



Etudes électrochimiques de chaînes de transfert d'électrons photosynthétiques ou Vers une photoproduction biomimétique d'hydrogène.

Vincent Fourmond

► To cite this version:

Vincent Fourmond. Etudes électrochimiques de chaînes de transfert d'électrons photosynthétiques ou Vers une photoproduction biomimétique d'hydrogène.. Chimie. Université Paris-Diderot - Paris VII, 2007. Français. NNT : . tel-00361224

HAL Id: tel-00361224

<https://theses.hal.science/tel-00361224>

Submitted on 13 Feb 2009

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.

Université Paris 7 – Denis Diderot
UFR de Physique (036)

DOCTORAT
Interface Physique–Biologie

Vincent FOURMOND

**Études électrochimiques de chaînes de transfert d'électrons
photosynthétiques**

ou

Vers une photoproduction biomimétique d'hydrogène

Thèse dirigée par Winfried LEIBL

Soutenue le mardi 3 avril 2007

JURY

Pr. Catherine ETCHEBEST
Pr. Pierre LABBÉ
Dr. Fabrice RAPPAPORT
Dr. Sophie LECOMTE
Dr. Winfried LEIBL

Présidente
Rapporteur
Rapporteur

Je souhaite ici remercier toutes les personnes qui ont participé plus ou moins directement à la réalisation de cette thèse. Cette liste est partielle : il manque sûrement du monde, et je n'ai remercié chaque personne que pour ce qui m'a semblé le plus important, ou ce qui sonnait le mieux.

En premier lieu, je tiens à remercier Winfried Leibl de m'avoir accueilli dans son équipe et d'avoir réussi à me supporter pendant ces années, ce qui n'est pas une mince affaire.

Merci à Bernard Lagoutte pour son soutien constant et la patience qu'il a dû mettre en œuvre pour faire face à mes demandes astronomiques de purifications de cytochrome c_6 .

Merci à Hervé Bottin pour toutes les discussions que l'on a pu avoir, tant scientifiques qu'autres.

Merci à Pierre Sétif pour les mesures de constantes de dissociations ainsi que toutes les discussions et éclaircissements sur la FNR.

Merci à Tatiana Antoine pour avoir réussi à produire l'hydrogénase, ainsi que pour m'avoir donné une bonne raison d'écrire du Perl au boulot.

Merci à Alain Boussac pour m'avoir fourni des échantillons de photosystème II.

Merci à Christophe Demaille d'avoir pris en charge les simulations numériques et de m'avoir expliqué comment ça marche.

Merci à Vanessa Proux pour m'avoir inculqué les rudiments d'électrochimie qui m'étaient nécessaires en début de thèse, et en particulier la construction des électrodes.

Merci à Christian Bourdillon pour les discussions intéressantes et pour m'avoir appris à observer (et donc à améliorer) mes électrodes.

Merci au Professeur Pierre Labbé et à Fabrice Rappaport qui ont accepté d'être mes rapporteurs. Bonne lecture !

Merci au Professeur Catherine Etchebest d'avoir accepté de présider le jury.

Merci à Sophie Lecomte d'avoir accepté de participer au jury.

Merci à Véronique Mary qui est une des raisons pour lesquelles il est agréable de travailler au troisième...

Merci à Éliane Nabadryk et Sandra Andrianambinintsoa pour les thés et les discussions au premier.

Merci à Jean-Julien Fleck, pour, entre autres, sa relecture critique (et très appréciée, comme toujours) des dernières étapes du manuscrit.

Merci à Céline Chevalier, qui est dans une certaine mesure responsable de nombre d'aspects typographiques de cette thèse.

Merci à Sébastien Desreux (et à H&K) pour m'avoir (en partie) appris à écrire.

Merci à Bill Paxton d'avoir écrit la librairie fantastique qu'est Tioga, responsable de la quasi-totalité des images dans cette thèse.

Merci à Yukihiro Matsumoto pour avoir fourni à Bill les moyens de faire cette librairie.

Merci à Donald Knuth et à Leslie Lamport pour avoir fait $\text{\TeX}$ et $\text{\LaTeX}$ qui ont été utilisés pour composer cette thèse.

Merci à Georges Brassens pour son soutien moral indispensable quoi que, hélas, post-mortem...

Merci enfin et surtout à Tetyana pour m'avoir soutenu tout au long de cette thèse, ainsi qu'à Sophie pour m'avoir «aidé» à rédiger (pas facile de taper avec un petit monstre sur les genoux...).

Table des matières

Table des matières	2
I Introduction	5
1 Où va-t-on ?	7
2 La photosynthèse	9
2.1 Généralités	9
2.1.1 Séparations de charges photoinduites	9
2.1.2 Photosynthèse oxygénique	10
2.1.3 Quelques mots sur les transferts cycliques d'électrons	12
2.2 Le photosystème I et ses partenaires	12
2.2.1 Le photosystème I	12
2.2.2 Cytochrome c_6	14
2.2.3 Ferrédoxine et flavodoxine	14
2.2.4 Ferrédoxine:NADP ⁺ oxydoréductase	15
2.2.5 Hydrogénases	16
2.3 Que va-t-on en faire ?	17
3 Les techniques électrochimiques	19
3.1 Interactions molécule/électrode	20
3.2 Les échelons de potentiel	21
3.3 La voltamétrie cyclique	23
3.3.1 Le cas réversible	24
3.3.2 Autres cas	25
3.4 Quelques aspects pratiques	26
3.4.1 Courants non-faradiques et double couche	27
3.4.2 Montage électrochimique	28
II Des transferts d'électrons	29
4 Du potentiostat au cytochrome c_6	31
4.1 Électrodes	31
4.1.1 Fabrication des électrodes à feuille collée	31
4.1.2 Caractérisation des électrodes	33
4.1.3 Autres électrodes utilisées	36
4.2 Électrochimie du c_6	37
4.2.1 Configuration expérimentale	37
4.2.2 Électrochimie directe sur l'or nu	38
4.2.3 Modification des électrodes	39
4.2.4 Électrochimie directe du c_6 sur de l'or modifié	40

5	Du c_6 au glutamate	43
5.1	Du c_6 à l'oxygène en passant par le méthylviologène	43
5.1.1	Mesures expérimentales	44
5.1.2	Interprétation	44
5.2	Construction de la chaîne	47
5.2.1	Utilisation de la ferrédoxine couplée à l'oxygène comme accepteur terminal .	47
5.2.2	Utilisation de partenaires de la ferrédoxine	48
5.2.3	Premières expériences avec la FNR	49
5.2.4	Recyclage du NADP^+	50
5.3	Mesures des réactions parasites	51
5.3.1	Le court-circuit Ferrédoxine- c_6	51
5.3.2	Réactions entre le c_6 et la FNR	55
5.3.3	Réactions directes avec l'électrode	56
5.3.4	Complexation ferrédoxine oxydée-FNR	57
5.4	Étude de la chaîne complète	58
5.4.1	Considérations sur l'influence de l'intensité d'éclairement	58
5.4.2	Réaction c_6 – PSI	60
5.4.3	Réaction PSI – Ferrédoxine	61
5.4.4	Discussion	68
5.5	Conclusion	70
6	D'autres transferts	71
6.1	Hydrogénases	71
6.1.1	Préliminaires à la construction d'une chaîne	71
6.1.2	Différents essais de chaîne complète	73
6.2	Greffages	76
6.2.1	Techniques de greffage	76
6.2.2	Greffage du photosystème II	77
6.2.3	Greffage du cytochrome c_6	80
6.2.4	Conclusion	81
6.3	Transferts virtuels	81
7	Pour en finir...	83
III	À toutes fins utiles...	85
A	Quelques simulations	87
A.1	Construction de l'algorithme	87
A.2	Implémentation	88
A.3	Simulations de voltamogrammes catalytiques	91
B	Informations pratiques	93
B.1	Électrodes	93
B.1.1	Solutions oxydantes	93
B.1.2	Colles	93
B.1.3	Lavage des lames de verres	93
B.1.4	Évaporation	94
B.1.5	Préparation des électrodes à feuilles collées	95
B.2	Tampons utilisés	95
B.3	Préparation des protéines	96
C	Bibliographie	97

Première partie

Introduction

Chapitre | 1

Où va-t-on ?

Il est de plus en plus évident que le climat est le sujet d'une évolution à long terme engendrée pour une grande partie par les activités humaines [1]. L'utilisation d'une quantité massive de combustible fossiles déséquilibre le cycle naturel du carbone et entraîne l'accumulation de dioxyde de carbone dans l'atmosphère. Par ailleurs, les ressources terrestres en combustibles fossiles n'ont rien d'éternel, et sont appelées à disparaître dans un futur plus ou moins proche. Il est en conséquence d'une importance vitale de chercher d'autres sources d'énergie. Pour simplifier, deux sources d'énergie sont disponibles en quantités suffisantes à la surface de la Terre : les combustibles nucléaires de fusion, et le rayonnement solaire¹. La nature² a fait son choix depuis longtemps pour aboutir au système très évolué de la photosynthèse, qui permet à la quasi-totalité des écosystèmes d'utiliser le Soleil comme source d'énergie primaire.

L'utilisation de cellules photovoltaïques permet une conversion d'une partie de l'énergie lumineuse incidente en électricité. La technologie reposant sur des semi-conducteurs est maintenant bien maîtrisée, et la généralisation de leur utilisation est plus liée semble-t-il à des raisons d'ordre économique et politique. En revanche, le problème du stockage de l'énergie photoproduite reste entier. Il est en effet notoire que l'électricité est une ressource délicate à stocker, et le caractère fondamentalement variable de l'énergie solaire complique d'autant cette tâche. Au delà du simple stockage local à court terme, qui peut être assuré par des batteries d'accumulateurs avec des rendements raisonnables, il est particulièrement important d'être en mesure de stocker l'énergie incidente sous une forme stable et facile à transporter, pour une utilisation dans des véhicules par exemple ou pour se prémunir des variations saisonnières de la demande d'énergie. Il est pour cela nécessaire de fabriquer un combustible à partir de cette énergie. L'hydrogène est sans aucun doute le combustible le plus facile à produire chimiquement : c'est la molécule la plus simple qui soit et on sait fabriquer de l'hydrogène à partir d'électricité depuis longtemps. Par ailleurs, des technologies de piles à combustibles se développent pour transformer l'énergie chimique stockée dans l'hydrogène en électricité avec des rendements beaucoup plus élevés que les moteurs à explosion actuels. Des études montrent qu'il est plausible de passer lentement à une économie basée sur l'hydrogène [2] ; de nombreux projets sont d'ailleurs à l'étude dans certains points du globe trop éloignés des ressources pétrolières [3]. Cependant, dans l'état actuel de nos connaissances, la production d'hydrogène à partir d'électricité est relativement peu efficace (environ 50% de pertes) et nécessite du platine comme catalyseur. Il est donc nécessaire de mettre au point de nouvelles technologies de production.

La nature sait fabriquer des combustibles à partir d'énergie solaire depuis des millions d'années : la photosynthèse permet la production de sucres et de dioxygène à partir d'eau et de dioxyde de carbone. Par ailleurs, un grand nombre d'organismes possèdent des enzymes, les hydrogénases, capables de catalyser la réduction de protons en hydrogène ainsi que la réaction inverse. L'étude de

¹N'oublions pas que les énergies éolienne, hydroélectrique et de la biomasses, ainsi que tous les combustibles fossiles, sont issus de manière plus ou moins directe du rayonnement solaire.

²Par souci de simplicité et pour éviter des périphrases particulièrement lourdes à base de «le hasard et l'évolution ont fait que ...», je vais personnifier la nature. Que personne ne se choque, il s'agit simplement d'une figure de style !

ces enzymes est d'une importance fondamentale pour comprendre les mécanismes permettant la catalyse de ces réactions, tant pour la production que la consommation d'hydrogène.

Le but de cette thèse est d'effectuer un pas vers un procédé efficace pour la conversion d'énergie lumineuse en hydrogène. La recherche en cours s'appuie sur deux voies aboutissant à la production d'hydrogène. D'une part, des biologistes cherchent à modifier des organismes pour favoriser les mécanismes de production d'hydrogène, soit en redirigeant une partie des électrons de la photosynthèse, soit en utilisant les nitrogénases, enzymes qui réduisent l'azote en ammoniac et produisent de l'hydrogène gazeux comme sous-produits. D'autre part, des groupes de chimistes essaient de s'inspirer des enzymes utilisées par les organismes vivants pour créer des catalyseurs artificiels reproduisant les mêmes fonctionnalités.

Dans cette optique, j'ai étudié les transferts d'électrons dans des chaînes photosynthétiques reconstituées en dehors de cellules vivantes. Les objectifs de cette approche sont doubles :

- d'une part, l'étude de ces chaînes permet de mieux comprendre les interactions des différents partenaires des chaînes photosynthétiques, afin d'optimiser les modifications d'organismes entiers pour la production d'hydrogène ;
- d'autre part, en insérant les hydrogénases dans une chaîne photosynthétique, on peut la photoréduire et en extraire ainsi des données cinétiques pour mieux comprendre son fonctionnement.

Les études présentées ont été essentiellement réalisées par des moyens électrochimiques, avec des incursions dans le domaine de la spectrométrie.

Nous allons commencer par une introduction sur la photosynthèse, et en particulier sur les protéines que nous avons étudiées ; elle sera suivie par une introduction sur les techniques électrochimiques utilisées au cours de cette thèse. Nous poursuivrons ensuite par l'étude en deux étapes d'une chaîne de transferts d'électrons complète. D'autres aspects du travail réalisés seront présentés ensuite, avant de passer à une ébauche de conclusion. Une attention particulière a été portée sur la clarté du texte. À part pour les bases d'électrochimie, la théorie nécessaire pour comprendre des résultats est développée avec les résultats.

Bonne lecture !

Chapitre

La photosynthèse

2

La photosynthèse est le processus par lequel les organismes vivants autotrophes (plantes, algues, cyanobactéries) absorbent l'énergie solaire pour synthétiser des molécules indispensables à leur survie (et à la notre, accessoirement). Les premières étapes de la conversion d'énergie lumineuse suivent des étapes très similaires à celles rencontrées dans les capteurs photovoltaïques : un photon incident induit crée un état excité qui est transformé par des structures appropriées en énergie électrochimique¹ grâce à un processus de séparation de charge. Ces charges sont ensuite collectées et utilisées. Nous allons dans un premier temps voir brièvement comment sont réalisés ces processus dans les organismes photosynthétiques ; nous nous focaliserons ensuite sur les enzymes étudiées au cours de cette thèse.

2.1 Généralités

L'absorption proprement dite d'énergie lumineuse est réalisée dans les organismes vivants par des structures membranaires composées de protéines et de pigments appelées centres réactionnels. Les centres réactionnels sont dotés de systèmes étendus d'antennes permettant de collecter les photons dans une grande région pour retransmettre l'excitation au cœur du centre. Ils sont impliqués dans des chaînes complexes de transferts d'électrons, linéaires ou cycliques.

2.1.1 Séparations de charges photoinduites

Le rôle de la photosynthèse est de convertir de l'énergie lumineuse en une autre forme plus facilement stockable et utilisable : de l'énergie chimique. La méthode par excellence pour parvenir à ce but est l'exploitation de séparations de charges photoinduites : un photon incident dans un dispositif approprié permet de séparer une charge positive et une charge négative initialement réunies. Ceci permet de convertir un quantum d'énergie lumineuse en une énergie électrochimique.

Les organismes photosynthétiques utilisent essentiellement deux complexes aux fonctionnements similaires pour effectuer cette séparation de charge : les centres réactionnels de type I (à centres Fer-Soufre [Fe,S]) et II (à phéophytines et quinones). Chacun de ces complexes comporte un donneur primaire qui reçoit l'excitation lumineuse captée et relayée par un système d'antennes. Lors de l'absorption d'un photon, le donneur primaire passe dans un état excité de haute énergie (et donc de bas potentiel). Ce donneur réduit ensuite un accepteur primaire d'énergie plus basse, qui à son tour en réduit un autre et ainsi de suite : l'électron suit une série de transferts internes au cours desquels il perd une part non négligeable de son énergie. Cette déperdition est indispensable pour assurer la directionnalité du transfert d'électrons et ainsi minimiser les risques de recombinaisons. En un temps assez court (inférieur à une microseconde en général), on aboutit à un état relativement stable de séparation de charge entre le donneur primaire, oxydé, et l'accepteur terminal du photosystème,

¹Ou purement électrostatique pour les capteurs photovoltaïques.

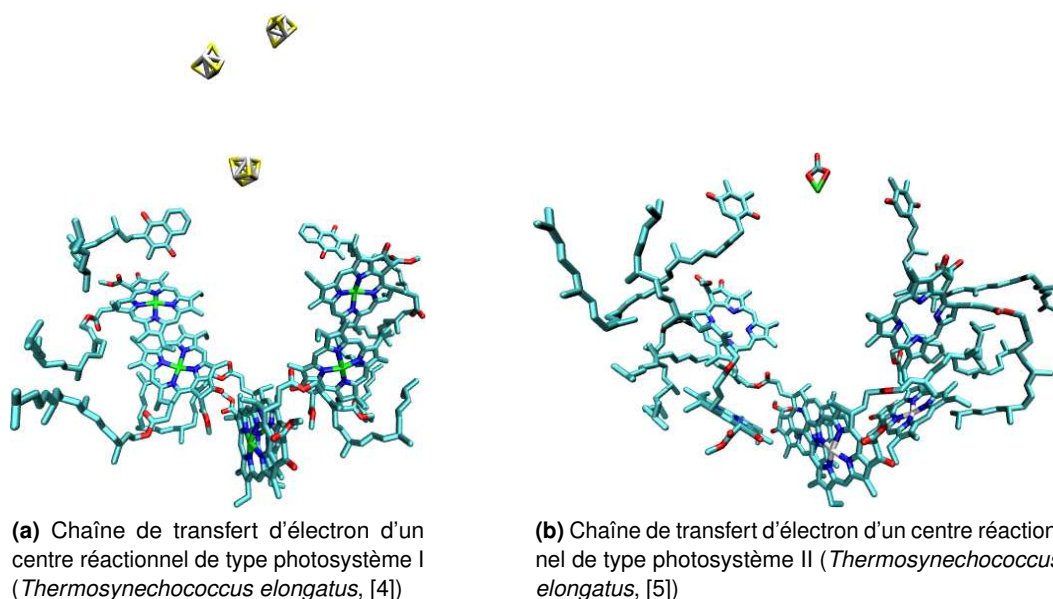


FIG. 2.1 : Comparaison des chaînes de transferts d'électrons entre des centres de type I (fig. 2.1a) et de type II (fig. 2.1b). Toutes deux ont une structure relativement semblable à deux branches, formées de cofacteurs similaires. Toutes les images de structures présentées dans ce chapitre ont été obtenues à partir des données PDB téléchargées depuis la base de données MMDB [6], à l'aide du logiciel VMD [7].

réduit :

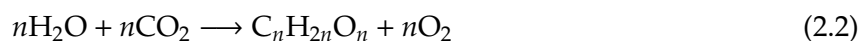


Pour fonctionner à nouveau, le photosystème doit retourner à son état initial. C'est le rôle de donneurs et d'accepteurs externes² qui réoxydent l'accepteur terminal et réduisent le donneur primaire. Ces partenaires permettent au photosystème d'interagir avec le reste de son environnement.

La figure 2.1 montre les chaînes de transfert d'électrons pour un photosystème de type I et un photosystème de type II. Malgré des différences bien visibles, on retrouve une structure caractéristique de tous les centres réactionnels : un donneur primaire sur l'axe de pseudo-symétrie d'une structure à deux branches portant des cofacteurs similaires (quinones, chlorophylles, phéophytines).

2.1.2 Photosynthèse oxygénique

La photosynthèse oxygénique est celle qui conduit à la réduction de dioxyde de carbone en sucres et à l'oxydation de l'eau en oxygène, soit un bilan global



On peut la décomposer schématiquement en deux parties : l'une se déroule de part et d'autre de la membrane des thylakoïdes et conduit à l'oxydation de l'eau du côté luménal et à la réduction du $NADP^+$ en NADPH du côté stromal. L'autre partie est ce qu'on appelle le cycle de Calvin, et catalyse la fixation de dioxyde de carbone en sucres en consommant de l'ATP et du NADPH. Nous nous intéresserons ici uniquement à la partie membranaire³. Elle s'oriente autour de deux complexes membranaires photoactifs, les photosystème I et II, reliés par des petits transporteurs d'électrons en interaction via un complexe membranaire non photoactif : le cytochrome b_6f (figure 2.2). Ce dernier permet de coupler le transfert d'électrons à un transfert de protons transmembranaire. Par

²Éventuellement via une chaîne de transporteurs internes.

³Qualifiée aussi de «lumineuse», par opposition à la réduction du dioxyde de carbone qui ne nécessite pas directement de photons et peut ainsi se dérouler à l'obscurité.

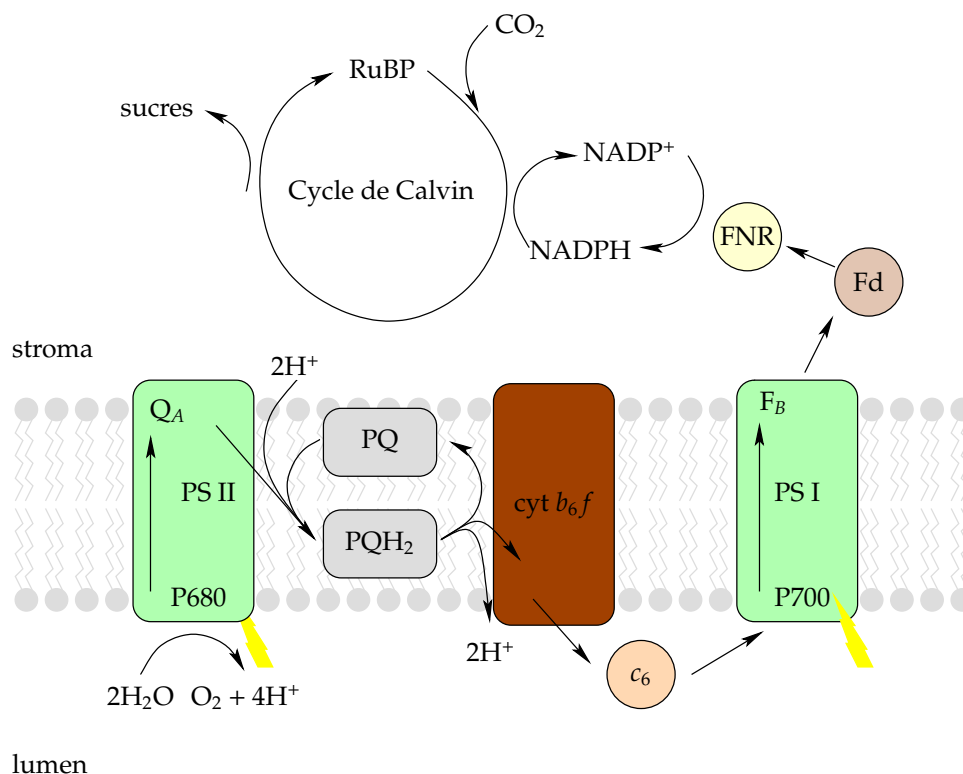


FIG. 2.2: Schéma global des transferts d'électrons autour d'une membrane de photosynthèse oxygénique. Voir le texte pour les abréviations utilisées.

ailleurs, un autre complexe membranaire, l'ATP-synthase (non représentée sur la figure), se charge de convertir le gradient de proton produit par les réactions lumineuses en ATP.

Commençons par le photosystème II. Après avoir absorbé un photon, il crée un état de séparation de charge, donnant lieu d'une part à la réduction de plastoquinone (PQ) du côté stromal du complexe et à l'accumulation d'un fort pouvoir oxydant sur un agrégat de manganèse du côté luménal. Le départ de quatre électrons de l'agrégat permet l'oxydation de molécules d'eau en oxygène. Le mécanisme exact de cette réaction n'est pas encore parfaitement établi, quoi que les structures à haute résolution récentes ont permis des avancées dans sa compréhension. Une fois que la plastoquinone a été réduite en hydroquinone (PQH₂) en acceptant deux électrons et deux protons, elle est relâchée dans la membrane et diffuse jusqu'à rencontrer un complexe de cytochrome *b₆f*. Ce dernier permet le transfert d'électrons de la plastoquinone au cytochrome *c₆* tout en réalisant un transfert d'électrons transmembranaire.

Le cytochrome *c₆* ainsi réduit diffuse ensuite dans le milieu luménal jusqu'au photosystème I⁴. Le mécanisme de séparation de charge de ce dernier permet de fournir un électron à bas potentiel à la ferrédoxine, un transporteur soluble d'électrons stromal. La ferrédoxine interagit avec un certain nombre d'enzymes dont la ferrédoxine:NADP⁺ oxydoréductase (FNR), qui permet la production de NADPH, la source d'électrons de la fixation du dioxyde de carbone dans le cycle de Calvin, et, dans certains organismes, avec des hydrogénases. La figure 2.3 résume l'évolution des potentiels au long de la chaîne. La membrane joue un rôle fondamental pour deux raisons :

- Elle évite la rencontre d'espèces à haut potentiel du côté luménal avec des espèces à bas potentiel du côté stromal, ce qui entraînerait des court-circuit fâcheux, peut-être destructifs et en tous cas inefficaces⁵.
- Elle permet la création d'un gradient de protons entre ses deux côtés ; l'ATP-synthase catalyse la conversion de l'énergie potentielle associée à ce gradient en ATP, l'unité d'énergie cellulaire.

⁴La plastocyanine joue aussi ce rôle, suivant les organismes et les conditions.

⁵Voir par exemple section 5.3.1, page 51.

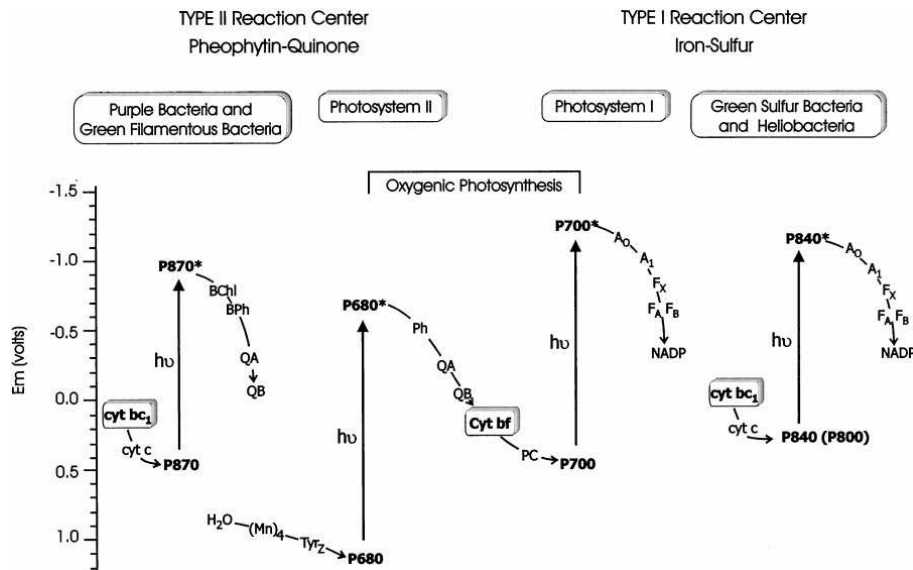


FIG. 2.3: Évolution des potentiels au cours de la chaîne photosynthétique. Figure extraite de [8].

De la sorte, la photosynthèse oxygénique produit à la fois de l'énergie utilisable immédiatement (ATP) et des réserves pour des périodes moins fastes (les sucres).

La quasi-totalité des photons absorbés par les centres réactionnels donnent lieu à une séparation de charge efficace (rendement quantique proche de 1). C'est au prix d'une perte d'énergie non négligeable : on estime le rendement global de la conversion d'énergie aux alentours de 40 à 50%.

2.1.3 Quelques mots sur les transferts cycliques d'électrons

La photosynthèse oxygénique consiste à extraire des électrons à haut potentiel de l'eau pour les donner à un potentiel beaucoup plus bas au dioxyde de carbone. Si ce type d'utilisation de la lumière est adopté par une grande partie des organismes photosynthétiques, dont les plantes supérieures, il en existe d'autres en revanche, basées sur des concepts de transferts cycliques. Ces systèmes sont fondés sur des quinones, qui sont réduites d'un côté d'une membrane pour être réoxydées de l'autre côté, permettant le transfert de protons d'un côté à l'autre de la membrane. Tout se passe comme si, sur la figure 2.2, le cytochrome c_6 allait réduire le P680 du photosystème II en lieu et place de l'eau. Le gradient de proton est ensuite converti en ATP par l'ATP-synthase. Ces organismes doivent bien entendu s'appuyer sur d'autres sources d'électrons que l'eau pour vivre, puisqu'ils ne sont pas en mesure de l'oxyder.

2.2 Le photosystème I et ses partenaires

Nous allons maintenant nous intéresser plus en détail à la structure du photosystème I ainsi qu'aux interactions avec ses partenaires.

2.2.1 Le photosystème I

Le photosystème I est une oxydoréductase photoinductible dont le rôle est de transférer les électrons des donneurs solubles du côté luménal (plastocyanine, cytochrome c_6) à des accepteurs solubles du côté stromal de potentiel beaucoup plus bas (ferrédoxine, flavodoxine). On le purifie des cyanobactéries sous forme de monomères ou de trimères. La structure tridimensionnelle de la forme trimérique a été obtenue à une résolution de 2,5 Å [4]. Elle révèle une structure complexe : 12 sous-unités totalisant 127 cofacteurs, dont 96 chlorophylles. La plus grande partie du complexe est constituée des deux unités PsaA et PsaB, très homologues qui forment un dimère. C'est au sein

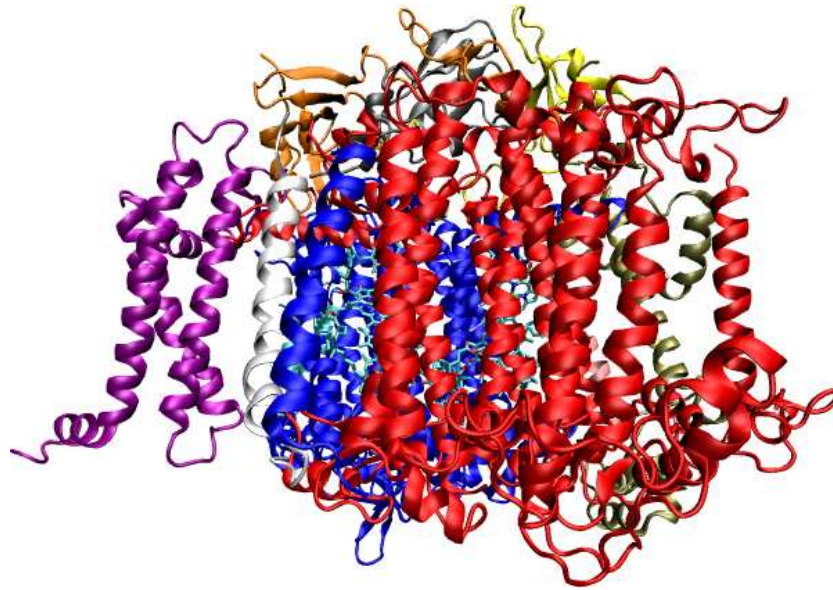


FIG. 2.4: Vue de côté du photosystème I. On repère bien la partie membranaire aux hélices alpha parallèles. Le côté stromal est en haut. L'orientation est exactement la même que celle de la figure 2.1a. PsaA est en bleu et PsaB en rouge.

de ces deux unités que sont localisés la plupart des cofacteurs impliqués dans la séparation de charge. Les sous-unités PsaC, PsaD et PsaE sont stromales et interviennent dans la réaction avec la ferrédoxine. PsaF joue un rôle dans l'interaction avec le cytochrome c_6 et la plastocyanine. La fonction des autres sous-unités est moins bien connue ; on pense qu'ils jouent un rôle important dans la formation de trimères (sous-unités PsaI et PsaL) ou dans la structure du complexe. Une vue de côté du photosystème I est montrée dans la figure 2.4.

Le donneur primaire du photosystème I est un hétérodimère de chlorophylle a et a' , nommé P700 d'après la longueur d'onde principale de son blanchiment sous éclairage. La chaîne de transport d'électrons est constituée de deux branches quasiment symétriques, de part et d'autre du donneur primaire (figures 2.1a et 2.5). À proximité du donneur primaire ($eC-A_1$ et $eC-B_1$) se trouvent des chlorophylles a ($eC-A_2$ et $eC-B_2$). Bien qu'elles soient supposées avoir un rôle important dans les transferts d'électrons, aucune étude à ce jour n'a pu mettre en évidence le passage d'un électron sur l'une d'elle. Après se trouve une autre paire de chlorophylles a , nommées accepteurs primaires ($eC-A_3$ et $eC-B_3$) ; elles reçoivent l'électron du donneur primaire au bout de quelques picosecondes. Celui-ci est ensuite transféré en 30 ps vers un second accepteur, une phylloquinone (notée Q_K-A et Q_K-B). Ces deux transferts sont accompagnés d'une perte importante d'énergie qui minimise les risques de recombinaison. Après les phylloquinones, les deux branches se rejoignent au niveau des agrégats $[4Fe,4S]$: F_X , F_A et F_B . Le transfert continue dans cet ordre, pour arriver à F_B . L'ensemble de ces réactions aboutissent à un état stable de séparation de charge en moins d'une microseconde. Le rôle des deux branches n'est pas clair, et est toujours sujet à débats. D'aucuns pensent que, comme dans le photosystème II, une seule des deux branches est active ; d'autres en revanche pensent que les deux branches jouent un rôle dans le transfert d'électrons. Ce qui a été clairement démontré, c'est que les deux phylloquinones participent aux

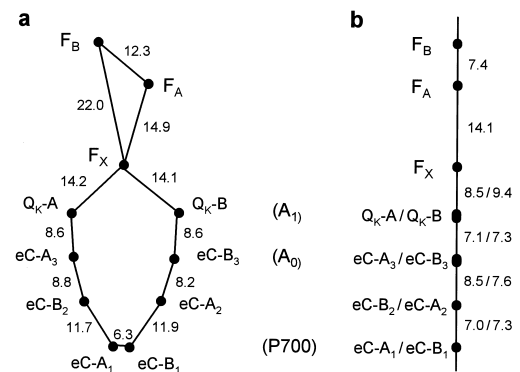


FIG. 2.5: Chaîne de transfert d'électrons du photosystème I ; cette figure est tirée de [9]. Les nombres sont les distances centre à centre en Angström.

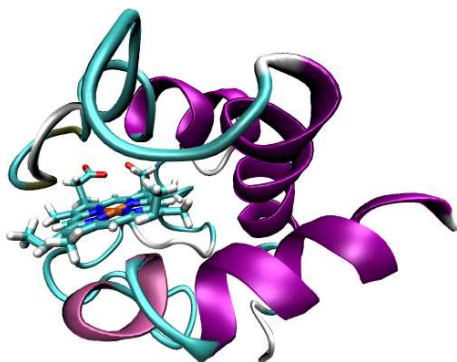


FIG. 2.6: Structure du cytochrome c_6 de *Thermosynechococcus elongatus* [17]. On voit que l'hème est particulièrement accessible d'un côté ; c'est ce côté qui interagit avec le photosystème I.

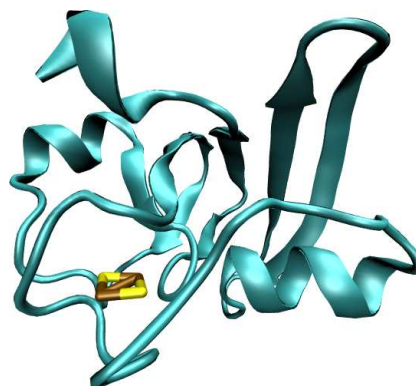


FIG. 2.7: Structure de la ferrédoxine *Synechocystis*, obtenue par homologie à partie de celle d'*Anabaena* [18, 19]. L'agrégat [2Fe,2S] est clairement visible.

transferts d'électrons [10, 11].

Une fois que l'état ultime de séparation de charge est atteint, le donneur primaire est réduit par un porteur soluble du côté luménal, la plastocyanine ou le cytochrome c_6 . L'agrégat Fer-Soufre F_B est quant à lui réoxydé par la ferrédoxine.

2.2.2 Cytochrome c_6

Le cytochrome c_6 (figure 2.6) est une petite protéine soluble (12 kDa) qui comporte un hème dont le potentiel est proche de 330 mV et qui dépend faiblement du pH [12]. Son rôle est de transporter les électrons du complexe b_6f au photosystème I. Certains organismes n'expriment le cytochrome c_6 qu'en conditions de déficience en cuivre, quand l'assemblage du centre métallique de la plastocyanine n'est plus possible. Dans d'autres organismes, il est exprimé constitutivement. L'interaction avec la sous-unité PsaF du PSI est apparemment due à la fois à des interactions hydrophobes et électrostatiques [13], et ne semble pas en général donner lieu à un complexe durable, du moins chez les cyanobactéries [14, 15]. Les transferts d'électrons avec le photosystème I ont été étudiés en détail (voir par exemple [16]).

2.2.3 Ferrédoxine et flavodoxine

La ferrédoxine est une petite protéine soluble (10 kDa) présente dans un grand nombre d'organismes, y compris des organismes non photosynthétiques. Elle contient un agrégat [2Fe,2S] qui permet le transport d'électrons à bas potentiels (aux alentours de -420 mV). Sa structure est représentée figure 2.7. La ferrédoxine est très acide, offrant ainsi une surface chargée négativement à ses partenaires. Elle forme avec eux des complexes basés essentiellement sur des interactions électrostatiques.

Ses interactions avec le photosystème I ont été étudiées en détail au laboratoire [20–25]. Ces études ont permis de caractériser la formation du complexe entre la ferrédoxine et le photosystème I (avec un k_{on} entre $2 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ et $5 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$), la dissociation dans le cas où la ferrédoxine n'est pas réduite (un K_d entre 0,2 μM et 0,6 μM) et le transfert d'électron au sein du complexe. Ce dernier présente trois cinétiques de vitesses très différentes (des temps caractéristiques de 0,5 μs à 100 μs) dont l'origine n'est pas encore très bien comprise. En revanche, ces études n'ont pas permis de connaître la cinétique du départ de la ferrédoxine réduite. Tout au plus des études d'absorption par flash ont permis d'en fixer une limite inférieure vers 800 s^{-1} [26].

