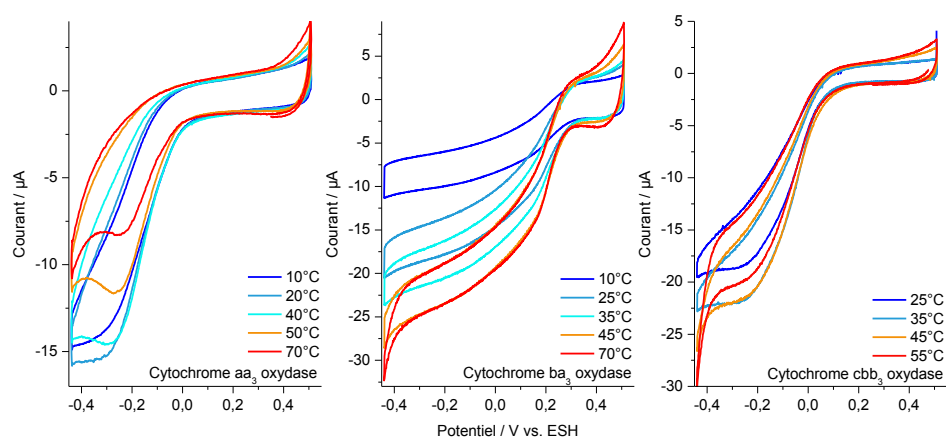


Figure 7.6 : Voltammogrammes des cytochromes aa_3 , ba_3 et cbb_3 oxydases à différentes températures. Les mesures ont été effectuées en présence d'oxygène dans un tampon phosphate 50 mM ($v=0.02$ V/s).

Pour la cytochrome aa_3 oxydase, une courant stable est observé entre 10 et 40°C avant une diminution brutale après cette température. En ce qui concerne la cytochrome cbb_3 oxydase, une augmentation du courant est observée entre 25°C et 35°C puis celui-ci est constant entre 35°C et 45°C avant de diminuer au-delà de cette température. Finalement, la cytochrome ba_3 oxydase, qui est issue d'un organisme thermophile, présente une augmentation du courant entre 10°C et 45°C puis une stabilité de celui-ci jusqu'à 75°C.

Ces résultats prouvent que la protéine thermophile est plus stable et possède une activité supérieure à ces homologues mésophiles à haute température. Ceci montre que les oxydases terminales immobilisées conservent leur stabilité thermique même sur la surface modifiée et prouvent que leur intégrité structurale est conservée.

7.4.2. Comparaison par spectroscopie infrarouge

La stabilité thermique des oxydases terminales a également été comparée par spectroscopie infrarouge en transmission. Pour ce faire, des spectres infrarouge ont été mesurés entre 15°C et 75°C. Pour chaque température, un temps d'équilibration thermique de 10 min a été utilisé et des spectres ont été enregistrés jusqu'à entière stabilité de celui-ci. Les mesures ont été effectuées en solution tampon deutérée afin de s'affranchir de la contribution de l'eau sous la bande Amide I (l'influence de l'utilisation de D₂O sur la bande Amide II est décrite dans la section 6.2.5.). La figure 7.7 présente les spectres infrarouges obtenus pour les cytochromes aa_3 , ba_3 et cbb_3 oxydase entre 15°C et 75°C à pD 7.

Comparaison d'oxydases terminales de différents types

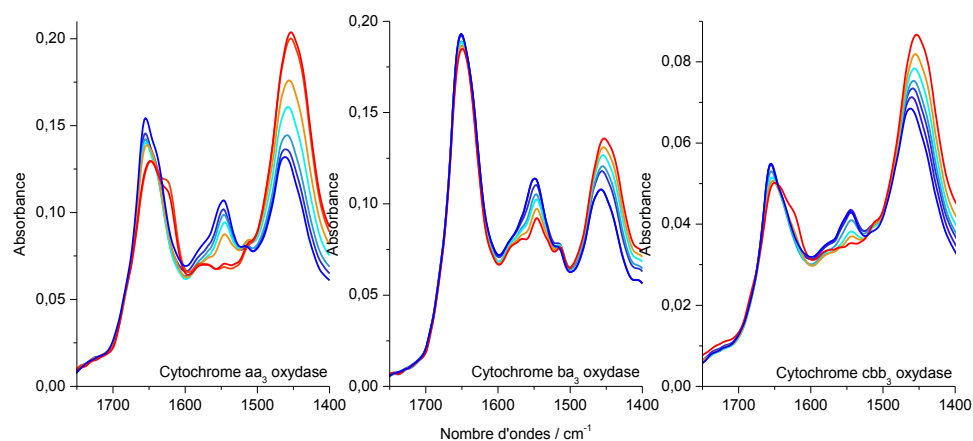


Figure 7.7 : Evolution des bandes Amide I, Amide II et Amide II' des cytochromes aa_3 , ba_3 et cbb_3 oxydases en fonction de la température. Les mesures ont été effectuées dans un tampon phosphate deutéré (0.02 % DDM, pD 7) de 15°C à 75°C.

Dans chaque cas, à 15°C, le maximum de la bande Amide I est compris entre 1650 cm^{-1} et 1655 cm^{-1} . Cette position est typique de structures composées majoritairement d'hélices α . Cette constatation est appuyée par le calcul de la déconvolution de cette bande qui permet d'obtenir une image des proportions des différentes structures secondaires présentes dans la protéine puisque des taux d'hélices α estimés entre 55 et 60% sont observés à 15°C (Figure 7.8 et Tableau 7.3).

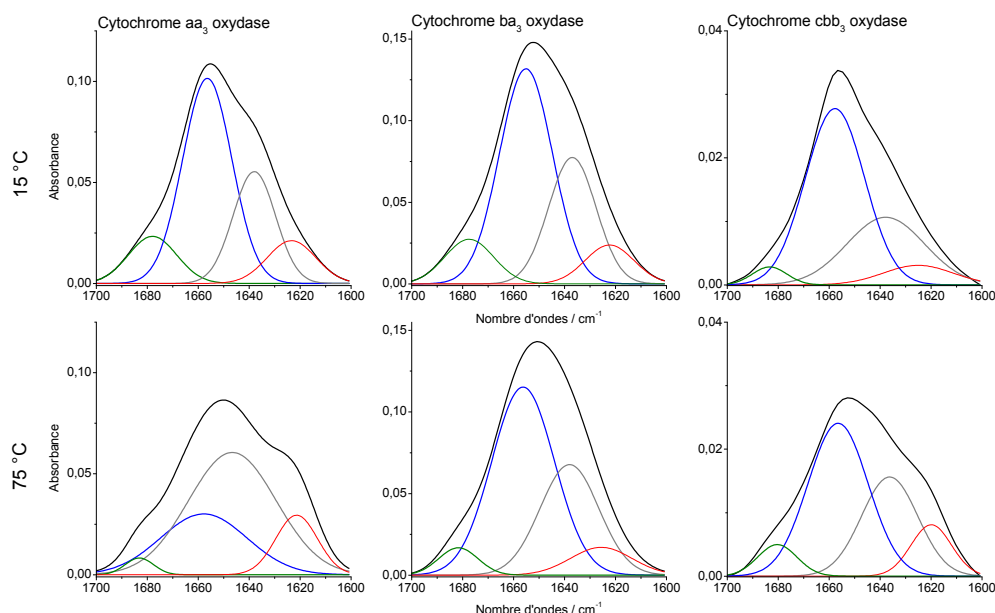


Figure 7.8 : Déconvolution de la bande Amide I pour les cytochromes aa_3 , ba_3 et cbb_3 oxydases à 15°C et 75°C.

