



HAL
open science

Auto-assemblage d'une protéine fongique, l'hydrophobine SC3, aux interfaces : Applications à l'élaboration de surfaces catalytiques

Yohann Corvis

► **To cite this version:**

Yohann Corvis. Auto-assemblage d'une protéine fongique, l'hydrophobine SC3, aux interfaces : Applications à l'élaboration de surfaces catalytiques. Autre. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 2005. Français. NNT : 2005NAN10187 . tel-01746956

HAL Id: tel-01746956

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01746956>

Submitted on 29 Mar 2018

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

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



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

**UFR Sciences & Techniques de la Matière et des Procédés
École Doctorale SESAMES**

Thèse

présentée pour l'obtention du titre de

Docteur de l'Université Henri Poincaré, Nancy 1
en Chimie et Physico-Chimie Moléculaires

par **Yohann CORVIS**

**Auto-assemblage d'une protéine fongique, l'hydrophobine SC3, aux interfaces.
Applications à l'élaboration de surfaces catalytiques.**

Soutenue publiquement le 13 décembre 2005

Membres du jury

Rapporteurs

Mme R. Bilewicz Professeur, Université de Varsovie, Varsovie
M. R. Verger Directeur de Recherche CNRS, Marseille

Examineurs

M. D. Tagu Directeur de Recherche INRA, Rennes
M. J.-L. Rivail Professeur Émérite, Université Henri Poincaré, Nancy
M. A. Walcarius Directeur de Recherche CNRS, Université Henri Poincaré, Nancy
Mme E. Rogalska Maître de conférences, Université Henri Poincaré, Nancy

Remerciements

Les travaux de recherches doctorales présentés dans ce mémoire ont été réalisés au sein de l'UMR "Structure et Réactivité des Systèmes Moléculaires Complexes" dans le cadre d'une Bourse Docteur Ingénieur cofinancée par le CNRS et l'entreprise hollandaise BioMaDe Technology Foundation.

Je tiens d'abord à remercier la directrice de cette thèse, Mme Ewa Rogalska, pour m'avoir donné la possibilité de travailler sur un sujet fascinant, à la fois novateur d'un point de vue fondamental et très prometteur au niveau technologique. Mme Rogalska a su apporter une dimension internationale à ces travaux de recherche. Par ailleurs, mon travail a bénéficié de nombreux échanges interdisciplinaires et collaborations scientifiques. D'excellents contacts professionnels et personnels ont été également créés dans le cadre de congrès internationaux auxquels j'ai participé.

Je remercie tous les laboratoires qui m'ont accueilli et les spécialistes de renom avec lesquels j'ai pu établir des relations privilégiées. Je pense particulièrement à : M. Georges Robillard, Mme Karin Scholtmeijer, M. Harm Hektor et M. Rick Rink (BioMaDe Technology Foundation, Groningen, Pays-Bas) ; M. Gerald Brezesinski (Max Planck Institute of Colloids and Interfaces, Berlin, Allemagne) ; M. Sergio Funari (Deutsches Elektronen-Synchrotron, Hamburger Synchrotronstrahlungslabor, Hambourg, Allemagne) ; Mme Renata Bilewicz et Mme Ewa Górecka (Département de Chimie de l'Université de Varsovie, Pologne) ; M. Bernard Gauthier-Manuel (Laboratoire de Physique et Métrologie des Oscillateurs, Besançon) ; M. Marek Rogalski et M. Fabrice Mutelet (Laboratoire de Thermodynamique des Milieux Polyphasés, Metz) ; M. Alain Walcarius (Laboratoire de Chimie et Microbiologie pour l'Environnement, Villers-lès-Nancy).

Mes études doctorales se sont quant à elles déroulées dans d'excellentes conditions au sein l'école doctorale "Synthèses, Expériences, Simulations, Applications : de la Molécule aux Édifices Supramoléculaires" dirigée par M. Daniel Canet que je remercie.

Je remercie Mme Renata Bilewicz et M. Robert Verger d'être les rapporteurs de ce manuscrit ainsi que M. Denis Tagu, M. Jean-Louis Rivail et M. Alain Walcarius d'avoir accepté de participer au jury de ma thèse.

Je tiens également à remercier tous ceux qui m'ont soutenu durant ces trois années de thèse : ma famille et mes amis. Une pensée particulière pour mes collègues du laboratoire, Angéline van der Heyden, Mounia Badis Kadri, Sébastien Follot, Sabrina Hecht et Florentin Michaux.

Je dédie ce travail de recherche aux enseignants qui ont marqué mon parcours scolaire et m'ont donné le goût des Sciences : M. Gaillard, Mme Bistoquet, M. Allamkan et M. Courset ; sans oublier ceux qui m'ont initié à la recherche scientifique, M. Ángyán, M. Chruściel et M. Pottecher.

Table des matières

Liste des abréviations	6
Avant-propos	9
<u>INTRODUCTION - Les hydrophobines : protéines polyvalente</u>	<u>11</u>
1 - Développement des champignons filamenteux	13
2 - Étapes d'excrétion et de purification de l'hydrophobine SC3	14
3 - Les différents travaux de recherche sur les hydrophobines	15
<u>MATÉRIEL ET MÉTHODES</u>	<u>19</u>
1 - Diffusion de lumière	21
2 - Dichroïsme circulaire	22
3 - Phénomènes interfaciaux : interface eau/air	23
3.a - Notion de tension superficielle	23
3.b - Adsorption des molécules amphiphiles à l'interface eau/air	24
3.c - Pression de surface et films de Langmuir	25
3.d - Potentiel de surface	28
3.e - Microscopie à angle de Brewster	30
3.f - Diffraction des rayons X sous incidence rasante	32
3.g - Spectroscopie infrarouge à l'interface eau/air	35
4 - Mesure d'angle de contact	38
5 - Microscopie électronique et spectroscopie de pertes d'énergie	39
5.a - La microscopie électronique à transmission	39
5.b - Spectroscopie de perte d'énergie des électrons transmis	40
5.c - Technique de coloration négative	41
6 - Technique de Franges d'ordre chromatique égal	42
7 - Diffraction des rayons X aux petits angles	43
7.a - Phase lamellaire	44
7.b - Phase cubique	45
7.c - Préparation des échantillons de monooléine	45
8 - Modification et fonctionnalisation des surfaces	46
8.a - Nettoyage des surfaces avant modification	46
8.b - Modification des surfaces par physisorption de la SC3	47
8.c - Fonctionnalisation par adsorption d'enzymes sur les surfaces modifiées	47
8.d - Co-immobilisation de molécules issues de la synthèse organique	48
8.e - Élaboration d'électrodes d'or modifiées par auto-assemblage de thiols	48
8.f - Revue sur les méthodes existantes de fonctionnalisation de matériaux	50

9 - Les méthodes voltampérométriques en électrochimie.....	51
9.a - Voltampérométrie cyclique.....	52
9.b - Ampérométrie hydrodynamique.....	53
9.c - Les capteurs et biocapteurs électrochimiques.....	55
10 - Spectrophotométrie UV-visible.....	56
11 - Outils de modélisation moléculaire appliquée aux protéines.....	57
11.a - Estimation du volume de protéines sphériques.....	57
11.b - Calcul d'aire de surface accessible.....	57
12 - Composés chimiques et biologiques utilisés.....	59
12.a - L'hydrophobine SC3 et le lysozyme.....	59
12.b - Les lipides.....	60
12.c - Les enzymes et leurs substrats.....	62
12.d - Les solvants.....	67
12.e - Les sels.....	67
12.f - Autres produits.....	68
RÉSULTATS ET DISCUSSION.....	69
Chapitre I - Organisation de l'hydrophobine SC3 aux interfaces.....	71
I.1 - Organisation de la SC3 en milieu aqueux.....	71
I.2 - Auto-assemblage de la protéine sur support solide.....	76
I.2.a - Adsorption de la SC3 sur supports solides.....	76
I.2.b - Mesure d'angle de contact.....	77
I.2.c - Imagerie par microscopie électronique à transmission.....	78
I.2.d - Mise en évidence de la porosité du film protéique.....	80
I.2.e - Épaisseurs des films de SC3 adsorbés sur surfaces solides.....	82
I.2.f - L'hydrophobine SC3 adsorbée sur électrodes d'or modifiées.....	84
I.3 - Conclusion.....	86
Chapitre II - Interactions hydrophobine - membranes modèles.....	88
II.1 - Impact de la SC3 sur des monocouches lipidiques.....	88
II.1.a - Monocouches phospholipidiques à l'interface eau/air.....	89
II.1.b - Désorganisation de la monocouche de monooléine par la SC3.....	101
II.2 - Influence de la SC3 sur des bicouches de monooléine.....	102
II.3 - Conclusion.....	104
Chapitre III - Immobilisation d'enzymes.....	105
III.1 - Mise en évidence des interactions SC3-enzymes.....	105
III.2 - Activités enzymatiques suivies par électrochimie.....	111
III.2.a - Électrodes fonctionnalisées par la glucose oxydase.....	111
III.2.b - Électrodes fonctionnalisées par la peroxydase.....	113
III.2.c - Estimation de la quantité d'enzyme immobilisée sur ECV.....	116
III.3 - Activités enzymatiques suivies par spectrophotométrie.....	120
III.4 - Conclusion.....	122

Chapitre IV - Immobilisation de molécules issues de la synthèse organique	124
IV.1 - Les cyclodextrines	124
IV.1.a - Études électrochimiques en volume.....	125
IV.1.b - Caractérisation des systèmes cyclodextriniques immobilisés.....	130
IV.2 – Complexe calixarénique de cuivre ^I adsorbé sur électrodes	132
IV.2.a - Contexte de l'étude	132
IV.2.b - Stabilité du film calixarène/hydrophobine sur électrode de carbone..	134
IV.2.c - Étude du cycle Cu ^{II} /Cu ^I en présence de base	135
IV.2.d - Mise en évidence de la réactivité de H ₂ O ₂ sur électrode de platine....	136
IV.2.e - Mise en évidence de la catalyse d'oxydation de l'acide oléique.....	136
IV.3 - Les fullerènes.....	137
IV.4 - Conclusion.....	139
 Chapitre V - Chélation d'ions cuivriques par l'hydrophobine PFA-SC3.....	 140
 <u>CONCLUSION GÉNÉRALE</u>	 <u>145</u>
 <u>RÉFÉRENCES.....</u>	 <u>149</u>

Liste des abréviations

ASA : Aire de surface accessible

BAM : Microscopie à angle de Brewster (Brewster angle microscopy)

CAC : Concentration d'agrégation critique

CCD : Dispositif à transfert de charges (Charge-Coupled Devices)

CD : Cyclodextrine

CE : Contre-électrode

Cs : Compressibilité

Cs^{-1} : Module de compressibilité

DMPE : 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidyléthanoline (C₃₃H₆₆NO₈P)

DO : Densité optique

DPPC : 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholine (C₄₀H₈₀NO₈P)

ECV : Électrode de carbone vitreux

EELS : Spectroscopie de perte d'énergie des électrons transmis
(Electron energy lost spectroscopy)

EPt : Électrode de platine

ER : Efficacité de recouvrement

FAD : Flavine adénine dinucléotide

FECO : Franges d'ordre chromatique égal (Fringes of equal chromatic order)

GCA : Grille de carbone amorphe

GIXD : Diffraction des rayons X sous incidence rasante (Grazing incidence X-ray diffraction)

GOX : Glucose oxydase

HRP : Peroxydase de raifort (Horseradish peroxidase)

IR : Infrarouge

IRRAS : Spectroscopie infrarouge de réflexion-absorption
(Infrared reflection-absorption spectroscopy)

LIP : Lipase

Man : Mannose

MET : Microscopie électronique à transmission

MO : Monooléine (1-oleoyl-*rac*-glycerol ; C₂₁H₄₀O₄)

NAG : *N*-acétylglucosamine

PDB : Banque de données des protéines (Protein data bank)

RE : Électrode de référence (Reference electrode)

SAM : Monocouche auto-assemblée (Self-assembled monolayer)

SDS-PAGE : Electrophorèse sur gel en polyacrylamide en présence de dodécyle sulfate de sodium

SMO : Système moléculaire organisé

$t\text{-}\varphi_{G\text{-}LE}$: Transition de phase gaz-liquide expansé

$t\text{-}\varphi_{LE\text{-}LC}$: Transition de phase liquide expansé-liquide condensé

VC : Voltampérométrie cyclique

VMC : Voltampérométrie multi-cyclique

WE : Électrode de travail (Working electrode)

Π : Pression de surface

ΔV : Potentiel de surface

φ_G : Phase gazeuse

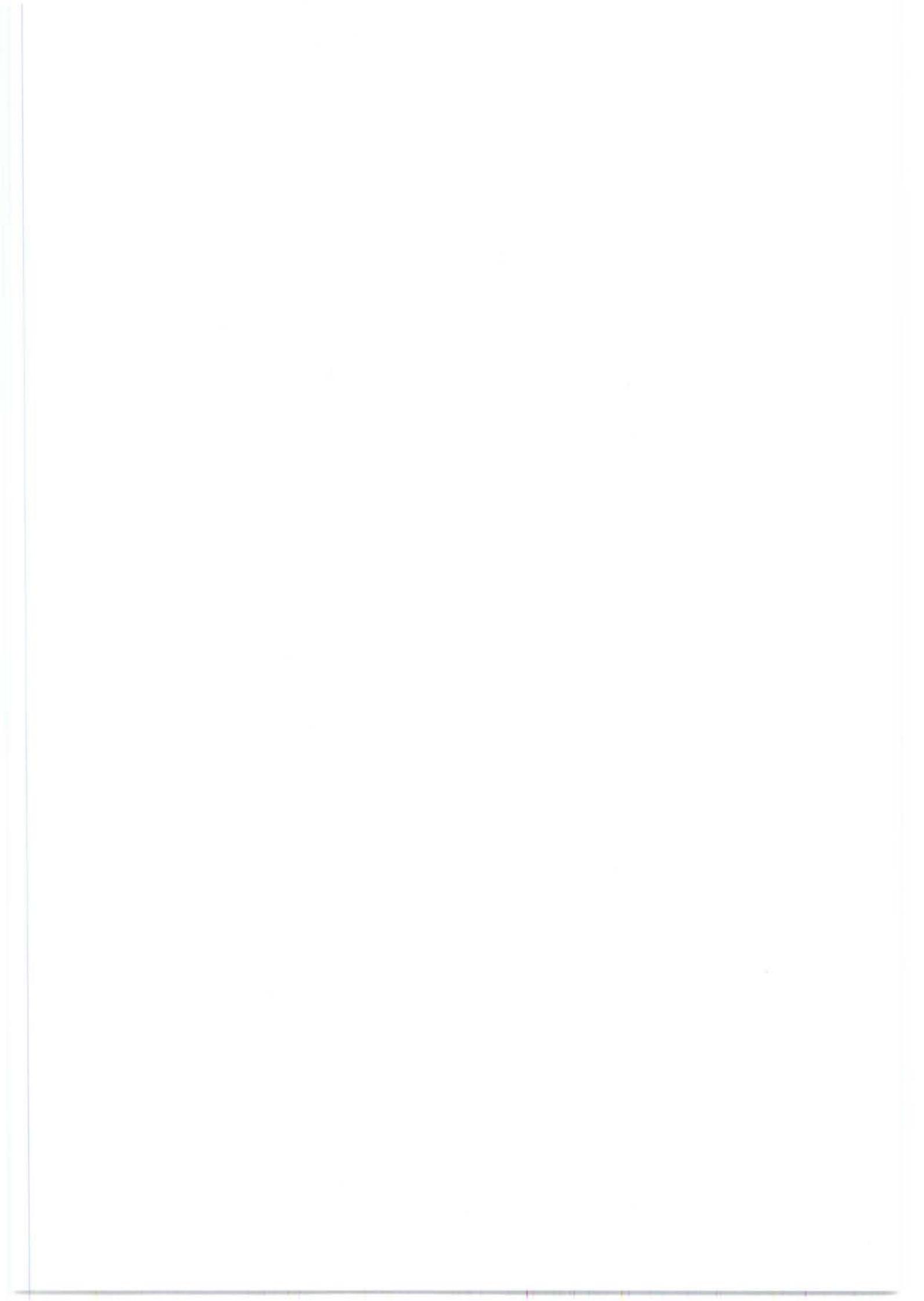
φ_{LC} : Phase liquide condensé

φ_{LE} : Phase liquide expansé

φ_S : Phase solide

σ : Nombre d'onde de vibration

θ_B : Angle de Brewster

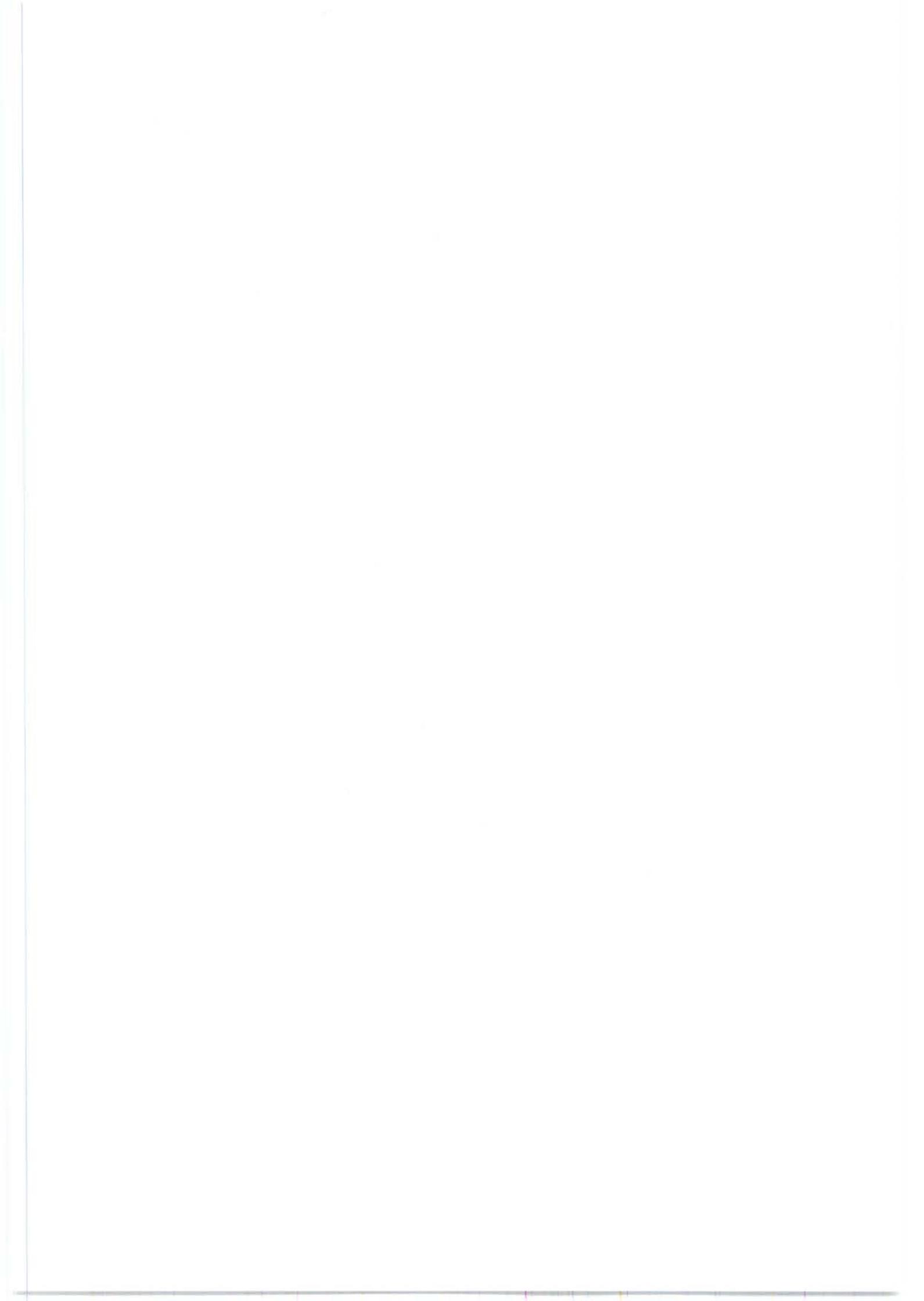


Avant-propos

Les systèmes moléculaires organisés (SMO) par auto-assemblage présentent un intérêt fondamental d'un point de vue bio-physico-chimique.¹ D'autre part, de nombreuses applications technologiques font appel aux SMO de propriétés contrôlées. Différentes entités supramoléculaires « discrètes » permettent l'assemblage organisé que l'on qualifierait alors d'« étendu ». Les chaînes supramoléculaires, les monocouches ou films adsorbés, ainsi que les cristaux liquides ou différents solides peuvent servir d'exemples de systèmes étendus, respectivement, mono- bi- et tridimensionnels. Ce sont les interactions faibles telles que les liaisons hydrogène, les forces électrostatiques ou de van der Waals, qui régissent l'auto-organisation supramoléculaire. Le processus d'auto-organisation peut être décomposé en trois étapes : la reconnaissance moléculaire, la croissance de l'édifice supramoléculaire et la terminaison de l'auto-assemblage.²⁻⁴

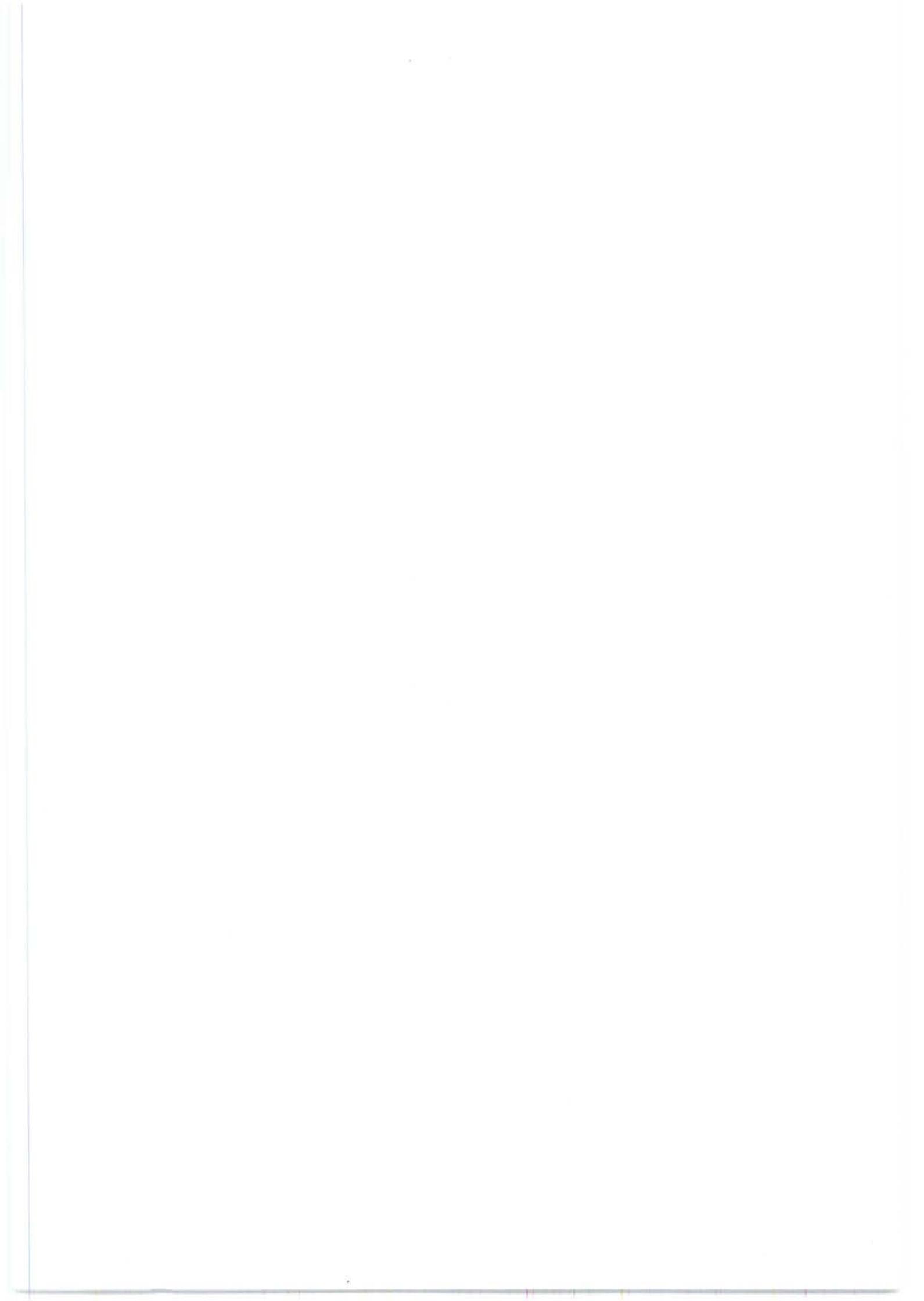
Le développement de nouveaux matériaux fonctionnels tels que, à titre d'exemple, les surfaces catalytiques, est un défi technologique.⁵ L'optimisation du rapport entre la qualité, le coût et la facilité d'obtention est à la base de la conception de tels matériaux. Différentes méthodes d'immobilisation de catalyseurs utilisées actuellement, à savoir le greffage par covalence ou encore l'encapsulation, sont souvent compliquées, longues, et parfois destructrices pour les composés que l'on souhaite immobiliser. Afin de pallier ces difficultés, nous avons envisagé une nouvelle approche d'immobilisation de molécules, basée sur l'auto-assemblage d'une protéine fongique, l'hydrophobine,⁶⁻⁹ aux interfaces. Dans nos travaux nous démontrons que différentes molécules, aussi bien des enzymes que des molécules issues de la synthèse organique peuvent être immobilisées sur supports solides via l'hydrophobine. La préparation de surfaces fonctionnelles utilisant l'hydrophobine comme agent fixateur de molécules a nécessité une étude préalable du comportement de cette protéine en solution et aux interfaces. En effet, bien que l'affinité des hydrophobines pour différents types de surfaces ait été étudiée et démontrée depuis la découverte de ces protéines au début des années 90, son mécanisme est encore mal compris. En ce qui concerne les interactions entre les hydrophobines et d'autres molécules, aucune étude n'a été réalisée à ce jour.

Nos travaux apportent des renseignements fondamentaux sur les interactions de l'hydrophobine avec les interfaces et avec différentes molécules. Une meilleure compréhension de ces phénomènes nous a permis de développer des systèmes moléculaires fonctionnels, notamment catalytiques. Nous avons également démontré que ces systèmes représentent un intérêt pour le développement d'outils tels que les capteurs et les réacteurs.



INTRODUCTION

Les hydrophobines : protéines polyvalentes



1 - Développement des champignons filamenteux

Les hydrophobines, protéines d'une centaine d'acides aminés, découvertes au début des années 90,¹⁰⁻¹² sont nécessaires à la croissance et à la prolifération des champignons, en servant de médiateurs aux interfaces eau/air, hyphes/air et hyphes/support solide (Figure 1). En effet, lorsqu'elles sont secrétées en milieu aqueux, elles sont adsorbées préférentiellement à l'interface eau/air (Figure 1A et B), abaissant ainsi la tension interfaciale de l'eau ; ce qui permet aux hyphes hydrophiles de franchir plus facilement l'interface eau/air (Figure 1C). Les hyphes aériens sécrètent également les hydrophobines qui s'auto-assemblent sur les parois des cellules, rendant ces filaments mycéliens hydrophobes. L'agrégation des protéines au niveau des hyphes permet une stabilisation de ces structures dans l'air mais aussi leur adhésion à différentes surfaces minérales ou organiques, ce qui permet au mycélium de s'y développer (Figure 1D). Le mécanisme de sécrétion et d'agrégation des hydrophobines proposé ci-dessous est le résultat de nombreuses études réalisées depuis leur découverte.^{6, 13-16}

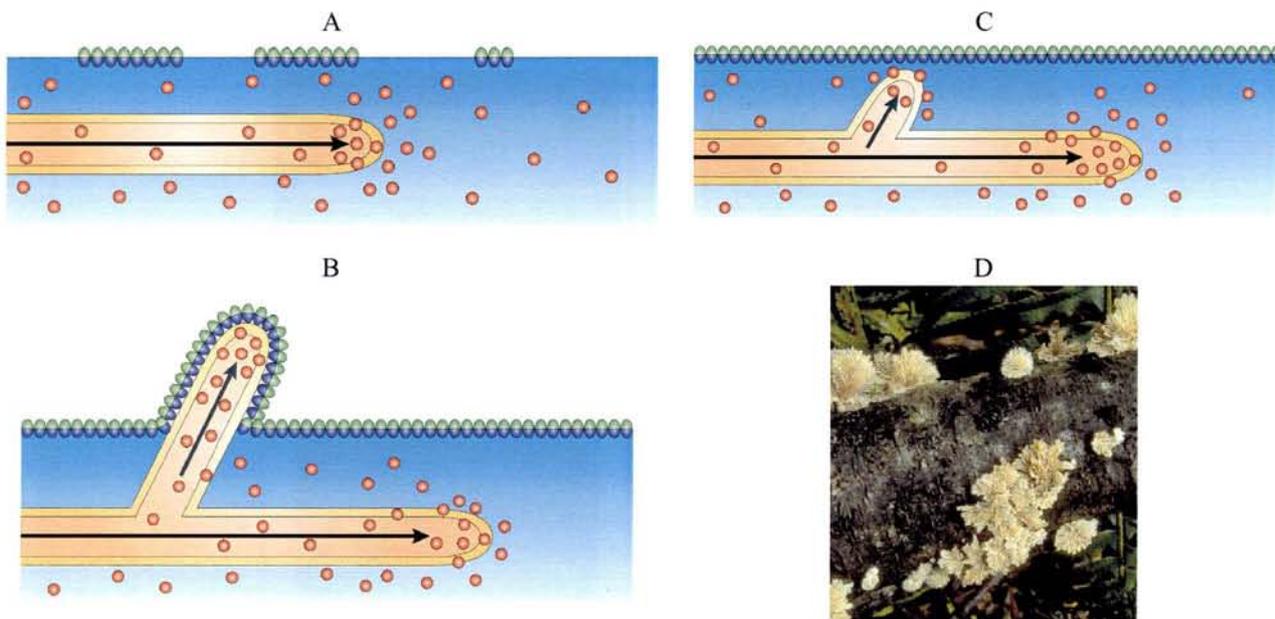


Figure 1. Développement des hyphes (A) en milieu aqueux, (B, C) à travers l'interface eau/air. (D) Colonie du champignon *Schizophyllum commune* sur tronc d'arbre. Les images A-C ont été tirées de la revue de Gebbink et collaborateurs.⁹

Les propriétés d'auto-assemblage des hydrophobines permettent d'envisager différentes applications de ces protéines. On peut remarquer qu'on met l'auto-assemblage des hydrophobines au profit de leur purification : la protéine est alors récoltée grâce à son adsorption sur des bulles de gaz, évitant ainsi la purification par chromatographie.

2 - Étapes d'excrétion et de purification de l'hydrophobine SC3

Les propriétés interfaciales de l'hydrophobine SC3 facilitent l'extraction de la protéine depuis le milieu de culture des champignons *Schizophyllum commune* et tout au long des étapes de purification. Chacune de ces étapes est détaillée ci-après. Notons que les procédés de production de la SC3 ont été breveté par l'entreprise BioMaDe Technology Foundation au sein de laquelle ont été prises les photographies des Figures 2 et 3.

Les mycéliums de *Schizophyllum commune* sont cultivés sur milieu MMP gélifié (1% d'extrait de malt, 0,5% de peptone mycologique, 1,5% d'agar) comme le montre la Figure 2A. Un quart de la culture est prélevé puis mixé dans 10 mL de milieu de culture minimum. Le mélange obtenu est réparti dans des erlenmeyers contenant chacun 1 L de milieu de culture minimum (Figure 2B). La culture est ensuite incubée à 37°C, sous agitation (Figure 2C). Ainsi, les cellules fongiques se développent et excrètent l'hydrophobine qui est alors solubilisée dans le milieu aqueux (Figure 2D).

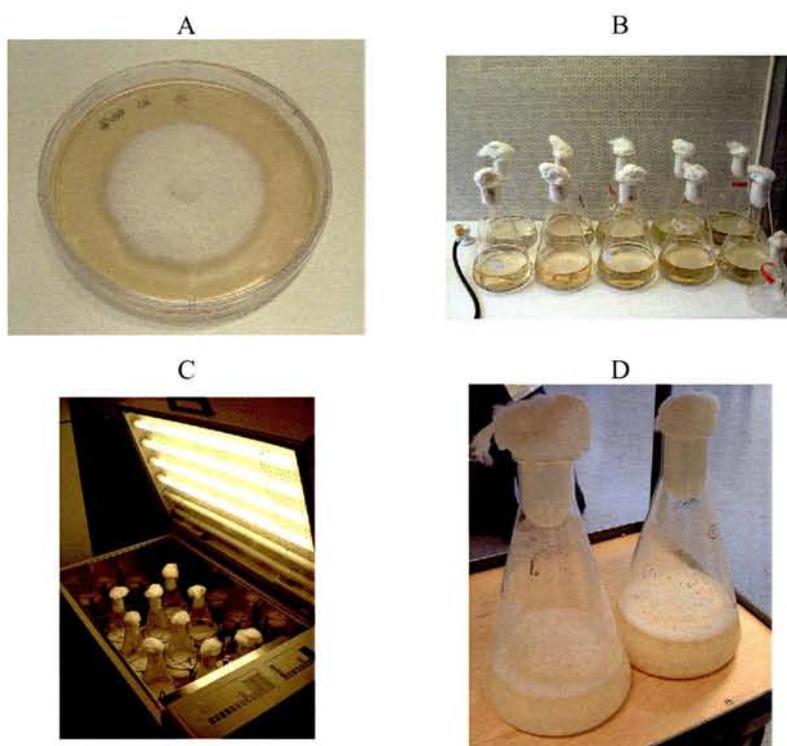


Figure 2. Cultures de *Schizophyllum commune*. (A) Culture développée sur la gélose et utilisée pour l'inoculation des cultures liquides. (B) Cultures en milieu liquide immédiatement après l'inoculation. (C) Incubation à 37°C sous agitation. (D) Cultures obtenues après deux jours d'incubation.

Les cultures obtenues après incubation sont filtrées sur une gaze en nylon (200 μm) pour n'en garder que la phase aqueuse contenant l'hydrophobine. On procède par la suite à la récupération de la protéine qui s'agrège aux interfaces entre le milieu aqueux et les bulles de dioxygène ou de dihydrogène. Ces bulles sont formées par électrolyse de l'eau contenue dans le milieu de culture (Figure 3).

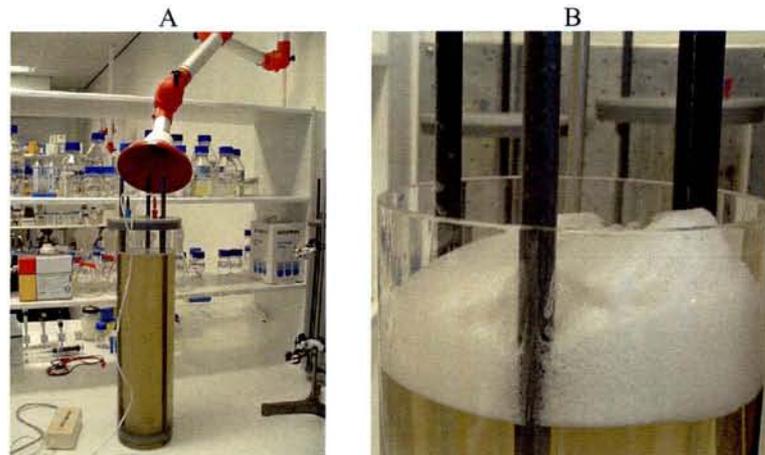


Figure 3. Électrolyse du milieu de culture au bout de (A) quelques minutes et (B) quelques heures.

La mousse formée est récupérée puis lyophilisée. La poudre obtenue contient l'hydrophobine sous forme insoluble dans l'eau. En effet, il faut savoir que les hydrophobines agrégées ne sont pas solubles dans l'eau. Toutefois, il est possible de transformer la protéine agrégée, insoluble, en protéine soluble par l'action de l'acide trifluoroacétique (TFA). Pour ce faire, l'hydrophobine est solubilisée dans le TFA pur à température ambiante. Le film formé sur les parois du récipient après évaporation du TFA est lavé à l'eau et l'éthanol, puis est lyophilisée. La pureté de l'échantillon obtenu est estimée par gel SDS-PAGE.

3 - Les différents travaux de recherche sur les hydrophobines

Les premières publications qui traitent des hydrophobines datent de 1991.¹⁰⁻¹² Depuis, environ 220 publications ont vu le jour (Figure 4) ; auxquelles s'ajoutent plus d'une vingtaine de brevets européens et internationaux, aussi bien sur la purification^{17, 18} que sur les applications technologiques potentielles¹⁹⁻²¹ de la protéine (Source : ScienceFinder[®]). La SC3, est de loin l'hydrophobine la plus étudiée. C'est une des protéines les plus tensioactives connues à ce jour¹³ et les structures auto-organisées qu'elle forme sont stables comparées à

celles d'autres hydrophobines comme HFBI et HFBII, toutes deux produites à partir des champignons *Trichoderma reesei*.²²

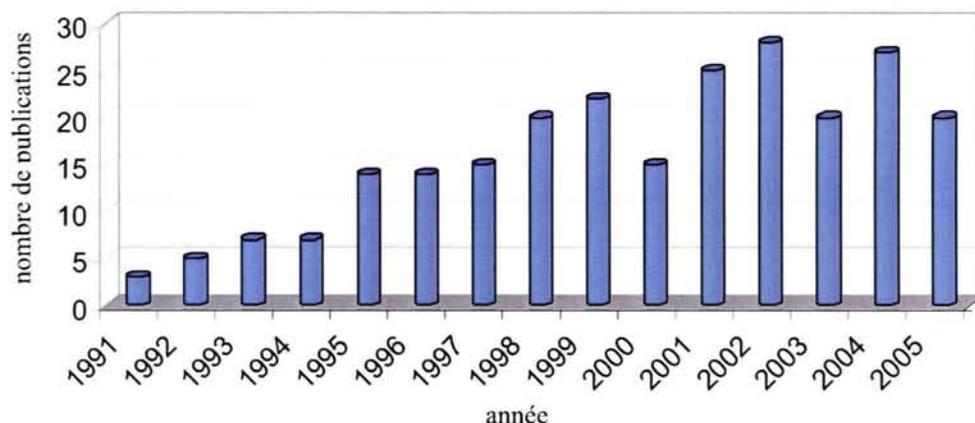


Figure 4. Répartition par année du nombre de publications traitant des hydrophobines.

Du fait de la complexité des interactions interprotéiques, la cristallisation des hydrophobines est très difficile à réaliser. Ce n'est que récemment que les premiers renseignements sur la structure tridimensionnelle des hydrophobines HFBII, HFBI et SC3 ont été respectivement obtenus par diffraction des rayons X,²³ microscopie à force atomique²⁴ et modélisation biomoléculaire.²⁵ En ce qui concerne l'hydrophobine SC3, toutes les études structurales complémentaires permettent à la fois de pallier le manque d'information concernant sa résolution 3D complète et de mieux comprendre les mécanismes de fonctionnement de la protéine dans un environnement donné. L'entreprise BioMaDe Technology Foundation, en partenariat avec d'autres laboratoires, travaille activement sur l'étude structurale des hydrophobines auto-assemblées à différentes interfaces ainsi que sur les applications technologiques à en bénéficier.²⁶ En effet, la possibilité qu'ont les hydrophobines d'adhérer à différentes surfaces et interfaces fait d'elle une molécule qu'on pourrait qualifier de polyvalente.

Les premières expériences concernant la fonctionnalisation de surfaces à l'aide de l'hydrophobine ont été réalisées récemment par notre groupe en collaboration avec le laboratoire de Chimie de l'Université de Varsovie (Pr Renata Bilewicz) et l'INRA de Nancy (D. R. Denis Tagu).²⁷ Ces travaux ont démontré qu'il était possible d'immobiliser de petites molécules électroactives tels les coenzymes Q0 et Q10 ainsi que l'azobenzène via l'hydrophobine HydPt1 du champignon *Pisolithus tinctorius*, et dont les gènes ont été

exprimés chez *Escherichia coli*. Par la suite, mes travaux de DEA sur l'immobilisation d'enzymes²⁸ ainsi que les études menées par A. van der Heyden sur l'immobilisation de calixarènes en utilisant l'hydrophobine SC3,²⁹ ont permis de généraliser nos méthodes d'obtention de surfaces catalytiques, et ce, en fonction de l'entité à immobiliser. Toutes nos études ont ainsi ouvert la voie à l'utilisation de la SC3 en tant qu'agent fixateur de molécules fonctionnelles pour la réalisation de diverses surfaces catalytiques, thème axial de cette recherche.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1 - Diffusion de lumière

La technique de diffusion de lumière permet d'obtenir la répartition en taille de particules en suspension dans un liquide pour des rayons hydrodynamiques allant de la dizaine de nanomètres à quelques micromètres. Ainsi, les tailles moyennes de la SC3 en solution aqueuse ont été déterminées en utilisant un spectromètre laser He-Ne de 35 mW et de longueur d'onde de 633 nm (Malvern Autosizer 4700, Royaume-Uni) en mesures dispersantes sous un angle incident de 90° et à la température de 25°C ; et ce en collaboration avec le Laboratoire de Thermodynamique et d'Analyse Chimique de l'Université de Metz. Le vecteur de diffraction q^{30} est quant à lui déterminé par l'Équation 1.

$$q = \left(\frac{4 \cdot \pi \cdot n}{\lambda} \right) \sin\left(\frac{\theta}{2}\right) \quad (1)$$

Où n est l'index de réfraction du milieu dans lequel les particules sont en suspensions (dans nos études : $n=1,332$. Indice de réfraction de l'eau à 25°C), λ la longueur d'onde et θ l'angle d'incidence du laser utilisé.

Les tailles des particules ont été mesurées à partir de la fonction d'auto-corrélation de la fluctuation d'intensité de la lumière diffusée. Ces mesures permettent dès lors d'obtenir le coefficient D de diffusion qui permet de calculer le rayon R_H hydrodynamique des particules en se basant sur l'équation de Stokes-Einstein qui suit.

$$D = \frac{k \cdot T}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot R_H} \quad (2)$$

Avec k , la constante de Boltzmann, T la température absolue et η la viscosité de la phase continue. Dans notre cas, $\eta = 8,9 \cdot 10^{-4}$ Pa.s pour l'eau à 25°C.

Les résultats de spectroscopie à corrélation de photons ont été par la suite analysés en utilisant un programme standard permettant l'obtention de la valeur moyenne Z ou par la méthode CONTIN.^{31, 32}

Avant chaque mesure, la solution protéique étudiée a été filtrée à l'aide d'un filtre Millipore.

2 - Dichroïsme circulaire

Le dichroïsme circulaire est une méthode de choix pour déterminer le taux de structures secondaires telles que les hélices α et les feuillets β dans les protéines.³³ Cette technique repose sur l'absorption différentielle de deux composantes circulaires d'une lumière polarisée (dichroïsme) par les molécules chirales en solution. La différence observée dépend de la longueur d'onde λ incidente. Dans le cas des peptides et des protéines, la chiralité des molécules est due à la chiralité des acides aminés individuels mais aussi à leur agencement spatial. Les spectres UV du dichroïsme sont ainsi caractéristiques des conformations des protéines. Cette méthode est basée sur une équation empirique (Équation 3).³⁴

La différence d'absorption ΔA entre l'absorbance du milieu pour la polarisation gauche (A_G) et celle pour la polarisation droite (A_D), déterminée à l'aide d'un spectropolarimètre, donne accès à l'ellipticité molaire moyenne par résidu ($[\theta]_{MRW}$) selon la relation suivante :

$$[\theta]_{MRW} = \frac{4,5 \cdot 10^3}{\pi} \cdot \ln(10) \cdot \frac{M \cdot \Delta A}{l \cdot c \cdot n} \quad (3)$$

Avec M , la masse molaire exprimée en Da de la protéine étudiée ; l , est le chemin optique exprimé en cm ; c , la concentration en mg.mL⁻¹ et n , le nombre d'acides aminés constituant la protéine. $[\theta]_{MRW}$ est alors exprimé en deg.cm².dmol⁻¹. MRW pour Mean Residue Weight ellipticity.

La courbe d'équation $[\theta]_{MRW} = f(\lambda)$ est appelé spectre de dichroïsme.

Les spectres de dichroïsme ont été obtenus à partir d'un spectropolarimètre de type Jasco J-715 (Jasco, Japon) permettant l'utilisation de cuves de quartz de 1 mm d'épaisseur. La région spectrale balayée par le spectropolarimètre a été comprise entre 185 et 260 nm (l'ultraviolet lointain, domaine d'absorption des liaisons peptidiques chirales).

3 - Phénomènes interfaciaux : interface eau/air

3.a - Notion de tension superficielle

La tension interfaciale est définie comme étant la force exercée à l'interface de deux milieux (solide/air, liquide/liquide, air/liquide, par exemple). Dans nos études, nous ne nous sommes particulièrement intéressés à la tension de l'interface eau/air autrement appelée tension superficielle (γ). Celle-ci est définie comme étant le travail requis pour créer une unité d'aire (Équation 4). Elle est alors exprimée en $J.m^{-2}$.

$$\delta W = \gamma \cdot dA \quad (4)$$

Or, d'après la première loi de la thermodynamique :

$$dU = \delta Q + \delta W_{Total} \quad (5)$$

Où U représente l'énergie libre du système ; Q , la quantité de chaleur et W_{Total} , le travail de toutes les forces s'exerçant sur le système.

$$\delta Q_{rev} = T \cdot dS \quad (6)$$

$$\delta W_{Total} = -P \cdot dV + \gamma \cdot dA \quad (7)$$

Ainsi, d'après l'Équation 5, on obtient :

$$dU = T \cdot dS - P \cdot dV + \gamma \cdot dA \quad (8)$$

Sachant que l'énergie interne est liée à l'énergie libre de Gibbs par la relation :

$$G = H - T \cdot S \quad (9)$$

Avec :

$$H = U + P \cdot V \quad (10)$$

On obtient alors :

$$dG = dU + P \cdot dV + V \cdot dP - T \cdot dS - S \cdot dT \quad (11)$$

En remplaçant l'expression de dU de l'Équation 8 dans l'Équation 11, on obtient la relation liant l'énergie libre de Gibbs à la tension superficielle dans le cas d'un système réversible (Équation 12).

$$dG = \gamma \cdot dA + V \cdot dP - S \cdot dT \quad (12)$$

Ainsi, pour un travail réversible à pression et température constantes, on a :

$$\left(\frac{\partial G}{\partial A} \right)_{P,T} = \gamma \quad (13)$$

Il est à noter que la relation 13 traduit le fait que la tension superficielle correspond à la dérivée partielle de l'énergie libre de Gibbs par rapport à l'aire moléculaire.

3.b - Adsorption des molécules amphiphiles à l'interface eau/air

Les molécules amphiphiles dissoutes dans l'eau s'adsorbent aux interfaces afin de minimiser l'énergie totale du système. L'adsorption des molécules amphiphiles à l'interface eau/air entraîne la diminution de la tension superficielle. La partie hydrophobe des molécules est alors orientée vers l'air et la partie hydrophile, dans l'eau. Le processus d'adsorption des molécules amphiphiles à l'interface eau/air peut être suivi par différentes méthodes. La technique couramment utilisée est celle de la lame de Wilhelmy. Ce dernier démontra au début du XIX^e siècle que la force exercée au centre de gravité d'une lame de longueur et d'épaisseur définies, lorsqu'elle est placée à l'interface liquide/air, est directement liée à la tension superficielle comme le montre la relation 14.

$$\vec{\gamma} = F \int_0^x x \cdot dx \quad (14)$$

Dans ce cas, la tension superficielle s'exerçant sur cette lame d'épaisseur e et de longueur L , et donc de périmètre $2(L+e)$, est :

$$\vec{\gamma} = 2 \cdot F \cdot (L + e) \quad (15)$$

La composante verticale de γ est alors :

$$\gamma = 2 \cdot F \cdot (L + e) \cdot \cos(\theta) \quad (16)$$

Avec F la résultante horizontale de la force exercée sur la lame de Wilhelmy et θ l'angle de mouillabilité de la lame par l'eau.

Dans nos études, nous avons utilisé une lame de platine qui, en contact avec l'eau, est totalement mouillée ($\theta \sim 0$). Par ailleurs, l'épaisseur de la lame est négligeable par rapport à sa longueur. Ainsi, l'Equation 16 peut être simplifiée de la manière suivante :

$$\gamma = 2 \cdot F \cdot L \quad (17)$$

Dans le cas des films adsorbés à l'interface eau/air, l'évolution de la tension superficielle au cours du temps donne accès aux cinétiques d'adsorption. La tension superficielle diminuant avec la concentration surfacique à l'interface eau/air, un équilibre thermodynamique est atteint lorsque cette interface est saturée en molécules amphiphiles. En faisant varier la concentration des molécules amphiphiles solubilisées, il est possible d'obtenir ainsi différentes cinétiques d'adsorption et donc de pouvoir établir une isotherme d'adsorption, autrement appelée isotherme de Gibbs. Cette isotherme correspond à la représentation graphique de la tension de surface obtenue à l'équilibre thermodynamique en fonction du logarithme de la concentration en SC3 exprimée en mg.mL^{-1} .³⁵

3.c - Pression de surface et films de Langmuir

Les molécules amphiphiles insolubles dans l'eau forment, à l'interface eau/air, des films d'épaisseur donnée et dont l'état (gazeux, liquide, solide par analogie aux diagrammes thermodynamiques Pression-Volume) peut être modifié en fonction de leur compression.³⁶ On définit la pression de surface Π comme étant la différence entre la tension superficielle du liquide pure et celle du liquide recouvert par un film moléculaire (Equation 18).

$$\Pi = \gamma_0 - \gamma \quad (18)$$

À 20°C, γ_0 de l'eau vaut 72,5 mN.m^{-1} pour une eau pure. La méthode de Wilhelmy associée à une balance de Langmuir permet de suivre l'évolution de la pression de surface en fonction de l'aire occupée par molécule amphiphile à l'interface eau/air. On obtient alors une isotherme de compression (Figure 5).

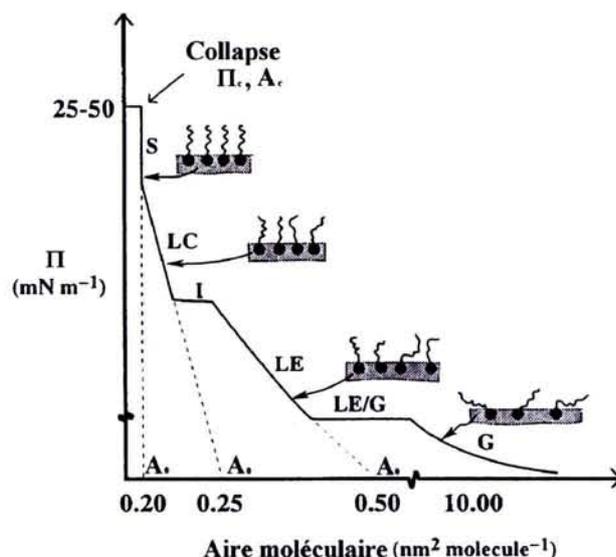


Figure 5. Isotherme de compression idéalisée.³⁵ G : phase gazeuse. LE/G et I : transition de phase. LE : phase liquide expansée. LC : phase liquide condensée. S : phase solide. A_c : aire moléculaire au point de collapse. A_0 : aire moléculaire de la phase considérée, extrapolée à $\Pi = 0$ mN/m.

Les molécules amphiphiles, solubilisées dans un solvant organique volatil et non miscible à l'eau (exemple : le chloroforme), sont déposées à l'interface eau/air en phase gazeuse. Les molécules sont assez distantes les unes des autres pour qu'il n'y ait aucune interaction entre elles. Elles forment alors un réseau bidimensionnel dont un des axes varie au cours de la compression. La balance de Langmuir est constituée d'une cuve en Téflon[®] surmontée de deux barrières mobiles (Figure 6) dont le rapprochement unidirectionnel permet de connaître à tout moment l'aire occupée par molécule, connaissant la quantité de molécules déposées. La lame de Wilhelmy, placée entre ces deux barrières à l'interface eau/lipide/air, permet de mesurer, en fonction de l'aire moléculaire, la pression de surface Π du film, selon l'Équation 18.

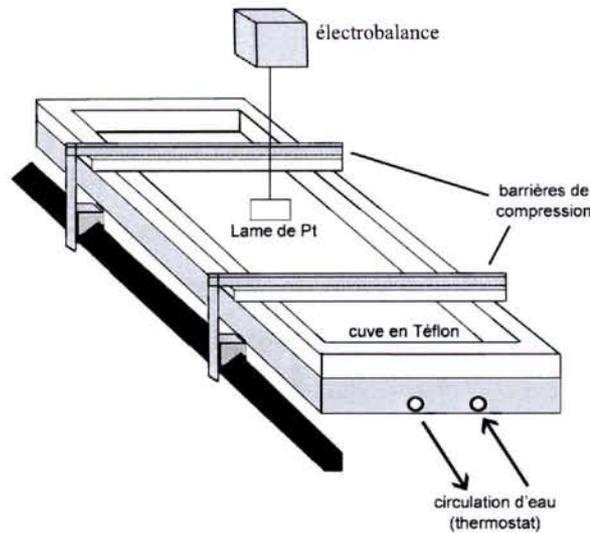


Figure 6. Représentation schématique d'une balance de Langmuir.