La ferrédoxine est susceptible de donner ses électrons à bas potentiel à un grand nombre de partenaires différents comme la glutamate synthase, la nitrite réductase, la sulfite réductase

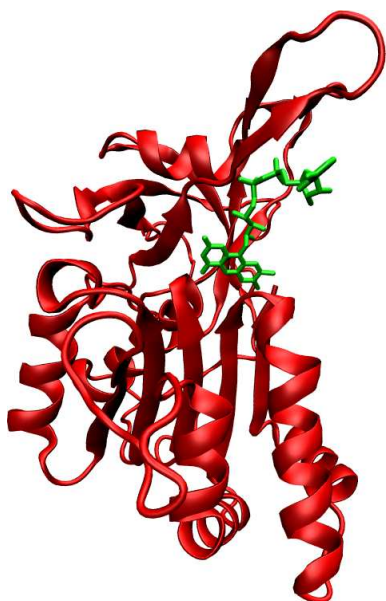


FIG. 2.8: Structure de la FNR de *Synechococcus*, proche de celle du petit pois [33], PDB numéro 2B5O. Le cofacteur FAD est affiché en vert.

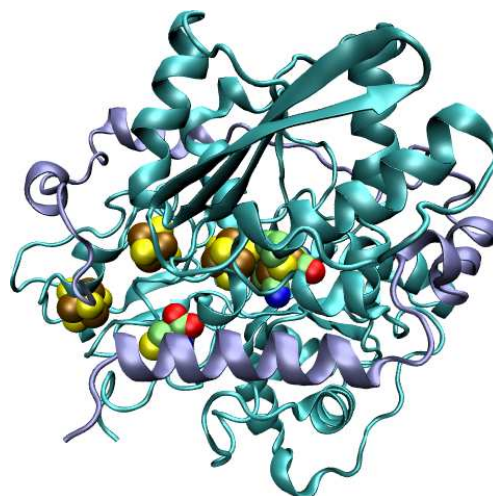


FIG. 2.9: Structure l'hydrogénase à Fer seul de *Desulfovibrio desulfuricans* [34]. L'hydrogénase de *Chlamydomonas* présente une structure similaire, mais dépourvue des centres Fer-Soufre distaux.

et bien d'autres encore. Nous allons nous intéresser essentiellement à deux de ses partenaires, la ferrédoxine:NADP⁺ oxydoréductase (FNR) et l'hydrogénase.

La flavodoxine est une petite protéine contenant une flavine qui peut remplacer la ferrédoxine dans certains organismes dans des conditions de déficience en fer, par exemple, bien que ces deux protéines n'aient guère de points communs. La flavodoxine est capable de transporter deux électrons, mais il n'est pas clair que les deux électrons puissent effectivement être transportés au potentiel de la ferrédoxine [22]. Elle est réputée interagir avec le photosystème I au même site que la ferrédoxine.

2.2.4 Ferrédoxine:NADP⁺ oxydoréductase

La ferrédoxine:NADP⁺ oxydoréductase, FNR, est une flavoenzyme présente dans un grand nombre d'organismes. Sa fonction primaire est de transférer les électrons de la ferrédoxine vers le couple NADP⁺/NADPH, point d'entrée des électrons dans le cycle de Calvin [27]. Une de ses principales caractéristiques est sa capacité à regrouper et séparer des électrons entre des porteurs à un électron (la ferrédoxine) et à deux électrons (le NADPH). Elle est due à son groupe prosthétique, un FAD (flavine adénine dinucléotide), qui est présent dans trois degrés d'oxydation différents, HFAD⁻, HFAD[•] et FAD du plus réduit au plus oxydé. Les potentiels des couples varient avec le pH de la solution, mais sont relativement proches de celui de la ferrédoxine aux pH physiologiques (entre -350 mV et -335 mV à pH 7 d'après [28]). La FNR est aussi connue pour son activité dans le sens de la réduction de la ferrédoxine, jouant ainsi vraisemblablement un rôle important dans le métabolisme en fournissant des électrons à bas potentiels aux (autres) partenaires de la ferrédoxine.

La FNR a été étudiée en grands détails par Batie et Kamin au début des années 80 [29–32]. Il a par exemple été montré que la réduction du NADP⁺ s'opère par un complexe ternaire FNR, ferrédoxine, NADP⁺, que la complexation d'un des partenaires par la FNR décroît son affinité pour l'autre [31] et que le potentiel de la ferrédoxine dans le complexe est sensiblement plus bas qu'en solution [29].

Différentes études suggèrent que la ferrédoxine s'associe avec la FNR via des interactions électrostatiques, comme dans le cas du photosystème I [35–37], quoi que d'autres études suggèrent aussi une certaine importance des interactions hydrophobes [38].

Dans les cyanobactéries, la FNR existe sous deux formes distinctes, une de 26 kDa et une de 29 kDa dotée d'une extension dans le domaine N-terminal [39]. De récentes études semblent suggérer que la forme longue forme un complexe avec les phycobilisomes et fonctionne plutôt dans le sens de la production de ferrédoxine réduite, tandis que la forme courte (FNRs) est soluble et fonctionne dans le sens de la production de NADPH [40]. Pour des raisons historiques, une forme intermédiaire (FNRmed) de la FNR [26,41] était aussi disponible au laboratoire en grandes quantités au début de la thèse, comportant une délétion d'environ 75 acides aminés en N-terminal par rapport à la forme longue de la FNR de *Synechocystis pcc 6803*. C'est donc elle qui a été étudiée en premier. La figure 2.8 montre la structure de la FNR. Le FAD est au centre de la poche servant de réceptacle à la ferrédoxine.

Bien qu'elle ait été très étudiée, un certain nombre de questions restent ouvertes quand au fonctionnement de la FNR (voir [42]) : on ne sait par exemple pas grand chose du mécanisme donnant lieu à l'oxydation du NADPH, et les interactions moléculaires à l'origine de la diminution réciproque de l'affinité de la FNR pour l'autre substrat quand l'un est présent ne sont pas connues.

2.2.5 Hydrogénases

Les hydrogénases sont des enzymes qui catalysent la réaction de réduction de protons en dihydrogène :



Elles sont présentes dans de nombreux procaryotes ainsi que dans un certain nombre d'eucaryote. Suivant les organismes, on trouve plutôt des hydrogénases adaptées pour la production d'hydrogène, pour évacuer des électrons en excès lors de fermentations par exemple, ou pour la consommation d'hydrogène, fournissant ainsi des électrons à bas potentiel pour le métabolisme de l'organisme, le plus souvent dans le cadre d'une symbiose avec des partenaires producteurs d'hydrogène.

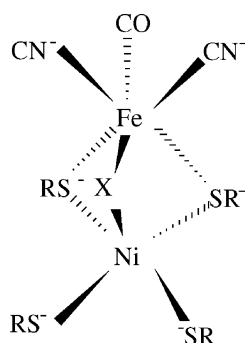


FIG. 2.10: Site actif d'une hydrogénase à Ni-Fe, tiré de [43]. La nature du composé X dépend de l'état redox de la protéine.

Elles se divisent essentiellement en deux classes suivant la nature de leur site actif : les hydrogénases à Nickel-Fer et les hydrogénases à Fer seul. Ces deux classes ont un site actif relativement proche, composés de deux atomes métalliques coordonnés par des cystéines avec d'autres ligands pour le moins inhabituels car très toxiques : CO et CN⁻ [34,44] (figures 2.10 et 2.11). Ils partagent par ailleurs une architecture similaire, avec un canal amenant l'hydrogène au site actif (ou l'en évacuant) et, dans la plupart des cas, une série de centres Fer-Soufre formant une voie de transfert d'électrons entre le site actif et le partenaire redox de l'hydrogénase.

Les hydrogénases à Nickel-Fer se caractérisent par un site actif contenant un atome de fer complexé par deux CN⁻ et un CO, relié à un atome de Nickel. L'ensemble est complexé par des résidus cystéines de la protéine. Ce type d'hydrogénase se caractérise par une inhibition réversible par le monoxyde de carbone et par le dioxygène. C'est le type d'hydrogénase le mieux connu.

Le site catalytique de l'autre type d'hydrogénases ne contient que des atomes de fer comme centres métalliques. La plupart des hydrogénases à Fer seul se décomposent en deux domaines distincts [44] (voir figure 2.9) : l'un des deux contient une série de centres Fer-Soufre (généralement trois) qui permettent les échanges d'électrons avec les partenaires, et l'autre domaine contient le site actif proprement dit, nommée *H cluster*. Ce dernier est composé d'un centre [4Fe,4S] vraisemblablement impliqué dans le transfert d'électrons [44] et d'un site catalytique à deux fer contenant entre autres une molécule d'eau et des ligands CN⁻ et CO. Les hydrogénases à Fer seule sont inhibées de manière irréversible par la présence d'oxygène. Le mécanisme de la désactivation est encore peu connu, mais une chose est sûre, c'est qu'elle rend l'étude de ces hydrogénases pour le moins délicate. Ceci explique d'ailleurs en partie le fait qu'elles soient moins bien étudiées que leurs consœurs à Nickel-Fer, plus avenantes.

Les hydrogénases qui nous ont principalement intéressées au cours de cette thèse sont celles à Fer seul de *Chlamydomonas reinhardtii* [45–47]. Contrairement à la plupart des hydrogénases à fer seul, elles sont dépourvues du domaine «transfert d'électrons» et ne comportent qu'un centre Fer-Soufre et le site à deux Fer. Au moins l'une d'elle, *HydA1* est en mesure d'interagir avec la ferrédoxine de *Chlamydomonas*, ce qui lui permet d'utiliser directement les électrons à bas potentiel issus de la photosynthèse.

2.3 Que va-t-on en faire ?

Au cours de cette thèse, je me suis employé à recréer *ex-vivo* des portions de ces chaînes photosynthétiques dans des cellules électrochimiques, pour obtenir plus d'informations sur leurs interactions. Il est en effet possible dans une certaine mesure de choisir les interactions observées par électrochimie en adaptant les concentrations des partenaires.

Dans l'optique d'une étude des hydrogénases, nous avons essayé de recréer une chaîne de transport d'électrons comprenant le cytochrome c_6 , le photosystème I, la ferrédoxine et l'hydrogénase. Il a donc fallu dans un premier temps caractériser les interactions entre le cytochrome c_6 et le photosystème I, puis entre le photosystème I et la ferrédoxine, ce qui a été réalisé avec l'aide de la FNR.

Par ailleurs, des hydrogénases ont été étudiées avec un médiateur chimique, le méthylviologène, et des chaînes contenant des photosystèmes II ont été construites.

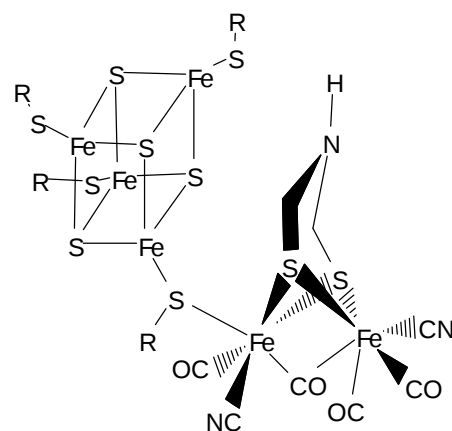


FIG. 2.11 : Site actif d'une hydrogénase à Fer seul

Chapitre

Les techniques électrochimiques

3

L'électrochimie est une discipline à l'interface entre la physique et la chimie qui s'intéresse aux échanges d'électrons. Il s'agit d'une science particulièrement ancienne puisqu'elle remonte aux travaux de Galvani et de Volta à la fin du XVIII^{ème} siècle. Depuis, l'électrochimie s'est beaucoup étendue : de la corrosion aux piles, en passant bien sûr par toutes les études cinétiques et thermodynamiques possibles avec une électrode. C'est essentiellement à ces dernières que nous allons nous intéresser dans cette thèse.

Si l'électrochimie semble être une méthode de choix pour l'étude des transferts d'électrons, elle n'a en revanche trouvé d'applications dans le domaine de la biologie que relativement récemment (les années 80). En effet, on ne savait pas auparavant échanger des électrons directement entre une électrode et une protéine rédox : la plupart des protéines rédox-actives ont des centres plus ou moins enfouis, ce qui les maintient à une distance généralement trop grande d'une électrode pour envisager un transfert direct. Il était nécessaire d'utiliser des médiateurs. Ces derniers permettent d'effectuer des titrages, et donc d'obtenir des données d'ordre thermodynamique sur une protéine (potentiels de ses centres actifs), mais ils sont généralement trop lents et peu efficaces pour l'étude des cinétiques de transferts d'électrons. Par ailleurs, comme nous le verrons au chapitre suivant, les protéines ne sont dans l'ensemble pas particulièrement coopératives quand elles sont placées au voisinage d'une grande surface de métal nu [48].

Depuis les années 80, le nombre de publications faisant état de mesures électrochimiques impliquant des protéines ne cesse d'augmenter. Certains groupes privilégient des interactions via des médiateurs avec des systèmes catalytiques [49–51], dans le but de créer par exemple des capteurs [52, 53]. D'autres utilisent divers types d'électrodes pour obtenir un transfert direct : des électrodes de graphite pyrolytique, sur lesquelles certaines protéines peuvent s'adsorber dans un état autorisant des transferts d'électrons rapides avec l'électrode [54–60], des électrodes d'or fonctionnalisées (ou non [61, 62]) propices aux transferts directs [63–65] et aux immobilisations [56, 66–68].

Ces techniques ont été exploitées dans le domaine des bio-capteurs [51, 52, 69–72], c'est-à-dire des capteurs tirant parti de la rapidité et de la spécificité d'enzymes, dans l'élucidation de questions fondamentales sur les transferts d'électrons [54, 66, 73–79], dans la compréhension des mécanismes sous-jacents des systèmes enzymatiques rédox [?, 55, 57, 80–82] voire dans l'étude de systèmes modèles de physique statistique [83].

Nous allons dans ce chapitre aborder quelques notions de théorie de l'électrochimie qui seront particulièrement utiles par la suite¹. Il ne couvre pas toute la théorie nécessaire aux développements ultérieurs, mais il constitue ce que l'on doit savoir de la voltamétrie cyclique. Les autres aspects théoriques seront exposés au fur et à mesure de l'avancement dans cette thèse.

¹Je tiens à préciser que je n'ai pas utilisé les notations usuelles dans ce chapitre : j'ai tenu à retrouver les résultats présentés ici, et pour me rendre la tâche plus facile, j'ai préféré recourir à mes propres notations.

3.1 Interactions molécule/électrode

Toute méthode électrochimique repose sur la réaction d'une ou plusieurs espèces électroactives avec une électrode. Pour comprendre les phénomènes observés dans une cellule électrochimique, il est important de comprendre ce qui se passe aux électrodes et dans leur voisinage.

Remarquons d'abord que l'échange d'électron d'une espèce avec une électrode n'est pas un processus instantané. Comme toute réaction chimique classique, elle obéit aux lois de la cinétique chimique. Considérons l'échange d'un électron² d'une espèce oxydée O avec une électrode pour devenir une espèce réduite R :



Cette réaction a lieu uniquement sur l'électrode, ou plutôt dans son voisinage immédiat. Les constantes k_f et k_b qui apparaissent sont les pendants pour les réactions hétérogènes des constantes cinétiques classiques des réactions homogènes. De la sorte, on peut dire que la quantité de R produite par unité de temps et de surface est :

$$v_R = k_f [O] - k_b [R] \quad (3.2)$$

Théoriquement, les concentrations des réactions précédentes devraient être des concentrations surfaciques. Cependant, puisque l'épaisseur de la couche considérée n'est pas susceptible de dépendre du temps, on peut la factoriser dans les constantes et utiliser les concentrations volumiques, prises au voisinage immédiat de l'électrode. De ce fait, les constantes k_f et k_b s'expriment en cm.s^{-1} . La quantité v_R est aussi exactement le nombre d'électrons que l'électrode doit fournir au système par unité de surface et de temps ; on en déduit le courant surfacique j qui traverse l'électrode en direction de la solution :

$$j = -\mathcal{F} v_R = -\mathcal{F} (k_f [O] - k_b [R]) \quad (3.3)$$

où $\mathcal{F}$ est la constante de Faraday. Par ailleurs, les concentrations à l'équilibre doivent obéir à la loi de Nernst, soit

$$\frac{[O]}{[R]} = \exp [f (E - E_0)] \quad (3.4)$$

où E est le potentiel de l'électrode, E_0 le potentiel du couple O/R et $f = \frac{\mathcal{F}}{RT}$. Si l'on suppose qu'il n'y a pas de dissymétrie entre les deux constantes k_f et k_b , elles doivent avoir la forme suivante :

$$k_f = k_s \exp \left[\frac{f (E_0 - E)}{2} \right] \quad \text{et} \quad k_b = k_s \exp \left[\frac{f (E - E_0)}{2} \right] \quad (3.5)$$

où k_s est une constante qui ne dépend que de la nature des réactifs et de l'électrode, et qui est donc caractéristique de la cinétique de l'électrochimie d'un couple sur une électrode donnée.

En vérité, les transferts ne sont pas toujours symétriques ; une étude plus poussée, connue sous le nom du modèle de Butler-Volmer [84, chap. 3], qui s'intéresse à l'état de transition de la réaction (3.1) donne

$$k_f = k_s \exp [-\alpha f (E - E_0)] \quad \text{et} \quad k_b = k_s \exp [(1 - \alpha) f (E - E_0)] \quad (3.6)$$

où α est un paramètre qui dépend des profils énergétiques au voisinage de l'état de transition et qui caractérise la symétrie de ce dernier. On retrouve les équations (3.5) pour $\alpha = \frac{1}{2}$.

²On se restreint ici au cas d'un électron car c'est le seul dont on aura besoin au long de cette thèse ; il est relativement facile de généraliser à un système quelconque.

Notons que les équations précédentes fixent une limite au courant qui peut être débité pour la réduction de O à une électrode de surface S maintenue au potentiel E :

$$I_{\text{red. max.}} = S k_f [O] = S [O] k_s \exp [-\alpha f (E - E_0)] \quad (3.7)$$

Ceci peut d'ailleurs être exploité pour estimer k_s .

3.2 Les échelons de potentiel

Maintenant que l'on a une meilleure idée de ce qu'il se passe à l'électrode, on peut aborder ce qu'il se passe à son voisinage dans la solution. Le phénomène le plus simple est celui des «échelons de potentiel» : on change brusquement le potentiel appliqué à l'électrode et on mesure le courant qui en résulte. Nous allons supposer que les phénomènes sont unidimensionnels selon un axe (Ox). Ceci revient à supposer que la taille caractéristique de l'électrode est bien supérieure à la taille de la couche de diffusion³.

Commençons par relier le courant surfacique j mesuré à l'électrode aux profils de concentration. Le flux net des molécules de O à l'électrode est nécessairement converti en molécules de R par la réaction (3.1). Cette quantité est donnée par la loi de Fick :

$$n_O = D_O \left. \frac{\partial [O]}{\partial x} \right|_{x=0} \quad (3.8)$$

où D_O est le coefficient de diffusion de l'espèce O et n_O s'exprime par unité de surface et de temps. On peut en déduire j , le courant surfacique, puisque chaque espèce de O convertie enlève un électron de l'électrode :

$$j = -\mathcal{F} D_O \left. \frac{\partial [O]}{\partial x} \right|_{x=0} \quad (3.9)$$

Les concentrations de R et O sont alors régies par les équations de diffusion suivantes :

$$\frac{\partial [O]}{\partial t} = D_O \frac{\partial^2 [O]}{\partial x^2} \quad (3.10)$$

$$\frac{\partial [R]}{\partial t} = D_R \frac{\partial^2 [R]}{\partial x^2} \quad (3.11)$$

Loin de l'électrode, le système n'est pas affecté par sa présence. On a donc à chaque instant

$$\lim_{x \rightarrow \infty} [O] = [O]_{t=0} \quad \text{et} \quad \lim_{x \rightarrow \infty} [R] = [R]_{t=0} \quad (3.12)$$

La dernière condition aux limites est fournie par l'égalité entre le courant donné par les considérations cinétiques (3.3) et par les lois de la diffusion (3.9) :

$$D_O \left. \frac{\partial [O]}{\partial x} \right|_{x=0} = k_f [O]_{x=0} - k_b [R]_{x=0} \quad (3.13)$$

Pour simplifier le problème, supposons de plus que R et O ont le même coefficient de diffusion D et qu'initialement, la solution ne contient que O à la concentration uniforme C_0 . Il est alors facile de montrer qu'à tout instant et en tout point, la concentration totale de R et O est conservée :

$$[R] + [O] = C_0 \quad (3.14)$$

³Pour les travaux effectués au cours de cette thèse, cette hypothèse est tout à fait légitime. Elle ne le serait pas pour une électrode plus petite, ou pour des temps très longs. La physique des systèmes en diffusion «sphérique» est sensiblement différente.

Les équations précédentes se simplifient alors en

$$\frac{\partial [O]}{\partial t} = D \frac{\partial^2 [O]}{\partial x^2} \quad \text{avec} \quad \begin{cases} \lim_{x \rightarrow \infty} [O] = C_0 \\ D \frac{\partial [O]}{\partial x} \Big|_{x=0} = (k_f + k_b) [O]_{x=0} - k_b C_0 \end{cases} \quad (3.15)$$

Une manière de résoudre ce système est de passer en transformée de Laplace. Nommons pour p strictement positif $\tilde{O}(x, p)$ la transformée de Laplace de $[O](x, t)$:

$$\tilde{O}(x, p) = \int_{t=0}^{+\infty} [O](x, t) \exp[-tp] dt \quad (3.16)$$

Le système précédent se transforme alors en une équation différentielle ordinaire

$$p \tilde{O} = D \frac{d^2 \tilde{O}}{dx^2} + C_0 \quad \text{avec} \quad \begin{cases} \lim_{x \rightarrow \infty} \tilde{O} = \frac{C_0}{p} \\ D \frac{d\tilde{O}}{dx} \Big|_{x=0} = (k_f + k_b) \tilde{O} \Big|_{x=0} - \frac{k_b C_0}{p} \end{cases} \quad (3.17)$$

Cette dernière se résout en

$$\tilde{O} = \frac{k_b}{k_f + k_b + \sqrt{Dp}} \frac{C_0}{p} \exp\left[-\sqrt{\frac{p}{D}} x\right] + \frac{C_0}{p} \quad (3.18)$$

La transformée de Laplace de l'équation (3.9) nous permet d'aboutir à la transformée de Laplace du courant :

$$\tilde{j} = -\mathcal{F} \frac{k_b}{k_f + k_b + \sqrt{Dp}} \sqrt{\frac{D}{p}} C_0 \quad (3.19)$$

Malheureusement, sans suppositions supplémentaires, on ne peut pas repasser simplement dans le domaine temporel. Supposons d'abord que l'une ou l'autre de k_b et k_f est grand devant $\sqrt{Dp}$, c'est-à-dire que les réactions (3.1) sont beaucoup plus rapides que la diffusion. L'équation (3.1) est alors en permanence à l'équilibre, et à chaque instant la concentration des espèces à l'électrode obéit à la loi de Nernst (3.4). On dit que l'électrochimie est *réversible*. L'expression de $\tilde{j}$ se simplifie alors en :

$$\tilde{j} = -\mathcal{F} \frac{1}{1 + \exp[f(E - E_0)]} \sqrt{\frac{D}{p}} C_0 \quad (3.20)$$

On connaît la transformée inverse de l'expression précédente ; on peut donc remonter à l'expression du courant en fonction du temps :

$$j(t) = -\mathcal{F} \frac{C_0}{1 + \exp[f(E - E_0)]} \sqrt{\frac{D}{\pi t}} \quad (3.21)$$

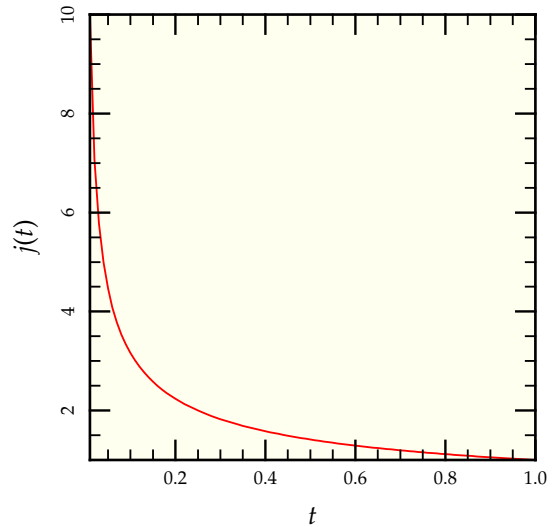


FIG. 3.1 : Courant théorique pour un échelon de potentiel dans le cas réversible. Les unités sont arbitraires.

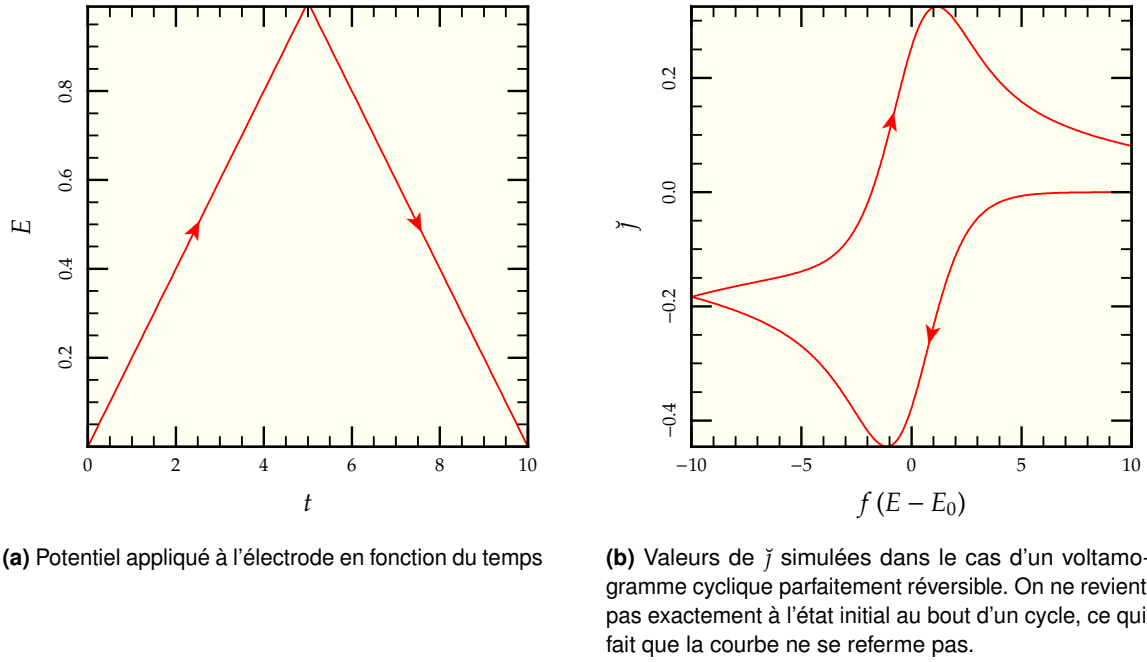


FIG. 3.2: Voltamétrie cyclique

ou encore, pour des potentiels suffisamment réducteurs

$$j(t) = -\mathcal{F} C_0 \sqrt{\frac{D}{\pi t}} \quad (3.22)$$

L'allure du courant observé est représenté figure 3.1. On aurait pu prévoir la dépendance temporelle de cette équation par un raisonnement simple. La couche explorée par la diffusion a une épaisseur de l'ordre de $\sqrt{Dt}$. En conséquence, la quantité d'électrons fourni par unité de surface de l'électrode est de l'ordre de $C_0 \sqrt{Dt}$. Le courant est la dérivée de la charge, soit $j = -\mathcal{F} C_0 \sqrt{\frac{D}{4t}}$.

On peut aussi supposer que le terme $\sqrt{Dp}$ est dominant dans l'équation (3.19). On obtient alors un courant indépendant du temps :

$$j_{\text{lim.}} = -\mathcal{F} k_b C_0 \quad (3.23)$$

C'est le cas limite où la réaction à l'électrode est cinétiquement déterminante : la diffusion est suffisamment rapide pour évacuer les espèces produites⁴.

3.3 La voltamétrie cyclique

La voltamétrie cyclique est très similaire à la technique des échelons de potentiels, si ce n'est que le potentiel appliqué à l'électrode, au lieu d'être fixe, varie au cours du temps suivant deux rampes (voir figure 3.2a)⁵. Le voltamogramme est caractérisé par la position de ses points de départ E_1 et de milieu E_2 , et par sa vitesse de balayage v (en Volt par seconde). En posant $\Delta E = E_2 - E_1$, le potentiel

⁴Notons que c'est aussi le cas pour des temps très courts, où le courant est essentiellement limité par les réactions à l'électrode.

⁵En pratique, il peut y avoir plus de deux rampes et il n'est pas nécessaire de revenir au point de départ. Cependant, le cas de deux rampes symétriques permet déjà de montrer toute la richesse de la technique de mesure.

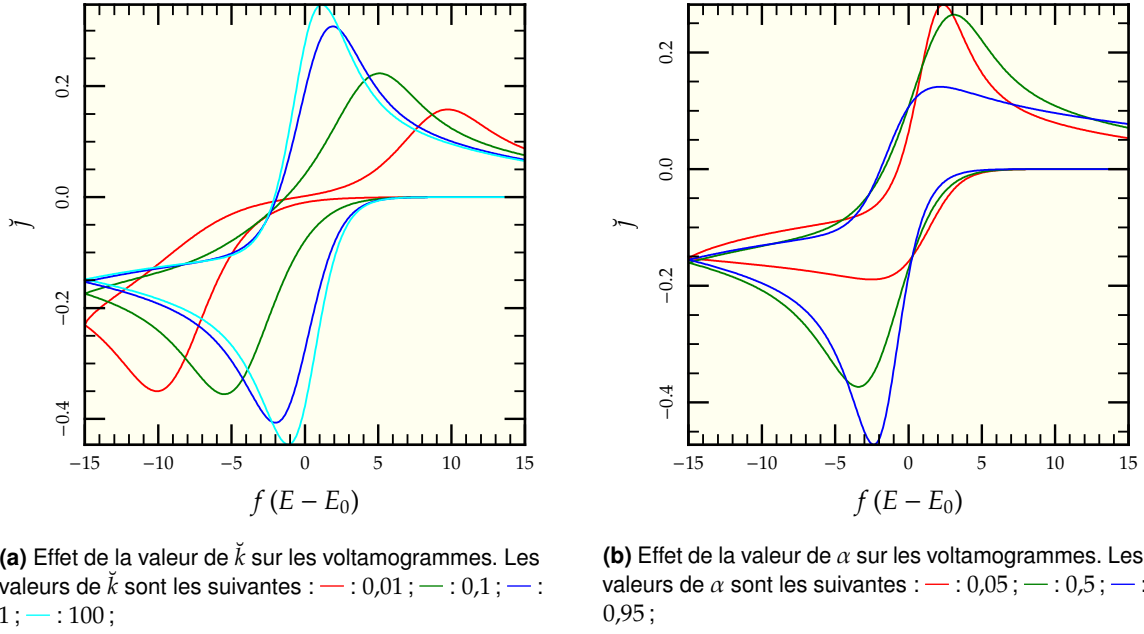


FIG. 3.3: Exemples de voltammogrammes dans le cas non-réversible

s'exprime :

$$E(t) = \begin{cases} E_1 + vt & \text{pour } 0 < t < t_m = \left| \frac{\Delta E}{v} \right| \\ E_2 - v(t - t_m) & \text{pour } t_m < t < 2t_m \end{cases} \quad (3.24)$$

Le système d'équations (3.15) est toujours valable, si ce n'est que maintenant, k_f et k_b dépendent du temps.

3.3.1 Le cas réversible

On va dans un premier temps s'intéresser au cas parfaitement réversible, où à chaque instant la réaction (3.1) est à l'équilibre. Le système (3.15) s'écrit alors

$$\frac{\partial [O]}{\partial t} = D \frac{\partial^2 [O]}{\partial x^2} \quad \text{avec} \quad \begin{cases} \lim_{x \rightarrow \infty} [O] = C_0 \\ [O]|_{x=0} = \frac{C_0}{1 + \Gamma(t)} \end{cases} \quad (3.25)$$

avec

$$\Gamma(t) = \exp(f[E_0 - E(t)]) \quad (3.26)$$

Le système a une unité de temps naturelle, $\tau = (fv)^{-1}$. On peut s'en servir pour trouver une unité de distance naturelle, $\lambda = \sqrt{D\tau}$. Par ailleurs, C_0 est une unité naturelle pour les concentrations. En posant $x = \lambda \tilde{x}$, $t = \tau \tilde{t}$ et $[O] = C_0 c$, on peut récrire le système précédent en termes adimensionnés :

$$\frac{\partial c}{\partial \tilde{t}} = \frac{\partial^2 c}{\partial \tilde{x}^2} \quad \text{avec} \quad \begin{cases} \lim_{\tilde{x} \rightarrow \infty} c = 1 \\ c(x=0) = \frac{1}{1 + \Gamma(\tilde{t})} \end{cases} \quad (3.27)$$

Il est intéressant de remarquer le choix de $\tilde{t}$ a fait disparaître la dépendance en v de $\Gamma(\tilde{t})$: ce dernier ne dépend plus que de la position relative de E_1 et E_2 par rapport au potentiel E_0 , exprimés

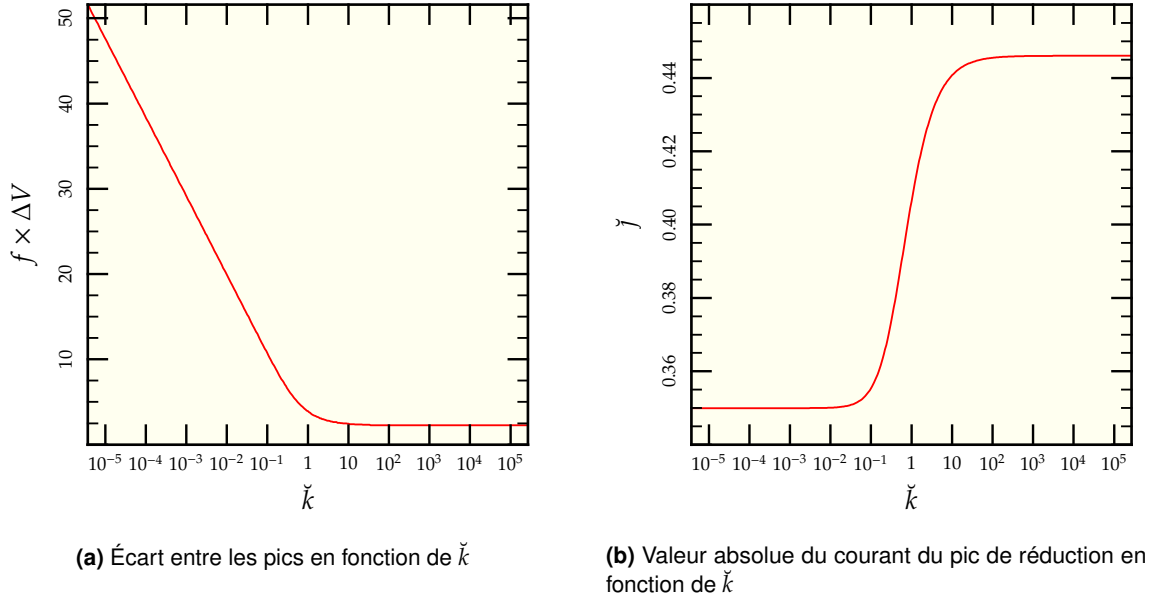


FIG. 3.4: Résultat des simulations

en termes de f^{-1} . Il en va de même pour la solution du système précédent, et donc pour le courant adimensionné suivant :

$$\tilde{j}(\tilde{t}) = \left. \frac{\partial c}{\partial \tilde{x}} \right|_{\tilde{x}=0} \quad (3.28)$$

On peut alors remonter à la densité de courant mesurée

$$j(t) = \mathcal{F} C_0 \frac{\lambda \tilde{j}}{\tau} = -\mathcal{F} C_0 \sqrt{f v D} \tilde{j}(f v t) \quad (3.29)$$

Ce résultat est important, car il prédit la dépendance du courant en fonction de v pour des voltamogrammes entre les mêmes bornes.

Il n'est pas possible d'aboutir à une expression analytique pour $\tilde{j}$ [85]; en revanche, des techniques de simulation numériques ont été développées [86–88]. Elles aboutissent à l'allure de $\tilde{j}$ représentée figure 3.2b. Ce qu'il est important de remarquer, c'est que $\tilde{j}$ présente deux pics symétriques autour du potentiel E_0 distants systématiquement de $2,24 f^{-1}$, soit environ 57 mV à température ambiante (295 K). C'est une caractéristique des conditions d'électrochimie réversibles. Par ailleurs, les simulations permettent d'obtenir la valeur exacte du courant du pic de réduction :

$$j_{\text{réd.}} = -0,446 \times \mathcal{F} C_0 \sqrt{f v D} \quad (3.30)$$

3.3.2 Autres cas

Pour les cas où il faut tenir compte des constantes de réaction à l'électrode, il n'est pas possible d'effectuer un raisonnement semblable à celui qui a mené à (3.29). Il est nécessaire de faire des simulations pour connaître les allures des courbes. Un petit programme en Ruby⁶ a été utilisé pour réaliser des simulations pour différentes valeurs de la constante de vitesse adimensionnée

$$\tilde{k} = \frac{k_s \tau}{\lambda} = \frac{k_s}{\sqrt{f v D}} \quad (3.31)$$

⁶Voir page 87 en annexe pour le code du programme et quelques explications.

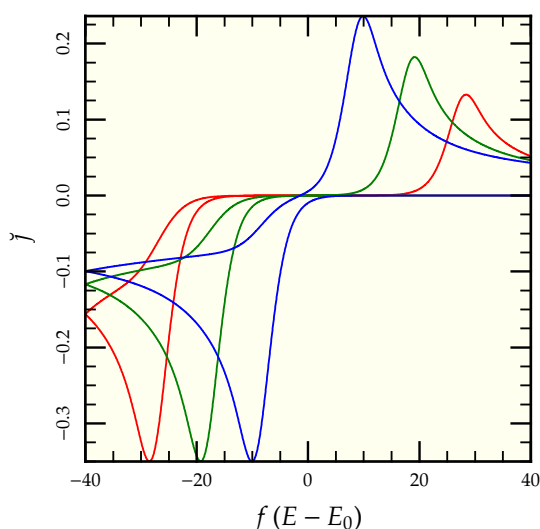


FIG. 3.5: Quelques voltammogrammes pour de très faibles valeurs de $\tilde{k}$: 10^{-2} pour —, 10^{-4} pour — et 10^{-6} pour —.