Oxydase	Température / °C	Feuillets β +		
		Hélices α / %	désorganisés / %	Coudes / %
<i>aa</i> ₃	15	55	35	10
	75	25	70	5
<i>ba</i> ₃	15	55	35	10
	75	55	35	10
<i>cbb</i> ₃	15	60	35	5
	75	50	45	5

Tableau 7.3 : Résultats de la déconvolution de la bande Amide I des trois types d'oxydases terminales à 15°C et 75°C.

Pour la cytochrome *aa*₃ oxydase, l'élévation de la température vers 65°C se traduit par l'apparition d'un épaulement vers 1620 cm⁻¹ pouvant traduire un changement de structure secondaire. Cette observation est confirmée par la déconvolution de la bande Amide I à 75°C puisque l'apparition de l'épaulement est concomitante avec l'augmentation de la proportion de structures en feuillets β et désorganisées (de 35% à 70%) et la diminution de la proportion des hélices α (de 55% à 25%). De plus, la température de transition déterminée est en accord avec celle observée par calorimétrie et par spectroscopie infrarouge précédemment par Haltia et al.⁽²⁹⁾ qui proposent une température de dénaturation de 67°C pour cette même protéine.

La cytochrome *cbb*₃ oxydase présente un épaulement à partir de 75°C. Cet épaulement peut également être interprété comme un changement de structure secondaire. Cependant, une proportion moindre de la structure semble être impliqué en comparaison avec les changements observés pour la cytochrome *aa*₃ oxydase puisqu'une diminution de 10% d'hélices α et une augmentation de 10% des structures en feuillets β et désorganisées sont observées.

La cytochrome *ba*₃ oxydase de *T. thermophilus* ne présente pas de changement majeur lors de l'élévation de température. En effet, la déconvolution de la bande Amide I ne permet de déceler aucun changement de structure secondaire. Le seul changement observé correspond à une diminution d'intensité de la bande Amide I corrélée à une augmentation d'intensité de la bande Amide II' caractéristique de changements au niveau de la structure tertiaire traduit par un échange H/D de résidus rendus accessibles à cause de l'élévation de température. Ces observations vont dans le sens de celles observées par Sujak et al. qui montrent que le domaine Cu_A de la cytochrome *ba*₃ oxydase est stable à 100°C et à pH 4⁽³⁰⁾.

En comparant les températures de transitions observées pour les trois oxydases terminales, il est possible de constater que les deux protéines issues d'organismes mésophiles présentent des températures de transition inférieures à la structure thermophile. Il est également possible de corréler les données obtenues par spectroscopie infrarouge avec celles déterminées par électrochimie utilisée pour mesurer l'activité relative en fonction de la température. Pour les organismes mésophiles, la température de diminution de l'activité relative des protéines était inférieure à la température de changement de structures secondaires. Ceci implique que la baisse d'activité observée n'est pas liée à des changements de structures secondaires mais plutôt à des changements de structures tertiaires entraînant une dénaturation partielle au niveau d'une partie fonctionnelle de la protéine. La dénaturation la plus probable peut provenir du chemin d'accès de l'oxygène. Il a été proposé que la présence de chemin d'accès à l'oxygène à proximité du centre actif entraîne une rigidification de la structure à cet endroit⁽²⁸⁾ et il représente donc très certainement un point clef dans la conservation de l'activité des oxydases à haute température. Ce point est crucial compte-tenu de l'importance de la conservation de l'environnement du site actif puisqu'il est relié non seulement au transfert d'électrons mais aussi au transfert de protons. Il a d'ailleurs été proposé que pour s'adapter à un environnement à faible concentration en oxygène, le chemin d'accès de l'oxygène de la cytochrome *ba₃* oxydase était particulièrement hydrophobe. L'hydrophobicité du chemin d'accès de l'oxygène contribue probablement à sa stabilité à haute température puisqu'il a été montré que les protéines stabilisées par des interactions hydrophobes dénaturent généralement à des températures plus élevées que celles stabilisées par des interactions électrostatiques⁽³¹⁾.

7.5. Etude de la cytochrome *ba₃* oxydase par spectroscopie infrarouge différentielle

Afin de déterminer au niveau moléculaire les raisons de l'inversion des potentiels relatifs des hèmes *b* et *a₃*, une étude par spectroscopie infrarouge différentielle couplée à l'électrochimie a été menée. La figure 7.9 présente les spectres à l'état oxydé moins l'état réduit de la cytochrome *ba₃* oxydase à pH 6.5, 7, 7.5, 8 et 8.5. Les signaux observés à l'état oxydé traduisent donc les changements moléculaires observés au cours de l'oxydation alors que les signaux négatifs correspondent aux changements observés au cours de la réduction.

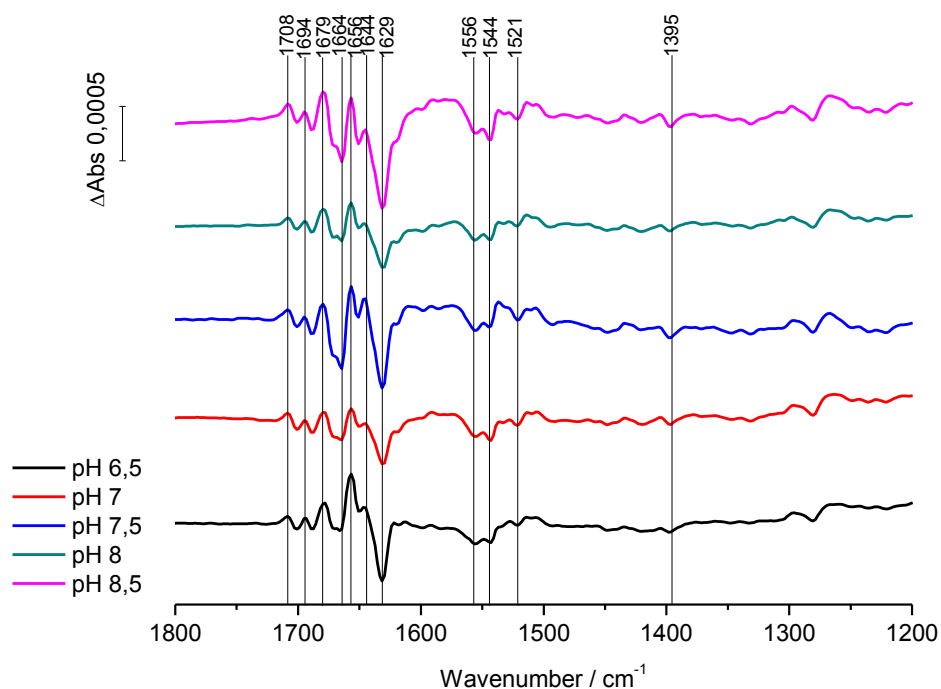


Figure 7.9 : Comparaison des spectres oxydés moins réduits (+0.51V/-0.19V) de la cytochrome ba_3 oxydase à pH 6.5, 7, 7.5, 8 et 8.5. Les mesures ont été effectuées dans un tampon phosphate (50 mM).