Les isothermes de compression sont réalisées à température constante mais également à nombre de moles et pression atmosphérique constants afin de respecter les conditions de l'Équation 13. Lorsque le film monomoléculaire est comprimé, la pression de surface mesurée évolue en fonction de la nature des molécules le constituant le film et du type des interactions intermoléculaires impliquées. Ainsi, l'isotherme de compression caractérise le composé amphiphile étudié. À partir de celle-ci, il est possible de suivre l'évolution des phases et/ou des transitions de phase lors de la compression mais il est aussi possible de déterminer des paramètres classiques tels que le décollage, le collapse et le module de compressibilité du film. Le décollage correspond à la valeur de l'aire moléculaire pour laquelle la pression de surface n'est plus nulle. Le collapse est le point où le film monomoléculaire est désorganisé avec formation d'agrégats tridimensionnels. Le collapse se traduit par une discontinuité dans l'évolution croissante de $\Pi=f(A)$ lorsque l'aire moléculaire A diminue. Ainsi, au point de collapse, la dérivée $d\Pi/dA$ passe par un minimum pour $A = A_{\text{collapse}}$. Cette dernière permet de connaître la pression correspondante appelée Π_{collapse} . La compressibilité du film (C_s) caractérise la rigidité du film. Elle est définie par l'équation suivante.

$$C_s = -\frac{1}{A} \cdot \left(\frac{dA}{d\Pi} \right) \quad (19)$$

L'inverse de la compressibilité du film (C_s^{-1}), aussi appelé module de compressibilité, est le paramètre le plus fréquemment utilisé pour décrire la rigidité d'un film moléculaire. En

général, le Cs^{-1} d'un film est déterminé à son point de compression maximale, c'est à dire au point de collapse.

De nombreuses méthodes sont utilisées pour étudier la structure des films moléculaires étalés à l'interface eau/air. Nous nous sommes particulièrement intéressés à la mesure du potentiel de surface, à la microscopie à angle de Brewster, à la diffraction des rayons X sous incidence rasante ainsi qu'à la spectroscopie infrarouge de réflexion-absorption.

3.d - Potentiel de surface

La technique de mesure du potentiel de surface la plus utilisée est celle faisant appel à la sonde vibrante de Kelvin. Elle fut initialement développée pour mesurer les différences de potentiel de contact entre des matériaux conducteurs.³⁷ Pour des mesures à l'interface eau/air, l'électrode vibrante métallique est située à environ 2 mm au dessus de la sous-phase aqueuse dans laquelle est plongée une contre-électrode (Figure 7). Avec V_0 le potentiel à la surface de l'eau pure et V_M celui à la surface de l'eau recouverte d'un film moléculaire, on mesure la différence de potentiel $\Delta V = V_M - V_0$. En considérant la contre-électrode et l'électrode vibrante comme étant les armatures d'un condensateur électrique, ΔV modifie la capacité (C) entre l'interface et l'électrode vibrante. L'électrode vibrante permet de moduler la valeur de C qui est fonction de l'état du film moléculaire en générant un courant alternatif i défini comme suit.

$$i = \Delta V \cdot \frac{dC}{dt} \quad (20)$$

Afin d'annuler l'intensité du courant traversant la résistance (R) aux bornes de laquelle est générée une tension alternative mesurée par le détecteur de phase sensitive (PSD), une tension $-V$ est générée aux bornes de la contre-électrode. La valeur absolue de cette tension est appelée potentiel de surface ΔV .³⁸

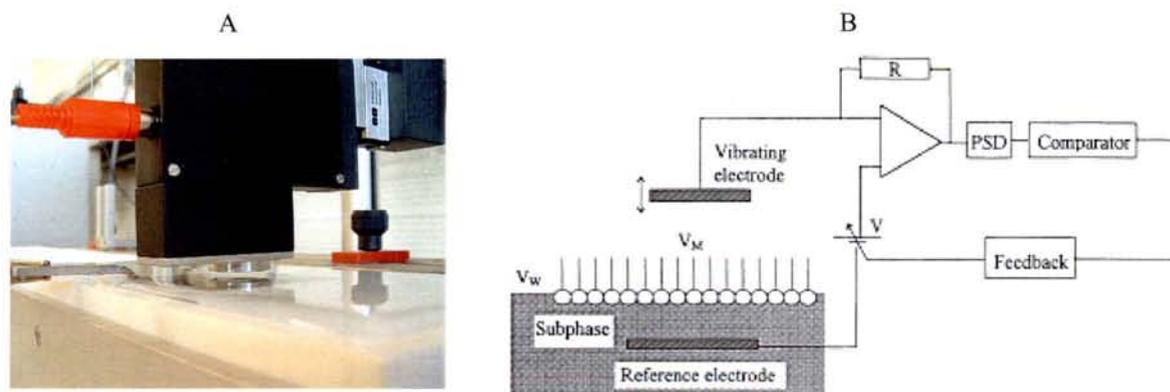


Figure 7. Montage expérimental permettant la mesure du potentiel de surface à l'interface eau/air. (A) Photographie de l'appareil de mesure. (B) Représentation schématique du dispositif de mesure de ΔV d'après Taylor.³⁸

Selon la théorie de Helmholtz, la monocouche peut être assimilée à un assemblage de dipôles moléculaires qui contribuent, chacun de manière uniforme, à la polarisation du film étalé. Par analogie avec le condensateur à armatures parallèles, ΔV est alors lié à l'aire moléculaire (A) par la relation suivante :

$$\Delta V = \frac{\mu_{\perp}}{\epsilon_0 \cdot A} \quad (21)$$

Où μ_{\perp} est le moment dipolaire effectif dont la direction est parallèle à la normale de la surface et ϵ_0 , la permittivité du vide ($\epsilon_0 = 8,85 \times 10^{-12} \text{ J}^{-1} \cdot \text{C}^2 \cdot \text{m}^{-1}$).

On s'aperçoit que le potentiel augmente avec μ_{\perp} mais aussi au cours de la compression. Ainsi, à compression constante, le potentiel de surface mesuré à l'interface eau/air permet d'estimer l'orientation des molécules possédant un moment dipolaire non nul, ainsi que les interactions intermoléculaires mises en jeu. Selon le modèle de double couche de Vogel-Möbius,^{39, 40} le moment dipolaire effectif est la somme de la contribution des moments dipolaires des têtes polaires (μ_P) et des chaînes hydrophobes (μ_{NP}) comme l'indiquent l'Équation 22 et la Figure 8.

$$\mu_{\perp} = \mu_P + \mu_{NP} \quad (22)$$

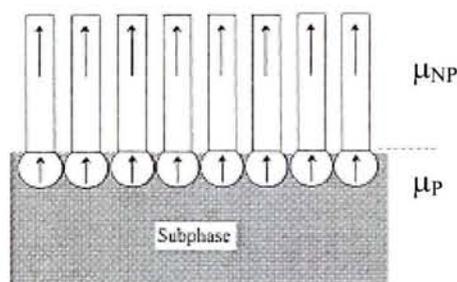


Figure 8. Représentation schématique du modèle de double couche de Vogel-Möbius d'un film moléculaire étalé à l'interface eau/air.

Dans le cas des études des monocouches à l'interface eau/air, le potentiel de surface semble être un outil de choix notamment pour la détermination de l'orientation des chaînes alkyles par rapport au plan d'eau. La mesure de ΔV au cours de la compression peut également permettre de mettre en évidence des transitions de phase qui ne seraient pas perceptibles par la mesure de la pression de surface.

La tête de potentiel (SPOT1, KSV, Finlande) utilisée pour ces mesures est munie d'une sonde vibrante de 17 mm de diamètre. Les deux électrodes sont en acier inoxydable. Pour nos mesures la fréquence de vibration de l'électrode de mesure était de 153,3 Hz.

3.e - Microscopie à angle de Brewster

Le fonctionnement de la microscopie à angle de Brewster (BAM), développée indépendamment par l'équipe de Jacques Meunier^{41, 42} et celle de Dietmar Möbius,⁴³ est basé sur le principe de réfringence, à l'interface eau/air, d'un faisceau monochromatique *p*-polarisé (Figure 9).

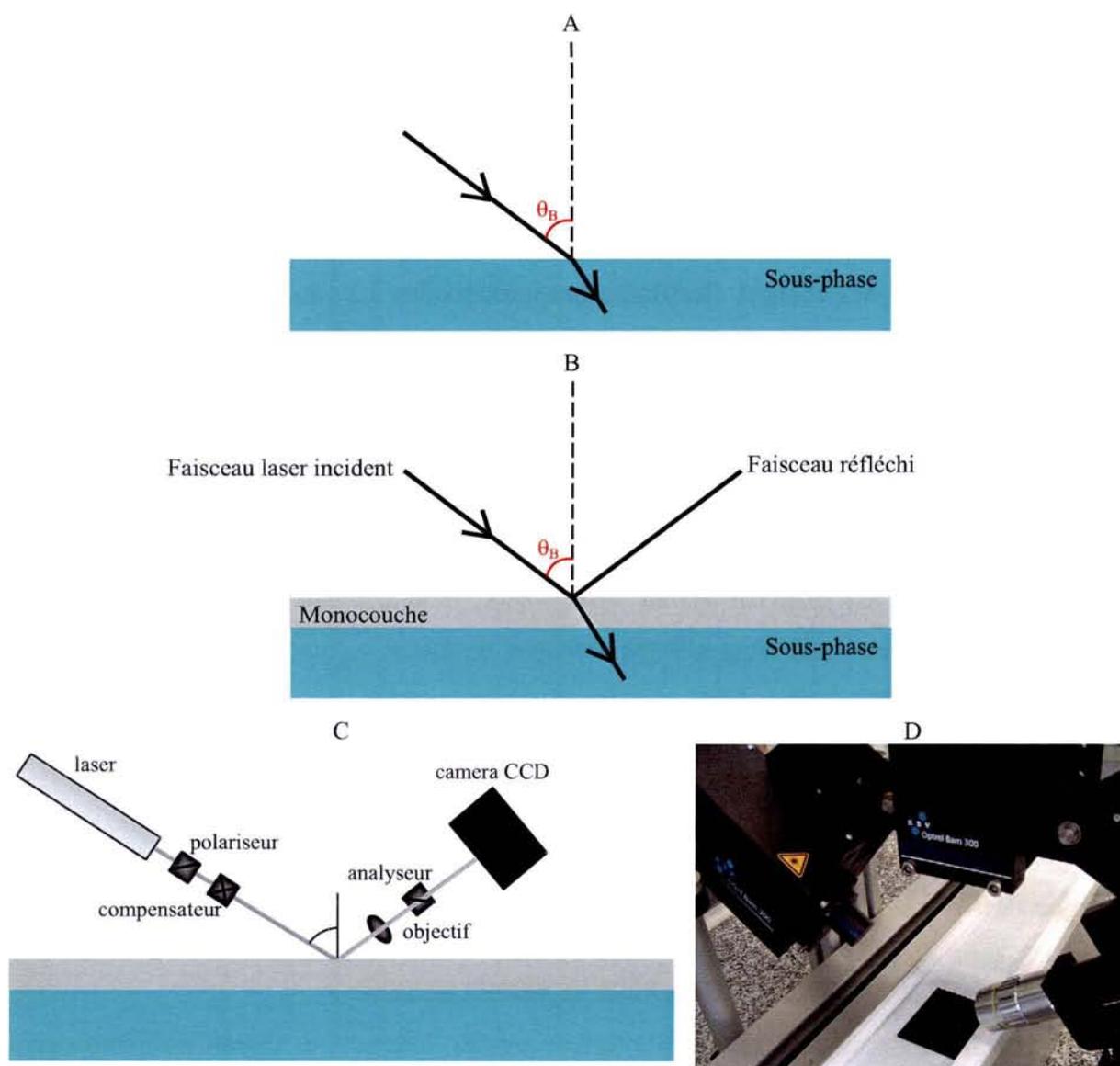


Figure 9. Microscopie à angle de Brewster. (A) Condition de Brewster à l'interface eau/air. (B) Réflexion du faisceau incident due à la présence du film monomoléculaire étalé à l'interface. (C et D) Emission et traitement du signal diffracté par caméra CCD.

La lumière *p*-polarisée n'est pas réfléchiée à une interface homogène et propre lorsqu'elle y arrive sous un angle incident θ_B appelé angle de Brewster (Figure 9A). Cet angle vaut $\sim 53^\circ$ pour l'interface eau/air. Des diélectriques tels que les molécules amphiphiles, placés à cette interface, modifient la condition de Brewster ; d'où une réflexion de la lumière (Figure 9B). En effet, à l'angle de Brewster, l'intensité relative du faisceau réfléchi (I) est proportionnelle au carré de l'épaisseur du film moléculaire (d) comme l'indique l'Équation 23.

$$I = |R_p|^2 = \alpha \cdot d^2 \quad (23)$$

Où R_p est la composante dans le plan d'incidence de la lumière réfléchiée et α , un coefficient de proportionnalité.

Un dispositif à transfert de charges (caméra CCD), sensible à l'intensité de la lumière réfléchiée, enregistre des charges électriques proportionnelles à la quantité de lumière reçue (Figure 9C et D). Ces charges sont traduites en code monochrome. Ainsi, le contraste des images BAM est observé lorsqu'il y a des différences locales d'indice de réfraction dues à des différences de densité moléculaire locale, ou d'entassement des molécules. Typiquement, l'intensité du faisceau réfléchi correspond au millionième de l'intensité incidente. La lumière réfléchiée permet d'obtenir une image de fort contraste de la morphologie latérale de la monocouche étalée à l'interface eau/air. Ainsi, cette technique adaptée à la technique de Langmuir permet, grâce aux images BAM obtenues, de mettre en évidence le changement de morphologie d'un film moléculaire au cours de sa compression ou encore au cours de sa dégradation à l'aide d'enzymes par exemple.⁴⁴

Le BAM (*Optrel* BAM300, KSV, Finlande) utilisé pour ces études est équipé d'un laser de 10 mW à la longueur d'onde de 632,8 nm.

3.f - Diffraction des rayons X sous incidence rasante

Les films lipidiques étalés à l'interface eau/air forment un réseau bidimensionnel ordonné ; il est donc possible d'en étudier les paramètres de maille par analyse aux rayons X. Pour ce faire, la technique de diffraction des rayons X sous incidence rasante (GIXD), avec une résolution de l'ordre de l'angström, peut être envisagée.

Les expériences GIXD ont été réalisées en utilisant le diffractomètre liquide-surface de la plateforme BW1 de HASYLAB au DESY de Hambourg (Allemagne). Un faisceau monochromatique de synchrotron arrive à l'interface eau/air sous un angle d'incidence $\alpha_i = 0,85\alpha_c$, où α_c est l'angle critique avec le quel on obtient une réflexion totale. Pour l'interface eau/air, la valeur de α_c est de $0,13^\circ$. Ainsi, l'onde évanescente résultante pénètre environ 5 nm (comparable à l'épaisseur d'un film monomoléculaire) sous la surface et est diffractée par la structure interne de la monocouche comme le montre la Figure 10. Ainsi la diffraction des rayons X sous incidence rasante a l'avantage de donner un signal qui provient uniquement de la monocouche, sans contribution de la sous-phase.

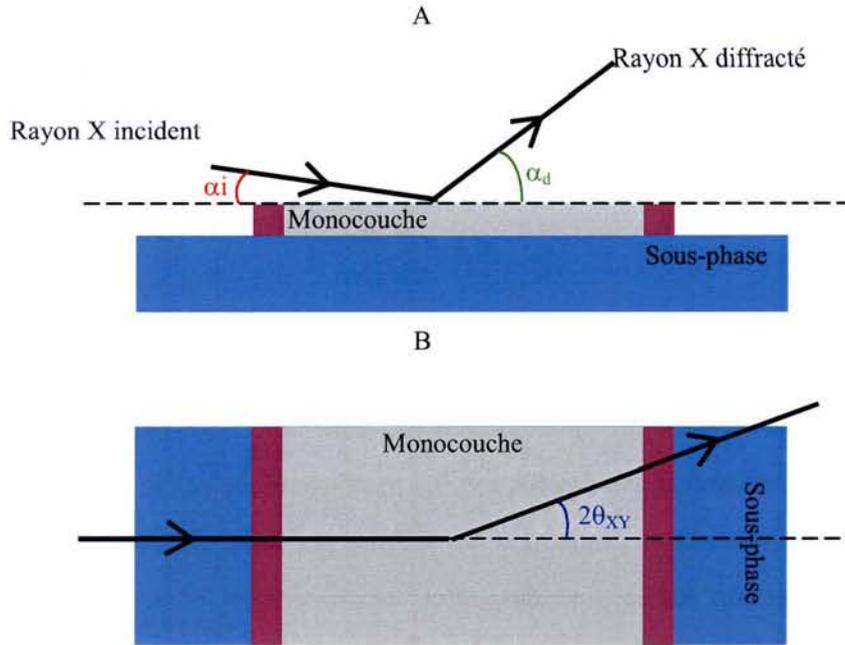


Figure 10. Diffraction des rayons X sous incidence rasante. (A) Vue de face. (B) Vue du dessus.

Un détecteur permet de mesurer les intensités des rayons diffractés par le réseau bidimensionnel. Ces intensités dépendent de l'angle vertical de diffusion α_d . Selon la structure du réseau formé par les molécules amphiphiles, le vecteur de diffusion Q peut être alors décomposé en deux termes : une composante horizontale Q_{XY} contenue dans le plan de l'interface et une composante verticale Q_Z hors du plan. Elles sont définies par les Équations 24 et 25.

$$Q_{XY} = \frac{2 \cdot \pi}{\lambda} \cdot \left[[\cos(\alpha_i)]^2 + \cos^2 \alpha_d - 2 \cdot \cos(\alpha_i) \cdot \cos(\alpha_d) \cdot \cos(2\theta) \right]^{1/2} \quad (24)$$

$$Q_Z = \frac{2 \cdot \pi}{\lambda} \cdot [\sin(\alpha_i) + \sin(\alpha_d)] \quad (25)$$

Lorsque $\alpha_i \ll \alpha_d$, on obtient alors :

$$Q_{XY} \approx \frac{4 \cdot \pi}{\lambda} \cdot \sin\left(\frac{2 \cdot \theta_{XY}}{2}\right) \quad (26)$$

et

$$Q_Z \approx \frac{2 \cdot \pi}{\lambda} \cdot \sin(\alpha_d) \quad (27)$$

Lorsqu'un film monomoléculaire forme un réseau orthorhombique, on obtient deux pics de Bragg. La composante horizontale du vecteur de diffusion renseigne sur l'espacement de la maille (Équation 28) et ainsi sur la nature du réseau bidimensionnel.^{45, 46}

$$d_{hk} = \frac{2 \cdot \pi}{Q_{XY}} \quad (28)$$

h et k étant les indices de Miller indiquant l'ordre de la diffraction.

En effet, en utilisant un ajustement lorentzien de la courbe d'intensité représentant Q_{XY} , il est possible d'obtenir avec précision les paramètres de maille (a , b , γ) représentés sur la Figure 11A. Ces paramètres donnent accès à l'aire par unité de maille (A_{XY}) qui correspond à l'aire de la projection sur le plan de l'interface de la chaîne latérale lipidique à laquelle s'ajoute l'aire de la tête polaire.

$$A_{XY} = a \cdot b \cdot \sin(\gamma) \quad (29)$$

Les informations sur l'angle t formé entre la normale à l'interface et les chaînes alkyles, ainsi que sur l'angle azimutal Ψ correspondant à la direction des chaînes alkyles suivant le plan de l'interface, sont obtenues à partir de la composante Q_Z (Équation 30 et Figure 11B).

$$Q_Z^{hk} = Q_{XY}^{hk} \cdot \cos(\Psi_{hk}) \cdot \tan(t) \quad (30)$$

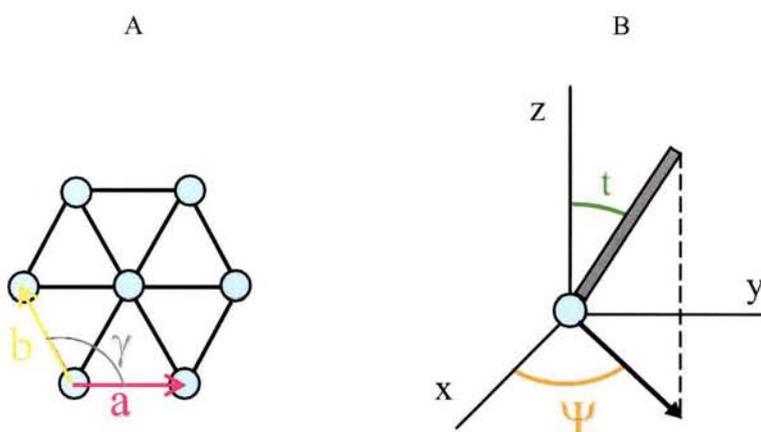


Figure 11. Représentation du réseau orthorhombique formé par les molécules amphiphiles à l'interface eau/air. (A) Unité de maille bidimensionnelle dans le plan d'eau. (B) Orientation dans l'espace d'une molécule amphiphile de la maille.

Ainsi, un ajustement gaussien de la courbe d'intensité représentant Q_z permet d'obtenir les valeurs de l'angle d'inclinaison t des chaînes alkyles ainsi que l'aire A_0 occupée par tête polaire, par extrapolation à $t=0^\circ$ comme l'indique l'Équation 31.

$$A_0 = A_{xy} \cdot \cos(t) \quad (31)$$

La technique GIXD permet donc de déterminer tous ces paramètres de maille à différents états de condensation du film moléculaire.

3.g - Spectroscopie infrarouge à l'interface eau/air

La spectroscopie infrarouge de réflexion-absorption (IRRAS) permet d'obtenir les nombres d'onde (σ) de vibration des groupements caractéristiques des molécules constituant un film moléculaire étalé à l'interface eau/air.^{47, 48} Par ailleurs, avec cette même technique, il est possible de connaître les nombres d'onde de vibration des groupements amides des peptides situés au voisinage de l'interface eau/air.⁴⁹ Selon des règles de sélection, certains groupements des molécules constitutives de la monocouche peuvent être excités par les rayons infrarouges incidents (Figure 12). Ainsi, différents modes peuvent caractériser la vibration des liaisons des groupements excités (Figure 13).

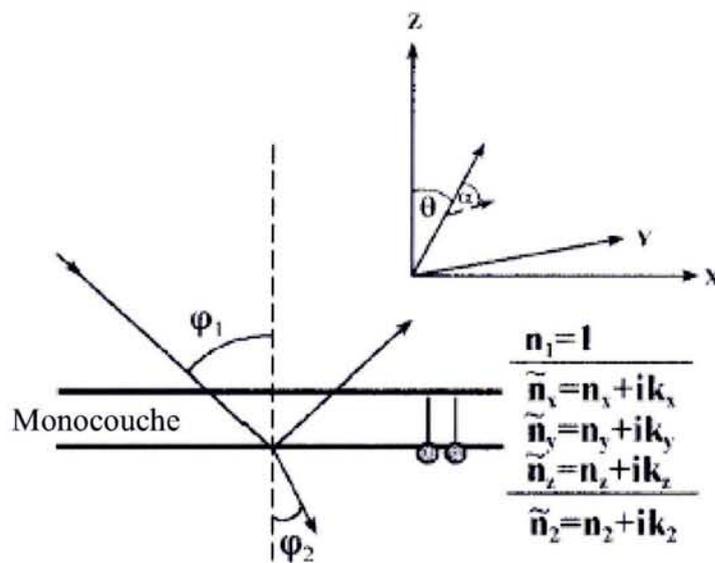


Figure 12. Représentation du principe de réflexion des rayons infrarouges à l'interface eau/air par une monocouche de molécules amphiphiles.

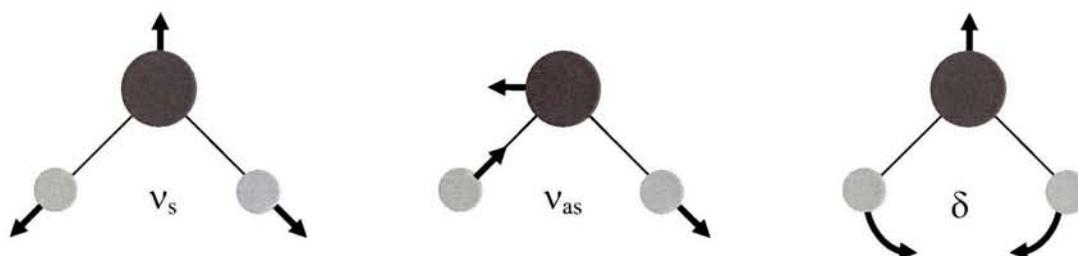


Figure 13. Les trois modes de vibration les plus étudiés par infrarouge ; cas d'une molécule triatomique : élongation symétrique (ν_s), élongation asymétrique (ν_{as}) et déformation (δ).

Chaque groupement excité absorbe une partie de l'intensité des rayons infrarouge à un nombre d'onde caractéristique dont la valeur dépend du mode et de la fréquence de vibration. En utilisant le modèle simplifié de l'oscillateur harmonique de la mécanique classique, chaque liaison excitée peut être assimilée à un ressort de raideur k et dont la fréquence propre de vibration ν est donnée par la loi de Hooke (Équation 32).

$$\nu = \frac{1}{2 \cdot \pi} \cdot \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad (32)$$

Avec μ , la masse réduite du groupement d'atomes.

On a alors :

$$\sigma = \frac{\nu}{c} \quad (33)$$

Avec c , la célérité de la lumière ($\sim 3 \times 10^8 \text{ m.s}^{-1}$).

La position en cm^{-1} des pics d'absorption obtenus par cette technique est donc fonction de l'état conformationnel, de l'orientation des molécules constituant le film mais aussi des interactions intra- et intermoléculaires. À partir de la position des bandes d'adsorption correspondant aux groupements peptidiques amides (bandes amide), il est possible de déduire la structure secondaire des peptides en interaction avec le film ou adsorbés à l'interface eau/air.⁴⁷ De plus, la variation de l'angle d'incidence par la méthode IRRAS permet de déterminer l'orientation des molécules du film ; et ce, via l'orientation de leur moment dipolaire de transition (Figure 12). En effet, le sens et l'intensité des pics d'absorption des spectres IRRAS sont gouvernés par des règles de sélection qui dépendent de l'orientation du moment dipolaire de transition des molécules organisées à l'interface. Ainsi, Blaudez et ses collaborateurs ont démontré que, pour un angle d'incidence de 75° , un moment dipolaire de transition situé dans le plan de l'interface eau/air entraîne l'apparition d'un pic d'absorption

positif par rapport à la ligne de base alors qu'un moment dipolaire de transition perpendiculaire à l'interface entraîne l'apparition un pic d'absorption négatif.⁵⁰⁻⁵²

Notons que les bandes amide sont classifiées en trois régions distinctes : bandes amide I, II et III respectivement situées entre 1700 et 1600 cm^{-1} , 1600 et 1500 cm^{-1} , et entre 1300 et 1200 cm^{-1} .

Pour les expériences IRRAS, la cuve est divisée en deux compartiments. L'un est rempli d'eau pure et sert de référence, l'autre contient la sous-phase aqueuse sur laquelle a été étalé le film à étudier. Les deux cuves communiquent par un canal étroit qui permet d'obtenir, selon le principe des vases communicant, un niveau identique dans les deux compartiments. Les spectres obtenus à partir du compartiment de référence ont été soustraits des spectres de mesure. Ceci permet de s'abstraire des signaux dus à la présence de vapeurs d'eau dont le pourcentage est maintenu constant dans une enceinte hermétiquement fermée. Chaque spectre a été enregistré au bout d'une dizaine de minutes, après 200 acquisitions. La résolution spectrale est de 8 cm^{-1} . Les spectres IRRAS présentés dans ce mémoire n'ont nécessité ni de correction de ligne de base, ni d'un lissage.

L'appareille IRRAS est équipé d'un spectromètre infrarouge IFS 66 à transformé de Fourier (Bruker, Allemagne). L'angle d'incidence du faisceau infrarouge polarisé par BaF_2 dans le plan d'incidence (*p*-polarisé) et perpendiculairement à ce plan (*s*-polarisé) a été de 32, 40 ou 62°. Dans le cas du faisceau IR *p*-polarisé, les angles d'incidence θ inférieurs et supérieurs à θ_B , permettent d'obtenir respectivement des pics d'absorption IR négatifs et positifs.⁵³

Coupler la technique IRRAS à la technique des films de Langmuir permet d'accéder à la conformation des molécules en fonction de l'état de condensation du film.

4 - Mesure d'angle de contact

La technique de mesure des angles de contact rend compte de l'aptitude d'un liquide à s'étaler ou non sur une surface solide par analyse de l'angle obtenu après dépôt du liquide sur la dite surface (Figure 14). Lorsque ce liquide est l'eau, il est possible d'en déduire la nature hydrophile/hydrophobe des surfaces. Ainsi, plus l'angle de contact formé entre la goutte d'eau déposée et la surface est obtus, plus la surface est hydrophobe et réciproquement, plus l'angle est aigu, plus la surface est hydrophile. Dans le premier cas, on dit que le liquide mouille la surface avec laquelle il est en contact (Figure 14A). Dans le second cas, on dit qu'il ne mouille pas la surface (Figure 14B). Par convention, l'angle critique qui permet de discriminer les surfaces hydrophiles de celles qui ne le sont pas est voisin de 90° .



Figure 14. (A) Représentation d'une surface hydrophile mouillée par une goutte d'eau : $\theta < 90^\circ$. (B) Dispositif expérimental de mesure des angles de contact.

Outre la possibilité de connaître la nature polaire ou apolaire d'une surface, les angles de contact donnent accès à l'énergie libre de surface. En effet, la forme adoptée par une goutte déposée sur un support solide est fonction de trois paramètres : les tensions interfaciales solide-liquide (γ_{SL}), liquide-vapeur (γ_{LV}) et solide-vapeur (γ_{SV}). La tension interfaciale γ_{SV} correspond à l'énergie de surface du matériau et γ_{LV} , à la tension superficielle du liquide en contact avec le matériau. Les trois paramètres précédemment cités sont régis par la relation de Young :

$$\gamma_{SL} - \gamma_{SV} + \gamma_{LV} \cdot \cos \theta = 0 \quad (34)$$

À partir de l'Équation 34, on s'aperçoit que plus l'énergie de surface d'un solide est faible, plus l'angle de contact formé par un liquide posé sur ce solide est élevé. En effet, un liquide s'étale sur un solide lorsque ce dernier possède une énergie de surface plus élevée que l'énergie de cohésion du liquide.

Seuls γ_{LV} et θ sont mesurables. Afin de pouvoir déterminer γ_{SL} et γ_{SV} , il est possible d'utiliser des modèles de calcul tels que ceux développés par Owens et Wendt⁵⁴ ainsi que ceux de van Oss et Good⁵⁵. Le principe repose alors sur l'utilisation de deux à trois liquides différents dont les composantes dispersives et non dispersives sont connues.

Les mesures d'angle de contact ont été réalisées dans le cadre de notre collaboration avec de BioMaDe Technology Foundation de Gröningen (Pays-Bas) et avec la participation du Laboratoire d'Études et de Recherche sur le Matériau Bois de Nancy.

Ces mesures nous ont été utiles pour la détermination des phénomènes physico-chimiques régissant les adsorptions protéique et enzymatiques sur les supports solides.

5 - Microscopie électronique et spectroscopie de pertes d'énergie

5.a - La microscopie électronique à transmission

La microscopie électronique à transmission (MET) permet la visualisation de matériaux déposés sur une grille de carbone amorphe, par transmission des électrons au travers du matériau.

Les expériences MET ont été effectuées aux Services Communs de Microscopies Électroniques de la Faculté des Sciences et de la Faculté de Médecine de Nancy. Elles ont été réalisées au moyen d'un microscope électronique à transmission Philips CM20 (Figure 15), couplé à un spectromètre de pertes d'énergie des électrons transmis. Les protéines ont été adsorbées sur film de carbone amorphe supporté par une grille de cuivre.

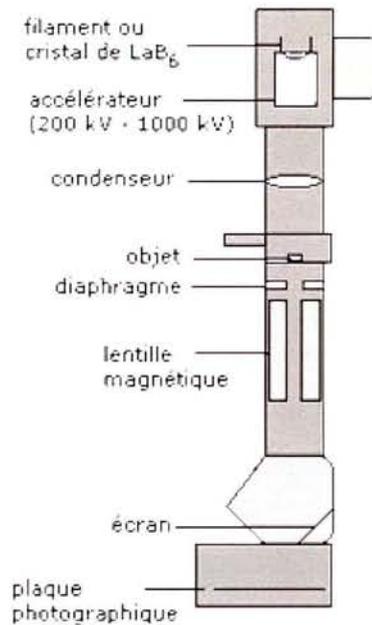


Figure 15. Dispositif de la microscopie électronique à transmission.

5.b - Spectroscopie de perte d'énergie des électrons transmis

À partir du spectromètre à perte d'énergie d'un microscope électronique de transmission, il est possible d'estimer l'épaisseur des échantillons déposés sur grille de carbone amorphe (GCA).⁵⁶ En effet, l'énergie des électrons transmis obtenue par la méthode dite EELS^{57,58} est liée à l'épaisseur de l'échantillon (e) par la relation suivante :

$$\frac{e}{\lambda} = \ln\left(\frac{I_t}{I_0}\right) \quad (35)$$

Où I_t représente l'intégrale totale du spectre d'intensité obtenu ; I_0 , l'intégrale du spectre correspondant à une perte nulle d'énergie et λ , le libre parcours moyen des électrons à travers l'échantillon dans le cas d'une diffusion inélastique.

D'après Egerton,⁵⁷ λ peut être estimé par la relation suivante :

$$\lambda = \frac{106 \cdot F \cdot E_0}{E_m \cdot \ln\left(\frac{2 \cdot \beta \cdot E_0}{E_m}\right)} \quad (36)$$

Chaque terme de l'Équation 36 est défini ci-contre.

- le facteur F :

$$F = \frac{1 + \frac{E_0}{1022}}{1 + \left(\frac{E_0}{511}\right)^2} \quad (37)$$

- E_0 , la tension d'accélération des électrons incidents, exprimée en keV
- E_m , la valeur moyenne de la perte d'énergie des électrons, exprimée en eV

$$E_m = 7,6 \cdot Z^{0,36} \quad (38)$$

- β , l'angle de collection, exprimé en mrad

$$\beta = \frac{\Phi_{\text{objectif}}}{2 \cdot f} \quad (39)$$

Nous avons utilisé pour ces études un microscope électronique de transmission Philips CM20/STEM muni d'un spectromètre de perte d'énergie.⁵⁹ Il possède une distance focale $f = 2,3$ nm et le diamètre du diaphragme de son objectif (Φ_{objectif}) est de 50 μm . E_0 a été fixé à 160 keV. Ainsi, en se basant sur l'Équation 36, on obtient un libre parcours moyen des électrons à travers une surface essentiellement constituée de carbone ($Z=12$) de 143 nm.

5.c - Technique de coloration négative

Afin d'améliorer le contraste des images des échantillons analysés au MET, il est possible de procéder à la coloration dite négative de ces échantillons. Pour ce faire, nous avons utilisé l'acide phosphotungstique 2%. La technique de coloration négative est basée sur l'augmentation de l'intensité transmise via l'augmentation du nombre de charges Z (Équations 35, 36 et 38). Ainsi un composé, de nombre de charges élevé, adsorbé sur un échantillon, permet d'obtenir un meilleur contraste des images correspondant à cet échantillon. Pour information le nombre de charges de l'acide phosphotungstique est de 74. Ce composé ne dénature pas les protéines auxquelles il est adsorbé.

6 - Technique de Franges d'ordre chromatique égal

La technique de franges d'ordre chromatique égal dite FECO a été développée par Tolansky⁶⁰, puis par Israelachvili.⁶¹ Cette méthode optique, basée sur le principe de réfraction de la lumière blanche, permet notamment de déterminer les épaisseurs de films adsorbés sur support solide. Pour nos études, nous nous sommes intéressés à la mesure d'épaisseur de films d'hydrophobine adsorbés sur un support hydrophile : le mica muscovite. Le montage expérimental est explicité ci-dessous.

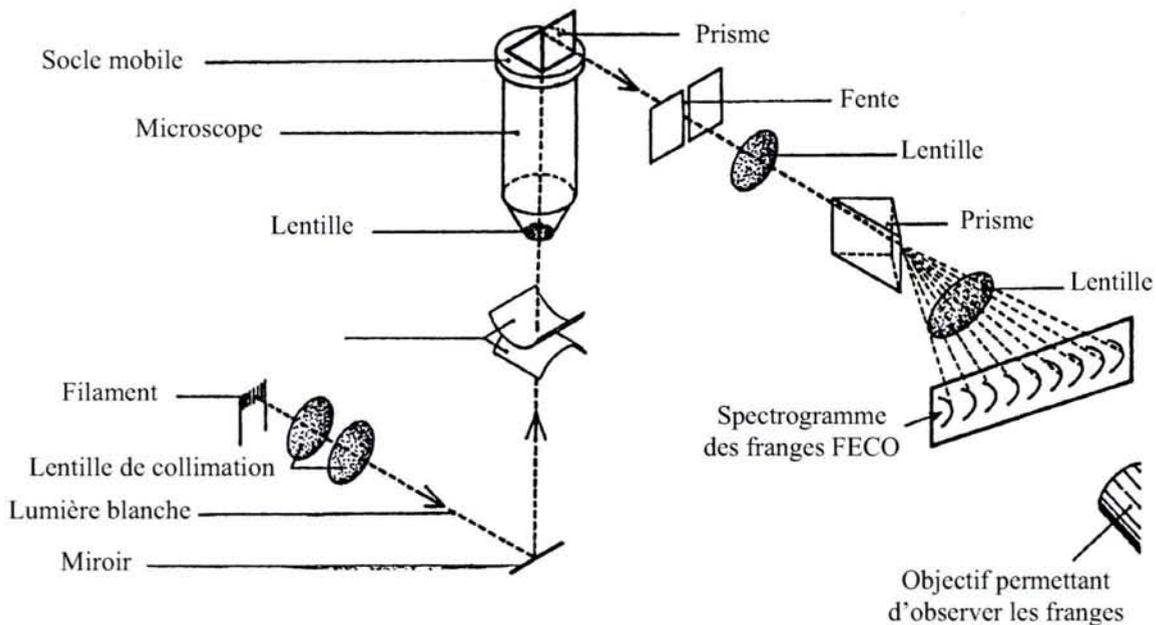


Figure 16. Schéma du dispositif expérimental permettant l'obtention des franges d'ordre chromatique égal, d'après Israelachvili.⁶¹

Il faut savoir que l'épaisseur e d'une surface qui réfracte un faisceau polychromatique tel que la lumière blanche est liée à l'indice de réfraction n de cette surface ainsi qu'à la différence de marche δ (Équation 40).

$$e = \frac{\delta}{2 \cdot (n - 1)} \quad (40)$$

Pour deux franges d'interférence consécutives d'ordres N et $N+1$ et de longueurs d'onde respectives λ_1 et λ_2 , la différence de marche δ induite par un chemin optique non identique de ces deux ondes est définie comme suit.

$$\delta = N \cdot \lambda_1 = (N + 1) \cdot \lambda_2 \quad (41)$$

L'ordre de chacune des franges ainsi que les valeurs λ_1 et λ_2 peuvent être déterminés à partir du spectrogramme des franges d'interférence obtenu. Dans notre cas on a : $\lambda_1 > \lambda_2$. Par ailleurs, dans le cas d'une surface d'épaisseur e_S recouverte d'un film d'épaisseur e_F , on a :

$$e = e_S + e_F \quad (42)$$

Si l'on veut déterminer par la technique FECO l'épaisseur e_F d'un film adsorbé sur feuille de mica, il nous faut préparer un échantillon partiellement recouvert de ce film afin de pouvoir d'abord déterminer les épaisseurs e et e_S ; connaissant l'indice complexe de réfraction du mica. Cet indice est de $1,5682 + \lambda^2 - i \cdot 10^{-5}$. Les films formés par l'hydrophobine ont été étudiés après l'adsorption de la protéine sur des feuilles de mica, diélectrique biréfringent, d'environ $3 \mu\text{m}$ d'épaisseur.

Les expériences FECO présentées dans ce manuscrit ont été réalisées dans le cadre d'une collaboration avec le Laboratoire de Physique et Métrologie des Oscillateurs de Besançon.

7 - Diffraction des rayons X aux petits angles

Les analyses de diffraction des rayons X aux petits angles (SAXS) de structures organisées permettent d'avoir accès à leurs paramètres de maille, selon la loi Bragg (Équation 43).

$$\lambda = 2 \cdot d \cdot \sin \theta \quad (43)$$

Où θ représente l'angle de diffraction ; d , les plans du réseau responsable de la diffraction et λ , la longueur d'onde des rayons X.

Pour nos études, la longueur d'onde des rayons X a été fixée à 150 \AA . Les intensités des rayons diffractés ont été enregistrées au moyen d'un détecteur thermostaté à la vitesse de $1 \text{ K} \cdot \text{min}^{-1}$. Les espaces réciproques ont été calibrés à l'aide du spectre obtenu de diffraction de collagène de queue de rat. Les expériences SAXS ont été réalisées sur la plateforme A2 de HASYLAB au DESY de Hambourg.

Nous nous sommes particulièrement intéressés à l'étude de deux structures 3D cristalline de molécules amphiphiles : la phase lamellaire et la phase cubique.

7.a - Phase lamellaire

La phase lamellaire d'un système molécule amphiphile/eau est composée de feuillets bicouches formés par les molécules amphiphiles. Ces bicouches sont séparées les unes des autres par un plan d'eau (Figure 17). La direction horizontale des phases lamellaires est considérée comme étant infinie. Le spectre de diffraction pour un échantillon de phase lamellaire est généralement formé de deux pics. Les positions de ces deux pics sont notées S_1 et S_2 , et correspondent respectivement aux composantes des vecteurs d'onde de diffraction de premier et de second ordre. Le paramètre de maille, d , de la phase lamellaire correspond à l'épaisseur d'une bicouche de molécules à laquelle s'ajoute l'épaisseur d'un plan d'eau. Ce paramètre de maille est lié à la composante du vecteur d'onde de diffraction de premier ordre par la relation suivante :

$$d = \frac{1}{S_1} \quad (44)$$

S_1 et S_2 , sont quant à eux liés par cette relation :

$$\frac{S_2}{S_1} = 2 \quad (45)$$

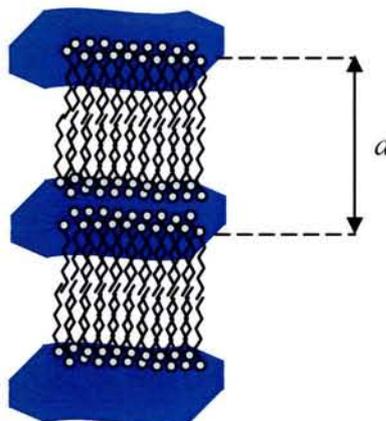


Figure 17. Représentation graphique de deux unités de maille de phase lamellaire.

7.b - Phase cubique

La phase cubique d'un système molécule amphiphile/eau est formée de canaux d'eau autour desquels sont organisés les molécules amphiphiles organisées en bicouches (Figure 18). Elle est, en général, plus visqueuse que la phase lamellaire. Les phases cubiques sont utilisées notamment pour la cristallisation de protéines membranaires.⁶²

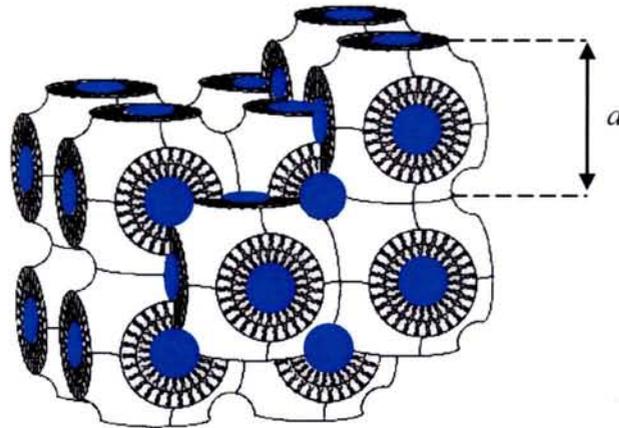


Figure 18. Structure de la phase cubique I_{a3d} .

Le paramètre de maille, a , de la phase cubique est déterminé à partir de la composante $S_{h,k,l}$ du vecteur d'onde de diffraction selon la relation suivante.

$$a = \frac{(h^2 + k^2 + l^2)^{1/2}}{S_{h,k,l}} \quad (46)$$

Où h , k et l sont les indices de Miller.

La représentation graphique de $(h^2 + k^2 + l^2)^{1/2}$ en fonction $S_{h,k,l}$ est donc une droite dont la valeur de la pente correspond au paramètre de maille de la phase cubique.

7.c - Préparation des échantillons de monooléine

Les phases lamellaire (L_α) et cubique (I_{a3d}) de la monooléine (MO) ont été préparées en mélangeant le lipide liquéfié après chauffage et l'eau en proportion 86/14 w/w pour L_α et 60/40 w/w pour I_{a3d} . Nous nous sommes aidés du diagramme de phase du système monooléine/eau établi par Qiu et Caffrey en 2000 et représenté en Figure 19.⁶³

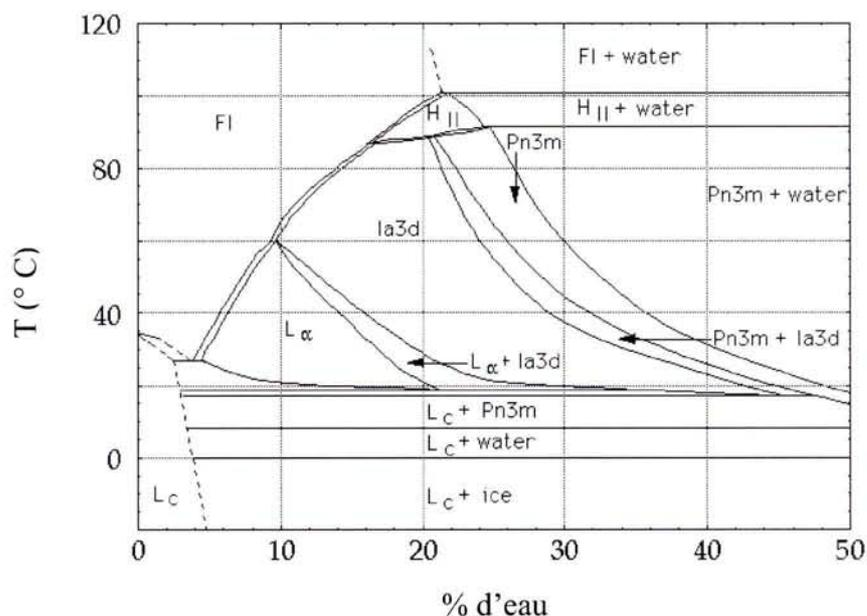


Figure 19. Diagramme de phase du système monooléine/eau établi par Qiu et Caffrey.⁶³

Les échantillons ont été par la suite vortexés, placés dans un bain-marie de 40°C durant environ 3 heures, puis transférés dans des tubes capillaires en verre ($\phi = 1$ mm, Hilgenberg GmbH, Malsfeld, Germany). Ensuite, les capillaires, scellés à la flamme du bec bunsen, ont été placés dans un porte-échantillon thermostaté à 25°C pour permettre l'enregistrement des spectres SAXS.

8 - Modification et fonctionnalisation des surfaces

En se basant sur l'affinité que possède l'hydrophobine pour les interfaces, nous avons élaboré à notre laboratoire et ce, en collaboration avec l'entreprise BioMaDe Technology Foundation, une méthode générale d'auto-assemblage de la protéine sur différents supports solides. Nous qualifierons désormais de surfaces modifiées les surfaces solides sur lesquelles l'hydrophobine a été adsorbée.

8.a - Nettoyage des surfaces avant modification

Les surfaces solides ont été nettoyées avant chaque utilisation. Les électrodes de carbone vitreux (ECV) ont été polies sur disque de diamant tournant puis sur poudres de diamant, d'alumine 1 μm , 0,3 μm et 0,05 μm . Entre chaque polissage, les électrodes ont été passées aux ultrasons dans un mélange d'eau et d'éthanol (50/50). Les surfaces en polytétrafluoroéthylène (Téflon[®]) ont été trempées quelques minutes dans une solution

d'acide sulfochromique puis rincées à l'eau et à l'éthanol. Les surfaces en acier inoxydable et celles en polystyrène ont été uniquement nettoyées à l'eau et à l'éthanol.

8.b - Modification des surfaces par physisorption de la SC3

Les surfaces modifiées ont été préparées par contact entre la solution aqueuse de la protéine à $0,3 \text{ mg.mL}^{-1}$ et la surface préalablement nettoyée (Figure 20). Les surfaces en Téflon[®], en polystyrène et en acier inoxydable ont été immergées dans la solution d'hydrophobine (Figure 20A). En ce qui concerne les grilles de carbone amorphe et les électrodes de carbone vitreux, une goutte de la solution d'hydrophobine a été déposée en surface (Figure 20B). Les échantillons ont été placés à la température de 4°C et recouverts afin de limiter toute évaporation de la solution de SC3. Le processus d'auto-assemblage a lieu spontanément à l'interface solide/liquide.



Figure 20. Schéma représentant les conditions expérimentales permettant l'auto-assemblage de l'hydrophobine sur (A) une surface en Téflon[®] d'après Tagu et Rogalska⁶⁴ et (B) une grille de carbone.

Au bout d'une trentaine de minutes, les surfaces sont abondamment rincées à l'eau pure afin d'éliminer l'excès d'hydrophobine non adsorbée et sont prêtes à être fonctionnalisées.

8.c - Fonctionnalisation par adsorption d'enzymes sur les surfaces modifiées

Les surfaces modifiées par l'hydrophobine ont été mises en contact avec la solution enzymatique souhaitée (Figure 21), puis ont été recouvertes et placées à la température de 4°C . Les enzymes sont dès lors adsorbées sur le film d'hydrophobine. Après une trentaine de minutes, les supports solides sont rincés avec la solution tampon qui a servi à la solubilisation de l'enzyme. Les nouvelles surfaces obtenues ainsi sont qualifiées de surfaces fonctionnalisées.

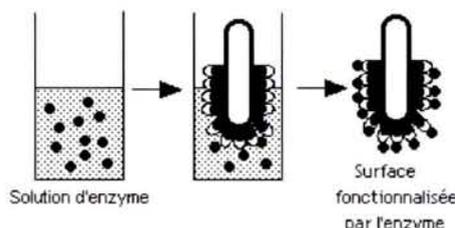


Figure 21. Schéma représentant les conditions expérimentales permettant l'immobilisation d'enzymes sur une surface en Téflon[®] préalablement modifiée par l'hydrophobine ; d'après Tagu et Rogalska.⁶⁴

8.d - Co-immobilisation de molécules issues de la synthèse organique

En ce qui concerne l'immobilisation de molécules issues de la synthèse organique, la fonctionnalisation comme précédemment décrite ne permet pas l'obtention de systèmes stables, comme nous en discuterons dans le Chapitre IV. Nous avons pallié ce problème en optant pour une adsorption d'un mélange mixte hydrophobine-molécule organique. Nous qualifierons désormais cette méthode de « co-immobilisation ». Le mélange hydrophobine-molécule organique est obtenu après ajout de la solution aqueuse de la protéine à la solution de la molécule organique. Pour permettre l'homogénéisation du mélange, il est nécessaire que le solvant dans lequel est solubilisé le composé organique soit miscible à l'eau.

8.e - Élaboration d'électrodes d'or modifiées par auto-assemblage de thiols

Nous nous sommes intéressés aux monocouches organiques auto-assemblées (SAM) sur électrodes d'or. Nous avons utilisé comme molécules organiques, trois molécules bifonctionnelles thiol/alkyle, thiol/acide carboxylique et thiol/hydroxyle (Figure 22). Les électrodes d'or modifiées par les SAM ont servi de support solide pour l'étude de l'organisation de l'hydrophobine en fonction de la physico-chimie de la surface.

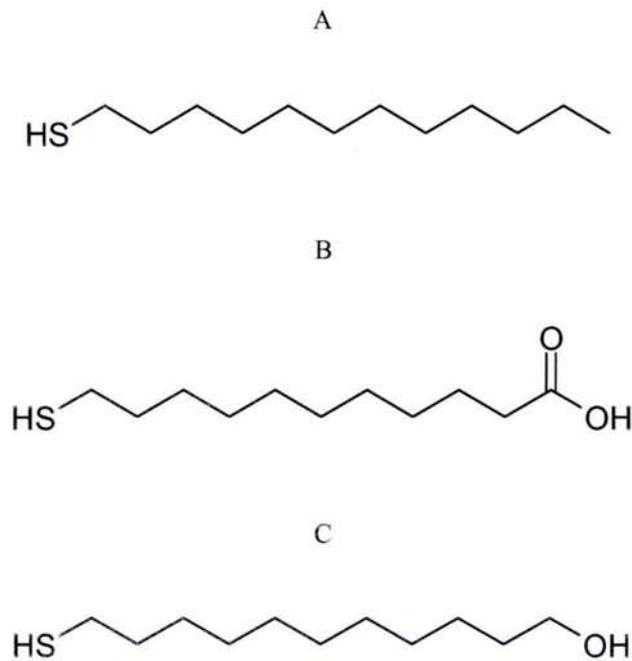


Figure 22. Structure des trois thiols utilisés pour l'élaboration des SAM sur électrodes d'or. (A) 1-Dodécane-thiol, (B) acide 11-mercapto-undecanoïque et (C) 11-mercapto-1-undecanol.