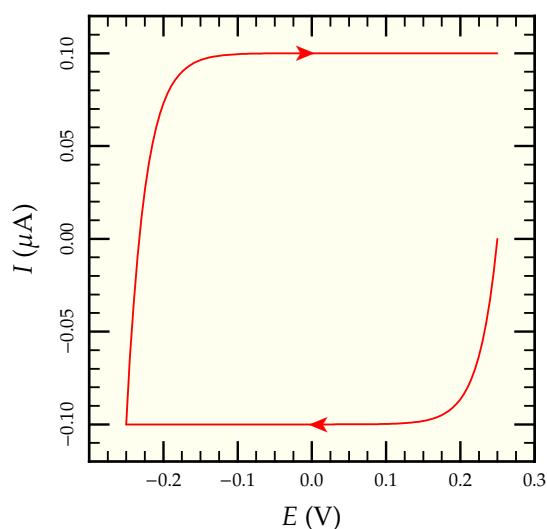


FIG. 3.6: Ligne de base d'une électrode, pour $C_{\text{éq}} = 1 \mu\text{F}$, $v = 100 \text{ mV.s}^{-1}$ et $R_{\text{éq}} = 250 \text{ k}\Omega$ (exagérée pour que l'effet soit visible).

La figure 3.3a montre l'effet du paramètre $\tilde{k}$: on voit que plus il est petit, plus les pics ont tendance à s'écarter, alors qu'ils se rapprochent du cas parfaitement réversible dans le cas où $\tilde{k}$ est grand. La figure 3.3b montre l'effet de α (voir équation (3.6)) sur la symétrie des voltammogrammes observés : pour $\alpha = 1/2$, les voltammogrammes sont parfaitement symétriques alors que dans les cas où α est proche de 0 ou de 1, un côté seulement ressemble à un voltammogramme réversible tandis que l'autre est beaucoup plus aplati.

Par ailleurs, un calcul systématique de l'écart entre les pics en fonction de $\tilde{k}$ a été réalisé. Les résultats sont donnés dans la figure 3.4a. En outre, la figure 3.4b montre la valeur absolue du pic de réduction en fonction de $\tilde{k}$. On pourrait être surpris que la valeur des pics atteigne un plateau pour les faibles valeurs de $\tilde{k}$, mais cela n'a rien d'étonnant car les constantes cinétiques dépendent exponentiellement du surpotentiel, c'est-à-dire du potentiel appliqué en sus du potentiel du couple considéré. De la sorte, si le balayage est effectué sur une gamme de potentiel suffisamment grande, on peut toujours trouver un potentiel où k_f ou k_b devient suffisamment important pour donner un pic relativement bien défini. On peut s'en convaincre en regardant la figure 3.5 qui montre plusieurs voltammogrammes pour différentes valeurs de $\tilde{k}$, toutes très petites devant 1. Les pics de réduction ont tous la même amplitude, par contre leurs positions respectives sont décalées.

Notons pour finir que d'autres types de techniques, comme l'utilisation d'électrodes rotatives, permettent de s'affranchir dans une certaine mesure des limitations liées aux phénomènes de transports de masse. Ces techniques n'ont pas été utilisées au cours de cette thèse.

3.4 Quelques aspects pratiques

Maintenant que l'on connaît la réponse purement électrochimique d'une cellule électrochimique à diverses variations du potentiel, il est intéressant de se pencher sur ce que l'on mesure en pratique, et comment on y parvient.

3.4.1 Courants non-faradiques et double couche

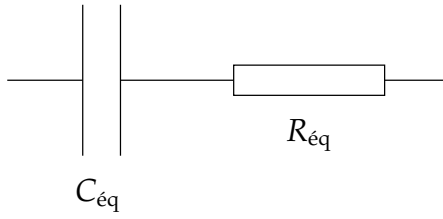


FIG. 3.7: Schéma électrique équivalent d'une électrode

Dans le cas d'un échelon de potentiel, il est facile de calculer le courant observé. Si l'on note ΔE la valeur de l'échelon, on a

$$i(t) = \frac{\Delta E}{R_{\text{éq}}} \exp \left[-\frac{t}{R_{\text{éq}} C_{\text{éq}}} \right] \quad (3.32)$$

Pour le cas des voltamogrammes cycliques, le courant n'est guère plus compliqué ; en notant v la vitesse de balayage du voltamogramme, et t_m le temps où l'on change le sens du balayage, on a

$$i(t) = \begin{cases} -C_{\text{éq}} v \left(1 - \exp \left[-\frac{t}{R_{\text{éq}} C_{\text{éq}}} \right] \right) & \text{pour la partie décroissante} \\ C_{\text{éq}} v \left(1 - 2 \exp \left[-\frac{t - t_m}{R_{\text{éq}} C_{\text{éq}}} \right] \right) & \text{pour la partie croissante} \end{cases} \quad (3.33)$$

L'allure des courbes observées est donnée dans la figure 3.6. Notons que dans le cas d'un voltamogramme cyclique, si le temps caractéristique du circuit RC équivalent est faible devant la durée du voltamogramme, la réponse est essentiellement un rectangle d'épaisseur $2 C_{\text{éq}} v$; une telle réponse d'une électrode réelle est le signe d'un bon état de surface.

En réalité, l'interface électrode/électrolyte, que l'on appelle «double couche» est beaucoup plus complexe. En particulier, sa capacité dépend du potentiel appliqué. Cependant, cette modélisation simpliste permet de rendre compte dans une certaine mesure des phénomènes observés.

Une technique appelée spectrométrie d'impédance électrochimique permet entre autres de mesurer divers paramètres liés à la double couche. Elle consiste simplement à mesurer la réponse de l'électrode à une excitation sinusoïdale dans le temps. Les données mesurées permettent de tracer le diagramme de Bode de l'électrode. Cette technique se révèle particulièrement utile dans le cas des modifications de surface, puisqu'elle permet de suivre les variations de la capacité de l'électrode qui dépend dans une certaine mesure de ce qui est adsorbé à sa surface [68, 89, 90].

Pour comprendre cette relation, nous allons modéliser de manière simpliste une double couche. Le comportement capacitif d'une interface électrode-liquide vient du fait que les charges présentes sur la surface de l'électrode sont contrebalancées par des ions s'approchant de l'électrode. Ceux-ci ne peuvent pas s'approcher arbitrairement près de l'électrode : ils sont gênés par leur propre taille, leur sphère de solvation et les différentes espèces potentiellement adsorbées sur l'électrode. Notons λ la distance minimale à laquelle ces ions peuvent s'approcher. Nous allons supposer que la double couche est assimilable à un condensateur plan infini dont les plaques sont séparées de λ . Ceci donne une capacité surfacique

$$C = \frac{\epsilon_0 \epsilon_r}{\lambda} \quad (3.34)$$

La valeur précise de ϵ_r est délicate à choisir : comme il s'agit d'une quantité obtenue sur des éléments mésoscopiques, il est difficile d'étendre le concept à des échelles de dimensions aussi faibles. Les valeurs mesurées en solution suggèrent plutôt que ϵ_r est proche de la valeur pour l'eau, vers 80.

L'utilisation de molécules adsorbées a tendance à diminuer fortement cette valeur. Notons que cette relation est particulièrement simpliste ; les mesures expérimentales montrent que la capacité dépend du matériau employé pour l'électrode, de la salinité, de la nature des ions présents en solution, du potentiel appliqué... Cependant, elle permet de comprendre et d'interpréter les phénomènes observés en termes simples ; c'est à ceci qu'elle nous servira.

3.4.2 Montage électrochimique

Toutes les mesures électrochimiques doivent être conduites dans des milieux conducteurs, appelés électrolytes. Pour les mesures conduites en milieux aqueux, n'importe quelle solution contenant au moins quelques millimolaires de sel fait l'affaire. En général, le choix de l'électrolyte est essentiellement fixé par les molécules que l'on souhaite observer. Notons qu'il a une influence considérable sur les mesures de spectrométrie d'impédance électrochimique, du moins pour les faibles salinités. Pour s'en affranchir, toutes les mesures ont été effectuées dans un électrolyte à force ionique importante (0,4 M Na_2SO_4).

Nous avons utilisé jusqu'à présent des potentiels sans vraiment définir leur point de référence. Ils sont définis par rapport à l'électrode standard à hydrogène. On les mesure en pratique par rapport à des électrodes de référence dont le potentiel est fixe⁷. Or, ces références cessent d'être fiables dès lors qu'un courant important passe au travers. Elles ne peuvent donc pas être utilisées pour fermer le circuit électrique et ramener les électrons dans la solution.

On utilise dans ce but un montage comportant trois électrodes :

- l'électrode de travail, celle qui nous intéresse ;
- l'électrode de référence, pour connaître le potentiel absolu appliqué à l'électrode de travail ;
- la contre-électrode, qui sert fermer.

L'ensemble est commandé par un potentiostat. Ce dernier comporte une boucle d'asservissement qui ajuste la différence de potentiel entre l'électrode de travail et la contre-électrode jusqu'à ce que le potentiel de l'électrode de travail mesuré par rapport à l'électrode de référence soit celui requis. En théorie, ce type de montage autorise n'importe quelle électrode comme contre-électrode. En pratique, pour éviter au maximum de perturber le système étudié, on utilise une électrode en platine de surface importante. La grande réactivité du platine garantit que le potentiel de la contre-électrode reste dans des gammes raisonnables.

En l'absence d'autres indications, l'électrode de référence utilisée pour les mesures électrochimiques est une électrode au calomel (dans du KCl saturé), notée SCE en abrégé. Son potentiel par rapport à l'électrode standard à hydrogène est $E_0 = +0,241$ V à 25°C. Quand l'électrode au calomel saturée était trop volumineuse pour être employée, une électrode de référence de type Ag/AgCl a été utilisée. Cette dernière a un potentiel standard de $E_0 = +0,195$ V.

⁷En général, pour les électrodes de références utilisées en milieux aqueux, ils ne dépendent que de la température.

Deuxième partie

Des transferts d'électrons

Chapitre

Du potentiostat au cytochrome c_6

4

Avant d'être en mesure d'explorer les interactions du cytochrome c_6 avec ses partenaires, il faut d'abord s'assurer que l'on peut échanger des électrons avec le c_6 dans de bonnes conditions. Nous allons voir dans ce chapitre quelles électrodes ont été employées, la manière de les fabriquer, et comment on aboutit à de bonnes conditions pour l'électrochimie du cytochrome c_6 sur ces électrodes.

4.1 Électrodes

L'électrode est l'outil fondamental de l'électrochimiste. Schématiquement, la plupart des limitations rencontrées lors d'une mesure électrochimique sont dues à l'électrode de travail choisie. Suivant son type, certaines molécules électroactives réagiront de manière différente. De plus, les réactions de l'électrode avec l'électrolyte imposent des limites à la gamme de potentiel utilisable. Ainsi, les électrodes de platine sont utilisables sur une gamme de potentiel assez réduite puisqu'elles sont en général très réactives. De plus, la matière utilisée pour faire l'électrode est importante quand il s'agit de modifier chimiquement l'électrode : tous les métaux¹ n'offrent pas les mêmes possibilités de fonctionnalisation.

Nous avons choisi de travailler essentiellement avec des électrodes d'or. Celles-ci offrent une gamme de potentiel raisonnable (environ de $-0,2$ V à $+0,5$ V par rapport au calomel saturé sans précautions particulières, plus large en prenant soin de dégazer et d'exclure tous les ions susceptibles de complexer les oxydes d'or, comme les ions chlorure) et des possibilités étendues de modifications chimiques au moyen de monocouches autoassemblées². Le type principal que nous avons utilisé est ce que j'appellerai une «électrode à feuille collée»³, où la surface électroactive est une feuille d'or collée sur un support. Nous allons voir rapidement comment fabriquer ces électrodes et quelles sont leurs caractéristiques.

4.1.1 Fabrication des électrodes à feuille collée

Dans les électrodes à feuille collée, la partie électroactive est une mince feuille d'or (2 microns d'épaisseur en moyenne) collée au moyen de deux colles différentes sur un support constitué d'une tige en inox fixée à l'intérieur d'un tube en verre (figure 4.1).

Les feuilles d'or sont fabriquées par évaporation sous vide. Plus de détails sont disponibles dans l'annexe B.1.4, page 94. Pour fabriquer les supports, on colle une tige de métal d'environ 1 millimètre de diamètre à l'intérieur d'un tube en verre de 3 millimètres de diamètre extérieur, à l'aide d'un adhésif structural. Les électrodes sont obtenues par collage sur un support d'une feuille d'or avec d'une part une colle conductrice (colle à l'argent) et d'autre part un adhésif structural (l'araldite,

¹Ou alliages conducteurs ou semi-conducteurs.

²*Self assembled monolayer*, S.A.M. pour le restant de ce document.

³En attente d'un meilleur nom...

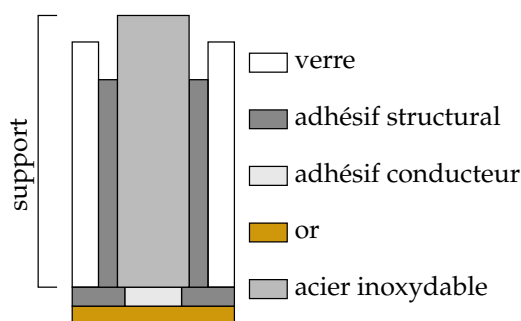


FIG. 4.1: Schéma d'une électrode. Les échelles ne sont pas respectées. La feuille d'or mesure environ 2 μm d'épaisseur et le support environ 15 centimètre de long. Il est difficile d'évaluer l'épaisseur de la colle, mais elle est vraisemblablement de l'ordre du dixième de millimètre.



FIG. 4.2: Une électrode à feuille collée

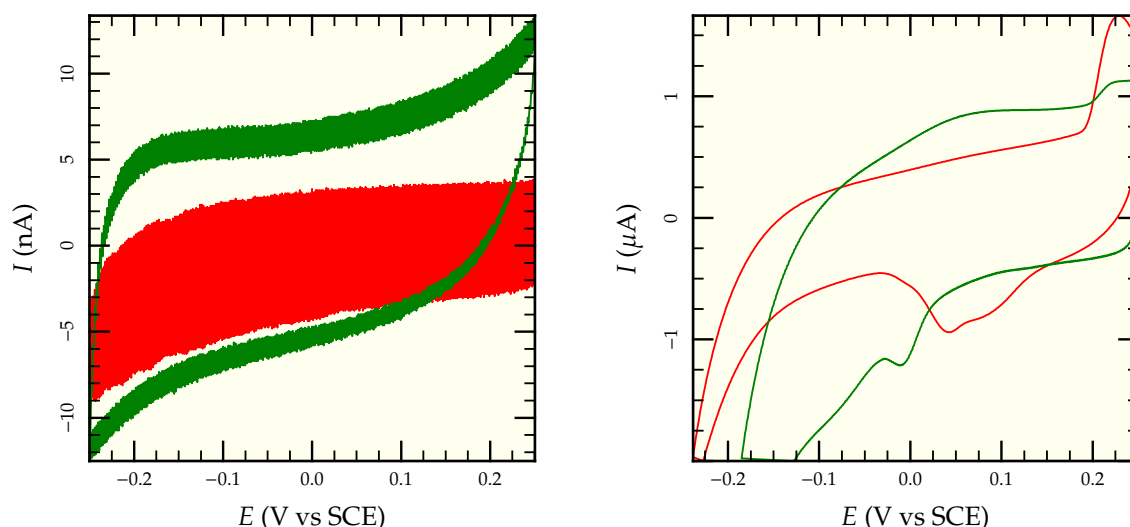
voir page 93 pour les références exactes et la préparation). Les détails de la préparation ont été laissés en annexe (B.1.5, page 95). La figure 4.2 montre l'allure d'une électrode prête à l'emploi.

Comme on a pu le constater en annexe, la fabrication de ces électrodes requiert un peu de doigté et d'habitude. En particulier, il est très important de doser correctement les différentes colles. S'il n'y a pas assez de colle à l'argent, elle est noyée dans l'araldite et perd ses effets conducteurs : la surface d'or n'est plus reliée à la tige en inox et l'électrode est complètement inutilisable (figure 4.3a). Inversement, s'il y a trop de colle à l'argent, elle peut atteindre les bords de l'électrode et rentrer en contact avec la solution. Elle est très électroactive et donne des pics importants sur les voltamogrammes (figure 4.3b), ce qui rend l'électrode inutilisable. C'est pourquoi il faut systématiquement tester les électrodes avec un voltamogramme cyclique entre 0,25 V et -0,25 V (par rapport au calomel) avant de les utiliser. On peut ainsi éliminer celles présentant un défaut (figure 4.3).

Les rendements de fabrication des électrodes sont très variables : dans certaines séries, 90 à 100% électrodes fonctionnent parfaitement ; d'autres donnent des électrodes qui semblent fonctionner puis finissent par perdre leurs contacts au bout de quelques heures ou bien donnent des signaux d'argent. Certaines séries enfin ne donnent que très peu d'électrodes utilisables, voire aucune. Pour essayer de comprendre l'influence de la position et de la quantité des colles sur la qualité d'une électrode, une étude systématique a été réalisée : pour environ 300 électrodes, une photo de la répartition des colles a été prise avant l'application des feuilles d'or. Quelques exemples sont représentés figure 4.4. Si cette étude a permis de dégager quelques mauvais cas, elle n'a pas en revanche permis de déterminer ce qui fait qu'une électrode est bonne, et ce pour plusieurs raisons : sans un gros investissement en construction d'algorithme de traitement des images, il n'est pas possible d'utiliser un ordinateur pour analyser les photo prises : on doit se contenter d'observations purement visuelles qui ont leurs limites. De plus, des électrodes avec des aspects particulièrement similaires n'ont pas systématiquement les mêmes résultats (ce qui est bien mis en évidence sur la figure 4.4). Cette étude ne peut pas en outre prendre en compte d'autres facteurs, sûrement aussi importants dans le succès d'une électrode, comme

- l'état des différentes colles (leur âge, la manière de les mélanger, la température ambiante) ;
- les conditions de séchage (en particulier la température et la durée) ;
- la manière d'appliquer la feuille d'or sur l'électrode ;
- la manière de découper la feuille d'or après application.

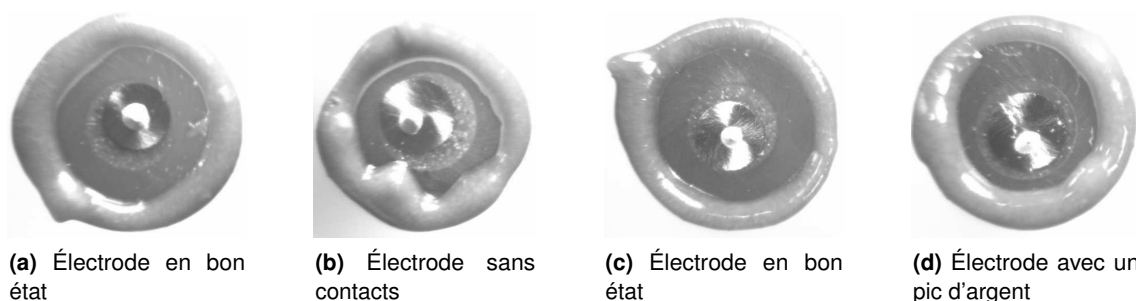
Ces deux derniers facteurs sont absolument inquantifiables, ce qui rend toute étude statistique impossible ou en tous cas très partielle. En conclusion, il a été nécessaire de préparer des quantités importantes d'électrodes avant chaque expérience.



(a) Quelques électrodes sans contacts. Les courants observés sont beaucoup trop faibles (quelques nA).

(b) Pics de l'argent sur différentes électrodes.

FIG. 4.3: Mauvaises électrodes



(a) Électrode en bon état

(b) Électrode sans contacts

(c) Électrode en bon état

(d) Électrode avec un pic d'argent

FIG. 4.4: Photos d'électrodes avant application de la feuille d'or. On peut facilement comprendre pourquoi leur interprétation n'est pas simple...

4.1.2 Caractérisation des électrodes

Pourquoi utiliser de telles électrodes alors qu'elles sont si délicates à fabriquer ? C'est la question à laquelle nous allons maintenant essayer de répondre.

Remarquons d'abord que la surface géométrique des électrodes est relativement bien connue : la surface de l'or est exactement celle de la section d'un tube⁴. Les tubes ont un diamètre $D = 3,0 \pm 0,1$ mm, ce qui donne une surface de $S = 7,1 \pm 0,5$ mm², soit une variation de l'ordre de 7%.

Voltamétrie et impédance

Nous avons vu que la manière la plus directe de caractériser une électrode est de mesurer un simple voltamogramme entre 0,25 V et -0,25 V par rapport au calomel saturé, puisque c'est la manière utilisée pour détecter les mauvaises électrodes. Quelques-uns de ces voltamogrammes sont représentés sur la figure 4.5a. On peut voir que les voltamogrammes observés sont relativement proches de la courbe théorique prédite dans le cas d'une double couche simplifiée (figure 3.6). Une différence notable cependant est la pente importante qui apparaît pour les potentiels faibles à partir d'environ -100 mV par rapport au calomel saturé due à la présence d'oxygène dissous dans

⁴À condition que le polissage ait été effectué de manière perpendiculaire, avec une tolérance raisonnable vu que l'écart de surface est proportionnel au carré de l'angle d'inclinaison.

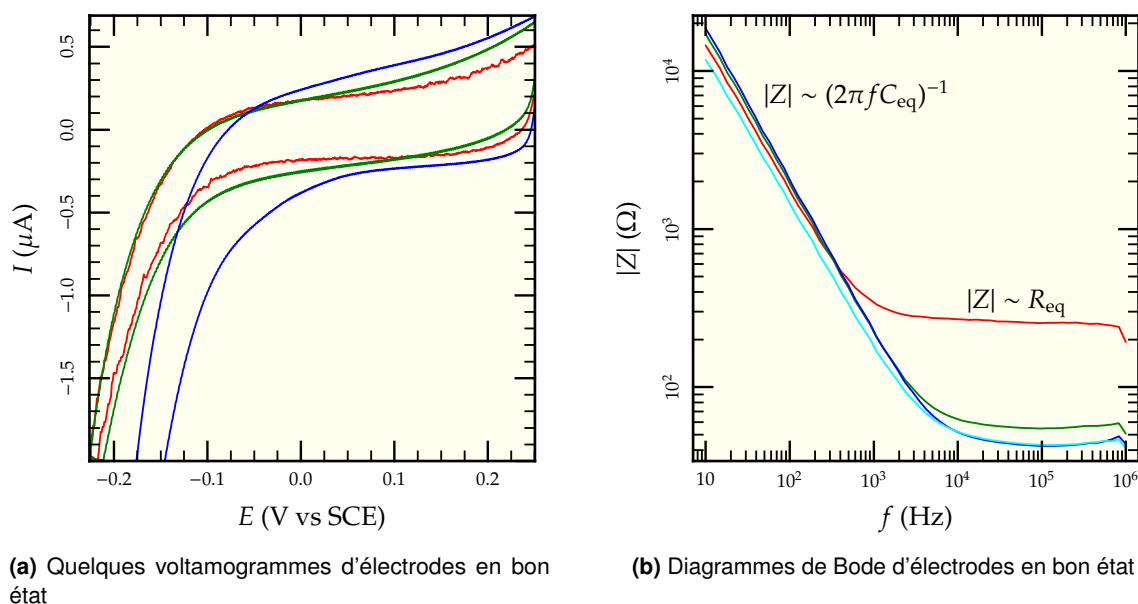


FIG. 4.5: Caractéristiques de base d'une électrode saine.

la solution. En effet, à ces potentiels, la réduction de l'oxygène à l'électrode commence à devenir efficace et l'on observe un «mur» de courant.

On peut caractériser un peu mieux l'électrode en utilisant la spectrométrie d'impédance électrochimique⁵. Quelques diagrammes de Bode d'électrodes sont montrés sur la figure 4.5b. On peut voir sur les diagrammes que, si les résistances équivalentes (partie horizontale du diagramme de Bode) sont très variables, les capacités équivalentes (partie oblique) sont beaucoup plus homogènes. Ceci se comprend dans le sens où la résistance équivalente dépend de beaucoup de paramètres, comme la qualité de la colle à l'argent, la manière dont elle a été répartie, la qualité des autres contacts⁶, alors que la capacité équivalente dépend uniquement des caractéristiques de la surface : la propreté, l'état cristallin, les diverses impuretés adsorbées, et surtout la rugosité⁷ ; ces dernières sont sensiblement moins sujettes à variations. La résistance équivalente est généralement comprise entre 40 Ω et 250 Ω. La capacité de l'électrode est comprise entre 0,75 μF et 1,3 μF, soit une capacité surfacique entre 11,4 μF.cm⁻² et 18,5 μF.cm⁻² : l'écart de surface géométrique des électrode ne suffit pas à expliquer ces variations. La présence de contaminants divers et les différences de rugosité d'une électrode à une autre pourraient en être à l'origine.

État de la surface et propreté

Les caractérisations précédentes, si elles sont parfaitement suffisantes pour l'utilisation courante des électrodes, ne sont en revanche pas particulièrement informatives sur l'état de leur surface. Une excellente manière d'obtenir plus d'informations, et accessoirement une méthode couramment utilisée pour nettoyer des surfaces d'or, est d'effectuer une série de cycles entre 0 V et environ 1,43 V par rapport au calomel saturé dans de l'acide sulfurique d'une grande pureté⁸ dilué dans

⁵Encore que, dans le cas présent, ce dernier qualificatif soit un tantinet usurpé puisqu'il n'y a pas de transferts d'électrons à travers la surface.

⁶Heureusement, ceux-ci n'ont que peu d'influence.

⁷La double couche est typiquement de l'ordre du nanomètre, voire plus petite : la capacité dépend donc de la rugosité de l'électrode, à l'opposé de la plupart des autres propriétés électrochimiques étudiées dans cette thèse, qui elles ne sont pas sensibles à des détails aussi fins sur la surface.

⁸L'acide sulfurique utilisé est certifié pur à 10⁻⁵ ; il est très important d'éviter toute contamination avec des ions chlorure, car ce sont des excellents complexants de l'or et ils faussent tous les résultats en permettant sa dissolution à des potentiels plus bas.

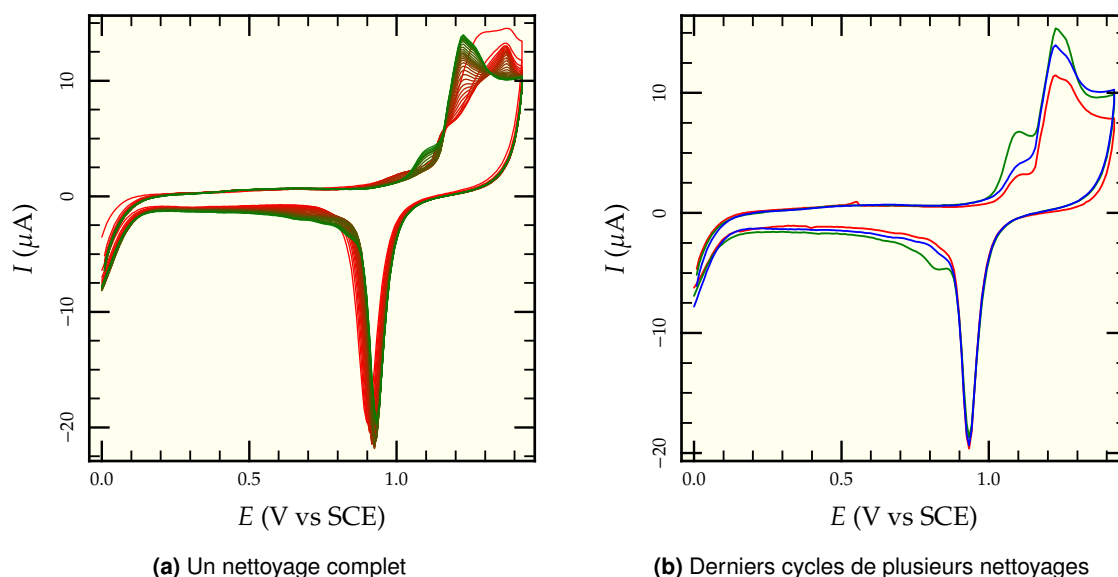


FIG. 4.6: Analyse de l'état des électrodes par voltamétrie cyclique dans 0,5 M d'acide sulfurique. Vitesse de balayage : 50 mV.s^{-1}

de l'eau. Une série de voltamogrammes est représentée figure 4.6a. On peut voir que l'allure des voltamogrammes évolue entre le premier cycle (—) et le dernier (—) : le pic sans forme observé au début vers 1,3 V se mue progressivement en une série de pics bien définis à des potentiels plus faibles. Les pics observés correspondent à la formation d'oxydes surfaciques d'or. La présence d'impuretés se traduit par une couche bloquante qui gêne l'oxydation et donne lieu au pic informe. Le pic de réduction vers 0,9 V correspond à la réduction de ces oxydes. Des cycles successifs d'oxydation/réduction permettent de décoller la couche bloquante pour aboutir à une électrochimie bien définie de l'or.

La figure 4.6b montre les derniers cycles de nettoyage pour plusieurs électrodes ; on peut voir que ces voltamogrammes, même s'ils sont différents, présentent un certain nombre de points communs : tous possèdent les mêmes pics d'oxydation au dessus de 1 V, quoi que dans des proportions différentes. Ces pics correspondent à diverses structures cristallines de l'or. On peut notamment voir sur la figure 4.6a qu'au fur et à mesure des cycles (de rouge à vert), la forme initialement dominante vers 1,38 V s'amenuise au profit d'une autre avec un pic vers 1,2 V.

Le pic de réduction observé au retour vers 0,9 V correspond à la réduction des oxydes d'or. Si le balayage aller n'a pas dépassé le potentiel où les couches internes d'or commencent à s'oxyder, ce qui est le cas dans les voltamogrammes présentés ci-dessus, la quantité de charge de ce pic est directement proportionnelle à la quantité d'or accessible au solvant. On peut en déduire la surface microscopique et la rugosité de la surface. La figure 4.6b montre que le pic de réduction des oxydes est bien défini et très bien conservé d'une électrode à une autre : l'état de la surface ne varie pas suivant les électrodes. Notons aussi que, d'après la figure 4.6a, le lavage n'a que peu d'influence sur la surface accessible. L'analyse de la courbe — (figure 4.6b) donne une charge totale pour la réduction du pic entre $37 \mu\text{C}$ (sans soustraction de la contribution capacitive) et $30 \mu\text{C}$ (avec soustraction). La charge véritable est certainement comprise entre les deux. La charge surfacique est donc entre $420 \mu\text{C.cm}^{-2}$ et $520 \mu\text{C.cm}^{-2}$. Les valeurs théoriques attendues varient beaucoup d'un auteur à un autre. Des calculs théoriques pour une face (100) montrent qu'on doit s'attendre à $386 \mu\text{C.cm}^{-2}$ pour la surface microscopique [91,92]. Par ailleurs, dans les meilleures conditions, la charge par unité de surface macroscopique mesurée est en réalité plus proche de $450 \mu\text{C.cm}^{-2}$ [93–95]. Les valeurs obtenues ici donnent une mesure de la rugosité par le rapport entre la surface microscopique et la surface géométrique ; ce dernier est compris entre 1,1 et 1,3, ce qui indique que les électrodes sont

particulièrement lisses.

Toutes les électrodes sont nettoyées systématiquement par un bain d'une dizaine de secondes dans du mélange sulfo-chromique avant utilisation. Ni ce bain ni un bain plus long (deux minutes) ne sont suffisants pour que la surface de l'or redevienne hydrophile, comme attendu. D'ailleurs, l'allure du premier cycle de la figure 4.6a trahit la présence de molécules organiques sur l'électrode. Celles-ci peuvent être très gênantes dans le cas de la construction de couches bloquantes, où l'existence de défauts peut avoir des répercussions très importantes sur les résultats obtenus [96,97]. Cependant, pour les besoins des études présentées dans cette thèse il n'est pas nécessaire d'utiliser une surface parfaitement propre et reproductible : le nettoyage par un court bain de mélange sulfo-chromique est donc amplement suffisant.

Mais pourquoi ?

Nous n'avons pas encore répondu à la question : pourquoi ces électrodes ? Quels avantages ont ces électrodes par rapport aux électrodes d'or plus classiques ? Comparons avec d'autres électrodes d'utilisation plus courante : des électrodes «photovoltage», décrites à la section suivante, des électrodes massives polies et des électrodes produites en faisant fondre un mince fil d'or.

Les électrodes de type «photovoltage» sont produites par évaporation d'une couche d'or sur une lame de verre. Ce type d'électrode est particulièrement robuste et toutes les électrodes fabriquées sont utilisables. Cependant, la surface produite est plutôt rugueuse (celles utilisées au cours de cette thèse ont montré une rugosité sensiblement plus élevée que dans le cas des électrodes à feuille collée) et la géométrie est peu pratique pour les expériences qui ont été réalisées au cours de cette thèse : il n'est pas aisé de travailler sur des petits volumes avec une électrode plane (voir section 4.2.1 pour plus de détails sur la configuration utilisée).

La plupart des électrodes d'or employées dans des publications similaires sont des simples tiges d'or enrobées dans un substrat, du verre ou un plastique. Ces électrodes sont simples d'utilisation, mais elles doivent être polies avant chaque nouvelle utilisation pour éliminer les traces des expériences précédentes. Il est difficile d'obtenir une surface lisse, la rugosité étant couramment proche de 1,5 [98].

Les électrodes construites par fusion d'un fil d'or et montage sur un support sont relativement faciles à produire et lisses. En revanche, la surface géométriques de ce type d'électrode varie sensiblement d'une fabrication à une autre. De plus, elles ont généralement une surface sphérique, ce qui n'est pas facile à éclairer de manière uniforme, ce qui est important pour les expériences impliquant des photosystèmes.

En résumé, ces électrodes ont été utilisées car :

- elles sont constituées d'une surface plane au bout d'un tube, ce qui est pratique pour les mesures réalisées ;
- elles ont une surface géométrique bien définie et indépendante de la fabrication ;
- elles ont une rugosité particulièrement faible, donc une ligne de base faible, donc une excellente sensibilité.

4.1.3 Autres électrodes utilisées

D'autres électrodes ont été utilisées de manière beaucoup plus marginale au cours de cette thèse. Quelques essais ont été réalisés avec des électrodes de carbone vitreux, sans être vraiment satisfaisants par rapport aux électrodes habituelles. Pour les applications où un grand rapport surface utile sur encombrement est nécessaire, des électrodes d'or dites «électrodes photovoltage» ont été utilisées : il s'agit d'électrodes préparées par évaporation directe d'or sur des lames de verres prédécoupées. Une couche d'accroche de quelque nanomètres de chrome sont d'abord déposés par évaporation avant de rajouter entre 50 et 200 nm d'or. Ces électrodes présentent une rugosité beaucoup plus grande que les électrodes classiques. Elles ont été moins utilisées pour l'électrochimie proprement dite que pour les applications de photovoltage, où les cinétiques de l'évolution du

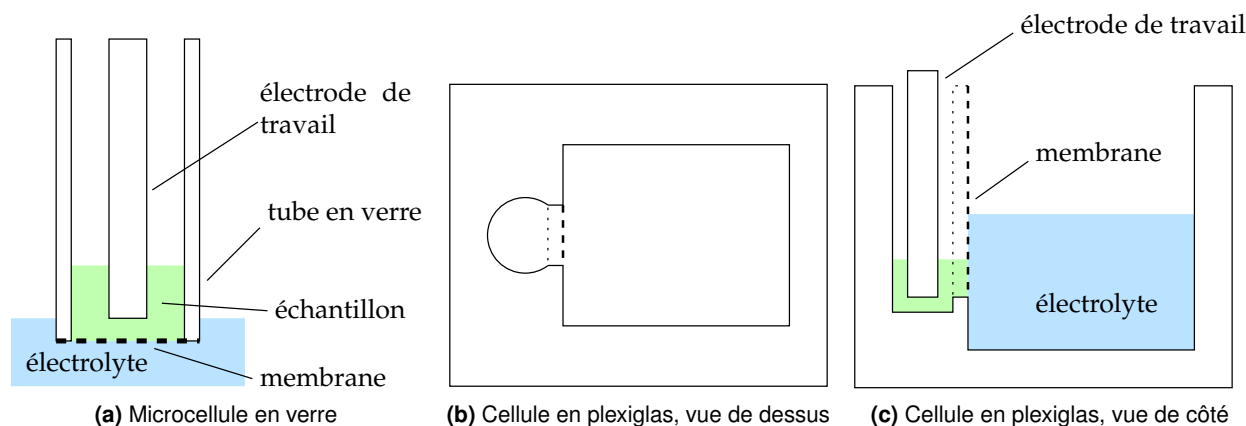


FIG. 4.7: Les deux types de microcellules utilisées

potentiel de l'électrode sont enregistrées après une excitation par laser ; ces expériences seront abordées ultérieurement (section 6.2.2, page 78).

4.2 Electrochimie du C_6

Les électrodes à feuille collée ont principalement été utilisées pour échanger des électrons avec le cytochrome c_6 de *Thermosynechococcus elongatus*⁹ afin d'explorer ses interactions avec le photosystème I, puis celles du photosystème I avec ses autres partenaires. Pour ce faire, il est fondamental que l'interaction entre l'électrode et le cytochrome c_6 soit suffisamment rapide pour ne pas limiter l'exploration de la chaîne. Nous allons maintenant voir comment on peut obtenir des conditions convenables de transferts d'électrons entre une électrode d'or et le cytochrome c_6 .

4.2.1 Configuration expérimentale

Dans un premier temps, nous allons nous intéresser de plus près aux cellules utilisées. La plupart des cellules électrochimiques disponibles couramment nécessitent des volumes d'électrolyte d'une dizaine de millilitres¹⁰. Ces volumes, s'ils sont raisonnables pour des expériences «classiques» sur des composés «chimiques», disponibles en grandes quantités, sont en revanche impraticables pour travailler sur des protéines, produites en quantités sensiblement plus faibles. Pour réduire la quantité de protéines utilisées, une stratégie est de confiner la protéine dans un faible volume autour de l'électrode de travail au moyen d'une membrane en laissant la contre-électrode et l'électrode de référence dans un compartiment plus grand contenant uniquement de l'électrolyte. Pour ce faire, deux microcellules d'une centaine de microlitres ont été conçues et réalisées.