L'allure générale des spectres est similaire à celle obtenue par Hellwig et al.⁽¹⁾ et est typique pour les oxydases terminales^(32, 33). L'attribution des signaux a par conséquent été effectuée à partir de cette publication et complétée par des résultats obtenus par spectroscopie Raman par Gerscher et al.⁽³⁴⁾. Les résultats sont compilés dans le tableau 7.4.

Fréquence + / cm^{-1}	Fréquence - / cm^{-1}	Tentative d'attribution
1708		$\nu(\text{C}=\text{O})$ Asp/Glu
	1700	$\nu(\text{C}=\text{O})$ propionates des hèmes
1694		$\nu(\text{C}=\text{O})$ propionates des hèmes
	1688	$\nu(\text{C}=\text{O})$ propionates des hèmes
1679		$\nu(\text{C}=\text{O})$ propionates des hèmes $\nu(\text{C}=\text{O})$ CHO hème a_3 $\nu(\text{CN}_3\text{H}_5)^{\text{as}}$ Arg Amide I (feuilletts β)
	1664	$\nu(\text{C}=\text{O})$ CHO hème a_3 Amide I (feuilletts β)
1656		Amide I (hélices α)
1644		Amide I (hélices α)

Comparaison d'oxydases terminales de différents types

1629	$\nu(\text{CN}_3\text{H}_5)^s$ Arg Amide I (feuillet β)
1618	$\nu(\text{C}\alpha=\text{C}\beta)$ vinyl des hèmes Amide I (feuillet β)
1597	ν_{37} hème <i>b</i>
1590	Tyr-O ⁻
1586	ν_{37} hème <i>a</i> ₃
1556	ν_{38} hème <i>b</i> $\nu(\text{COO}^-)^{as}$ propionates des hèmes Amide II
1544	ν_{38} hème <i>a</i> ₃ $\nu(\text{COO}^-)^{as}$ propionates des hèmes Amide II
1521	Tyr-OH
1504	Tyr-O ⁻
1433	$\nu(\text{COO}^-)^s$ Asp/Glu
1419	$\nu(\text{COO}^-)^s$ Asp/Glu
1395	$\nu(\text{COO}^-)^s$ propionates des hèmes
1280	Tyr-O ⁻
1266	δ_{42} hème <i>b/a</i> ₃ Tyr-OH

Tableau 7.4 : Récapitulatif des bandes observées sur les spectres différentiels de la cytochrome *ba*₃ oxydase et tentatives d'attributions.

- Squelette polypeptidique

Les signaux du squelette polypeptidique sont attendus entre 1680 cm⁻¹ et 1620 cm⁻¹ pour la région Amide I et entre 1570 cm⁻¹ et 1520 cm⁻¹ pour la région Amide II. Pour la cytochrome *ba*₃ oxydase, la réorganisation des hélices α est observée à 1656 et 1644 cm⁻¹ quelque soit le pH étudié ; celle des feuillet β est observée à 1629 et 1618 cm⁻¹. Des contributions à 1679 et à 1664 cm⁻¹ ne peuvent cependant pas être exclues⁽¹⁾.

- Cofacteurs

Les vibrations des hèmes sont généralement trouvées entre 1620 cm^{-1} et 1500 cm^{-1} . Les bandes ν_{37} sont attendues entre 1560 et 1620 cm^{-1} . Pour la cytochrome ba_3 oxydase de *T. thermophilus*, une étude par spectroscopie Raman⁽³⁴⁾ nous permet d'attribuer les modes ν_{37} à 1597 cm^{-1} et 1586 cm^{-1} à l'hème b et à l'hème a_3 respectivement. ν_{38} est une autre bande caractéristique des protéines hémiques. Elle a été attribuée à 1556 cm^{-1} pour l'hème b et à 1544 cm^{-1} pour l'hème a_3 . Une dernière vibration spécifique de l'hème a_3 peut être attribuée au groupe formyl à 1679 cm^{-1} . Malgré la probable superposition de plusieurs contributions à cet endroit, la position de cette bande a été confirmée par spectroscopie de résonance Raman et peut par conséquent être attribuée avec certitude⁽³⁴⁾.

- Propionates des hèmes

Les bandes correspondant aux propionates des hèmes sont généralement observées entre 1710 cm^{-1} et 1675 cm^{-1} . Plusieurs bandes sont présentes dans cette région et il est malheureusement difficile d'attribuer spécifiquement ces signaux. Une étude a été effectuée sur la cytochrome aa_3 oxydase permettant d'attribuer spécifiquement les signaux des propionates des hèmes grâce au marquage isotopique de ces derniers⁽³⁵⁾. Ce spectre a permis de montrer la diminution d'un signal à 1676 cm^{-1} apparaissant dans la forme oxydée. Il est donc possible de penser que le signal à 1679 cm^{-1} peut représenter le signal le plus probable sans toutefois pouvoir écarter les autres signaux observés dans cette zone. Les propionates des hèmes dans leur forme déprotonée sont généralement observés entre 1530 et 1570 cm^{-1} pour la vibration $\nu(\text{COO}^-)^{\text{as}}$ et vers 1400 cm^{-1} pour la vibration $\nu(\text{COO}^-)^{\text{s}}$. Dans le cas de la cytochrome ba_3 oxydase, des signaux peuvent être envisagés à 1556 cm^{-1} ou 1544 cm^{-1} pour les vibrations $\nu(\text{COO}^-)^{\text{as}}$ et à 1395 cm^{-1} pour les vibrations $\nu(\text{COO}^-)^{\text{s}}$. La position des vibrations $\nu(\text{COO}^-)^{\text{as}}$ ne peut cependant pas être déterminée avec certitude compte-tenu de la forte superposition des bandes observées à cet endroit. Elle se base donc sur des résultats décrits dans la littérature. En effet, ces bandes ont été attribuées à 1570 cm^{-1} et 1538 cm^{-1} pour la cytochrome aa_3 oxydase de *P. denitrificans*⁽³⁵⁾ et à 1562 cm^{-1} et 1530 cm^{-1} pour les propionates de la cytochrome caa_3 oxydase de *T. thermophilus*⁽³²⁾.

- Acides aminés individuels

Les acides aspartiques et glutamiques possèdent généralement des modes normaux de vibration entre 1790 cm^{-1} et 1700 cm^{-1} dans leur forme protonée alors que les formes déprotonées sont observées entre 1590 cm^{-1} et 1530 cm^{-1} pour les vibrations $\nu(\text{COO}^-)^{\text{as}}$ et entre 1430 cm^{-1} et 1380 cm^{-1} pour les vibrations $\nu(\text{COO}^-)^{\text{s}}$. Dans le cas de la cytochrome ba_3 oxydase, plusieurs signaux pourraient impliquer la présence d'acides aspartiques ou glutamiques dans leur forme protonée entre 1688 cm^{-1} et 1708 cm^{-1} . La différence de nombre d'ondes observée provient de la différence d'environnement dans lequel se trouve l'acide puisque plus le signal est observé à des nombres d'ondes élevés, plus l'acide est situé dans un environnement hydrophobe. Peu d'acides aspartiques ou glutamiques ont cependant été décrits dans la littérature comme participant à la fonction de cette protéine. Le seul résidu acide connu participant au transfert de protons dans la cytochrome ba_3 oxydase est Glu15 qui constitue l'entrée du chemin de protons⁽³⁶⁾. Des signaux pour les formes déprotonées sont également attribués mais l'étude effectuée en présence de D_2O par Hellwig et al.⁽¹⁾ n'a pas permis de confirmer ces signaux avec certitude.