Les thiols s'auto-assemblent sur une électrode d'or et forment une monocouche via la formation, pour chaque molécule de thiol, d'une liaison covalente S–Au entre un atome de soufre de la molécule et un atome d'or de la surface de l'électrode (Figure 23). L'auto-assemblage a lieu spontanément après l'immersion de l'électrode d'or dans une solution d'éthanol contenant le thiol à la concentration de 1 mM. Au bout d'une heure, l'électrode est rincée à l'éthanol puis au tampon phosphate et ainsi, est prête à l'emploi.

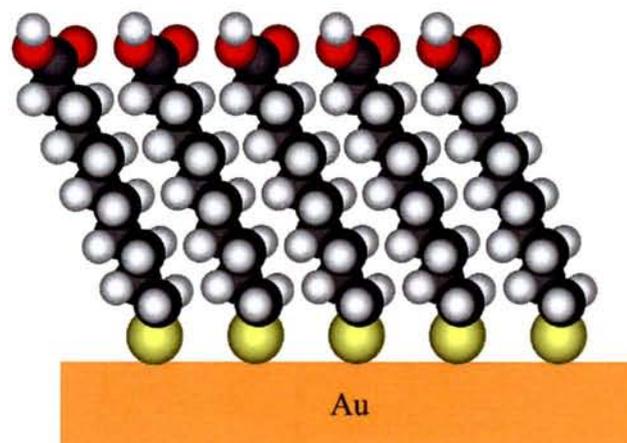


Figure 23. Schéma d'une monocouche de thiol 11-mercapto-undecanoïque auto-assemblée à la surface d'une électrode d'or.

8.f - Revue sur les méthodes existantes de fonctionnalisation de matériaux

L'immobilisation d'entités moléculaires sur supports solides est un défi technologique majeur, aussi bien en physique, chimie, biologie que dans le domaine médical.⁵ En effet, les matériaux fonctionnalisés peuvent servir de catalyseurs (réaction électrochimique ou chimique), de témoins optiques (fluorescence, phosphorescence, réfraction), ou encore de transporteurs de molécules (vectorisation de principes actifs). Les techniques d'immobilisation les plus utilisées sont la réticulation, l'adsorption et l'inclusion.^{65, 66}

La réticulation par liaisons covalentes nécessite l'emploi de réactifs bifonctionnels qui servent de ponts moléculaires entre le matériau et les molécules à immobiliser. Cette technique peut parfois être longue et fastidieuse. Notons que les enzymes immobilisées par réticulation peuvent être dénaturées.

Les techniques d'adsorption sont basées sur les interactions intermoléculaires électrostatiques ou de type polaire/apolaire. Elles ont pour avantage d'être moins dénaturantes que les techniques de réticulation mais la surface fonctionnalisée peut être moins stable.

Les méthodes d'inclusion permettent l'encapsulation de molécules dans une matrice qui peut être polymérique,^{67, 68} lipidique^{69, 70} ou encore silicatée.⁷¹ La matrice est ensuite fixée sur la surface que l'on souhaite fonctionnaliser. Il ne faut pas oublier que l'étude du problème lié au transport des entités chimiques dans ces systèmes est primordiale pour leur fonctionnement.

Toutes ces méthodes d'immobilisation possèdent donc leurs avantages et leurs inconvénients. De plus, le choix du type de transduction permettant l'utilisation de ces surfaces fonctionnelles doit être judicieux pour la fiabilité des mesures. Dans nos études nous nous sommes intéressés aux transductions électrochimique et spectrophotométrique. Ces techniques sont détaillées ci-après.

9 - Les méthodes voltampérométriques en électrochimie

La voltampérométrie⁷² est une méthode d'électrochimie dynamique qui permet la mesure du courant aux bornes d'une électrode de travail (WE), en fonction du potentiel imposé entre cette électrode et l'électrode de référence (RE). Les électrodes sont plongées dans une cellule électrochimique contenant la solution d'une ou plusieurs espèces électroactives (Figure 24).

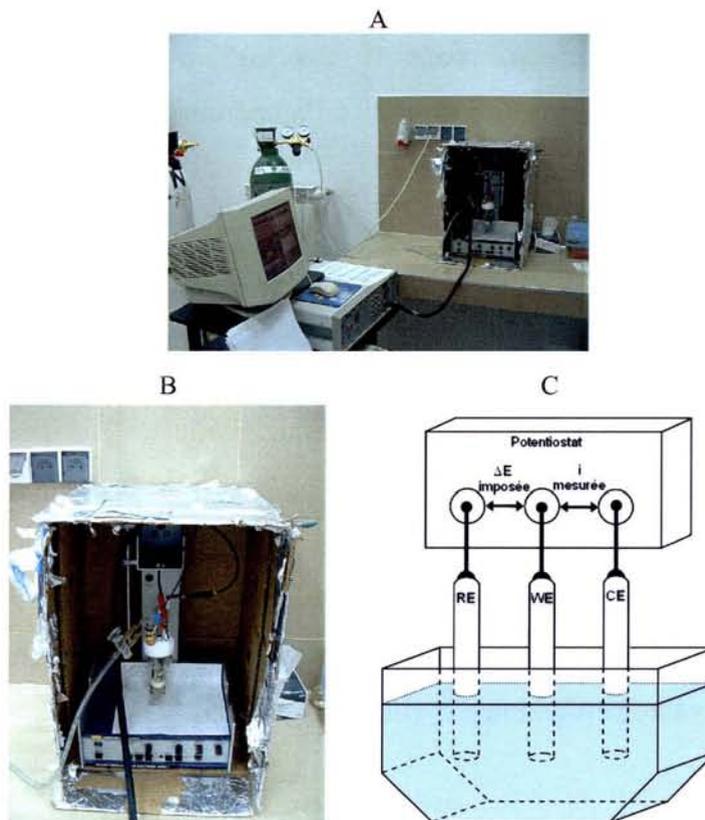


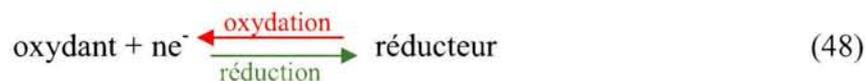
Figure 24. Montage d'électrochimie avec une cellule électrochimique équipée d'un système à trois électrodes. (C) Principe de mesure de l'intensité du courant i en fonction du potentiel ΔE imposé. RE : électrode de référence, WE : électrode de travail et CE : contre-électrode.

Selon la relation de Nernst (Équation 47), le ratio concentration en oxydant sur concentration en réducteur, au voisinage de l'électrode de travail, est fonction du potentiel E appliqué à cette électrode.

$$E = E^\circ + \frac{R \cdot T}{n \cdot F} \cdot \ln \left(\frac{[\text{oxydant}]}{[\text{réducteur}]} \right) \quad (47)$$

Avec E° le potentiel thermodynamique du couple oxydant/réducteur ; R , la constante des gaz parfaits ; T , la température ; n , le nombre d'électrons mis en jeu et F la constante de Faraday ($F \sim 9,6 \cdot 10^4 \text{ C} \cdot \text{mol}^{-1}$).

La consommation ou l'apport d'électrons, respectivement lors de la réduction ou de l'oxydation d'une espèce (Équation 48), modifie le courant aux bornes de l'électrode de travail.



Les études électrochimiques présentées dans ce manuscrit ont été réalisées par voltampérométrie cyclique, excepté dans le cas du suivi de l'activité des enzymes d'oxydoréduction pour lequel nous avons utilisé l'ampérométrie hydrodynamique. Chacune de ces techniques est détaillé ci-après.

9.a - Voltampérométrie cyclique

Dans le cas de la voltampérométrie cyclique (VC), le potentiel imposé varie linéairement entre deux potentiels limites appelés premier et deuxième potentiels de retournement (E_1 et E_2 , respectivement). Le potentiel initial (E_i) et le potentiel final (E_f) correspondent en général au potentiel à courant nul. Ainsi, si v est la vitesse de balayage exprimée en $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$, alors, lorsque $E_1 > E_i > E_2$ on a : $E(t) = E_i + v \cdot t$ jusqu'à l'instant t_1 où $E(t_1) = E_1$. Puis pour $t > t_1$ on a $E(t) = E_1 - v \cdot t$ jusqu'à l'instant t_2 où $E(t_2) = E_2$. Et enfin pour $t > t_2$ on a $E(t) = E_2 + v \cdot t$ jusqu'à ce que $E(t) = E_f$. La mesure du courant en fonction du potentiel permet d'obtenir un voltampérogramme cyclique (Figure 25).

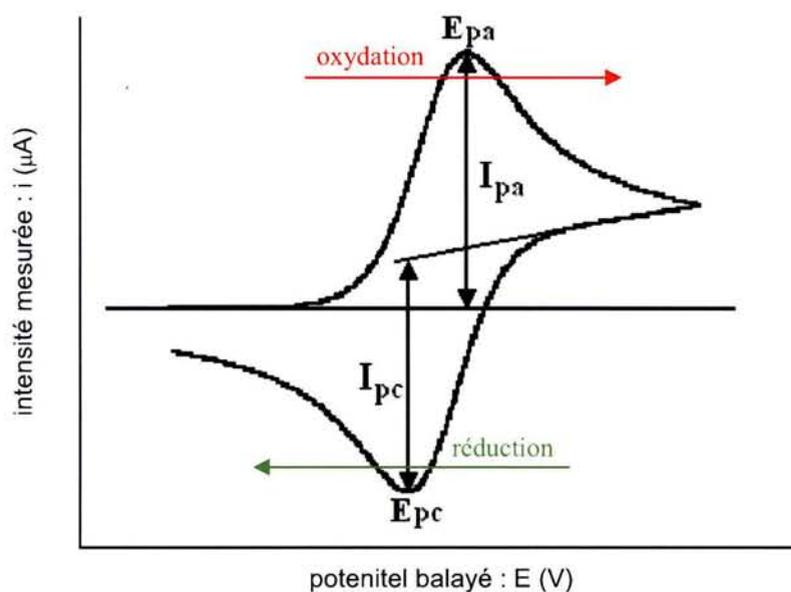


Figure 25. Voltampérogramme cyclique type obtenu en électrochimie dans le cas d'un système réversible.

Les concentrations des espèces en solution, étant régies à tout instant par l'équation de Nernst (Équation 47), lorsque le potentiel augmente, l'équilibre d'oxydoréduction est déplacé vers la formation d'oxydants au voisinage de l'électrode de travail avec libération d'électrons (Équation 48). Le courant mesuré aux bornes de l'électrode WE passe donc par un maximum d'intensité I_{pa} . Lorsque le potentiel imposé diminue, il y a consommation d'électrons : le signal mesuré passe par un minimum d'intensité I_{pc} . Lorsque le transfert des électrons vers la surface de l'électrode de travail est rapide, le système rédox est dit réversible (Figure 25). Les intensités I_{pa} et I_{pc} sont alors égales, et la différence entre les potentiels E_{pa} et E_{pc} est de $0,059/n$; avec n le nombre d'électrons échangés. Dans le cas contraire, le système rédox est dit irréversible.

Les expériences en VC étant réalisées en régime diffusionnel, l'intensité I des signaux d'oxydoréduction est fonction de la migration des espèces de la couche diffusionnelle vers l'électrode WE, comme l'indique l'équation de Randles-Sevcik ci-dessous.

$$I = (2,69 \cdot 10^5) \cdot n^{3/2} \cdot (v \cdot D)^{1/2} \cdot A \cdot C \quad (49)$$

Avec I exprimée en μA ; A , la surface de l'électrode en cm^2 ; D , le coefficient de diffusion ($cm^2 \cdot s^{-1}$) ; v , la vitesse de balayage en $V \cdot s^{-1}$ et C , la concentration en espèce électroactive exprimée en $mmol \cdot L^{-1}$.

Ainsi, l'intensité des pics d'oxydoréduction est proportionnelle à la racine carrée de la vitesse de balayage pour des espèces dissoutes en solution. Dans le cas d'espèces électroactives adsorbées sur l'électrode de travail, l'intensité des pics observés est directement proportionnelle à la vitesse de balayage. Cette dépendance I versus v est utile pour l'étude de la stabilité des systèmes immobilisés sur des électrodes de travail.

Nous avons également fait appel à deux autres méthodes voltampérométriques : la voltampérométrie différentielle à impulsions et la voltampérométrie par redissolution anodique.

9.b - Ampérométrie hydrodynamique

La méthode d'ampérométrie hydrodynamique ou chronoampérométrie permet, en régime de diffusion convective, de mesurer l'intensité aux bornes de l'électrode de travail en fonction du temps, lorsqu'un potentiel est imposé. Dans nos études, le potentiel imposé est

constant tout au long de l'expérience. Par cette technique, il est possible de mettre en évidence la formation d'une espèce électroactive lorsque le potentiel imposé est supérieur au potentiel d'oxydation ou inférieur au potentiel de réduction de cette espèce. Des sauts d'intensité sont observés à chaque fois que la concentration en espèces électroactives augmente. Pour les réactions d'oxydation, ces sauts d'intensité positive sont croissants alors que pour les réactions de réduction (Figure 26), les sauts sont décroissants et d'intensité négative. Les paliers observés résultent du régime de convection qui permet de maintenir la concentration en espèces électroactives constante dans toute la cellule électrochimique.

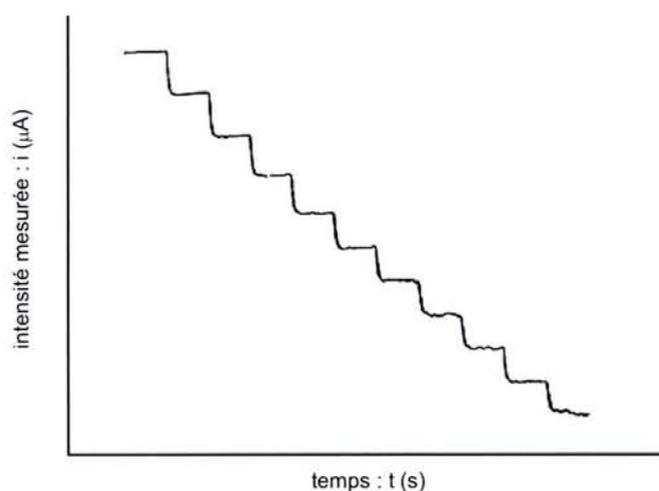


Figure 26. Chronoampérogramme type obtenu en électrochimie dans le cas de la réduction d'une espèce électroactive. Résultat obtenu par Wang et Walcarius.⁷³

Dans le cas du suivi de l'activité d'enzymes d'oxydoréduction, les courbes d'intensité i obtenues en ampérométrie hydrodynamique donnent accès à la constante apparente de Michaelis-Menten. En effet, lorsque la courbe d'équation $i=f(i/[substrat])$ est linéaire, le mécanisme enzymatique peut être décrit par le modèle de Michaelis-Menten. Selon l'équation de Lineweaver-Burk (Équation 50), la constante apparente de Michaelis-Menten correspond à la valeur du coefficient directeur de la droite obtenue.^{74, 75} Cette constante reflète l'affinité de l'enzyme pour le substrat.

$$i = i_{\max} - K_M^{app} \cdot \frac{i}{[substrat]} \quad (50)$$

La vitesse de rotation de l'électrode WE pour les expériences d'ampérométrie hydrodynamique présentées dans ce rapport a été de 1700 tours.minute⁻¹.

9.c - Les capteurs et biocapteurs électrochimiques

Des surfaces fonctionnalisées directement par des espèces électroactives ou indirectement par des catalyseurs dont le mécanisme réactionnel donne lieu à la production d'espèces détectables par électrochimie présentent des avantages particuliers. En effet, la proximité des espèces électroactives à la surface ou au voisinage des électrodes permet d'améliorer la sensibilité de la transduction grâce à des concentrations locales en analyte élevées. De faibles quantités de l'espèce à immobiliser suffisent à la préparation de telles surfaces. Ces dernières présentent l'avantage d'être réutilisables et permettent de simplifier la composition du milieu réactionnel.⁷⁶

Les biocapteurs électrochimiques sont classés en trois catégories.⁷⁷ La première génération permet le suivi direct de la réaction catalytique, la seconde nécessite l'utilisation de médiateurs électrochimiques et la troisième est caractérisée par un transfert d'électrons entre la couche de diffusion et la surface de l'électrode. Les médiateurs électrochimiques sont des intermédiaires de transfert électronique (Figure 27). Bien choisis, ils facilitent le transfert de charge par l'abaissement de la surtension et amplifient les intensités des signaux mesurés, permettant ainsi la réalisation de capteurs d'une sensibilité accrue.^{78, 79}

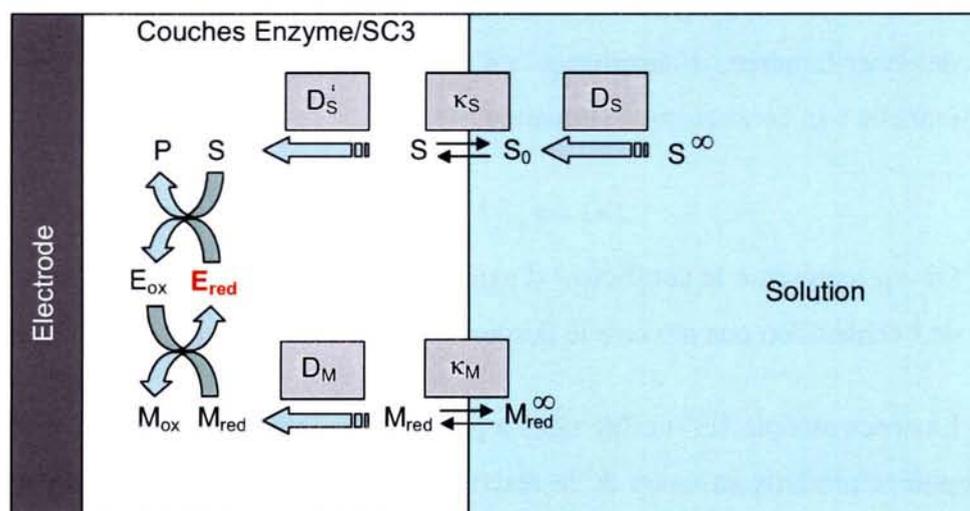


Figure 27. Représentation schématique de la diffusion du substrat S et du médiateur M_{red} à l'interface électrode/solution et dans la couche d'enzyme/SC3. Cas d'une électrode fonctionnalisée par une enzyme E_{red} . Schéma librement adapté d'une publication de Lyons.⁸⁰

Dans nos études, nous avons élaborés des biocapteurs électrochimiques en utilisant deux enzymes d'oxydoréduction : la GOX qui nous a permis d'obtenir des biocapteurs de première génération (Cf. Partie Résultats & Discussion, Paragraphe III.2.a) et la HRP grâce à laquelle nous avons pu élaborer des biocapteurs de seconde génération (Cf. Partie Résultats & Discussion, Paragraphe III.2.b).

Les expériences de voltampérométrie ont été réalisées au moyen d'un potentiostat 283 (EG&G, Princeton Applied Research, USA) ou d'un potentiostat GPES (Eco Chemie). Le suivi des activités enzymatiques par électrochimie ainsi que les études avec les calixarènes et les cations cuivriques ont été réalisées au LCPME de Villers-lès-Nancy (D. R. Alain Walcarius). Les études avec les SAM, les cyclodextrines et les fullerènes ont été réalisées à l'Université de Varsovie (Pr Renata Bilewicz et Ewa Górecka). Pour toutes nos études, nous avons utilisé une électrode de référence Ag|AgCl, 3M et une contre électrode en platine.

10 - Spectrophotométrie UV-visible

La spectrophotométrie UV-visible a été utilisée afin de pouvoir suivre l'avancement des réactions enzymatiques pour lesquelles les produits obtenus sont chromophoriques. Selon la loi de Baer-Lambert, l'absorbance ou densité optique (DO) d'un chromophore est proportionnelle à sa concentration (Équation 51).

$$DO = \varepsilon_M \cdot l \cdot [chromophore] \quad (51)$$

Où ε_M représente le coefficient d'extinction molaire du chromophore et l , l'épaisseur de l'échantillon que traverse le faisceau UV-visible. Dans nos études l est de 1 cm.

La spectroscopie UV-visible nous a permis de caractériser le spectre d'absorption des chromophores produits au cours de la réaction enzymatique. À partir de ces spectres, il est possible de connaître le domaine spectral pour lequel l'absorption du chromophore est maximale. Ainsi, il est possible suivre, pour une longueur d'onde définie, les cinétiques enzymatiques par spectrophotométrie.

Par ailleurs, la technique de spectrophotométrie UV-visible a été employée pour déterminer le coefficient d'extinction molaire d'un substrat synthétique de la HRP, à partir de l'Équation 51 (Cf. Paragraphe 12.c.γ).

11 - Outils de modélisation moléculaire appliquée aux protéines

11.a - Estimation du volume de protéines sphériques

Afin de mieux comprendre l'organisation de l'hydrophobine et des enzymes telles que la glucose oxydase (GOX) et la peroxydase (HRP) aux interfaces, nous avons été amenés à assimiler ces protéines à des sphères. Pour ce faire, nous avons utilisé la relation établie par Beck en 1989.⁸¹ La formule qu'il obtint, corrélant le diamètre (D) d'une protéine quelconque à sa masse moléculaire (M), est donnée ci-dessous.

$$D = \left(\frac{6 \cdot M \cdot \nu}{\pi \cdot N_A} \right)^{1/3} \quad (52)$$

Avec M , la masse moléculaire de la protéine exprimée en dalton, N_A le nombre d'Avogadro et ν , le volume partiel spécifique de la protéine. Ce dernier varie de 0,70 à 0,76 mL.g⁻¹ pour les protéines. Pour tous nos calculs, nous avons fixé $\nu = 0,73$ mL.g⁻¹.

Les résultats obtenus par cette approche serviront de référence pour l'estimation de la forme adoptée par la SC3 en volume et à l'interface eau/air, ainsi que pour l'estimation des épaisseurs des films SC3, GOX, HRP, SC3/GOX, et SC3/HRP formés sur GCA et ECV.

11.b - Calcul d'aire de surface accessible

Le calcul d'aire de surface accessible⁸² (ASA) permet d'accéder aux propriétés surfaciques des acides aminés d'une protéine accessible à une molécule sonde comme le montre la Figure 28. La surface accessible correspond alors à l'aire de l'enveloppe générée par le centre de la sonde sphérique roulant sur la surface de la protéine.

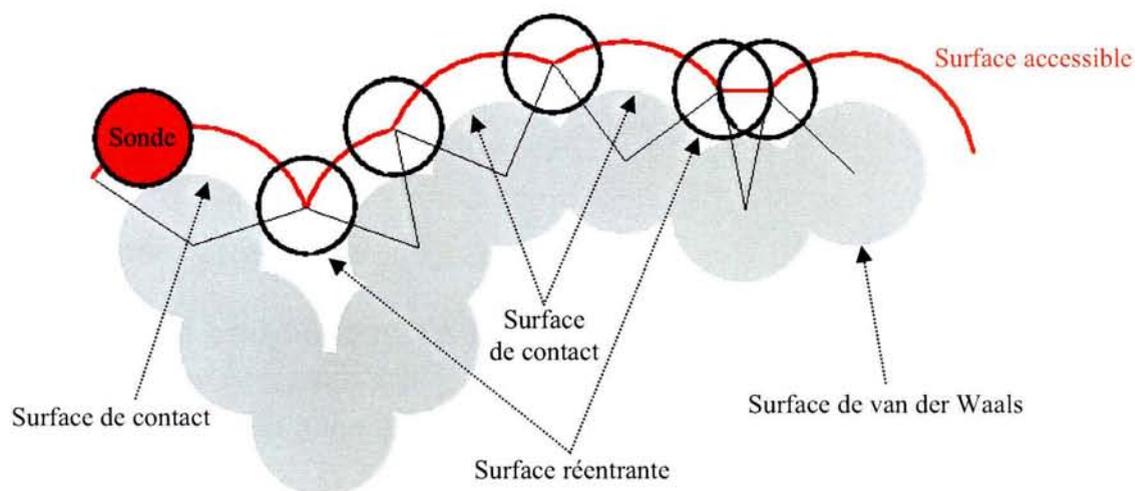


Figure 28. Schéma explicatif de la méthode utilisée pour déterminer l'aire de surface accessible d'une protéine à une sonde, d'après Labanowski.⁸³

Les ASA ont été calculées au moyen de la procédure analytique SurVol⁸⁴ implémentée dans le package de modélisation moléculaire BRUGEL,^{85, 86} et ce, sur une station Silicon Graphics O2 R10000.

Les structures cristallographiques de la GOX monomérique ainsi que celle de la HRP ont été obtenues à partir de la banque de données PDB (Protein Data Bank). Les codes PDB de la GOX et de la HRP utilisées pour ces calculs sont, respectivement, 1GAL⁸⁷ et 1H57.⁸⁸ D'après les paramètres d'unité asymétrique (ASU) de la 1GAL, la glucose oxydase est associée à une coenzyme, la flavine adénine dinucléotide (FAD) et à 9 sucres : 3 mannoses (Man) et 6 *N*-acétylglucosamines (NAG) fixés sur la partie *N*-terminale pour chacune des sous-unités. D'après les paramètres ASU de la 1H57, la peroxydase est une enzyme monomérique non glycosylée qui complexe deux ions calcium et un hème.

Les enzymes ont été dépourvues de leurs molécules d'eau avant le lancement des calculs. Les ASA ont été déterminées en utilisant une sonde sphérique de rayon $R = 2,809 \pm 0,047 \text{ \AA}$ ($n = 10$). Le choix de cette sonde a été basé sur l'analyse du rayon de giration des molécules NAG terminales des parties glycosylées présentes chez de nombreuses enzymes. La taille de la sonde a, quant à elle, été fixée de manière à prendre en compte les interactions SC3/GOX et SC3/HRP ; interactions sensées établir des surfaces de contact suffisamment larges et stables, tout en excluant les acides aminés situés dans les crevasses les plus étroites des protéines (aire de surface réentrante non négligeable).^{89, 90} Il faut savoir que la taille de la

sonde, tout comme celle des atomes des protéines, joue un rôle important dans les calculs ASA aussi bien d'un point de vue qualitatif que quantitatif. Dans les études ASA présentées ici, nous avons utilisé des atomes unifiés comme décrit par Li & Nussinov.⁹¹ La procédure SurVol permet à la sonde d'approcher la surface externe de la protéine afin de détecter les surfaces individuelles et de générer des tables correspondant à chaque ensemble prédéfini : les patches polaires (incluant les acides aminés D, E, G, H, K, N, Q, R, S et T), les patches apolaires (incluant les acides aminés A, C, I, L, M et P) et les patches aromatiques (incluant les acides aminés F, W et Y). La GOX est connue est un homodimère possédant deux sous-unités de 80 kDa chacune. Toutefois, les paramètres d'unité asymétrique (ASU) de la structure RX (1GAL) de cette enzyme la définissent comme étant une biomolécule monomérique mais ne fournit aucune donnée d'opération de symétrie qui permettrait de générer le dimère.⁹²

Ces études ont été réalisées dans le cadre d'une collaboration avec le Pr Nadir Mrabet du Laboratoire de Pathologie Cellulaire et Moléculaire en Nutrition de la Faculté de Médecine de Nancy.

12 - Composés chimiques et biologiques utilisés

12.a - L'hydrophobine SC3 et le lysozyme

La SC3, d'une masse moléculaire de 14,2 kDa, est composée de 112 acides aminés dont 60 polaires, 51 non polaires et 1 aromatique (Figure 29). 16 à 22 mannoses sont greffés sur les 12 premières thréonines de la partie *N*-terminale. Les principales étapes d'extraction et de purification de la SC3 à partir du champignon *Schizophyllum commune* ont été décrites dans la partie Introduction de ce manuscrit et ont été publiés respectivement en 1993 et 2002.^{93, 94}

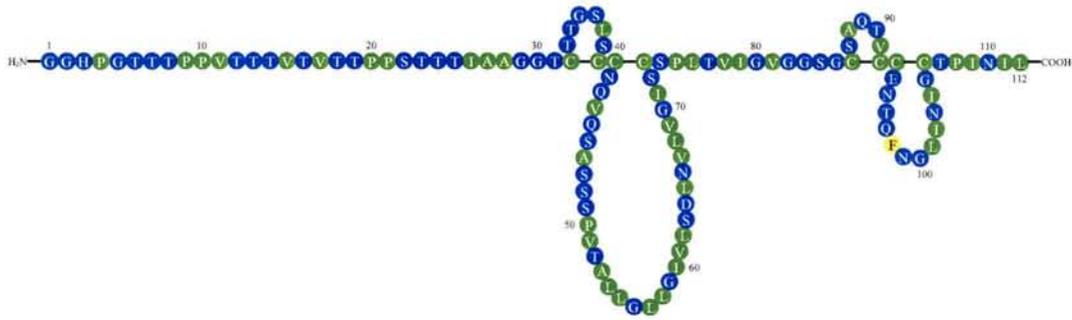


Figure 29. Séquence de l'hydrophobine SC3. Les acides aminés polaires, apolaires et aromatiques sont respectivement représentés en bleu, vert et jaune.

Le lysozyme de blanc d'oeuf de poule, de masse moléculaire voisine de celle de la SC3 (14,3 kDa), a été utilisé dans nos études comme protéine de référence. Il peut être employé en tant que bactéricide ou qu'inhibiteur bactériostatique.⁹⁵⁻⁹⁷ Il est composé de 129 acides aminés dont 73 polaires, 44 non polaires et 12 aromatiques (Figure 30). Notons que, comme l'hydrophobine SC3, le lysozyme possède 4 ponts disulfures.⁹⁸

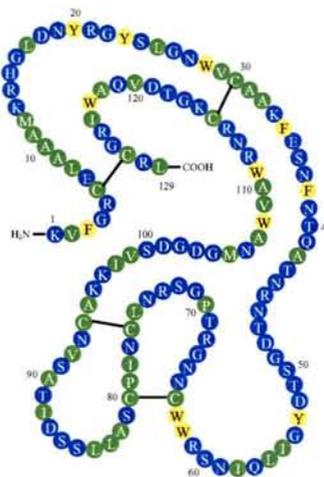


Figure 30. Séquence du lysozyme de blanc d'œuf. Code couleur identique à celui de la figure précédente.

12.b - Les lipides

α) Monooléine

Le 1-oleoyl-*rac*-glycerol (monooléine, MO, Figure 31) est utilisé dans l'alimentation en tant que émulsifiant, gélifiant et stabilisant. À température ambiante, la monooléine pure forme une structure lamellaire solide et cristalline notée L_C . En fonction de son taux d'hydratation et de la température de l'échantillon 3D, le mélange MO+eau existe sous des phases différentes. Dans nos travaux, nous avons étudiées, en présence d'hydrophobine, l'organisation des molécules de monooléine organisées en monocouche et en bicouche.

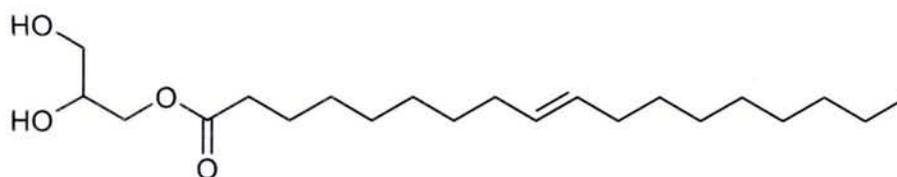


Figure 31. Structure de la monooléine.

β) DPPC

La 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholine (DPPC, Figure 32) est l'un des constituants importants des membranes biologiques. La DPPC représente par exemple 19% du poids lipidique total des membranes d'érythrocyte chez l'Homme.³³ Elle est donc souvent utilisée comme membrane modèle notamment pour les études des protéines transmembranaires. La température de fusion de la DPPC est de 41°C.

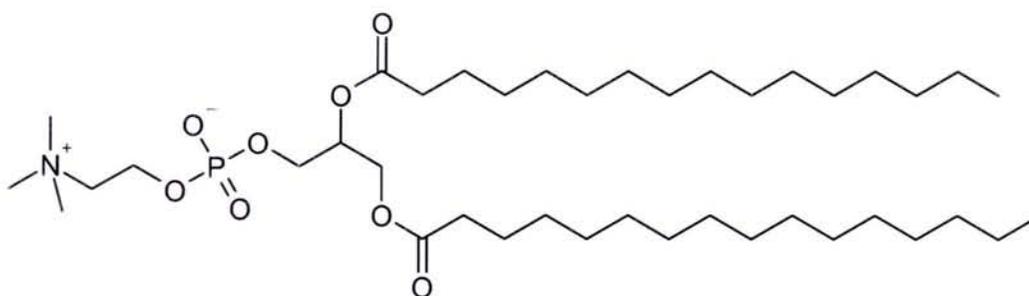


Figure 32. Structure de la DPPC.

γ) DMPE

La 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphoéthanolamine (DMPE, Figure 33) est un constituant des membranes cellulaires animales tout aussi important que la DPPC.³³ La température de fusion de la DMPE est de 50°C.

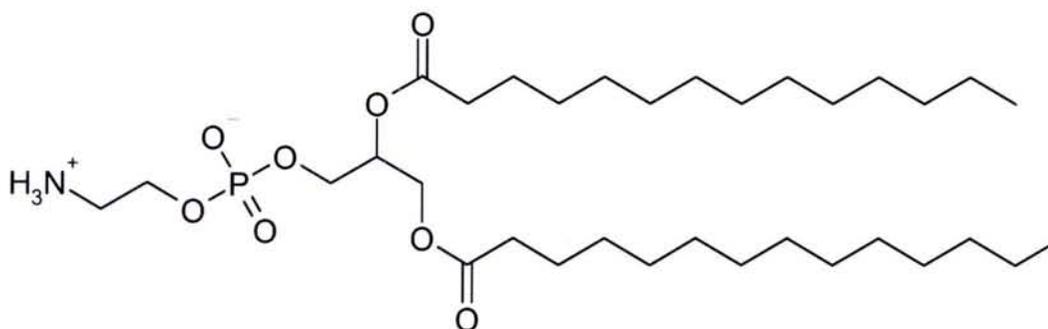
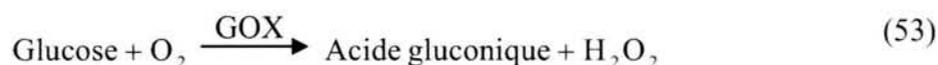


Figure 33. Structure de la DMPE.

12.c - Les enzymes et leurs substrats

α) Glucose oxydase

La glucose oxydase, découverte par Muller en 1928,⁹⁹ est une enzyme de la classe des oxydoréductases du glucose (EC 1.1.3.4). Elle catalyse la réaction d'oxydation du glucose selon l'équation bilan suivante :



La stabilité de cette enzyme la rend attractive pour différentes applications comme, par exemple, la bio-détection du glucose. Nous avons utilisé la GOX purifiée à partir du champignon *Aspergillus niger* (Sigma). C'est une protéine dimérique d'environ 160 kDa. La structure tertiaire du monomère de la GOX est représentée ci-dessous.

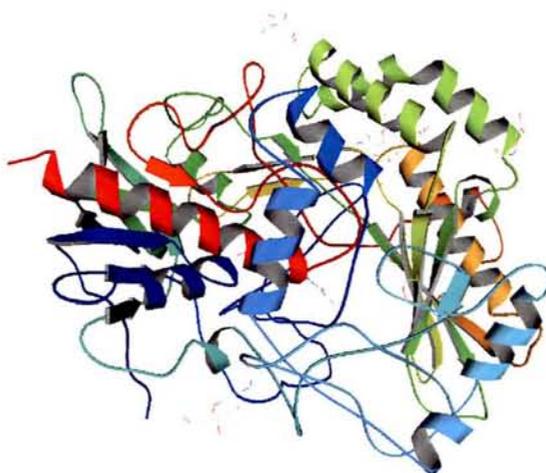


Figure 34. Structure tridimensionnelle du monomère de la glucose oxydase (code PDB : 1GAL).

β) Peroxydase

La peroxydase est une hémoprotéine de la classe des oxydoréductases du peroxyde d'hydrogène (EC 1.11.1.7). Elle catalyse la réaction d'oxydation de nombreux substrats acides de Brønsted tels que les dérivés phénoliques hydroquinone (QH₂) ou encore méthoxyphénol par le peroxyde d'hydrogène selon l'équation bilan 57. Nous avons utilisé la HRP purifiée à partir du raifort (Sigma). La structure tertiaire de l'enzyme d'une masse moléculaire de 40 kDa, est représentée ci-dessous.

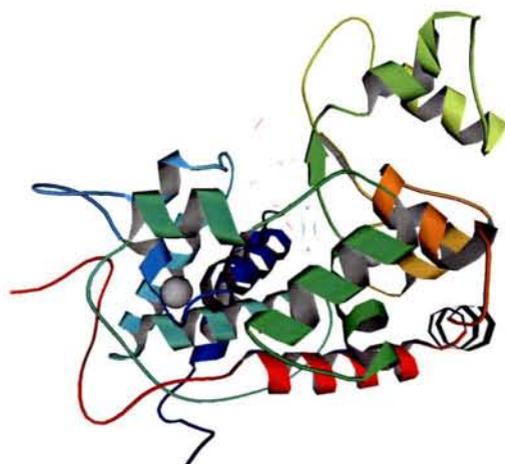
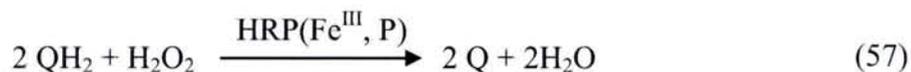


Figure 35. Structure tridimensionnelle de l'homodimère de la peroxydase de raifort (code PDB : 1H57).

Le mécanisme catalytique de la HRP, établi en 1991 par Dunford,¹⁰⁰ est le suivant :



$\text{HRP}(\text{Fe}^{\text{III}}, \text{P})$ représente la forme native de la peroxydase avec P, la porphyrine, hétérocycle inséré dans l'enzyme et qui est connu pour être un bon chélatant du fer. Le complexe porphyrine- Fe^{II} est d'ailleurs mieux connu sous le nom d'hème. L'équation bilan de la catalyse d'oxydation de QH_2 est alors la suivante :



Toutefois, un transfert direct d'électrons entre l'électrode sur laquelle a été adsorbée la HRP et le site actif de l'enzyme peut être parfois observé.¹⁰¹⁻¹⁰³ Dans ce cas, le système catalytique ne nécessite pas l'emploi de l'hydroquinone qui peut être dès lors considéré comme un médiateur électrochimique. Les deux processus sont représentés en Figure 36.

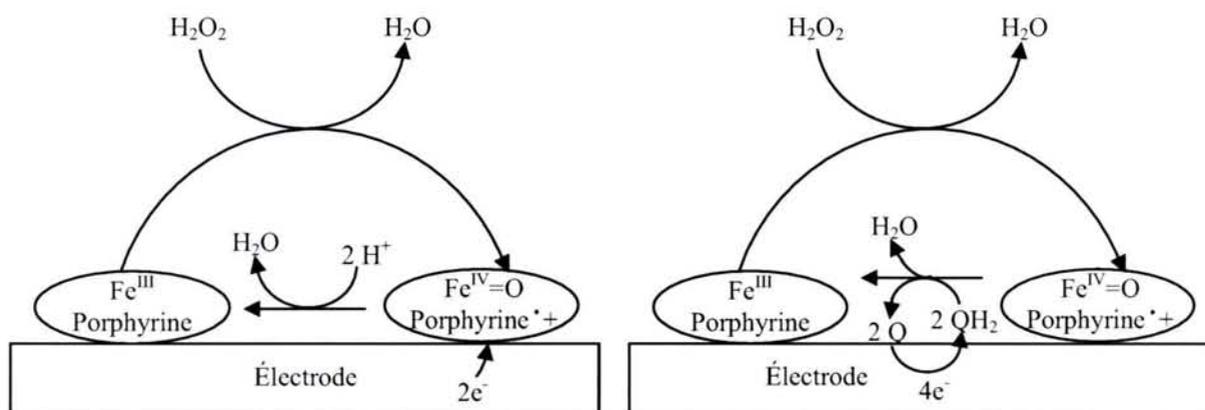


Figure 36. Schéma illustrant les mécanismes à la base du fonctionnement de la HRP. Transferts d'électrons (A) direct et (B) via l'oxydoréduction d'un médiateur électrochimique : QH₂.

Le couple rédox H₂O₂/H₂O étant cinétiquement lent à la surface d'un grand nombre d'électrodes,^{104, 105} il est souvent nécessaire d'avoir recours à l'utilisation d'un médiateur électrochimique qui, en plus de catalyser la régénération de la peroxydase sous sa forme native, permet de travailler à des potentiels rédox moins dénaturant pour l'enzyme.

γ) Couple glucose oxydase/ peroxydase

Afin de pouvoir suivre par spectrophotométrie les cinétiques enzymatiques de la glucose oxydase ou celles de la peroxydase, il est nécessaire d'utiliser un chromophore témoin de l'avancé de la catalyse. Le sel d'ammonium du 2,2'-azino-di[3-éthylbenzthiazoline-sulfonate] (ABTS, Sigma) est le chromophore qui a été retenu pour nos études. En effet, le peroxyde d'hydrogène, formé lors de l'oxydation du glucose (Équation 53), peut être réduit par l'ABTS. Cette réaction est catalysée par la HRP suivant l'Équation 58. Ici, l'ABTS joue le rôle de base de Lewis.



La solution du cation radicalaire ABTS^{·+} est verte et ainsi absorbe les longueurs d'onde autour de 405 nm. Les structures de l'ABTS et de sa forme oxydée sont présentées en Figure 37.

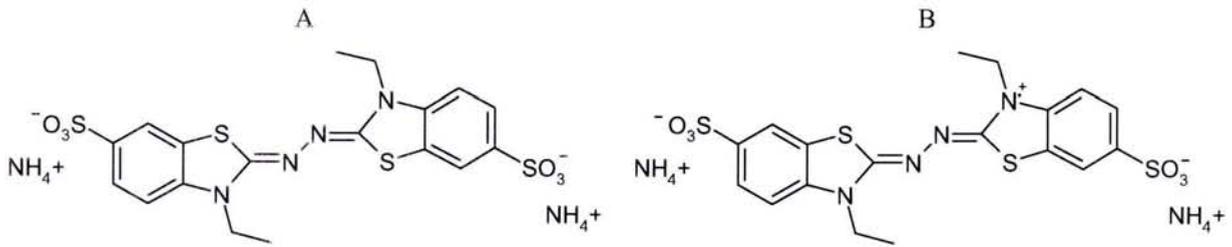


Figure 37. Structure de la forme (A) oxydée et (B) réduite du sel d'ammonium d'ABTS.

La valeur du coefficient d'extinction molaire de la forme oxydée de l'ABTS permet d'accéder à de l'activité spécifique de la GOX ainsi que celle de la HRP solubilisées (Équation 59).

$$A_S = \frac{\Delta(DO) \cdot V_{total}}{\epsilon_M \cdot V_{enzyme}} \quad (59)$$

Où $\Delta(DO)$ représente la vitesse de la réaction enzymatique exprimée en min^{-1} ; V_{total} , le volume total du milieu réactionnel contenu dans la cellule spectrophotométrique et V_{enzyme} , le volume d'enzyme introduit.

Le coefficient d'extinction molaire, ϵ_M , de la forme oxydée de l'ABTS a été déterminé expérimentalement. Il correspond à la valeur de la pente de la droite d'équation $DO=f([\text{substrat}]_0)$ avec DO , la valeur de l'absorbance mesurée à la fin de l'activité enzymatique et $[\text{substrat}]_0$, la concentration initiale en substrat. On se place alors en excès d'enzymes pour que la concentration finale en produit soit équivalente à $[\text{substrat}]_i$. On obtient un coefficient ϵ_M pour l'ABTS oxydé de $32,4 \text{ mM}^{-1}$ à 405 nm , $\text{pH}=7$.

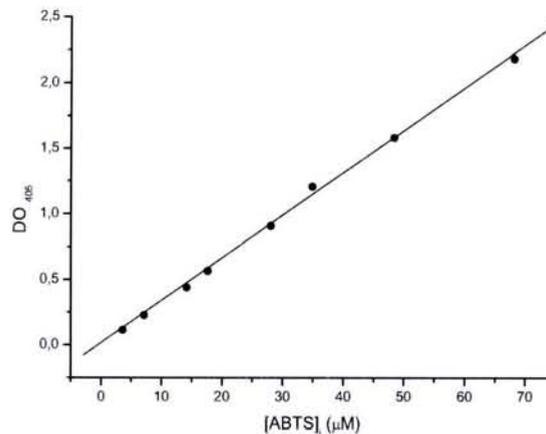


Figure 38. Courbe de régression linéaire permettant d'accéder à la valeur du coefficient d'extinction molaire de la forme oxydée de l'ABTS.

δ) Lipase

Les lipases font partie de la classe des hydrolases d'esters carboxyliques. Elles ont pour classification internationale : glycérol-ester-hydrolase (E.C.3.1.1.3). L'activité des lipases est plus importante pour des substrats insolubles (émulsions, liposomes, films monomoléculaires) que sur les mêmes substrats solubilisés sous forme monomérique. Les premières résolutions des structures tridimensionnelles de lipases aux rayons X^{106, 107} ont d'abord laissé supposer que le phénomène d'activation interfaciale¹⁰⁸⁻¹¹⁰ observé avec plusieurs lipases pouvait être lié à la présence d'une boucle peptidique recouvrant de site actif de certaines lipases en milieu aqueux. Cette boucle s'ouvrirait alors au contact d'une interface. Toutefois, il a été démontré par la suite que pour certaines lipases, la présence d'une boucle peptidique n'induisait pas forcément une activation interfaciale.¹¹¹⁻¹¹⁴ Le critère d'identification des lipases a donc été recadré sur le fait que ces enzymes catalysent l'hydrolyse des acylglycérols à chaînes longues ou analogues.

Les lipases sont utilisées en chimie fine dans l'hydrolyse d'esters, dans les réactions d'estérification, les transestérifications, les interestérifications ainsi que dans les réactions de transfert du groupement acyle d'un ester sur d'autres nucléophiles, tels que des amines ou des thiols. Elles sont utilisées dans l'industrie agro-alimentaire mais aussi dans les lessives pour éliminer les traces de graisse des vêtements.

Nous avons utilisé la lipase de *Candida cylindracea* (LIP) fournie par Biocatalysts. C'est une enzyme composée de 534 acides aminés et sa masse moléculaire est d'environ 60 kDa (Figure 39).

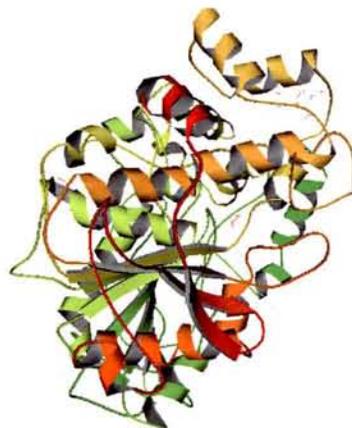
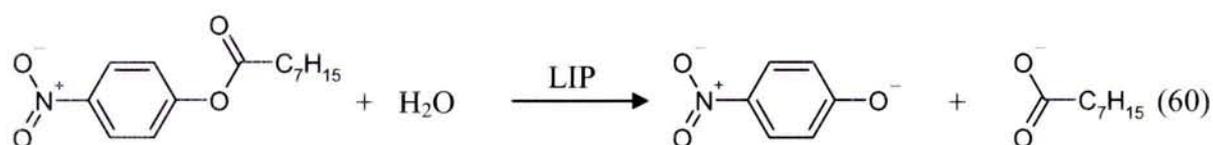


Figure 39. Structure tridimensionnelle de la lipase *Candida cylindracea* (code PDB : 1CLE).

Il existe de nombreuses méthodes permettant le dosage de l'activité catalytique des lipases.¹¹⁵ On peut citer à titre d'exemple, la spectrophotométrie, la méthode du pH-stat et la technique des films monomoléculaires. Dans nos études, le suivi de la cinétique lipolytique a été étudié grâce à l'utilisation d'un substrat non naturel de la lipase : le caprylate de *p*-nitrophényle¹¹⁶ (Prolabo). Le caprylate de *p*-nitrophényle étant soluble en milieu organique mais non en milieu aqueux, il est nécessaire de préparer des solutions micellaires de caprylate de *p*-nitrophényle/DMSO/eau pour pouvoir mesurer l'activité de la lipase de *Candida cylindracea* par spectrophotométrie. L'équation bilan du mécanisme correspondant est proposée ci-après.



Le *p*-nitrophénol, produit au cours de cette réaction, absorbe dans le visible les longueurs d'onde voisines de 412 nm.

12.d - Les solvants

Acétonitrile pour HPLC (Carlo Erba)

Acide trifluoroacétique (Sigma)

Chloroforme (Prolabo)

Dichlorométhane pour HPLC, stabilisé à l'amylène (Carlo Erba)

Diméthylformamide (Prolabo)

Diméthylsulfoxyde (SDS)

Eau MilliQ

Éthanol à 95 et 98% distillé

Tétrahydrofurane (Prolabo)

12.e - Les sels

t-BuPF₆, KNO₃, NaH₂PO₄, KHPO₄, *t*-ProBF₄

Hexacyanoferrate de potassium : K₄Fe(CN)₆, 3H₂O

Nitrate de cuivre : Cu(NO₃)₂

Hexafluorophosphate de cuivre : CuPF₆, [CH₃CN]₄

Sulfate de cérium : Ce(SO₄)₂

12.f - Autres produits

Acide phosphotungstique (Prolabo)

Peroxyde d'hydrogène (Carlo Erba et Prolabo)

Vert de méthylène (Sigma)

Hydroquinone (Prolabo)

Les thiols (Sigma)

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Chapitre I

Organisation de l'hydrophobine SC3 aux interfaces

I.1 - Organisation de la SC3 en milieu aqueux

L'étude physico-chimique de l'hydrophobine est primordiale pour la compréhension du processus d'assemblage de la protéine aux interfaces.

Les travaux de van der Heyden ont montré que l'hydrophobine SC3, comme l'hydrophobine HydPt1,²⁷ s'adsorbe spontanément à l'interface eau/air depuis sa solution aqueuse et forme ainsi des films de Gibbs comme les molécules tensioactives classiques.^{35, 36, 117} À partir de ces résultats, il nous été possible d'estimer la section d'aire occupée par protéine à l'interface. Il a ainsi été démontré que la SC3 adopte une conformation allongée dont l'axe principal serait orienté plus ou moins verticalement par rapport à l'interface eau/air. D'après les travaux de Zangi et ses collaborateurs, le film d'hydrophobine SC3 adsorbé à l'interface eau/air aurait une épaisseur d'environ 10 nm.²⁵ Ils ont alors proposé deux hypothèses : la première, conforme à notre hypothèse à savoir que l'hydrophobine serait allongée à l'interface eau/air ; la seconde, que l'hydrophobine pourrait former des multicouches de monomères sphériques à l'interface eau/air.

Ces études ont été complétées par des expériences de spectroscopie infrarouge de la protéine adsorbée à l'interface eau/air. Les résultats IRRAS indiquent que l'hydrophobine adsorbée à l'interface eau/air est principalement composée de feuilletts β agrégés (Figure 40). En effet, l'analyse des spectres IR montre l'existence de 3 pics d'absorption principaux positionnés à 1635, 1650 et 1670 cm^{-1} . Le large pic à 1650 cm^{-1} est souvent décrit dans la littérature comme résultant des différentes réflectivités de la surface de l'eau ; phénomène attribuable à la dépendance entre la longueur d'onde du faisceau incident et la composante complexe de l'indice de réfraction de l'eau.¹¹⁸ La restructuration des molécules d'eau à l'interface peut également expliquer la forte intensité de ce pic d'absorption.^{118, 119} Cette dernière hypothèse sera confortée par la suite car en présence d'un film lipidique et d'hydrophobine à l'interface eau/air, ce pic n'est plus observé (Cf. Paragraphe II.2.a). Le pic

observé à 1670 cm^{-1} quant à lui pourrait correspondre aussi bien à la présence de brins β^{120} au sein de la SC3 qu'à la présence de traces de TFA provenant des étapes de purification.^{121, 122} En effet, Surewicz et ses collaborateurs ont montré que l'apparition d'un pic à 1670 cm^{-1} pourrait être la conséquence de l'absorption correspondant au mode de vibration ν_{COO} des groupements carboxyliques de l'acide. Dans ce cas, le pic à 1635 cm^{-1} est le seul qui peut être attribué à la présence de la protéine adsorbée et correspond à la présence de feuillettes β agrégés.^{123, 124} Ces résultats sont confirmés par le fait que le spectre réalisé avec un faisceau infrarouge *p*-polarisé sous un angle d'incidence de 62° , présente un unique et large pic à 1635 cm^{-1} (Figure 40B). L'inversion de signe de ce pic, par rapport aux signaux obtenus pour les angles d'incidence de 32 et 40° , apporte une information supplémentaire, à savoir que les moments dipolaires de transition des groupements amides constituant les feuillettes β sont orientés parallèlement à l'interface eau/air.¹²⁵ Remarquons que la structure secondaire de l'hydrophobine adsorbée à l'interface eau/air n'évolue pas au cours du temps (Figure 40C).