La première, la plus utilisée, est constituée d'un simple tube en verre terminé à une extrémité par une membrane, et à l'autre par un rodage s'adaptant sur ces cellules électrochimiques classiques. L'électrode est fixée dans le rodage à l'aide d'un bouchon percé. La figure 4.7a en représente un schéma. Pour la plupart des expériences réalisées avec l'aide de cette microcellule, une membrane de dialyse avec des pores de taille 6 à 8 kDa¹¹ a été utilisée pour obturer le tube. La jonction entre les deux liquides ne semble pas générer une différence de potentiel de contact importante. Elle permet de travailler confortablement dans un volume d'environ 75 μ L. Un trou a été percé sur le côté pour introduire une pointe de pipette afin d'effectuer des ajouts dans le contenu de la cellule.

⁹Voir les détails des préparations en annexe page 96.

¹⁰La plus petite des cellules complètes dont nous disposons au laboratoire permet de travailler sur un volume total d'environ 2 mL.

¹¹Membrane Spectra/Por 6000–8000

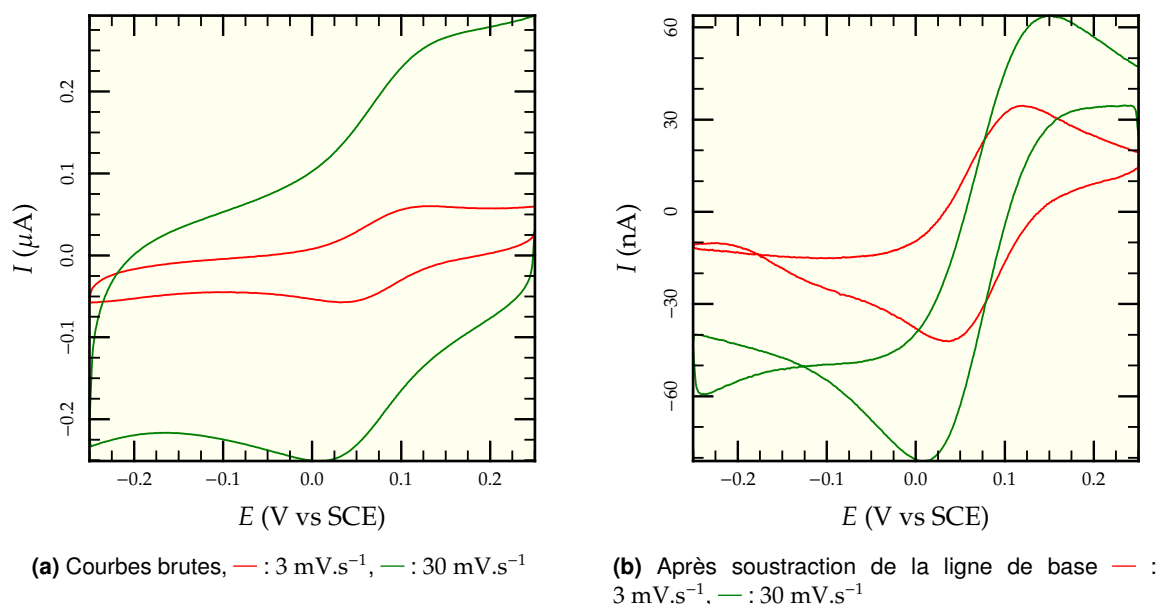


FIG. 4.8: Électrochimie du cytochrome c_6 (concentration 50 μM) sur une électrode d'or nu dans un tampon dégazé.

Cette cellule, si elle est parfaitement utilisable dans bon nombre de situations, présente tout de même quelques défauts. Elle doit être utilisée dans une grande cellule électrochimique, avec un volume de tampon d'au moins 10 mL. Quand les composés présents dans le tampon sont particulièrement coûteux (comme le NADP⁺), il peut être avantageux de travailler sur des volumes plus petits. Par ailleurs, il est important dans certain cas d'avoir un bien meilleur contrôle sur la position exacte de l'électrode ainsi qu'une meilleure reproductibilité des positions¹². Dans ce but, une autre microcellule a été conçue. Il s'agit d'un bloc de plexiglas dans lequel différents compartiments ont été évidés. Une vue de côté et de dessus sont représentés sur les figures 4.7b et 4.7c. Les membranes de dialyse posent des problèmes de fuites dans cette configuration ; une membrane échangeuse d'ions a donc été utilisée pour séparer les deux compartiments. L'électrode est tenue sur pratiquement toute sa longueur par une pièce de plastique ajustée parfaitement à la microcellule : sa position est très bien contrôlée. L'ensemble permet de travailler avec des volumes d'échantillon de 75 μL et des volumes de tampon de l'ordre de 2 mL. De plus, une ouverture pratiquée sur le côté permet d'effectuer des ajouts en cours de mesure pratiquement sans perturbations¹³, ce qui n'est pas possible avec l'autre type de microcellule. Elle est néanmoins plus délicate à mettre en œuvre et l'effet de la présence du plexiglas sur les protéines n'est pas connu. Cette cellule a donc essentiellement été utilisée quand l'autre cellule n'était pas appropriée. À cause de la taille du grand compartiment de cette microcellule, il est nécessaire d'utiliser des électrodes de références à Ag/AgCl, plus compactes que celles au calomel.

4.2.2 Électrochimie directe sur l'or nu

Maintenant que nous avons des électrodes et une microcellule adaptée, on peut étudier l'électrochimie du cytochrome c_6 . Quelques voltammogrammes ont été enregistrés en l'absence de prétraitement de l'électrode d'or, dans un tampon tricine pH 8¹⁴ contenant 50 μM de cytochrome c_6 ; ils sont représentés sur la figure 4.8. On peut voir que les pics sont aplatis et éloignés, même à des vitesses relativement faibles : à 30 mV.s⁻¹ l'écart pic-à-pic avoisine 140 mV, signe que les réactions

¹²Voir pourquoi page 60.

¹³Cette particularité sera utilisée page 56.

¹⁴Voir page 95 pour les détails des tampons.

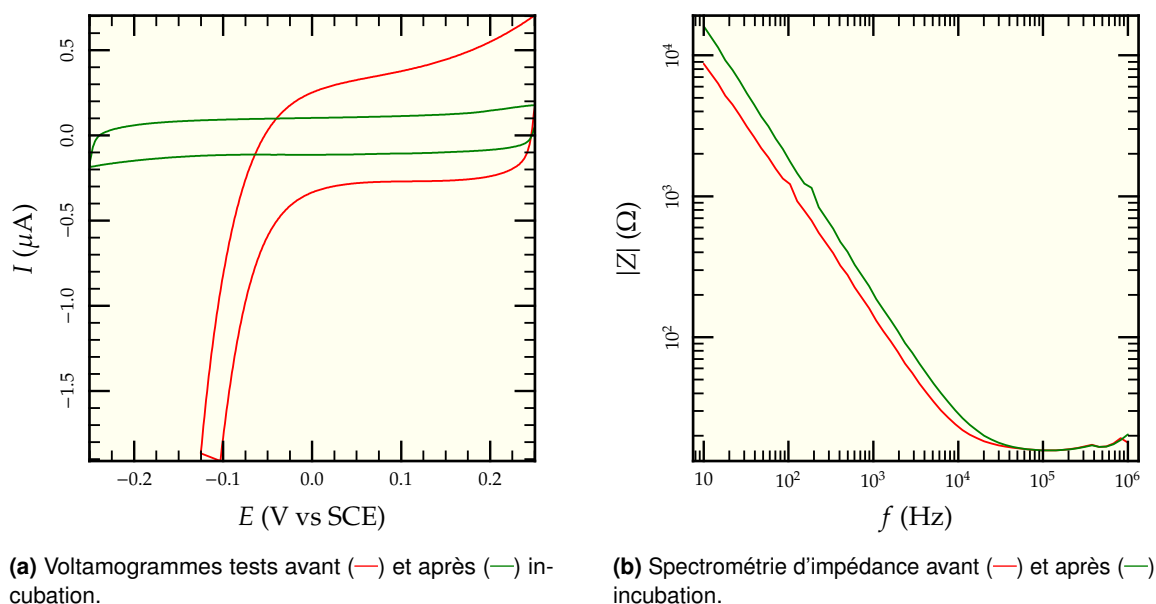


FIG. 4.9: Comparaison des propriétés des électrodes avant et après fonctionnalisation avec le mercaptopropanol

à l'électrode sont trop lentes. De plus, les croisements de traces pour le moins curieux dans la figure 4.8b suggère que la ligne de base a évolué au cours des mesures. Ceci est sans aucun doute le signe d'une adsorption du cytochrome sur l'électrode ; des auteurs ont déjà fait état de ce type de comportement sur des électrodes d'or nu [48]. Une couche de cytochrome adsorbé se forme rapidement sur la surface et rend les transferts d'électrons très difficiles.

4.2.3 Modification des électrodes

Pour éviter une adsorption trop rapide du cytochrome c_6 , il est nécessaire de changer les caractéristiques de la surface exposée au solvant. Une technique particulièrement élégante pour contrôler l'état de la surface est l'utilisation de monocouches auto-assemblées, S.A.M. en anglais [95]. En effet, il est bien connu que les groupes thiols, sulfures et disulfures ont tendance à s'adsorber fortement sur des surfaces d'or, formant ainsi des couches d'une molécule d'épaisseur. Les conditions dans lesquelles ces composés s'adsorbent ont été particulièrement étudiées par Bain, Whitesides et leurs collègues à la fin des années 80 [99–105], ainsi que par bien d'autres groupes [94, 97, 106–109]. Les thiols longs ont tendance à former des couches bloquantes [96, 97] empêchant toute électrochimie. En revanche, des études ont montré que des molécules de petite taille adsorbées sur des électrodes peuvent promouvoir l'électrochimie de protéines [61, 62, 65, 110–112]. Une étude précédente menée par Vanessa Proux [64] a montré que l'utilisation de mercaptopropanol ($\text{SH} - (\text{CH}_2)_3 - \text{OH}$) est idéal pour promouvoir l'électrochimie du cytochrome c_6 : le cytochrome n'a plus tendance à s'adsorber et la couche est suffisamment peu organisée et mobile pour que les transferts d'électrons aient lieu dans de bonnes conditions. Ce thiol a aussi été utilisé avec succès pour promouvoir l'électrochimie d'autres cytochromes [112].

Les électrodes sont couvertes d'une couche de mercaptopropanol par immersion pendant environ une heure dans une solution d'une dizaine de millimolaires dans l'éthanol. Les électrodes sont ensuite rincées dans plusieurs bains d'éthanol puis d'eau avant d'être à nouveau testées en voltamétrie cyclique. La figure 4.9a montre les voltamogrammes avant et après l'incubation dans le mercaptopropanol. On voit essentiellement deux phénomènes :

- La pente abrupte de réduction qui commence vers $-0,1$ V sur l'électrode d'or nu a quasiment disparu une fois que cette électrode est recouverte de mercaptopropanol. Il s'agit de la pente

de réduction de l'oxygène. Elle disparaît car la couche de thiols qui se forme est suffisamment bloquante pour en ralentir la cinétique.

- Indépendamment de ce phénomène, la ligne de base après application du mercaptopropanol est sensiblement plus petite. Ceci est confirmé par la figure 4.9b, d'où l'on peut tirer que la capacité passe de $18,5 \mu\text{C}\cdot\text{cm}^{-2}$ avant incubation à $11,7 \mu\text{C}\cdot\text{cm}^{-2}$ après. Ceci peut se comprendre qualitativement à l'aide de l'équation (3.34) : la permittivité relative est plus faible dans la couche de thiol, et celle-ci empêche les ions d'approcher aussi près qu'en son absence, d'où une diminution sensible de la capacité. Celle-ci est reliée à une diminution de la ligne de base via l'équation (3.33).

Il est légitime de se demander quelle est réellement la quantité de thiols adsorbés sur la surface de l'électrode. Un moyen particulièrement simple de connaître le nombre de thiols adsorbés est de diminuer le potentiel de l'électrode dans un tampon dégazé : les thiols se désorbent de la surface d'or s'ils sont soumis à un potentiel suffisamment bas. Il s'agit d'une désorption réductive faisant intervenir un électron par thiols désorbé [95, 113–115]. On s'attend alors à une charge de l'ordre de $90 \mu\text{C}\cdot\text{cm}^{-2}$ (pour une monocouche complète). Trois cycles successifs sont représentés sur la figure 4.10. On peut voir que le premier cycle (—) présente un pic important vers $-0,6 \text{ V}$ par rapport au calomel saturé¹⁵. Les cycles suivants en présentent une pâle réminiscence, due à des restes de thiols sur la surface, ou plus vraisemblablement à une réadsorption des thiols à proximité de l'électrode à la fin du cycle [115]. L'intégration de l'aire entre le premier cycle (—) et le dernier (—) donne une charge de $65 \mu\text{C}\cdot\text{cm}^{-2}$, ce qui suggère une couverture d'environ 70% de la surface.

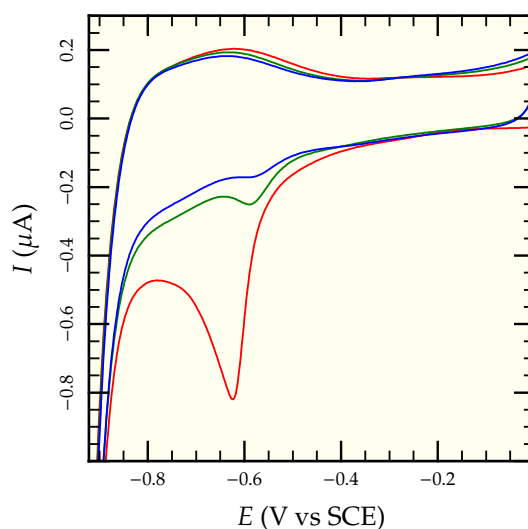


FIG. 4.10: Désorption réductive du mercaptopropanol, cycles 1 (—), 2 (—) et 3 (—).

4.2.4 Électrochimie directe du c_6 sur de l'or modifié

Comme annoncé, le cytochrome ne s'adsorbe plus sur des électrodes couvertes de mercaptopropanol et on est en mesure d'obtenir plus de données sur la qualité de l'électrochimie. Pour accéder aux données cinétiques de l'électrochimie du cytochrome, une série de voltammogrammes à différentes vitesses ont été réalisés. Les résultats sont représentés sur la figure 4.11. La figure 4.11a représente les voltammogrammes obtenus après soustraction de la ligne de base. Pour être en mesure de comparer visuellement les voltammogrammes à différentes vitesses de balayage, on a représenté sur la figure 4.11b les voltammogrammes divisés par la racine carrée de la vitesse de balayage : pour des conditions réversibles, l'équation (3.29) implique que les voltammogrammes doivent alors se superposer. On voit que si c'est le cas jusqu'à $300 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$, le voltammogramme pour $3 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$ ne se superpose plus du tout aux précédents : l'électrochimie n'est plus réversible dans ce cas.

On cherche à obtenir trois paramètres de ces mesures : le potentiel du couple $c_6^{\text{ox}}/c_6^{\text{red}}$, le coefficient de diffusion du cytochrome et la constante d'interaction k_s avec l'électrode. Le potentiel du couple est simplement la moyenne du potentiel des deux pics dans les conditions réversibles. On mesure facilement $E_0 = 77 \text{ mV}$ par rapport au calomel saturé, soit $E_0 = 318 \pm 1 \text{ mV}$ par rapport à l'électrode standard à hydrogène. D'après l'équation (3.30) tant que l'électrochimie peut être considérée comme réversible, le courant de pic est proportionnel à la racine carrée du coefficient de diffusion. Ainsi, on peut se servir de la partie linéaire de la figure 4.12a où l'électrochimie est bien

¹⁵Cette valeur est particulièrement élevée par rapport aux valeurs trouvées couramment dans la littérature. C'est parfaitement normal étant donné que le potentiel de réduction diminue quand la longueur de la chaîne augmente.

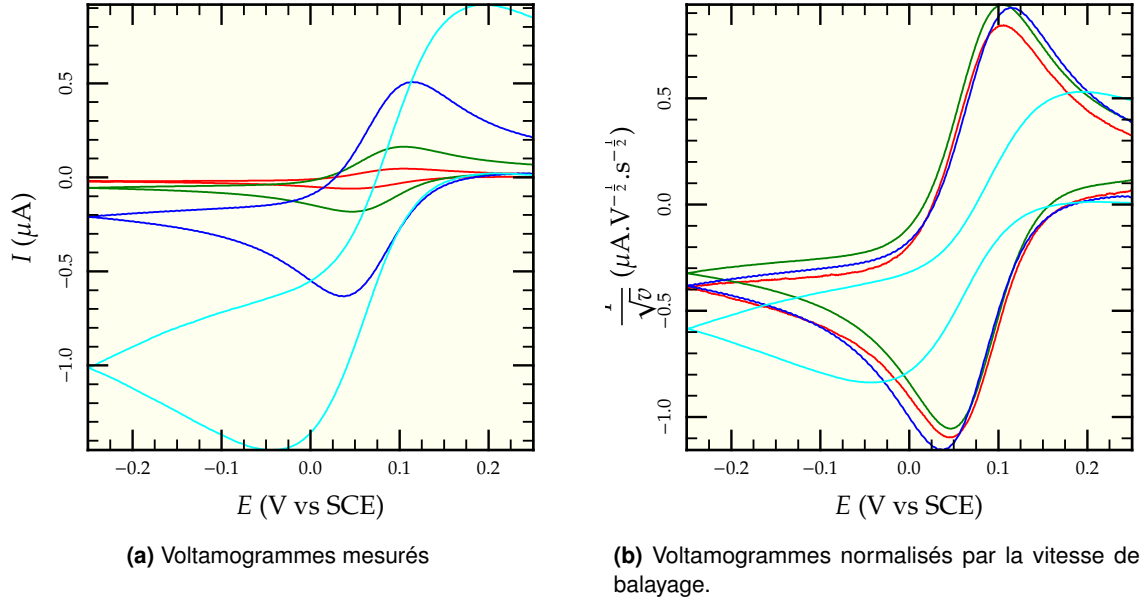


FIG. 4.11: Quelques voltammogrammes de $50 \mu\text{M}$ de c_6 sur une électrode modifiée avec du mercaptopropanol. La figure (a) montre les voltammogrammes tels quels, tandis que le courant est divisé par la racine de la vitesse dans (b). — est à 3 mV.s^{-1} , — à 30 mV.s^{-1} , — à 300 mV.s^{-1} et — à 3 V.s^{-1} .

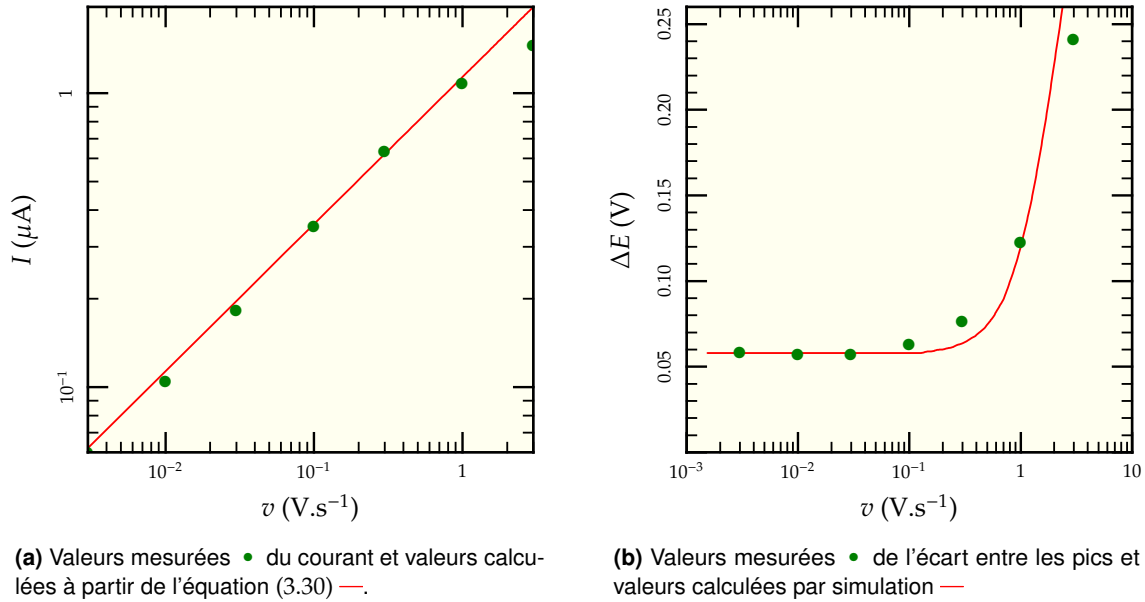


FIG. 4.12: Pic du courant de réduction (a) et écart pic-à-pic (b) pour différentes valeurs de la vitesse de balayage v .

réversible pour obtenir un coefficient de diffusion de l'ordre de $1,2 \pm 0,1 \times 10^{-6} \text{ cm}^2.\text{s}^{-1}$. À l'aide de cette valeur, on peut maintenant confronter les mesures des écarts entre le pic de réduction et le pic de réoxydation aux valeurs simulées (voir figure 3.4a). Les données sont présentées figure 4.12b. Les meilleurs ajustements sont obtenus pour $k_s = 5,5 \pm 0,5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}.\text{cm}^{-1}$.

En résumé, nous avons montré que l'électrochimie directe et réversible du cytochrome c_6 est possible sur une électrode d'or moyennant une modification de l'électrode au moyen de thiols courts hydrophiles comme le mercaptopropanol. Ces mesures électrochimiques nous ont permis de tirer un certain nombre de paramètres thermodynamiques et cinétiques de l'électrochimie du

cytochrome c_6 sur de telles électrodes. Nous sommes maintenant armés pour étudier les interactions du cytochrome avec des partenaires en solution.

L'électrochimie du cytochrome sur les électrodes d'or en bref :

- très mauvaise sur des électrodes nues ;
- correcte sur des électrodes modifiées avec du mercaptopropanol ;
- $E_0 = 318 \pm 1 \text{ mV}$
- $D_{c_6} = 1,2 \pm 0,1 \times 10^{-6} \text{ cm}^2.\text{s}^{-1}$
- $k_s = 5,5 \pm 0,5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}.\text{cm}^{-1}$.

Chapitre

Du c_6 au glutamate

5

Dans ce chapitre, nous allons montrer qu'il est possible d'explorer les cinétiques de différentes étapes d'une chaîne de transferts d'électrons en observant le premier élément de la chaîne, le cytochrome c_6 , par des méthodes électrochimiques. Nous allons étudier de cette manière la chaîne de transferts d'électrons photosynthétiques depuis le cytochrome c_6 jusqu'à la formation du NADPH puis du glutamate. Cette étude forme la plus grande partie de mes travaux de thèse.

Nous allons d'abord nous intéresser à un système plus simple ressemblant à la chaîne complète, puis nous verrons la construction de la chaîne ainsi que les constatations qui l'ont motivée. Ensuite, nous étudierons les réactions parasites (et parallèles) à la chaîne avant d'en aborder l'étude quantitative. La construction et l'étude de cette chaîne ont occupé la plus grande part de mes travaux de thèse, pour un certain nombre de raisons qui seront apparentes à la fin de ce chapitre.

Les systèmes électrochimiques étudiés dans ce chapitre diffèrent de ceux étudiés précédemment dans le sens où l'on s'intéresse à des systèmes catalytiques. Les électrons que l'électrode fournit au cytochrome c_6 vont dorénavant servir à photoréduire un accepteur final à l'aide du photosystème I. La nature de cet accepteur va varier au long du chapitre. Contrairement au chapitre précédent où le pic du retour des voltamogrammes compensait plus ou moins le pic aller, on va ici pouvoir observer un transfert net d'électrons de l'électrode à un accepteur final dans la solution ; on s'attend donc à observer une augmentation du courant de réduction (en valeur absolue).

5.1 Du c_6 à l'oxygène en passant par le méthylviologène

Intéressons-nous dans un premier temps au système le plus simple possible faisant intervenir le cytochrome c_6 et le photosystème I et qui est susceptible d'un véritable comportement catalytique, c'est-à-dire dans lequel un flux réel (unidirectionnel) d'électrons est observé, comme dans la photosynthèse.

À moins d'utiliser une quantité de photosystème I beaucoup plus grande que de cytochrome c_6 , ce qui n'est pas envisageable, il n'est pas possible de stocker des électrons sur le photosystème I. Une fois que la paire ($P700^+$, F_B^-) a été photogénérée, le photosystème I peut accepter un électron pour devenir ($P700$, F_B^-). Mais, sans accepteur d'électrons, le système se bloque ; une illumination subséquente ne peut pas créer de séparation de charge durable à cause de la présence d'un électron sur F_B^- . Il faut donc utiliser un accepteur approprié pour le photosystème I ; on peut à cet effet utiliser le méthylviologène (MV). Le couple MV^{2+}/MV^+ possède un potentiel très proche de celui de l'accepteur naturel du PSI, la ferrédoxine ($-0,446$ V pour le méthylviologène, entre $-0,42$ V et $-0,41$ V pour la ferrédoxine [116, 117]). Par ailleurs, le méthylviologène est connu pour être très rapidement réoxydé en présence d'oxygène. Il constitue donc un excellent candidat pour le système qui nous intéresse, étant

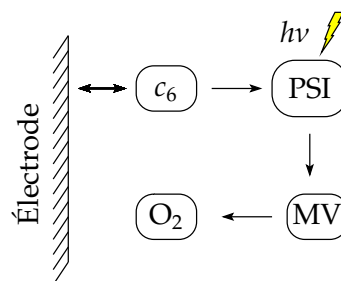


FIG. 5.1: Chaîne de transfert d'électrons étudiée. Chaque flèche représente un transfert d'électrons.

donné que dans une solution non dégazée, il sera en permanence réoxydé. Dans cette configuration, on transfère les électrons du c₆ jusqu'à l'oxygène, qui est ici l'accepteur terminal (figure 5.1).

5.1.1 Mesures expérimentales

Dans la microcellule à tube de verre décrite page 37 on introduit un échantillon contenant 0,6 μM de PSI et 20 μM de cytochrome c₆. Le tout est équilibré dans un tampon contenant 200 μM de méthylviologène. Ce dernier doit aussi être présent à la même concentration dans la grande cellule, car il est trop petit pour être retenu par la membrane. Pour éviter sa disparition progressive au cours des mesures¹ ainsi que des effets de potentiels de jonction liquide/liquide au niveau de la membrane, il faut que les deux côtés de la membrane de dialyse séparant les deux compartiments soient équilibrés.

Les mesures se déroulent de la sorte : chaque voltamogramme à l'obscurité du cytochrome c₆ est doublé d'un voltamogramme pendant lequel on éclaire la microcellule au moyen d'une lampe halogène. Quelques exemples de courbes obtenues sont montrés dans la figure 5.2. On peut voir que le courant sous éclairage est radicalement différent de celui à l'obscurité. Par ailleurs, le voltamogramme avec seulement 70% de la lumière maximum montre que l'intensité lumineuse est suffisamment grande pour ne pas limiter la catalyse.

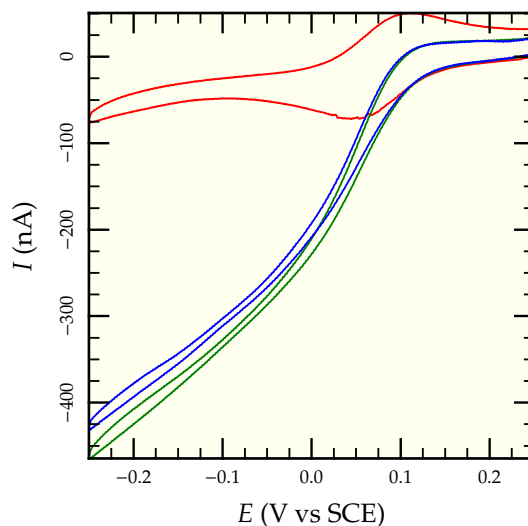


FIG. 5.2: Voltamogrammes obtenus pour le système c₆/PSI/MV/O₂. — est obtenu à l'obscurité ; — avec un éclairage maximal et — avec un éclairage de 70%. Les lignes de base n'ont pas été soustraites.

5.1.2 Interprétation

Nous allons essayer de comprendre ce qu'il se passe dans la solution. Le traitement de la section 3.3 n'est plus valable dans la mesure où le cytochrome c₆ est régénéré par le photosystème I. Il faut désormais tenir compte des réactions suivantes [64] :



La réaction (5.1) représente la séparation de charge photoinduite du photosystème I. La notation PSI^{+-} représente un photosystème I avec son donneur primaire (P700) oxydé et son accepteur terminal (F_B) réduit. Pour simplifier, on va supposer que les réactions (5.4) et (5.5) sont suffisamment rapides pour qu'elles n'interviennent pas dans la cinétique². Le système de réactions précédent se simplifie alors en

¹Il faut tout de même tempérer ce point de vue : la diffusion à travers la membrane est un processus très lent ; quelques essais ont montré qu'il n'y a pas de différence significative sur quelques heures.

²D'après les constantes cinétiques trouvées dans [64] et le rapport des concentrations entre le c₆ et le méthylviologène, cette hypothèse est parfaitement légitime.



Pour les puissances d'éclairage utilisées, on peut considérer que la constante k_1 dépend linéairement de l'intensité lumineuse³. Ainsi, en l'absence d'éclairement, la réaction (5.6) n'a pas lieu et il n'y a pas de PSI^+ présent en solution. En conséquence, la réaction (5.7) n'a jamais lieu non plus, et aucune espèce en solution n'interagit avec le cytochrome. On se retrouve ainsi dans le même cas que dans la section 3.3 : les voltamogrammes observés à l'obscurité sont simplement ceux du cytochrome c_6 seul. En revanche, dès que l'échantillon est éclairé, les réactions (5.6) et (5.7) régénèrent le cytochrome réduit et l'on observe une activité catalytique, ce qui est bien évident dans les mesures expérimentales. C'est là le principal attrait de ces expériences, puisque l'on peut «allumer et éteindre» la catalyse à volonté simplement en jouant sur l'éclairage. Ce confort d'expérimentation contraste fortement avec les expériences de catalyse électrochimique couramment publiées, où il faut rajouter des espèces dans le tampon pour observer une activité catalytique. Ceci impose en pratique d'utiliser des enzymes adsorbées sur des électrodes pour ne pas consommer des quantités faramineuses de protéines [56, 118–120].

On va simplifier encore plus le système en remarquant que si l'intensité lumineuse n'a que peu d'effets sur l'allure des voltamogrammes, c'est que la réaction (5.6) est suffisamment rapide pour ne pas être limitante non plus. Le système se réduit alors à une réaction du pseudo-premier ordre :



avec k_a donnée par une approximation des états quasi-stationnaires aux espèces du PSI :

$$k_a = k_2 [\text{PSI}]_0 \quad (5.9)$$

où $[\text{PSI}]_0$ est la concentration totale des différentes formes du photosystème I. Cette réaction se traduit en terme de l'évolution des concentrations par la contribution suivante :

$$\left. \frac{\partial c_6^{\text{ox.}}}{\partial t} \right|_{\text{chim.}} = k_a c_6^{\text{réd.}} \quad (5.10)$$

Pour plus de lisibilité, on a omis les crochets autour des concentrations. Cette contribution doit être ajoutée à celle de la diffusion pour obtenir la dérivée temporelle de la concentration de $c_6^{\text{ox.}}$ en un point donné de la solution :

$$\frac{\partial c_6^{\text{ox.}}}{\partial t} = \left. \frac{\partial c_6^{\text{ox.}}}{\partial t} \right|_{\text{diff.}} + \left. \frac{\partial c_6^{\text{ox.}}}{\partial t} \right|_{\text{chim.}} = D_{c_6} \frac{\partial^2 c_6^{\text{ox.}}}{\partial x^2} + k_a c_6^{\text{réd.}} \quad (5.11)$$

En exprimant les conditions aux limites, on aboutit alors au système suivant :

$$\frac{\partial c_6^{\text{ox.}}}{\partial t} = D_{c_6} \frac{\partial^2 c_6^{\text{ox.}}}{\partial x^2} + k_a c_6^{\text{réd.}} \quad \text{avec} \quad \begin{cases} \lim_{x \rightarrow \infty} c_6^{\text{ox.}} = C_0 \\ c_6^{\text{ox.}}(x=0) = C_0 \gamma \\ c_6^{\text{ox.}} + c_6^{\text{réd.}} = C_0 \end{cases} \quad (5.12)$$

où γ est une constante entre 0 et 1 dépendant uniquement du potentiel à l'électrode et C_0 la concentration totale en c_6 , tous états d'oxydation confondus. Il n'est pas possible d'obtenir une

³Pour saturer le PSI, il faut lui fournir plus d'un million de photons par seconde, ce qui est loin d'être le cas, voir les ordres de grandeur page 61

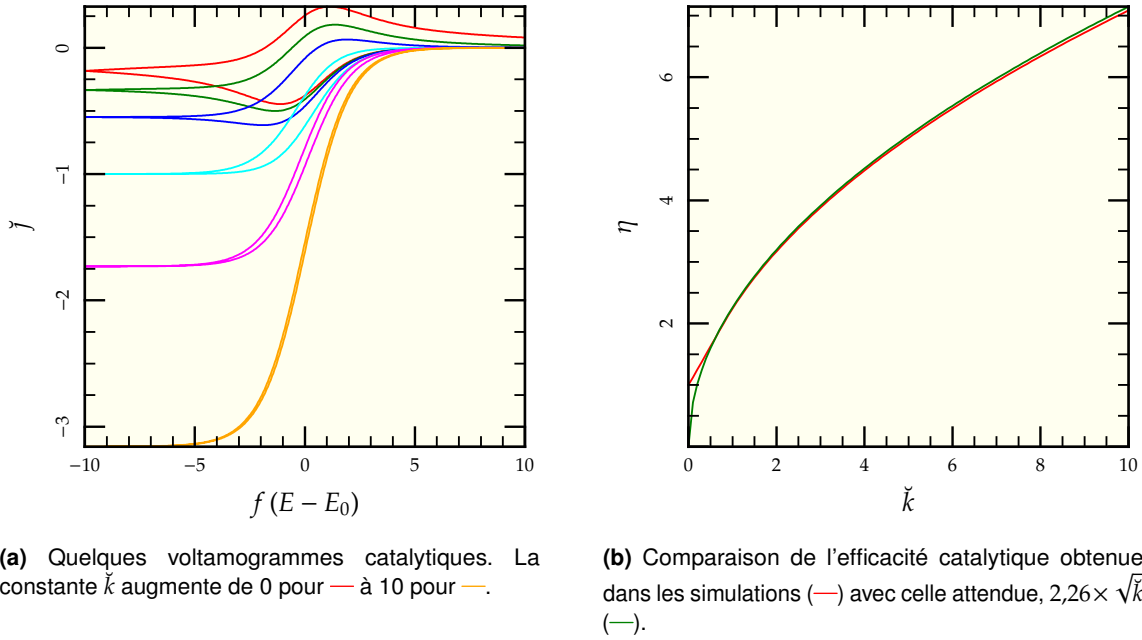


FIG. 5.3: Voltammogrammes catalytiques simulés

solution analytique fermée de ce système ; il est néanmoins possible d'aboutir à une forme intégrale. Par contre, on peut remarquer qu'il possède un état stationnaire non trivial :

$$c_6^{\text{ox.}}(x) = C_0 \left(1 + (\gamma - 1) \exp \left[-\sqrt{\frac{k_a}{D_{c_6}}} x \right] \right) \quad (5.13)$$

Cet état stationnaire peut être atteint assez rapidement et l'on observe alors un courant constant :

$$j = \mathcal{F} D_{c_6} \frac{\partial c_6^{\text{ox.}}}{\partial x} = -\mathcal{F} C_0 \sqrt{k_a D_{c_6}} (1 - \gamma) \quad (5.14)$$

Contrairement au cas où il n'y a pas de recyclage le système débite un courant constant à l'équilibre, ce qui traduit le fait que les électrons sont «stockés» dans un accepteur terminal, ici le couple O₂/H₂O.

L'étude de la solution analytique montre que l'état stationnaire est atteint après un temps de l'ordre de k_a^{-1} . Partant de ces observations, on peut déduire l'allure du courant observé dans le cas d'un voltammogramme cyclique. Si la constante de vitesse k_a est suffisamment élevée par rapport à la vitesse de variation de γ , on peut considérer que le système est en permanence à l'équilibre et l'on obtient alors une sigmoïde. La valeur du courant de plateau est alors donnée par l'équation (5.14), pour $\gamma = 0$. Dans des cas moins idéaux, l'on observe généralement une sigmoïde déformée et la valeur du courant de plateau est la même que dans le cas idéal, s'il y a effectivement un plateau. Pour augmenter la fiabilité des mesures, il est préférable d'utiliser l'efficacité catalytique η , définie comme le rapport entre le courant plateau sous illumination i_{cat} et le courant du pic de réduction à l'obscurité i_0 (voir équation (3.30)). En effet, ce rapport ne dépend ni de la surface de l'électrode, ni de la concentration en cytochrome, ni du coefficient de diffusion du cytochrome :

$$\eta = \frac{i_{\text{cat}}}{i_0} = 2,26 \times \sqrt{\frac{k_a}{f v}} \quad (5.15)$$

Pour se donner une idée de l'allure des voltammogrammes obtenus dans le cas d'un recyclage,

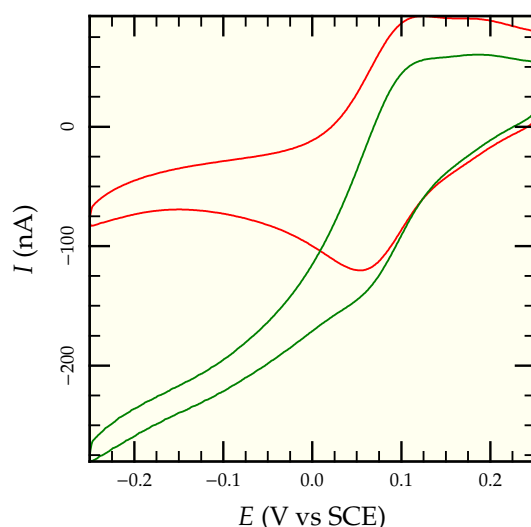


FIG. 5.4: Voltammogrammes catalytiques en présence de 50 μM de cytochrome c_6 , 1 μM de PSI et 150 μM de ferrédoxine, dans une solution non dégazée. — à l'obscurité, — à la lumière.

quelques simulations ont été réalisées⁴. Les résultats sont présentés sur la figure 5.3 ; la variable $\tilde{k}$ est la constante de réaction apparente du premier ordre divisée par le temps caractéristique du voltammogramme τ (voir équations section 3.3.1). On peut voir sur la figure 5.3a que plus la constante de réaction augmente, plus la bosse de réoxydation diminue et plus l'hystérésis entre l'aller et le retour a tendance à se résorber. La figure 5.3b compare l'efficacité catalytique observée sur les simulations à celle attendue d'après la formule (5.15). L'écart vers les faibles valeurs de $\tilde{k}$ est dû au fait que le maximum du courant observé est essentiellement le pic de réduction, ce qui n'est pas pris en compte dans (5.15).