Les vibrations attribuées aux tyrosines peuvent également être observées dans le spectre différentiel. Elles sont généralement observées dans leur forme protonée vers 1520 cm^{-1} et entre 1270 cm^{-1} et 1235 cm^{-1} alors que les formes déprotonées sont présentes à 1500 cm^{-1} et 1270 cm^{-1} . Des signaux typiques des tyrosines protonées peuvent être observés à 1521 cm^{-1} et 1266 cm^{-1} alors que des signaux des formes déprotonées sont observés à 1590 cm^{-1} , 1504 cm^{-1} et 1280 cm^{-1} . La complexité des signaux observés dans ce cas peut provenir du grand nombre de tyrosines impliquées dans le mécanisme de la cytochrome ba_3 oxydase. En effet, les tyrosines Tyr244 et Tyr 248 participent au transfert de protons alors que la Tyr237 joue un rôle crucial dans cette protéine puisqu'elle fait partie du site actif⁽³⁷⁾. Tyr 237 est largement conservée dans la plupart des oxydases terminales, notamment chez *R. sphaeroides* ou *P. denitrificans* où elle participe au transfert d'électron.

Les arginines peuvent également être visualisées dans le spectre différentiel si elles sont impliquées dans la réaction d'oxydoréduction. Elles sont généralement observées vers 1675 cm^{-1} pour la vibration $\nu(\text{CN}_3\text{H}_5)^{\text{as}}$ et vers 1635 cm^{-1} pour le mode $\nu(\text{CN}_3\text{H}_5)^{\text{s}(38)}$. Les signaux à 1679 cm^{-1} et 1629 cm^{-1} peuvent correspondre aux Arg 449 et Arg450 pontants respectivement les propionates de l'hème b et un propionate de l'hème b et de l'hème a_3 .

La comparaison des spectres aux différents pH ne permet pas d'observer des changements majeurs. Cependant, les signaux impliquant les propionates des hèmes présentent une intensité inhomogène. En effet, on s'attendrait à voir diminuer l'intensité du signal à 1679 cm^{-1} vers les pH les plus élevés mais celui-ci augmente à pH 8.5. Cette augmentation semble donc montrer une reprotonation à pH élevé. Cette protonation est une piste plausible à l'inversion des potentiels observés par Sousa et al. au-delà de pH 8. Elle est en plus corrélée avec une augmentation des signaux des propionates déprotonés dans la forme réduite au-delà de pH 8 à 1556 cm^{-1} , 1544 cm^{-1} et 1395 cm^{-1} . Ces différentes indications semblent montrer un rôle important des protons dans la régulation des potentiels thermodynamiques des hèmes *b* et *a*₃.

Afin de déterminer quels sont les propionates impliqués dans les réactions de protonation/déprotonation, les contributions individuelles des hèmes *b* et *a*₃ ont été sondés. Des bornes en potentiel différentes permettant d'oxyder ou de réduire spécifiquement le cofacteur sondé ont été utilisés. Les valeurs utilisées ont été déterminés à partir des travaux publiés par Sousa et al. et sont mentionnées dans le tableau récapitulatif en section 3.3.2. Il faut cependant mentionner que les spectres obtenus ne contiennent pas uniquement les contributions de l'hème attendu. On observe plutôt les signaux des deux hèmes avec une part relative majeure de l'hème sondé en raison de la coopérativité qui implique une interdépendance des contributions des hèmes pendant la réaction d'oxydoréduction.

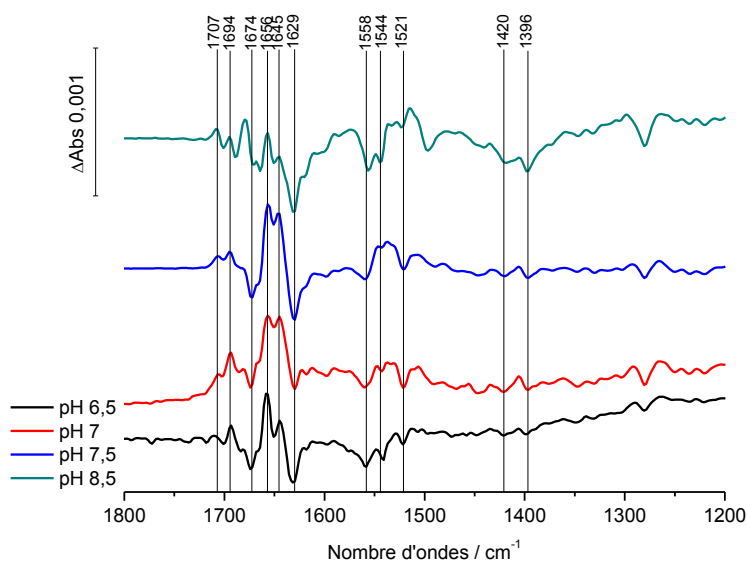


Figure 7.10 : Spectres différentiels de l'état oxydé moins l'état réduit de la cytochrome *ba*₃ oxydase à pH 6.5, 7, 7.5 et 8.5 avec une contribution majoritaire de l'hème *b*.

La figure 7.10 présente les spectres de l'état oxydé moins l'état réduit avec une contribution majoritaire de l'hème *b*. Dans un premier temps, on peut constater que le spectre observé à pH 8.5 est très différent de celui observé aux pH inférieurs. La différence observée entre 1675 cm^{-1} et 1620 cm^{-1} semble traduire un changement conformationnel différent à pH 8.5 que celui impliqué aux autres pH. Un autre changement intéressant pouvant être observé à pH 8.5 correspond à l'augmentation du signal des propionates protonés à 1679 cm^{-1} corrélée à l'augmentation des signaux correspondant aux formes déprotonées à 1558 cm^{-1} et 1396 cm^{-1} . Ces signaux montrent une potentielle implication de la protonation/déprotonation des propionates des hèmes *b* au cours de la réaction d'oxydoréduction.