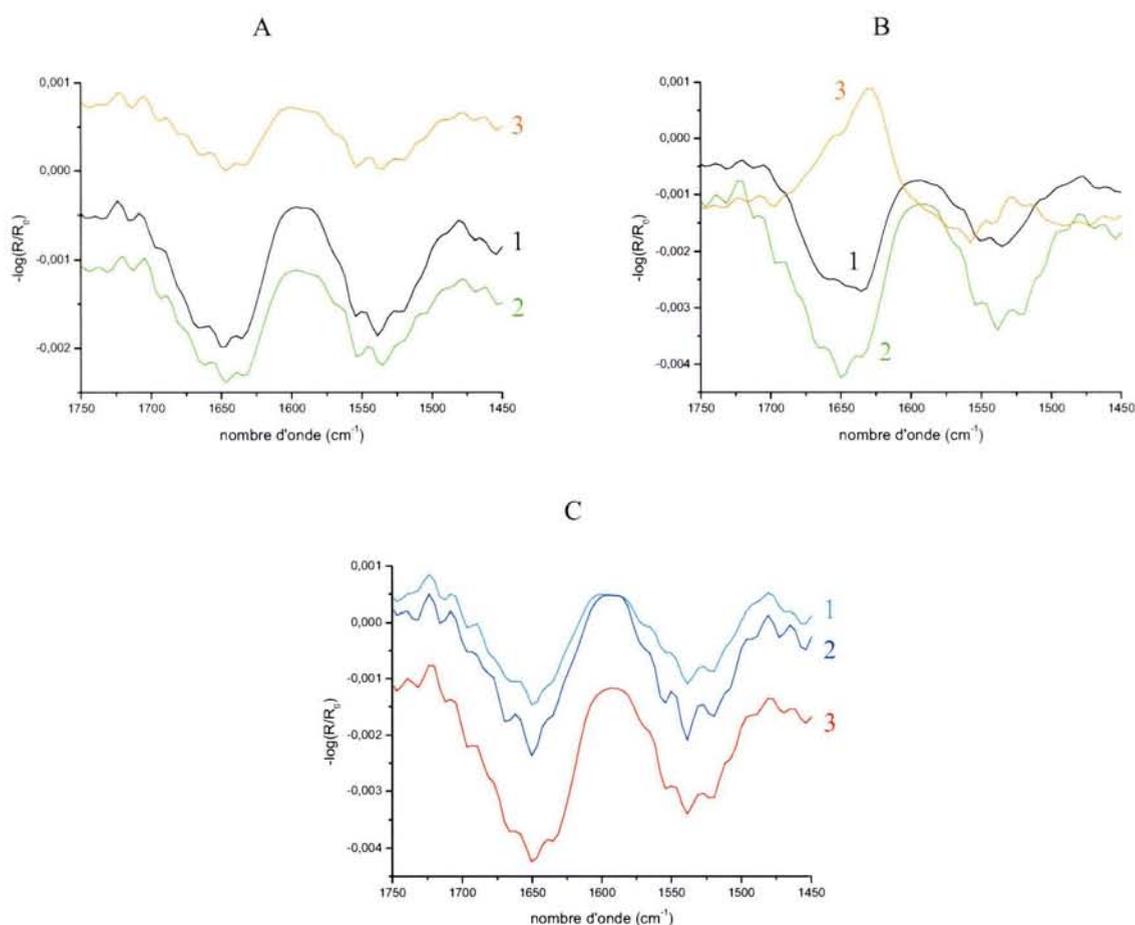


Figure 40. Spectre IRRAS de la SC3 adsorbée à l'interface eau/air. Expériences réalisées en fonction de l'angle d'incidence du faisceau infrarouge (A) *s*- et (B) *p*-polarisé : (1) 32° , (2) 40° et (3) 62° . (C) Expériences réalisées en fonction du temps d'adsorption de la protéine : (1) 2 heures, (2) 3 heures et (3) 24 heures. Concentration en SC3 : $0,360\text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Comme souvent décrit dans la littérature, les intensités des spectres obtenus avec une lumière infrarouge *p*-polarisée sont plus intenses que celles des spectres obtenus avec une lumière *s*-polarisée.^{125, 126} Aussi, nous nous intéresserons par la suite qu'aux mesures en IRRAS réalisées avec une lumière *p*-polarisée dont l'angle d'incidence est de 40° comme présenté en Figure 40C (Cf. Chapitre II).

La stabilité du film adsorbé à l'interface eau/air a été démontrée par simple compression au moyen d'une balance de Langmuir. En effet, après adsorption spontanée de la protéine durant 60 minutes à l'interface eau/air, il se forme un film protéique qui ne se solubilise ni dans le temps ni sous de fortes contraintes mécaniques (Figure 41). C'est sans doute pour cette raison que les films d'hydrophobines formés aux interfaces sont qualifiés dans la littérature de membranes protéiques.¹²⁷

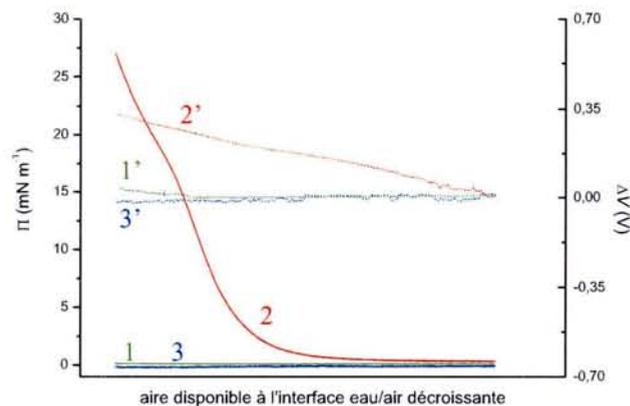


Figure 41. Isothermes (—) Π - A et (---) ΔV - A des sous-phases protéiques de (1) lysozyme et de (2) SC3. (3) Isothermes de référence avec sous-phase d'eau pure. Concentration en SC3 : $0,360 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

En comparaison, l'adsorption puis la compression du lysozyme dans les mêmes conditions ne conduisent pas aux mêmes phénomènes. En effet, la pression de surface reste nulle tout au long de la compression. Seul le potentiel de surface augmente pour un état très condensé du film du lysozyme. Ceci pourrait être expliqué par le fait que le lysozyme est bien présent à l'interface mais dénaturé d'un point de vue perte d'activité interfaciale, lorsqu'il est adsorbé à l'interface eau/air comme l'ont démontré Postel et ses collaborateurs.¹²⁸

Par ailleurs, des études Π - A menées par un groupe de chercheurs finlandais ont montré que les hydrophobines HFBI et HFBII forment également des films de Langmuir.²⁴ Chacun de ces films forme alors un réseau cristallin bidimensionnel qui a pu être étudié par microscopie à force atomique après transfert de Langmuir-Blodgett de ces films sur feuilles de mica.²⁴ Or, les hydrophobines de classe II auxquelles appartiennent la HFBI et la HFBII sont moins stables que celles de classe I dont la SC3 fait partie.²² Nos résultats combinés avec ceux précédemment évoqués suggèrent que l'hydrophobine SC3 posséderait elle aussi une structure cristalline bien définie dans les films de Langmuir. De plus, de Vocht et ses collaborateurs ont montré qu'il y a l'augmentation du pourcentage de feuillettes β dans les formes assemblées des hydrophobines par rapport aux formes solubles pour les hydrophobines de classe I et non pour celles de classe II.¹²³ Les feuillettes β sont donc supposés stabiliser les assemblages moléculaires de la protéine. On peut ainsi supposer que le remaniement conformationnel de la SC3 est dû à un environnement différent à l'interface eau/air qu'en volume et qu'il serait à l'origine de l'ancrage de la protéine à cette interface ; et comme nous le verrons, aux interfaces hydrophile/hydrophobe en général.

La taille des particules d'hydrophobine SC3 en solution a été mesurée par la technique de diffusion de lumière. Pour les concentrations en protéine inférieures à $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$, valeur de la concentration d'agrégation critique (CAC) de la SC3 dans l'eau pure,²⁹ deux populations constituées d'objets de tailles distinctes de 30 et 1400 Å environs ont été observées (Figure 42). Pour des concentrations en SC3 supérieures à la CAC, nous avons obtenu la disparition de la population de 30 Å de diamètre et l'apparition de petits agrégats (~ 200 Å) en plus faibles proportions. Notons que Wang et ses collaborateurs ont également mis en évidence deux populations de tailles distinctes pour des solutions de SC3 solubilisée dans un tampon phosphate (4°C , $[\text{SC3}] = 1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Dans ces conditions, les diamètres moyens des deux populations obtenus ont été respectivement de 34 et de 270 Å. Toutefois, pour obtenir avec précision la valeur de 34 Å, les auteurs ont eu recours à la chromatographie d'exclusion de taille.¹²⁹

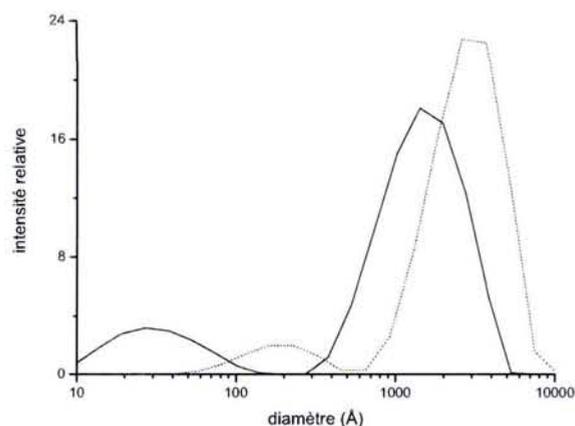


Figure 42. Diamètres des particules d'hydrophobine SC3 pour des solution aqueuse de concentration (—) 26 et (....) 732,8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Selon l'Équation 52, une protéine sphérique de même poids moléculaire que celui de la SC3 devrait avoir un diamètre théorique de 32 Å.¹³⁰ Ainsi, les résultats obtenus en diffusion de lumière suggèrent qu'à de faibles concentrations en SC3, il y a coexistence, en solution aqueuse, de monomères plus ou moins sphériques et d'agrégats de la protéine. En fait, le comportement de l'hydrophobine est beaucoup plus complexe que celui des molécules tensioactives classiques. En effet, la CAC déterminée à partir de l'isotherme d'adsorption de la protéine à l'interface eau/air, ne décrit pas le début du processus d'agrégation de la SC3 en volume mais correspondrait plutôt à la saturation de l'interface eau/air par la protéine. L'agrégation spontanée de la SC3 est, quant à elle, inévitable. Afin d'estimer la structure secondaire qu'adopte l'hydrophobine SC3 dans nos conditions de travail, des expériences en dichroïsme circulaire ont été réalisées. Les résultats obtenus sont représentés en Figure 43.

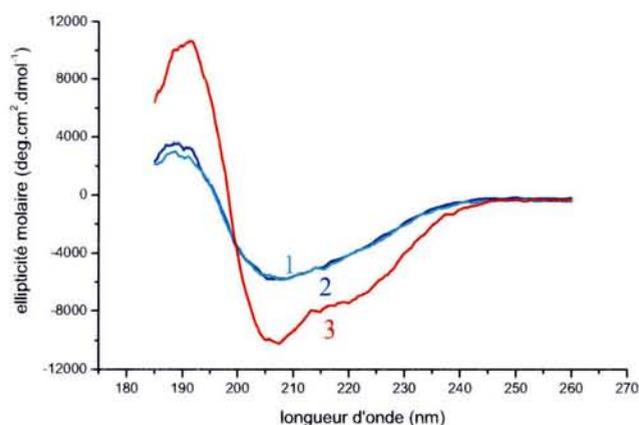


Figure 43. Spectres de dichroïsme circulaire de solutions aqueuses de SC3 à (1) 0,3 mg.mL^{-1} (2) 0,6 mg.mL^{-1} et à (3) 0,3 mg.mL^{-1} dans un mélange eau/ hexafluoroisopropanol (50/50).

Nous pouvons constater que la SC3 adopte en solution une conformation secondaire essentiellement constituée de feuillets β , comme décrit dans la littérature.¹³¹ Les feuillets β , responsables de la stabilité des formes assemblées de la SC3, comme nous l'avons vu précédemment, pourraient être induits par les interactions interprotéiques à l'origine de la formation des agrégats observés par la technique de diffusion de lumière.

Lorsque la SC3 est placée dans un milieu aqueux en présence de molécules hydrophobes telles que l'hexafluoroisopropanol, la formation d'hélices α est observée (Figure 43). Ici encore, la structure secondaire adoptée par l'hydrophobine SC3 dans un environnement hydrophile/hydrophobe – mélange liquide/liquide dans notre cas – diffère de celle adoptée en solution aqueuse. Le même changement de conformation de feuillets β en hélices α a également été observé par de Vocht et ses collaborateurs lors de l'introduction de Téflon[®] colloïdal en suspension ou de trifluoroéthanol dans une solution aqueuse de SC3.¹²³

I.2 - Auto-assemblage de la protéine sur support solide

I.2.a - Adsorption de la SC3 sur supports solides

Différentes surfaces solides ont été modifiées par auto-assemblage de l'hydrophobine SC3 depuis sa solution aqueuse, comme décrit dans la partie Matériel et Méthodes. Afin de mettre en évidence l'adsorption de la protéine sur ces surfaces, nous avons traité au TFA chacune d'elles. Le TFA permet de désorber la protéine du support solide sur lequel elle a été auto-assemblée. L'échantillon de SC3 récupéré pour chaque surface est d'abord solubilisé dans un tampon de migration d'électrophorèse, puis déposé sur gel d'électrophorèse en polyacrylamide (SDS-PAGE). La Figure 44 montre les résultats obtenus après électrophorèse du gel.

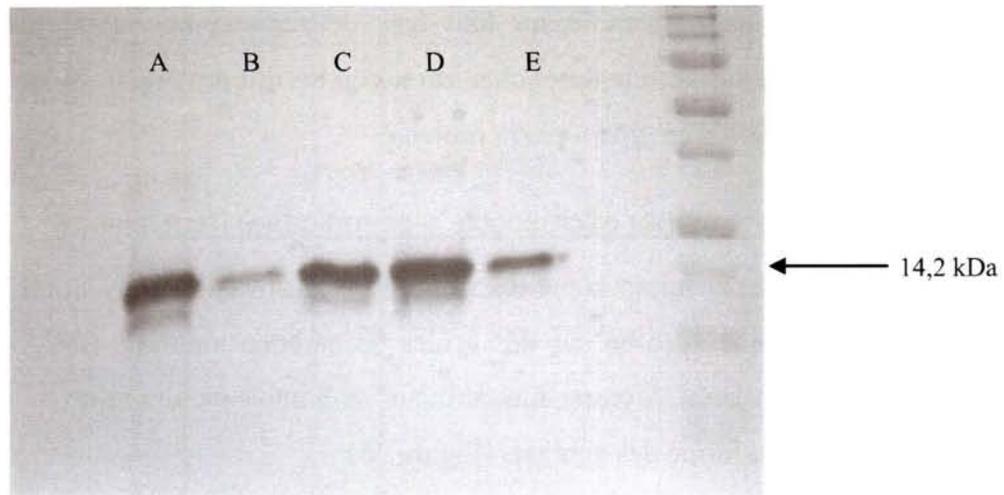


Figure 44. Gel SDS-PAGE 12,5% de la SC3 désorbée (A) d'une feuille de Téflon[®], (B) d'une surface en verre, (C, D) de Téflon[®] de deux fournisseurs différents et (E) d'acier inoxydable. Révélation au nitrate d'argent.

1.2.b - Mesure d'angle de contact

La détermination des propriétés polaires/apolaires des surfaces avant et après modification nous a permis, via la mesure d'angle de contact, de mieux comprendre le processus d'auto-assemblage de la SC3 sur ces supports solides.

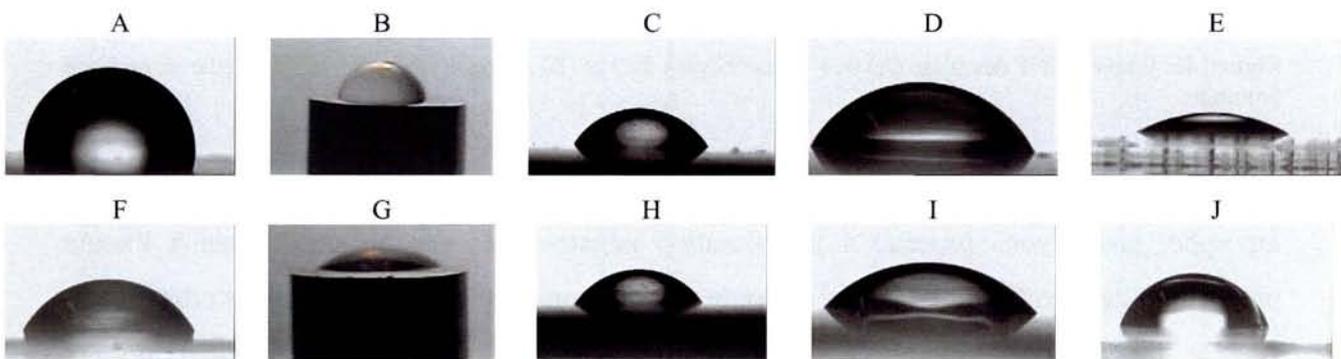


Figure 45. Mouillabilité de surfaces propres (ligne du haut) et modifiées par la SC3 (ligne du bas). Les valeurs des angles de contact sont pour les surfaces en (A) Téflon[®] : $108,1^\circ \pm 3,6$; (B) carbone vitreux : $88,7 \pm 3,4$; (C) acier inoxydable : $67,8^\circ \pm 3,8$; (D), polystyrène : $62,4^\circ \pm 0,8$; (E) verre : $33,4^\circ \pm 2,7$; (F) SC3/Téflon[®] : $46,4^\circ \pm 6,7$; (G) SC3/carbone vitreux : $41,0 \pm 4,8$; (H) SC3/acier inoxydable : $54,7^\circ \pm 4,0$; (I) SC3/polystyrène : $55,4^\circ \pm 6,6$; et (J) SC3/verre : $54,6^\circ \pm 5,3$.

Comme le montrent les résultats obtenus avec le Téflon[®] et le carbone vitreux, plus une surface est hydrophobe, plus l'assemblage protéique a pour effet de changer les propriétés polaires/apolaires de cette surface (Figure 45). Ce phénomène est aussi observé dans le cas des surfaces hydrophiles comme le verre qui est rendu moins hydrophile après adsorption de la SC3. L'auto-assemblage de la protéine sur des surfaces intermédiaires (angle de contact voisin de 60°) comme le polystyrène ou l'acier inoxydable, n'entraîne pas d'importantes modifications des angles de contact. Tous ces résultats montrent d'une part que

l'hydrophobine s'auto-assemble sur tout type de surface, et d'autre part, qu'elle a plus d'affinité pour les surfaces hydrophobes et/ou que le film protéique est agencé différemment en fonction de la surface « vue » par la protéine.

1.2.c - Imagerie par microscopie électronique à transmission

L'imagerie par microscopie électronique à transmission nous a permis de visualiser le film d'hydrophobine adsorbé sur des grilles de carbone amorphe (GCA). L'hydrophobine SC3 s'adsorbe sur la GCA en un film structuré et homogène alors que le lysozyme, dans les mêmes conditions, forme des agrégats (Figure 46).

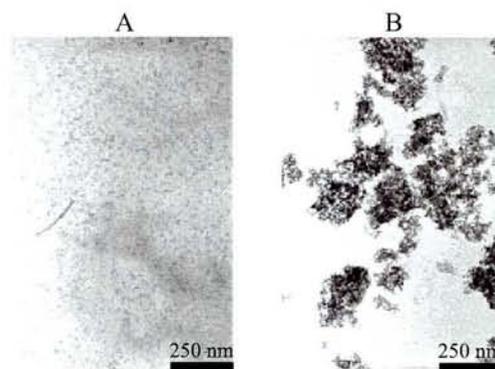


Figure 46. Images MET des films (A) de l'hydrophobine SC3 et (B) du lysozyme adsorbés sur grille de carbone amorphe.

Afin de mieux percevoir la structure du film de SC3 formé sur les surfaces de carbone amorphe, nous avons procédé à la coloration négative des échantillons traités à l'acide phosphotungstique (Figure 47). On constate dès lors que le film d'hydrophobine adsorbé sur surface de carbone amorphe est non seulement homogène mais également poreux (Figure 47A-C). De plus, on s'aperçoit que le film peut se former aux interstices eau/air d'une grille dite à trous ; et ce, par les seules interactions interprotéiques (Figure 47D-F). Cette dernière observation confirme l'organisation particulière de la protéine en fonction de l'interface à laquelle elle est adsorbée.

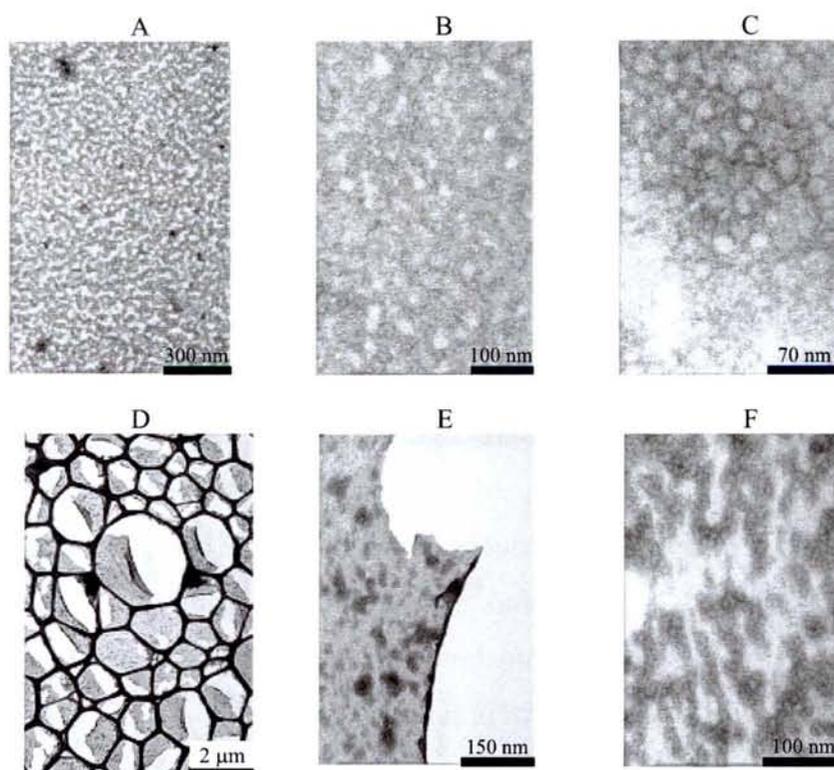


Figure 47. Images MET des films de SC3 adsorbés (A-C) sur carbone amorphe et (D-F) aux interstices d'une grille de carbone amorphe dite à trous. Les échantillons ont été contrastés par la technique de coloration négative.

Par ailleurs, les épaisseurs des films présentés ici ont également été estimées par la méthode de spectroscopie de perte d'énergie des électrons transmis (EELS) dont les résultats seront détaillés dans le Paragraphe I.2.e.

Notons que les propriétés apolaires du carbone amorphe sont voisines de celles du carbone vitreux utilisé précédemment pour les expériences d'angle de contact et par la suite pour les expériences d'électrochimie et de spectroscopie UV-visible. En effet, les mesures d'angle de contact indiquent que les deux surfaces nues sont relativement hydrophobes avec des angles de contact voisins (Figure 48). Aussi, les approximations que nous ferons par la suite, à savoir la comparaison entre la quantité d'enzyme immobilisée sur GCA modifiées et la quantité de la même enzyme immobilisée sur ECV modifiées (Cf. Paragraphe III.2.c), tiennent compte de ce résultat.



Figure 48. Mesure d'angle de contact sur surfaces de carbone (A) vitreux : $88,7^\circ \pm 3,4$ et (B) amorphe : $87,8^\circ \pm 4,2$.

1.2.d - Mise en évidence de la porosité du film protéique

L'étude électrochimique par voltampérométrie cyclique d'une petite molécule électroactive comme le peroxyde d'hydrogène nous a permis de confirmer la porosité du film observée au MET. Pour ce faire, il est alors nécessaire de connaître la concentration en H_2O_2 introduit en volume dans la cellule électrochimique. Ainsi, avant chaque série d'expériences, la solution de H_2O_2 utilisée a été dosée par le sulfate de cérium^{IV}.

a) Dosage potentiométrique de H_2O_2

Le dosage d'une solution diluée de H_2O_2 a été réalisé par une solution de sulfate de cérium^{IV}, $Ce(SO_4)_2$, dont la concentration exacte a été déterminée par un premier dosage potentiométrique (Figure 49A). Le réactif utilisé dans ce cas a été le sel de Mohr. Le second dosage, permettant de connaître la concentration en peroxyde d'hydrogène, a pu être alors réalisé par le Ce^{IV} (Figure 49B).

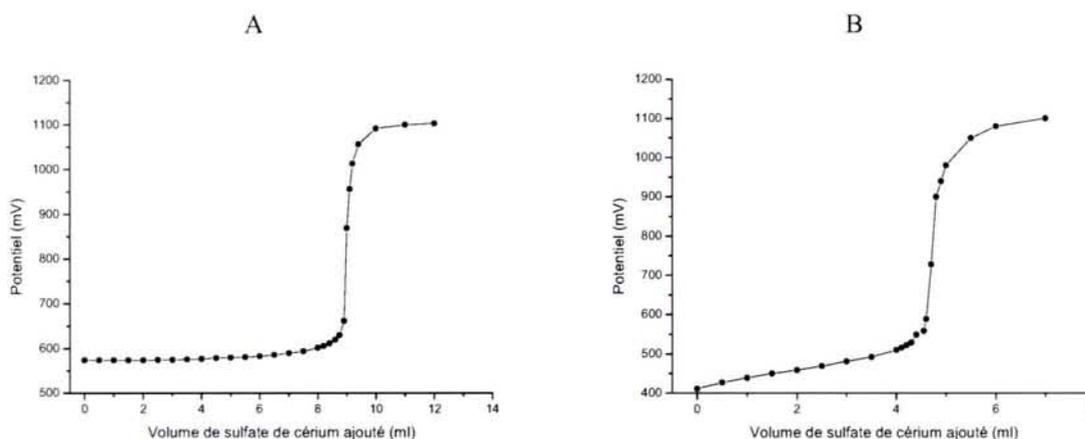
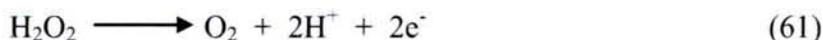


Figure 49. Courbes de dosage potentiométrique (A) d'une solution de sulfate de cérium et (B) d'une solution diluée de H_2O_2 .

β) Voltampérométrie cyclique en solution aqueuse

La perméabilité du film d'hydrophobine auto-assemblé sur ECV a été vérifiée en solution aqueuse par voltampérométrie cyclique. Lorsqu'une ECV nue est immergée dans une solution diluée de H_2O_2 , on observe, à un potentiel d'environ 1,2 V, un signal d'oxydation du peroxyde d'hydrogène suivant l'Équation bilan 61. L'intensité du signal est alors proportionnelle à la concentration en espèce électroactive (Équation 49).



La Figure 50 montre qu'une ECV recouverte par un film d'hydrophobine permet aussi l'obtention de ce signal d'oxydation dans les mêmes conditions expérimentales. Toutefois, il semble que l'électrode modifiée par la SC3 ait une meilleure sensibilité envers la détection du peroxyde d'hydrogène que l'électrode non modifiée. En effet, alors que le seuil de détection de H_2O_2 est voisin de 0,2 mM pour l'électrode modifiée (Figure 50B), il est supérieur à 0,9 mM pour l'électrode nue. Ceci pourrait être lié à la diminution du courant capacitif induit par la présence de la SC3²⁷ et/ou à l'accumulation locale de H_2O_2 régie par les interactions polaires à la surface de l'électrode modifiée.¹³⁰

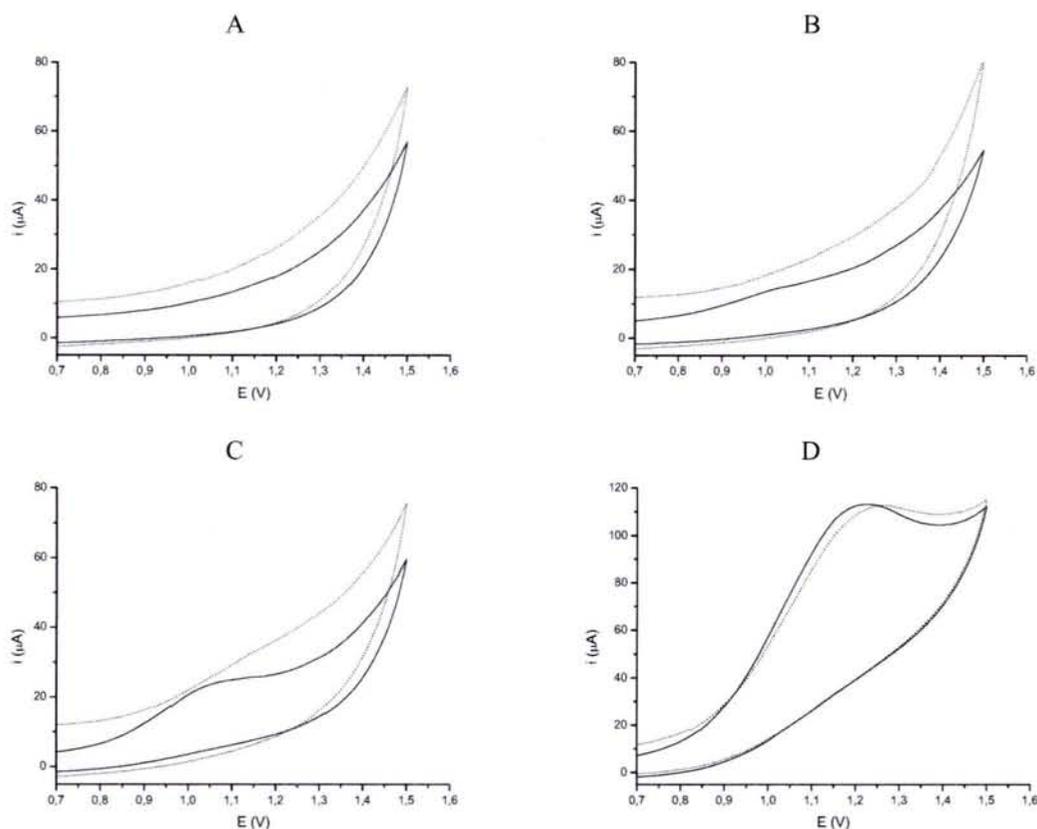


Figure 50. Voltampérogrammes cycliques enregistrés dans un tampon phosphate 50 mM, pH 7 (A) en absence et (B-C) en présence de peroxyde d'hydrogène. Vitesse de balayage : $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$. Concentrations en H_2O_2 : (A) 0,0 ; (B) 0,2 ; (C) 0,6 et (D) 4,3 mM. Électrode de travail utilisée : ECV (....) nue et (—) modifiée par la SC3.

1.2.e - Épaisseurs des films de SC3 adsorbés sur surfaces solides

α) SC3 adsorbée sur support hydrophile de mica

Grâce à la technique de franges d'ordre chromatique égal (FECO), nous avons pu déterminer l'épaisseur du film formé par la SC3 sur des feuilles de mica. En effet, à partir des franges d'interférences obtenues (Figure 51A) et de l'Équation 41, il a été possible d'accéder à l'ordre chromatique des deux franges observées. Pour la frange d'ordre chromatique $N=13$, λ_1 et λ'_1 correspondent aux longueurs d'onde réfractées, respectivement, par le mica non modifié et par le film d'hydrophobine. De même pour λ_2 , et λ'_2 avec $N=14$. Notons que les différences $\lambda_1 - \lambda_2$ et $\lambda'_1 - \lambda'_2$ sont toutes les deux égales à 39 nm.

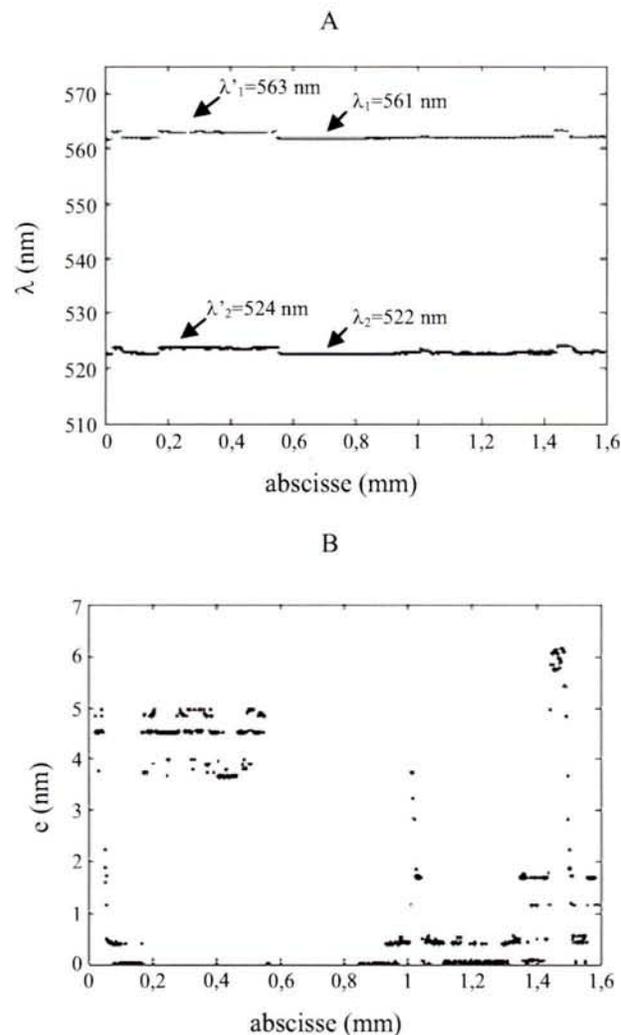


Figure 51. (A) Franges d'interférences obtenues au FECO représentant la longueur d'onde réfractée en chaque point situé sur une direction horizontale de l'échantillon appelée abscisse. (B) Épaisseur du film d'hydrophobine auto-assemblé sur une surface de mica en fonction de l'abscisse de l'échantillon.

La présence du film d'hydrophobine induit une augmentation de la longueur d'onde réfractée de 2 nm pour les abscisses comprises entre 0,20 et 0,58 mm. Comme nous l'avons énoncé dans la partie Matériel et Méthodes (Cf. Pages 42 et 43), on accède à l'épaisseur du film d'hydrophobine via la détermination de l'épaisseur de la feuille de mica non modifiée et l'indice de diffraction de la couche d'hydrophobine auto-assemblée. Cette épaisseur est représentée en fonction de l'abscisse horizontale de l'échantillon (Figure 51B). Sur le mica, la SC3 s'auto-assemble donc pour former un film quasi-uniforme de 47 Å d'épaisseur. Ce résultat laisse penser que l'hydrophobine s'adsorberait en formant une monocouche de protéines plus ou moins sphériques sur les surfaces hydrophiles telles que le mica.

β) SC3 adsorbée sur support hydrophobe de carbone amorphe

Les mesures par spectroscopie de perte des électrons transmis permettent d'obtenir l'épaisseur du film de la SC3 auto-assemblée sur les surfaces de carbone amorphe. Les résultats sont présentés dans le tableau suivant.

Tableau 1. Valeurs des épaisseurs des films de SC3 auto-assemblés sur GCA.

Support solide	E_0 (keV)	λ (nm)	e_{SC3} (Å)
GCA	120	124	203
GCA	160	143	202
GCA à trous	200	124	60

Nous pouvons remarquer que l'épaisseur du film ne varie pas avec l'énergie du faisceau. En fait, ni le vide poussé, ni l'énergie du faisceau électronique incident n'altèrent le film d'hydrophobine au cours d'une expérience qui peut durer jusqu'à une dizaine de minutes. Ces résultats combinés avec ceux obtenus par FECO indiquent que l'épaisseur du film de SC3 est manifestement fonction de l'interface liquide/solide ou liquide/liquide perçue par la protéine. Aussi, nous nous sommes proposés d'étudier la modification, à l'aide de l'hydrophobine, d'électrodes d'or fonctionnalisées par chimisorption de thiols de natures différentes.

1.2.f - L'hydrophobine SC3 adsorbée sur électrodes d'or modifiées

Des surfaces d'électrode d'or modifiées par auto-assemblage de monocouche de thiols (SAM) ont été utilisées pour servir de support à l'auto-assemblage de la SC3. Les thiols utilisés, diffèrent de par la nature du second groupement fonctionnel terminal (méthyle, acide carboxylique ou hydroxyle). L'avantage de cette approche est de pouvoir travailler avec des matériaux de base identique mais dont la surface est modifiée par une monocouche de propriétés physico-chimiques et d'épaisseur déterminées.

La voltampérométrie est une méthode de choix pour l'étude des SAM chimisorbés sur électrodes d'or.^{132, 133} Dans nos travaux, nous avons utilisé l'hexacyanoferrate de potassium comme sonde afin d'estimer l'efficacité de recouvrement (ER) du film d'hydrophobine adsorbé sur électrodes fonctionnalisées (Figure 52).

Notons que le thiol 11-mercapto-undecanoïque est auto-assemblé sur les électrodes d'or sous forme protonée de l'acide carboxylique. Toutefois, sachant que le pKa de ce groupement est de 4,5 et que les voltampérogrammes ont été enregistrés à pH 7, nous avons travaillé avec la forme déprotonée du thiol, notée : $-\text{COO}^-$. Le 11-mercapto-1-undecanol et le 1-dodécane-thiol seront notés, respectivement, $-\text{CH}_3$ et $-\text{OH}$

Comparer l'effet de la nature de la terminaison de la monocouche sur l'accessibilité de l'hexacyanoferrate de potassium à l'électrode d'or avant et après auto-assemblage de la SC3 nous a permis de constater que l'efficacité de recouvrement de la protéine est bien fonction de la nature polaire/apolaire du groupement fonctionnel terminal de la SAM. En effet cette efficacité évolue comme suit : $\text{ER}(-\text{CH}_3) > \text{ER}(-\text{COO}^-) > \text{ER}(-\text{OH})$. Ce résultat semble être cohérent avec les études d'angle de contact réalisées et aussi avec les hypothèses émises dans la littérature, à savoir que l'hydrophobine a plus d'affinité pour les surfaces hydrophobes que pour les surfaces hydrophiles.¹³⁴⁻¹³⁶ Toutefois, si l'on tient compte des résultats des mesures d'épaisseur du film de la SC3 en fonction de la nature de la surface sur laquelle il est adsorbé, un autre paramètre à savoir l'agencement structural de la SC3, est également régi par la nature polaire/apolaire de la surface. Les travaux avec les électrodes modifiées par les SAM sont en cours de réalisation et permettront d'infirmer ou de confirmer les deux théories proposées ci-dessus.

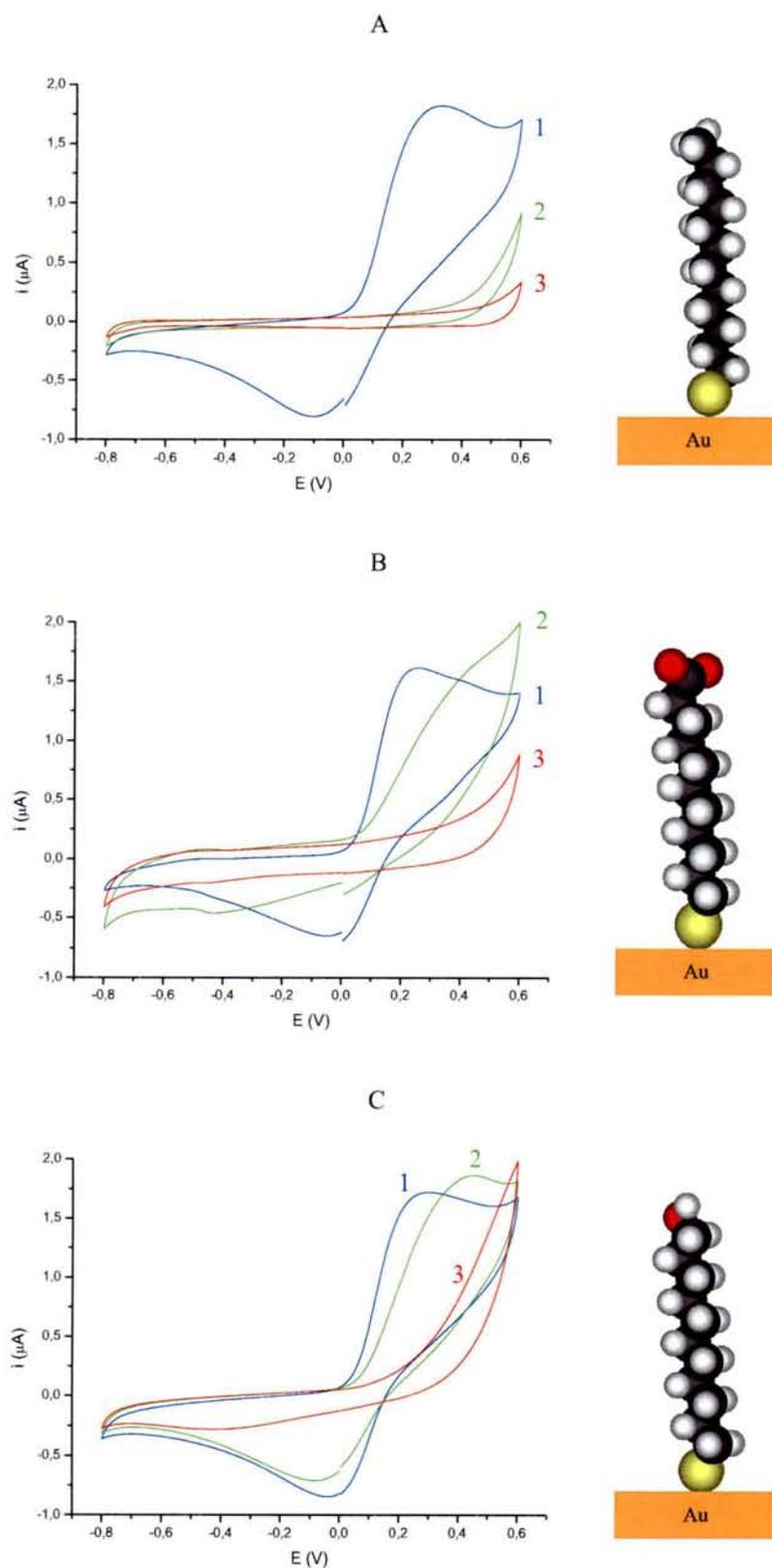


Figure 52. Voltampérogrammes enregistrés dans une solution d'hexacyanoferrate de potassium 1mM. Électrodes de travail : électrodes d'or (1) nue et recouverte de (2) thiols et de (3) SC3/thiols. Les thiols utilisés : (A) $-\text{CH}_3$, (B) $-\text{COO}^-$ et (C) $-\text{OH}$. Vitesse de balayage : $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$. Électrolyte support : tampon phosphate, pH 7.

I.3 - Conclusion

L'agencement structural des hydrophobines et en particulier celui de l'hydrophobine SC3 est très complexe. Hydrosoluble après purification et traitement à l'acide TFA, la solution aqueuse de la SC3 n'est pas homogène en taille. En effet, nous avons mis en évidence par la technique de diffusion de lumière la présence de deux populations de tailles distinctes ; quelque soit la concentration en protéine. Pour les concentrations inférieures à la concentration d'agrégation critique, les deux populations observées correspondent à des monomères et à des petits agrégats alors que pour les concentrations supérieures à la CAC nous observons des agrégats de moyennes et plus grandes tailles. Cependant, il se pourrait que l'équilibre d'agrégation de la protéine soit déplacé vers la formation des monomères lorsque celle-ci est adsorbée à l'interface eau/air. À cette interface, la protéine adopterait alors une conformation plus ou moins allongée dont l'axe principal serait orienté plus ou moins perpendiculairement à l'interface. D'une manière générale, il a été démontré qu'il se produit un réarrangement structural de la protéine lorsque celle-ci est placée au sein d'un système interfacial hydrophile/hydrophobe. En effet, comparée à la structure secondaire adoptée par la SC3 en volume, essentiellement composée de feuillet β , nous observons la formation d'hélices α lorsque la protéine est placée à interface hexafluoroisopropanol/eau ; alors que dans le cas de l'interface eau/air, on note une augmentation du pourcentage de feuillets β .

Le film de SC3, auto-assemblé sur surface solide, recouvre cette surface de manière uniforme et structurée. Ceci pourrait être expliqué par le fait que les interactions protéine-surface solide, plus fortes que les interactions protéine-protéine, conduiraient à la formation de films de SC3 d'épaisseur comparable à celle d'une monocouche de la protéine ; et ce même à partir des solutions de concentration en hydrophobine élevée. La SC3 adsorbée sur les surfaces hydrophobes, adopterait dans ce cas une conformation allongée comparable à celle adoptée par les hydrophobines HydPt-1 et SC3 à l'interface eau/air. L'épaisseur du film relatif à l'agencement est alors fonction de la nature polaire/apolaire de la surface. Par ailleurs, le film d'hydrophobine SC3 semble inaltérable sous vide et sous forte énergie électronique incidente pour des temps d'exposition raisonnables. La présence de pores au sein du film adsorbé sur électrode de carbone permet non seulement la détection mais aussi l'abaissement de la limite de détection d'une petite molécule hydrophile : le peroxyde d'hydrogène. En parallèle, des études d'organisation de la SC3 sur des monocouches de groupements terminaux différents et auto-assemblées sur surface d'or ont confirmé le fait que

la nature physico-chimique de l'interface en contact avec la protéine influence son auto-assemblage à cette interface. Il a d'ailleurs été admis que c'est la ségrégation des parties polaires et des parties non polaires qui permet l'ancrage de la SC3 aux interfaces hydrophile/hydrophobe.

L'affinité ainsi que l'agencement de la SC3 seraient régis par la nature polaire/apolaire de l'interface à laquelle elle s'adsorbe pour former un film de structure bien définie. Le chapitre suivant apportera d'autres informations quant à ce phénomène très particulier. En effet, via l'impact de la protéine sur des systèmes lipidiques de structure contrôlée, nous verrons que la conformation de la SC3 évolue en fonction de l'entité lipidique avec laquelle elle interagit.

Chapitre II

Interactions hydrophobine - membranes modèles

Comme il l'a été rappelé en introduction de ce manuscrit, les hydrophobines sont des médiateurs protéiques nécessaires à la croissance et à la prolifération des champignons. Très tensioactives, elles adhèrent fortement aux parois des hyphes sans pour autant provoquer la destruction des cellules fongiques.¹⁵ Par ailleurs, le fait que les hydrophobines s'auto-assemblent sur les parois des hyphes aériens et non sur celles des hyphes immergés dans leur milieu aqueux de culture, reste encore inexplicé.¹³ Nous nous sommes donc proposés d'étudier l'impact de l'hydrophobine SC3 sur des modèles de mono- et bicouches de membranes lipidiques. Les monocouches, formées à l'interface eau/air, ont été étudiées par les techniques de mesure de pression (Π -A) et potentiel (ΔV -A) de surface, la microscopie à angle de Brewster (BAM), la diffraction des rayons X sous incidence rasante (GIXD) et la spectroscopie infrarouge de réflexion-absorption (IRRAS). La conformation de l'hydrophobine en interaction avec les monocouches a, elle aussi, été étudiée et comparée aux résultats d'adsorption de la protéine à l'interface eau/air. La diffraction des rayons X aux petits angles (SAXS) a permis d'étudier les modèles de bicouches.¹³⁷

II.1 - Impact de la SC3 sur des monocouches lipidiques

L'utilisation de lipides étalés à l'interface eau/air, en tant que membranes modèles est fréquemment décrite dans la littérature.¹³⁸⁻¹⁴¹ Bien que les phospholipides constitutifs des membranes forment en réalité des bicouches, les interactions entre les têtes polaires et les molécules du milieu extra- ou intracellulaire peuvent être approchées par la technique des films monomoléculaires. Dans nos études, nous nous sommes principalement intéressés à l'influence de l'hydrophobine et du lysozyme sur l'organisation de monocouches de 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholine (DPPC) et de 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidyléthanolamine (DMPE) étalées à l'interface eau/air. Rappelons, à titre d'exemple, que les phosphatidylcholines et -éthanolamines représentent respectivement 19 et 18% du poids lipidique total des membranes des globules rouges chez l'Homme et que le taux de

phosphatidyléthanolamines chez *Escherichia coli* atteint 68% des lipides membranaires.³³ En parallèle, les impacts du lysozyme et de la SC3 sur des monocouches de lipides non membranaires tels que la monooléine ont également été étudiés.

II.1.a - Monocouches phospholipidiques à l'interface eau/air

Lorsque des molécules de DPPC sont étalées en phase gazeuse sur une sous-phase contenant la SC3, l'augmentation de la pression de surface (Π) dans le temps n'est observée qu'au bout de 20 minutes alors qu'à l'interface eau/air, le temps d'induction est de 3 heures (Figure 53). L'augmentation de Π étant la conséquence d'un équilibre d'adsorption/désorption de la protéine déplacé dans le sens de l'adsorption, nous pouvons en déduire qu'en présence des molécules phospholipidiques, la SC3 est moins désorbée de l'interface eau/DPPC/air qu'elle ne l'est à l'interface eau/air. Ce phénomène traduirait une forte interaction DPPC-SC3 et donc une accumulation rapide de la protéine.

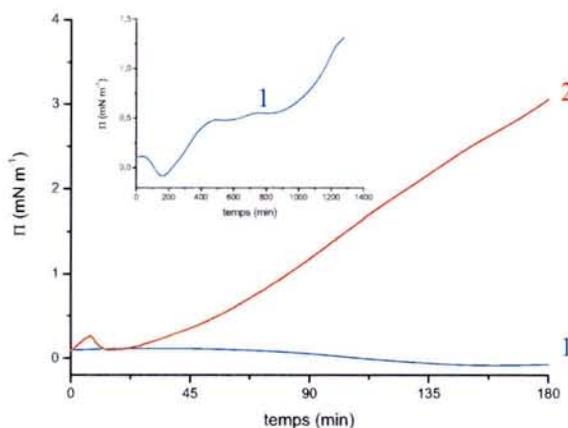


Figure 53. Cinétiques d'adsorption de l'hydrophobine SC3 (1) en absence et (2) en présence de molécules de DPPC à l'interface eau/air. Aire moyenne occupée par molécule de DPPC : 120 \AA^2 . En insert est présenté la cinétique d'adsorption de la SC3 à l'interface eau/air, enregistrée durant 22 heures. Concentration en SC3 : $0,360 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Dans ces conditions, les spectres IRRAS peuvent fournir des informations sur la structure secondaire de la protéine adsorbée à l'interface eau/DPPC/air de par la position des signaux observés dans la bande infrarouge d'adsorption située entre 1700 et 1600 cm^{-1} : bande amide I (Figure 54 et Tableau 5). Comme le montre la Figure 54C, on observe un changement de structure secondaire de l'hydrophobine SC3 lorsque la DPPC est étalée sur la sous-phase contenant la protéine. En effet, alors que la protéine est principalement composée de feuillets β parallèles à l'interface eau/air (Cf. Paragraphe I.1), en présence de DPPC, elle adopte une toute autre structure secondaire composée de feuillets β antiparallèles¹⁴² (1628 cm^{-1}) et

d'hélices α^{131} (1662 cm^{-1}). Cependant, contrairement aux hélices α généralement observées à 1658 cm^{-1} pour de nombreuses protéines, le décalage observé vers 1662 cm^{-1} est dû à des entassements intermoléculaires ou à des liaisons hydrogène intramoléculaires plus faibles.¹²⁰

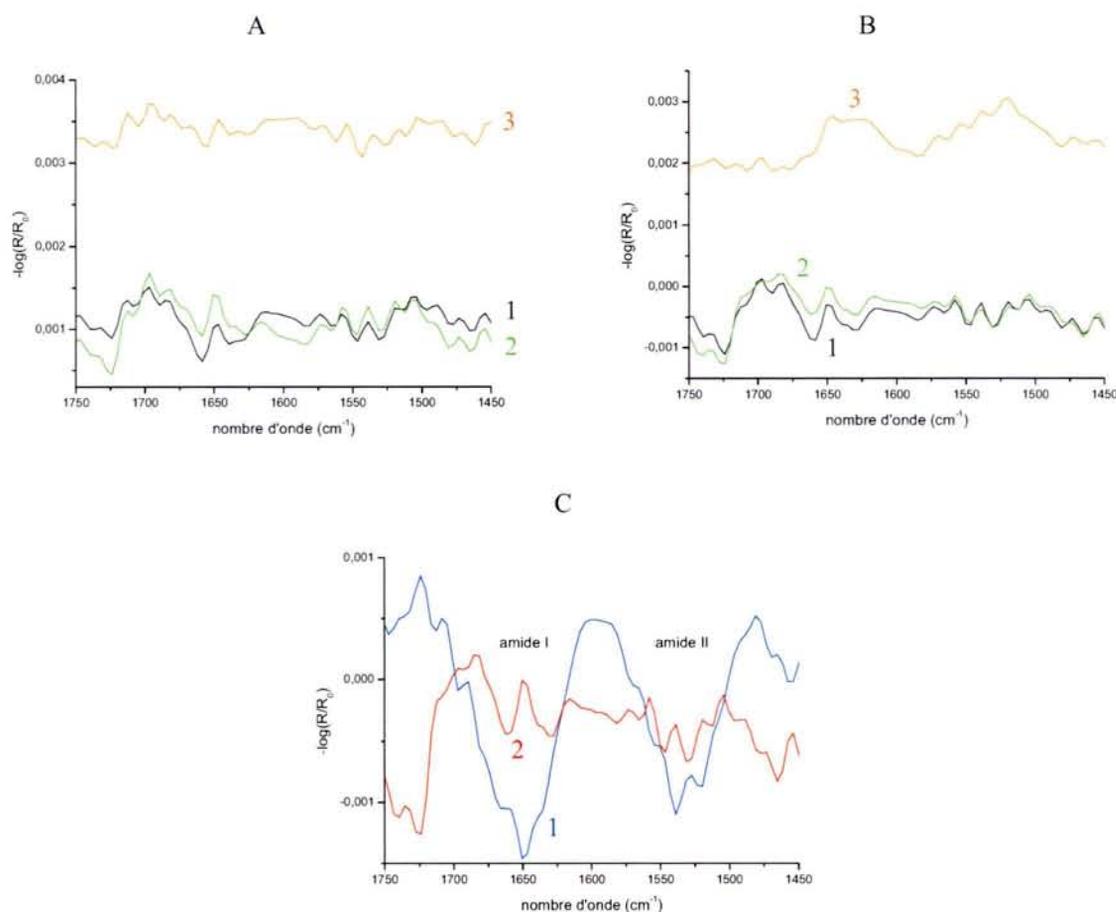


Figure 54. Spectre IRRAS de la SC3 adsorbée à la monocouche de DPPC étalée en phase gazeuse après de deux heures d'adsorption. Expériences réalisées en fonction de l'angle d'incidence du faisceau infrarouge (A) *s*- et (B) *p*-polarisé : (1) 32, (2) 40 et (3) 62°. (C) Comparaison entre les spectres IRRAS 40°*p* de la SC3 adsorbée aux interfaces (1) eau/air et (2) eau/DPPC/air. Concentration de la protéine solubilisée en sous-phase : $0,360\ \mu\text{g.mL}^{-1}$.