Pour finir, on peut se demander pourquoi les voltammogrammes observés sur la figure 5.2 ne présentent pas un vrai plateau catalytique, contrairement aux voltammogrammes simulés. Ceci est vraisemblablement dû à la production d'espèces de potentiel élevé très réactives au cours de la réaction du méthylviologène réduit avec le dioxygène dissous (O_2^- , H_2O_2) [121, 122]. Ces espèces peuvent soit réoxyder le cytochrome, soit réagir directement avec l'électrode. Cette dernière hypothèse est la plus vraisemblable, car elle explique la pente observée : plus le potentiel est bas, plus les réactions de ces espèces avec l'électrode sont efficaces donc plus le courant est important. La plupart des autres voltammogrammes présentés dans ce chapitre sont enregistrés dans des conditions d'anoxie modérée et sont exempts de ce défaut.

5.2 Construction de la chaîne

Nous allons maintenant détailler les constatations et les réflexions qui ont conduit à la construction d'une chaîne de transport d'électrons aussi complexe que celle qui mène du cytochrome c_6 à la réduction de l' α -kétooglutarate en glutamate.

5.2.1 Utilisation de la ferrédoxine couplée à l'oxygène comme accepteur terminal

La suite logique des mesures présentées dans la section précédente est de remplacer le méthylviologène par un des accepteurs naturels du photosystème I : la ferrédoxine (Fd). Si la réaction entre la ferrédoxine et l'oxygène dissous est aussi efficace que dans le cas du méthylviologène, on peut choisir les concentrations de sorte à ce que le courant observé soit essentiellement dû à la

⁴Il y a plus de détails sur l'algorithme utilisé page 91.

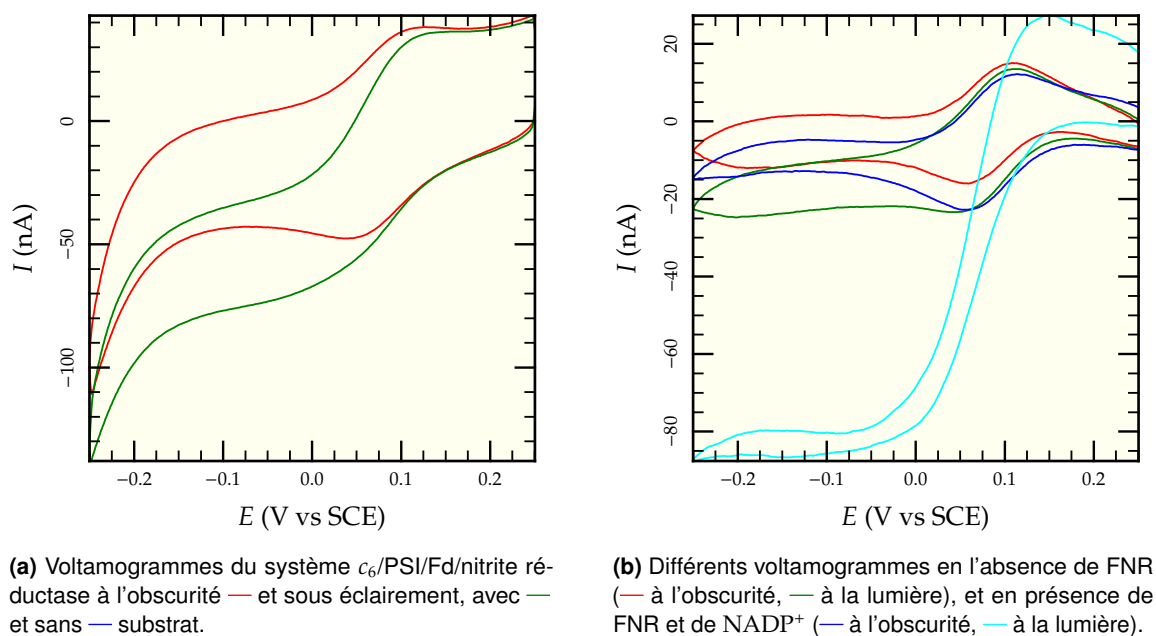


FIG. 5.5: Choix du partenaire de la ferrédoxine

réaction entre le photosystème I et la ferrédoxine. Pour ce faire, des voltamogrammes à l'obscurité et à la lumière ont été enregistrés dans une microcellule non dégazée contenant du cytochrome c_6 , du photosystème I et de la ferrédoxine ; ils sont représentés sur la figure 5.4. On peut voir que les voltamogrammes obtenus sous éclairage sont loin d'être satisfaisants : l'efficacité catalytique obtenue est faible (inférieure à 2), ce qui les rend inexploitable. Ceci peut s'expliquer par le fait que la ferrédoxine, même si elle est réoxydée par l'oxygène dissous, l'est beaucoup moins rapidement que le méthylviologène. L'ensemble de la chaîne est donc limité par l'étape de réoxydation de la ferrédoxine avec l'oxygène, ce qui n'a pas d'intérêt biologique.

5.2.2 Utilisation de partenaires de la ferrédoxine

L'obtention de bonnes conditions catalytiques est indispensable pour une interprétation quantitative des données obtenues. Puisque l'oxygène n'est pas suffisamment efficace pour réoxyder la ferrédoxine, nous nous sommes intéressés aux partenaires naturels de cette dernière. Les premiers essais ont naturellement été réalisés avec les enzymes disponibles au laboratoire, c'est-à-dire la nitrite réductase et la FNR. Une série de mesures préliminaires a été effectuée pour choisir celle des deux enzymes qui réoxyde la ferrédoxine le plus efficacement, afin d'obtenir les meilleures conditions catalytiques.

Quelques mesures ont été réalisées avec la nitrite réductase dans les conditions suivantes : $15\text{ }\mu\text{M}$ de cytochrome, entre $0,3\text{ }\mu\text{M}$ et $0,6\text{ }\mu\text{M}$ de photosystème I, entre $2\text{ }\mu\text{M}$ et $6\text{ }\mu\text{M}$ de ferrédoxine, entre $2\text{ }\mu\text{M}$ et $4\text{ }\mu\text{M}$ de nitrite réductase et environ 2 mM de nitrite de sodium. Quelques-uns des voltamogrammes obtenus sont représentés sur la figure 5.5a. On peut voir que l'efficacité catalytique est particulièrement faible. De plus, il n'y a pas de différence entre les conditions avec substrat et sans substrat. La nitrite réductase nous a donc paru être un très mauvais choix.

D'autres mesures plus prometteuses ont été réalisées avec la FNR. Dans une microcellule contenant $10\text{ }\mu\text{M}$ de c_6 , $0,3\text{ }\mu\text{M}$ de photosystème I, $4\text{ }\mu\text{M}$ de ferrédoxine, 0 puis $2\text{ }\mu\text{M}$ de FNR et 2 mM de $NADP^+$, on a enregistré des voltamogrammes à l'obscurité et à la lumière. Les résultats sont présentés dans la figure 5.5b. On peut voir que les voltamogrammes sous éclairage en présence de substrat et de FNR présentent un vrai plateau catalytique, avec une efficacité catalytique importante : le rapport entre le plateau de — et le pic de réduction de — dans la figure 5.5b donne

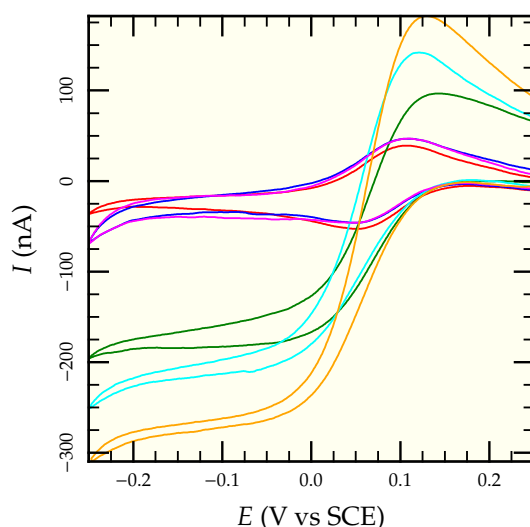


FIG. 5.6: Une expérience typique d'ajouts successifs dans un échantillon. Initialement, l'échantillon de 100 μL contient 25 μM de cytochrome c_6 , 12 μM de ferredoxine, 0,3 μM de photosystème I et 2,5 μM de FNR. Par ailleurs, le tampon contient 2 mM de NADP^+ . — et — sont des voltammogrammes à l'obscurité et à la lumière dans les conditions initiales. — et — après un ajout de 60 μM de ferredoxine (6 μL ajoutés), et — et — après un ajout de 60 μM de ferredoxine (6 μL ajoutés) et de 2,5 μM de FNR (0,5 μL).

une efficacité catalytique de l'ordre de 3,8. C'est pourquoi nous avons choisi d'utiliser la FNR pour caractériser les réactions entre le photosystème I et la ferredoxine.

5.2.3 Premières expériences avec la FNR

Avec un système de régénération de la ferredoxine qui semble fonctionner, on peut commencer à acquérir des données quantitatives en faisant varier la concentration des différents partenaires en solution pour explorer différentes cinétiques. En effet, suivant les concentrations respectives des partenaires les étapes limitantes dans la chaîne ne sont pas les mêmes : en choisissant convenablement les concentrations, on peut se concentrer sur quelques réactions. Il n'est pas raisonnable d'envisager de fabriquer un nouvel échantillon pour chaque condition de concentration, pour différentes raisons :

- cette approche serait beaucoup trop coûteuse en protéines (ou trop pauvre en mesures) ;
- le temps mis pour fabriquer un échantillon est assez long, voire très long s'il faut le dégazer⁵ ;
- par ailleurs, les électrodes utilisées sont relativement fragiles ; des manipulations excessives (entrée/sortie de la microcellule) finissent par les endommager et les rendre inutilisables.

Pour pallier à ces problèmes, il nous a semblé plus avantageux de ne préparer qu'un échantillon par série de mesures, et d'ajouter systématiquement une quantité connue des protéines⁶. De plus, la dilution engendrée est faible et facile à mesurer.

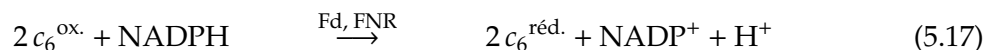
La figure 5.6 représente une expérience typique d'ajouts utilisant la FNR pour régénérer la ferredoxine. Pour chaque échantillon, on a réalisé à la fois un voltammogramme sous éclairage (catalytique) et un voltammogramme à l'obscurité. On voit qu'au fur et à mesure des ajouts le courant obtenu sous éclairage augmente en valeur absolue, alors que les voltammogrammes obtenus à l'obscurité restent pratiquement identiques les uns aux autres. Cette propriété est particulièrement importante pour l'analyse des données ; le voltammogramme à l'obscurité remplit plusieurs fonctions :

⁵Dégazer directement les 75 μL n'est pas possible sans changer les concentrations de manière significative. Il faut alors dégazer en plaçant l'échantillon dans la microcellule et dégazer dans la grande cellule. Une demi-heure est nécessaire pour obtenir une anoxie correcte dans ces conditions.

⁶Cette approche peut aussi être utilisée pour les composés solubles de petite taille, mais cela est plus délicat étant donné qu'il faut aussi équilibrer le tampon à l'extérieur de la microcellule, ce qui rend l'opération sensiblement moins précise.

- il permet de vérifier que l'état de l'électrode est stable et en particulier que l'électrochimie du cytochrome c_6 reste réversible (60 mV pic à pic) ;
- pour le calcul de l'efficacité catalytique, il est indispensable de connaître le courant i_0 sans catalyse obtenu dans les mêmes conditions que celles de la catalyse ;
- enfin, puisque le courant à l'obscurité est proportionnel à la concentration du c_6 , il permet d'estimer la dilution effective de l'échantillon en comparant aux voltamogrammes précédents d'une série d'ajouts⁷. Il a d'ailleurs été possible de négliger systématiquement la dilution.

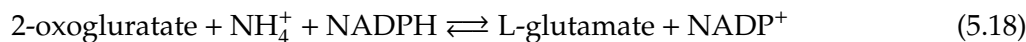
Par rapport à la ferrédoxine seule (figure 5.4), la catalyse obtenue en présence de FNR et de NADP⁺ est bien meilleure : on observe désormais de vrais plateaux catalytiques. Cependant, la forme n'est pas du tout sigmoïdale comme les voltamogrammes prédits par des simulations (figure 5.3). Le pic de retour augmente quand la catalyse augmente, ce qui est le contraire de ce que l'on attend si l'on suppose que la réaction de recyclage du cytochrome c_6 est totale. En fait, ce n'est pas le cas. Au sein d'une cellule vivante le cytochrome et la ferrédoxine sont séparés par une membrane et ne se rencontrent jamais. Cependant, le potentiel beaucoup plus bas de la ferrédoxine suggère qu'il est possible qu'à l'état réduit, elle échange son électron avec le cytochrome c_6 oxydé. La FNR est par ailleurs connue depuis longtemps pour fonctionner également dans le sens de la consommation du NADPH, en produisant ainsi de la ferrédoxine réduite ; elle fonctionne alors en diaphorase [30]. De la sorte, on accumule du NADPH au cours de l'aller dans le voltamogramme de la figure 5.6, et la FNR le réoxyde pour donner des électrons à la ferrédoxine, puis au cytochrome c_6 au cours du balayage retour dans les voltamogrammes. Les réactions en compétition qui ont effectivement lieu dans la solution sont donc



Ces réactions aboutissent à un court-circuit, dans le sens où les électrons naviguent de manière cyclique autour du photosystème I au lieu d'aller linéairement vers un accepteur final, comme dans la photosynthèse⁸. Puisque les techniques électrochimiques ne peuvent mesurer qu'un flux net d'électrons, elles ne donnent accès à ces court-circuits que de manière très indirecte et partielle. Pour obtenir des données fiables, il est donc nécessaire de minimiser les réactions de retour en s'assurant que le niveau de NADPH reste le plus bas possible au cours des expériences.

5.2.4 Recyclage du NADP⁺

Pour maintenir une concentration de NADPH la plus basse possible, il est nécessaire d'utiliser un système qui réoxyde le NADPH en NADP⁺. Un certain nombre d'enzymes peuvent accepter des électrons du NADPH ; la plus importante est sans doute la G3P déshydrogénase qui permet l'apport d'électrons à bas potentiel dans le cycle de Calvin. Par ailleurs, plusieurs méthodes sont couramment utilisées dans des procédés industriels pour recycler le NADP⁺ : l'utilisation d'une flavine (FMN) en conjonction avec de l'oxygène et l'utilisation de la glutamate déshydrogénase (GLDH) [123]. Cette dernière a particulièrement retenu notre attention. La glutamate déshydrogénase catalyse la réaction



Elle nous a semblé intéressante pour plusieurs raisons :

⁷Contrairement à ce que l'on pourrait penser, les calculs effectués à partir des volumes ajoutés ne donnent pas des résultats corrects, car sur un volume aussi petit, les pertes par évaporation sont significatives, surtout dans une boîte à gants.

⁸Ceci n'est pas tout-à-fait vrai étant donné que même les organismes photosynthétiques oxygéniques voient un transfert cyclique autour du photosystème I. Celui-ci est cependant couplé à un transfert de protons à travers la membrane et donc à un stockage d'énergie.

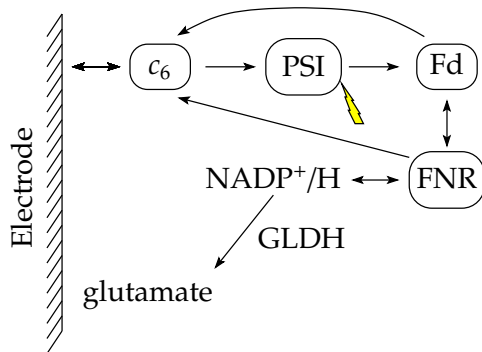


FIG. 5.7: Chaîne complète étudiée avec recyclage de la ferrédoxine oxydée par le système FNR/GLDH.

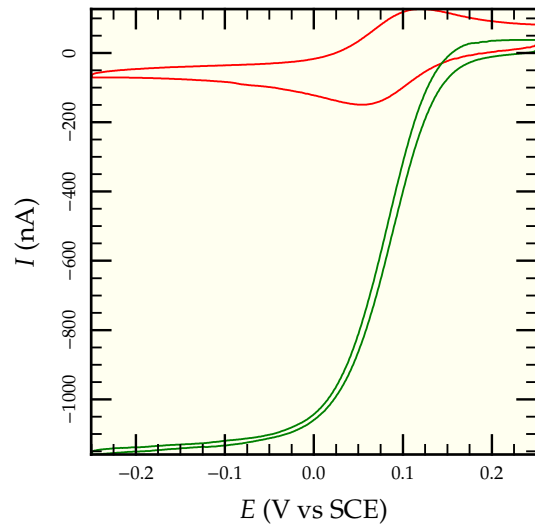


FIG. 5.8: Une paire typique de voltammogrammes en présence de FNR, Ferrédoxine, PSI, c_6 , GLDH et leurs substrats

- son optimum de pH (8,3) pour la réoxydation du NADPH est proche de nos conditions expérimentales (pH 8) et son optimum de pH dans l'autre sens en est suffisamment éloigné (9,8) ;
- elle a déjà été utilisée pour des applications similaires (recyclage du NADPH en NADP^+ [123,124]) ;
- elle est disponible commercialement.

Plusieurs types de GLDH de plusieurs provenances sont disponibles, celle de *Proteus inconstans* [125] nous a semblé la plus adaptée à nos besoins. Les mesures en présence de GLDH ont été conduites dans un tampon différent reflétant ses besoins : pour s'approcher des conditions décrites dans [125], on a remplacé le sulfate de sodium par du sulfate d'ammonium et de l' α -kétoglutarate a été ajouté. On peut voir dans la figure 5.8 que la bosse de retour présente dans les voltammogrammes de la figure 5.6 a complètement disparu : la GLDH joue bien son rôle et recycle efficacement le NADPH en NADP^+ .

On est maintenant en mesure de décrire complètement la chaîne qui a été utilisée pour explorer les cinétiques des partenaires du photosystème I. Elle est représentée sur la figure 5.7, avec les réactions de court-circuits.

5.3 Mesures des réactions parasites

Comme il a été mentionné précédemment, un certain nombre de réactions sont susceptibles de gêner la catalyse et de fausser les résultats dans le cas d'un recyclage insuffisant. Pour améliorer les modélisations, il est nécessaire de connaître ou au moins d'estimer la cinétique de ces réactions parasites.

5.3.1 Le court-circuit Ferrédoxine- c_6

La ferrédoxine et le cytochrome c_6 sont deux petites protéines qui portent leurs centres rédox (un agrégat Fer-Soufre et un hème) à proximité de leur surface. Comme la ferrédoxine a un potentiel beaucoup plus bas que celui du cytochrome, il est vraisemblable qu'elle puisse donner son électron au cytochrome, d'autant plus que, puisque les deux protéines ne sont normalement jamais du même côté de la membrane thylakoïdale, l'évolution naturelle des organismes n'a pas abouti à une

minimisation de ces interactions. De fait, nous avons observé que la réaction



se produit de manière assez efficace. Cette réaction est assez difficile à quantifier, étant donné qu'il n'est pas aisé de produire de la ferrédoxine réduite seule et de la garder réduite suffisamment longtemps, puisqu'elle réagit avec l'oxygène dissous⁹. Trois type d'expériences ont été réalisées pour quantifier la réaction :

- mélange dans un spectrophotomètre «stopped-flow» de c_6 oxydé et de ferrédoxine réduite de différentes manières ;
- utilisation de FNR et de NADPH en grand excès pour réduire la ferrédoxine et le c_6 dans un spectrophotomètre classique ;
- photoréduction de la ferrédoxine par du photosystème I dans un spectromètre classique.

Stopped-flow

Un spectromètre «stopped-flow» permet d'effectuer très rapidement (en quelques millisecondes) des mélanges de petites quantités de différentes solutions et d'étudier l'évolution du spectre du mélange au cours du temps. C'est la technique par excellence pour la mesure des interactions bimoléculaires, même si elle est un peu exigeante à mettre en place. Deux expériences différentes ont été tentées, toutes deux en anoxie.

Dans la première, la ferrédoxine ($4 \mu\text{M}$) est réduite par un grand excès de NADPH ($300 \mu\text{M}$) en présence de FNR (quelques μM). Les constituants sont mélangés dans une boîte à gants et amenés en anaérobiose dans le spectromètre où ils sont mélangés rapidement avec $4 \mu\text{M}$ de cytochrome c_6 . On a représenté dans la figure 5.9 les cinétiques observées à 553 nm , où la différence d'absorption entre le c_6 réduit et le c_6 oxydé est proche de son maximum, tandis que celle de la ferrédoxine est faible.

Sur deux échantillons différents, la cinétique est quasiment identique et constituée en grande partie par une portion linéaire. Ceci n'est simplement pas explicable par une cinétique dominée par une réaction du second ordre, mais ressemble plutôt à une cinétique en présence d'un catalyseur. Le mécanisme à l'origine de cette cinétique n'est pas connu ; on peut cependant supposer qu'il est lié à la présence de FNR : réduction directe du c_6 par la FNR ou limitation de la réduction du c_6 par la ferrédoxine par une complexation excessive de la ferrédoxine réduite par la FNR.

Pour parer à ces problèmes, nous avons eu recours à un réducteur chimique, le citrate de titane, pour produire de la ferrédoxine réduite en atmosphère anoxique. Nous avons ensuite séparé la ferrédoxine du réducteur au moyen d'une colonne de chromatographie d'exclusion de taille. La ferrédoxine et le c_6 ont été ensuite mélangés dans le spectrophotomètre «stopped-flow». Malheureusement, les changements d'absorption observés sont trop faibles pour être exploités. Le problème est sans doute attribuable à un défaut d'anoxie du système (qui comprend beaucoup d'éléments).

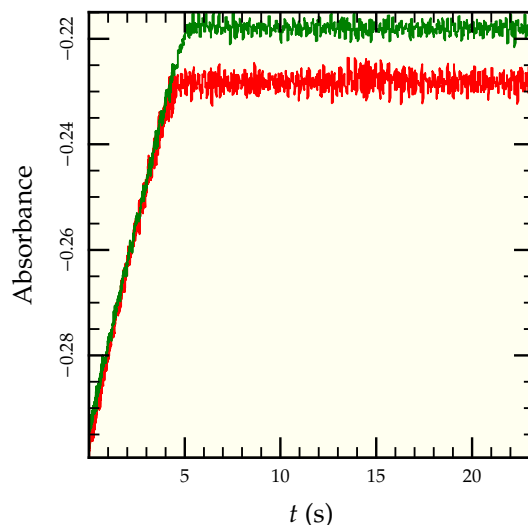


FIG. 5.9 : Évolution de l'absorbance à 553 nm en fonction du temps sur deux échantillons différents après mélange du cytochrome c_6 oxydé et de la ferrédoxine réduite par la FNR dans un spectrophotomètre stopped-flow.

⁹Pas assez vite, hélas, pour autoriser l'exploration électrochimique avec l'oxygène comme accepteur terminal.

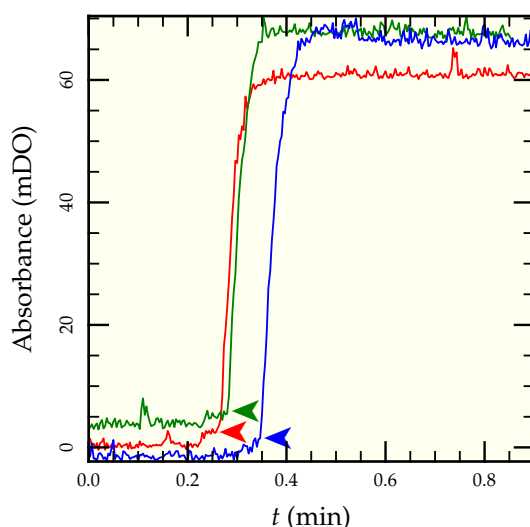


FIG. 5.10: Cinétiques de réduction du c_6 par un mélange de FNR et de ferrédoxine, suivies à 553 nm. La réaction est initiée par l'apport de 60 μM NADPH dans la cuve de mesure. Tous les échantillons comprennent 3 μM de cytochrome c_6 oxydé et 3 μM de FNR ; — et — comprennent en outre respectivement 30 nM et 3 nM de ferrédoxine oxydée. Les symboles > correspondent aux additions de NADPH.

Spectrométrie classique

Devant l'échec des expériences de spectrométrie «stopped-flow», il a fallu avoir recours à d'autres méthodes pour mesurer la constante de réaction du court-circuit. La plus simple est de mesurer dans un spectromètre classique la cinétique de réduction du cytochrome c_6 par un mélange de ferrédoxine, FNR et NADPH. En effet, si l'on se place en grand excès de NADPH et de FNR, la réaction cinétiquement déterminante est la réaction entre la ferrédoxine réduite et le cytochrome oxydé ; à partir d'une série de cinétiques, on devrait donc être capable de remonter à la valeur de la constante de réaction. Il n'est pas nécessaire d'utiliser une technique «stopped-flow» dans ce cas, car pour des faibles concentrations de ferrédoxine, les cinétiques attendues sont suffisamment lentes pour être observées dans un spectromètre classique.

La figure 5.10 montre quelques exemples des cinétiques enregistrées. En particulier, on peut voir que la cinétique —, avec 3 nM de ferrédoxine et la cinétique —, sans ferrédoxine, sont identiques : la FNR peut réagir directement avec le c_6 , sans passer par la ferrédoxine. Quoi que le fait soit intéressant en soi, il ne fait pas notre affaire dans ce cas précis, puisque l'on ne peut pas s'arranger pour que la réaction c_6 ferrédoxine soit l'étape limitante de la chaîne $\text{NADPH} \rightarrow \text{FNR} \rightarrow \text{Fd} \rightarrow c_6$ sans que la chaîne directe $\text{NADPH} \rightarrow \text{FNR} \rightarrow c_6$ ne donne une contribution importante à la cinétique. La réaction entre le cytochrome c_6 et la FNR sera décrite plus en détail dans la section 5.3.2.

Spectrométrie sous éclaircissement

Les mesures de spectrophotométrie «stopped-flow» et classique n'ayant pas abouti à la détermination de la constante recherchée, il a fallu utiliser une autre technique¹⁰. Puisque la FNR interfère avec les mesures, il faut éviter de l'employer. Une autre méthode naturelle de production de la ferrédoxine réduite est de partir de ferrédoxine oxydée, de cytochrome réduit et utiliser le photosystème I sous éclaircissement. Il suffit de rajouter un système d'éclaircissement et de filtres sur un spectromètre classique pour réaliser cette expérience.

Dans cette expérience aussi, il faut s'assurer d'une excellente anoxie : s'il reste une quantité importante d'oxygène dissous, il est réduit par le photosystème I [126] ou la ferrédoxine réduite,

¹⁰Et cette fois, promis, elle va marcher.

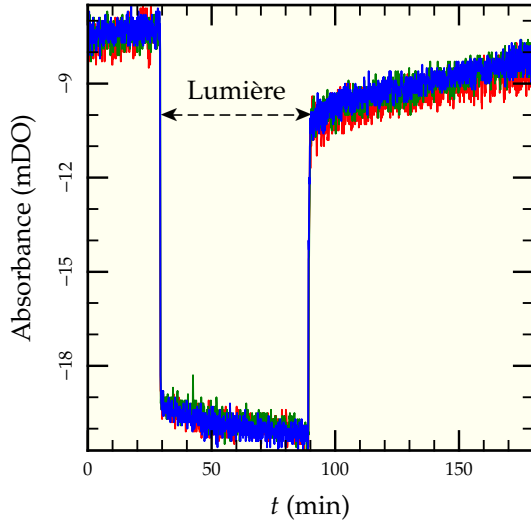


FIG. 5.11: Évolution de l'absorption à 553 nm dans une cuve contenant initialement 3 μM de cytochrome c_6 réduit, 3 μM de ferrédoxine oxydée et 0,3 μM de photosystème I. La cuve est éclairée entre 0,5 minute et 1,5 minutes.

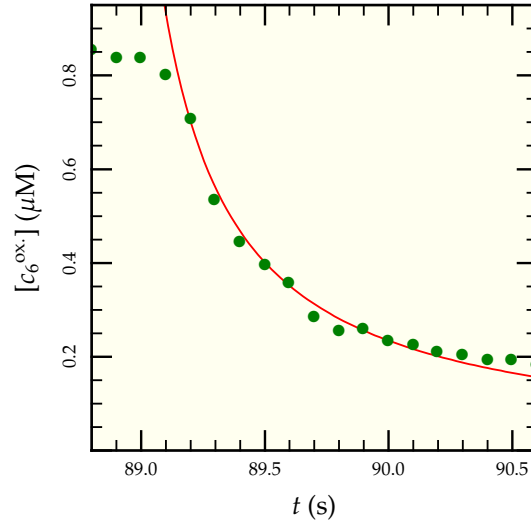


FIG. 5.12: Comparaison des mesures • avec la courbe théorique pour une réaction du second ordre —. Les courbes sont dérivées de celles de la figure 5.11, en prenant $\Delta\epsilon(c_6^{\text{red.}}/c_6^{\text{ox.}}) = 17850 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ et $\Delta\epsilon(\text{Fd}^{\text{red.}}/\text{Fd}^{\text{ox.}}) = 3900 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$

et les électrons du c_6 sont «perdus». Pour obtenir une anoxie correcte, de la glucose oxydase, du glucose et de la catalase ont été incorporés dans le tampon de l'échantillon. La figure 5.11 représente plusieurs mesures successives sur la même cuve. La cuve est éclairée entre $t = 30 \text{ s}$ et $t = 90 \text{ s}$. On peut voir que les traces se superposent parfaitement, signe qu'il n'y a pas de fuites d'électrons dans le système.

Il est possible d'extraire la constante cinétique qui nous intéresse de deux manières différentes. La plus simple est de considérer les réactions prenant place immédiatement après l'extinction de la lumière. Sous éclairage, on a accumulé une certaine quantité de c_6 oxydé et exactement la même quantité de ferrédoxine réduite. Quand l'éclairage cesse, la consommation de c_6 réduit et la production de ferrédoxine réduite s'arrêtent. Si l'on néglige la quantité de photosystème I dans l'état de séparation de charge, la seule réaction qui se poursuit dans la cellule est donc celle qui nous intéresse :



Comme on a $[c_6^{\text{ox.}}] = [\text{Fd}^{\text{red.}}]$, l'évolution de la concentration suit une cinétique canonique du second ordre :

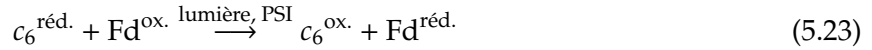
$$[c_6^{\text{ox.}}] = \frac{C_0}{1 + C_0 k_1 t} \quad (5.21)$$

où l'on a appelé C_0 la concentration de cytochrome oxydé immédiatement après l'interruption de l'éclairage (à $t = 0$). Il suffit d'ajuster les paramètres C_0 et k_1 pour suivre au plus près la cinétique observée. Le résultat est représenté sur la figure 5.12. On obtient la valeur suivante pour la constante de réaction :

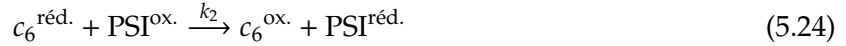
$$k_{c_6 \text{ Fd}} = 3,5 \pm 0,2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1} \quad (5.22)$$

L'ajustement est correct, mais il est intéressant d'essayer de déterminer la même constante d'une manière différente. On peut voir sur les figures que la concentration de c_6 oxydé atteint rapidement

un plateau. Sur le plateau, la concentration est fixée par l'équilibre entre la réaction (5.20) et la suivante :



Dans les conditions utilisées, cette dernière réaction est limitée par l'étape suivante :



où $\text{PSI}^{\text{ox.}}$ et $\text{PSI}^{\text{réd.}}$ représentent respectivement les populations de photosystèmes dans lesquels le donneur primaire est oxydé (après éclaircissement) ou dans son état fondamental, indépendamment de l'état redox des agrégats Fer-Soufre. Par ailleurs, si l'on applique l'approximation de l'état quasi-stationnaire à l'ensemble des espèces du PSI, en quantité bien moins grandes que ses partenaires, le fait que (5.24) soit cinétiquement déterminante implique que le PSI est essentiellement dans l'état $\text{PSI}^{\text{ox.}}$. Dans ces conditions, on obtient un état stationnaire si les concentrations vérifient la condition suivante :

$$k_1 [c_6^{\text{ox.}}] [\text{Fd}^{\text{réd.}}] = k_2 [c_6^{\text{réd.}}] [\text{PSI}]_0 \quad (5.25)$$

où $[\text{PSI}]_0$ est la concentration totale de photosystème I. Puisque l'on a $[c_6^{\text{réd.}}] = [\text{Fd}^{\text{ox.}}]$ et $[c_6^{\text{ox.}}] = [\text{Fd}^{\text{réd.}}]$, et que la concentration totale en c_6 est de $[c_6]_0 = 3 \mu\text{M}$, on peut calculer k_1 à partir de la valeur de k_2 [64] :

$$k_{c_6 \text{ Fd}} = k_2 \frac{([c_6]_0 - [c_6^{\text{ox.}}]) [\text{PSI}]_0}{[c_6^{\text{ox.}}]^2} = 5,0 \pm 0,2 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1} \quad (5.26)$$

L'accord entre les deux méthodes n'est pas très bon, mais il a le mérite de montrer que l'ordre de grandeur de la constante de réaction est correct. Si la valeur obtenue par ajustement sur la cinétique de second ordre semble plus robuste, car dépendant de moins de paramètres, c'est la deuxième valeur qui a été utilisée dans les simulations (page 5.4.3) car l'accord avec les données expérimentales est bien meilleur. En tous cas, les valeurs mesurées montrent que si dans le chloroplaste le cytochrome et la ferrédoxine n'étaient pas chacun dans leur compartiment respectif, l'efficacité de la photosynthèse serait grandement réduite, puisque la réaction de court-circuit est aussi rapide que l'étape limitante dans la photoréduction de la ferrédoxine.

5.3.2 Réactions entre le c_6 et la FNR

Nous avons vu dans la section précédente que la FNR peut donner ses électrons directement au c_6 , sans l'intermédiaire la ferrédoxine. Cette observation n'a pas été rapportée précédemment, mais, au vu du potentiels des couples associés aux différentes formes du FAD, il est raisonnable de penser que la FNR dans au moins un de ses états réduits est capable d'échanger des électrons avec le c_6 . Pour mesurer la constante de réaction, plusieurs cinétiques de réduction du c_6 après addition de NADPH en présence de différentes concentrations de FNR ont été enregistrées. La figure 5.13 montre quelques-unes des cinétiques obtenues dans ces conditions.

On peut voir que les cinétiques obtenues sont exponentielles. Pour extraire les informations cinétiques intéressantes, on trace l'évolution de la constante apparente du pseudo-premier ordre (k_a) en fonction de la concentration (figure 5.14). Les points s'alignent sur une droite de pente $1,6 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. Par ailleurs, la concentration de NADPH n'affecte pas les cinétiques. Si l'on adapte le mécanisme de réaction de la ferrédoxine avec la FNR de [32] (reproduit figure 5.23, page 67) en remplaçant la ferrédoxine par le c_6 , les remarques précédentes permettent de conclure que les réactions cinétiquement déterminantes des cinétiques observées sont

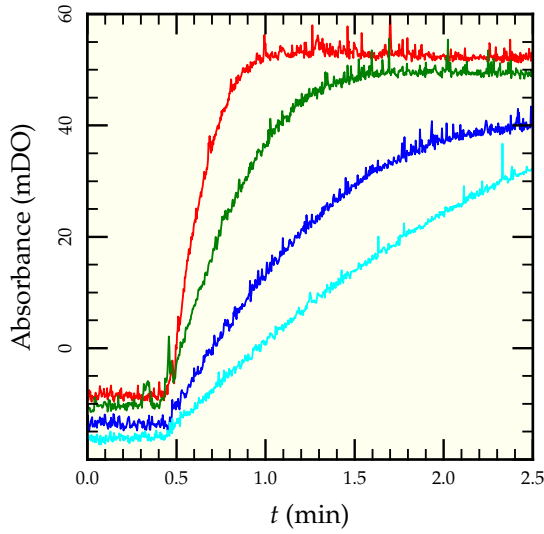


FIG. 5.13: Cinétiques de réduction à 553 nm du c_6 par le NADPH en présence de différentes concentrations de FNR : — : 750 nM, — : 300 nM, — : 150 nM, — : 75 nM.

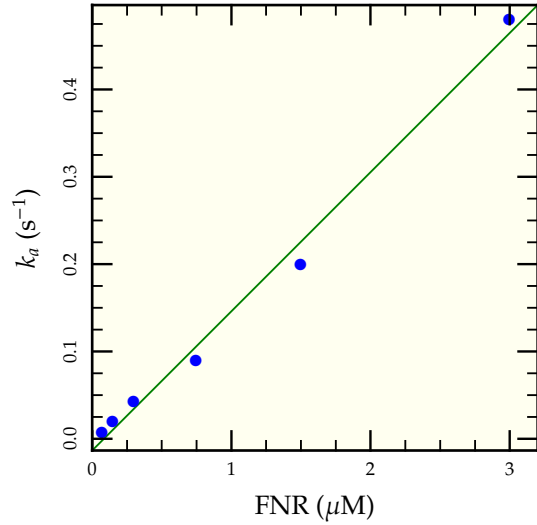
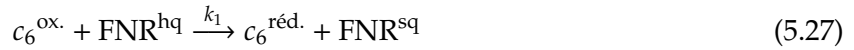


FIG. 5.14: Constantes apparentes du pseudo-premier ordre pour diverses concentrations de FNR.



où FNR^{sq} et FNR^{hq} représentent respectivement les forme semiquinone (réduite à un électron) et hydroquinone (réduite à deux électrons) de la FNR. En l'absence d'autres informations, on ne peut pas préciser les valeurs réelles des constantes de réactions. On peut tout de même supposer que l'une d'entre elles doit être de l'ordre de grandeur de la constante suivante, et que l'autre doit être du même ordre ou plus faible.

$$k_{\text{FNR } c_6} = 1,6 \pm 0,1 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1} \quad (5.29)$$

De plus, puisque la constante de vitesse apparente du pseudo-premier ordre des cinétiques dépend linéairement de la concentration de FNR, on peut considérer qu'aucun complexe entre le c_6 et la FNR ne se forme dans ces conditions. Notons que la vitesse de réaction entre la FNR et le c_6 est pratiquement deux ordres de grandeur plus petite que celle entre la ferrédoxine et le c_6 ; nous n'en tiendrons pas compte dans l'analyse des données sur la chaîne complète.