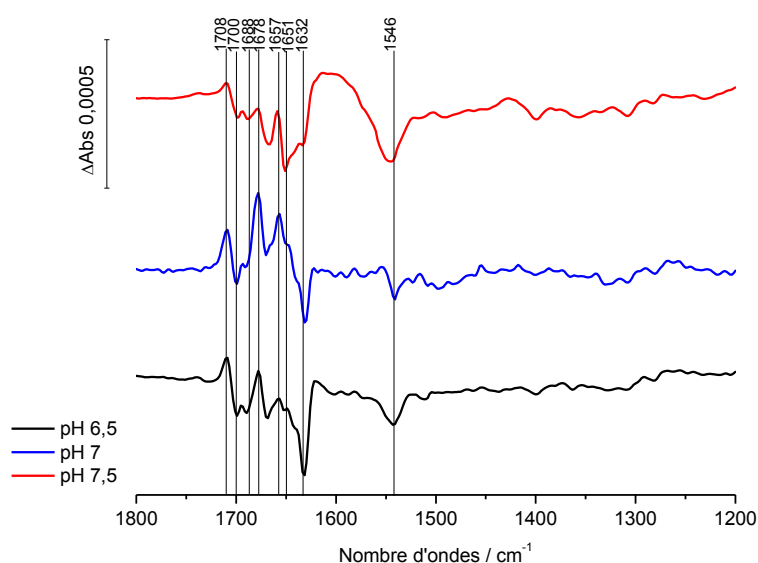


Figure 7.11 : Spectres différentiels de l'état oxydé moins l'état réduit de la cytochrome ba_3 oxydase à pH 6.5, 7, 7.5 et 8.5 avec une contribution majoritaire de l'hème a_3 .

La figure 7.11 présente les spectres de l'état oxydé moins l'état réduit avec une contribution majoritaire de l'hème a_3 . Ces spectres présentent une importante différence de contributions à 1678 cm^{-1} . Contrairement aux spectres montrant une contribution majoritaire de l'hème *b* où l'intensité du signal à 1678 cm^{-1} augmente avec le pH, l'effet inverse est observé pour les spectres présentant une contribution majoritaire de l'hème a_3 . Cette observation semble liée à des différences d'état de protonation des propionates de l'hème a_3 . Ici, les propionates semblent préférentiellement protonés aux faibles pH. De plus, à partir de pH 7.5, les bandes comprises entre 1675 cm^{-1} et 1620 cm^{-1} semblent traduire un changement conformationnel de nature différente par rapport aux spectres obtenus à pH 6.5 et pH 7.

La différence d'état de protonation au niveau des propionates est une possible cause des potentiels relatifs observés pour les hèmes *b* et a_3 ⁽³⁹⁾. En effet, les contributions des hèmes *b* et a_3 montrent une protonation préférentielle de l'hème *b* aux valeurs de pH élevées et de l'hème a_3 aux valeurs de pH les plus faibles. Cette observation corrèle avec une diminution de la différence de potentiel entre l'hème relais et l'hème du site actif et avec les résultats obtenus par électrochimie directe puisqu'ils montrent également pourquoi la réduction de l'oxygène est favorisée aux faibles pH. Il faut cependant analyser ces données avec précaution compte-tenu de la faible qualité des spectres obtenus.

7.6. Conclusion

Cette étude a pour but de comparer des oxydases hème-cuivre de différentes familles avec des propriétés différentes. L'immobilisation des enzymes sur les électrodes modifiées a permis d'observer une stabilité thermique supérieure pour la cytochrome ba_3 oxydase que pour les deux enzymes issues d'organismes mésophiles. L'importance de la différence relative de potentiels thermodynamiques de l'hème relais et de l'hème du site actif sur la réaction de réduction de l'oxygène a également été démontrée. Les propriétés thermodynamiques de chacune des enzymes étudiées semblent donc engendrer des mécanismes de transfert d'électrons et de protons différents.

La cytochrome ba_3 oxydase, qui possède un ordre relatif des potentiels thermodynamiques différents par rapport aux oxydases terminales « classiques », a été plus particulièrement examinée par spectroscopie infrarouge différentielle. Cette technique nous a permis de proposer une explication concernant les potentiels des hèmes. En effet, les potentiels thermodynamiques semblent reliés à un équilibre de protonation en faveur de l'hème a_3 aux faibles pH et en faveur de l'hème *b* aux pH élevés.

7.7. Références

1. Hellwig, P., Soulimane, T., Buse, G., and Maentele, W. (1999) Electrochemical, FTIR, and UV/VIS Spectroscopic Properties of the ba3 Oxidase from *Thermus thermophilus*, *Biochemistry* 38, 9648-9658.
2. Nicholls, P. (1979) Effects of inhibitory ligands on the aerobic carbon monoxide complex of cytochrome c oxidase, *Biochem. J.* 183, 519-529.
3. 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.
4. Todorovic, S., Pereira, M. M., Bandejas, T. M., Teixeira, M., Hildebrandt, P., and Murgida, D. H. (2005) Midpoint Potentials of Hemes a and a₃ in the Quinol Oxidase from *Acidianus ambivalens* are Inverted, *J. Am. Chem. Soc.* 127, 13561-13566.
5. Verissimo, A. F., Sousa, F. L., Baptista, A. n. M., Teixeira, M., and Pereira, M. M. (2008) Thermodynamic Redox Behavior of the Heme Centers in A-Type Heme-Copper Oxygen Reductases: Comparison between the Two Subfamilies, *Biophys. J.* 95, 4448-4455.
6. Verissimo, A. F., Sousa, F. L., Baptista, A. M., Teixeira, M., and Pereira, M. M. (2007) Thermodynamic Redox Behavior of the Heme Centers of cbb3 Heme-Copper Oxygen Reductase from *Bradyrhizobium japonicum*, *Biochemistry* 46, 13245-13253.
7. Morris, R. L., and Schmidt, T. M. (2013) Shallow breathing: bacterial life at low O₂, *Nat. Rev. Microbiol.* 11, 205-212.
8. Fabian, H., and Mäntele, W. (2002) Infrared spectroscopy of proteins, *Handbook of vibrational spectroscopy*.
9. Barth, A. (2007) Infrared spectroscopy of proteins, *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* 1767, 1073-1101.
10. Arrondo, J. L. R., Muga, A., Castresana, J., and Goni, F. M. (1993) Quantitative studies of the structure of proteins in solution by Fourier-transform infrared spectroscopy, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 59, 23-56.
11. Osawa, M. (2006) In-situ surface-enhanced infrared spectroscopy of the electrode/solution interface, *Adv. Electrochem. Sci. Eng.* 9, 269-314.
12. 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, *Biophys. J.* 94, 3698-3705.
13. Bortolotti, C. A., Borsari, M., Sola, M., Chertkova, R., Dolgikh, D., Kotlyar, A., and Facci, P. (2007) Orientation-Dependent Kinetics of Heterogeneous Electron Transfer for Cytochrome c Immobilized on Gold: Electrochemical Determination and Theoretical Prediction, *J. Phys. Chem. C* 111, 12100-12105.
14. Monari, S., Ranieri, A., Bortolotti, C. A., Peressini, S., Tavagnacco, C., and Borsari, M. (2011) Unfolding of cytochrome c immobilized on self-assembled monolayers. An electrochemical study, *Electrochimica Acta* 56, 6925-6931.
15. Bortolotti, C. A., Battistuzzi, G., Borsari, M., Facci, P., Ranieri, A., and Sola, M. (2006) The Redox Chemistry of the Covalently Immobilized Native and Low-pH Forms of Yeast Iso-1-cytochrome c, *J. Am. Chem. Soc.* 128, 5444-5451.
16. Zanetti-Polzi, L., Daidone, I., Bortolotti, C. A., and Corni, S. (2014) Surface Packing Determines the Redox Potential Shift of Cytochrome c Adsorbed on Gold, *J. Am. Chem. Soc.*, Ahead of Print.
17. Petrovic, J., Clark, R. A., Yue, H., Waldeck, D. H., and Bowden, E. F. (2005) Impact of Surface Immobilization and Solution Ionic Strength on the Formal Potential of Immobilized Cytochrome c, *Langmuir* 21, 6308-6316.