L'évolution des isothermes de compression de la monocouche de DPPC en présence d'hydrophobine SC3 en sous-phase a été comparée à celle de la DPPC en présence de lysozyme (Figure 55). Comme le montre la Figure 55A, les isothermes de compression des films de DPPC étalés sur des solutions de lysozyme de deux concentrations différentes sont que légèrement modifiées par rapport à l'isotherme de compression de la DPPC pure. En effet, les décalages vers les plus grandes aires moléculaires des isothermes $\Delta V-A$ et $\Pi-A$ sont respectivement observés en phase gazeuse (φ_G) et lors de la transition de phase liquide expansé/liquide condensé ($t_{\varphi_{LE-LC}}$) du film de DPPC. Ces décalages traduisent la présence de

la protéine au sein du film phospholipidique. Toutefois à partir de 18 mN.m^{-1} , la superposition des isothermes nous permet de déduire que le lysozyme est expulsé du film. Dans la littérature, une expulsion en sous-phase des protéines et autres adsorbants du film est souvent observée aux fortes pressions de surface.^{143, 144} Dans le cas des sous-phases d'hydrophobine SC3, la protéine reste insérée dans la monocouche de DPPC mêmes aux fortes pressions de surface (Figure 55B). Le changement de pente observé à 18 mN.m^{-1} correspondrait à un réarrangement de la protéine qui, contrairement au lysozyme n'est pas expulsée du film de DPPC. Par ailleurs, on observe que la valeur de la pression de surface correspondant à la $\varphi_{\text{LE-LC}}$ du film de DPPC n'est pas modifiée que ce soit dans le cas des sous-phases de lysozyme ou de SC3. Ce phénomène est d'autant plus remarquable pour les systèmes DPPC-SC3 que l'hydrophobine est très tensioactive et qu'elle interagit avec le film de DPPC tout au long de la compression. Notons que la conservation de l'allure des isothermes Π - A des films phospholipidiques interagissant avec d'autres entités moléculaires n'est pas toujours rapportée dans la littérature.^{144, 145}

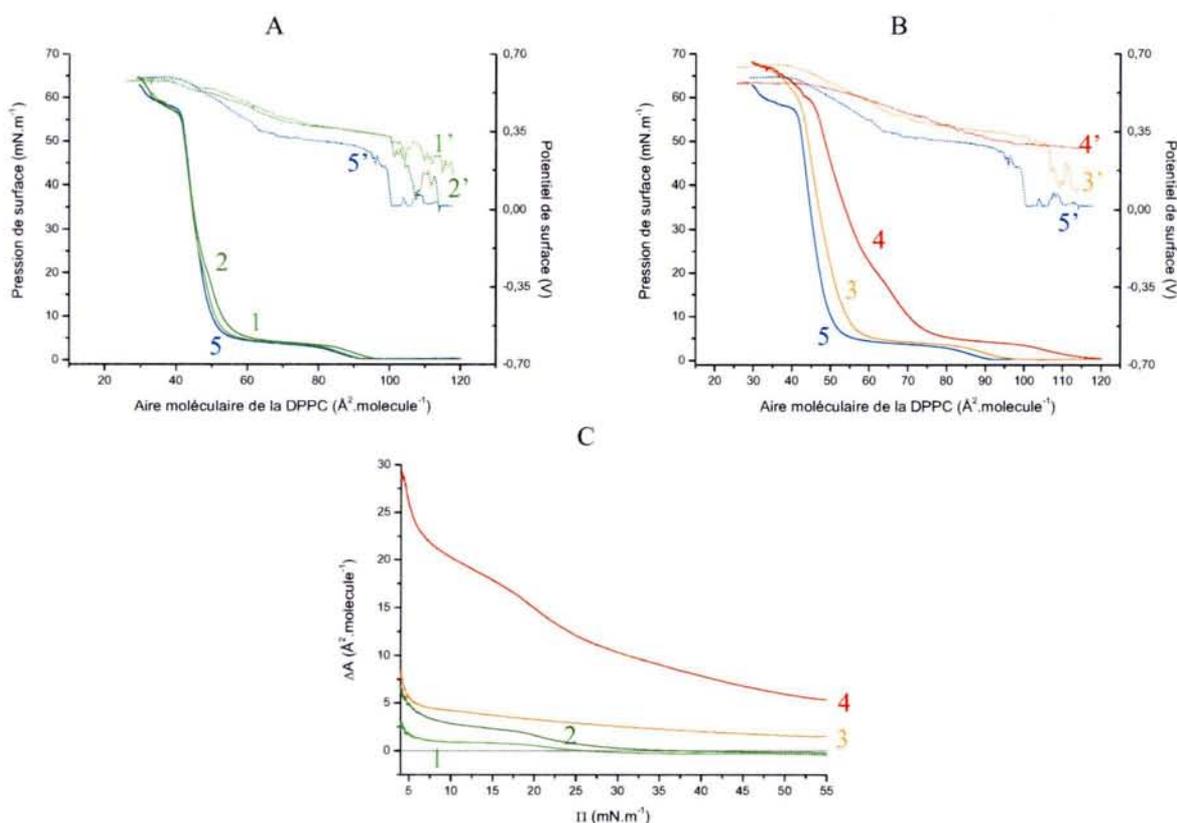


Figure 55. Isothermes Π - A et ΔV - A du film de DPPC étalé sur sous-phases de (A) lysozyme et (B) SC3. Concentration en protéines : (1), (3) $0,036$ et (2), (4) $0,360 \mu\text{g.mL}^{-1}$. (5) Isotherme de référence du film de DPPC étalé sur eau pure. En traits continus : isothermes de pression ; en pointillés : isothermes de potentiel. (C) Variations du décalage des aires moléculaires par rapport à l'eau pure, ΔA , en fonction de la pression de surface pour chacune des sous-phases contenant le lysozyme et la SC3. Même code couleur que pour les figures A et B.

Afin de mieux évaluer les capacités relatives qu'ont le lysozyme et l'hydrophobine d'interagir avec la monocouche phospholipidique de DPPC, les décalages observés en termes d'aires moléculaires et en fonction de Π , sont présentés sur la Figure 55C pour les systèmes DPPC-lysozyme et DPPC-SC3. Ces études ont été complétées par la détermination du module de compressibilité (C_s^{-1}) du film de DPPC à son point de collapse pour chacun de ces systèmes (Tableau 2). Ainsi, sur une sous-phase de lysozyme, le C_s^{-1} est comparable à celui du film étalé sur eau pure, $\sim 330 \text{ mN.m}^{-1}$. Sur une sous-phase de SC3, il est inférieur à 290 mN.m^{-1} . Le C_s^{-1} traduisant l'état de rigidité du film formé par les molécules phospholipidiques, les résultats confirment bien le fait que l'hydrophobine est fortement adsorbé au film de DPPC tout au long de la compression.

Tableau 2. Valeurs caractéristiques des isothermes Π - A et ΔV - A des films monomoléculaires de DPPC. Le C_s^{-1} a été calculé à partir de l'Équation 19.

	[Protéine] ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	A_{col} ($\text{\AA}^2.\text{molecule}^{-1}$)	Π_{col} (mN.m^{-1})	ΔV_{col} (mV)	C_s^{-1} (mN.m^{-1})
DPPC/eau	0	44,0	39,5	562	339,0
DPPC/lysozyme	0,036	43,6	40,4	611	323,3
	0,360	43,8	40,3	547	320,8
DPPC/SC3	0,036	45,1	44,8	541	288,9
	0,360	48,9	48,7	568	200,3

En outre, les résultats présentés en Figure 56 montrent que même après un cycle de décompression et de recompression de la monocouche de DPPC étalée sur sous-phase d'hydrophobine, les propriétés du films ne sont pas modifiées et l'isotherme reste décalée vers les plus grandes aires moléculaires.

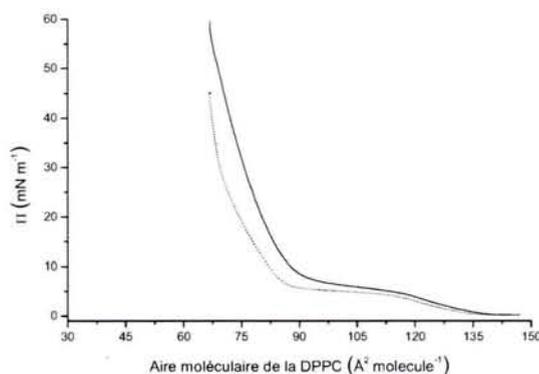


Figure 56. Cycle de (—) décompression et de (....) recompression d'une monocouche de DPPC étalée sur une sous-phase de SC3 de $0,360 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Entre la fin de la décompression et le début de la recompression, un temps de pose de 30 minutes a été pris.

Les images obtenues par microscopie à angle de Brewster à l'interface eau/air ont permis de visualiser les différences de morphologie entre les films de DPPC formés sur l'eau pure et ceux des films formés sur les solutions des protéines (Figure 57). Nous pouvons constater que l'organisation des molécules de DPPC en φ_G et au cours de la transition de phase gaz-liquide expansé ($t_{\varphi_{G-LE}}$) diffère lorsque nous sommes en présence de lysozyme ou de SC3 en sous-phase (Figure 57A, D et G). Cette observation confirme le phénomène d'interaction protéine-phospholipide observé dès la φ_G de la DPPC via la cinétique d'adsorption de la SC3 (Figure 53). Toutefois, dans le cas de la sous-phase de lysozyme, les domaines de la $t_{\varphi_{LE-LC}}$ ainsi que l'image correspondant à la phase solide (φ_S) ne diffèrent pas de ceux obtenus sur l'eau pure (Figure 57E et F). Ces observations tendent à confirmer le fait que le lysozyme est bien expulsé du film de DPPC en phase condensée. En revanche, la présence de la SC3 au sein du film est bien mise en évidence par les images BAM ; et ce quelque soit l'état de compacité du film (Figure 57G-I). De surcroît, les domaines caractéristiques de la morphologie de la monocouche de DPPC visualisés lors de la $t_{\varphi_{LE-LC}}$ sont plus volumineux et plus espacés en présence de SC3. En effet, les domaines LC ont en moyenne une largeur de 12 μm sur eau pure et de 28 μm sur la solution de SC3 à 0,360 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Dans le cas du lysozyme, l'espacement entre les domaines LC est comparable à celui obtenu sur l'eau. Toutefois, l'évolution générale de la morphologie du film au cours de la compression est la même quelque soit la sous-phase utilisée. En effet, quelque soit la sous-phase, la croissance et le rapprochement des domaines lumineux formés lors de la transition de phase dans une phase plus condensée homogène peuvent être observés au fur et à mesure que la pression de surface augmente.

Il est important de signaler ici que les morphologies des films protéiques du lysozyme et de la SC3 observées au BAM ne présentent aucun contraste.

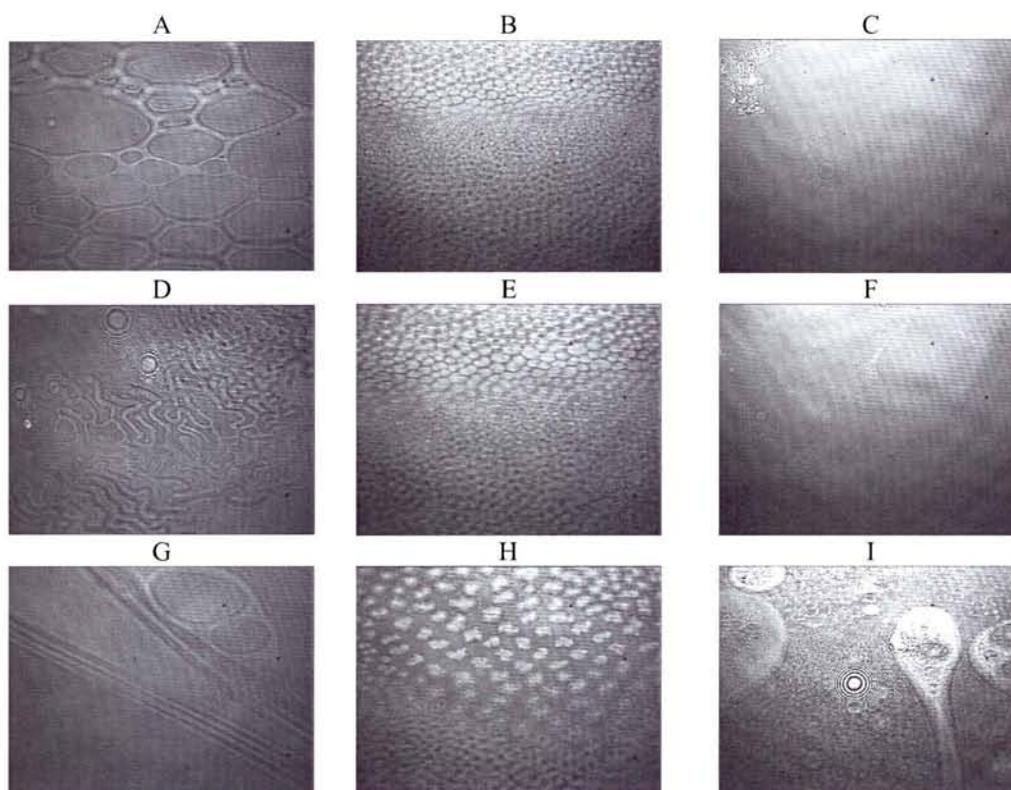


Figure 57. Imagerie par microscopie à angle de Brewster. Morphologies des films de DPPC étalés sur (A–C) sous-phase d'eau pure, et sur solutions à $0,360 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de (D–F) lysozyme et (G–I) SC3. Les images ont été obtenues (A, D, G) en phase gazeuse du film pour des aires moléculaires de DPPC respectivement de 100, 107 et $120 \text{ \AA}^2.\text{molecule}^{-1}$, et pour les pressions du film de (B, E, H) 5 mN.m^{-1} et (C, F, I) 50 mN.m^{-1} . Échelle : la largeur totale de chacune des images correspond à $400 \mu\text{m}$.

Afin d'obtenir de plus amples informations sur la structure du système interfacial DPPC-SC3, des expériences de diffraction des rayons X sous incidence rasante ont également été menées. La Figure 58 représente les courbes de niveau d'intensité obtenues par cette technique à différentes pressions de surface du film de DPPC en absence et en présence de SC3.

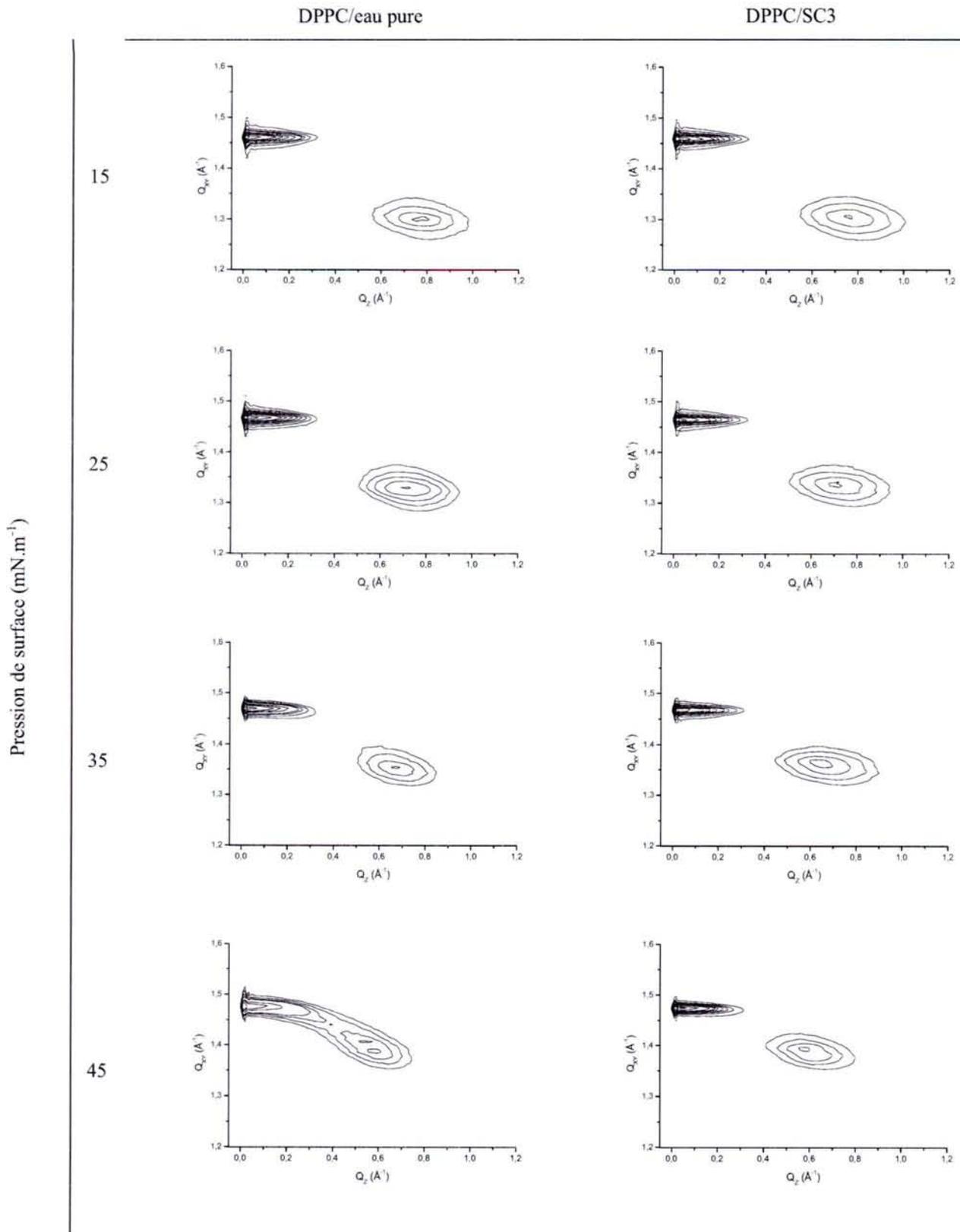


Figure 58. Courbes de niveau d'intensité des spectres de diffraction GIXD représentant, pour 4 différentes pressions de surface du film de DPPC, la composante horizontale du vecteur de diffusion (Q_{XY}) en fonction sa composante verticale (Q_Z). Expériences GIXD réalisées sur film de DPPC étalé sur sous-phases (colonne de gauche) d'eau pure et (colonne de droite) de SC3 à 0,360 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Le traitement numérique de ces courbes, comme décrit dans la partie Matériel et Méthodes, donnent alors accès aux paramètres de maille de la structure cristalline formée par la DPPC à l'interface eau/air. Les résultats numériques sont présentés dans le Tableau 3.

Tableau 3. Valeurs des paramètres de maille du réseau tridimensionnel hexagonal formé par les molécules de DPPC étalées à l'interface eau/air.

Π (mN.m ⁻¹)	a (Å)		b (Å)		γ (deg.)		t (deg.)		A_{XY} (Å ²)		A_0 (Å ²)	
	eau	SC3	eau	SC3	eau	SC3	eau	SC3	eau	SC3	eau	SC3
15	5,8	5,8	5,2	5,2	124,1	124,0	35,5	36,1	25,1	25,0	20,4	20,2
25	5,7	5,6	5,1	5,1	123,5	123,2	33,2	33,3	24,3	24,1	20,4	20,2
35	5,5	5,5	5,1	5,1	122,8	122,6	30,4	30,8	23,6	23,5	20,3	20,1
45	5,3	5,3	5,0	5,0	121,7	122,0	25,9	27,3	22,4	22,7	20,2	20,2

Nous pouvons nous apercevoir que les paramètres de la maille formée par les molécules de DPPC, l'orientation des chaînes alkyles des phospholipides ainsi que l'aire occupée par tête polaire ne subissent pas d'importantes modifications en présence de l'hydrophobine et ce, quelque soit la pression latérale du film. Toutefois, la présence de la SC3 au sein de la monocouche de DPPC permet une meilleure stabilité du film. En effet, la séparation des pics de diffraction observée à 45 mN.m⁻¹ dans le cas de la sous-phase de SC3, provient du fait que l'angle azimutal des molécules de DPPC est en moyenne mieux défini. Ce phénomène n'est pas observé lorsque la DPPC est étalée sur l'eau pure (Figure 58) ni sur l'eau contenant des ions métalliques.¹⁴⁶ Cette stabilité du film en présence d'hydrophobine pourrait également expliquer les isothermes $\Delta V-A$ obtenues dans le cas des sous-phases de SC3 ; isothermes dont l'allure générale diffère de celles obtenues avec les sous-phases d'eau pure et de lysozyme (Figure 55A et B).

Des expériences d'infrarouge nous ont permis de connaître l'organisation des phospholipides et des protéines à l'interface eau/air, via l'analyse des spectres d'absorption des molécules (Figure 59A). Les nombres d'onde pour chaque mode de vibration caractéristique des groupements la DPPC et de la SC3 sont donnés respectivement dans le Tableau 4 et le Tableau 5. Si l'on s'intéresse particulièrement aux molécules phospholipidiques ; au cours de la compression, les nombres d'onde obtenus en présence et en absence de SC3 sont comparables. On peut ainsi en déduire que la structure du film phospholipidique est préservée en présence de SC3. Cependant, dans l'état le plus condensé

du film, les nombres d'onde des pics correspondant aux groupements de la tête polaire sont légèrement plus élevés que ceux obtenus sur eau pure¹³⁸ (Figure 59B). Ceci laisse penser que l'interaction DPPC-SC3 aurait lieu au niveau de la tête polaire du phospholipide.

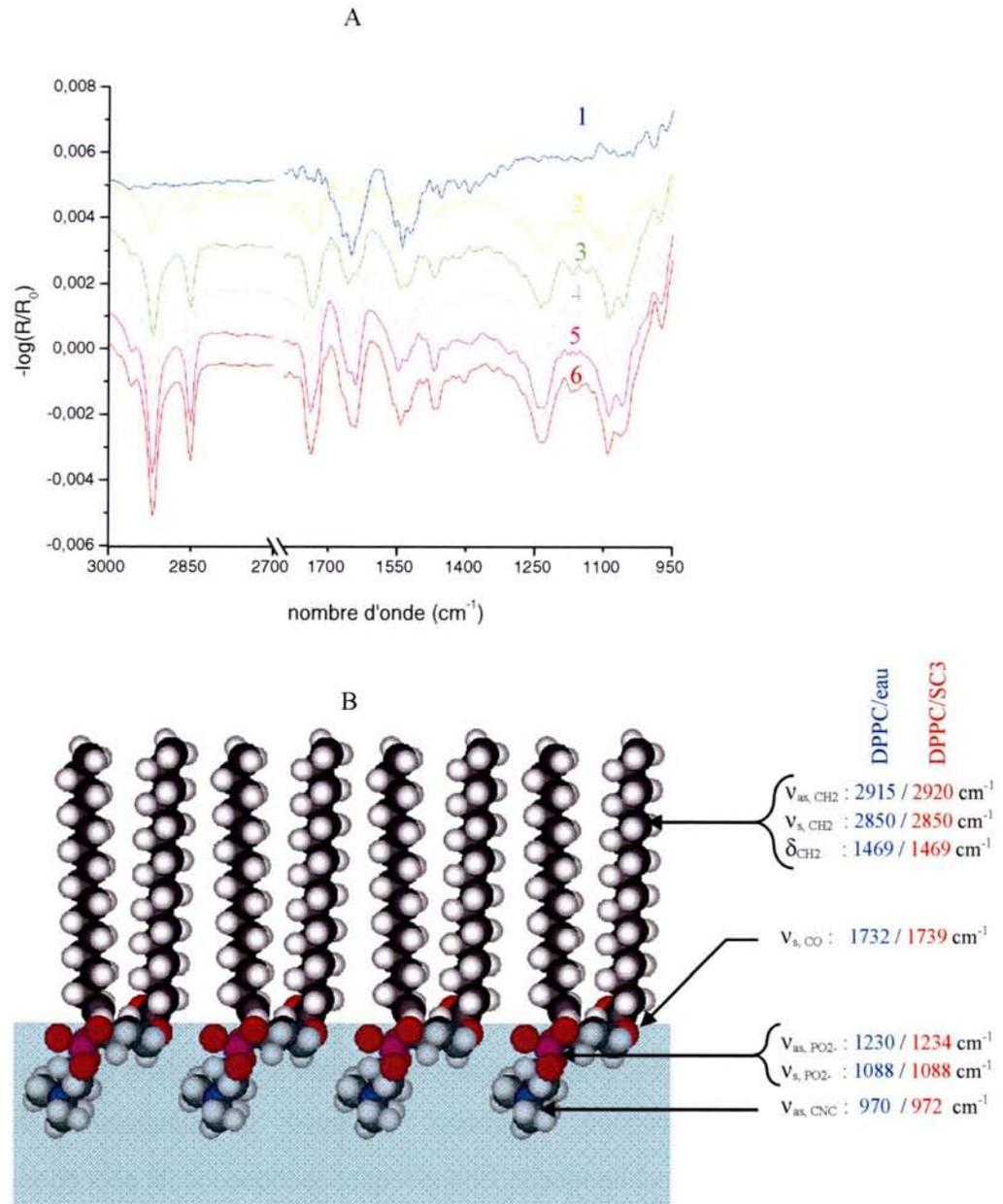


Figure 59. (A) Spectres IRRAS aux interfaces (1) SC3/air et SC3/DPPC/air à différentes pressions latérales du film de DPPC : (2) 2, (3) 15, (4) 25, (5) 35 et (6) 45 $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$. Pour plus de lisibilité, les spectres infrarouges ont été décalés selon l'axe des ordonnées de + 0,0035 ; +0,004 ; 0,0025 et -0,001 respectivement pour les courbes à 2, 15, 25 et 35 $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$. (B) Comparaison des nombres d'onde des modes de vibration des groupements caractéristiques de la DPPC pour les systèmes DPPC/eau et DPPC/SC3 à 0,360 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Le faisceau IR, *p*-polarisé, arrive avec un angle d'incidence de 40°.

Tableau 4. Valeur des nombres d'onde de vibration des pics d'absorption des groupements caractéristiques de la DPPC en fonction de l'état de compression latérale du film.

Π (mN.m ⁻¹)	$\nu_{as}(CH_2)$	$\nu_s(CH_2)$	$\nu_s(C=O)$	$\delta(CH_2)$	$\nu_{as}(P=O)$	$\nu_s(P=O)$	$\nu_s(C-O-P)$	$\nu_{as}(C-N'-C)$
2	2923,6	2854,2	1735,6	1465,6	1234,2	1087,7	1064,5	995,1
15	2919,7	2850,3	1735,6	1469,5	1234,2	1087,7	1056,8	979,7
25	2919,7	2850,3	1739,5	1469,5	1234,2	1087,7	1060,7	975,8
35	2919,7	2850,3	1739,5	1469,5	1234,2	1087,7	1060,7	975,8
45	2919,7	2850,3	1739,5	1465,6	1234,2	1087,7	1060,7	972,0

La présence du peptide au sein du film de DPPC peut être également mise en évidence, tout au long de la compression, grâce aux spectres IRRAS de par la présence des signaux des régions amide I et II (Figure 59A). Nous constatons que la structure secondaire de la SC3 en interaction avec les molécules de DPPC évolue en fonction de la surface latérale du film phospholipidique, comme résumé par le Tableau 5.

Toutefois, Wang et ses collaborateurs n'ont pas observé d'évolution entre la structure secondaire des protéines de SC3 solubilisées en solution aqueuse et celle de ces mêmes protéines en interaction avec les têtes polaires de liposomes de DPPC dispersés en solution aqueuse.¹⁴⁷ De plus, les liposomes de DPPC ne permettent pas l'insertion de la protéine au travers de la bicouche. Ces informations supplémentaires, combinées aux résultats présentés dans ce mémoire, nous permettent d'émettre l'hypothèse que dans le cas des interactions à l'interface eau/air entre le film de DPPC et la SC3, il se peut qu'il y ait à la fois des interactions protéine-tête polaire de DPPC et protéine-chaîne hydrophobe de DPPC. Ainsi, le rapprochement des têtes polaires et le changement d'orientation des chaînes hydrophobes au cours de la compression, pourraient expliquer le changement de conformation de l'hydrophobine observé lorsque le film phospholipidique est de plus en plus condensé.

Tableau 5. Valeurs des nombres d'onde de vibration des pics d'absorption de la bande peptidique amide I en fonction de la pression latérale de la monocouche. Correspondance avec la structure secondaire de la SC3. ⁺ indique le pic de plus grande intensité à une pression de surface donnée.

Π (mN.m ⁻¹)	$\sigma_{\text{amide I}}$ (cm ⁻¹)	Structure secondaire de la SC3
2	1628 1662	feuillettes β antiparallèles hélices α
15	1639 1658 ⁺	feuillettes β parallèles hélices α
25	1639 1655	feuillettes β parallèles hélices α , coudes
35	1639 ⁺ 1655	feuillettes β parallèles hélices α , coudes
45	1639 ⁺ 1650	feuillettes β parallèles coudes

Un autre phospholipide, la DMPE, de chaînes alkyles plus courtes et de tête polaire différente a été utilisé pour obtenir des informations supplémentaires sur les interactions protéine-lipide. D'après l'allure des isothermes Π - A et ΔV - A , l'organisation du film de DMPE ne semble pas être modifiée en présence de lysozyme ou encore de SC3, comme c'était le cas avec la DPPC. Le décalage vers les plus grandes aires moléculaires traduit alors l'insertion de la protéine dans le film phospholipidique. On peut même constater que le potentiel de surface est plus stable en présence de SC3, notamment pour la φ_G et lors de la $t\varphi_{LE-LC}$.

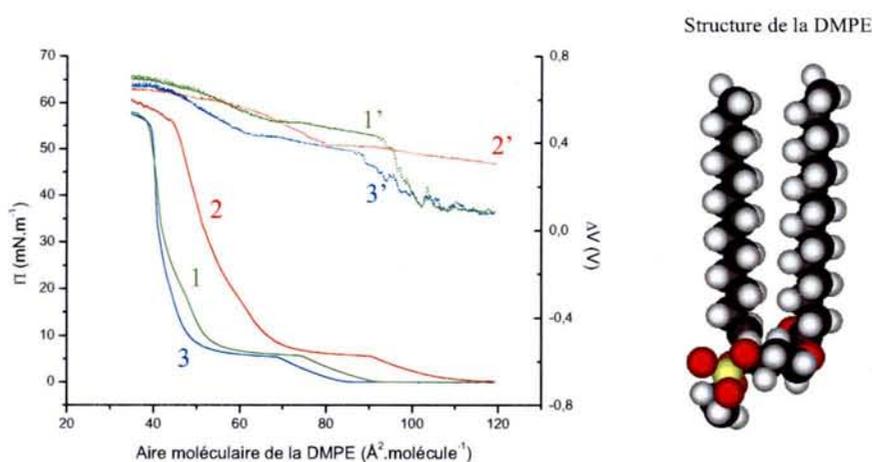


Figure 60. Isothermes Π - A et ΔV - A du film de DMPC étalé sur sous-phases de (1) lysozyme et de (2) SC3 à 0,360 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. (3) Isotherme de référence du film de DPPC étalé sur eau pure. En traits continus : isothermes de pression ; en pointillés : isothermes de potentiel.

Toutefois, les images BAM indiquent que la morphologie du film de DMPE change de manière drastique en présence de l'hydrophobine (Figure 61I–L). En effet, les motifs caractéristiques de la transition de phase $t_{\phi_{LE-LC}}$ de la DMPE ne sont plus observés dans le cas de la sous-phase d'hydrophobine alors qu'ils le sont bien pour les sous-phases d'eau pure et de lysozyme (Figure 61B et F). De plus, dans la phase la plus condensée du film, les molécules de DMPE s'agrègent pour les sous-phases contenant l'une ou l'autre protéine (Figure 61H et L). Ainsi, on peut supposer que la tailles de la chaînes alkyles et/ou de la tête polaire des phospholipides ont une influence sur la structure de la monocouche lors des interactions protéine-phospholipide et ce, sans modifier le comportement interfacial des molécules de phospholipide au sein du film. Ces résultats seront confirmés par la suite avec les travaux concernant les interactions protéine-lipide non membranaire (Cf. Paragraphe II.2.b).

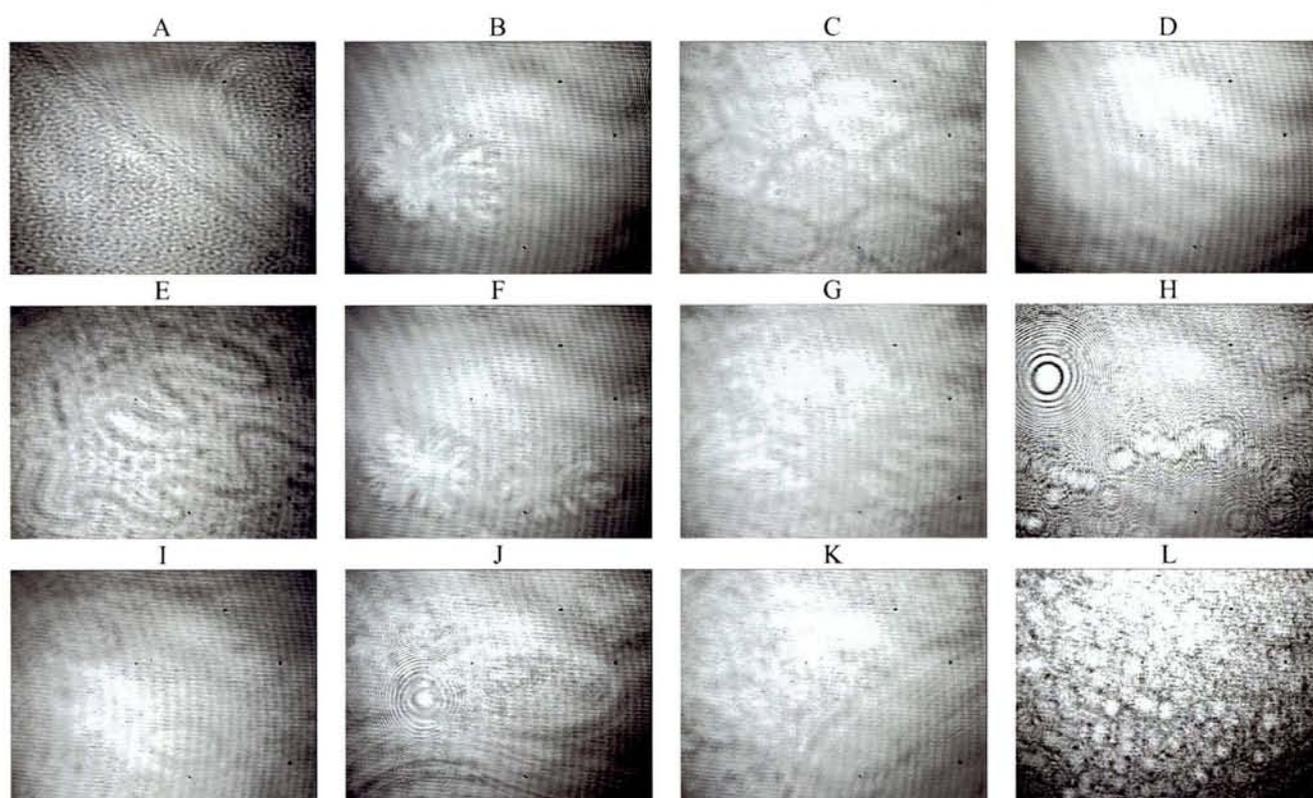


Figure 61. Imagerie par microscopie à angle de Brewster. Morphologies des films de DMPE étalés sur (A–D) sous-phase d'eau pure, et sur solutions à $0,360 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de (E–H) lysozyme et (I–L) SC3. Les images ont été obtenues (A, E, I) en phase gazeuse du film pour des aires moléculaires de DMPE respectivement de 96 , 100 et $119 \text{ \AA}^2.\text{molecule}^{-1}$, et pour les pressions du film de (B, F, J) 6 mN.m^{-1} , (C, G, K) 8 mN.m^{-1} et (D, H, L) 50 mN.m^{-1} . Échelle : la largeur totale de chacune des images correspond à $400 \mu\text{m}$.

II.1.b - Désorganisation de la monocouche de monooléine par la SC3

Les films formés de lipides non membranaires tels que la monooléine (MO) sont désorganisés en présence de la SC3 ou du lysozyme en sous-phase. En effet, l'étude des isothermes Π - A des systèmes MO/eau, MO/lysozyme et MO/SC3 (Figure 62) a montré qu'en présence de chacune de ces protéines, les aires moléculaires des molécules de monooléine sont inférieures à celles des molécules de monooléine étalées sur eau pure. La formation d'agrégats et/ou la réorganisation des molécules au sein du film, induites par des interactions protéine-lipide, pourraient être à l'origine de la désorganisation du film. Les images BAM obtenues pour chacun des systèmes mentionnés ci-dessus permettent de confirmer la première hypothèse (Figure 63).

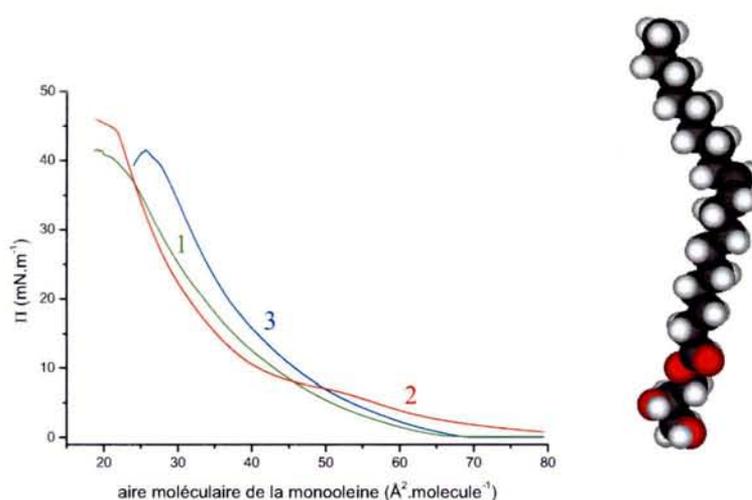


Figure 62. Isothermes Π - A du film de monooléine étalé sur sous-phases à $0,360 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de (1) lysozyme et (2) SC3. (3) Isotherme de référence du film de monooléine étalé sur eau pure.

Il semble donc que la modification des isothermes de monooléine en présence de protéines engendre la formation d'agrégats. Ces agrégats apparaissent plus tôt et sont plus nombreux dans le cas de la sous-phase contenant l'hydrophobine (Figure 63E et F).

La destruction du film de monooléine à l'interface eau/air en présence d'une ou de l'autre protéine en sous-phase peut être expliquée par le fait que le lipide possède une tête polaire plus petite que celle de la DPPC et ne possède qu'une chaîne hydrophobe insaturée en C18 alors que la DPPC possède deux chaînes saturées en C16. Cependant, l'impact de la SC3 sur les molécules de monooléine organisées en bicouches lipidiques ne conduit pas à la destruction de la structure 3D du système monooléine/eau, comme explicité dans le prochain paragraphe.

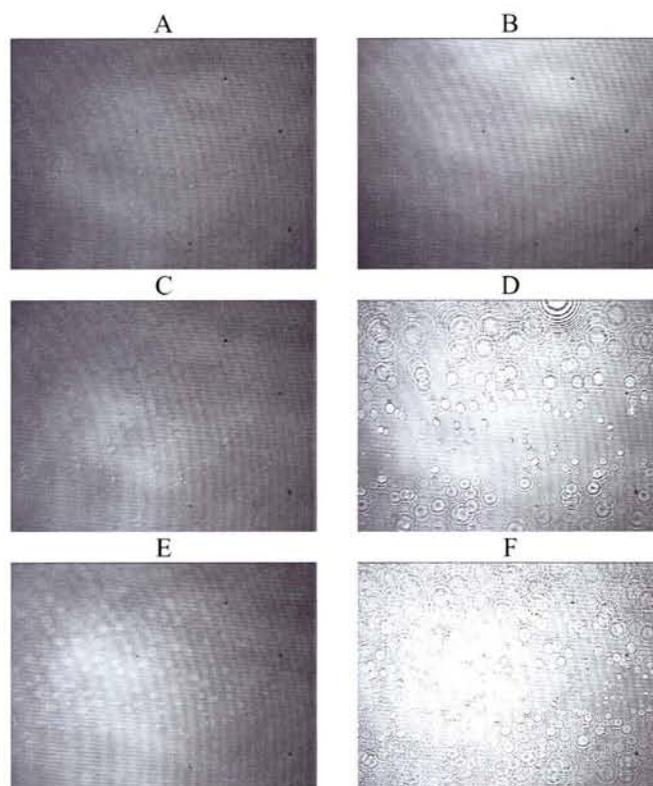


Figure 63. Imagerie par microscopie à angle de Brewster. Morphologies des films de monooléine étalés sur (A, B) sous-phase d'eau pure, et sur solutions à $0,360 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de (C, D) lysozyme et (E, F) SC3. Les images ont été obtenues pour les pressions du film de monooléine de (A, C) 0 mN.m^{-1} , $79 \text{ \AA}^2.\text{molecule}^{-1}$, (E) 1 mN.m^{-1} et (B, D, F) 35 mN.m^{-1} . Échelle : la largeur totale de chacune des images correspond à $400 \mu\text{m}$.

II.2 - Influence de la SC3 sur des bicouches de monooléine

La monooléine a également été utilisée pour la préparation de modèles de membranes organisées en bicouches. Pour nos études, nous nous sommes particulièrement intéressés aux phases lamellaire L_{α} et cubique I_{a3d} . Les impacts de la SC3 et du lysozyme sur ces structures ont été étudiés par diffraction des rayons X aux petits angles (SAXS). Les spectres de diffraction obtenus sont présentés sur la Figure 64. Nous pouvons constater que la structure de la phase cubique de monooléine en présence de lysozyme n'est pas modifiée alors qu'en présence de SC3 il y a diminution du paramètre de maille, a , de la matrice lipidique tridimensionnelle I_{a3d} (Figure 64A-C). En effet, avec un paramètre de maille pour la phase cubique MO/eau pure, $a(\varphi_{\text{MO/eau}})$, de 121 \AA , nous avons obtenu $a(\varphi_{\text{MO/SC3}}) < a(\varphi_{\text{MO/eau}})$ (Figure 64A et B).¹³⁷ La SC3 contracte donc la maille de MO alors que le lysozyme, introduit dans les mêmes conditions expérimentales, ne change pas le paramètre de maille de ce système, soit : $a(\varphi_{\text{MO/lysozyme}}) \sim a(\varphi_{\text{MO/eau}})$. On peut supposer que la SC3 change la structure de base du système lipidique avec lequel elle interagit alors que le lysozyme, solubilisé dans les

canaux aqueux et sans interactions notables avec le système, n'a aucune influence sur celui-ci. Dans le cas des phases lamellaires de monooléine, le lysozyme contrairement à la SC3, modifie le paramètre de maille, d , représentant l'épaisseur d'une bicouche lipidique à laquelle s'ajoute l'épaisseur de la partie aqueuse environnant les têtes polaires. On obtient alors : $d(\varphi_{MO/lysozyme}) < d(\varphi_{MO/SC3}) \sim d(\varphi_{MO/eau})$ (Figure 64D). Ces résultats peuvent être expliqués par le fait que le lysozyme, n'interagissant pas avec les molécules lipidiques, reste dans les plans d'eau du système, d'où une augmentation de l'épaisseur du paramètre d . L'hydrophobine, pénétrant à interface lipide/eau, ne modifie que faiblement ce paramètre.

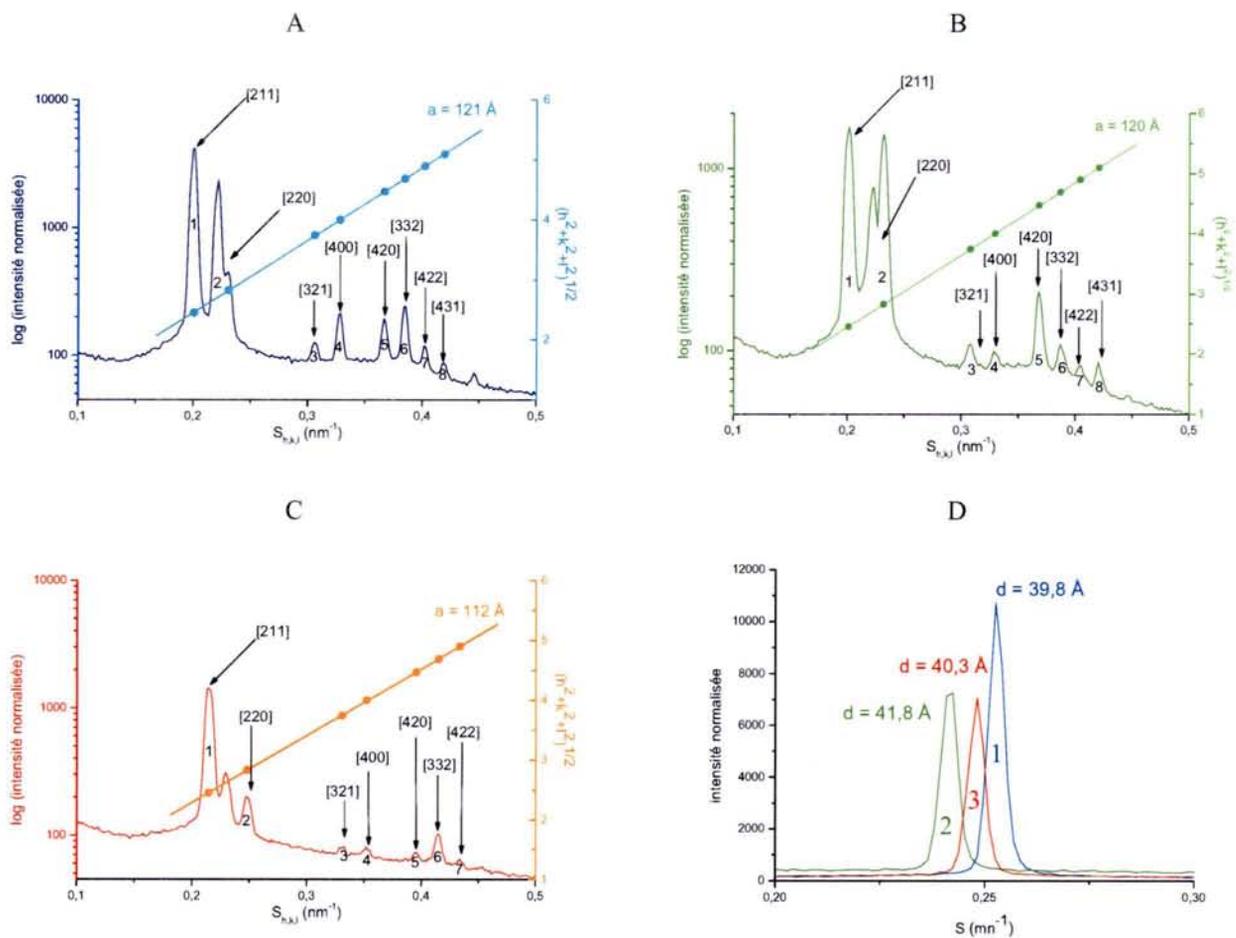


Figure 64. Spectres RX des phases (A) cubique I_{a3d} pure (B) cubique $I_{a3d} + SC3$ (C) cubique $I_{a3d} + \text{lysozyme}$ et (D) lamellaires (1) L_α pure, (2) $L_\alpha + \text{lysozyme}$, (3) $L_\alpha + SC3$, de la monooléine.

II.3 - Conclusion

Les études structurales de l'hydrophobine SC3 déjà réalisées,²³⁻²⁵ bien que pas faciles à mettre en œuvre, ont été utiles pour l'analyse du comportement interfacial de la protéine d'un point de vue statique. Les études proposées dans ce chapitre nous ont permis de mettre l'accent sur l'aspect dynamique de l'auto-assemblage de la SC3 lors d'interactions avec des modèles de mono- et bicouches de membranes lipidiques. En effet, contrairement aux autres surfaces avec lesquelles l'hydrophobine peut interagir, les systèmes lipidiques offrent une meilleure possibilité de modulation de leur structure de manière à pouvoir analyser les effets de l'interaction protéine-membrane pour différents systèmes.

Nous avons démontré dans ce chapitre la forte affinité de l'hydrophobine SC3 pour les interfaces lipide/liquide. Alors que les monocouches phospholipidiques étalées à l'interface eau/air conservent leurs propriétés structurales lorsqu'elles sont en interaction avec la protéine, les lipides non membranaires s'agrègent dans les mêmes conditions. Dans le cas des structures lipidiques tridimensionnelles, l'hydrophobine s'insérerait entre les molécules de monooléine aussi bien dans les phases cubiques que lamellaires. Contrairement à la SC3, le lysozyme est expulsé des phases condensées des monocouches phospholipidiques étalées à l'interface eau/air et ne semble pas interagir avec les bicouches lipidiques de monooléine. De surcroît, l'étude du système SC3-DPPC à l'interface eau/air a montré, via les mesures de pression, de potentiel de surface et de diffraction des rayons X sous incidence rasante, que les interactions protéine-phospholipide, bien que très fortes, ne dénaturent pas le film phospholipidique mais au contraire le stabilisent. Il semble que la dénaturation des films de Langmuir dont les molécules interagissent avec les protéines en sous-phase dépende de la taille des têtes polaires mais aussi de la taille et du nombre des chaînes alkyles. De plus, la structure secondaire de l'hydrophobine SC3 étudiée par IRRAS varie en fonction de l'état de compression du film au sein duquel elle est insérée. De ces études, nous déduisons que l'hydrophobine s'adapte à l'environnement avec lequel elle interagit.

Les résultats obtenus jusqu'ici nous permettent de mieux comprendre les interactions protéine-surface solide et protéine-lipide. La non dénaturation de ces interfaces et le réarrangement protéique nous permettent dès lors de mieux appréhender l'immobilisation d'entités moléculaires sur supports solides au moyen de l'hydrophobine SC3.

Chapitre III

Immobilisation d'enzymes

La méthode d'immobilisation d'enzymes au moyen d'une protéine telle l'hydrophobine SC3 consiste en une nouvelle approche pour la préparation de surfaces catalytiques définies. En absence de structure tridimensionnelle de la SC3, il devient difficile d'apporter des éléments concluants quant aux mécanismes d'interaction SC3-enzyme. Pour palier à ce manque d'informations, nous avons procédé à des mesures d'angle de contact ainsi qu'à la modélisation des surfaces accessibles de chacune des enzymes. L'imagerie par microscopie électronique à transmission nous a également été utile pour compléter ces études.

III.1 - Mise en évidence des interactions SC3-enzymes

Les expériences de microscopie électronique à transmission nous ont permis de visualiser l'organisation de l'hydrophobine SC3, de la glucose oxydase et de la peroxydase adsorbées sur carbone amorphe. Comme il l'a été discuté dans le Paragraphe I.2.c, les micrographes obtenus ici montrent bien que la SC3 recouvre de manière homogène toute la surface de carbone amorphe (Figure 65A-C). Contrairement au film de la SC3, les films de la GOX (Figure 65D-F) et de la HRP (Figure 65G-I) adsorbées ne recouvrent pas uniformément la surface de carbone amorphe comme le montre les micrographes obtenus pour les grandissements de 150 et 3 000 (Figure 65D, G et E, H, respectivement). En effet, les films formés par chacune des enzymes se rompent et s'enroulent au dessus de la surface GCA. Remarquons cependant que ces films peuvent être localement homogènes (Figure 65F et I). Les films formés par les enzymes adsorbées sur les GCA modifiées par l'hydrophobine (Figure 65J-L, M-O) sont moins fragiles que ceux formés sur les GCA non modifiées.