5.3.3 Réactions directes avec l'électrode

Le court-circuit le plus gênant est le suivant : que se passe-t-il si les espèces réduites de bas potentiel produites réagissent directement avec l'électrode ? Comme le potentiel de l'électrode est beaucoup plus élevé, les espèces de bas potentiel seraient réoxydées et le bilan serait nul. Il a donc été nécessaire d'effectuer quelques tests pour estimer ces courants de réoxydation. Pour cela, on maintient une électrode modifiée à un potentiel fixe dans la microcellule en plexiglas dans laquelle on a placé une solution de ferrédoxine oxydée et de FNR. À un instant donné, une grande quantité de NADPH est introduite dans la cellule ; la ferrédoxine est instantanément réduite, et l'on observe sa réoxydation à l'électrode. La figure 5.15 montre les courbes obtenues pour différentes valeurs du potentiel appliqué :

- Pour un potentiel de 0,3 V vs Ag/AgCl, on observe une réponse qui ressemble à ce que l'on verrait dans le cas d'un échelon de potentiel classique, mais moins pentu. Le courant est limité à la fois par la diffusion et par les réactions à l'électrode.
- Pour un potentiel de 50 mV vs Ag/AgCl, on obtient une courbe similaire, mais plus «plate» : les limitations à l'électrode se font plus sentir que dans le cas précédent.
- Pour un potentiel de -0,2 V vs Ag/AgCl, on n'observe rien : la ferrédoxine ne peut plus réagir de manière significative à un tel potentiel.

Pour les bas potentiels, les données précédentes montrent clairement qu'il n'y a aucune possibilité de court-circuit directement de la ferrédoxine à l'électrode. Ces résultats semblent néanmoins semer le doute quant aux potentiels plus élevés. Pour comprendre ces réactions, des électrodes ont été fonctionnalisées avec du mercaptopropanol mélangé avec de l'acide mercaptopropanoïque en différentes quantités. Les électrodes présentent une charge nette négative due à l'acide et la cinétique d'interaction avec la ferrédoxine est considérablement ralentie. Il en est de même pour le c_6 , quoi que dans une bien moindre mesure. Il est ainsi possible d'obtenir une électrode réagissant raisonnablement bien avec le c_6 et plus du tout avec la ferrédoxine. Des mesures d'activité catalytique dans ces conditions n'ont montré aucune différence par rapport aux électrodes classiques, éliminant les possibilités d'interférences de ces réactions. Le courant important observé sur la figure 5.15 doit vraisemblablement être attribué aux concentrations très importantes de NADPH employées : ils ne peuvent représenter que des majorations grossières.

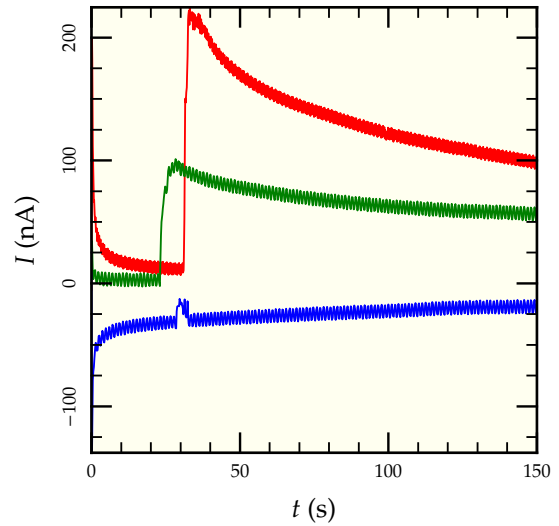


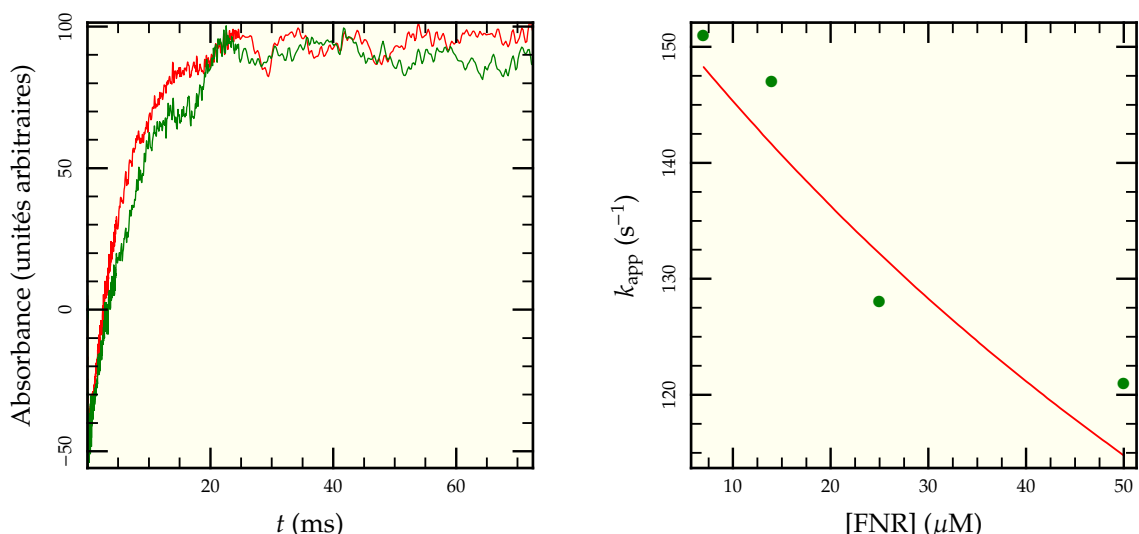
FIG. 5.15 : Échelon de potentiel en présence de ferrédoxine et de FNR. Les discontinuités correspondent aux additions de NADPH. — : 0,3 V vs Ag/AgCl, — : 0,05 V vs Ag/AgCl, — : -0,2 V vs Ag/AgCl.

5.3.4 Complexation ferrédoxine oxydée–FNR

Suivant les conditions, la FNR complexe une partie plus ou moins grande de la ferrédoxine oxydée. Bien que cette réaction ne soit pas à proprement parler un court-circuit, elle a une influence considérable sur les résultats que l'on peut tirer des mesures électrochimiques. Il existe une méthode particulièrement élégante pour mesurer cette constante de dissociation, mise au point par Nicolas Cassan et Pierre Sétif [26]. Elle repose sur les particularités d'un mutant de la sous-unité PsaE du photosystème I, R39Q. Ce mutant a une affinité beaucoup moins élevée que le PSI sauvage pour la ferrédoxine, ce qui implique que dans des conditions de concentrations relativement faibles (quelques micromolaires de ferrédoxine, cinq fois moins de PSI), la réaction entre le PSI et la ferrédoxine est du second ordre.

Des mesures spectrométriques ont été effectuées dans des cuves contenant 4,6 μM de ferrédoxine, 0,95 μM de PSI et des concentrations variables de FNR. Les photoréactions sont initiées par un flash laser ; les changements d'absorption qui s'ensuivent sont mesurés à 580 nm (figure 5.16a). On observe dans ces conditions une réduction de la FNR dont l'étape cinétiquement déterminante est la réaction entre le photosystème I et la ferrédoxine. Comme la FNR réoxyde la ferrédoxine de manière efficace dans ces conditions, la cinétique observée est du pseudo-premier ordre avec une constante de vitesse

$$k_{\text{app.}} = k_{\text{PSI Fd}} [\text{Fd}]_{\text{libre}} \quad (5.30)$$



(a) Cinétiques observées à 580 nm. — est à $7 \mu\text{M}$ de FNR intermédiaire tandis que — est à $50 \mu\text{M}$. On peut voir un léger ralentissement de la cinétique de la seconde par rapport à la première.

(b) Constantes de vitesse apparente du premier ordre en fonction de la concentration de FNR intermédiaire, ainsi que la modélisation pour un K_d de $140 \mu\text{M}$

FIG. 5.16: Mesures du K_d entre la FNR intermédiaire et la ferrédoxine oxydée

où $[\text{Fd}]_{\text{libre}}$ est la concentration de ferrédoxine non complexée par la FNR :

$$[\text{Fd}]_{\text{libre}} = \frac{[\text{Fd}]_0 - [\text{FNR}]_0 - K_d + \sqrt{([\text{Fd}]_0 + [\text{FNR}]_0 + K_d)^2 - 4 [\text{Fd}]_0 [\text{FNR}]_0}}{2} \quad (5.31)$$

Les concentrations indicées ₀ sont les concentrations totales des espèces concernées. Il suffit alors d'ajuster les paramètres $k_{\text{PSI Fd}}$ et K_d pour obtenir la meilleure représentation des données (figure 5.16b). La constante d'association avec la ferrédoxine oxydée a été mesurée pour les deux formes de FNR utilisées au cours de cette thèse, la forme intermédiaire (FNRmed) et la forme courte (FNRs)¹¹. Dans les conditions de tampon utilisées dans les mesures électrochimiques, les constantes de complexation valent respectivement $140 \mu\text{M}$ (FNRmed) et $21 \mu\text{M}$ (FNRs).

5.4 Étude de la chaîne complète

Nous avons vu les raisons qui nous ont amenés à construire la chaîne que nous avons étudiée. Par ailleurs, nous avons vu comment on peut mesurer certaines des réactions parasites – potentielles ou bien réelles. Maintenant, nous sommes en mesure d'analyser les données obtenues sur la chaîne complète en électrochimie. Nous allons d'abord nous intéresser à quelques considérations sur la saturation lumineuse ; nous verrons ensuite différents jeux de données permettant la mesure de différents paramètres cinétiques du système complet.

5.4.1 Considérations sur l'influence de l'intensité d'éclairement

Avant toute autre considération, il est important de s'intéresser à l'effet de la lumière sur les expériences : dans quelle mesure la lumière est-elle un facteur limitant ? Comment s'assurer que les résultats obtenus ne dépendent pas ou peu de l'intensité de l'éclairement ?

Les réponses sont naturellement fonction de ce que l'on cherche à mesurer. Nous allons ici envisager deux cas de figure :

¹¹Voir page 15 et [26].

- d'abord le cas le plus simple où l'étape cinétiquement déterminante se situe au niveau du photosystème I ;
- ensuite, le cas où l'étape cinétiquement déterminante est en aval du photosystème I.

Cas 1 : PSI cinétiquement déterminant

Nous allons d'abord nous intéresser au cas où l'étape cinétiquement déterminante est localisée au niveau du photosystème I : il s'agit soit de l'interaction avec le donneur soit de celle avec l'accepteur. Dans tous les cas, la luminosité que l'on peut obtenir en éclairage continu est beaucoup trop faible pour saturer les capacités de séparation de charge du photosystème I¹². La réaction



a donc une constante de vitesse proportionnelle au nombre de photons reçus par unité de temps, c'est-à-dire à l'intensité lumineuse :

$$k_\ell \propto I \quad (5.33)$$

Dans le cas où les réactions cinétiquement déterminantes sont au niveau du PSI, on peut considérer que les réactions qui ramènent l'état de séparation de charge au repos sont les suivantes :



k_1 correspond aux réactions du côté accepteur (ferrédoxine) tandis que k_2 aux réactions du côté donneur (cytochrome c_6). Pour plus de clarté, on a supposé que l'état de séparation de charge est systématiquement réoxydé avant d'être réduit. On aurait pu s'intéresser à l'autre possibilité ou aux deux en même temps, mais cela n'a pas d'influence sur les résultats qualitatifs obtenus. Par ailleurs, on a considéré que toutes les réactions sont du premier ordre, étant donné que si les réactions au niveau du photosystème I sont cinétiquement déterminantes, les concentrations de ses partenaires ne varient pas ; il s'agit de réactions du pseudo-premier ordre. Le nombre d'électrons qui traversent le PSI par unité de temps est alors donné par la formule suivante :

$$i = k_1 [\text{PSI}^{+-}] = k_2 [\text{PSI}^+] = k_\ell [\text{PSI}] \quad (5.36)$$

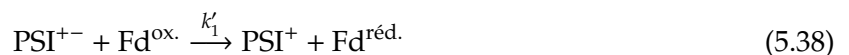
En appliquant l'approximation de l'état quasi-stationnaire aux différentes espèces du photosystème I, on aboutit à

$$i = \frac{k_1 k_2 k_\ell}{k_1 k_2 + k_1 k_\ell + k_2 k_\ell} [\text{PSI}]_0 \quad (5.37)$$

où l'on a noté $[\text{PSI}]_0$ la concentration totale en photosystème I. À la lecture de cette expression, on peut dire que la saturation lumineuse intervient quand k_ℓ est sensiblement supérieur en ordre de grandeur à k_1 et k_2 . Il n'est pas possible de jouer sur les conditions de saturation autrement qu'en augmentant la luminosité de la source.

Cas 2 : réaction cinétiquement déterminante en aval du PSI

On suppose maintenant qu'une réaction en aval du PSI est cinétiquement déterminante. Pour en tenir compte, on modifie la réaction (5.34) en



¹²L'état de séparation de charge prend moins d'une microseconde à être formé [9], en conséquence, le PSI peut potentiellement absorber 10^6 électrons par seconde. On verra qu'on est loin de ces valeurs au cours de nos expériences.

On modélise par ailleurs la réaction aval cinétiquement déterminante de la manière suivante :



En appliquant l'approximation des états quasi-stationnaires à la ferrédoxine et au PSI, on aboutit aux concentrations suivantes :

$$[\text{PSI}^{+-}] = \frac{1}{2} k_3 \left[\beta + \sqrt{\beta^2 + \frac{[\text{PSI}]_0}{k'_1 k_3}} \right] \quad (5.40)$$

$$[\text{Fd}^{\text{ox.}}] = \frac{k_3}{k'_1 [\text{PSI}^{+-}] + k_3} [\text{Fd}]_0 \quad (5.41)$$

$$\beta = \frac{[\text{PSI}]_0}{k_3} - \frac{1}{k'_1} - [\text{Fd}]_0 \left[\frac{1}{k_\ell} + \frac{1}{k_2} \right] \quad (5.42)$$

Ceci aboutit à un courant

$$i = \frac{k_1 k_3 [\text{PSI}^{+-}]}{k'_1 [\text{PSI}^{+-}] + k_3} [\text{Fd}]_0 \quad (5.43)$$

Ce qu'il est important de voir, c'est que dans ce cas, si la concentration totale du photosystème I augmente, la valeur de β devient de moins en moins sensible aux variations de k_ℓ , donc aux conditions d'éclairement : plus il y a de photosystème, plus le système est proche de la saturation lumineuse. Ceci est cohérent dans la mesure où l'augmentation de la concentration de PSI repousse les étapes cinétiquement déterminantes en aval du PSI.

Dans la microcellule

Des paragraphes précédents il ressort que plus on a de photosystème I présent en solution, moins on a de problèmes potentiels avec la saturation lumineuse. En réalité, c'est plus complexe : la couche explorée au cours d'une mesure électrochimique est très localisée au voisinage de l'électrode, surtout dans les cas d'un recyclage catalytique. Il faut donc s'assurer que l'intensité lumineuse n'est pas trop faible à l'électrode. Or, pour arriver à l'électrode, dans les microcellules utilisées, il faut traverser de 1 à 2 millimètres de solution. Bien que cela ne paraisse pas beaucoup, il faut savoir que 1,6 μM de photosystème I absorbent 90% de la lumière sur une épaisseur de 1 mm au maximum d'absorption de la chlorophylle à 679 nm. Il est donc important de garder une concentration de photosystème I raisonnable pour éviter que l'intensité lumineuse au niveau de l'électrode soit trop faible. Comme par ailleurs, les deux paragraphes précédents ont montré que l'on a plutôt intérêt à garder la concentration élevée, la concentration utilisée relève d'un compromis. En pratique, des concentrations de 0,6 μM à 1,2 μM ont été utilisées, les conditions optimales se trouvant vers 0,9 μM .

5.4.2 Réaction c₆ – PSI

La réaction la plus facile à explorer est la première réaction de la chaîne. C'est donc celle qui a été étudiée en premier. Pour ce faire, il suffit d'utiliser de petites quantités de cytochrome c₆ de sorte à ce que la première réaction de la chaîne soit cinétiquement déterminante. La figure 5.17 montre quelques uns des voltamogrammes obtenus. Pour exploiter ces courbes, on reprend l'analyse effectuée dans le cas du méthylviologène, page 43. Le paramètre que l'on tire de ces données est l'efficacité catalytique, soit le rapport entre le courant plateau et le courant du pic de réduction du c₆ à l'obscurité. Pour ces courbes, on trouve une efficacité catalytique de $\eta = 5,6$. À l'aide de l'équation (5.15), on peut aisément remonter à la constante apparente du pseudo-premier ordre :

$$k_a = 0,198 \times f v \eta^2 = 2,45 \text{ s}^{-1} \quad (5.44)$$

À partir de cette constante apparente et de la concentration de photosystème I, $0,42 \mu\text{M}$, on peut remonter à la constante de réaction du second ordre :

$$k_{c_6 \text{ PSI}} = \frac{k_a}{[\text{PSI}]} = 5,8 \pm 0,2 \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1} \quad (5.45)$$

Cette constante cinétique est parfaitement en accord avec celle trouvée précédemment par des méthodes électrochimiques en utilisant le méthylviologène [64]. On peut de plus observer sur la figure 5.17 que le voltamogramme à l'éclairement maximal, —, est très proche de celui pour un éclairement de 70% —, ce qui indique que les conditions d'éclairement sont saturantes : les résultats obtenus ne dépendent pas de l'éclairement.

Calculons maintenant le nombre d'électrons moyen passant à travers chaque photosystème pour le voltamogramme —. L'équation (5.13) indique que la couche active au voisinage de l'électrode a une épaisseur de l'ordre de

$$\ell = \sqrt{\frac{D_{c_6}}{k_a}} = 7 \mu\text{m} \quad (5.46)$$

Ceci implique qu'en moyenne, chaque photosystème dans la couche active voit passer un nombre d'électrons par seconde de l'ordre de

$$n = \frac{j}{\mathcal{F} [\text{PSI}] \ell} = 75 e^- \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{PSI}^{-1} \quad (5.47)$$

Il est clair que cette valeur est très en-deçà des possibilités maximales du photosystème I.

5.4.3 Réaction PSI – Ferrédoxine

Puisque l'on vient de voir que la réaction entre le photosystème I et le cytochrome c_6 est limitante pour des faibles concentrations de c_6 , il faut donc l'augmenter de manière conséquente pour explorer au-delà de cette première étape. C'est le travail qui a pris le plus de temps au long de cette thèse, pour des raisons qui seront bientôt apparentes. Nous allons d'abord nous intéresser aux différents jeux de données qui ont été obtenus au cours de cette thèse. Nous verrons ensuite comment les analyser, et quelles informations on a su en tirer.

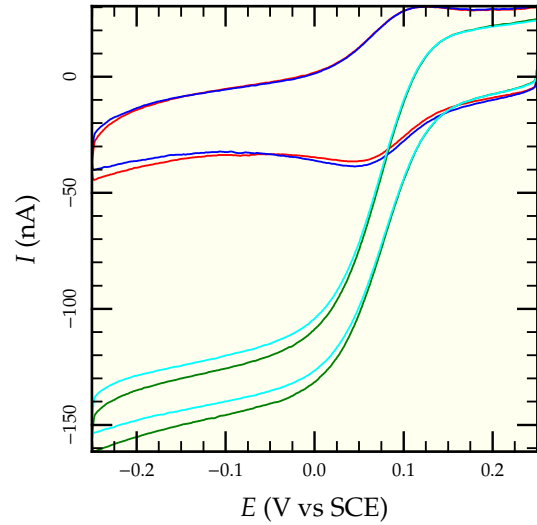


Fig. 5.17: Quelques voltammogrammes à $10 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ dans les conditions suivantes : $15 \mu\text{M } c_6$, $3 \mu\text{M}$ ferrédoxine, $3 \mu\text{M}$ FNR, $0,42 \mu\text{M}$ photosystème I et 9 unités de GLDH. — et — sont à l'obscurité, — avec un éclairement relatif de 100% et — un éclairement de 70%.

Différents jeux de données

Des expériences d'ajout ont été menées à différentes étapes dans des conditions différentes. Nous allons ici essentiellement nous intéresser à trois jeux de données, qui reflètent les autres obtenus dans des conditions similaires et aux mêmes périodes :

- le premier jeu a été enregistré fin 2004/début 2005 avec du photosystème I de *Thermosynechococcus elongatus*, de la FNR intermédiaire et $[c_6] = 100 \mu\text{M}$;
- le second a été enregistré fin 2005 avec du photosystème I de *Synechocystis* PC6803, de la FNR courte et $[c_6] = 100 \mu\text{M}$;
- le troisième a été enregistré dans les mêmes conditions que le second avec cependant $[c_6] = 80 \mu\text{M}$, mi 2006, et contient en outre des échantillons avec un photosystème I muté.

Dans tous les échantillons, la ferrédoxine et la FNR proviennent de *Synechocystis*, le cytochrome c_6 de *Thermosynechococcus elongatus* et la GLDH provient de *Proteus* et est utilisée à raison de 9 unités pour $75 \mu\text{L}$. La GLDH a été achetée chez différents fournisseurs étant donné que dans un nombre important de cas, les lots obtenus étaient en-deçà de leurs activités spécifiques dans un facteur 50 à 100. Le premier jeu est celui pour lequel les meilleurs résultats ont été obtenus, même s'il est moins complet que les suivants. On peut s'en rendre compte sur la figure 5.18 : les voltamogrammes obtenus ne présentent pas la moindre trace de bosse suspectieuse sur le balayage retour et les efficacités catalytiques observées sont importantes. C'est pour cela que nous allons baser nos analyses essentiellement sur ce jeu.

Quelques voltamogrammes des jeux 2 et 3 sont représentés figures 5.19a et 5.19b respectivement. On peut voir d'emblée que la qualité du recyclage du NADP^+ est bien inférieure à celle du premier jeu : les voltamogrammes sous éclaircissement présentent un faible pic au retour, ce qui n'est pas le cas du premier jeu. Par ailleurs, on constate aussi que pour des conditions apparemment identiques, les courants catalytiques du jeu 3 sont beaucoup plus faibles que ceux du jeu 2, qui sont eux-même sensiblement plus faibles que ceux du premier jeu¹³. Un effort important a été consacré à l'élucidation de ces différences sans grands résultats : d'autres stocks de FNR, photosystème I, ferrédoxine, cytochrome c_6 et de GLDH ont été testés et les tampons légèrement modifiés. De manière épisodique et apparemment décorrélée avec les conditions, des expériences de tests ont montré des conditions de recyclage satisfaisantes, mais aucune de ces conditions n'a pu être reproduite pour des expériences plus longues. L'ensemble a malheureusement consommé un nombre important de ressources, tant du côté des protéines que du temps disponible. L'hypothèse la plus probable est une dégradation lente du substrat de la GLDH, l' α -kétooglutarate : ceci expliquerait pourquoi l'on observe une diminution des activités catalytiques au cours des deux dernières années de la thèse. Cependant, cette hypothèse ne permet pas d'expliquer les expériences épisodiques qui offrent de bonnes conditions de recyclage. La question n'a pas pu être explorée plus en détail faute de temps.

Les différents jeux ont été réalisés avec des concentrations de photosystème I assez variables¹⁴. Pour être en mesure de comparer les catalyses dans différentes conditions, on a tracé la constante

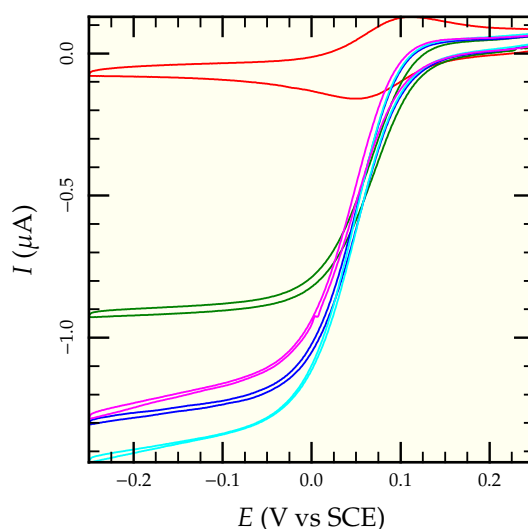


FIG. 5.18: Voltamogrammes du premier jeu de données.

¹³Il est vrai que, comme les sources de photosystème I et la FNR ont changé entre le premier et le second jeu, ces données ne sont pas comparables. Certaines expériences, hélas trop peu nombreuses, nous ont cependant montré que dans de meilleures conditions de recyclage du NADP^+ , les courants catalytiques observés étaient sensiblement plus élevés

¹⁴La raison en est simple : le PSI est stocké en quantités assez faibles, et les effets de concentration par séchage sont assez importants, ce qui ajoute une grande incertitude sur la quantité ajoutée. Par ailleurs, les quantités mises en jeu sont relativement petites, et les erreurs de pipetage ne sont pas à exclure. Ces incertitudes sont levées systématiquement *a posteriori* par dosage spectrométrique de l'échantillon.

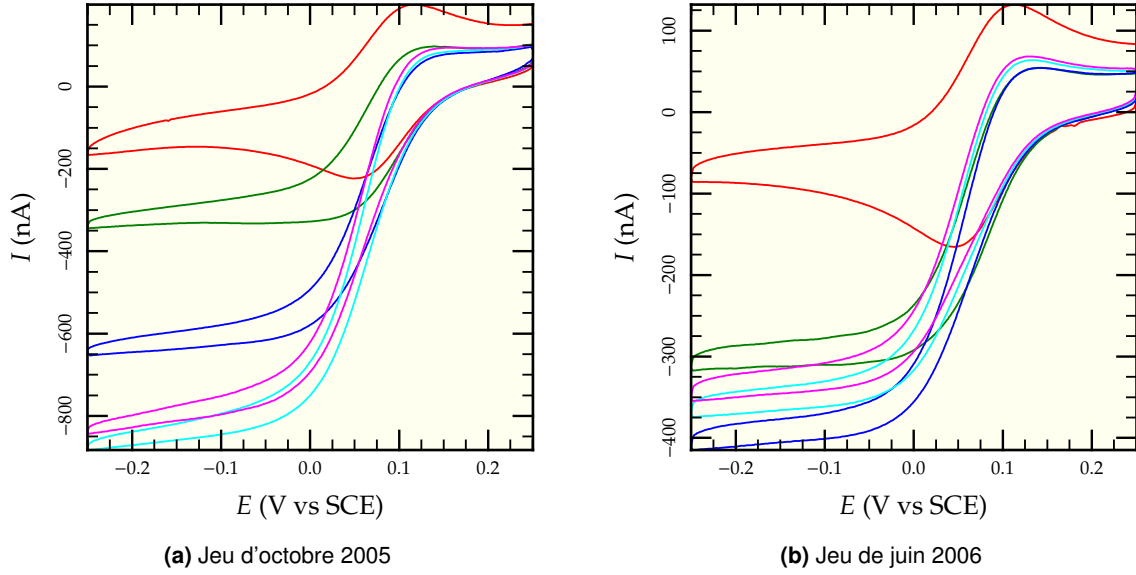


FIG. 5.19: Extraits des jeux de données utilisant la FNR courte et le photosystème I de *Synechocystis*. Il y a 5 μM de FNR dans les deux jeux, et la concentration en ferrédoxine varie d'une courbe à l'autre. Des couleurs identiques entre les deux figures correspondent à des concentrations en ferrédoxine très proches. On peut voir une différence nette entre les deux jeux, qui ne peuvent pas être expliquée simplement par la diminution de 20% de la concentration de c_6 . Par ailleurs, on voit bien que sur 5.19b, le pic au retour est plus marqué que sur 5.19a, signe que la qualité du recyclage du NAPD^+ s'est dégradée entre les deux jeux.

du second ordre apparente $k_{\text{app.}}$ définie par la relation suivante¹⁵ :

$$j = \mathcal{F} [c_6]_0 \sqrt{D_{c_6} k_{\text{app.}} [\text{PSI}]} \quad (5.48)$$

ou encore, en fonction de l'efficacité catalytique

$$k_{\text{app.}} = 0,198 \times \frac{f v \eta^2}{[\text{PSI}]} \quad (5.49)$$

La figure 5.20 montre l'évolution de $k_{\text{app.}}$ en fonction de la concentration en ferrédoxine pour différentes valeurs de la concentration en FNR. Trois particularités sont immédiatement visibles :

- Les valeurs de $k_{\text{app.}}$ sont sensiblement inférieures à la valeur de la constante $k_{c_6 \text{ PSI}}$ trouvée dans la section précédente, ce qui implique que l'on n'est plus limité par la réaction entre le cytochrome c_6 et le PSI.
- Les valeurs de $k_{\text{app.}}$ à différentes concentrations en FNR coïncident pour les faibles concentrations en ferrédoxine ; ceci suggère que les caractéristiques observées dans cette région sont essentiellement reliées à la réaction entre la ferrédoxine et le photosystème I, c'est-à-dire la réaction qui nous intéresse à présent.
- $k_{\text{app.}}$ croît comme attendu pour les faibles concentrations en ferrédoxine, mais se met à décroître pour des valeurs plus élevées.

La figure 5.21 montre les comparaisons entre les différents jeux de données. On peut voir d'emblée que les résultats du troisième jeu ($\blacklozenge$ et $\blacktriangle$) sont très irréguliers et peu fiables. Les jeux 1 et 2, s'ils forment chacun séparément un ensemble cohérent, ne sont pas cohérents entre eux ; ceci s'explique en partie seulement par le fait que la FNR et le photosystème I sont différents, la cause principale étant la dégradation des conditions de recyclage.

¹⁵On montrera au paragraphe suivant que, sous certaines conditions, cette constante est effectivement indépendante de la concentration en photosystème I.

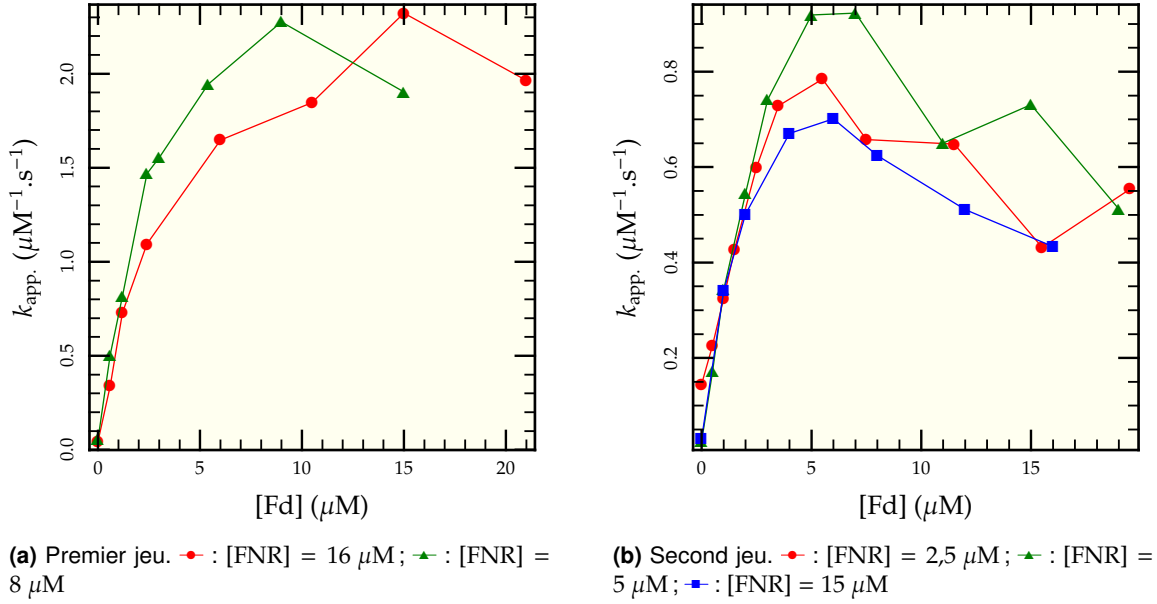


FIG. 5.20: Valeurs mesurées de la constante apparente du second ordre k_{app} pour les deux premiers jeux de données

Modèle analytique

Pour extraire les informations cinétiques des courbes du k_{app} obtenues précédemment, il est préférable d'utiliser un modèle analytique si possible. Dans cette optique, nous allons supposer que la réaction (5.50) de recyclage de la ferrédoxine est suffisamment rapide pour considérer que la ferrédoxine réduite libre est immédiatement réoxydée par la FNR¹⁶. Ainsi, en tout point de la solution, on a $[Fd^{ox.}] = [Fd]_0$, ce que l'on nommera «conditions de recyclage total».



Comme précédemment, on va s'intéresser uniquement au courant catalytique obtenu lorsque l'on atteint le plateau, c'est à dire quand le système atteint un état stationnaire. Dans ces conditions, si l'on suppose de plus que la diffusion du photosystème I est négligeable devant celle du c_6 , ce qui est légitime étant données leur tailles respectives, la vitesse de réoxydation du c_6 en un point de la solution dépend uniquement des concentrations respectives en c_6 réduit et oxydé. L'équation qui régit l'état stationnaire a donc la forme suivante :

$$D_{c_6} \frac{d^2 [c_6^{ox.}]}{dx^2} = g([c_6^{ox.}]) \quad (5.51)$$

où g est une certaine fonction de la concentration de cytochrome oxydé qui représente la vitesse de production de $c_6^{ox.}$ par les réactions homogènes. On peut obtenir une forme plus propice en multipliant par le gradient de concentration de c_6 oxydé et en intégrant entre x et l'infini (soit le milieu non perturbé par les réactions à l'électrode) :

$$D_{c_6} \left[\left(\frac{d[c_6^{ox.}]}{dx} \right)^2 - \left(\frac{d[c_6^{ox.}]}{dx} \right)^2 \right]_{x=\infty}^x = 2 \int_{x'=\infty}^x g([c_6^{ox.}]) dx' \quad (5.52)$$

Cette équation n'admet pas de solution analytique générale, mais cela n'est pas nécessaire puisque

¹⁶Ceci implique entre autres de négliger le court-circuit c_6 -ferrédoxine.

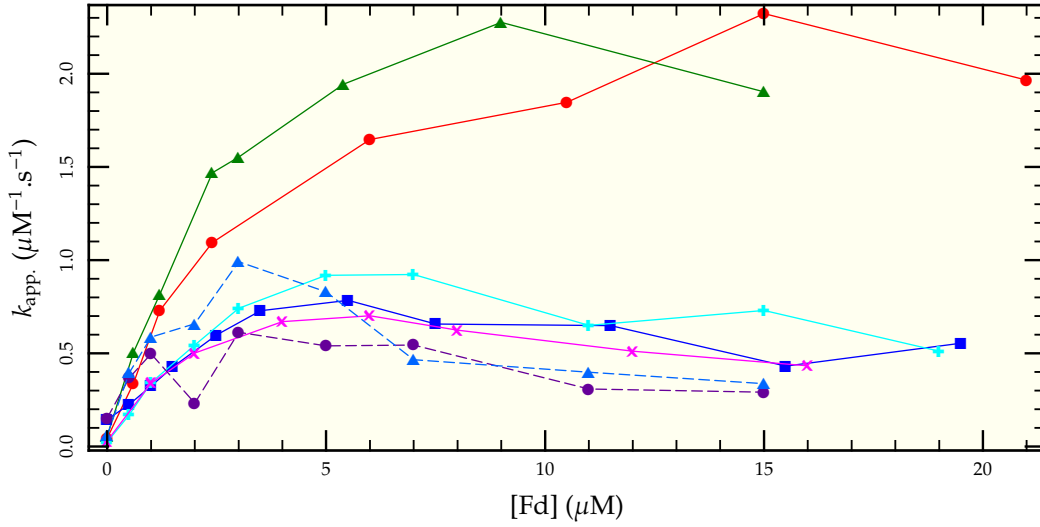


FIG. 5.21: Comparaison du $k_{app.}$ des trois différents jeux

l'on peut directement en extraire la densité de courant¹⁷ :

$$j = \mathcal{F} D_{c_6} \left. \frac{d[c_6^{ox.}]}{dx} \right|_{x=0} = \mathcal{F} \sqrt{2 D_{c_6} \int_{x=+\infty}^{x=0} g([c_6^{ox.}]) dx} \quad (5.53)$$

Remarquons que, habituellement, $[c_6^{ox.}]_{x=\infty}$ est la concentration initiale de c_6 oxydé. Dans des conditions réversibles, la concentration en $x = 0$ est celle imposée par Nernst. On peut vérifier ce résultat en remarquant que si l'on prend $g([c_6^{ox.}]) = k_{app.} [c_6^{red.}]$, on retrouve l'équation (5.14).

Il s'agit maintenant de savoir quelle est la fonction g dans le cas qui nous intéresse. En plus de l'équation (5.50), nous allons nous intéresser au mécanisme suivant :



Nous allons en outre supposer que la vitesse de la réaction (5.54) est suffisamment grande pour ne pas influencer sur le résultat ; ceci revient à supposer que les mesures ont été effectuées à la saturation lumineuse. Dans ces conditions, appliquer l'approximation de l'état quasi-stationnaire pour les différentes espèces du photosystème I donne une vitesse de production du c_6 oxydé de

$$v_{c_6} = \frac{[PSI]_0}{\frac{1}{k_1 [c_6^{red.}]} + \frac{1}{k_{on} [Fd^{ox.}]} + \frac{1}{k_{off}}} = g([c_6^{ox.}]) \quad (5.58)$$

D'après l'équation (5.53), il suffit maintenant d'intégrer cette équation entre $[c_6^{ox.}] = [c_6]_0$ (à l'infini) et $[c_6^{ox.}] = 0$ (à l'électrode) pour obtenir le courant. On peut le mettre sous la forme suivante [64] :

$$j = \mathcal{F} [c_6]_0 \sqrt{D_{c_6} k_{app.} [PSI]} \quad (5.59)$$

¹⁷On rappelle que le gradient de concentration est nul à l'infini par hypothèse.