18. Avila, A., Gregory, B. W., Niki, K., and Cotton, T. M. (2000) An Electrochemical Approach to Investigate Gated Electron Transfer Using a Physiological Model System: Cytochrome c Immobilized on Carboxylic Acid-Terminated Alkanethiol Self-Assembled Monolayers on Gold Electrodes, *J. Phys. Chem. B* 104, 2759-2766.
19. Heering, H. A., Wiertz, F. G. M., Dekker, C., and De Vries, S. (2004) Direct immobilization of native yeast iso-1 cytochrome c on bare gold: Fast electron relay to redox enzymes and zeptomole protein-film voltammetry, *J. Am. Chem. Soc.* 126, 11103-11112.
20. Leger, C., and Bertrand, P. (2008) Direct Electrochemistry of Redox Enzymes as a Tool for Mechanistic Studies, *Chem. Rev.* 108, 2379-2438.
21. Schach, D., Nowak, C., Gennis, R. B., Ferguson-Miller, S., Knoll, W., Walz, D., and Naumann, R. L. C. (2010) Modeling direct electron transfer to a multi-redox center protein: Cytochrome c oxidase, *J. Electroanal. Chem.* 649, 268-276.
22. Nowak, C., Schach, D., Gebert, J., Grosserueschkamp, M., Gennis, R. B., Ferguson-Miller, S., Knoll, W., Walz, D., and Naumann, R. L. C. (2011) Oriented immobilization and electron transfer to the cytochrome c oxidase, *J. Solid State Electrochem.* 15, 105-114.
23. Aagaard, A., and Brzezinski, P. (2001) Zinc ions inhibit oxidation of cytochrome c oxidase by oxygen, *FEBS Lett.* 494, 157-160.
24. Hellwig, P., Grzybek, S., Behr, J., Ludwig, B., Michel, H., and Maentele, 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.
25. Cordes, M., and Giese, B. (2009) Electron transfer in peptides and proteins, *Chem. Soc. Rev.* 38, 892-901.
26. Hrabakova, J., Ataka, K., Heberle, J., Hildebrandt, P., and Murgida, D. H. (2006) Long distance electron transfer in cytochrome c oxidase immobilised on electrodes. A surface enhanced resonance Raman spectroscopic study, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 8, 759-766.
27. von Ballmoos, C., Lachmann, P., Gennis, R. B., Adelroth, P., and Brzezinski, P. (2012) Timing of electron and proton transfer in the ba₃ cytochrome c oxidase from *Thermus thermophilus*, *Biochemistry* 51, 4507-4517.
28. von Ballmoos, C., Gennis, R. B., Adelroth, P., and Brzezinski, P. (2011) Kinetic design of the respiratory oxidases, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 11057-11062.
29. Haltia, T., Semo, N., Arrondo, J. L. R., Goni, F. M., and Freire, E. (1994) Thermodynamic and Structural Stability of Cytochrome c Oxidase from *Paracoccus denitrificans*, *Biochemistry* 33, 9731-9740.
30. Sujak, A., Sanghamitra, N. J. M., Maneg, O., Ludwig, B., and Mazumdar, S. (2007) Thermostability of proteins: Role of metal binding and pH on the stability of the dinuclear CuA site of *Thermus thermophilus*, *Biophys. J.* 93, 2845-2851.
31. Kumar, S., and Nussinov, R. (2001) How do thermophilic proteins deal with heat?, *Cell. Mol. Life Sci.* 58, 1216-1233.
32. Hellwig, P., Soulimane, T., and Maentele, W. (2002) Electrochemical, FT-IR and UV/VIS spectroscopic properties of the caa₃ oxidase from *T. thermophilus*, *Eur. J. Biochem.* 269, 4830-4838.
33. Behr, J., Michel, H., Maentele, W., and Hellwig, P. (2000) Functional Properties of the Heme Propionates in Cytochrome c Oxidase from *Paracoccus denitrificans*. Evidence from FTIR Difference Spectroscopy and Site-Directed Mutagenesis, *Biochemistry* 39, 1356-1363.

34. Gerscher, S., Hildebrandt, P., Buse, G., and Soulimane, T. (1999) The active site structure of ba3 oxidase from *Thermus thermophilus* studied by resonance Raman spectroscopy, *Biospectroscopy* 5, S53-S63.
35. 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.
36. 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, S16169/16161-S16169/16120.
37. von Ballmoos, C., Adelroth, P., Gennis, R. B., and Brzezinski, P. (2012) Proton transfer in ba3 cytochrome c oxidase from *Thermus thermophilus*, *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* 1817, 650-657.
38. Barth, A. (2007) Infrared spectroscopy of proteins, *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* 1767, 1073-1101.
39. Braenden, G., Braenden, 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.

Chapitre VIII

Conclusion

Le but de cette thèse est d'apporter des informations concernant le transfert d'électrons et de protons au sein des oxydases terminales à partir de techniques électrochimiques et spectroscopiques. La visualisation du transfert d'électron est obtenue par des méthodes électrochimiques. Le transfert de protons n'est pas directement observable et a été estimé grâce au blocage des chemins de protons par différentes méthodes.

Cet objectif a nécessité la mise au point d'une méthode d'analyse permettant le transfert d'électron direct entre une électrode et la protéine. Ceci a été possible grâce à l'utilisation de nanoparticules d'or fonctionnalisées avec un mélange de mercaptohexanol et d'hexanethiol. Le système modèle utilisé a été la cytochrome *bo*₃ oxydase pour laquelle nous avons pu observer un signal dont le potentiel correspond à celui de la quinone. De même, en présence d'oxygène, une large vague cathodique traduisant la réduction du substrat est visible. L'inhibition de la protéine en présence de cyanure a pu confirmer que le signal observé provenait bien de la protéine. Cette première étude a permis d'envisager l'utilisation de l'électrochimie directe des protéines pour de futures études mécanistiques.

La deuxième partie de la thèse a été consacrée à la visualisation de l'effet de différents moyens d'inhibition sur la cytochrome *aa*₃ oxydase de *P. denitrificans*. Des études sur des mutants des chemins d'entrée des protons, sur l'inhibition du transfert d'électron et de protons ont mis en avant les effets reliés au blocage des chemins de protons sur les cyclovoltammogrammes et ont permis de discuter les sites de coordination du Zn²⁺ en comparaison des résultats déjà publiés dans la littérature. Nous avons donc montré qu'il était nécessaire de bloquer les deux chemins d'entrée et le chemin de sortie des protons pour inhiber l'activité catalytique de la protéine.

La troisième partie montre la comparaison de deux isoformes de la cytochrome *cbb*₃ oxydase. Les différentes techniques physico-chimiques utilisées n'ont pas permis de déceler d'importantes différences en terme d'activité, ni de potentiels de demi-vague des cofacteurs. Cependant, la spectroscopie infrarouge a permis de mettre en avant des différences mécanistiques au niveau moléculaire notamment au niveau des acides aspartiques et glutamiques, des propionates des hèmes et des arginines.