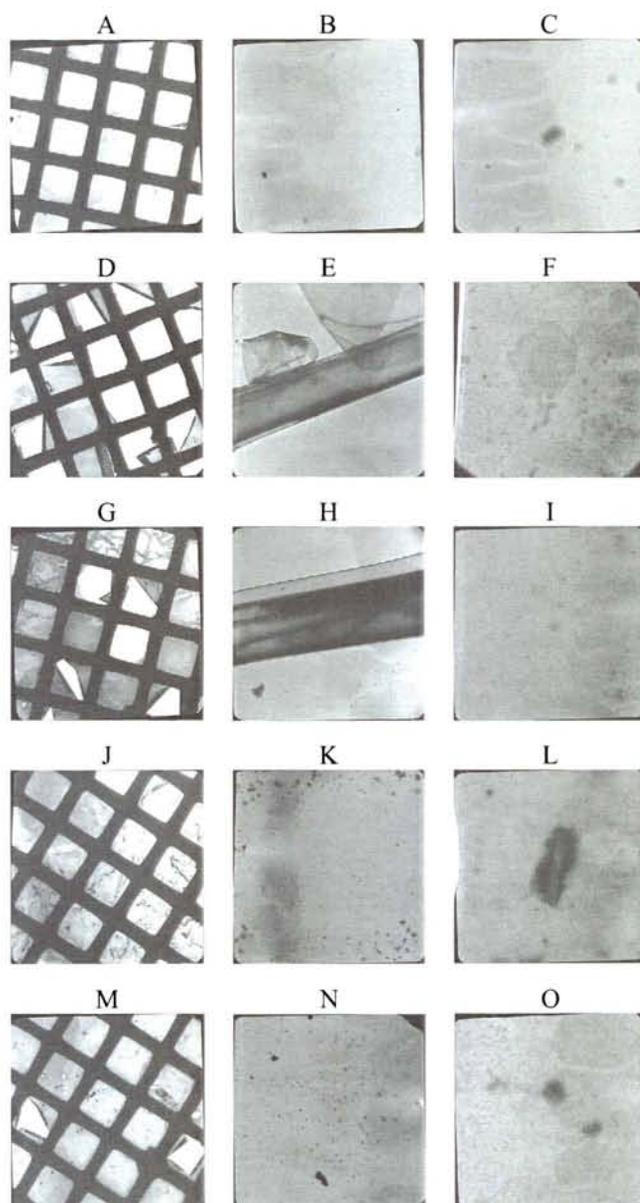


Figure 65. Images MET des films de (A–C) SC3, (D–F) GOX, (G–I) HRP, (J–L) GOX/SC3, (M–O) HRP/SC3 adsorbés sur grilles de carbone amorphe. Les échantillons ont été contrastés par la technique de coloration négative. Échelle : les largeurs des clichés des colonnes de gauche, du milieu et de droite sont respectivement de 570,0 ; 28,6 et 2,9 μm .

Les valeurs des épaisseurs moyennes de chacun des films protéiques formés sur GCA sont données dans le Tableau 6. À partir de ces données, il est possible d'estimer l'épaisseur du film formé par la GOX et celle du film formé par la HRP sur les surfaces recouvertes d'hydrophobine. Ces épaisseurs sont respectivement de 79 et 173 Å.

Tableau 6. Valeurs des épaisseurs déterminées par EELS des films protéiques adsorbés sur GCA.

	SC3	GOX	HRP	GOX/SC3	HRP/SC3
e (Å)	202	208	323	281	376

Des mesures d'angle de contact ont été réalisées dans le but d'obtenir des informations sur la nature des interactions impliquées lors de l'immobilisation des enzymes via la SC3 (Figure 66). Les surfaces de carbone vitreux des électrodes de travail utilisées en électrochimie ont servi pour ces mesures. Confortant les résultats précédemment obtenus en imagerie MET, l'hydrophobie du carbone vitreux (Figure 66A) diminue après avoir été recouvert aussi bien par la GOX (Figure 66B) que par la HRP (Figure 66C). Toutefois, il y a une différence entre les valeurs des angles de contact obtenues avec ces deux enzymes. En effet, avec la peroxydase, la surface de l'électrode de carbone vitreux devient plus hydrophile qu'avec la glucose oxydase : $60,9^\circ$ pour la HRP contre $70,5^\circ$ pour la GOX.

Le changement d'hydrophobie de l'ECV est encore plus remarquable après recouvrement par l'hydrophobine SC3 car l'angle de contact diminue de plus de la moitié, comparé à l'ECV non modifiée (Figure 66A et D). Lorsque la GOX est immobilisée sur l'ECV modifiée par la SC3 (Figure 66E), l'hydrophobie de la surface modifiée augmente avec un angle de contact qui atteint une valeur proche de celle obtenue pour la surface GOX/ECV. La même tendance est observée avec la surface HRP/SC3/ECV (Figure 66F), mais dans ce cas l'hydrophobie de la surface est légèrement plus faible que celle de la surface HRP/ECV.

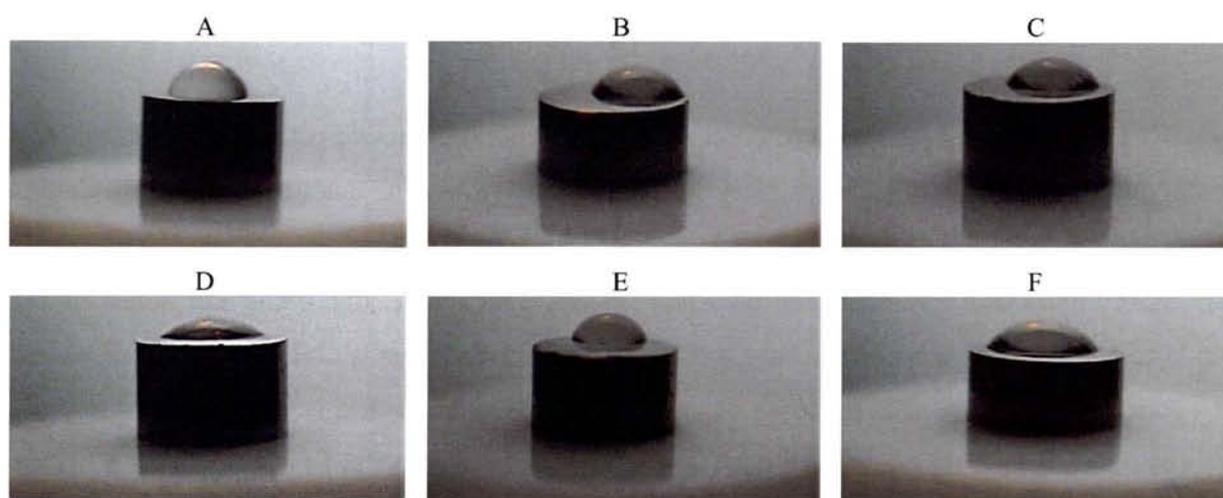


Figure 66. Mesures d'angle de contact sur surfaces de carbone vitreux recouvertes ou non de protéines. (A) ECV non modifiée : $88,7^\circ$; (B) GOX/ECV : $70,5^\circ$; (C) HRP/ECV : $60,9^\circ$; (D) SC3/ECV : $41,0^\circ$; (E) GOX/SC3/ECV : $71,6^\circ$; (F) HRP/SC3/ECV : $55,9^\circ$.

Comme nous l'avons exposé au Chapitre I, l'affinité qu'à la SC3 pour différentes interfaces dépend à la fois de la manière dont sa conformation est remaniée et de son orientation permettant d'établir des interactions hydrophiles ou hydrophobes. La conséquence première de l'adsorption de cette protéine sur une surface solide est alors l'inversement des propriétés hydrophile/hydrophobe de la surface.^{93, 136, 148} Nos expériences ont montré que la GOX et la HRP ont un comportement similaire bien que moins prononcé. En effet, l'hydrophobie de la surface propre de carbone vitreux et l'hydrophilie de celle modifiée par la SC3 diminuent après l'adsorption de la GOX et de la HRP. Ces résultats indiquent que la GOX, comme la HRP, établit des interactions hydrophobes avec la surface de carbone vitreux non modifiée par la SC3 alors que les interactions entre ces enzymes et le film d'hydrophobine SC3 sont polaires.

En parallèle, les analyses d'aire de surface accessible (ASA) ont été réalisées dans le but d'accéder aux propriétés moléculaires surfaciques de la GOX (Figure 67A) et de la HRP, ainsi qu'aux interactions enzyme-SC3. Les ASA ont été calculées en utilisant l'approche usuelle du roulement d'une sonde sphérique⁸² comme décrit dans la partie Matériel et Méthodes. Ainsi les surfaces accessibles de la GOX et de la HRP, sondées par une sphère de 2,809 Å de diamètre possèdent chacune une polarité d'environ 75% de leur ASA totale (Figure 67B et C).

La GOX présente un large patch polaire continu, accessible à la sonde alors qu'elle possède des patches non polaires et aromatiques plus petits et discontinus. L'aire totale des contributions polaires de la GOX est de 12 830,184 Å², représentant 77,0% de l'ASA totale de la protéine. Cette aire est constituée de 4 patches dont le plus important représente 76,4% de l'ASA totale (Figure 67B). L'aire totale des contributions non polaires de la GOX est de 3 146,824 Å² (18,9% ; 38 patches) et celle des contributions aromatiques de 689,534 Å² (4,1% ; 25 patches). Notons que l'ASA des motifs glycosylés NAG et Man (Figure 67A) est de 2 401,936 Å².

L'aire totale des contributions polaires de la HRP est de 2 665,703 Å², représentant 73,2% de l'ASA totale de la protéine. Cette aire est constituée de 2 patches dont le plus important représente 72,1% de l'ASA totale (Figure 67C). L'aire totale des contributions non polaires de la HRP est de 2 665,703 Å² (22,3% ; 18 patches) et celle des contributions aromatiques de 537,263 Å² (4,5% ; 11 patches).

Remarquons qu'il est fort probable que la HRP utilisée dans le cadre de nos études expérimentales soit plus polaire que son analogue déglycosylé utilisé pour les calculs d'ASA. De même, nous supposons que l'homodimère de la GOX utilisé pour les expériences d'immobilisation serait plus polaire que le monomère, en partie glycosylé, et utilisé pour les calculs d'ASA.¹⁴⁹

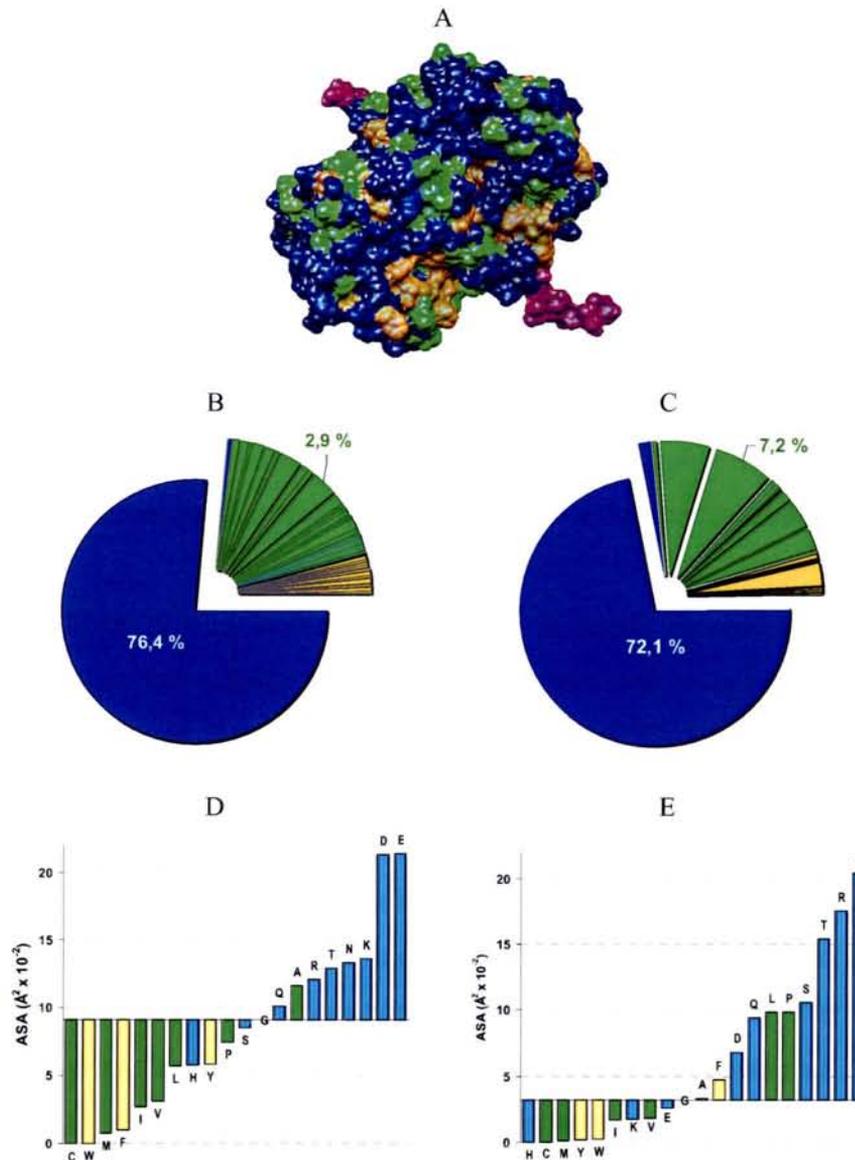


Figure 67. Analyses d'aire de surface accessible. (A) Représentation tridimensionnelle de la GOX. Propriétés de surface accessible (B) de la GOX et (C) de la HRP. Contributions de chaque type d'acides aminés à l'ASA totale de (D) la GOX et à celle de (E) la HRP. Ces contributions sont représentées relativement à la contribution des glycines G qui ne possèdent pas de chaîne latérale. L'ASA des glycines est de 908,655 Å² pour la GOX avec n=24 et de 319,180 Å² pour la HRP avec n=8. Code couleur : les éléments en bleu, vert et jaune représentent respectivement les surfaces polaires, apolaires et aromatiques. Les éléments en rose représentent les chaînes glycosylées.

Les contributions de chaque type d'acides aminés à l'ASA totale de la GOX et à celle de la HRP sont respectivement représentées sur la Figure 67D et E. Comme on pouvait s'y attendre, ce sont les acides aminés polaires, qui possèdent les ASA les plus importantes.

En outre, il faut savoir que la GOX est négativement chargée alors que la HRP l'est positivement.

Il est semble donc raisonnable de penser que les larges surfaces polaires de la GOX et de la HRP sont impliquées dans les interactions avec les surfaces polaires formées par la SC3 adsorbée aux électrodes hydrophobes ; les surfaces non polaires de l'enzyme adsorbée étant alors exposées à l'air. Ainsi, les résultats issus des calculs d'ASA sont en accord avec les résultats obtenus par mesures d'angle de contact. De l'ensemble de ces résultats, nous pouvons déduire que les interactions SC3-enzyme sont principalement favorisées par les interactions polaires. Aussi, les interactions non polaires, impliquées dans le mécanisme d'adsorption de la GOX et de la HRP sur les ECV non modifiées par la SC3, étant trop faibles pour permettre une adsorption stable des enzymes, sont dénaturantes pour les enzymes.¹⁵⁰

Les résultats obtenus jusqu'ici indiquent clairement que la stabilité de la glucose oxydase et celle de la peroxydase sont principalement contrôlées sur surfaces solides par les interactions interprotéiques SC3-enzyme. Ceci nous conduit naturellement à envisager l'utilisation de l'hydrophobine SC3 en tant qu'agent fixateur d'enzymes sur les supports solides. De plus, le fait que la SC3 adhère fortement à différents types de surfaces nous laisse penser à la généralisation du procédé d'immobilisation via l'obtention de matériaux fonctionnels de natures différentes. Toutefois, pour mener à bien ce projet, il est nécessaire que l'activité des enzymes soit également conservée après leur immobilisation par l'hydrophobine. Les études de suivi d'activité des enzymes immobilisées ont donc été menées au moyen de deux techniques de transduction : l'électrochimie et la spectrophotométrie.

III.2 - Activités enzymatiques suivies par électrochimie

Le choix de la glucose oxydase et la peroxydase comme enzymes d'oxydoréduction à immobiliser grâce à l'hydrophobine a été guidé par les résultats concernant la perméabilité du film de SC3 au peroxyde d'hydrogène ; film alors formé sur électrode de carbone vitreux (Cf. Paragraphe I.2.d). La transduction électrochimique semble dès lors être un choix judicieux permettant le suivi de l'activité des enzymes immobilisées. Pour ces études, les ECV ont été d'abord modifiées par l'hydrophobine SC3 puis, fonctionnalisées par l'enzyme (Cf. Partie Matériel & Méthodes).

III.2.a - Électrodes fonctionnalisées par la glucose oxydase

L'activité catalytique de la GOX a été suivie par la technique dite d'ampérométrie hydrodynamique. La réponse du courant du système correspondant à l'oxydation de H_2O_2 , montre bien le phénomène de transport de H_2O_2 à travers les couches protéiques et indique que l'enzyme immobilisée via la SC3 reste active. En effet, lorsqu'une électrode fonctionnalisée par la GOX/SC3 est immergée dans un électrolyte, on mesure à chaque ajout de glucose une augmentation de l'intensité mesurée pour un potentiel de travail de 1,2 V (Figure 68). Ceci traduit l'oxydation d'une espèce électroactive au voisinage de l'électrode. Sachant que le glucose n'est pas électroactif, nous en déduisons que seul l'un des produits de la réaction d'oxydation du glucose est susceptible d'être oxydé dans ces conditions expérimentales. Si l'on tient compte de l'Équation 61 et des résultats présentés en Figure 50, H_2O_2 est l'espèce oxydée ici. Nous montrons ainsi que le peroxyde d'hydrogène a bien été généré à la surface de l'ECV sur laquelle la GOX a été stabilisée grâce à l'hydrophobine SC3 (Équation bilan 53).¹³⁰ Par ailleurs, aucune activité enzymatique n'a été observée lorsque la GOX a été directement adsorbée sur l'électrode de carbone vitreux (Figure 68, courbe 1). Ce résultat peut être expliqué par le fait, qu'en absence de la SC3, l'enzyme est désorbée de l'ECV et/ou dénaturée ; la première hypothèse étant supportée par les résultats obtenus en imagerie MET (Figure 65D).

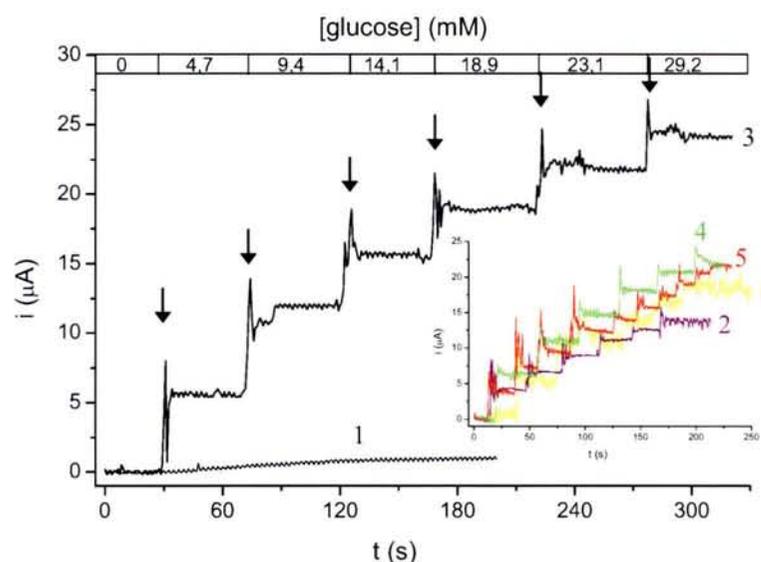


Figure 68. Courbes d'ampérométrie hydrodynamique à un potentiel imposé de 1,2 V. Les flèches indiquent les injections de 150 µl de solution de glucose 1M dans la cellule électrochimique contenant initialement 35 mL de solution tampon phosphate, 50 mM, pH 7. La courbe 1 est l'ampérogramme de référence obtenu avec l'électrode sur laquelle la GOX a été adsorbée en absence de SC3 et les courbes 2–6 ont été obtenues avec l'électrode fonctionnalisée GOX/SC3 et utilisée respectivement les 1^{er}, 27^{ème}, 36^{ème}, 68^{ème} et 99^{ème} jours après la fonctionnalisation.

Les mesures d'ampérométrie répétées durant une centaine de jours avec une même électrode fonctionnalisée par la GOX ont montré la stabilité de l'activité enzymatique au cours du temps et du nombre d'expériences (Figure 68). Ce résultat est très important si l'on souhaite obtenir des surfaces fonctionnelles fiables et réutilisables.

À partir des courbes d'ampérométrie hydrodynamique, il nous est possible de déterminer des paramètres expérimentaux tels que la sensibilité, le domaine de linéarité de la réponse en fonction de la concentration en glucose, le temps de réponse du système catalytique et la constante apparente de Michaelis-Menten (K_M^{app}). La sensibilité, la limite de détection ainsi que le domaine de linéarité sont obtenus à partir des courbes de calibration résultant du traitement des courbes d'ampérométrie (Figure 69A). K_M^{app} est quant à lui obtenu par la courbe d'équation $i = f(i/[glucose])$ (Figure 69B), selon la relation de Lineweaver-Burk (Équation 50).^{74, 75} Toutes les valeurs déterminées sont présentées dans le Tableau 7 et nous permettent d'envisager l'utilisation de ce genre de système fonctionnel pour le développement de capteur électrochimique de glucose.

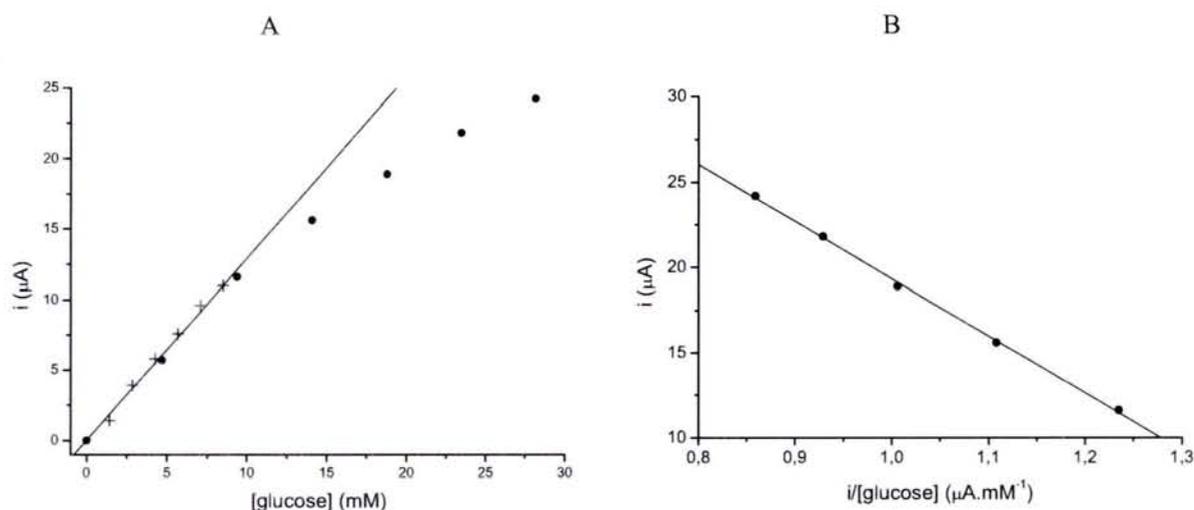


Figure 69. (A) Courbe de calibration obtenue pour électrode fonctionnée par la GOX. (B) Réponse du courant en fonction du rapport $i/[\text{glucose}]$. Pente de la droite obtenue par régression linéaire = $-33,6 \text{ mM}^{-1}$; coefficient de régression : $r = -0,99$.

Tableau 7. Paramètres expérimentaux inhérents à la fiabilité du biocapteur GOX pour la détection du glucose.

Temps de réponse	Limite de détection	Sensibilité	Domaine de linéarité	K_M^{app}
$\sim 10 \text{ s}$	$\sim 1 \text{ mM}$	$\sim 1 \mu\text{A.mM}^{-1}$	$[\text{glucose}] < 10 \text{ mM}$	$33,6 \text{ mM}^{-1}$

Notons que la valeur de la constante apparente de Michaelis-Menten obtenue pour le système GOX/SC3 immobilisé sur ECV est proche de celle de 37 mM rapportée dans la littérature dans le cas de la GOX solubilisée en volume.¹⁵¹ Ceci montre que l'affinité de la glucose oxydase pour son substrat est la même après immobilisation de l'enzyme.

III.2.b - Électrodes fonctionnalisées par la peroxydase

La peroxydase, catalysant la réaction d'oxydation de l'hydroquinone (QH_2) selon l'équation bilan 57, a elle aussi été étudiée par électrochimie après son immobilisation sur ECV modifiées par l'hydrophobine SC3. Les résultats obtenus par voltampérométrie cyclique et par ampérométrie hydrodynamique (Figure 70) indiquent que la technique d'immobilisation de la HRP à l'aide de la SC3 permet l'étude par électrochimie de l'activité de l'enzyme adsorbée. En effet, la Figure 70A montre que lorsque l'électrode de carbone vitreux fonctionnée HRP/SC3 est placée dans une solution contenant H_2O_2 et QH_2 , le signal d'oxydation de QH_2 en quinone (Q) diminue alors que le signal en retour, correspondant à la réduction de Q en QH_2 , augmente. Ces résultats montrent qu'il y a consommation de QH_2 et production de Q à la surface de l'électrode fonctionnée par la

peroxydase ; résultats en accord avec le mécanisme catalytique de la HRP décrit dans la littérature¹⁵²⁻¹⁵⁴ et rappelé dans la partie Matériel et Méthodes de ce manuscrit. Par ailleurs, la dépendance entre le courant traversant l'électrode de travail et la concentration volumique en H_2O_2 obtenue à partir des expériences d'ampérométrie hydrodynamique montre que la sensibilité du système HRP/SC3 passe de $1,3 \mu A.mM^{-1}$ le 1^{er} jour d'utilisation à $0,3 \mu A.mM^{-1}$ le 8^{ème} jour et $0,1 \mu A.mM^{-1}$ le 19^{ème} jour. La diminution de l'activité de la HRP immobilisée pourrait être la conséquence de l'instabilité intrinsèque de l'enzyme du fait de la présence dans le milieu réactionnel de H_2O_2 ,^{155, 156} espèce oxygénée réactive et/ou de la complexité de son mécanisme d'oxydoréduction (Équations bilan 54, 55 et 56). En effet, une électrode utilisée pour la première fois au 36^{ème} jour après sa fonctionnalisation par la HRP/SC3 est encore active (résultats non présentés). Cette dernière observation indique que l'électrode fonctionnalisée par la peroxydase peut être stockée sans dénaturation de l'enzyme mais ne peut servir que pour un nombre limité d'utilisations. Remarquons que la valeur du K_M^{app} obtenue pour la peroxydase immobilisée (0,9 mM) montre que l'affinité de l'enzyme pour son substrat ne diminue pas après immobilisation de la HRP via la SC3. En effet, la constante de Michaelis-Menten pour la HRP solubilisée en volume est de 0,7 mM.¹⁵¹

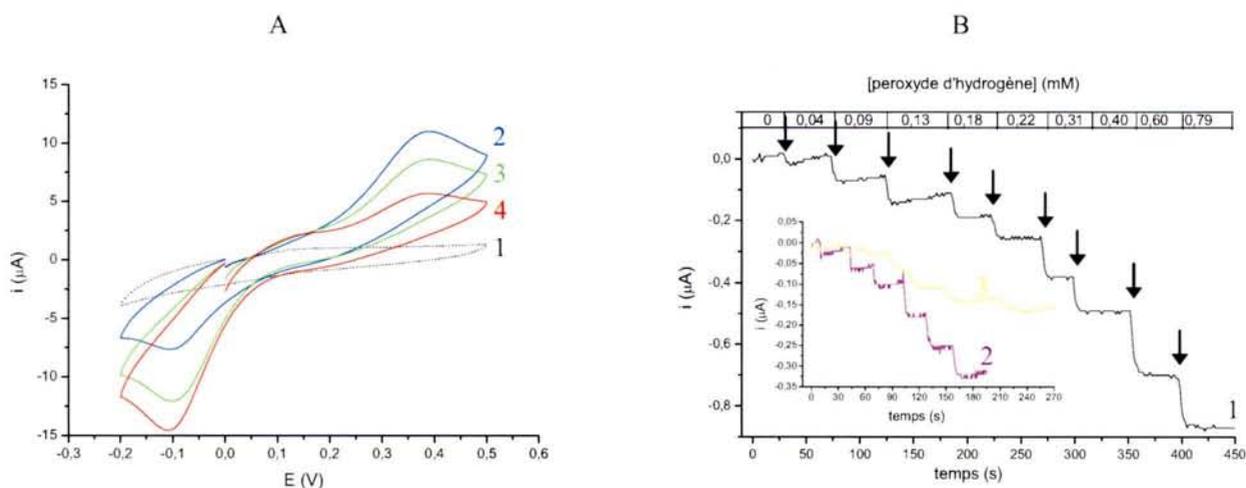
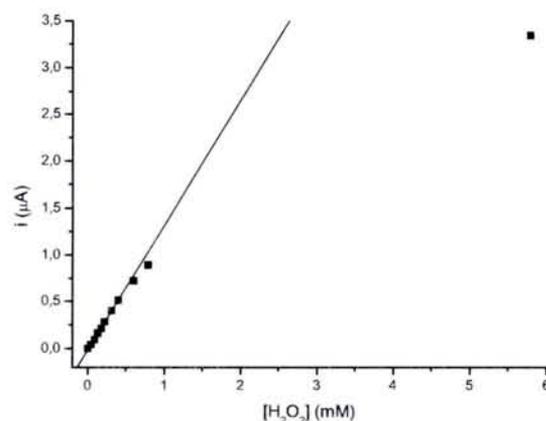


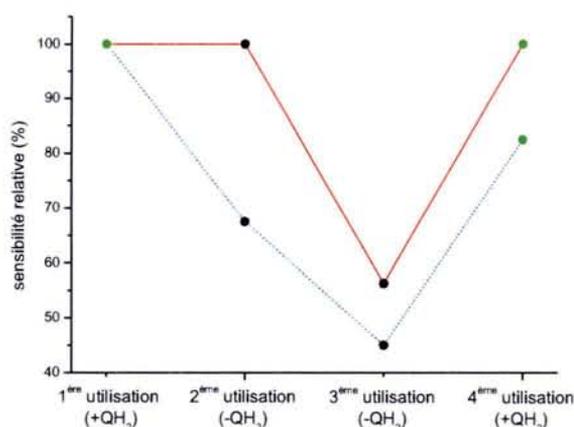
Figure 70. (A) Voltampérogrammes cycliques enregistrés au voisinage des potentiels rédox du couple Q/ QH_2 dans 50 mM de tampon phosphate pH 7 de concentrations en QH_2 et H_2O_2 respectives (1) 0 et 0 mM, (2) 2 et 0 mM, et 2 et 2 mM aux temps d'immersion (3) t_0 et (4) t_0+10 minutes. (B) Courbes d'ampérométrie hydrodynamique à un potentiel imposé de -0,2 V. Les flèches indiquent les injections de 20 à 180 μL de solution de H_2O_2 39,4 mM dans la cellule électrochimique contenant initialement 35 mL de solution de QH_2 0,5 mM. Les courbes 1–3 ont été obtenues avec l'électrode fonctionnalisée HRP/SC3 et utilisée respectivement les 1^{er}, 8^{ème} et 19^{ème} jours après la fonctionnalisation.

Tableau 8. Paramètres expérimentaux obtenus à la 1^{ère} utilisation du biocapteur HRP pour la détection de H₂O₂.

Temps de réponse	Limite de détection	Sensibilité	Domaine de linéarité	K_M^{app}
~ 10 s	~ 0,03 mM	~ 1,3 $\mu\text{A}\cdot\text{mM}^{-1}$	[H ₂ O ₂] < 0,6 mM	0,9 mM ⁻¹

**Figure 71.** Courbe de calibration de l'électrode fonctionnalisée par la HRP.

Notons que la HRP directement adsorbée sur l'ECV nue est également active. Cependant, l'électrochimie ne permet pas de comparer les valeurs de sensibilité pour deux systèmes distincts. Afin de mettre en évidence le rôle joué par l'hydrophobine dans le cas des systèmes enzymatiques immobilisés sur ECV, nous avons entrepris les mêmes études d'ampérométrie hydrodynamique précédemment décrites, en absence du médiateur QH₂. Comme le montre la Figure 72, la sensibilité d'une électrode fonctionnalisée HRP/SC3, après avoir été utilisée dans une solution de médiateur, est inchangée à sa seconde utilisation en absence du médiateur. On observe, dans les mêmes conditions, une perte de 33% de l'activité de l'enzyme avec l'électrode sur laquelle a été adsorbée la HRP.

**Figure 72.** Evolution de la sensibilité relative des systèmes (●) HRP et (—) HRP/SC3 adsorbés sur ECV, en fonction de la présence (+QH₂) ou de l'absence (-QH₂) du médiateur dans la cellule électrochimique.

À la troisième utilisation de ces systèmes, on note, sans QH₂, une perte d'activité par rapport à la première utilisation de 55 et de 44%, respectivement, pour les électrodes HRP et HRP/SC3. Toutefois, à la quatrième utilisation, l'emploi de QH₂ en volume permet, dans le cas du système HRP/SC3, de retrouver une activité égale à celle mesurée lors de la première utilisation. Le système HRP adsorbé ne retrouve que 82% de son activité initiale.

Ainsi, à défaut de pouvoir comparer les activités des enzymes des systèmes HRP et HRP/SC3 adsorbés sur ECV, la différence entre ces deux systèmes se manifeste par une meilleure stabilité en présence d'hydroquinone. Cette stabilité résulte très certainement de l'adsorption du médiateur à la surface de l'électrode HRP/SC3, phénomène auquel pourrait être annexé des transferts directs d'électrons à la surface de l'ECV.

Il faut rappeler que la quantité de catalyseur immobilisé est un paramètre important à prendre en considération pour l'élaboration d'électrodes fonctionnelles. D'un point de vue expérimental, la détermination des quantités d'enzyme adsorbée, généralement de l'ordre du nanogramme, est un réel défi. Des modèles analytiques, permettant de prédire l'adsorption de protéines sur des surfaces solides, sont d'ailleurs en cours de développement.¹⁵⁷

III.2.c - Estimation de la quantité d'enzyme immobilisée sur ECV

Dans nos études, la quantité d'enzyme immobilisée sur les électrodes de carbone vitreux a été estimée en se basant sur les résultats obtenus par la technique EELS et en assimilant les enzymes à des sphères rigides de volume spécifique partiel de 0,73 mL.g⁻¹.⁸¹ Ainsi, d'après l'Équation 52, nous obtenons un diamètre de la GOX de 72 Å (section d'aire de 4 051 Å²) et pour la HRP un diamètre de 45 Å, soit une section d'aire de 1 607 Å². D'après les résultats des épaisseurs du film GOX/SC3 adsorbé sur carbone amorphe, il devient clair que la glucose oxydase forme une monocouche lorsqu'elle est adsorbée sur la surface modifiée par la SC3. Nous en déduisons par extrapolation que la quantité de GOX immobilisée sur les ECV (0,07 cm² de surface) est d'environ 1,7×10¹¹, soit 46 ng d'enzyme. De même, dans le cas des surfaces HRP/SC3, la comparaison entre le diamètre de l'enzyme et l'épaisseur du film indique que la peroxydase est adsorbée sur les surfaces modifiées par la SC3 en formant 4 monocouches. En conséquence, la quantité de HRP immobilisée sur les électrodes de carbone vitreux est d'environ 1,7×10¹², soit 116 ng d'enzyme.

La question qu'il est usuel de se poser lorsque l'on travaille avec des systèmes catalytiques adsorbés sur des transducteurs est : en quoi l'immobilisation des enzymes influence-t-elle les cinétiques enzymatiques ? Alors que ces dernières peuvent être suivies par des méthodes telles que la spectrophotométrie, l'électrochimie n'est pas une méthode de choix permettant ce genre de mesures. En conséquence, l'efficacité de notre système d'immobilisation a été comparée par électrochimie à celle des enzymes solubilisées en volume sur le critère de l'obtention d'une réponse de courant instantanée. En effet, pour une concentration donnée en substrat, nous considérons qu'une réponse instantanée est obtenue pour des rapports $\Delta i/\Delta t > 1,4 \mu\text{A}\cdot\text{s}^{-1}$ et $\Delta i/\Delta t < -0,08 \mu\text{A}\cdot\text{s}^{-1}$, respectivement, dans le cas de la GOX et de la HRP. Les résultats d'ampérométrie hydrodynamique obtenus pour la GOX et la HRP solubilisées en volume sont présentés ci-dessous.

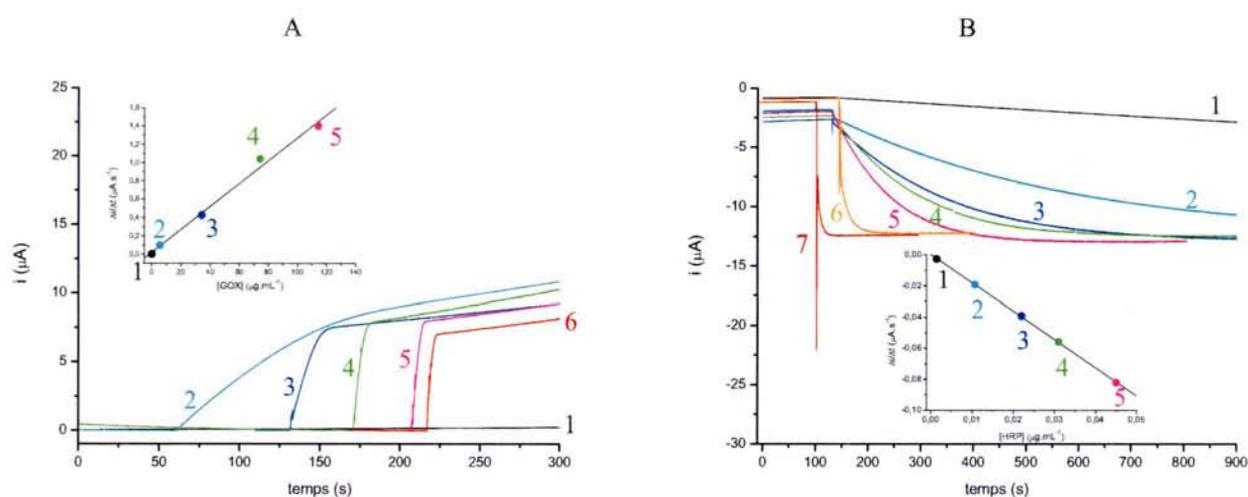


Figure 73. Suivi par ampérométrie hydrodynamique de la cinétique correspondant à l'activité (A) de la GOX et (B) de la HRP solubilisées en volume. (A) Les expériences ont été réalisées en fonction de la concentration en GOX, pour une concentration en glucose de 9,4 mM. Concentrations en GOX : (1) $2,5 \times 10^{-2}$; (2) 5,7; (3) $3,4 \times 10^1$; (4) $7,4 \times 10^1$; (5) $1,1 \times 10^2$ et (6) $1,6 \times 10^2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. L'insert représente l'évolution de la vitesse de réponse du système d'oxydation de H_2O_2 formé en fonction de la concentration en GOX, pour $\Delta i/\Delta t < 1,4 \mu\text{A}\cdot\text{s}^{-1}$. (B) Les expériences ont été réalisées en fonction de la concentration en HRP, pour des concentrations en hydroquinone et H_2O_2 respectives de 0,5 mM et 92 μM . Concentrations en HRP : (1) $1,4 \times 10^{-3}$; (2) $1,1 \times 10^{-2}$; (3) $2,2 \times 10^{-2}$; (4) $3,1 \times 10^{-2}$; (5) $4,5 \times 10^{-2}$; (6) $2,7 \times 10^{-1}$ et (7) $5,7 \times 10^{-1} \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. L'insert représente l'évolution de la vitesse de réponse du système de réduction de la quinone formée en fonction de la concentration en HRP, pour $\Delta i/\Delta t > -0,08 \mu\text{A}\cdot\text{s}^{-1}$.

Dans le cas de la GOX solubilisée, la réponse instantanée du système a été obtenue pour une concentration d'enzyme de $1,6 \times 10^2 \mu\text{g.mL}^{-1}$, ce qui correspond à une quantité de GOX de $5,5 \times 10^6 \text{ ng}$ dans la cellule électrochimique contenant 35 mL de solution (Figure 73A). Ainsi, en se basant sur l'estimation de la quantité de GOX immobilisée par la SC3 (46 ng) pour laquelle la réponse du système est elle aussi instantanée, il devient clair que $1,2 \times 10^5$ fois plus d'enzymes sont nécessaires pour obtenir une réponse identique pour la GOX solubilisée en volume. En ce qui concerne la HRP, $5,7 \times 10^{-1} \mu\text{g.mL}^{-1}$ d'enzymes solubilisées permet d'obtenir une réponse instantanée du système (Figure 73B) soit $2,0 \times 10^4 \text{ ng}$. De ce fait, 173 fois plus de HRP sont nécessaires en volume pour obtenir une réponse instantanée par comparaison avec la quantité de la même enzyme immobilisée via la SC3 qui a été estimée à 116 ng. Notons par ailleurs que la dépendance linéaire entre la vitesse de réponse du système et la concentration en enzyme à la fois pour la GOX et la HRP (inserts de la Figure 73A et B) indique que les cinétiques initiales suivies par l'ampérométrie hydrodynamique ne sont pas limitées par la diffusion des espèces vers la surface de l'électrode de travail.

Afin de comparer les propriétés intrinsèques des enzymes immobilisées à celles des enzymes solubilisées, les cinétiques enzymatiques ont également été suivies par spectrophotométrie. Les activités spécifiques de la GOX et de la HRP en volume ont été déterminées expérimentalement ($17,8$ et $6,0 \mu\text{mol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$, respectivement. Cf. Figure 74) et comparées avec les activités de ces mêmes enzymes immobilisées sur ECV modifiées par la SC3 ($3,8$ et $0,5 \mu\text{mol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$). Ces deux dernières valeurs ont pu être déterminées à partir de l'estimation des quantités d'enzyme immobilisée.

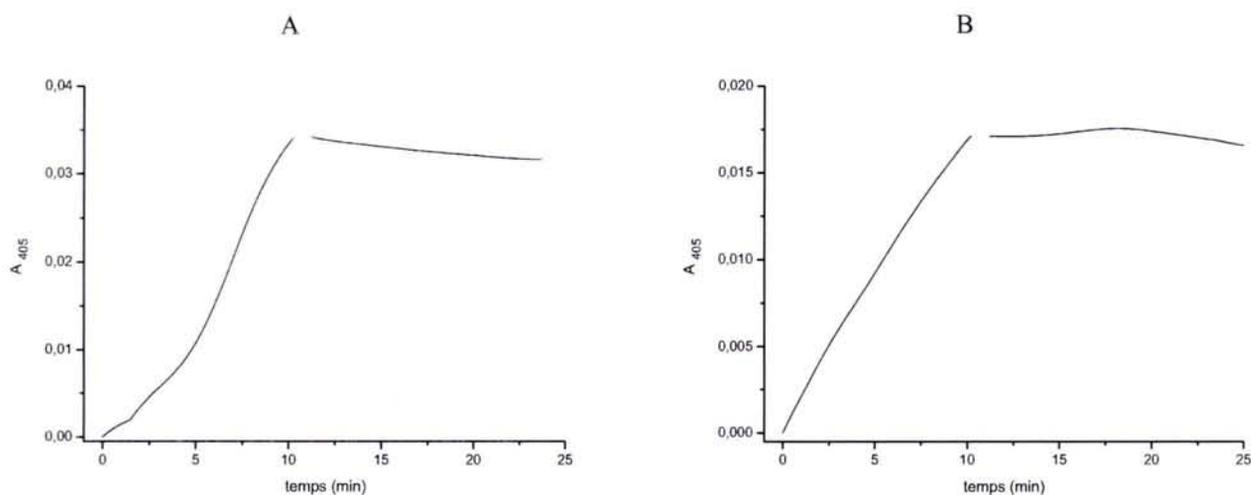


Figure 74. Cinétiques de l'activité (A) de la GOX et (B) de la HRP immobilisées sur ECV modifiée par la SC3. Après le retrait de la surface fonctionnalisée, la densité optique du milieu réactionnel n'augmente plus. Composition du milieu réactionnel : (A) glucose, ABTS, HRP et (B) glucose, ABTS, GOX dans une solution de tampon phosphate 50 mM, pH 7. [glucose] = 3,3 mM. [ABTS] = 47,9 μ M. [HRP] = [GOX] = 9,5 μ g.mL⁻¹.

Ainsi, les activités spécifiques des enzymes immobilisées sont 4,7 fois plus faibles dans le cas de la GOX, et 12 fois dans le cas de la HRP, que celles des enzymes solubilisées. Toutefois, assimiler les enzymes à des sphères et estimer que la totalité de la surface de l'ECV est recouverte de manière homogène par chacune des enzymes, nous a probablement conduit à surestimer les quantités de GOX et de HRP adsorbées à la surface des électrodes modifiées. En conséquence, les activités spécifiques calculées pour les enzymes immobilisées pourraient avoir été sous-estimées. Ces derniers résultats ainsi que les valeurs de K_M^{app} déterminées pour la GOX et la HRP montrent que la technique d'immobilisation utilisée pour ces travaux permet de préserver les enzymes sous leur forme active.

Les études en électrochimie du suivi des activités d'enzymes immobilisées ont cependant une limite, à savoir qu'elles ne permettent de travailler principalement qu'avec des enzymes d'oxydoréduction. Ce n'est que ces dernières années que commencent à apparaître dans la littérature des travaux en électrochimie concernant le suivi d'activités et même de cinétiques enzymatiques d'hydrolases par exemple.^{158, 159} De surcroît, avec l'électrochimie, nous sommes limités par la nature et le nombre de surfaces à pouvoir utiliser. Aussi, nous avons travaillé par transduction spectrophotométrique ; notamment pour l'étude de lipases immobilisées par l'hydrophobine SC3.

III.3 - Activités enzymatiques suivies par spectrophotométrie

Les lipases (LIP) sont des enzymes connues pour leur affinité pour les interfaces. Elles sont donc particulièrement intéressantes pour être étudiées sous forme immobilisée sur supports solides.

Nous avons utilisé des supports en Téflon[®], en polystyrène et en acier inoxydable. Les surfaces catalytiques obtenues ont été étudiées via l'activité des enzymes immobilisées, activité déterminée par spectrophotométrie (Figure 75). Nous pouvons constater que la lipase adhère aussi bien aux surfaces préalablement traitées par l'hydrophobine (LIP+SC3) qu'à celles non traitées (LIP-SC3). En effet, dans les deux cas, on observe l'avancement de la réaction d'hydrolyse du caprylate de *p*-nitrophényle.

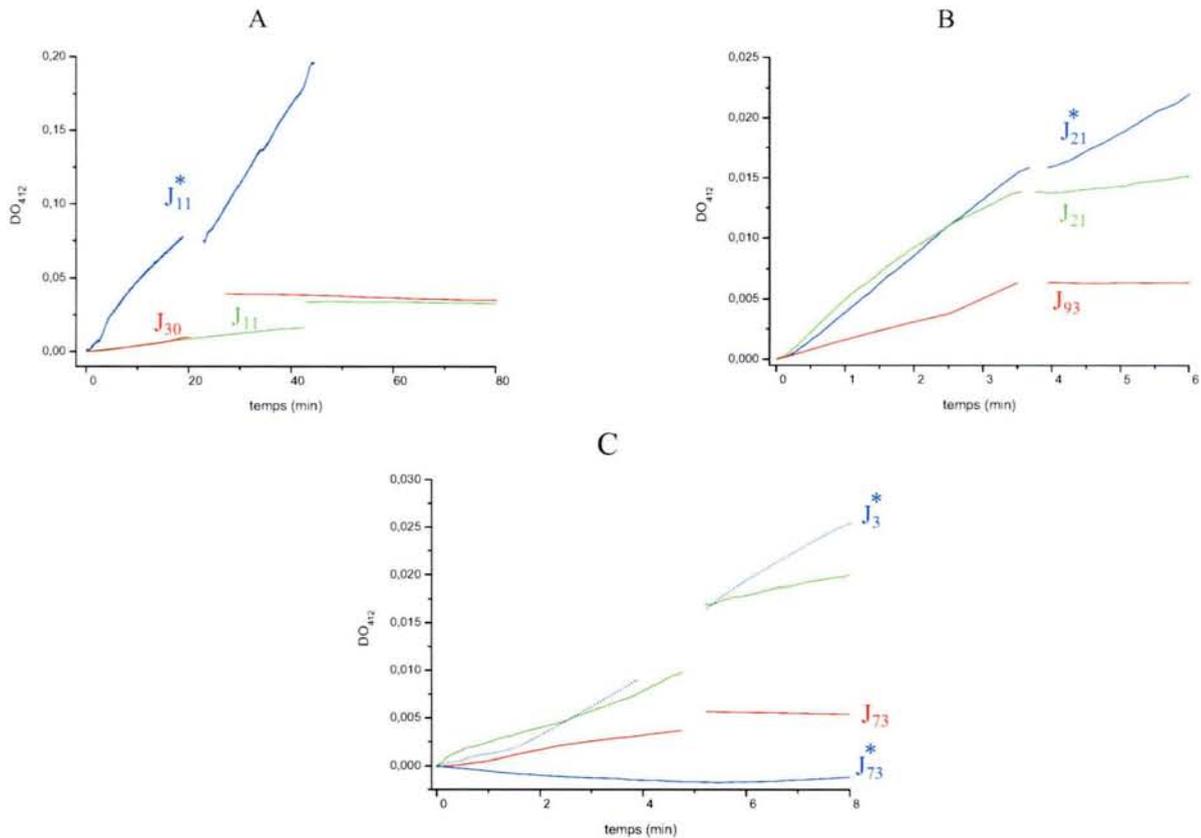


Figure 75. Cinétiques spectrophotométriques d'absorption à la longueur d'onde de 412 nm. Les surfaces en (A) Téflon[®], (B) polystyrène et (C) acier inoxydable, LIP+SC3 ou (*) LIP-SC3 ont été introduites, puis retirées de la cellule spectrophotométrique. J_X correspond à la mesure réalisée le X^{ème} jour après la préparation de la surface. Milieu réactionnel : 41,7 μM de caprylate de *p*-nitrophényle et 0,2% de DMSO dans une solution tampon phosphate pH 7,8.

Après retrait des surfaces LIP-SC3 de la cellule spectrophotométrique, on peut constater que l'absorbance du milieu réactionnel continue d'augmenter (Figure 75, courbes bleues). Ceci traduit le fait que la lipase est désorbée des surfaces nues lorsque ces dernières sont plongées dans la solution de substrat. Dans le cas des surfaces fonctionnalisées LIP+SC3, l'enzyme n'est que très peu, voire pas du tout, désorbée au cours d'une même expérience (Figure 75, courbes vertes et rouges). Notons que la différence d'activité de la lipase entre les surfaces LIP+SC3 et LIP-SC3 est plus importante dans le cas des surfaces en Téflon[®]. Ceci semble être en accord avec le fait que la lipase a plus d'affinité pour les surfaces hydrophobes que pour les surfaces hydrophiles.^{160, 161} Or, comme nous l'avons démontré dans le Chapitre I (Figure 45), une surface en Téflon[®] sur laquelle a été adsorbée la SC3 est rendue hydrophile avec une variation d'angle de contact beaucoup plus importante que pour les surfaces en polystyrène ou en acier inoxydable. Une adsorption en plus grande quantité de lipase, une organisation différente de l'enzyme sur le Téflon[®] entre les systèmes LIP-SC3 et LIP+SC3 et/ou une dualité entre l'activité des enzymes immobilisées et désorbées sont les trois hypothèses qui peuvent servir d'interprétation au phénomène observé. Toutefois, remarquons que le système LIP+SC3 est plus stable au cours du temps pour les surfaces en Téflon[®] que pour les surfaces en polystyrène et en acier inoxydable.

Par ailleurs, dans le cas de la surface en acier inoxydable LIP-SC3 utilisée le 73^{ème} jour après son élaboration, nous avons observé une perte totale de l'activité lipolytique. Dans les mêmes conditions d'utilisation, la surface en acier inoxydable LIP+SC3 permet toujours de suivre la catalyse enzymatique dont l'activité est comparable à celle mesurée au 3^{ème} jour.

Il nous a donc été possible de catalyser la réaction d'hydrolyse d'un substrat organique grâce à une enzyme immobilisée via l'hydrophobine SC3 sur différents supports solides ; et ce, sans qu'il y ait désorption de l'enzyme dans le temps. Ce résultat est prometteur pour la réalisation de bioréacteurs permettant le déclenchement ou l'arrêt contrôlé de la réaction.

III.4 - Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons démontré la possibilité d'immobiliser des enzymes sur différents supports solides en fonction de la transduction souhaitée. Les surfaces catalytiques obtenues sont stables et peuvent être réutilisées dans certains cas durant plus de trois mois.