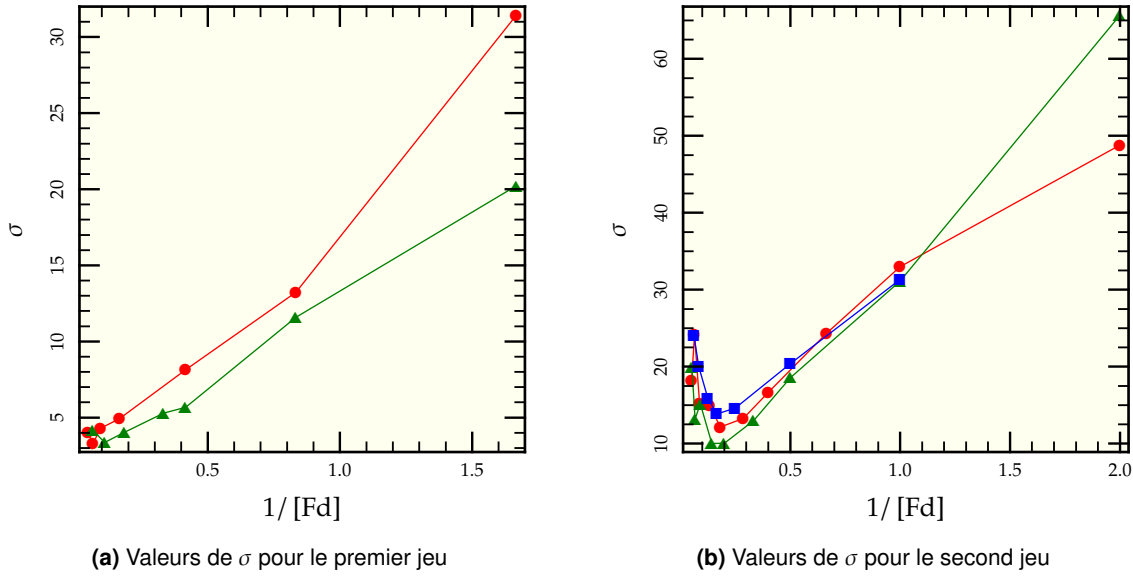


FIG. 5.22: Valeurs de σ en fonction de l'inverse de la concentration de ferrédoxine. Les couleurs correspondent à celles des figures 5.20a et 5.20b.

où $k_{app.}$ est une constante apparente du second ordre [127] :

$$k_{app.} = 2k_1 \left(\frac{1}{\sigma} + \frac{\ln[1 + \sigma]}{\sigma^2} \right) \quad (5.60)$$

Le paramètre adimensionné σ est une mesure du rapport entre les réactions au côté accepteur du photosystème I et les réactions au côté donneur :

$$\sigma = k_1 [c_6]_0 \left(\frac{1}{k_{on} [Fd]_0} + \frac{1}{k_{off}} \right) \quad (5.61)$$

Toutes les concentrations dans cette équation sont prises en $x = 0$. En conséquence, $[c_6^{red.}] = [c_6]_0$ car tout le cytochrome est réduit à l'électrode. Ainsi, il suffit de tracer σ en fonction de l'inverse de la concentration de ferrédoxine pour aboutir à une droite. S'il n'est pas possible d'inverser analytiquement l'équation (5.60), il est en revanche aisé de la résoudre numériquement. Le logiciel Octave [128], un équivalent libre de Matlab, a été utilisé dans ce but. La figure 5.22 montre σ en fonction de l'inverse de la concentration en ferrédoxine pour les deux premiers jeux. En particulier, on peut voir sur la figure 5.22a que pour une concentration de FNR de 16 μM , la courbe obtenue est une droite pour une gamme assez importante de concentrations de ferrédoxine. Ceci laisse à penser que dans cette partie, les conditions de recyclage total sont légitimes. Il suffit d'ajuster par une droite pour obtenir les constantes recherchées :

$$k_{on} = 7 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1} \quad \text{et} \quad k_{off} = 3500 \pm 300 \text{ s}^{-1} \quad (5.62)$$

Contrairement à la section précédente, on ne peut pas obtenir une expression analytique simple pour le nombre d'électrons traversant un photosystème I par unité de temps, puisque l'on ne peut pas calculer le profil de concentration dans la cellule. On peut cependant l'estimer en supposant que la formule (5.46) reste valable. On obtient alors pour les courants les plus forts du premier jeu,

$$\ell = 6 \mu\text{m} \quad \text{donc} \quad n \approx 230 \text{ s}^{-1} \quad (5.63)$$

Le second jeu (figure 5.22b) montre des propriétés très similaires au premier jeu pour les petites concentrations en ferrédoxine. Par contre, pour les concentrations plus importantes, la

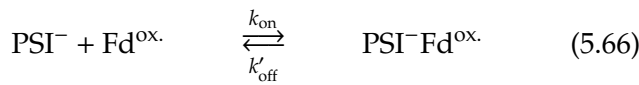
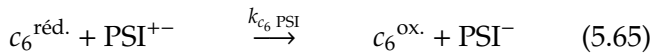
courbe s'infléchit et présente un minimum. Nous allons essayer d'en rendre compte en prenant en considération la complexation de la ferrédoxine oxydée par la FNR, car elle la rend indisponible pour la réduction par le photosystème I. Partant de là, on peut essayer de corriger les données en traçant σ non pas en fonction de la concentration totale de ferrédoxine, mais en fonction de la concentration de ferrédoxine libre, c'est-à-dire non complexée par la FNR (voir équation (5.31)). On voit que la complexation n'aura aucune influence ou presque sur le premier jeu, puisque la valeur de la constante de dissociation est particulièrement élevée pour la forme intermédiaire de la FNR. En revanche, pour le second jeu, le K_d est exactement dans la gamme de concentrations où le comportement inattendu est observé. Cependant, sa prise en compte ne permet pas d'expliquer les observations expérimentales.

Simulations

Les méthodes analytiques nous ont déjà permis d'extraire les informations cinétiques de la réaction entre le photosystème I et la ferrédoxine. Pour aller plus loin dans l'exploitation des données, il est nécessaire de procéder à des simulations numériques. Elles ont été réalisées par Christophe Demaille à Jussieu au moyen du logiciel DigiElch.

Ces simulations requièrent un modèle cinétique complet. Puisque l'on s'intéresse essentiellement aux conditions qui aboutissent à un recyclage total du NADP^+ , on peut négliger tout fonctionnement inverse de la FNR, ainsi que tous les détails liés au fonctionnement de la GLDH; il suffit de supposer que tout le NADPH libre redevient immédiatement du NADP^+ . Le mécanisme de réoxydation de la ferrédoxine par la FNR est tiré des travaux de Batie et Kamin [31], voir figure 5.23.

Commençons par résumer ici les réactions propres au fonctionnement du photosystème I. Une réaction désignée comme «rapide» elle est soit immédiate soit systématiquement à l'équilibre.



Dans ce mécanisme complet, on est maintenant en mesure de prendre en compte la réaction de court-circuit entre la ferrédoxine et le cytochrome c_6 :



Pour simplifier les notations, les espèces de FNR complexées avec du NADP^+ seront systématiquement indiquées en **gras**. La formation du complexe ternaire ferrédoxine oxydée, FNR et NADP^+ à partir de ferrédoxine et de complexe FNR/ NADP^+ s'écrit donc :

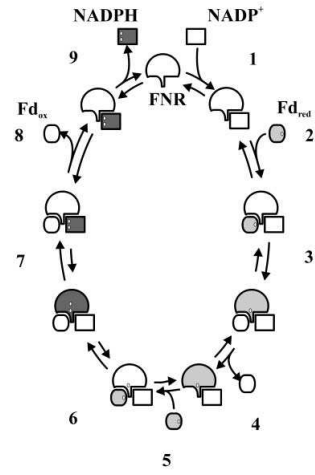
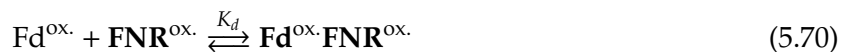
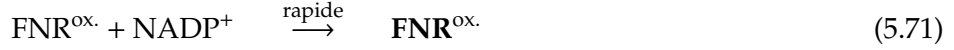


FIG. 5.23: Cycle catalytique de la FNR d'après Batie et Kamin [31]. L'image elle-même est extraite de la revue [42]. Les espèces blanches sont oxydées, grises, réduites à un électron et noires à deux électrons.

Enfin, on a traduit le cycle catalytique de la figure 5.23 par la série de réactions suivantes :



Il ne s'agit pas seulement de proposer un modèle cinétique, il faut aussi être en mesure d'estimer toutes les constantes impliquées dans les processus. Nous avons déjà mesuré $k_{c6 \text{ Fd}}$. k_{on} et k_{off} sont les constantes que l'on cherche à affiner, à partir des valeurs déterminées précédemment par l'approche analytique. La valeur exacte de k'_{off} est sans importance, puisque (5.66) est suivie par une réaction rapide, (5.67). En l'absence d'autres données, la valeur de k_{on} a été réutilisée pour k'_{on} . Les résultats sont quasiment indépendants de cette valeur précise. D'après [41], les transferts d'électrons au sein de la FNR, k_{ET1} et k_{ET2} sont de l'ordre $6\,200\text{ s}^{-1}$. Les constantes de dissociation K_{d1} à K_{d4} ont initialement été prises égales à la constante de dissociation K_d de l'équation (5.70). Cependant, il est rapidement apparu que ces constantes ne permettent pas de reproduire les caractéristiques observées, et en particulier la diminution de la catalyse à haute concentration en ferrédoxine. Sur des bases théoriques détaillées dans les pages suivantes, il a été choisi de tester des valeurs plus faibles de K_{d2} et K_{d4} . Il est alors apparu que la valeur exacte de K_{d4} importe peu, étant donné que la concentration de FNR^{hq} est maintenue à une valeur très faible par la réaction (5.78). En revanche, des valeurs de l'ordre de 2 à $6\text{ }\mu\text{M}$ pour K_{d2} permettent de reproduire de manière convaincante les courants catalytiques mesurés (figure 5.24). Les constantes utilisées pour les simulations sont résumées dans le tableau 5.1.

Par ailleurs, les simulations montrent que la valeur de k_{on} est sous-estimée par l'approche analytique en recyclage total de la ferrédoxine. Le courant catalytique à faible concentration de ferrédoxine est très sensible à la valeur exacte de k_{on} ; en ajustant dans ce domaine, on aboutit à une valeur de $2,3 \times 10^8\text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$, ce qui est sensiblement plus proche des valeurs mesurées par spectrométrie d'absorption en flash [24,25].

5.4.4 Discussion

Les mesures donnent une valeur de la constante d'interaction entre le photosystème I et le cytochrome c_6 cohérente avec les données de la littérature. Les mesures de k_{on} sont aussi cohérentes avec ce qui a été trouvé précédemment. En revanche, les présentes études ont permis de donner une valeur sensiblement plus grande que ce qui a été mesuré antérieurement pour la vitesse de dissociation du complexe entre la ferrédoxine réduite et le photosystème I ($k_{\text{off}} = 800\text{ s}^{-1}$ en mesures par flash dans [26] contre $k_{\text{off}} = 3500\text{ s}^{-1}$ ici).

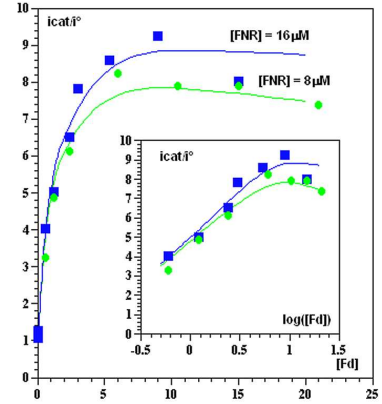


FIG. 5.24: Comparaison des courants catalytiques mesurés avec ceux simulés, pour une valeur de k_{d2} de $2,8\text{ }\mu\text{M}$.

Constante	Valeur	Commentaire
k_{c6} PSI	$6 \mu\text{M}^{-1}.\text{s}^{-1}$	[64], section 5.4.2
k'_{on}	$70 \mu\text{M}^{-1}.\text{s}^{-1}$	initialement prise égale à k_{on} , presque sans influence
k'_{off}	$3\,000 \text{ s}^{-1}$	initialement prise égale à k_{off} , sans influence
K_d	$140 \mu\text{M}$	section 5.3.4
K_{d1}	$140 \mu\text{M}$	prise égale à K_d , presque sans influence
K_{ET1}	$6\,200 \text{ s}^{-1}$	[41]
K_{d3}	$140 \mu\text{M}$	prise égale à K_d , presque sans influence
K_{ET2}	$6\,200 \text{ s}^{-1}$	[41]
K_{d4}	$140 \mu\text{M}$	prise égale à K_d , sans influence
k_{c6} Fd	$5,0 \mu\text{M}^{-1}.\text{s}^{-1}$	section 5.3.1
k_{on}	$230 \mu\text{M}^{-1}.\text{s}^{-1}$	
k_{off}	$3\,500 \text{ s}^{-1}$	
K_{d2}	$3 \mu\text{M}$ à $6 \mu\text{M}$	

TAB. 5.1: Constantes utilisées pour les simulations. Les constantes affichées en **gras** sont celles que l'on tire des simulations.

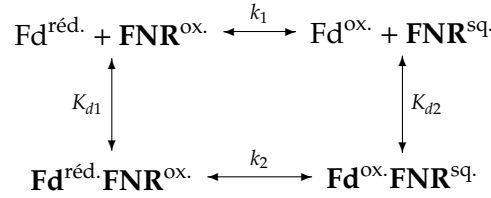


FIG. 5.25: Plusieurs manières de voir la première réduction de la FNR oxydée

De plus, la diminution de la catalyse à grande concentration de ferrédoxine apporte une mesure indirecte d'une constante de dissociation du complexe entre la ferrédoxine oxydée et la forme semi-réduite de la FNR, dans le complexe ternaire avec le NADP^+ , K_{d2} . Cette mesure n'a jusqu'à présent jamais été réalisée. En particulier, on voit que le complexe est beaucoup plus affiné qu'avec la FNR oxydée dans les mêmes conditions. Nous proposons ici un cheminement qui permet de justifier la valeur observée.

Si l'on suppose que les interactions entre la FNR et la ferrédoxine ne sont que faiblement influencées par l'état redox de la ferrédoxine, on peut en déduire que K_{d1} est du même ordre de grandeur que K_d . Par ailleurs, il a été rapporté que le potentiel de la ferrédoxine dans le complexe avec la FNR est plus bas qu'en solution. Considérons le schéma réactionnel de la figure 5.25 ; les lois de la thermodynamique impliquent que

$$k_1 = \frac{k_2 \times K_{d2}}{K_{d1}} \quad (5.79)$$

Par ailleurs, les constantes de réactions liées aux transferts d'électrons sont réglées par les différences de potentiels entre les espèces. Si l'on note e la différence entre le potentiel du couple $\text{Fd}^{\text{ox.}}/\text{Fd}^{\text{réd.}}$ et du couple $\text{FNR}^{\text{ox.}}/\text{FNR}^{\text{sq.}}$, et e' la même différence mais pour les couples au sein du complexe, on a alors :

$$k_1 = \exp\left[-\frac{\mathcal{F}e}{RT}\right] \quad \text{et} \quad k_2 = \exp\left[-\frac{\mathcal{F}e'}{RT}\right] \quad (5.80)$$

Il en découle la relation entre K_{d1} et K_{d2} :

$$\frac{K_{d1}}{K_{d2}} = \frac{k_2}{k_1} = \exp \left[-\frac{\mathcal{F}(e' - e)}{RT} \right] = \exp \left[-\frac{\mathcal{F} \Delta E}{RT} \right] \quad (5.81)$$

où ΔE représente le décalage relatif en potentiel des couples de la FNR et de la ferrédoxine dans le complexe par rapport aux couples en solution. Suivant les auteurs, la valeur exacte de ΔE varie d'environ 50 mV [129] à 110 mV [29]¹⁸. Ceci implique que la constante K_{d2} est entre 7 et 80 fois plus petite que K_{d1} . On s'attend à ce que la formation du complexe entre la ferrédoxine réduite et la FNR oxydée soit au moins aussi facile que la formation du complexe entre la ferrédoxine oxydée et la FNR oxydée, puisque comme les interactions sont pour la plupart d'origine électrostatique, le cas où la ferrédoxine est réduite est donc plus affin. On s'attend en conséquence à une majoration de K_{d2} comprise entre 20 μ M et 2 μ M. Les conclusions des simulations permettent donc de mettre en avant d'une manière différente le décalage en potentiel observé dans les complexes, tout en confirmant que le décalage a lieu au moins en partie dans le complexe avec la forme oxydée de la FNR.

5.5 Conclusion

Nous avons vu dans ce chapitre les raisons qui ont mené à la construction d'une chaîne complexe et complète de transferts d'électrons comprenant un photosystème de type I et ses partenaires naturels. Cette chaîne a permis l'extraction de données cinétiques sur les interactions entre le photosystème I et ses partenaires (c_6 , ferrédoxine). On a pu retrouver les données mesurées au moyen d'autres techniques, comme la constante d'interaction entre le photosystème I et le c_6 , ainsi que la constante de formation du complexe entre le photosystème I et la ferrédoxine oxydée. On a par ailleurs pu donner une valeur moins sous-estimée à la constante de dissociation du complexe photosystème I – ferrédoxine réduite.

Les simulations ont permis en outre de mettre en évidence la séquestration de la ferrédoxine oxydée par la forme semiquinone de la FNR, ce qui n'avait jamais été démontré jusqu'à présent. Ces mesures confirment les décalages en potentiel de la ferrédoxine dans le complexe avec la FNR observés par différents groupes.

Par ailleurs, les mesures se sont heurtées à des problèmes inattendus du côté du recyclage du NADP⁺. Malgré une lutte acharnée, les problèmes rencontrés n'ont pas été expliqués, mais ont contribué au manque de temps classique de fin de thèse...

¹⁸En fait, il ne s'agit pas exactement du décalage en potentiel dans le cas du complexe avec la FNR oxydée et semiquinone, mais la moyenne entre celui-ci et le décalage dans complexe avec la FNR semiquinone et réduite.

Chapitre | 6

D'autres transferts

Nous allons maintenant nous intéresser à d'autres transferts d'électrons qui ont été étudiés au cours de cette thèse. Il s'agit de projets bien moins aboutis que l'étude de la chaîne complète du c_6 au glutamate.

6.1 Hydrogénases

Le sujet de cette thèse s'inscrit dans un programme cherchant à mettre au point un système pour étudier les hydrogénases (H_2ase). Un certain nombre d'expériences ont été réalisées dans cette optique en suivant deux buts proches :

- la construction d'une chaîne de transferts d'électrons du cytochrome c_6 à l'hydrogène gazeux ;
- l'obtention de données cinétiques sur l'hydrogénase de *Chlamydomonas reinhardtii*.

6.1.1 Préliminaires à la construction d'une chaîne

Le problème de la construction d'une chaîne de transfert d'électrons jusqu'à la formation d'hydrogène gazeux est que la plupart des hydrogénases connues ne sont pas réputées interagir avec la ferrédoxine, rendant leur photoréduction par le PSI sensiblement plus délicate. Nous avons choisi de nous intéresser d'abord à des systèmes plus simples : une des mes activités a été d'essayer de faire fonctionner des hydrogénases avec des donneurs à bas potentiel, comme le méthylviologène. Deux hydrogénases ont été étudiées de cette manière : une hydrogénase à Nickel-Fer de *Thiocapsa roseopersicina* et une hydrogénase à Fer seul de *Chlamydomonas reinhardtii*.

Hydrogénase à fer seul de *Chlamydomonas reinhardtii*

Avant toute chose, il convient de remarquer que les étapes de purification de l'hydrogénase *hydA1* de *Chlamydomonas* se déroulent exclusivement en présence d'un réducteur fort, le dithionite ($S_2O_4^{2-}$), pour éviter que l'hydrogénase ne s'inactive en présence de traces d'oxygène. Cette remarque a une grande importance pour la suite.

Les expériences les plus simples à réaliser avec cette hydrogénase sont d'observer dans quelle mesure elle est capable de réoxyder le méthylviologène réduit. Des mesures ont été réalisées en partant d'une hydrogénase purifiée mais fournie dans un milieu contenant encore environ 20 mM de dithionite. En partant d'une microcellule ne contenant initialement que du méthylviologène dans du tampon, on a rajouté progressivement certaines quantités d'hydrogénase. Le résultat est montré sur la figure 6.1. L'allure de ces courbes est prometteuse : on observe effectivement un plateau dont le début correspond au pic de réduction du méthylviologène, comme pour les voltamogrammes catalytiques observés avec le photosystème I et ses partenaires. Par ailleurs, la valeur du courant de plateau, $0,93 \mu A$ pour la courbe — et $1,30 \mu A$ pour la courbe — sont bien dans un rapport $\sqrt{2}$, comme on l'attend si la réaction limitante est une réaction du second ordre entre l'hydrogénase et

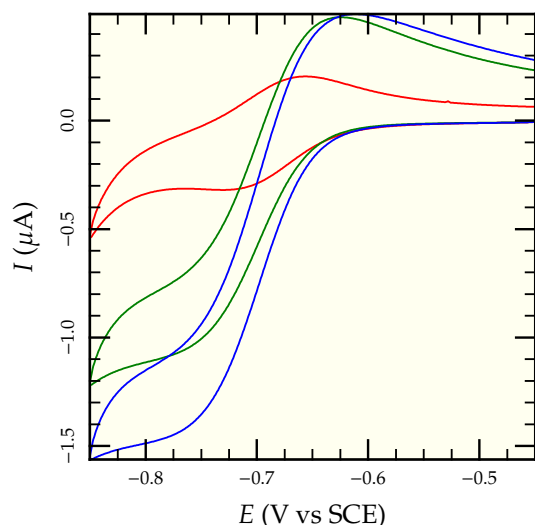


FIG. 6.1: Voltammogrammes de 100 μM méthylviologène. En absence d'hydrogénase : —, 10 μL d'hydrogénase : —, 20 μL d'hydrogénase : —.

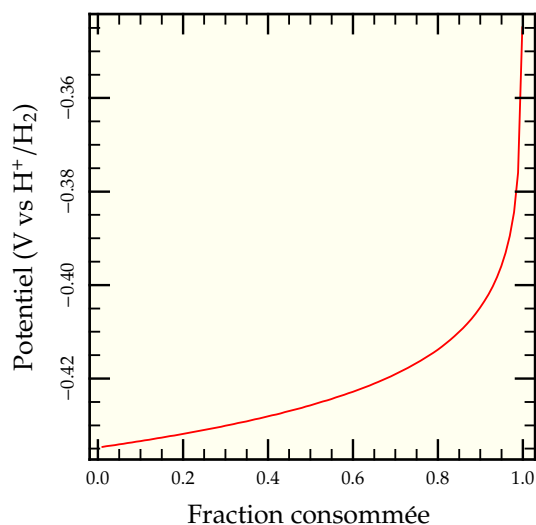
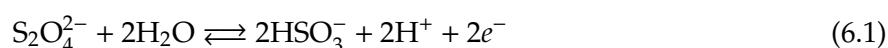


FIG. 6.2: Potentiel effectif du dithionite dans la solution contenant l'hydrogénase de *Chlamydomonas* en fonction de la fraction de dithionite consommée. La concentration initiale de dithionite est de 20 mM et le pH est de 7.

le méthylviologène¹. Par ailleurs, les courbes catalytiques ont un pic de retour plus élevé que les courbes non-catalytiques, ce qui est cohérent avec le fait que l'hydrogénase est réversible : comme dans le cas de la FNR sans recyclage, au la vague retour du voltammogramme l'hydrogénase oxyde l'hydrogène pour réduire le méthylviologène.

Cependant, reste le problème du dithionite. On ne peut pas raisonnablement attendre qu'un réducteur fort ne perturbe pas les mesures électrochimiques. Par ailleurs, la chimie du dithionite est complexe : celui-ci peut se décomposer [130, 131] et donne de nombreux sous-produits lors de son oxydation [132]. À partir des données du travail de Mayhew [132], nous allons essayer d'estimer le potentiel du dithionite dans la solution. L'équation bilan qui traduit l'électrochimie du dithionite est la suivante



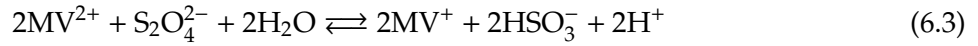
D'après [132, équation 13], le potentiel E_m de cette réaction est donnée par la formule suivante

$$E_m = E' + 0,059 \log \left(\frac{S_0}{2[\text{S}_2\text{O}_4^{2-}]} \right) + 0,029 \log (4K_a [\text{S}_2\text{O}_4^{2-}]) \quad (6.2)$$

où E' est le potentiel de point milieu de la réduction du monomère SO_2^- , K_a une constante d'association et S_0 la concentration initiale en dithionite. À pH 7, ces constantes valent $E' = -0,660$ V et $K_a = 7,14 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$. On a représenté un graphe donnant le potentiel effectif du couple de l'équation (6.1) sur la figure 6.2. On voit que le potentiel obtenu, s'il est suffisamment bas pour réduire efficacement l'oxygène et protéger l'hydrogénase, est en revanche parfaitement comparable à celui de l'hydrogénase et du méthylviologène. En particulier, si l'on suppose que la cinétique de l'équation bilan (6.3) est relativement lente, ce qui semble raisonnable vu la complexité des mécanismes mis en œuvre et la relative lenteur des réactions avec le dithionite de manière générale,

¹Voir le raisonnement page 43.

on peut parfaitement reproduire les voltamogrammes catalytiques de la figure 6.1².



Il a donc été conclu de ces observations qu'il faut absolument éliminer toute trace de dithionite pour les expériences d'électrochimie avec l'hydrogénase. Le problème est qu'il n'est pas facile de séparer l'hydrogénase du dithionite en évitant les contacts de l'hydrogénase avec l'oxygène. Les expériences avec le méthylviologène n'ont donc pas encore été reconduites en l'absence de dithionite.

Hydrogénase à Nickel-Fer de *Thiocapsa*

Quelques expériences ont été réalisées avec l'hydrogénase à Nickel-Fer de *Thiocapsa* [133]. Celle-ci a été fournie par le groupe du professeur Kovacs en Hongrie. Elle est beaucoup moins sensible à l'hydrogène que l'hydrogénase de *Chlamydomonas* et est sous une forme purifiée sans réducteur fort, ce qui en facilite l'étude électrochimique. En revanche, elle n'est pas particulièrement rapide. Un exemple de voltamogrammes catalytiques est présenté figure 6.3. La catalyse est clairement présente, mais on peut voir qu'elle n'est pas particulièrement élevée. La concentration utilisée dans ces expériences est proche de celle de la solution mère : c'est donc la plus grande concentration que l'on peut utiliser sans investissements plus lourds³. Pour obtenir une vague catalytique claire, il a été nécessaire de descendre la vitesse de balayage à 0,7 mV.s⁻¹. On trouve ainsi une constante apparente du premier ordre de réoxydation du méthylviologène de l'ordre de $k = 3 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$, soit une constante de vitesse du second ordre de l'ordre de $4 \times 10^3 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$, ce qui est particulièrement lent. La quantité de méthylviologène est grande, mais de l'ordre du K_m de l'hydrogénase [134] : les activités catalytiques à faibles concentrations de méthylviologène sont à peine meilleures. Cette hydrogénase est supposée réagir avec la ferrédoxine [134] ; nous avons donc essayé de construire une chaîne complète aussi avec elle.

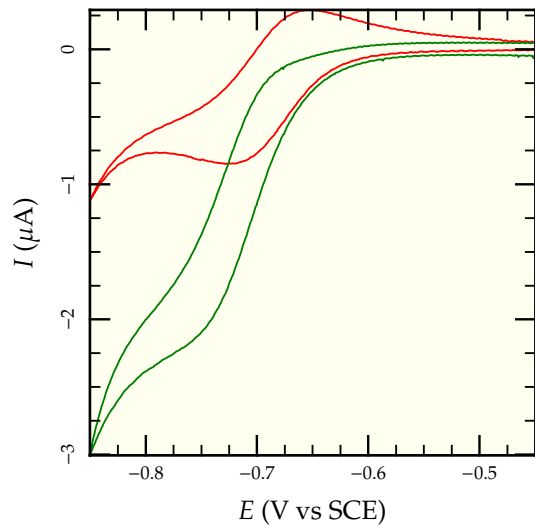


FIG. 6.3: Voltamogrammes de 600 μM de méthylviologène en présence de 8 μM d'hydrogénase de *Thiocapsa*, (—) ou en son absence (—). Vitesse de balayage 0,7 mV.s⁻¹.

6.1.2 Différents essais de chaîne complète

Pour construire une chaîne complète partant du cytochrome c_6 pour arriver à la production d'hydrogène gazeux, il faut que l'hydrogénase employée soit en mesure d'accepter les électrons à bas potentiel fournis par le photosystème I. Deux cas de figure se présentent :

- L'hydrogénase utilisée peut échanger des électrons avec la ferrédoxine. Dans ce cas, il suffit simplement de remplacer la FNR et ses partenaires par l'hydrogénase. C'est le cas de l'hydrogénase de *Chlamydomonas* et de celle de *Thiocapsa*.
- En revanche, si l'hydrogénase en question ne réagit pas avec la ferrédoxine, il faut rajouter son partenaire naturel. C'est le cas des hydrogénases de *Desulfovibrio fructosovorans* et de *Desulfovibrio desulfuricans*, pour lesquelles nous avons ajouté des cytochromes c_3 .

²Il n'a pas été fait de tests avec du dithionite seul car il n'est pas possible de préparer du dithionite dans l'état où il serait en fin de purification en présence d'hydrogénase.

³Et sans garantie de succès, qui plus est.

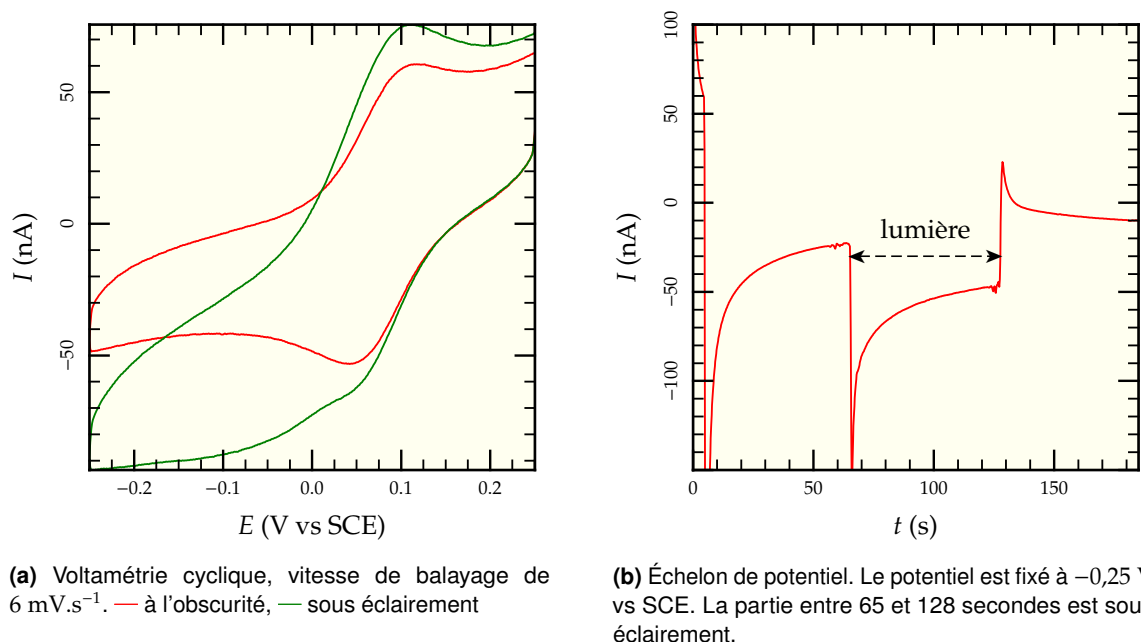


FIG. 6.4: Étude d'une chaîne de transport d'électrons du c_6 ($20 \mu\text{M}$) à l'hydrogénase a Nickel-Fer de *Thiocapsa* ($1 \mu\text{M}$), via par le photosystème I ($0,3 \mu\text{M}$) et la ferrédoxine ($20 \mu\text{M}$).

Commençons d'abord par les hydrogénases n'interagissant pas avec la ferrédoxine. Plusieurs configurations ont été testées avec les deux hydrogénases, en présence ou en absence de cytochrome c_3 , de ferrédoxine ou de flavodoxine, et aucune de ces configurations n'a abouti à l'observation d'une quelconque différence entre les voltamogrammes à l'obscurité et les voltamogrammes sous éclairage. Plusieurs explications sont possibles :

- Les conditions utilisées, proches des conditions optimales pour le photosystème I ne sont pas du tout appropriées pour les hydrogénases en question ; ceci est peu probable, étant donné qu'elles ont été testées dans des conditions relativement proches de celles de l'électrochimie.
- Les cytochromes c_3 employés ne parviennent pas à interagir avec la ferrédoxine ou la flavodoxine, et la chaîne est rompue.
- Les cytochromes c_3 réagissent plus vite avec le c_6 qu'avec les hydrogénases, et le transfert d'électrons est circulaire autour du photosystème I.
- Enfin, et c'est de loin l'hypothèse la plus probable, la ferrédoxine réagit préférentiellement avec le cytochrome c_6 qu'avec les cytochromes c_3 . La réaction avec le c_6 est en effet thermodynamiquement beaucoup plus favorable qu'avec les c_3 , vu que leurs potentiels sont sensiblement plus bas (aux alentours de -300 mV vs H^+/H_2 [135]), et nous avons vu au chapitre précédent que la réaction entre la ferrédoxine et le c_6 est rapide.

C'est pourquoi il est préférable d'éviter les intermédiaires et utiliser des hydrogénases qui réagissent directement avec la ferrédoxine ou la flavodoxine. Des expériences ont été conduites avec l'hydrogénase de *Thiocapsa* ; quelques résultats sont montrés sur la figure 6.4. On peut voir que, si la catalyse est présente, elle est relativement faible : il n'est pas raisonnable d'essayer d'exploiter les résultats de catalyse en voltamétrie cyclique lorsque l'efficacité catalytique est inférieure à 2. Notons tout de même que ces figures présentent exactement les caractéristiques auxquelles on s'attend. Puisque l'hydrogénase fonctionne de manière réversible, dès que le potentiel remonte, ou que l'éclairage cesse, on a production de c_6 réduit via la ferrédoxine par fonctionnement inverse de l'hydrogénase, donc un pic de retour sur le voltamogramme (comme avec la FNR sans recyclage du NADPH) et un pic inversé dès que l'éclairage cesse au cours d'un échelon de potentiel. Notons de plus que le pic de retour sur le voltamogramme est beaucoup moins grand que dans la chaîne comprenant la FNR (sans GLDH). Il y a essentiellement deux raisons à cela. D'une part, comme la

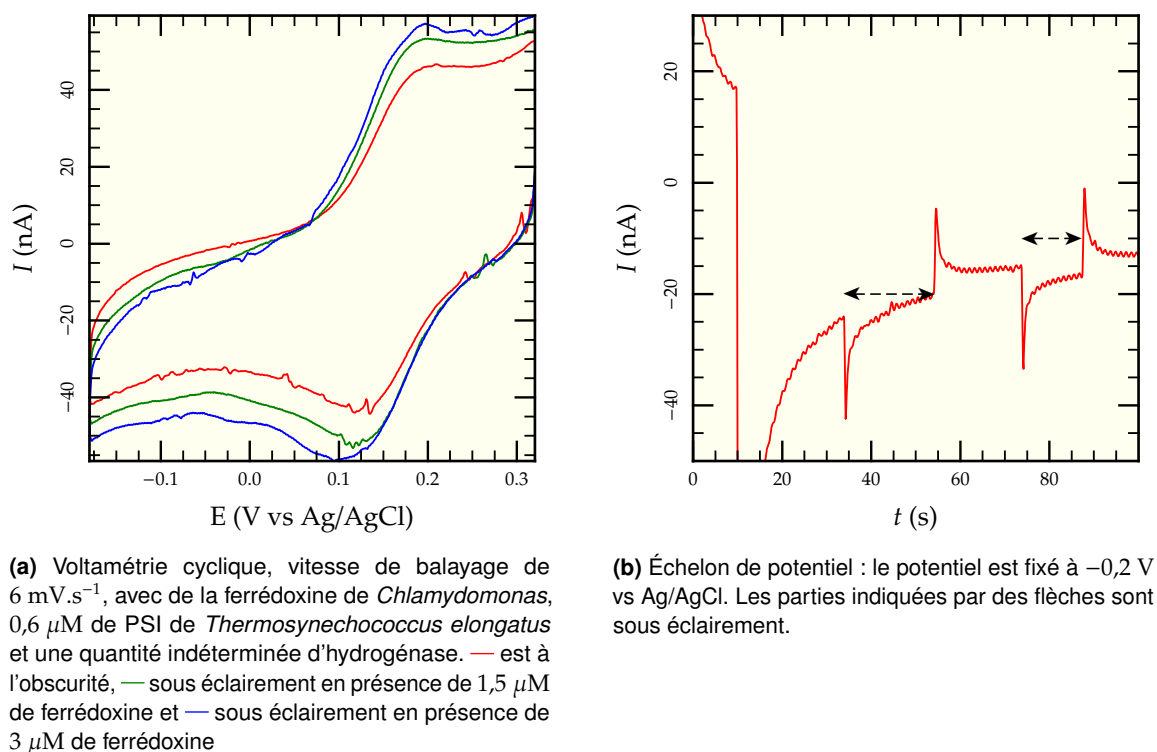


FIG. 6.5 : Étude d'une chaîne de transport d'électrons du c_6 ($20 \mu\text{M}$) à l'hydrogénase a Fer seul de *Chlamydomonas*, en passant par le photosystème I et la ferrédoxine. L'électrode de référence utilisée est Ag/AgCl.

catalse est moins importante, on produit moins d'espèces à bas potentiel. D'autre part, comme l'hydrogène diffuse beaucoup plus rapidement que le NADPH dans l'eau, une grande partie de l'hydrogène s'échappe et ne peut pas redonner ses électrons à l'hydrogénase.