La dernière partie propose une étude comparative d'oxydases terminales de différents types. Cette étude est particulièrement motivée par la dépendance pH particulière des potentiels de demi-vague des hèmes de la cytochrome *ba*₃ oxydase par rapport aux oxydases « classiques ». La différence de thermostabilité des différentes protéines a permis de sonder la conservation

de cette propriété après immobilisation sur l'électrode. Cette étude a également mis l'accent sur l'importance de la différence de potentiel entre l'hème relais et celui du site actif sur la réaction de réduction de l'oxygène. La spectroscopie infrarouge couplée à l'électrochimie semble montrer que les propionates des hèmes jouent un rôle dans les potentiels de demi-vague de la cytochrome *ba₃* oxydase.

Cette thèse a finalement permis d'explorer plusieurs voies permettant l'étude d'oxydases terminales par des techniques voltampérométriques. Une modification de surface simple et rapide à mettre en œuvre permet de visualiser le transfert d'électrons et la réaction de réduction de l'oxygène catalysée par les oxydases terminales. L'inhibition des différentes parties fonctionnelles et la comparaison d'oxydases aux propriétés variées offrent de nouvelles propositions d'explorations et d'interprétations puisqu'elles permettent l'observation directe de l'influence du transfert d'électron et l'observation indirecte du rôle du transfert de protons sur la réaction de réduction de l'oxygène. Cependant, certains facteurs restent à optimiser comme, par exemple, la visualisation plus précise de l'orientation de la protéine sur la surface qui est un élément clef dans l'interprétation des phénomènes en électrochimie directe des protéines.

Différentes possibilités d'exploration restent envisageables concernant l'interprétation des signaux obtenus. La plus intéressante et le plus prometteuse semble être le couplage des études spectroscopiques de caractérisation de surface avec les modifications décrites dans ce manuscrit. Le couplage à la spectroscopie UV-Visible permettra de sonder les cofacteurs impliqués dans le transfert d'électrons alors que les spectroscopies infrarouge et Raman apporteront une caractérisation au niveau moléculaire des surfaces modifiées et des phénomènes impliqués dans le pompage de protons et dans la réaction de réduction de l'oxygène.

Annexes

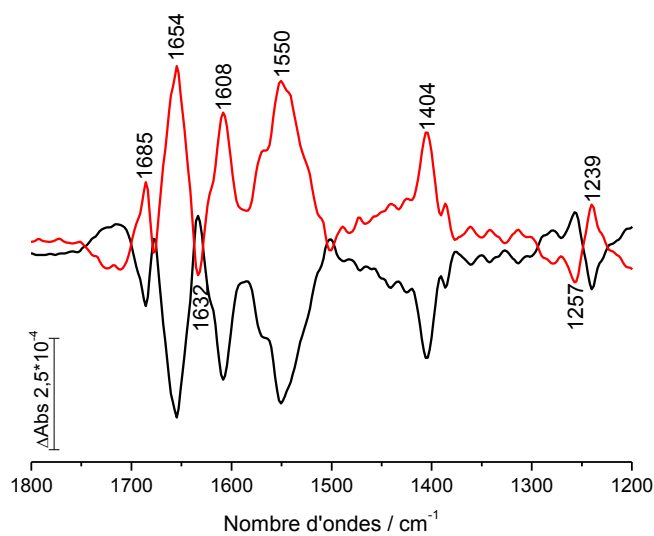


Figure 1 : Spectres différentiels de la sous-unité CcoP de la cytochrome *cb*₃-1. Le spectre noir correspond à la forme oxydée moins la forme réduite et le spectre rouge correspond à la forme réduite moins la forme oxydée. Les mesures ont été effectuées dans un tampon Tris à pH 7.5 entre -0.19V et +0.61 V.

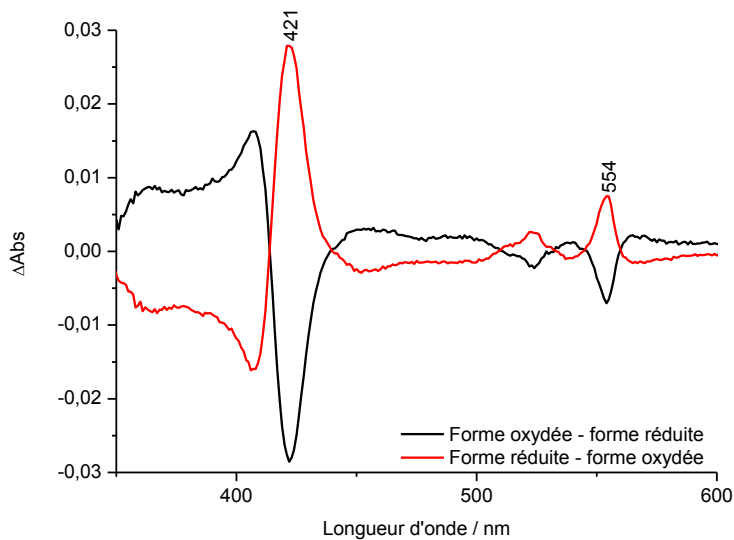


Figure 2 : Spectres différentiels UV-Visible de la forme oxydée moins réduite et de la forme réduite moins oxydée du cytochrome *c*₅. Les mesures ont été effectuées entre +0.01 et +0.51 V à pH 7.5.

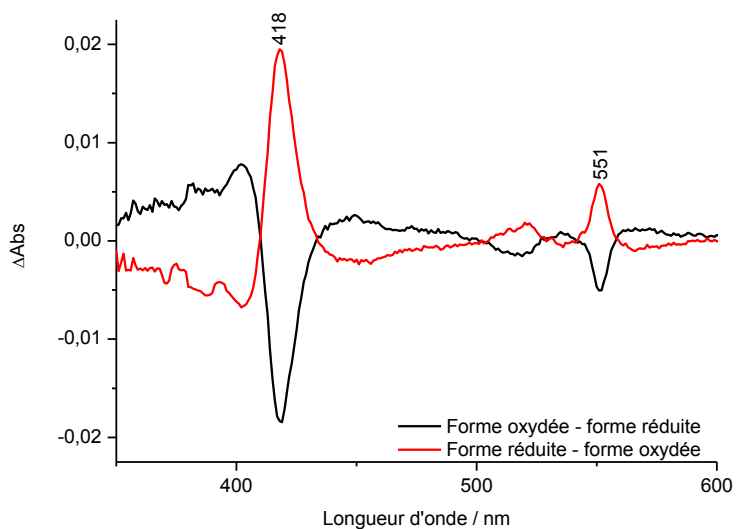


Figure 3 : Spectres différentiels UV-Visible de la forme oxydée moins réduite et de la forme réduite moins oxydée du cytochrome c_{551} . Les mesures ont été effectuées entre +0.01 et +0.51 V à pH 7.5.