Dans le cas de la glucose oxydase et de la peroxydase, l'affinité de l'enzyme pour son substrat est comparable, que l'enzyme soit immobilisée sur une électrode modifiée par la SC3 ou solubilisée en volume. Les études électrochimiques ont permis, à l'aide de la GOX, de réaliser des biocapteurs de première génération pour la détection du glucose ; et à l'aide de la HRP, des biocapteurs de seconde génération pour la détection du peroxyde d'hydrogène. Nous avons en effet démontré que la HRP est stabilisée grâce à l'hydrophobine SC3 sur électrode de carbone vitreux, bien que les conditions réactionnelles soient dénaturantes pour cette enzyme. Les études menées ont également abouti à des premiers résultats quant à la faisabilité d'élaborer des biocapteurs de troisième génération avec suivi de transferts directs des électrons, sans avoir recours à l'emploi de médiateurs électrochimiques solubilisés en volume. D'autres travaux déjà réalisés, concernant cette fois l'adsorption d'un autre médiateur, le vert de méthylène, sur des ECV modifiées par la SC3,²⁸ semblent prometteurs pour la généralisation de ce type de biocapteurs de troisième génération. En effet, au moyen de la voltampérométrie multi-cyclique, nous avons démontré que le médiateur s'accumule à la surface d'électrodes modifiées par la SC3. Les résultats obtenus avec la HRP immobilisée sans l'utilisation de l'hydroquinone en volume vont également dans ce sens. Ainsi, l'immobilisation à la fois de l'enzyme et du médiateur à la surface d'une l'électrode modifiée devrait permettre l'optimisation de transducteurs électrochimiques.

Les mesures réalisées en spectroscopie UV-visible ont montré qu'il était possible de suivre les cinétiques enzymatiques de la GOX et de la HRP immobilisées sur les ECV également par transduction spectrophotométrique. Cette même technique nous a aussi permis de détecter des substrats solubilisés en volume au moyen de diverses surfaces (Téflon[®], polystyrène, acier inoxydable) fonctionnalisées par une hydrolase. Nous avons montré que les lipases, adsorbées via l'hydrophobine SC3, ont une activité plus stable que celles directement physisorbées sur les surfaces nues. Dans ce dernier cas, l'enzyme semble être adsorbée en plus grande quantité et/ou posséder une activité accrue, mais elle est désorbée au cours du temps. La désorption complète de l'enzyme a d'ailleurs été observée dans le cas des surfaces

en acier inoxydable non modifiée par la SC3. Ainsi, grâce aux surfaces fonctionnalisées enzyme/SC3, il est possible de déclencher et d'arrêter des catalyses enzymatiques à volonté, sans en modifier les cinétiques.

Par ailleurs, les calculs d'aire de surface accessible des enzymes et la détermination du pouvoir mouillant des surfaces fonctionnalisées nous ont permis de conclure que ce sont les interactions polaires qui régissent l'adsorption des enzymes via la SC3, alors que l'adsorption des enzymes directement sur les surfaces solides est, quant à elle, régie par les interactions non polaires. De ce fait, ces dernières, étant en terme de superficie de surface de contact, plus faibles que les interactions polaires, ne sont pas stabilisantes pour les enzymes directement adsorbées sur supports solides.

Les résultats concernant l'immobilisation d'enzymes semblent donc prometteurs pour la réalisation de systèmes fonctionnels originaux et performants, que ce soit pour la mise au point de biocapteurs optiques ou électrochimiques, et ce, avec une grande diversité de combinaisons enzyme/support solide.

Chapitre IV

Immobilisation de molécules issues de la synthèse organique

Dans cet objectif de diversification du type de surfaces catalytiques à pouvoir élaborer grâce à l'hydrophobine SC3, nous nous sommes intéressés à l'immobilisation de composés organiques dotés de fonctionnalités particulières et synthétisés spécialement pour nos études.

IV.1 - Les cyclodextrines

Les cyclodextrines (CD), en tant que macrocycles amphiphiles à cavité permettant la complexation de molécules invités, sont largement étudiées et trouvent de nombreuses applications.¹⁶²⁻¹⁶⁵ Nous nous sommes intéressés à l'étude de dérivés de CD originaux synthétisés dans notre équipe par Stéphane Menuel et le Pr Alain Marsura (Figure 76). Les travaux de Badis et ses collaborateurs ont montré que certains de ces dérivés cyclodextriniques forment des films stables à l'interface eau/air et sur des supports solides après transfert depuis l'interface eau/air par la technique de Langmuir-Blodgett.¹⁶⁶ Nous nous sommes alors proposés d'étudier le comportement électrochimique de deux ligands originaux, dérivés de la cyclodextrine α , ainsi que de leurs analogues complexés mono- et binucléaires. En effet, les molécules utilisées pour ces travaux ont été préparées à partir de couronnes α -cyclodextrines natives, greffées sur la face alcool primaire de 6 bras uréido-bipyridyles qui permettent de complexer des métaux ou des lanthanides bi- ou trivalents. Les deux sites de complexation possibles de ces molécules sont les azotes des groupements bipyridyles et l'oxygène des groupements urées permettant respectivement la chélation des cations Fe^{II} et Eu^{III} (Figure 76).

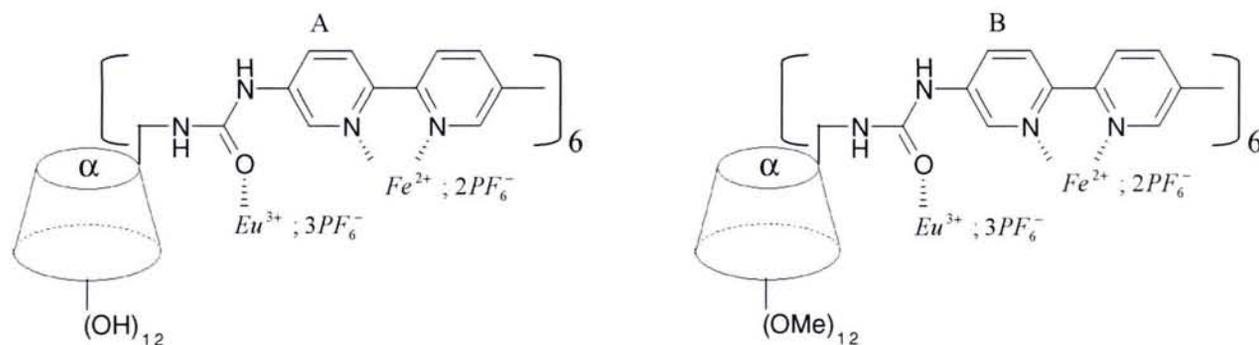


Figure 76. Structure des dérivés de cyclodextrine étudiés. Complexes binucléaires des cyclodextrines (A) hydroxylée et (B) perméthylée.

Pour plus de clarté, nous noterons OH, OH-Eu^{III}, OH-Fe^{II}, et OH-Eu^{III}-Fe^{II} les quatre dérivés hydroxylés étudiés ainsi que OMe, OMe-Eu^{III}, OMe-Fe^{II} et OMe-Eu^{III}-Fe^{II} les quatre dérivés perméthylés.

IV.1.a - Études électrochimiques en volume

Toutes les expériences présentées dans ce paragraphe ont été réalisées avec une concentration volumique des dérivés de CD d'environ 0,3 M. Les processus d'oxydoréduction des ligands diffèrent suivant la substitution -OMe ou -OH de leur face alcool secondaire (Figure 77). En effet, l'oxydation des groupements bipyridyles des cyclodextrines perméthylées a lieu à un potentiel de 1,0 V alors que celle des bipyridyles des cyclodextrines hydroxylées se produit à 2,0 V (Figure 77A). Ceci pourrait être expliqué par la formation de liaisons hydrogène entre les groupements bipyridyles et des molécules d'eau résiduelles stabilisées au sein du ligand OH. Ce dernier est en effet plus stable que son homologue OMe, du fait de la rigidité du complexe induit par la présence de liaisons hydrogène intramoléculaires au sein de la cavité cyclodextrinique. Des cations radicaux sont souvent décrits dans la littérature comme produits de l'oxydation des groupements bipyridyles et en général des groupements amines primaires, secondaires ou tertiaires.¹⁶⁷⁻¹⁶⁹ Notons que le signal en retour, correspondant à la réduction des radicaux formés, est lui aussi décalé de 1,0 V entre les deux ligands. En fait, le comportement du ligand hydroxylé est très complexe. D'après la Figure 77B, nous constatons que le signal d'oxydation observé à 1,5 V est le signal obtenu en retour de la réduction observée à -2,0 V. Nous avons émis comme hypothèse la possibilité de la réduction des liaisons hydrogène à -2,0 V qui conduirait alors à une oxydation plus facile (1,5 V) des bipyridyles libres. La dépendance entre l'intensité du pic observé à 1,5 V et la valeur du potentiel de retournement laisse penser qu'il y a adsorption de ces molécules après réduction des liaisons hydrogène, à la surface des ECV ; hypothèse

vérifiée expérimentalement. En effet après nettoyage de l'électrode de travail, le signal à 1,5 V disparaît lorsque la valeur critique du potentiel de réduction de retournement n'est pas atteinte.

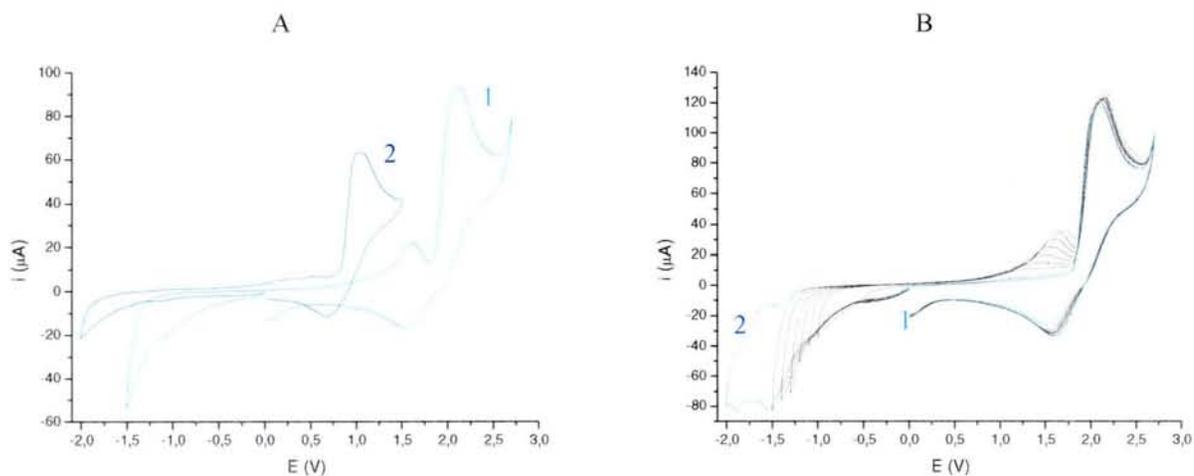


Figure 77. (A) Voltampérogrammes cycliques obtenus pour les ligands (1) OH et (2) OMe solubilisés dans 100 mM de *t*-BuPF₆/DMF. (B) Voltampérogrammes cycliques obtenus pour le ligand OH avec des potentiels de retournement en réduction croissant de (1) 0,0 V à (2) 2,0 V. Vitesse de balayage : 100 mV.s⁻¹.

Comme nous l'avons observé, les signaux correspondant aux processus d'oxydoréduction des groupements bipyridyles sont très complexes. À cela vient s'ajouter le fait que les dérivés cyclodextriniques étudiés possèdent chacun 6 groupements bipyridyles dont 3 interviennent dans la complexation des cations Fe^{II}. Afin de mieux comprendre la contribution de ces groupements bipyridyles au niveau du signal rédox observé pour les ligands α hexapodes, nous nous sommes intéressés à l'étude du ligand α tripode. Les voltampérogrammes cycliques des deux ligands α -OMe hexapodes et tripodes sont présentés en Figure 78. Le choix de ces deux ligands semble judicieux car ils ne sont pas impliqués dans des liaisons hydrogène inter- et intramoléculaires contrairement aux ligands OH.

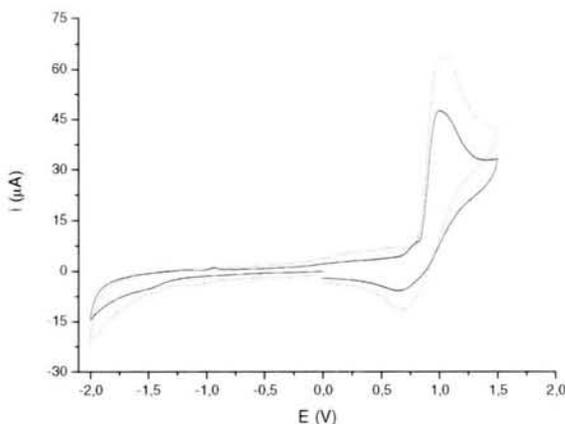


Figure 78. Voltampérogrammes cycliques obtenus pour les ligands α -OMe (—) tripode et (....) hexapode solubilisés respectivement dans 100 mM de *t*-BuPF₆/DMF et *t*-ProBF₄/DMF. Vitesse de balayage : 100 mV.s⁻¹.

Nous pouvons nous apercevoir que le signal d'oxydation des groupements bipyridyles obtenu avec le tripode n'est que 1,4 fois plus faible que le signal obtenu avec l'hexapode à la même concentration molaire. Ce signal n'est donc pas proportionnel au nombre de bipyridyles, ce qui peut s'expliquer par le fait que chaque groupement ne contribue pas de la même manière dans le processus rédox observé entre 0,5 et 1,0 V. Plusieurs hypothèses sont alors envisageables : l'organisation des bras bipyridyles peut être fonction de la conformation intrinsèque des molécules ou encore de l'engagement des azotes des bipyridyles dans d'autres liaisons faibles. Ces résultats sont confirmés par des études électrochimiques de la 5,5'-diméthyl-2,2'-bipyridine et de son complexe de Fe^{II} (Figure 79). Nous avons montré que les signaux rédox des 5,5'-diméthyl-2,2'-bipyridine obtenus en milieu organique ne sont ni réversibles, ni proportionnels à la concentration en espèce électroactive (Figure 79A), contrairement à leur analogue complexé par le cation Fe^{II} (Figure 79B). L'organisation bien définie des 5,5'-diméthyl-2,2'-bipyridines autour des cations qu'elles complexent, ainsi qu'une possible contribution du système $\text{Fe}^{\text{III}}/\text{Fe}^{\text{II}}$ dans le signal observé, expliqueraient cette différence de comportement électrochimique entre les 5,5'-diméthyl-2,2'-bipyridines et leurs complexes de Fe^{II} . En effet, le complexe 5,5'-diméthyl-2,2'-bipyridine- Fe^{2+} , comme le complexe 5,5'-diméthyl-2,2'-bipyridine- Fe^{3+} , est un complexe 3/1 ($[\text{Fe}(\text{Bpy})_3]^{2+}$).^{170, 171}

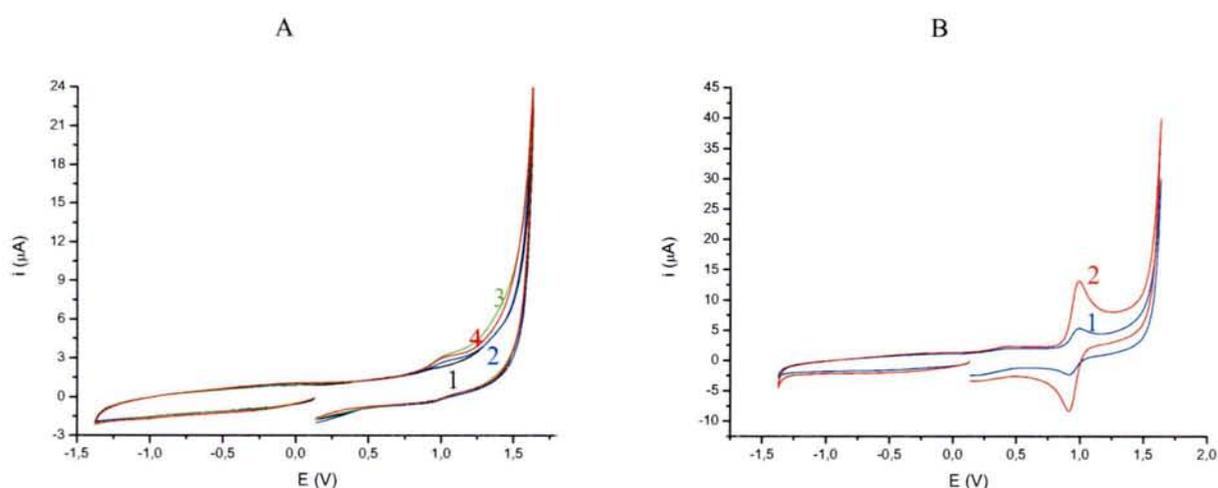


Figure 79. Voltampérogrammes cycliques obtenus pour les molécules 2,2'-bipyridines (A) non complexés et (B) complexés par les cations Fe^{II} . Électrolyte : 100 mM de $t\text{-BuPF}_6/\text{DMF}$. (A) Concentrations en 2,2'-bipyridine : (1) 0 ; (2) 0,6 ; (3) 2,4 ; et (4) 19,4 mM. (B) Concentrations en $[\text{Fe}(\text{Bpy})_3]^{2+}$: (1) 0,3 et (2) 12 mM. Vitesse de balayage : $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

Les études menées au préalable avec les ligands des dérivés cyclodextriniques et les molécules de 5,5'-diméthyl-2,2'-bipyridine ont ainsi facilité la compréhension des processus d'oxydoréduction intervenant au sein des complexes de CD mononucléaires (Figure 80) et binucléaires (Figure 81).

Les voltampérogrammes obtenus avec le complexe mononucléaire de fer nous permettent de déduire que le signal d'oxydoréduction du couple $\text{Fe}^{\text{III}}/\text{Fe}^{\text{II}}$ complexé au sein du dérivé de cyclodextrine est observé autour de 0,0 V (Figure 80A). Le signal du fer pour le complexe hydroxylé est alors 9 fois plus important que pour le complexe perméthylé. Ceci peut être expliqué par le fait que le complexe OH-Fe^{II} est moins flexible que le $\text{OMe-Fe}^{\text{II}}$, d'où une stabilité du processus rédox au sein de la CD hydroxylée. À partir des voltampérogrammes obtenus pour les complexes mononucléaires d'euporium, il devient clair que le signal du couple $\text{Eu}^{\text{III}}/\text{Eu}^{\text{II}}$ induit par la présence de l' Eu^{III} initialement complexé par le dérivé de cyclodextrine, est observé autour de -0,8 V.

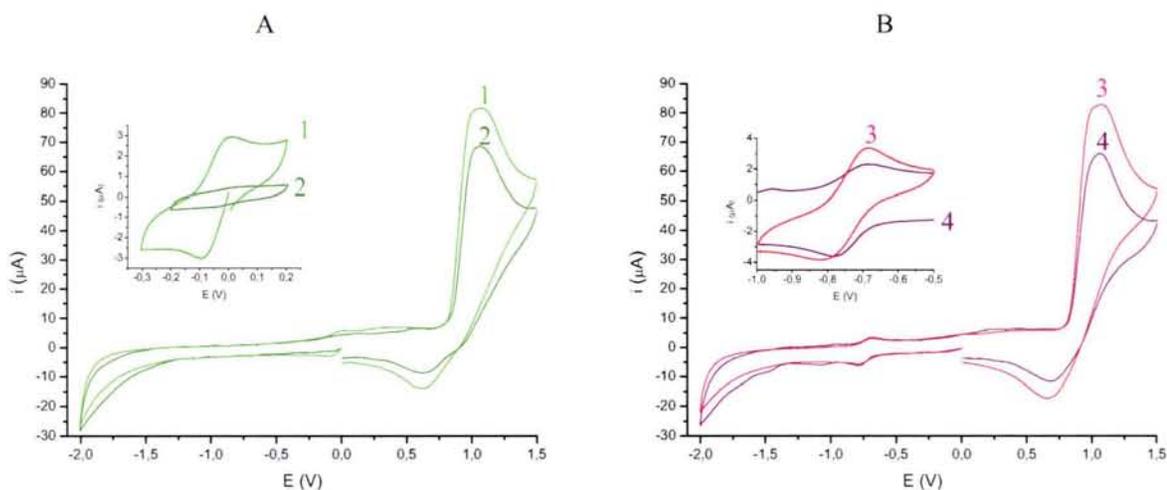


Figure 80. Voltampérogrammes cycliques obtenus pour les complexes mononucléaires de (A) Fe^{II} et (B) Eu^{III} solubilisés dans 100 mM de $t\text{-BuPF}_6/\text{DMF}$. (1) OH-Fe^{II} , (2) $\text{OMe-Fe}^{\text{II}}$, (3) $\text{OH-Eu}^{\text{III}}$ et (4) $\text{OMe-Eu}^{\text{III}}$. Vitesse de balayage : $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$. Les inserts représentent les cycles réalisés au voisinage des potentiels rédox des couples (A) $\text{Fe}^{\text{III}}/\text{Fe}^{\text{II}}$ et (B) $\text{Eu}^{\text{III}}/\text{Eu}^{\text{II}}$.

La présence de l' Eu^{III} dans le complexe binucléaire perméthylé semble stabiliser le système rédox $\text{Fe}^{\text{III}}/\text{Fe}^{\text{II}}$ car sans le lanthanide (complexe $\text{OMe-Fe}^{\text{II}}$), l'intensité du pic correspondant au système $\text{Fe}^{\text{III}}/\text{Fe}^{\text{II}}$ est beaucoup plus faible que celui obtenu avec le complexe $\text{OMe-Eu}^{\text{III}}\text{-Fe}^{\text{II}}$ (Figure 80A et Figure 81A). Ce résultat peut s'expliquer par le fait que, lors de la préparation du complexe binucléaire à partir du ligand cyclodextrinique, l'insertion du cation europium^{III} rigidifie l'édifice moléculaire du macrocycle, stabilisant ainsi

la complexation par la suite du fer^{II}. Notons que pour l'obtention d'un complexe binucléaire, il est nécessaire de former dans un premier temps le complexe d'Eu^{III}, puis de complexer le Fe^{II}. Dans le cas inverse, l'Eu^{III} n'est pas complexé par le complexe CD de Fe^{II}.¹⁷²

Fait remarquable : le signal réversible à -0,8 V correspondant au couple Eu^{III}/Eu^{II} n'est pas observé contrairement au signal du fer à 0,0 V et ce, pour les deux complexes binucléaires OMe-Eu^{III}-Fe^{II} et OH-Eu^{III}-Fe^{II} (Figure 81). L'euporium semble donc être décomplexé des complexes binucléaires. Les résultats obtenus sont confirmés par les constantes de complexation de l'euporium^{III} et du fer^{III} au niveau des groupements urées des CD. En effet, sachant que le Fe^{III} formé après oxydation du Fe^{II} complexé par les bipyridyles ne peut être complexé que par les groupements urées, et que dans ce cas, la constante de complexation du Fe^{III} est plus importante que celle de l'Eu^{III}, il semble évident de penser que le Fe^{III} formé est complexé par les urées, décomplexant ainsi l'Eu^{III}. Le cas du complexe binucléaire hydroxylé est un peu plus complexe. En effet, le signal correspondant à la réduction de l'euporium^{III} en euporium^{II} est observé alors que le signal retour en réduction ne l'est pas. L'hypothèse la plus plausible est que le cation Eu^{III}, bien que chassé par le Fe^{III}, est encore présent au sein de la cyclodextrine hydroxylée du fait, là encore, de la rigidité de l'édifice moléculaire des dérivées de CD OH.

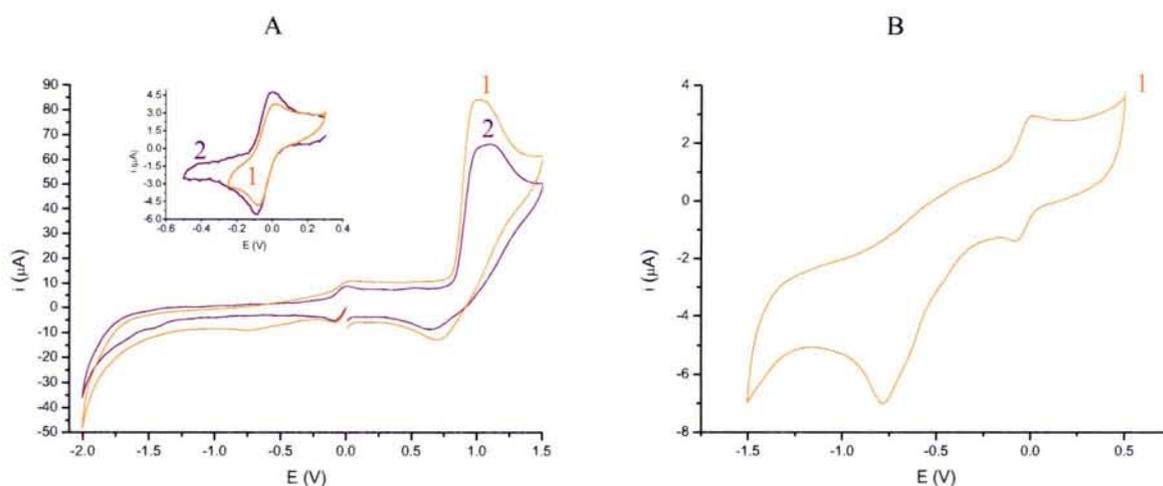


Figure 81. Voltampérogrammes cycliques obtenus pour les complexes binucléaires (1) OH-Eu^{III}-Fe^{II} et (2) OMe-Eu^{III}-Fe^{II}. (A) Cycle réalisé entre -2,0 et +1,5. L'insert représente les cycles réalisés au voisinage du potentiel rédox du couple Fe^{III}/Fe^{II}. (B) Cycle réalisé entre -1,5 et +0,5. Vitesse de balayage : 100 mV.s⁻¹.

Nous avons montré ici la possibilité d'oxyder et de réduire de manière cyclique les cations de fer ou d'euprium complexés par les dérivés de cyclodextrine mononucléaires. Les complexes binucléaires nous ont permis de mieux comprendre les processus rédox au sein de ces macrocycles. De plus, nous avons constaté que les résultats des études électrochimiques diffèrent selon la flexibilité conformationnelle des dérivés de cyclodextrine, via les liaisons hydrogène intramoléculaires pour les hydroxylés ou encore via la complexation de l'Eu^{III} pour les perméthylés. Les résultats obtenus nous permettent d'envisager l'élaboration de surfaces catalytiques dont les propriétés physico-chimiques permettraient d'obtenir des interrupteurs moléculaires originaux. Dans cette perspective, nous avons procédé à l'immobilisation de chacun des deux dérivés binucléaires à l'aide de l'hydrophobine SC3 sur électrodes de carbone vitreux.

IV.1.b - Caractérisation des systèmes cyclodextriniques immobilisés

L'immobilisation du complexe 5,5'-diméthyl-2,2'-bipyridine-Fe^{II} et celle des complexes binucléaires OH et OMe sur électrodes de carbone vitreux ont été réalisées grâce à l'hydrophobine SC3. Les résultats obtenus montrent qu'il est possible d'observer les signaux correspondant au système rédox des groupements bipyridyles des trois complexes (Figure 82). Toutefois dans le cas des deux complexes binucléaires, les signaux des couples Fe^{III}/Fe^{II} et Eu^{III}/Eu^{II} ne sont pas détectables contrairement aux résultats obtenus pour les mêmes complexes solubilisés en volume.

Par ailleurs, d'après l'allure des signaux observés, le complexe binucléaire perméthylé immobilisé semble plus stable que son analogue hydroxylé. Les fortes interactions hydrophobe-hydrophobe entre la couronne cyclodextrinique *O*-méthylée et l'hydrophobine SC3 peuvent expliquer ces résultats qui, en outre, coïncident avec les résultats des études des films monomoléculaires des ligands OH et OMe ainsi que des complexes OH-Eu^{III} et OMe-Eu^{III} étalés à l'interface eau/air.¹⁶⁶

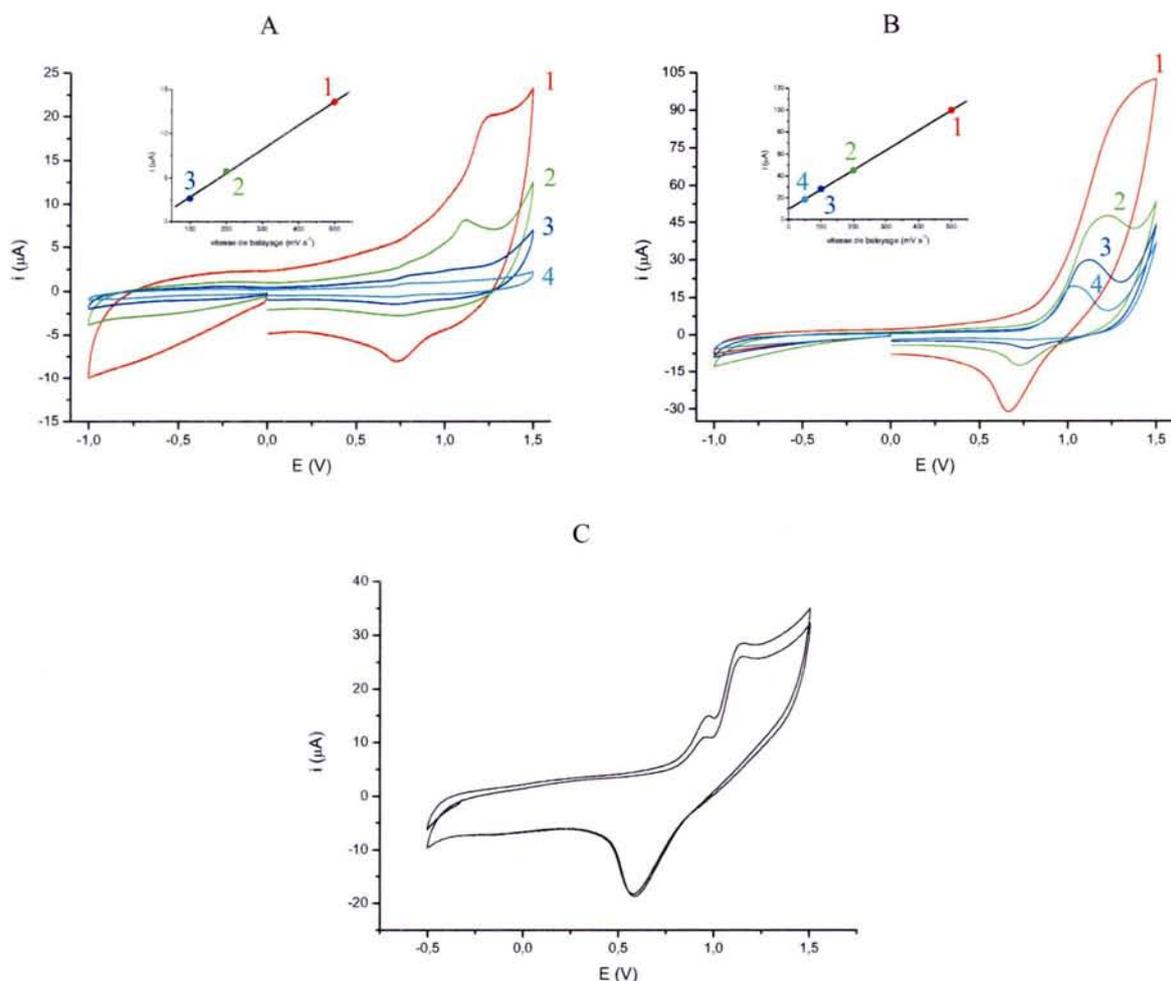


Figure 82. Voltampérogrammes cycliques enregistrés dans 50 mM de *t*-ProBF₄/CH₂Cl₂ avec les complexes binucléaires (A) OH-Eu^{III}-Fe^{II} et (B) OMe-Eu^{III}-Fe^{II} immobilisés sur ECV par l'hydrophobine SC3. Vitesses de balayage : (1) 500, (2) 200, (3) 100 et (4) 50 mV.s⁻¹. Les inserts représentent l'évolution de l'intensité du signal d'oxydation des bipyridyles en fonction de la vitesse de balayage. (C) Deux voltampérogrammes cycliques consécutifs enregistrés dans 50 mM de *t*-ProBF₄/CH₂Cl₂ avec le complexe de fer^{II} de la 5,5'-diméthyl-2,2'-bipyridine immobilisé sur ECV par l'hydrophobine SC3. Vitesse de balayage : 100 mV.s⁻¹.

La dépendance linéaire entre l'intensité du signal d'oxydation et la vitesse de balayage pour les deux dérivés binucléaires (Figure 82A et B) indique que les processus d'oxydoréduction observés ne sont pas limités par la diffusion des espèces électroactives. Ainsi, les deux complexes sont bien immobilisés dans la matrice protéique d'hydrophobine. La valeur des pentes obtenues après régression linéaire, à savoir 0,18 et 0,04 μA.s.mV⁻¹ respectivement pour les complexes OMe-Eu^{III}-Fe^{II} et OH-Eu^{III}-Fe^{II}, confirme la stabilité du complexe hydroxylé adsorbé à la surface de l'électrode par rapport au complexe perméthylé, dans les mêmes conditions. L'immobilisation des complexes [Fe(Bpy)₃]²⁺ (Figure 82C) peut contribuer à la dégradation par oxydation de polluants organiques tels que la rhodamine B, la malachite verte et le *N,N*-diméthylaniline, via l'activation de l'oxygène moléculaire.¹⁷³

IV.2 – Complexe calixarénique de cuivre^I adsorbé sur électrodes

IV.2.a - Contexte de l'étude

Les calixarènes, comme les cyclodextrines, représentent une famille de molécules à cavité pouvant complexer des molécules invitées. Leurs dérivés sont synthétisés et étudiés dans le but d'apporter des fonctionnalités supplémentaires. Les études électrochimiques d'un complexe de cuivre^I d'un dérivé calixarénique (calixarène-Cu^I) solubilisé en milieu organique ont récemment été réalisées par van der Heyden.²⁹ Elles ont permis de caractériser les cycles d'oxydoréduction du cuivre^I et du cuivre^{II} complexés par le dérivé de calixarène dans l'acétonitrile. Van der Heyden a ensuite entrepris des expériences d'immobilisation du calixarène-Cu^I sur des électrodes de carbone et de platine préalablement modifiées par l'hydrophobine SC3. Toutefois, les signaux d'oxydoréduction du cuivre disparaissaient au bout de deux ou trois cycles voltampérométriques. Nous avons donc poursuivi ces études dans un autre solvant, le dichlorométhane, solvant pour lequel le système SC3+calixarène-Cu^I adsorbé pourrait être plus stable. Par la suite, nous nous sommes intéressés à l'utilisation de ces surfaces sur lesquelles a été immobilisé le complexe calixarénique afin de pouvoir catalyser d'autres réactions d'oxydoréduction non pas électrochimiques mais chimiques. Le calixarène-Cu^I utilisé pour ces études a été synthétisé dans notre équipe par le Pr Jean-Bernard Regnouf de Vains et le Dr Jean-Olivier Dalbavie, à partir du ligand calixarénique dont la synthèse a déjà été rapportée.¹⁷⁴ Ce complexe possède une couronne aromatique sur laquelle sont greffés le long de l'axe centrale calixarénique, d'une part quatre groupements *ter*-butyles et d'autre part deux groupements bipyridyles et deux sous-unités benzyles non coordinantes. Les deux groupements bipyridyles peuvent complexer aussi bien les cations Cu⁺ (Figure 83) que Cu²⁺.¹⁷⁵

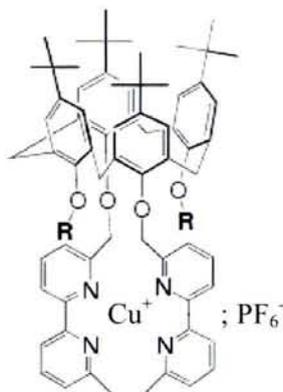


Figure 83. Structure du complexe de cuivre^I du dérivé de calixarène étudié en électrochimie. R représente le groupement benzyle.

Les observations faites par le Pr Regnouf de Vains et le Dr van der Heyden concernant la formation, en milieu acétonitrile, du complexe cuivreux à partir du complexe de cuivrique de dérivés de calixarène, ont permis de mettre en évidence la présence de trace d'eau dans le solvant organique, eau qui s'oxyderait en H_2O_2 avec formation de protons H^+ .²⁹ Ainsi, l'ajout d'une base dans le milieu permettrait de déplacer l'équilibre d'oxydoréduction vers la formation à la fois de H_2O_2 et du complexe calixarène- Cu^{I} (Figure 84).

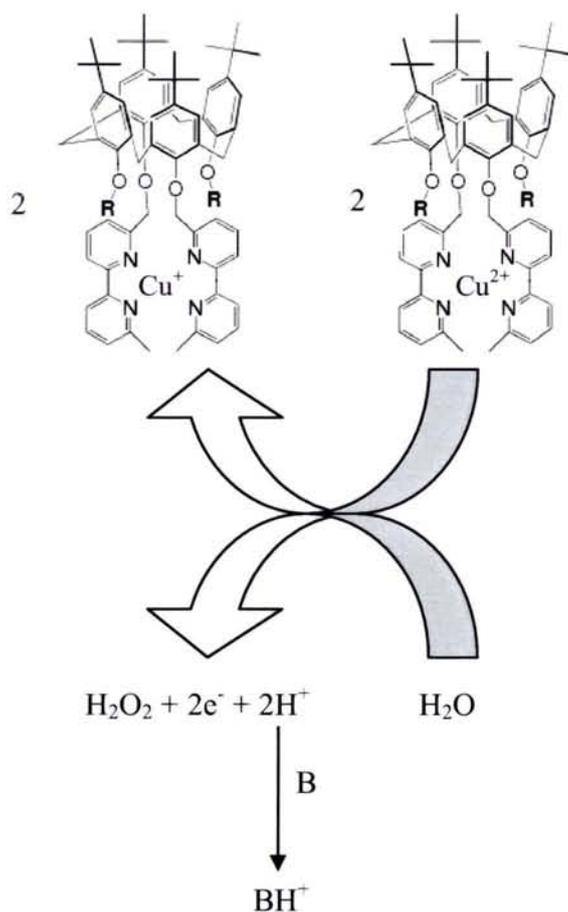


Figure 84. Schéma du cycle catalytique de la réduction du cuivre^{II} complexé en cuivre^I complexé au dérivé de calixarène. Mécanisme proposé par le Pr Jean-Bernard Regnouf de Vains.

Nous nous sommes proposés de préparer des surfaces d'électrodes sur lesquelles les complexes calixarène- Cu^{I} seraient immobilisés. Ainsi, par oxydation électrochimique du Cu^{I} complexé en Cu^{II} complexé, le cycle catalytique de régénération du Cu^{II} en Cu^{I} après ajout de base, pourrait permettre l'oxydation par H_2O_2 d'un composé insaturé comme l'acide oléique. Le choix de la base s'est porté sur la 2-picoline. Notons que le peroxyde d'hydrogène n'est pas soluble dans le dichlorométhane et que ni la 2-picoline, ni l'acide oléique ne sont électroactifs dans le domaine de potentiel balayé.

IV.2.b - Stabilité du film calixarène/hydrophobine sur électrode de carbone

Nous avons montré, dans un premier temps, que le système SC3+calixarène-Cu^I immobilisé est stable dans le dichlorométhane (Figure 85A). De plus, la dépendance linéaire entre l'intensité du pic d'oxydation du Cu^I complexé en Cu^{II} complexé et la vitesse de balayage du potentiel imposé (Figure 85B) indique que nous ne sommes pas limités par la diffusion des espèces électroactives vers l'électrode de travail ; ce qui implique que le film est bien immobilisé à la surface de l'ECV. De plus, au cours du temps et du nombre de cycles, le signal n'est pas modifié.

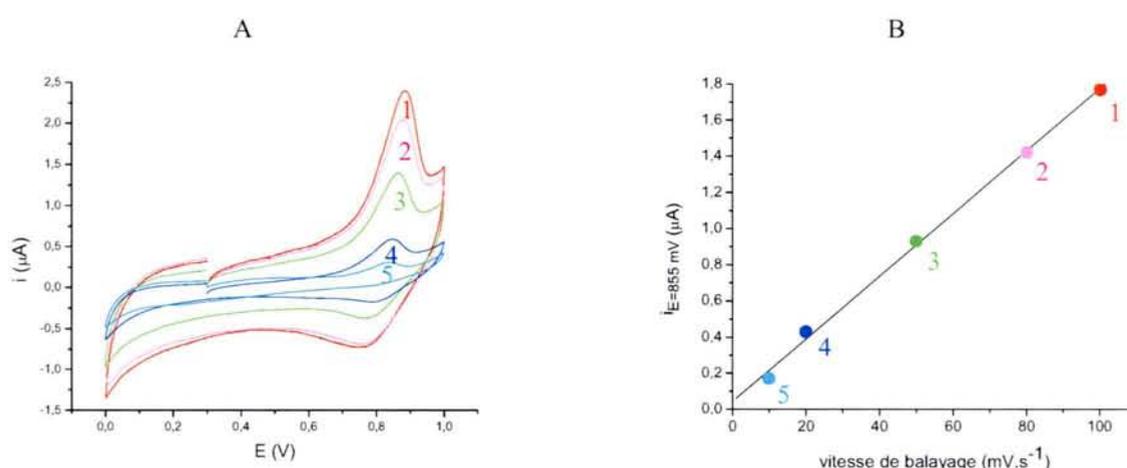


Figure 85. Étude voltampérométrique du calixarène-Cu^I immobilisé sur ECV au moyen de l'hydrophobine SC3. (A) Voltampérogrammes cycliques. (B) Relation intensité du pic d'oxydation – vitesse de balayage de la voltampérométrie cyclique. Électrolyte : *t*-BuPF₆/CH₂Cl₂, 50 mM. Vitesses de balayages : (1) 100, (2) 80, (3) 50, (4) 20 et (5) 10 mV.s⁻¹.

54601 VILLERS LES NANCY CEDEX

IV.2.c - Étude du cycle $\text{Cu}^{\text{II}}/\text{Cu}^{\text{I}}$ en présence de base

Les cycles d'oxydoréduction du système cuivre immobilisé ont été étudiés en présence de base introduite dans la cellule électrochimique (Figure 86). Deux électrodes de travail de nature différente ont été utilisées : une électrode de carbone vitreux et une électrode de platine (EPT).

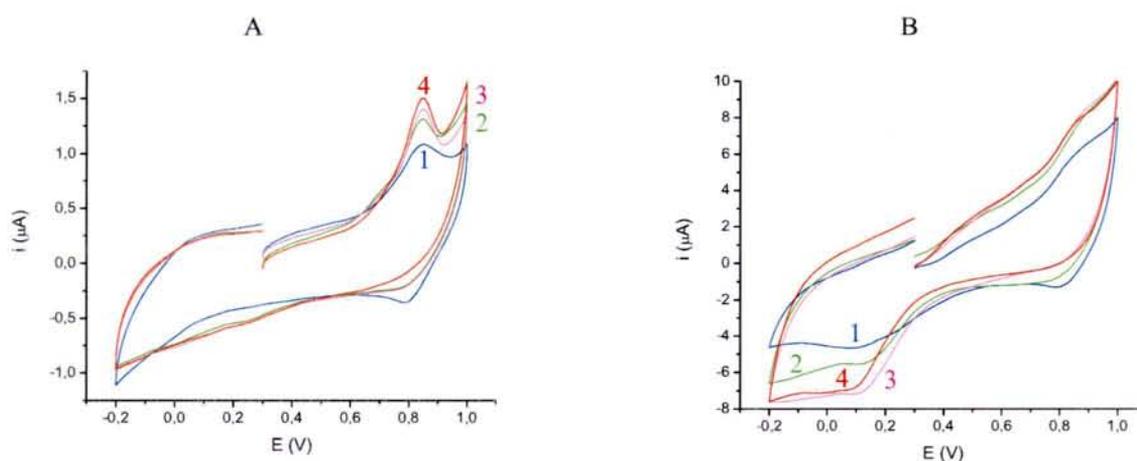


Figure 86. Voltampérogrammes cycliques enregistrés en absence et en présence de 2-picoline en volume sur (A) ECV et (B) EPT modifiées par le système SC3+calixarène- Cu^{I} . Électrolyte : $t\text{-BuPF}_6/\text{CH}_2\text{Cl}_2$, 50 mM. Vitesse de balayage : $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$. Les concentrations en 2-picoline après ajout successif en volume sont les suivantes : (1) 0, (2) 10, (3) 20 et (4) 120 mM.

Après ajout de la base, on observe à la fois pour l'ECV et pour l'EPT, une diminution du signal de réduction du cuivre^{II} en cuivre^I immobilisé et une augmentation du signal d'oxydation du cuivre^I et cuivre^{II} (Figure 86A et B). Nous montrons ici, que les résultats obtenus en volume par Regnouf de Vains et van der Heyden (Figure 84) sont reproductibles avec le système calixarène- Cu^{I} immobilisé. En effet, Cu^{II} formé par électrochimie est immédiatement réduit à la surface de l'électrode de travail. La présence d'un signal de réduction autour de 0,1 V sur électrode de platine (Figure 86B) nous conforte quand à la production de H_2O_2 à la surface de l'électrode lors des cycles de voltampérométrie. De plus, en présence 2-picoline, ce signal augmente. Nous supposons que le peroxyde d'hydrogène formé proviendrait de la réduction de l'eau présente au sein la maille du système SC3+calixarène- Cu^{I} immobilisé sur les électrodes. Afin de confirmer cette hypothèse, des expériences de voltampérométrie cyclique, sur électrode de platine modifiée par la SC3, ont été réalisées en volume dans le dichlorométhane saturé en H_2O_2 .

IV.2.d - Mise en évidence de la réactivité de H₂O₂ sur électrode de platine

Pour des raisons de cinétique de transfert des électrons, le signal correspondant à la réduction du peroxyde d'hydrogène peut être mis en évidence avec l'électrode de platine mais pas avec l'électrode de carbone vitreux.

Comme le montre la Figure 87, la réduction de H₂O₂ a lieu autour de 0,15 V sur électrode de platine alors qu'en présence d'acide oléique on observe un déplacement de ce signal autour de 0 V. Ceci nous laisse penser que le ou les produits de la réaction d'oxydation de l'acide oléique par le peroxyde d'hydrogène se réduiraient à ce potentiel de 0 V dans le dichlorométhane.

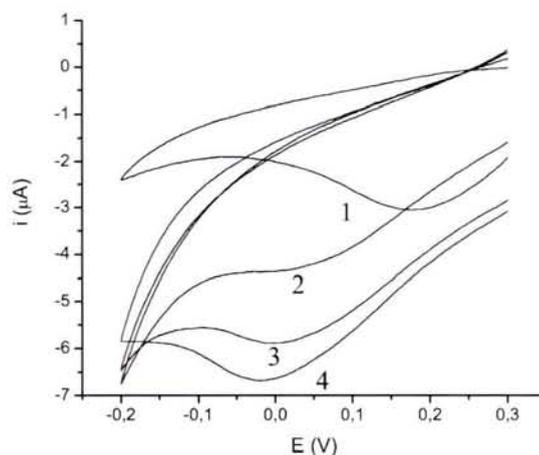


Figure 87. Voltampérogrammes cycliques enregistrés dans t-BuPF₆/CH₂Cl₂, 50 mM avec une EPt de travail modifiée par la SC3. [H₂O₂] ~ 1,4 mM. Concentrations en acide oléique : (1) 0,0 ; (2) 2,0 ; (3) 11,7 et (4) 21,3 mM. Vitesse de balayage : 50 mV.s⁻¹.

IV.2.e - Mise en évidence de la catalyse d'oxydation de l'acide oléique

En présence de base et d'acide oléique en volume, on observe une augmentation et un déplacement du signal de réduction initialement attribué à la présence de H₂O₂. Comme nous l'avons supputé précédemment, ce phénomène peut être attribué à la réaction d'oxydation chimique de l'acide oléique par H₂O₂. Ainsi, nous démontrons par ces expériences la réaction entre le peroxyde d'hydrogène formé à la surface de l'électrode et l'acide oléique présent dans la cellule électrochimique ; cette réaction étant catalysée par l'oxydoréduction du système calixarène-Cu^{II}/Cu^I immobilisé.

Remarquons que sur électrode de platine, la présence de l'acide oléique dans la cellule électrochimique entraîne une meilleure résolution du signal d'oxydation du cuivre^I complexé, immobilisé sur l'électrode.

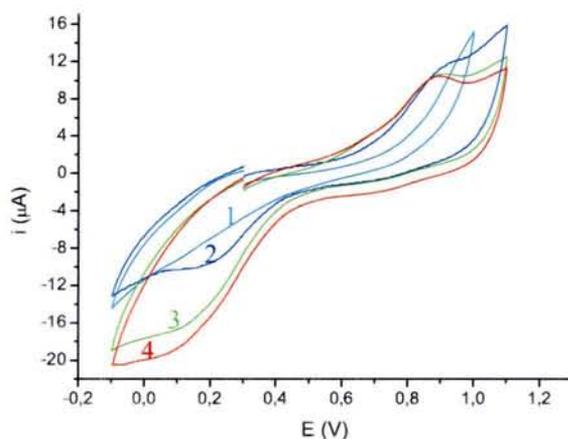


Figure 88. Voltampérogrammes cycliques enregistrés dans $t\text{-BuPF}_6/\text{CH}_2\text{Cl}_2$, 50 mM avec une EPT de travail modifiée par le système SC3+calixarène- Cu^{I} . Concentrations en 2-picoline et en acide oléique respectives : (1) 0 et 0 mM, (2) 10 et 0 mM, (3) 10 et 2 mM et (4) 10 et 12 mM. Vitesse de balayage : $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

Nous avons montré ici, la possibilité d'immobiliser sur des électrodes et ce, de façon stable, des macrocycles complexant des cations cuivreux et cuivriques dont les processus d'oxydoréduction électrochimique entraînent la catalyse de réactions chimiques.

IV.3 - Les fullerènes

Les travaux présentés dans ce paragraphe ont été réalisés en collaboration avec l'équipe du Pr Górecka de l'Université de Varsovie dans le cadre des projets Polonium et FAMOUS. Depuis leur découverte en 1985, les fullerènes suscitent un intérêt particulier du fait de leur structure originale.¹⁷⁶⁻¹⁷⁸ Nous nous sommes intéressés à un dérivé du fullerène C_{60} , greffé de deux longues chaînes hydrophobes (Figure 89). Le fullerène C_{60} est connu des électrochimistes car il peut établir jusqu'à quatre transferts d'électron, passant de l'état d'oxydation 0 à l'état d'oxydation -IV (Équation 62).

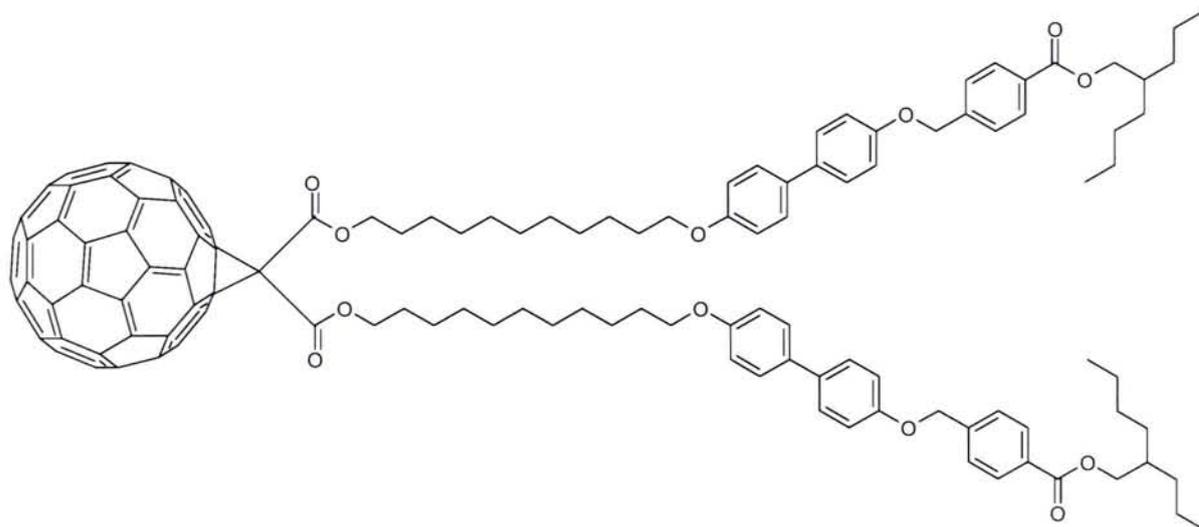
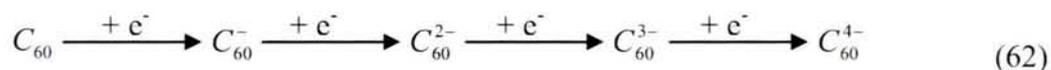


Figure 89. Structure du dérivé de fullerène C_{60} étudié.



Les premiers résultats obtenus ont montré la possibilité de suivre les quatre transferts d'électron grâce au dérivé C_{60} immobilisé sur une électrode de carbone vitreux au moyen de l'hydrophobine SC3 (Figure 90). La différence entre le potentiel des signaux obtenu avec le système immobilisé et celui des signaux obtenu avec le système solubilisé est la même pour chaque signal observé. À partir de ces données, il nous sera possible d'estimer la distance à laquelle les dérivés de fullerène sont éloignés de la surface de l'électrode de travail.

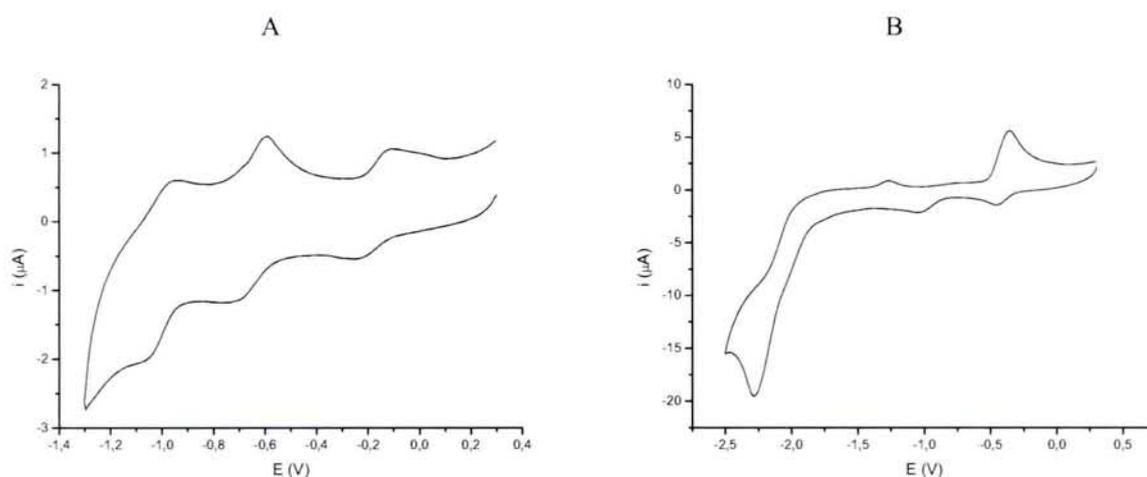


Figure 90. Voltampérogrammes cycliques enregistrés dans $t\text{-ProBF}_4/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ avec une électrode de carbone amorphe fonctionnalisée par le dérivé de fullerène C_{60} . Vitesse de balayage : $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$. Potentiels balayés : (A) 0,3 à -1,3 V et (B) 0,3 à -2,5 V.

Les études sur l'immobilisation des dérivés du C₆₀ sont actuellement en cours, mais semblent d'ores et déjà prometteur pour l'élaboration de surfaces permettant le transfert direct d'électrons.

IV.4 - Conclusion

Nous avons démontré dans ce chapitre qu'il est possible d'utiliser l'hydrophobine SC3 pour la fonctionnalisation des électrodes de carbone vitreux au moyen de dérivés de fullerène C₆₀ et de molécules macrocycliques complexantes de cations métalliques telles que les cyclodextrines ou les calixarènes. Le film d'hydrophobine est alors stable. De plus, il permet le transfert des électrons vers l'électrode de travail, tout comme la conservation des cycles d'oxydoréduction des cations des complexes immobilisés.

Nous avons aussi montré la possibilité d'obtenir des surfaces catalytiques grâce aux dérivés de calixarène immobilisés sur électrode de platine. En effet, les dérivés en question, de par leur propriété de complexation des cations cuivreux et cuivriques, peuvent être, à la surface de l'électrode, le siège de catalyse de réactions chimiques d'oxydoréduction d'espèces solubilisées en volume.

Par ailleurs, les études réalisées en volume et après immobilisation des dérivés binucléaires de cyclodextrines complexant à la fois les cations europium^{III} et fer^{II} nous ont permis de démontrer que les interactions hydrophobes mais aussi la rigidité conformationnelle des macrocycles sont à l'origine de la stabilité de ces édifices moléculaires. Nous avons également mis en évidence le fait que la rigidité de ces derniers est quant à elle régie par la présence de liaisons hydrogène intramoléculaires et/ou la complexation d'europium^{III}.

Toutes ces études s'inscrivent dans le cadre de la préparation de surfaces catalytiques ayant chacune des propriétés d'oxydoréduction particulières. D'autre part, les molécules présentées dans ce chapitre peuvent être considérées comme des sondes pour la compréhension des interactions intermoléculaires entre l'hydrophobine et d'autres entités moléculaires.

Chapitre V

Chélation d'ions cuivriques par l'hydrophobine PFA-SC3

L'hydrophobine PFA-SC3 est une SC3 chimiquement modifiée au moyen de l'acide performique (PFA) selon la méthode décrite par Wang et ses collaborateurs en 2004.¹²⁷

D'après les travaux menés par Wang et ses collaborateurs, l'hydrophobine PFA-SC3 a la particularité de chélater les cations bivalents tels que les cations calcium^{II}.¹²⁷ En effet, les spectres obtenus en dichroïsme circulaire mettent en évidence un changement de conformation notable de la protéine en présence de Ca²⁺. Nous avons voulu savoir si l'hydrophobine PFA-SC3 pouvait également complexer d'autres cations d'intérêt comme le cuivre^{II} ; cation électroactif et donc détectable par électrochimie comme le montre les résultats de voltampérométrie cyclique obtenus avec le sel de nitrate de cuivre dissous en solution aqueuse (Figure 91). Ainsi, le signal de réduction du cuivre^{II} en cuivre⁰ est observé sur ECV aux environs de -0,1 V alors que le signal retour, à savoir celui de la redissolution anodique du cuivre⁰ en cuivre^{II}, est observé à ~ 0,2 V.

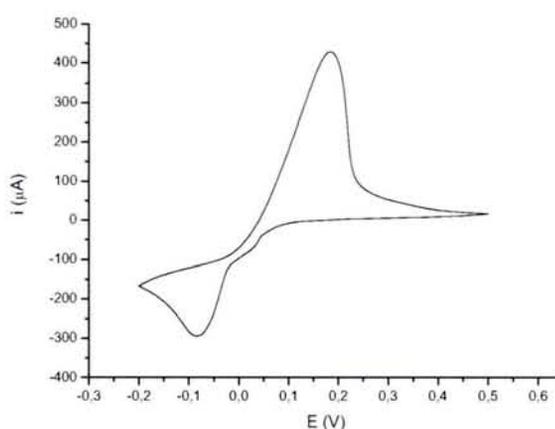


Figure 91. Voltampérogrammes cycliques enregistrés dans une solution de $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ à 11,5 mM. Électrode de travail : électrode de carbone vitreux. Électrolyte : $\text{KNO}_3/\text{H}_2\text{O}$, 50 mM. Vitesse de balayage : $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

Les travaux détaillés ci-après sont les premiers obtenus par électrochimie, démontrant la complexation du cation cuivre^{II} par la PFA-SC3 immobilisée sur électrode de carbone vitreux. Comme le montre la Figure 92A, le premier cycle effectué permet d'observer la réduction du cuivre^{II} et un faible signal en retour. Cependant, avec un nombre croissant de cycles, les signaux observés deviennent de plus en plus faibles.

Notons que la mise en contact entre l'électrode modifiée par le système PFA-SC3-Cu^{II} ne présentant plus de signal d'oxydoréduction du cuivre et une solution fraîche de cuivre^{II} permet d'obtenir à nouveau les signaux d'oxydoréduction du cuivre (Figure 92B). Nous pouvons ainsi en déduire que la perte du signal du cuivre précédemment mise en évidence correspond à la désorption du cuivre et non du système hydrophobine-cuivre.

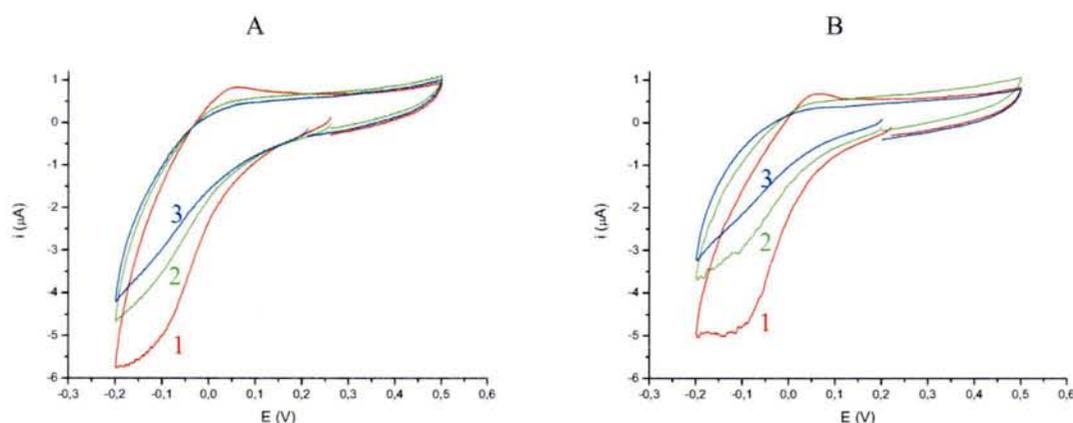


Figure 92. Voltampérogrammes cycliques enregistés dans 50 mM de $\text{KNO}_3/\text{H}_2\text{O}$ au moyen d'une électrode de carbone vitreux modifiée par le complexe PFA-SC3-Cu^{II}. (1) Premier, (2) deuxième et (3) troisième cycles. Vitesse de balayage : $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$. (A) Électrode nue sur laquelle a été adsorbé le complexe PFA-SC3-Cu^{II}. (B) Même électrode mise en contact avec une solution de cuivre^{II} et ce, après le troisième voltampérogramme cyclique obtenu en panel (A).

Les résultats obtenus montrent donc que la PFA-SC3 a bien la capacité de complexer l'ion cuivrique mais que le cuivre^I, obtenu par réduction du cuivre^{II}, n'est pas complexé par la protéine, d'où une perte du signal au bout de quelques cycles d'oxydoréduction.

Dans le but d'exploiter de tels matériaux originaux, il devient indispensable de retenir les ions cuivre dans le système complexant. Les résultats des interactions hydrophobine - membranes présentés dans le Chapitre II nous ont ainsi conduit à envisager l'utilisation des phases cubiques membranaires afin d'y stabiliser l'hydrophobine chélatant les ions cuivriques.

Nous avons en effet démontré que l'insertion du complexe PFA-SC3-Cu^{II} dans une matrice lipidique de monooléine d'épaisseur contrôlée (250 μm) permet d'améliorer le système d'oxydoréduction du cuivre complexé. En effet, il est possible d'obtenir plusieurs cycles rédox consécutifs de même intensité lorsque le cuivre est introduit dans une phase cubique de monooléine au moyen de l'hydrophobine PFA-SC3 (Figure 93A). Les signaux perdent de leur intensité non plus au cours du nombre de cycles mais lorsque le système est laissé en circuit ouvert, c'est-à-dire lorsque l'électrode de travail n'est pas traversée par un courant (Figure 93B). Soulignons également que la phase cubique de MO ne contenant pas d'hydrophobine ne peut retenir le cuivre (Figure 93C). Toutefois le cuivre, comme d'autres molécules sondes d'oxydoréduction,¹⁷⁹ peut librement diffuser à travers la phase cubique, comme le suggère la Figure 93D.

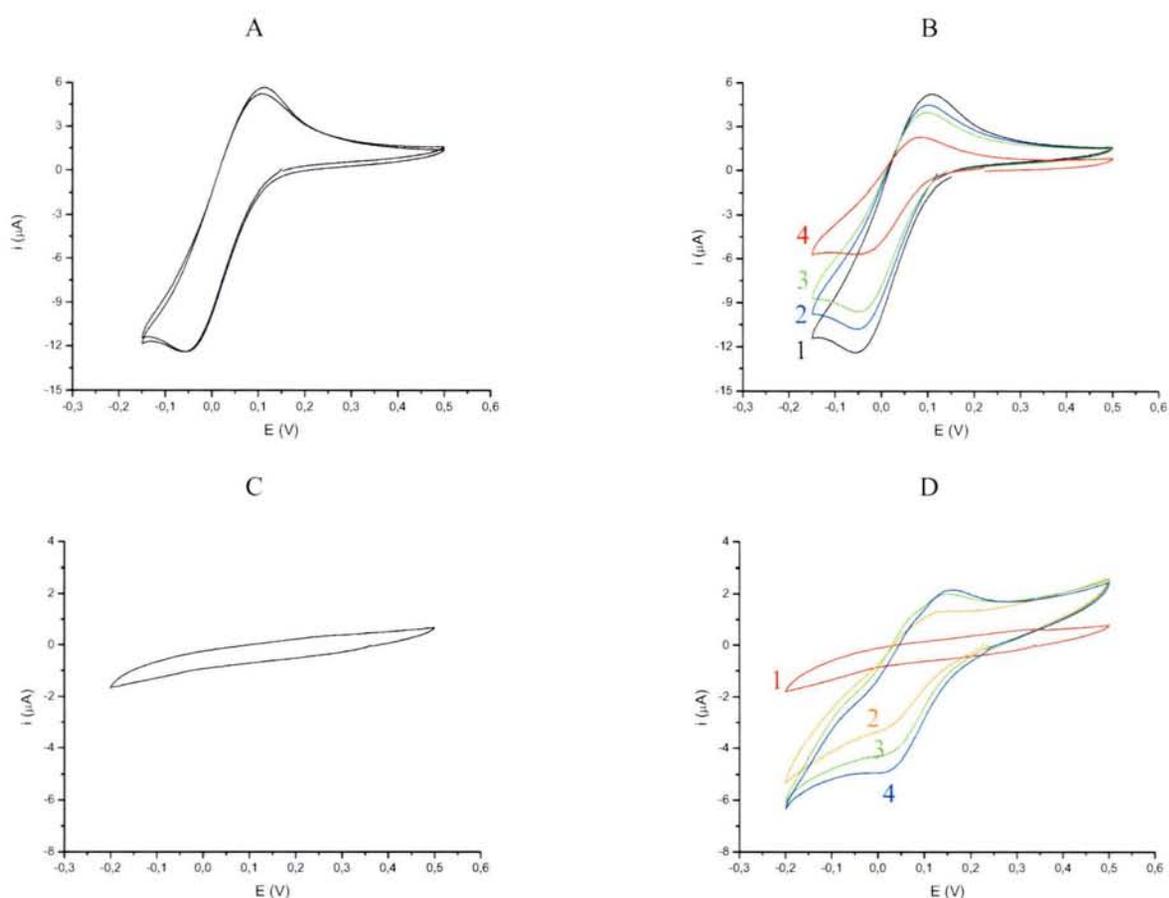


Figure 93. Voltampérogrammes cycliques enregistrés dans 50 mM de $\text{KNO}_3/\text{H}_2\text{O}$ au moyen d'une électrode de carbone vitreux sur laquelle a été déposée une phase cubique de monooléine de 250 μm d'épaisseur. Vitesse de balayage : 50 $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$. (A) Premier et dixième cycles consécutifs obtenus avec une ECV sur laquelle a été déposée la phase cubique de MO contenant l'hydrophobine PFA-SC3 chélatant le cuivre^{II}. (B) Même système que précédemment. Cycles 1-4 obtenus après avoir immergé l'électrode dans l'électrolyte 0, 8, 20 et 31 minutes, respectivement. (C) Cycle obtenu avec une ECV sur laquelle a été déposée la phase cubique de MO préparée en utilisant une solution aqueuse de $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ de 8,0mM. (D) Même électrode que précédemment immergée dans une solution de $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ de 2,7 mM. Les voltampérogrammes 1-4 ont été enregistrés au bout de 1, 40, 70 et 90 minutes, respectivement.

Les matériaux mixtes hydrophobine chélatante – matrice lipidique peuvent également servir à la détection de faibles quantités d'ions cuivriques présents en solution aqueuse par un phénomène de préconcentration de ces derniers au sein du système mixte (Figure 93).

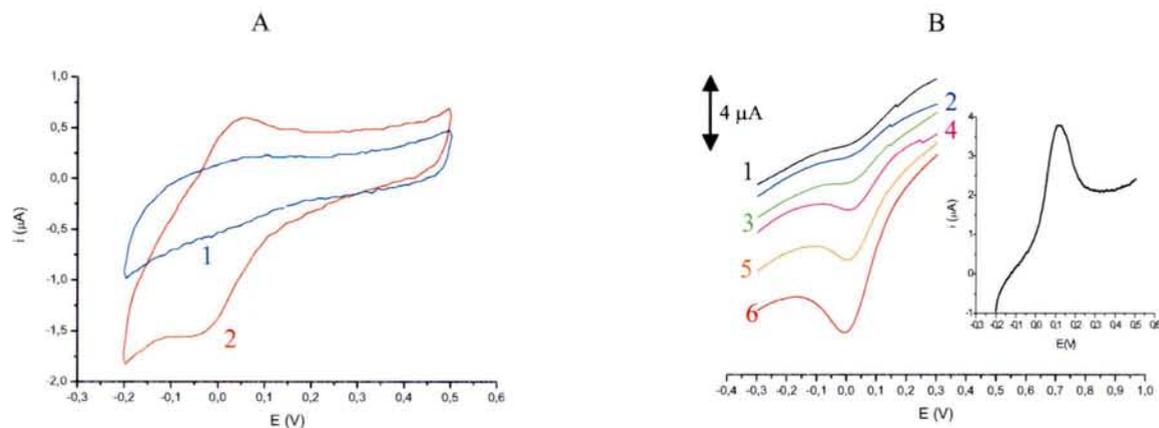


Figure 94. (A) Voltampérogrammes cycliques enregistrés dans 50 mM de $\text{KNO}_3/\text{H}_2\text{O}$ au moyen d'une électrode de carbone vitreux sur laquelle a été déposée une phase cubique de MO (1) pure et (2) contenant l'hydrophobine PFA-SC3 après 30 minutes d'accumulation de cuivre^{II} depuis une solution de 20 μM de $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ en circuit ouvert. Vitesse de balayage : $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$. (B) Voltampérogrammes obtenus par voltampérométrie différentielle à impulsions et enregistré dans 50 mM de $\text{KNO}_3/\text{H}_2\text{O}$ au moyen d'une électrode de carbone vitreux sur laquelle a été déposée une phase cubique de MO contenant l'hydrophobine PFA-SC3. Courbes 1-6 obtenues en fonction du temps d'accumulation depuis une solution de 5 μM de $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ en circuit ouvert : 1, 2, 3, 6, 13 et 20 minutes, respectivement. En insert est présenté le voltampérogramme obtenu par voltampérométrie par redissolution anodique obtenu après 20 minutes d'accumulation de Cu^{II} en circuit ouvert et 2 minutes électrolyse dans 50 mM de $\text{KNO}_3/\text{H}_2\text{O}$ à un potentiel de $-0,2\text{V}$.

En résumé, les résultats des travaux présentés dans ce chapitre nous permettent d'ores et déjà prétendre que l'utilisation d'hydrophobines chimiquement traitées peut, elle aussi, ouvrir la voie à de nouvelles méthodes de détection, d'immobilisation et d'élaboration de systèmes membranaires à caractères biomimétiques.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Le travail de thèse présenté dans ce manuscrit traite de l'étude du comportement interfacial d'une protéine fongique, l'hydrophobine SC3 et de l'élaboration de systèmes auto-assemblés fonctionnels. Ces systèmes ont été développés grâce à une nouvelle technique d'immobilisation d'enzymes, mais aussi de molécules issues de la synthèse organique, dotées de propriétés de complexation de cations métalliques ou de conductivité d'électrons. En effet, l'hydrophobine SC3 a été utilisée comme agent fixateur de toutes ces molécules sur différents supports solides.

Les études des propriétés physico-chimiques de l'hydrophobine SC3 en solution aqueuse et aux interfaces liquide/gaz, lipide/liquide et solide/liquide ont montré que la protéine adhère fortement à ces interfaces après remaniement de sa structure secondaire et ce, en fonction de la nature et/ou de l'agencement du système avec lequel elle interagit. Les résultats obtenus nous ont permis de mieux appréhender les interactions protéine-solides et protéine-lipides. Ces études nous ont également donné la possibilité d'optimiser l'élaboration des surfaces modifiées par des systèmes protéine-enzymes, protéine-molécules chélatantes ou encore protéine-dérivé de fullerène.

Les matériaux obtenus ont été étudiés en tant que transducteurs spectrophotométriques et électrochimiques basés sur des réactions d'hydrolyse ou d'oxydoréduction. Les systèmes catalytiques obtenus sont stables, fiables et réutilisables jusqu'à trois mois dans certains cas. Certains de ces matériaux fonctionnels peuvent être utilisés en tant que capteurs optiques ou électrochimiques et d'autres, en tant qu'interrupteurs électrochimiques basés sur la complexation/décomplexation de cations métalliques. Les résultats obtenus sont prometteurs, notamment dans le domaine des nanotechnologies, pour l'élaboration de diverses surfaces catalytiques avec une grande possibilité de choix du matériau de base ainsi que de l'entité à immobiliser ; et ce, en fonction de la transduction et du type de catalyse souhaités.

En une dizaine d'années, les hydrophobines se sont révélées être utiles en bien des domaines. Récemment, il a d'ailleurs été montré, dans le cadre d'études cosmétiques, qu'il était possible de réduire le coefficient de friction capillaire après recouvrement du cheveu humain par l'hydrophobine ABH1 exprimée par le champignon *Agaricus bisporus*.¹⁸⁰

54601 VILLERS LES NANCY CEDEX
54601 VILLERS LES NANCY CEDEX

SCD USTP NANCY 1
Bibliothèque des Sciences
Rue du Jardin Botanique - CS 20148
54601 VILLERS LES NANCY CEDEX

RÉFÉRENCES

CS 20148
54001 VILLERS LES NANCY CEDEX

- (1) Yates, F. E., Garfinkel, A., Walter, D. O., Yates, G. B., Eds. *Self-organizing systems: the emergence of order*; Plenum Press: New York, 1987.
- (2) Lehn, J.-M., Chimie supramoléculaire - concepts et perspectives, *Séminaire*, 19 février 2003, Nancy.
- (3) Lehn, J.-M. *Science* **2002**, *295*, 2400-2403.
- (4) Petitjean, A.; Nierengarten, H.; van Dorosselaer, A.; Lehn, J.-M. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **2004**, *43*, 3695-3699.
- (5) Bard, A. J., *Integrated chemical systems: a chemical approach to nanotechnology*; John Wiley: New York, 1994.
- (6) Wessels, J. G. H. *Trends Plant Sci.* **1996**, *1*, 9-15.
- (7) Wessels, J. G. H. *Adv. Microb. Physiol.* **1997**, *38*, 1-45.
- (8) Wösten, H. A. B.; Richter, M.; Willey, J. M. *Fungal Genet. Biol.* **1999**, *27*, 153-160.
- (9) Gebbink, M. F. B. G.; Claessen, D.; Bouma, B.; Dijkhuizen, L.; Wösten, H. A. B. *Nat. Rev. Microbiol.* **2005**, *3*, 333-341.
- (10) Wessels, J. G. H.; De Vries, O. M. H.; Asgeirsdottir, S. A.; Schuren, F. H. J. *Plant Cell* **1991**, *3*, 793-799.
- (11) Wessels, J. G. H.; De Vries, O. M. H.; Asgeirsdottir, S. A.; Springer, J. J. *Gen. Microbiol.* **1991**, *137*, 2439-2445.
- (12) Chater, K. *Current Biol.* **1991**, *1*, 318-320.
- (13) Wösten, H. A. B.; van Wetter, M.-A.; Lugones, L. G.; van der Mei, H. C.; Busscher, H. J.; Wessels, J. G. H. *Current Biol.* **1999**, *9*, 85-88.
- (14) Talbot, N. J. *Nature* **1999**, *398*, 295-296.
- (15) Wessels, J. G. *Fungal Genet. Biol.* **1999**, *27*, 134-145.
- (16) Elliot, M. A.; Talbot, N. J. *Curr. Opin. Microbiol.* **2004**, *7*, 594-601.
- (17) de Vocht, M. L.; Wösten, H. A. B.; Wessels, J. G. H. In *PCT Int. Appl.*; (Applied Nanosystems B.V., Neth.). Wo, 2001, pp 10 pp.
- (18) de Vocht, M. L.; Wösten, H. A. B.; Wessels, J. G. H.; Robillard, G. T. In *PCT Int. Appl.*; (Applied Nanosystems B.V., Neth.). Wo, 2001, pp 12 pp.
- (19) Rogalska, E. M.; Tagu, D. E. M. A.; Bilewicz, R. In *Eur. Pat. Appl.*; (Applied Nanosystems B.V., Neth.). Ep, 2003, pp 16 pp.

- (20) Hektor, H. J.; Rink, R.; Scholtmeijer, K.; Wemer, J.; Rogalska, E. M.; Walcarius, A. G. G. In *PCT Int. Appl.*; (Applied Nanosystems B.V., Neth.). Wo, 2003, pp 38 pp.
- (21) de Vocht, M. L.; Wösten, H. A. B.; Wessels, J. G. H. In *PCT Int. Appl.*; (Applied Nanosystems, B.V., Neth.; Stichting voor de Technische Wetenschappen). Wo, 2001, pp 17 pp.
- (22) Scholtmeijer, K.; Rink, R.; Hektor, H. H.; Wösten, H. A. B. In *Applied Mycology and Biotechnology*; Arora, D. K., Berka, R., Eds.; Elsevier Science: Amsterdam, 2005; Vol. 6.
- (23) Hakanpää, J.; Paananen, A.; Askolin, S.; Nakari-Setälä, T.; Parkkinen, T.; Penttilä, M.; Linder, M. B.; Rouvinen, J. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 534-539.
- (24) Paananen, A.; Vuorimaa, E.; Torkkeli, M.; Penttilä, M.; Kauranen, M.; Ikkala, O.; Lemmetyinen, H.; Serimaa, R.; Linder, M. B. *Biochemistry* **2003**, *42*, 5253-5258.
- (25) Zangi, R.; de Vocht, M. L.; Robillard, G. T.; Mark, A. E. *Biophys. J.* **2002**, *83*, 112-124.
- (26) Hektor, H. J.; Scholtmeijer, K. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2005**, *16*, 434-439.
- (27) Bilewicz, R.; Witomski, J.; van der Heyden, A.; Tagu, D.; Palin, B.; Rogalska, E. *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105*, 9772-9777.
- (28) Corvis, Y., Immobilisation de la glucose oxydase et de la peroxydase sur des surfaces modifiées par l'hydrophobine. DEA, Université Henri Poincaré, Nancy, 2002.
- (29) van der Heyden, A., Etude d'auto-assemblages supramoléculaires de lipides insaturés, d'hydrophobines et de calix[4]arènes. Elaboration d'un système catalytique d'oxydo-réduction. Thèse, Université Henri Poincaré, Nancy, 2003.
- (30) Cotton, J. P., *Neutron, X-ray and light scattering: introduction to an investigative tool for colloidal and polymeric systems*; North-Holland: Amsterdam, 1991.
- (31) Provencher, S. W. *Comput. Phys. Commun.* **1982**, *27*, 213-227.
- (32) Provencher, S. W. *Comput. Phys. Commun.* **1982**, *27*, 229-242.
- (33) Voet, D.; Voet, J. G., *Biochemistry*; John Wiley & Sons: New York, 1995.
- (34) Durliat, G., *Biochimie structurale*; Diderot: Paris, 1997.
- (35) Hiemenz, P. C.; Rajagopalan, R., *Principles of colloid and surface chemistry*; Marcel Dekker: New York, 1997.
- (36) Gaines, G. L., *Insoluble monolayers at liquid-gas interfaces*; Interscience Publishers: New York, 1966.
- (37) Lord Kelvin *Philos. Mag.* **1898**, *46*, 82-120.

- (38) Taylor, D. M. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2000**, *87*, 183-203.
- (39) Vogel, V.; Möbius, D. *J. Colloid Interface Sci.* **1988**, *126*, 408-420.
- (40) Vogel, V.; Möbius, D. *Thin Solid Films* **1988**, *159*, 73-81.
- (41) Hénon, S.; Meunier, J. *Rev. Sci. Instrum.* **1991**, *62*, 936-939.
- (42) Hénon, S., Microscopie a l'angle de Brewster : transitions de phases et défauts d'orientation dans des films monomoléculaires. Thèse, Université Paris VI, Paris, 1993.
- (43) Hönig, D.; Möbius, D. *J. Phys. Chem.* **1991**, *95*, 4590-4592.
- (44) Li, J.; Chen, Z.; Wang, X.; Brezesinski, G.; Mohwald, H. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **2000**, *39*, 3059-3062.
- (45) Als-Nielsen, J.; Möhwald, H., *Handbook of Synchrotron Radiation*; Elsevier Science: Amsterdam, 1991.
- (46) Als-Nielsen, J.; Jacquemain, D.; Kjaer, K.; Leveiller, F.; Lahav, M.; Leiserowitz, L. *Phys. Rep.* **1994**, *246*, 251-313.
- (47) Mendelsohn, R.; Brauner, J. W.; Gericke, A. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **1995**, *46*, 305-334.
- (48) Blaudez, D.; Buffeteau, T.; Desbat, B.; Turlet, J. M. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **1999**, *4*, 265-272.
- (49) Flach, C. R.; Brauner, J. W.; Taylor, J. W.; Baldwin, R. C.; Mendelsohn, R. *Biophys. J.* **1994**, *67*, 402-410.
- (50) Blaudez, D.; Buffeteau, T.; Cornut, J. C.; Desbat, B.; Escafre, N.; Pezolet, M.; Turlet, J. M. *Thin Solid Films* **1994**, *242*, 146-150.
- (51) Cornut, I.; Desbat, B.; Turlet, J. M.; Dufourcq, J. *Biophys. J.* **1996**, *70*, 305-312.
- (52) Ulrich, W.-P.; Vogel, H. *Biophys. J.* **1999**, *76*, 1639-1647.
- (53) Mielczarski, J. A. *J. Phys. Chem.* **1993**, *97*, 2649-2663.
- (54) Owens, D. K.; Wendt, R. C. *J. Appl. Polym. Sci.* **1969**, *13*, 1741-1747.
- (55) van Oss, C. J.; Good, R. J. *Langmuir* **1992**, *8*, 2877-2879.
- (56) Malis, T.; Cheng, S. C.; Egerton, R. F. *J. Electron Microsc. Tech.* **1988**, *8*, 193-200.
- (57) Egerton, R. F., *Electron energy loss spectroscopy in the electron microscope*; Plenum Press: New York, 1986.

- (58) Thomas, P. J.; Midgley, P. A. *Top. Catal.* **2002**, *21*, 109-138.
- (59) Bozzolo, N., Contribution de la microscopie électronique en transmission analytique a la caractérisation du diamant CVD. Thèse, Institut National Polytechnique de Lorraine, Nancy, 1996.
- (60) Tolansky, S., *Multiple-beam interferometry of surfaces and films*; Clarendon press: Oxford, 1948.
- (61) Israelachvili, J. N. *J. Colloid Interface Sci.* **1973**, *44*, 259-272.
- (62) Nollert, P. *Methods* **2004**, *34*, 348-353.
- (63) Qiu, H.; Caffrey, M. *Biomaterials* **2000**, *21*, 223-234.
- (64) Tagu, D.; Rogalska, E. *INRA Mensuel* **2001**, *112*, 4-5.
- (65) Ó'Fágáin, C. *Enzyme Microb. Technol.* **2003**, *33*, 137-149.
- (66) Katz, A.; Da Costa, P.; Lam, A. C. P.; Notestein, J. M. *Chem. Mater.* **2002**, *14*, 3364-3368.
- (67) Cosnier, S.; Szunerits, S.; Marks, R. S.; Novoa, A.; Puech, L.; Perez, E.; Rico-Lattes, I. *Electrochem. Commun.* **2000**, *2*, 851-855.
- (68) Nguyen, Q. T.; Ping, Z.; Nguyen, T.; Rigal, P. *J. Membr. Sci.* **2003**, *213*, 85-95.
- (69) Ropers, M.-H.; Bilewicz, R.; Stébé, M.-J.; Hamidi, A.; Miclo, A.; Rogalska, E. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2001**, *3*, 240-245.
- (70) Rowinski, P.; Bilewicz, R.; Stébé, M.-J.; Rogalska, E. *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 1554-1559.
- (71) Lei, C.; Shin, Y.; Liu, J.; Ackerman, E. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 11242-11243.
- (72) Bard, A. J.; Faulkner, L. R., *Electrochemical methods: fundamentals and applications*; John Wiley: New York, 1980.
- (73) Wang, J.; Walcarius, A. *J. Electroanal. Chem.* **1996**, *404*, 237-242.
- (74) Shu, F. R.; Wilson, G. S. *Anal. Chem.* **1976**, *48*, 1679-1686.
- (75) Kamin, R. A.; Wilson, G. S. *Anal. Chem.* **1980**, *52*, 1198-1205.
- (76) Andrieux, C. P.; Haas, O.; Saveant, J. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 8175-8182.
- (77) Habermüller, K.; Mosbach, M.; Schuhmann, W. *Fresenius. J. Anal. Chem.* **2000**, *366*, 560-568.

- (78) Mulchandani, A., Rogers, K. R., Eds. *Enzyme and microbial biosensors : techniques and protocols*; Humana Press: Totowa, 1998.
- (79) D'Souza, S. F. *Biosens. Bioelectron.* **2001**, *16*, 337-353.
- (80) Lyons, M. E. G. *Sensors* **2003**, *3*, 19-42.
- (81) Beck, K. *FEBS Lett.* **1989**, *249*, 1-4.
- (82) Lee, B.; Richards, F. M. *J. Mol. Biol.* **1971**, *55*, 379-400.
- (83) Labanowski, J. K., Molecular modeling, <http://www.ccl.net/cca/documents/molecular-modeling/node5.html>.
- (84) Alard, P., Calculs de surface et d'énergie dans le domaine des macromolécules. Thèse, Université Libre de Bruxelles, Bruxelles (Belgique), 1991.
- (85) Delhaise, P.; Bardiaux, M.; Wodak, S. *J. Mol. Graph.* **1984**, *2*, 103-106.
- (86) www.algonomics.com.
- (87) Kalisz, H. M.; Hecht, H. J.; Schomburg, D.; Schmid, R. D. *Biochim. Biophys. Acta* **1991**, *1080*, 138-142.
- (88) Berglund, G. I.; Carlsson, G. H.; Smith, A. T.; Szoeké, H.; Henriksen, A.; Hajdu, J. *Nature* **2002**, *417*, 463-468.
- (89) Mrabet, N. T. *Biochemistry* **1992**, *31*, 2690-2702.
- (90) Mrabet, N. T. *Methods* **1992**, *4*, 14-24.
- (91) Li, A.-J.; Nussinov, R. *Proteins: Struct., Funct., Genet.* **1998**, *32*, 111-127.
- (92) <http://pqs.ebi.ac.uk/pqs-bin/macmol.pl?filename=1gal>.
- (93) Wösten, H. A. B.; De Vries, O. M. H.; Wessels, J. G. H. *Plant Cell* **1993**, *5*, 1567-1574.
- (94) Wang, X.; de Vocht, M. L.; de Jonge, J.; Poolman, B.; Robillard, G. T. *Protein Sci.* **2002**, *11*, 1172-1181.
- (95) Lahav, M.; Ne'eman, N.; Sela, M. N.; Ginsburg, I. *Inflammation* **1979**, *3*, 365-377.
- (96) Pellegrini, A.; Thomas, U.; Bramaz, N.; Klauser, S.; Hunziker, P.; Von Fellenberg, R. *J. Appl. Microbiol.* **1997**, *82*, 372-378.
- (97) Marino, G.; Ferrarini, V.; Giardini, S.; Biavati, B. *In Vitro Cell. Dev. Biol., Plant* **2003**, *39*, 327-331.

- (98) Bordini, E.; Hamdan, M.; Righetti, P. G. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1999**, *13*, 1818-1827.
- (99) Muller, D. *Biochem. Z.* **1928**, *199*, 136-170.
- (100) Dunford, H. B. In *Peroxidases in Chemistry and Biology*; Everse, J., Everse, K. E., Grisham, M. B., Eds.; CRC Press: Boca Raton, 1991, pp 1.
- (101) Yaropolov, A. I.; Tarasevich, M. R.; Varfolomeev, S. D. *Bioelectrochem. Bioenerg.* **1978**, *5*, 18-24.
- (102) Ruzgas, T.; Gorton, L.; Emneus, J.; Marko-Varga, G. *J. Electroanal. Chem.* **1995**, *391*, 41-49.
- (103) Ferapontova, E.; Schmengler, K.; Borchers, T.; Ruzgas, T.; Gorton, L. *Biosens. Bioelectron.* **2002**, *17*, 953-963.
- (104) Clark, L. C., Jr. *Methods Enzymol.* **1979**, *56*, 448-479.
- (105) Wang, J.; Naser, N.; Angnes, L.; Wu, H.; Chen, L. *Anal. Chem.* **1992**, *64*, 1285-1288.
- (106) Winkler, F. K.; D'Arcy, A.; Hunziker, W. *Nature* **1990**, *343*, 771-774.
- (107) Brady, L.; Brzozowski, A. M.; Derewenda, Z. S.; Dodson, E.; Dodson, G.; Tolley, S.; Turkenburg, J. P.; Christiansen, L.; Huge-Jensen, B.; Norskov, L. *Nature* **1990**, *343*, 767-770.
- (108) Holwerda, K.; Verkade, P. E.; de Willigen, A. H. A. *Recl. trav. chim. Pays-Bas Belg.* **1936**, *55*, 43-57.
- (109) Schonheyder, F.; Volqvartz, K. *Acta Physiol. Scand.* **1945**, *9*, 57-67.
- (110) Palomo, J. M.; Munoz, G.; Fernández-Lorente, G.; Mateo, C.; Fernández-Lafuente, R.; Guisán, J. M. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2002**, *19-20*, 279-286.
- (111) Hjorth, A.; Carriere, F.; Cudrey, C.; Woldike, H.; Boel, E.; Lawson, D. M.; Ferrato, F.; Cambillau, C.; Dodson, G. G.; Thim, L. *Biochemistry* **1993**, *32*, 4702-4707.
- (112) Thirstrup, K.; Verger, R.; Carriere, F. *Biochemistry* **1994**, *33*, 2748-2756.
- (113) van Oort, M. G.; Deveer, A. M. T. J.; Dijkman, R.; Tjeenk, M. L.; Verheij, H. M.; de Haas, G. H.; Wenzig, E.; Goetz, F. *Biochemistry* **1989**, *28*, 9278-9285.
- (114) Volwerk, J. J.; de Haas, G. H. *Lipid-Protein Interact.* **1982**, *1*, 69-149.
- (115) Schmid, R. D.; Verger, R. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1998**, *37*, 1609-1633.
- (116) Bendicho, S.; Trigueros, M. C.; Hernández, T.; Martín, O. *J. Dairy Sci.* **2001**, *84*, 1590-1596.

- (117) Rogalska, E.; Bilewicz, R.; Brigaud, T.; El Moujahid, C.; Foulard, G.; Portella, C.; Stébé, M. J. *Chem. Phys. Lipids* **2000**, *105*, 71-91.
- (118) Handke, M.; Milosevic, M.; Harrick, N. J. *Vib. Spectrosc.* **1991**, *1*, 251-262.
- (119) Blaudez, D.; Buffeteau, T.; Cornut, J. C.; Desbat, B.; Escafre, N.; Pezolet, M.; Turllet, J. M. *Appl. Spectrosc.* **1993**, *47*, 869-874.
- (120) Castano, S.; Desbat, B.; Laguerre, M.; Dufourcq, J. *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1416*, 176-194.
- (121) Surewicz, W. K.; Mantsch, H. H. *J. Mol. Struct.* **1989**, *214*, 143-147.
- (122) Surewicz, W. K.; Mantsch, H. H.; Chapman, D. *Biochemistry* **1993**, *32*, 389-394.
- (123) de Vocht, M. L.; Scholtmeijer, K.; van der Vegte, E. W.; de Vries, O. M.; Sonveaux, N.; Wösten, H. A. B.; Ruyschaert, J. M.; Hadziloannou, G.; Wessels, J. G.; Robillard, G. T. *Biophys. J.* **1998**, *74*, 2059-2068.
- (124) Sal-Man, N.; Gerber, D.; Shai, Y. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 27449-27457.
- (125) Bi, X.; Taneva, S.; Keough, K. M. W.; Mendelsohn, R.; Flach, C. R. *Biochemistry* **2001**, *40*, 13659-13669.
- (126) Flach, C. R.; Gericke, A.; Mendelsohn, R. *J. Phys. Chem. B* **1997**, *101*, 58-65.
- (127) Wang, X.; Permentier, H. P.; Rink, R.; Kruijtzter, J. A. W.; Liskamp, R. M. J.; Wösten, H. A. B.; Poolman, B.; Robillard, G. T. *Biophys. J.* **2004**, *87*, 1919-1928.
- (128) Postel, C.; Abillon, O.; Desbat, B. *J. Colloid Interface Sci.* **2003**, *266*, 74-81.
- (129) Wang, X.; Graveland-Bikker, J. F.; De Kruif, C. G.; Robillard, G. T. *Protein Sci.* **2004**, *13*, 810-821.
- (130) Corvis, Y.; Walcarius, A.; Rink, R.; Mrabet, N. T.; Rogalska, E. *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 1622-1630.
- (131) de Vocht, M. L.; Reviakine, I.; Ulrich, W.-P.; Bergsma-Schutter, W.; Wösten, H. A. B.; Vogel, H.; Brisson, A.; Wessels, J. G. H.; Robillard, G. T. *Protein Sci.* **2002**, *11*, 1199-1205.
- (132) Ulman, A., *An introduction to ultrathin organic films: from Langmuir-Blodgett to self-assembly*; Academic Press: Boston, 1991.
- (133) Mirsky, V. M. *TrAC, Trends Anal. Chem.* **2002**, *21*, 439-450.
- (134) Scholtmeijer, K.; Janssen, M. I.; Gerssen, B.; de Vocht, M. L.; van Leeuwen, B. M.; van Kooten, T. G.; Wösten, H. A. B.; Wessels, J. G. H. *Appl. Environ. Microbiol.* **2002**, *68*, 1367-1373.

- (135) Janssen, M. I.; van Leeuwen, M. B. M.; Scholtmeijer, K.; van Kooten, T. G.; Dijkhuizen, L.; Wösten, H. A. B. *Biomaterials* **2002**, *23*, 4847-4854.
- (136) Wösten, H. A. B.; Schuren, F. H.; Wessels, J. G. *EMBO J.* **1994**, *13*, 5848-5854.
- (137) Corvis, Y.; Rink, R.; Funari, S. S.; Brezesinski, G.; Rogalska, E., Effect of hydrophobins on model membrane structures, *Online HASYLAB annual reports*, http://www-hasyllab.desy.de/science/annual_reports/2002_report/part1/contrib/47/7992.pdf.
- (138) Brezesinski, G.; Mohwald, H. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2003**, *100-102*, 563-584.
- (139) Möhwald, H. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **1990**, *41*, 441-476.
- (140) McConnell, H. M. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **1991**, *42*, 171-195.
- (141) Knobler, C. M.; Desai, R. C. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **1992**, *43*, 207-236.
- (142) Buffeteau, T.; le Calvez, E.; Castano, S.; Desbat, B.; Blaudez, D.; Dufourcq, J. *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 4537-4544.
- (143) Maltseva, E.; Brezesinski, G. *ChemPhysChem* **2004**, *5*, 1185-1190.
- (144) Li, J. B.; Zhao, J.; Miller, R. *Nahrung* **1998**, *42*, 234-235.
- (145) Krüger, P.; Schalke, M.; Wang, Z.; Notter, R. H.; Dluhy, R. A.; Lösche, M. *Biophys. J.* **1999**, *77*, 903-914.
- (146) Aroti, A.; Leontidis, E.; Maltseva, E.; Brezesinski, G. *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 15238-15245.
- (147) Wang, X., Insight into the interfacial self-assembly and structural changes of hydrophobins. Thèse, Université de Groningen, Groningen (Pays-Bas), 2004.
- (148) Wösten, H. A. B.; de Vocht, M. L. *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, *1469*, 79-86.
- (149) Lo Conte, L.; Chothia, C.; Janin, J. *J. Mol. Biol.* **1999**, *285*, 2177-2198.
- (150) Voros, J. *Biophys. J.* **2004**, *87*, 553-561.
- (151) Tiller, J. C.; Rieseler, R.; Berlin, P.; Klemm, D. *Biomacromolecules* **2002**, *3*, 1021-1029.
- (152) Chance, B. *Science* **1949**, *109*, 204-208.
- (153) Lobel, K. D.; Hench, L. L. *J. Biomed. Materi. Res.* **1998**, *39*, 575-579.
- (154) Ferapontova, E. E.; Grigorenko, V. G.; Egorov, A. M. *Biochemistry (Moscow)* **2001**, *66*, 832-839.

- (155) Bockle, B.; Martinez, M. J.; Guillen, F.; Martinez, A. T. *Appl. Environ. Microbiol.* **1999**, *65*, 923-928.
- (156) Olsen, L. F.; Hauser, M. J. B.; Kummer, U. *Eur. J. Biochem.* **2003**, *270*, 2796-2804.
- (157) Nicolau, D. V. J.; Nicolau, D. V., Dunedin, New Zealand 2004.
- (158) Valincius, G.; Ignatjev, I.; Niaura, G.; Kažemėkaitė, M.; Talaikytė, Z.; Razumas, V.; Svendsen, A. *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 2632-2636.
- (159) Ignatjev, I.; Valincius, G.; Švedaitė, I.; Gaidamauskas, E.; Kažemėkaitė, M.; Razumas, V.; Svendsen, A. *Anal. Biochem.* **2005**, *344*, 275-277.
- (160) Fernández-Lafuente, R.; Armisen, P.; Sabuquillo, P.; Fernández-Lorente, G.; Guisán, J. M. *Chem. Phys. Lipids* **1998**, *93*, 185-197.
- (161) Bastida, A.; Sabuquillo, P.; Armisen, P.; Fernández-Lafuente, R.; Huguet, J.; Guisán, J. M. *Biotechnol. Bioeng.* **1998**, *58*, 486-493.
- (162) Donze, C.; Coleman, A. W. *J. Inclusion Phenom.* **1995**, *23*, 11-21.
- (163) Eddaoudi, M.; Parrot-Lopex, H.; de Lamotte, S. F.; Ficheux, D.; Prognon, P.; Coleman, A. W. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1996**, 1711-1716.
- (164) Szejtli, J. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1743-1753.
- (165) Lo Nostro, P.; Santoni, I.; Bonini, M.; Baglioni, P. *Langmuir* **2003**, *19*, 2313-2317.
- (166) Badis, M.; van der Heyden, A.; Heck, R.; Marsura, A.; Gauthier-Manuel, B.; Zywockinski, A.; Rogalska, E. *Langmuir* **2004**, *20*, 5338-5346.
- (167) Deinhammer, R. S.; Ho, M.; Anderegg, J. W.; Porter, M. D. *Langmuir* **1994**, *10*, 1306-1313.
- (168) Zhang, L.; Lin, X. *Fresenius. J. Anal. Chem.* **2001**, *370*, 956-962.
- (169) Adenier, A.; Chehimi, M. M.; Gallardo, I.; Pinson, J.; Vila, N. *Langmuir* **2004**, *20*, 8243-8253.
- (170) Cozzi, D.; Ciantelli, G.; Pantani, F. *Ric. Sci.* **1968**, *38*, 845-847.
- (171) Nagasaka, S.; Harada, M.; Okada, T. *Anal. Chim. Acta* **2004**, *525*, 115-121.
- (172) Heck, R., Synthèse et étude des propriétés physico-chimiques de nouvelles métallo-cyclodextrines. Thèse, Université Henri Poincaré, Nancy, 2003.
- (173) Ma, W.; Li, J.; Tao, X.; He, J.; Xu, Y.; Yu, J. C.; Zhao, J. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **2003**, *42*, 1029-1032.

- (174) Regnouf de Vains, J. B.; Dalbavie, J. O.; Lamartine, R.; Fenet, B. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 2681-2684.
- (175) Dalbavie, J.-O., Nouveaux chélates calixaréniques destinés à l'extraction de métaux. Thèse, Université Claude Bernard, Lyon, 2001.
- (176) Jehoulet, C.; Bard, A. J.; Wudl, F. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 5456-5457.
- (177) Bulhoes, L. O. S.; Obeng, Y. S.; Bard, A. J. *Chem. Mater.* **1993**, *5*, 110-114.
- (178) Chlistunoff, J.; Cliffel, D.; Bard, A. J. *Thin Solid Films* **1995**, *257*, 166-184.
- (179) Rowinski, P.; Korytkowska, A.; Bilewicz, R. *Chem. Phys. Lipids* **2003**, *124*, 147-156.
- (180) Morgan, S. E.; Li, J.; Benson, S. D.; Misra, R.; Cannon, G. C. *Polym. Prepr. (Am. Chem. Soc., Div. Polym. Chem.)* **2005**, *46*, 517-518.

RAPPORT DE SOUTENANCE

Concernant la thèse de Doctorat de l'Université Henri Poincaré, Nancy 1

en *Chimie et Physicochimie Moléculaires*

Présentée par : *Yohann Corvis*

Date de la soutenance : *13 décembre 2005*



Monsieur Yohann Corvis a présenté de façon très dynamique l'essentiel de ses travaux dans un exposé très clair et d'une grande qualité didactique.

Au cours de la discussion qui a suivi, qui s'est déroulée en partie en langue anglaise, le candidat a répondu avec beaucoup d'aisance aux questions posées par les membres du jury. Le jury a tenu à souligner le caractère très pluridisciplinaire du travail de Monsieur Corvis qui a abordé des problèmes très divers, au moyen de techniques expérimentales variées et d'expériences délicates qu'il a réalisées lui-même à l'Université Henri Poincaré ainsi que dans plusieurs centres de recherches européens.

Prenant en compte à la fois le caractère très innovant du travail de recherche, de la qualité du mémoire et de sa présentation orale, le jury a été unanime pour proposer que le Doctorat de l'Université Henri Poincaré, Nancy 1 soit conféré à Monsieur Yohann Corvis.

Président du Jury - Nom, Prénom et signature :

Jean-Louis Rivail

Membres du Jury - Nom, Prénom et signature :

Renata Bilewicz

Robert VERGER

Ewa ROGALSKA

Denis TAGU

Alain WALCARIUS

N.B. De par décision du Conseil d'administration de l'Université en date du 2 décembre 2002, les jurys de soutenance de thèse de l'UHP Nancy 1 n'attribuent plus aucune mention à compter du 1^{er} janvier 2003.

3C-F8A A retourner au Service de la Scolarité de la Faculté des Sciences & Techniques dans les meilleurs délais.

Monsieur CORVIS Yohann

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ, NANCY 1
en CHIMIE & PHYSICO-CHIMIE MOLECULAIRES

VU, APPROUVÉ ET PERMIS D'IMPRIMER N  1152

Nancy, le 10 janvier 2006

Le Président de l'Université



**Auto-assemblage d'une protéine fongique, l'hydrophobine SC3, aux interfaces.
Applications à l'élaboration de surfaces catalytiques.**

Le travail réalisé a permis de mieux appréhender les mécanismes régissant l'auto-assemblage interfacial d'une protéine fongique, l'hydrophobine SC3. Ces études fondamentales ont été suivies par des travaux à caractère appliqué, visant l'utilisation de l'hydrophobine en tant qu'agent fixateur de molécules sur différents supports solides. Ainsi, des molécules aussi diverses que des enzymes, un dérivé de fullerène, ou encore des macrocycles tels que des dérivés de calixarène et de cyclodextrine dotés de propriétés de complexation de cations métalliques, ont été immobilisées sur des surfaces en carbone, platine, polytétrafluoroéthylène, polystyrène ou encore acier inoxydable. Par ailleurs, l'utilisation de l'hydrophobine SC3 portant des groupements sulfonates issus de l'oxydation des groupements sulfhydryles des cystéines, a permis l'immobilisation directe d'ions cuivriques dans une matrice mixte hydrophobine - membrane lipidique. Les résultats obtenus montrent que les différentes techniques d'immobilisation utilisées sont intéressantes pour la préparation de systèmes fonctionnels tels que les interrupteurs moléculaires électro-optiques, ou les capteurs électrochimiques basés sur des processus catalytiques.

Mots clés : Hydrophobine, auto-assemblage, édifices supramoléculaires, modification et fonctionnalisation de supports solides, surfaces catalytiques, (bio)capteurs, (bio)réacteurs, interrupteurs électro-optiques, transductions optiques et électrochimiques.

**Self-assembly of a fungal protein, the SC3 hydrophobin:
towards elaborating of catalytic surfaces.**

The work performed in this thesis allowed understanding of the interfacial self-assembly of a fungal protein, SC3 hydrophobin, at a deeper mechanistic level. These fundamental studies were the starting point of an applied research on the possibilities of using hydrophobin as an agent retaining different molecules on solid surfaces. It was shown that enzymes, fullerene, calixarene and cyclodextrin derivatives could be immobilized on carbon, platinum, polytetrafluoroethylene, polystyrene or stainless steel surfaces, yielding functional materials. Moreover, it was shown that the SC3 hydrophobin with eight cysteinyl sulfhydryl groups oxidized to sulfonates chelates cupric ions. The SC3-Cu^{II} incorporated in a lipid cubic phase deposited on electrodes formed a reversible, biomimetic redox system. The results obtained in this work show a way to easily manufacture stable surfaces with possible applications in electro-optical switching and electrochemical sensing.

Key words: Hydrophobin, self-assembly, supramolecular structures, solid substrate modification and functionalization, catalytic surfaces, (bio)sensors, (bio)reactors, electro-optical switches, optical and electrochemical transduction.