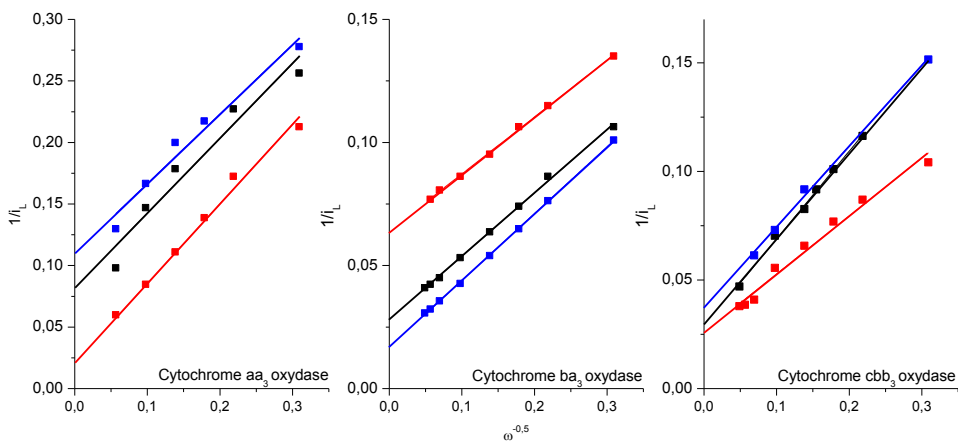


Figure 4 : Influence de la vitesse de rotation de l'électrode sur l'intensité du courant de réduction de l'oxygène à pH 6.5, 7 et 8.

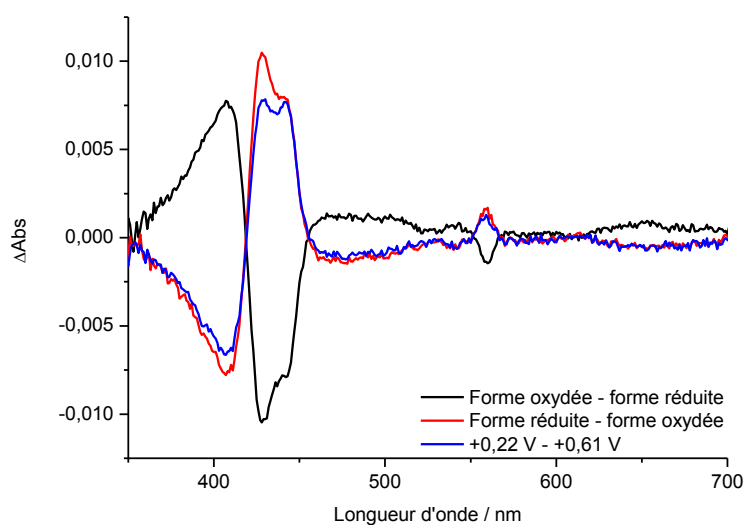


Figure 5 : Spectres différentiels UV-Visible de la forme oxydée moins réduite (courbe noire), de la forme réduite moins oxydée (courbe rouge) et de +0.22 V – 0.61 V (courbe bleue) de la cytochrome ba_3 oxydase. Les résultats montrent une proportion d'hème b réduits supérieur à l'hème a_3 .

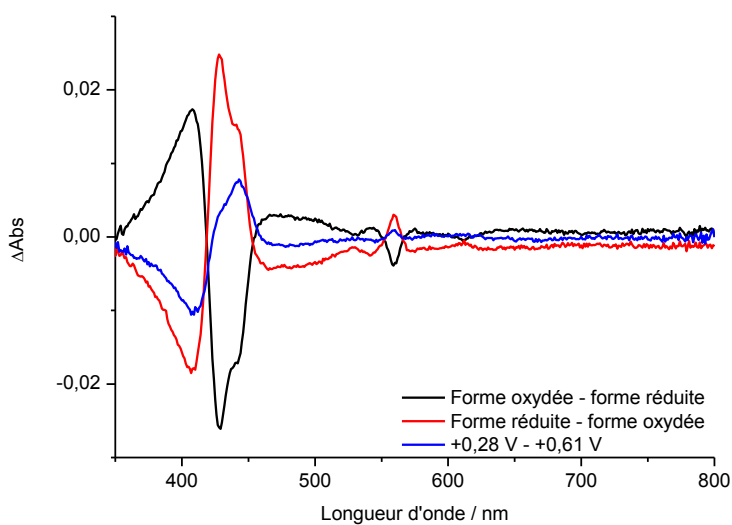


Figure 6 : Spectres différentiels UV-Visible de la forme oxydée moins réduite (courbe noire), de la forme réduite moins oxydée (courbe rouge) et de +0.28 V – 0.61 V (courbe bleue) de la cytochrome ba_3 oxydase. Les résultats montrent une proportion d'hème b réduits supérieur à l'hème a_3 .

Caractérisation électrochimique et spectroscopique de protéines membranaires immobilisées sur des nanomatériaux

Résumé

Le domaine de la bioénergétique concerne l'étude des échanges et des transformations de l'énergie au sein des organismes vivants. Cette thèse propose une étude électrochimique et spectroscopique de protéines issues de la chaîne respiratoire, les oxydases terminales, afin de comprendre l'influence de différentes propriétés de ces enzymes (potentiels des cofacteurs, dépendance pH...) sur leur mécanisme réactionnel. La première partie de ce travail décrit le développement d'une méthode d'immobilisation permettant de conserver l'intégrité et l'activité de ces enzymes. Cette technique a d'abord été utilisée pour étudier l'inhibition de la cytochrome *aa₃* oxydase de *P. denitrificans* et a permis de mettre en avant l'importance du transfert de protons sur la réaction de réduction de l'oxygène. Une deuxième étude propose de comparer deux isoformes de la cytochrome *cbb₃* oxydase dont aucune différence n'a été observée à ce jour. La spectroscopie IRTF couplée à l'électrochimie montre l'implication de résidus acides différents au cours de la réaction d'oxydoréduction suggérant des différences mécanistiques. La dernière partie propose une étude comparative d'oxydases terminales de différents types et met en perspective l'influence des potentiels relatifs des hèmes sur la réaction de réduction de l'oxygène.

Mots-clés : Bioénergétique, chaîne respiratoire, électrochimie directe, spectroscopie IRTF, spectroscopie UV-Vis, modification de surfaces, nanoparticules, oxydases terminales, Complexe IV, cytochrome *c* oxydase, quinol oxydase.

Résumé en anglais

The field of bioenergetics concerns the study of exchange and transformation of energy in living organisms. This manuscript proposes an electrochemical and spectroscopic study of the fourth complex of the respiratory chain, the terminal oxidases. The aim of this study was to understand the influence of some properties of these enzymes (potential of the cofactors, pH dependency...) on the catalytic mechanism. The first part describes an immobilization procedure which retains the protein activity and structure. This procedure has been applied for the study the inhibition of the proton pathways of cytochrome *aa₃* oxidase from *P. denitrificans* and shows the importance of proton transfer on the oxygen reduction. In a second study, two isoforms of cytochrome *cbb₃* oxidase were compared. No differences were observed between them until now. Our electrochemically induced FTIR spectroscopy study suggests the implication of different acidic residues during the redox reaction implying differences in the mechanism of these enzymes. The last part deals with the comparison of terminal oxidases of different types and shows the influence of the relative order of the midpoint potentials of the hemes on the oxygen reduction.

Keywords : Bioenergetics, respiratory chain, direct electrochemistry, FTIR spectroscopy, UV-Vis spectroscopy, surface functionalization, nanoparticles, terminal oxidases, Complex IV, cytochrome *c* oxidase, quinol oxidase.