D'autres expériences ont été conduites avec de l'hydrogénase de *Chlamydomonas*, au cours des derniers mois de cette thèse, à partir du moment où Tatiana Antoine a réussi à surexprimer l'hydrogénase et à en produire des quantités importantes. Les purifications ont encore été conduites avec du dithionite, étant donné que son absence aboutissait systématiquement à de l'hydrogénase inactive. Pour être en mesure de réaliser des expériences d'électrochimie, il faut donc séparer l'hydrogénase du dithionite ; dans ce but, nous avons utilisé une colonne à exclusion de taille. Des essais préliminaires ont montré qu'un passage dans la colonne avec un tampon ordinaire dégazé plusieurs jours dans la boîte à gants inactive complètement l'hydrogénase, vraisemblablement à cause de traces d'oxygènes présentes dans le tampon. Comme il est délicat de dégazer complètement un tampon, nous avons choisi d'utiliser un système à base de glucose oxydase pour éliminer les traces d'oxygène : les tampons ont systématiquement été complétés avec 10 mM de glucose et $0,5 \text{ U.mL}^{-1}$ de catalase et de glucose oxydase. La catalase est nécessaire pour réduire le peroxyde d'hydrogène produit par la réduction de l'oxygène. Des mesures électrochimiques ont montré que ces enzymes ne perturbent pas le fonctionnement de la chaîne de transfert d'électrons. L'hydrogénase survit au passage de la colonne, mais elle est diluée et perd une partie de son activité. On a cependant pu mesurer une activité catalytique dans certaines conditions.

On peut voir dans la figure 6.5 qu'il y a effectivement un effet photocatalytique, mais qu'il est particulièrement faible. Il y a beaucoup d'explications possibles pour une activité catalytique si faible : il est vraisemblable que les autres constituants du système étudié (ferrédoxine, cytochrome et photosystème I) n'étaient pas suffisamment dégazés et qu'ils ont apporté avec eux une quantité d'oxygène suffisante pour endommager en grande partie l'hydrogénase. Il est possible aussi que la réaction entre la ferrédoxine et l'hydrogénase soit beaucoup moins rapide que celle avec le cytochrome c_6 , ce qui rendrait toute étude de ce type impossible.

Étape	Capacité
Or nu	10,7 $\mu\text{F.cm}^{-2}$
Acide lipoïque	9,7 $\mu\text{F.cm}^{-2}$
EDC/NHS + NTA	8,8 $\mu\text{F.cm}^{-2}$
Nickel	8,5 $\mu\text{F.cm}^{-2}$

TAB. 6.1 : Évolution de la capacité de double couche au cours des différentes étapes du greffage

On peut conclure sur ces études en disant qu'il s'agit essentiellement de mesures préliminaires : il reste encore beaucoup de mises au point et d'essais à réaliser avant d'obtenir des résultats plus convaincants ou d'être en mesure d'affirmer que l'on a aucune chance d'acquiescer des données cinétiques sur l'hydrogénase de cette manière. Un des obstacles potentiels est le court-circuit entre la ferrédoxine et le cytochrome c_6 ; nous allons voir dans la section suivante des stratégies potentielles pour minimiser son influence.

6.2 Greffages

Jusqu'à présent, nous nous sommes intéressés exclusivement aux protéines en solution qui diffusent librement jusqu'à l'électrode. S'il s'agit du cas le plus simple à réaliser, il présente un certain nombre de désavantages par rapport au cas où l'on est en mesure de fixer une protéine sur une électrode. Pour commencer, travailler sur des protéines adsorbées est généralement moins gourmand en terme de quantités de protéines que les études en solution. De plus, il est particulièrement simple de changer de conditions de salinité et de pH, puisqu'il suffit de changer le tampon sans avoir à préparer un nouvel échantillon. Le traitement théorique des voltamogrammes catalytiques est en outre beaucoup plus simple que dans le cas diffusif. Enfin, puisque le greffage permet de confiner certaines espèces au voisinage de l'électrode, on peut s'attendre à ce que la probabilité de rencontre avec une autre espèce diminue. Ainsi, avec du c_6 confiné sur une électrode, on s'attend à diminuer les problèmes liés au court-circuit.

De nombreuses méthodes sont couramment utilisées pour immobiliser des protéines sur des électrodes d'or ; des techniques basées sur leur incorporation dans des gels [136–139] ou des polymères [52, 118, 140–142] et d'autres tirant parti de la chélation du nickel par les extensions polyhistidine [71, 143–147] ou la grande affinité de la streptavidine pour la biotine [78]. Pour ces derniers cas, il est plus facile de fixer sur l'électrode le partenaire (la biotine ou un groupe nitrilotriacétique) que la protéine elle-même.

Nous avons choisi de nous intéresser essentiellement à la dernière technique, utilisant des extensions polyhistidine et des composés auto-assemblés terminés par des groupes nitrilotriacétiques sur l'électrode. Cette technique nous garantit en effet un grand contrôle du dépôt des protéines sur l'électrode et en particulier du nombre de couches déposées.

Dans un premier temps, nous allons nous intéresser à l'aspect technique du greffage avec en particulier différents tests que l'on peut mener pour s'assurer que les étapes successives suivent bien leur cours. On s'intéressera ensuite aux deux enzymes qui ont fait l'objet d'immobilisations au cours de cette thèse : le photosystème II et le cytochrome c_6 .

6.2.1 Techniques de greffage

Nous avons choisi de nous restreindre aux techniques employant une extension polyhistidine. Elles sont basées sur l'affinité de chaînes polyhistidines (5 ou 6) pour le Nickel. Ce dernier est complexé par ailleurs par un groupe nitrilotriacétique, et joue le rôle d'une colle entre la protéine et le groupe NTA. Par ailleurs, le groupe NTA doit être fixé à l'électrode. Comme nous avons travaillé avec des électrodes en or, la méthode privilégiée pour la fixation est l'utilisation d'un thiol.

Puisqu'il n'existe pas commercialement de thiols terminés par des groupes NTA, la méthode usuelle est de déposer sur la surface de l'électrode un thiol (ou un disulfure) terminé par un groupe modifiable facilement, comme une amine ou un acide carboxylique. Au moyen du réactif approprié, on effectue ensuite un pontage avec un groupe qui lui est terminé par un NTA.

Nous avons choisi d'utiliser l'acide lipoïque, un disulfure court terminé par un acide carboxylique. Une fois que le disulfure est déposé sur l'électrode, on utilise un mélange d'EDC⁴ et de NHS⁵ pour activer la fonction acide carboxylique, afin qu'elle soit très réactive pour former des ester ou des amides [148, 149]. Le groupe NTA utilisé est terminé de l'autre côté de la chaîne par une amine : il suffit de mettre ce dernier en présence de l'électrode une fois que les carboxyliques ont été activés pour que l'amidation s'effectue. Il est nécessaire d'effectuer l'activation avant d'introduire le groupe NTA, car comme celui-ci contient des acides carboxyliques et une fonction amine, on risque de lier les groupements NTA entre eux au moment de l'amidation⁶. Ensuite, les groupements NTA sont saturés par immersion dans une solution de sulfate de nickel. Enfin, l'électrode est mise en contact avec la protéine à étudier qui complexe lentement les sites nickel-NTA grâce à leur extension polyhistidine.

Cet enchaînement de réactions chimiques constitue autant d'étapes qu'il est important de contrôler. Si l'on se base uniquement sur la réponse électrochimique attendue après l'adsorption finale de la protéine sur l'électrode, les chances d'échouer sans comprendre quelle étape a été déficiente sont trop grandes : il faut un moyen de suivre chacune des étapes, même si ce n'est que de manière qualitative. La spectrométrie d'impédance électrochimique est adaptée pour cela, dans le sens où l'on attend une modification de l'impédance à chaque étape. Le tableau 6.1 résume les variations de capacité d'une unique électrode à chaque étape.

On peut voir que quand tout se passe bien, chaque étape induit une variation perceptible dans la capacité de l'électrode. On pourrait douter de la pertinence de la variation due à l'ajout du nickel puisqu'elle semble relativement faible, mais elle est réellement significative : la capacité d'une électrode témoin laissée dans l'eau à la place du nickel a varié seulement de 1‰ pendant la même durée.

Notons pour finir que, puisque la protéine est liée à l'électrode par un équilibre de complexation, il suffit d'introduire dans la solution une grande quantité d'un complexant du nickel pour déplacer l'équilibre et enlever les protéines. On utilise généralement l'imidazole dans ce but. On peut ensuite enlever l'imidazole par un rinçage abondant dans de l'eau.

6.2.2 Greffage du photosystème II

Une des protéines dotées d'une extension polyhistidine disponibles au laboratoire est le photosystème II de *Thermosynechococcus elongatus*. L'extension, placée sur la sous-unité CP43, du côté accepteur (quinones) est utilisée pour purifier la protéine dans une colonne d'affinité [150]. C'est donc naturellement vers cette protéine que nous nous sommes tournés pour mettre au point la technique d'immobilisation. Dans un premier temps, nous avons étudié le photosystème II en solution de manière similaire au photosystème I pour vérifier que les conditions employées étaient favorables. Puis, nous avons étudié différentes manières de caractériser la présence de photosystème II adsorbé spécifiquement sur des électrodes.

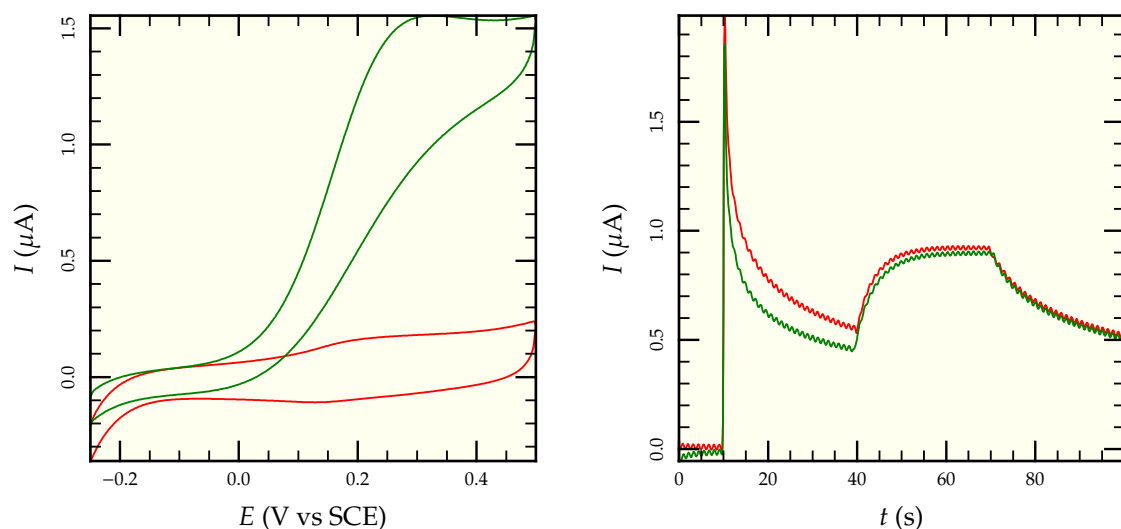
Études en solution

Pour s'assurer que les conditions de tampon et les médiateurs utilisés conviennent au photosystème II, nous avons vérifié la catalyse avec du photosystème II en solution. Ces expériences sont

⁴N-(3-Diméthylaminopropyl)-N'-éthylcarbodiimide

⁵N-Hydroxysulfosuccinimide

⁶D'ailleurs, si on le fait, on observe la formation de filaments dans la solution utilisée, preuve qu'une polymérisation a eu lieu.



(a) Étude en voltamétrie cyclique de 60 μM de duroquinone et 1,5 μM de photosystème II, à l'obscurité — et sous éclairage —.

(b) Deux échelons de potentiel mesurés dans les mêmes conditions : 85 μM de duroquinone et 0,6 μM de photosystème II. L'échantillon est éclairé dans les deux cas entre les secondes 40 et 70.

FIG. 6.6: Différentes études électrochimiques du photosystème II en solution, avec la duroquinone comme partenaire.

exactement les complémentaires de celles avec la chaîne étudiée au chapitre précédent : il s'agit maintenant de la partie de la chaîne photosynthétique en amont du cytochrome b_6f . Cela dit, l'étude de ce système est grandement simplifiée par le fait que la source d'électrons, l'eau, est systématiquement présente et efficace, contrairement au cas du photosystème I où l'on doit utiliser la GLDH pour créer un puits d'électrons. Le partenaire naturel du photosystème II est la plastoquinone [151]. Cependant, comme cette dernière est membranaire et peu soluble dans l'eau, d'autres quinones aux propriétés voisines sont utilisées, comme la duroquinone ou la dichlorobenzoquinone [152,153]. Les figures 6.6a et 6.6b montrent quelques courbes obtenues avec la duroquinone (potentiel voisin de +150 mV par rapport au calomel dans les conditions utilisées⁷). On peut voir que les courants catalytiques obtenus sont assez élevés, comparables aux plus élevés obtenus avec le photosystème I, voire plus importants : l'efficacité catalytique sur la figure 6.6a est de l'ordre de 15. Ceci est compréhensible dans la mesure où le photosystème II n'est pas sujet aux problèmes de court-circuits rencontrés avec le photosystème I, étant donné que l'oxydation des quinones par l'oxygène est très lente.

Maintenant que nous sommes assurés que les conditions sont propices aux réactions du photosystème II, nous pouvons passer à différentes études du PSII fixé sur une électrode.

Photovoltage

Les expériences de photovoltage consistent à envoyer un flash laser sur une électrode sur laquelle est déposée une couche de molécules photoactives. Le flash induit des mouvements de charges dans les molécules ; ceci modifie transitoirement la répartition des charges au voisinage de l'électrode et donc le potentiel de l'électrode par rapport à la solution. S'il n'est pas possible de prédire quantitativement le potentiel observé, les cinétiques de l'évolution du potentiel sont exactement celles des transferts d'électrons. Cette technique nécessite cependant que les molécules adsorbées sur la surface soient orientées, sinon les effets électriques se compensent d'une molécule à une autre.

⁷L'électrochimie n'étant pas réversible dans ces conditions, la détermination du potentiel est plus difficile.

La procédure employée pour l'immobilisation est celle décrite plus haut. Les électrodes utilisées sont celles nommées «photovoltage». Elles sont fabriquées par dépôt de quelques centaines de nanomètres d'or sur une couche d'accroche en chrome sur du verre. Elles sont éclairées par des flash laser à 532 nm de durée très faible (7 ns). Les variations du potentiel de l'électrode en réponse au flash sont enregistrées à l'aide d'un oscilloscope à haute bande passante. On observe ensuite les cinétiques d'évolution du potentiel suivant les différentes conditions. La figure 6.7 montre quelques exemples de traces obtenues.

Des traces ont été enregistrées dans différentes conditions : sur des électrodes nues, sur des électrodes fonctionnalisées puis incubées dans une solution de photosystème II et sur ces mêmes électrodes après un lavage dans l'imidazole. Par ailleurs, des lipides ont été utilisés à la manière de [154] pour tenter de reconstruire au moins partiellement une membrane autour des photosystèmes, dans le but de ralentir les cinétiques de relaxations ioniques autour des photosystèmes. En fait, comme on peut le voir sur la figure 6.7, les courbes obtenues dépendent très peu des conditions dans lesquelles elles ont été mesurées et représentent donc probablement des artéfacts. Trois hypothèses ont été envisagées pour expliquer ces résultats :

- la fonctionnalisation n'est pas effective, et le photosystème ne s'adsorbe pas sur l'électrode ;
- le photosystème II s'adsorbe, mais il est inactif ;
- l'adsorption sur l'électrode est non spécifique, ce qui annule toute possibilité d'observer un signal spécifique du photosystème II.

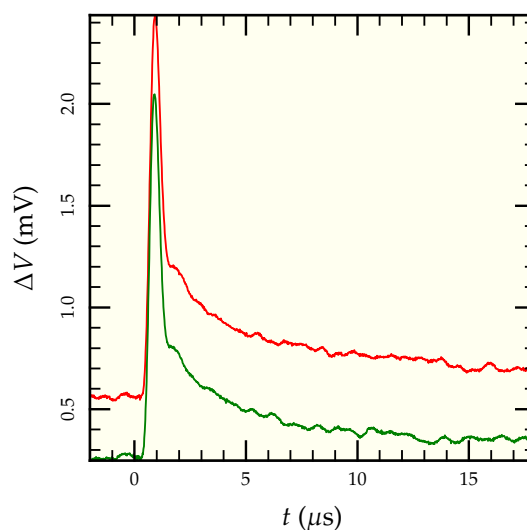


FIG. 6.7 : Quelques exemples de traces enregistrées en photovoltage : on mesure l'écart de potentiel entre la solution et l'électrode. La courbe — est obtenue pour une électrode nue, alors que — est obtenue après fonctionnalisation et incubation dans une solution de photosystème II.

Voltamétrie

Des mesures complémentaires à celles obtenues en photovoltage ont été effectuées en voltamétrie, dans des conditions similaires. Des électrodes «à feuille collée» ont été fonctionnalisées pour obtenir le chélateur NTA, puis incubées dans du sulfate de nickel et une solution de photosystème II. Des voltamogrammes à l'obscurité et sous éclairage sont ensuite pris dans un tampon approprié⁸ contenant un médiateur (la duroquinone ou la dichlorobenzoquinone). Plusieurs conditions ont été testées pour la fixation du photosystème II sur l'électrode, avec des concentrations similaires (0,5 μM). Si le tampon utilisé pour l'incubation contient un détergent, le β-DM (figure 6.8a), on voit l'apparition d'un courant catalytique sous éclairage. Cependant, ce courant apparaît aussi sur une électrode qui n'a pas été en contact avec du nickel, ce qui implique que le photosystème II responsable de la catalyse est adsorbé sur les électrodes de manière non spécifique. En absence de détergent, figure 6.8b, aucun courant catalytique convaincant n'est observé, que l'électrode ait été en présence de nickel ou non. Ce résultat peut être attribué tant à un défaut de fixation qu'à une fixation inactive, où par exemple le site d'oxydation de l'eau n'est pas fonctionnel ou encore les quinones ne sont pas accessibles aux médiateurs en solution. Notons qu'il n'est pas intuitif que le PSII s'adsorbe plus en présence de détergent qu'en leur absence. On ne peut cependant pas exclure d'autres facteurs intervenant dans la préparation des surfaces, comme la propreté initiale des électrodes, la présence de contaminants dans les solutions utilisées, un rendement moins bon d'activation⁹, etc... Dans tous les cas, il n'a pas été possible de mettre en évidence une adsorption spécifique.

⁸Voir page 95 pour les détails des tampons utilisés.

⁹Les réactifs ont été renouvelés entre les expériences avec détergents et les expériences sans détergents.

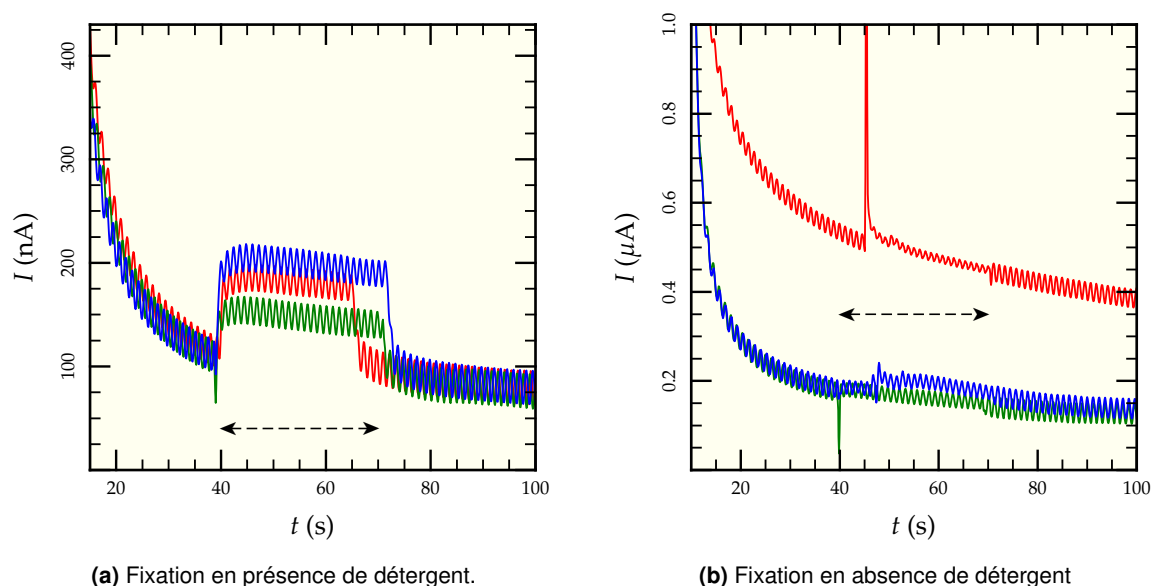


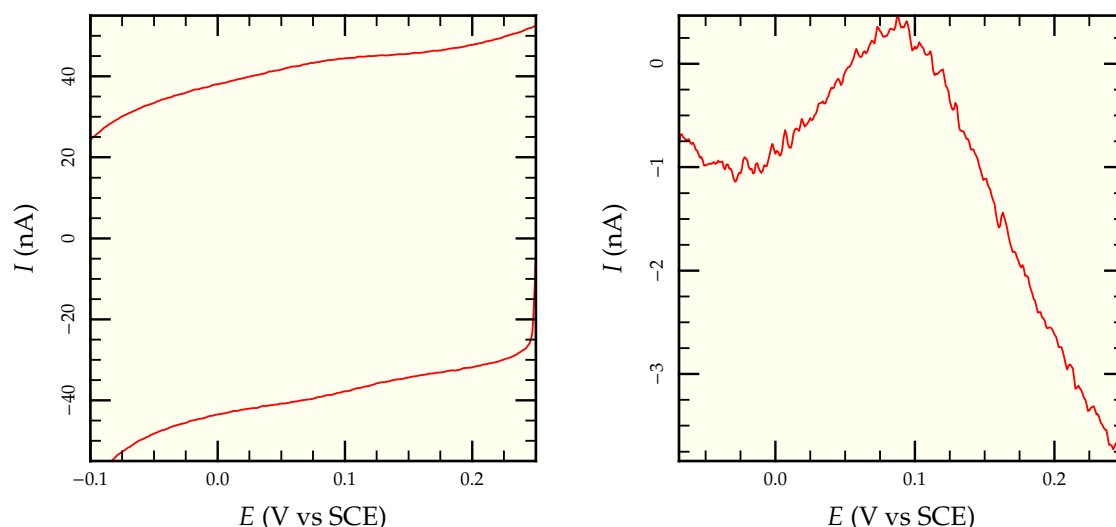
FIG. 6.8 : Étude du photosystème II fixé sur une électrode dans différentes conditions de fixation ; le médiateur utilisé est la dichlorobenzoquinone à une concentration voisine de $100 \mu\text{M}$. Les électrodes sont éclairées entre les secondes 40 et 60 (flèches). Sur les deux figures, — et — ont été en contact avec du nickel et — non. Le potentiel est maintenu constant à $+300 \text{ mV}$ par rapport au calomel.

Conclusion

La conclusion des expériences précédentes est que l'on n'arrive pas à obtenir une adsorption spécifique de photosystème II sur les électrodes utilisées : les courants catalytiques importants observés le sont aussi bien avec et sans nickel complexé. Ceci est confirmé par l'absence de signaux en photovoltage car cette technique requiert une orientation préférentielle des photosystèmes sur l'électrode. Ces résultats ne sont pas surprenant dans la mesure où le photosystème II est un complexe membranaire très volumineux. Il comporte donc une surface hydrophobe importante qui a tendance à s'adsorber sur l'électrode. La littérature comprend plusieurs rapports de fixation spécifique du photosystème II sur des électrodes d'or [71, 72] ; nous n'avons pas été en mesure de reproduire les résultats publiés. Un autre groupe a par ailleurs publié récemment une étude électrochimique du photosystème II sur des électrodes de graphite [155].

6.2.3 Greffage du cytochrome c_6

Deux types de cytochromes c_6 avec une extension polyhistidine en C-terminal ou en N-terminal ont été conçus au laboratoire par Vanessa Proux et Bernard Lagoutte. Comme le cytochrome c_6 ne s'adsorbe pas naturellement sur une électrode couverte de mercaptopropanol, des essais préliminaires ont été menés pour greffer le cytochrome sur une électrode. Pour limiter les adsorptions non spécifiques, nous avons utilisé une couche mixte des thiols mercaptopropanol et acide lipoïque. Le résultat est donné dans la figure 6.9. S'il est difficile de remarquer les pics sur les voltamogrammes bruts (figure 6.9a), il est en revanche clair qu'une espèce est adsorbée sur l'électrode quand on soustrait la ligne de base (figure 6.9b). Il convient de remarquer que la ligne de base évolue notablement quand on fixe le cytochrome ou quand on l'enlève, ce qui rend la soustraction difficile. Le pic observé correspond parfaitement à ce que l'on attend pour du cytochrome aux pH utilisés, il n'y a donc pas de doute quant à la nature de la substance adsorbée. Le signal disparaît après un passage dans l'imidazole, ce qui suggère que l'adsorption est spécifique. Notons que l'addition de photosystème I, ferrédoxine, FNR et NADP^+ en solution n'aboutit pas à un courant catalytique. Il est vraisemblable que le cytochrome soit adsorbé dans une configuration qui ne permet pas une



(a) Voltamogramme brut à 30 mV.s^{-1} . On peut deviner une bosse aux alentours de 0,1 V.

(b) Même voltamogramme après soustraction de la ligne de base, pour la partie ascendante en potentiel. On voit clairement un pic centré à 87 mV.

FIG. 6.9: Voltamogrammes de cytochrome c_6 doté d'une extension polyhistidine en C-terminal fixé sur une électrode

approche suffisante du photosystème I.

6.2.4 Conclusion

En conclusion, greffer une protéine de manière spécifique sur une électrode n'est pas un art facile. Un nombre important de paramètres est susceptible d'influencer les résultats :

- L'affinité naturelle des protéines pour des surfaces métalliques : si la protéine a tendance à s'adsorber, il est difficile de faire la différence entre une adsorption spécifique et non-spécifique.
- L'accessibilité de l'extension polyhistidine depuis l'électrode : si pour une raison stérique, l'accès de l'extension est difficile, la fixation spécifique sera très longue, voire impossible.
- L'état de surface des électrodes : la présence de contaminants influence de façons considérable les propriétés physiques de la surface, comme la propension de protéines à s'adsorber de manière non spécifique...
- La flexibilité du lien reliant la protéine à l'électrode : si la protéine est fixée de manière trop rigide à une distance relativement importante de l'électrode, les transferts électroniques avec l'électrode seront très lents. Cette même rigidité peut aussi gêner l'interaction avec des espèces en solution.

Par ailleurs, les résultats préliminaires avec le cytochrome c_6 sont encourageants. Plusieurs possibilités sont maintenant à explorer :

- L'utilisation de polymères courts (des PEG par exemple) comme espaceurs entre le thiol et le groupe NTA. Ceci permettrait une plus grande flexibilité et favoriserait les interactions avec les protéines en solution en rétablissant une mince couche de diffusion.
- La fixation de photosystème I (le groupe de Mathias Rögner à Bochum nous a fourni du photosystème I doté d'une extension polyhistidine).

6.3 Transferts virtuels

Cette section aborde des transferts d'électrons de nature complètement différente de tous ceux qui ont été précédemment décrits, étant donné que ceux-ci ont essentiellement eu lieu au sein de

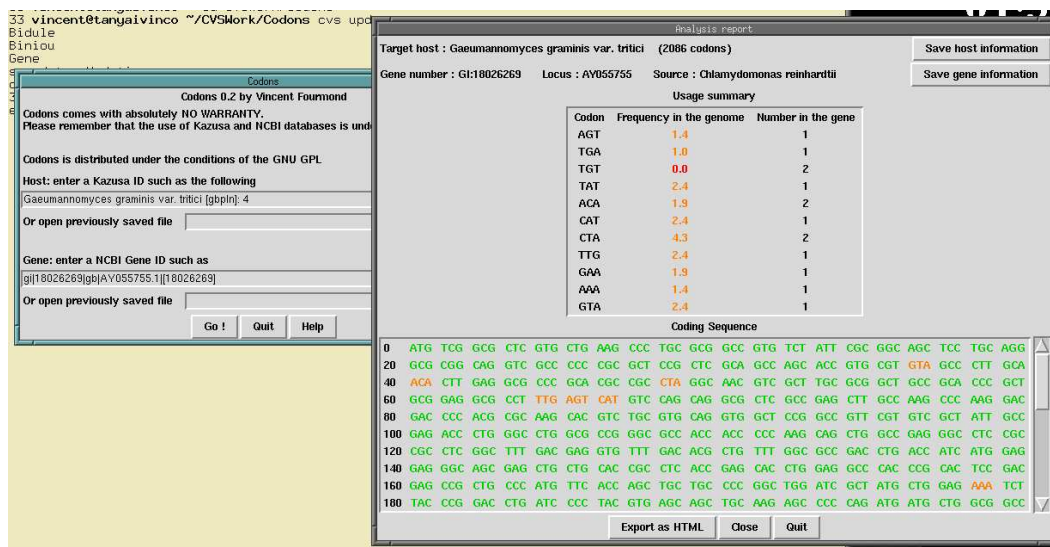


FIG. 6.10: Capture d'écran du logiciel Codons dans un environnement Linux.

quelques blocs de silicium... Je les mentionne ici puisque ces transferts m'ont valu d'être l'un des auteurs d'une publication [156].

Le code génétique est redondant, ce qui veut dire qu'un certain nombre d'acides aminés peuvent être représentés par différents codons. Cependant, au sein d'un organisme, toutes les possibilités de représentation ne sont pas utilisées de la même manière : certaines manières de représenter certains acides aminés sont préférées à d'autres, ce qui veut dire que leur ARNt est plus abondant que celui des autres formes. De même, l'ARNt de certains codons peut être rare voire absent dans un organisme. On considère que si un codon a une fréquence inférieure à 5%, une protéine qui contient ce codon sera exprimé difficilement et en faibles quantités. Un codon de fréquence inférieure à 1% est suffisant pour empêcher complètement l'expression d'une protéine. En conséquence, il est important de connaître le nombre et la fréquence des codons rares présents dans un gène quand on cherche à exprimer la protéine correspondante dans un organisme donné. Il va de soi que la nature des codons rares présents dans un gène dépend de l'hôte dans lequel on cherche à l'exprimer.

Pour faciliter ce genre d'études, l'institut japonais Kazusa a utilisé la base de données de gènes du NCBI pour compiler des statistiques d'utilisation des codons par hôte. S'il est possible d'utiliser ces données pour établir le nombre de codons rares d'un gène dans un génome donné, il s'agit en revanche d'une activité particulièrement longue, sujette à l'erreur et pour le moins inintéressante. Pour aider Tatiana Antoine dans la recherche d'un hôte approprié pour surexprimer l'hydrogénase de *Chlamydomonas*, j'ai donc écrit un programme qui se charge de télécharger un gène nommé par son identification (gi) sur le site de NCBI et des statistiques d'utilisation des codons d'un hôte sur le site de Kazusa. Il extrait ensuite les données intéressantes des pages en question au moyen d'expressions régulières [157] et compile un tableau sur la présence de codons rares et inexistants dans l'organisme cible. Ce programme a joué un rôle important dans le choix de l'organisme idéal pour l'expression hétérologue des gènes codant l'hydrogénase de *Chlamydomonas*.

Le code n'est pas reproduit en annexe, car pour des détails techniques il est assez long. Il peut être téléchargé librement sur la page du projet codons de Sourceforge¹⁰. Le programme peut être utilisé, distribué et modifié sous les termes de la licence publique générale GNU¹¹. Il est écrit en Perl, utilise la librairie LWP pour les accès internet et la librairie Tk pour l'interface graphique. Ces choix ont été motivés par la nécessité d'une grande portabilité. Pour faciliter l'utilisation du programme par la communauté scientifique, une version exécutable pour Windows a été produite au moyen de la librairie PAR. Une capture d'écran est représentée sur la figure 6.10.

¹⁰<http://sf.net/projects/codons>

¹¹GNU General Public License, GPL pour les intimes.

Chapitre

Pour en finir...

7

Cette thèse touche maintenant à sa fin. Dans les quelques pages qui restent, nous allons tenter de dresser un bilan des activités qui ont été entreprises et ce qu'il reste encore à faire.

La majeure partie de la thèse a été consacrée à l'étude de la chaîne de transferts d'électrons du cytochrome c_6 à la réduction de l' α -kétooglutarate. Malgré les différents écueils rencontrés (essentiellement dûs au recyclage du NADPH), cette étude a porté ses fruits :

- nous avons pu construire une chaîne de transports d'électron efficace ;
- nous avons pu étudier cette chaîne en voltamétrie cyclique ;
- nous avons montré qu'il est possible dans une certaine mesure de sélectionner la réaction à étudier en jouant sur les concentrations des partenaires ;
- et nous avons obtenu des données originales : le k_{off} de la réaction entre la ferrédoxine et le PSI a pu être mesurée de manière plus précise que dans des publications précédentes et les simulations ont donné une estimation de la constante de dissociation entre la FNR réduite à un électron et la ferrédoxine oxydée qui jusqu'alors n'avait pas pu être mesurée.

Ce travail a abouti à la rédaction d'un article¹. Notons par ailleurs qu'aucune étude d'une chaîne aussi complexe n'a été rapportée à ce jour en électrochimie². Il est cependant dommage que les conditions de recyclage se soient dégradées au cours de la thèse, puisque les expériences réalisées à la fin de la thèse offraient des jeux de données plus étendus, incluant des photosystèmes mutés.

En parallèle à l'étude de la chaîne, d'autres expériences ont été mises en place et testées, avec plus ou moins de succès : les études des hydrogénases au moyen de médiateurs, l'inclusion d'hydrogénases dans des chaînes complexes incluant le photosystème I et le greffage de différentes protéines sur des électrodes. Un effort particulier a été investi dans l'étude de l'hydrogénase à Fer seul de *Chlamydomonas*.

Les études électrochimiques de l'hydrogénase de *Chlamydomonas* sont subordonnées à l'obtention d'une forme active privée de dithionite, ce qui n'est désormais plus qu'une question de mise au point, les colonnes de chromatographie d'exclusion de taille couplées à l'utilisation de glucose oxydase donnant des résultats prometteurs. L'étude de cette hydrogénase semble délicate dans le cadre d'une chaîne photosynthétique : bien que les données actuelles ne permettent pas encore de le confirmer, le risque que le court-circuit ferrédoxine/ c_6 soit la voie majoritaire du départ des électrons de la ferrédoxine n'est pas négligeable. C'est pourquoi il semble intéressant de s'orienter en parallèle sur des études plus directes. L'électrochimie de la ferrédoxine sur des électrodes d'or est peu efficace [116], mais des études récentes sur des oxydes d'indium et d'étain [35, 158] suggèrent des possibilités intéressantes.

Les essais de greffage du photosystème II ont montré qu'il est très difficile d'obtenir des adsorptions spécifiques, ce qui a d'ailleurs été confirmé par les travaux de Martin Sjodin au laboratoire [98]. En revanche, les résultats sur les tentatives d'adsorption du cytochrome c_6 muté sont plus prometteurs et pourraient être combinés avec l'emploi de photosystème I doté d'une extension polyhistidine.

¹Fourmond *et al.*, en fin de rédaction

²Pour des raisons qui d'ailleurs devraient couler de source à la lecture de cette thèse.

En conclusion, ces travaux n'ont pas permis à ce jour une photoproduction d'hydrogène, mais ils ont néanmoins permis de mettre en place une structure pour étudier les chaînes photosynthétiques qui a pu être éprouvée pour obtenir des informations nouvelles. Ces informations pourront être utiles pour la modification d'organisme vivants dans le but d'ajuster leur métabolisme photosynthétique dans le sens de la photoproduction d'hydrogène. Par ailleurs, les développements récents dans la production de l'hydrogénase de *Chlamydomonas* suggèrent que des études électrochimiques vont être possibles dans un futur proche, offrant ainsi de nouvelles données pour comprendre son mécanisme et sa place dans la chaîne photosynthétique.

Pour finir, il ne faut pas oublier qu'une thèse est surtout une formation au métier de chercheur. De ce point de vue-là, cette thèse est un succès complet, vu que j'y ai appris beaucoup sur les manières de conduire des expériences, tenir des notes, chercher des informations, travailler en équipe, etc...

Troisième partie
À toutes fins utiles...

Annexe

Quelques simulations

A

Dans ce chapitre, on construit un algorithme pour résoudre numériquement les équations aux dérivées partielles du chapitre 3, et on présente son implémentation en Ruby.

A.1 Construction de l'algorithme

On cherche à trouver une solution numérique du système

$$\frac{\partial c}{\partial \tilde{t}} = \frac{\partial^2 c}{\partial \tilde{x}^2} \quad \text{avec} \quad \begin{cases} \lim_{\tilde{x} \rightarrow \infty} c = 1 \\ \left. \frac{\partial c}{\partial \tilde{x}} \right|_{\tilde{x}=0} = (\check{k}_f + \check{k}_b) c(\tilde{x}=0) - \check{k}_b \end{cases} \quad (\text{A.1})$$

où l'on a posé

$$\check{k}_f = \check{k}_s \exp \alpha \epsilon \quad \check{k}_b = \check{k}_s \exp (1 - \alpha) \epsilon \quad \epsilon = f(E - E_0) \quad \check{k}_s = \frac{k_s}{\sqrt{f v D}} \quad (\text{A.2})$$

Les systèmes électrochimiques sont très dissymétriques : les positions proches de l'électrode voient plus d'action que celles particulièrement éloignées. Pour incorporer cette observation dans les simulations, on utilise un modèle de grille exponentiel [86, 87] ; au lieu d'une grille où tous les éléments ont la même taille, ils ont ici une taille croissante au fur et à mesure que l'on s'éloigne de l'électrode. L'élément numéro 1 est celui en contact avec l'électrode. L'élément 0 représente les concentrations sur l'électrode. Voici leur taille :

$$\Delta x_i = \Delta x \exp [\beta (i - 1)] \quad (\text{A.3})$$

D'après [86, 159], il faut considérer que le «centre» de chaque élément est donné par la relation suivante :

$$x_i = \Delta x \frac{\exp \left[\beta \left(i - \frac{1}{2} \right) \right] - 1}{\exp [\beta] - 1} \quad (\text{A.4})$$

Même si cette dernière valeur n'est pas au centre géométrique de l'élément i , elle en est le centre effectif de la distribution de concentration [86]. Notons c_n la valeur moyenne de la concentration de l'élément n . À l'aide de la relation précédente, on peut donner la version discrète du laplacien au point n :

$$\frac{\partial^2 c}{\partial \tilde{x}^2} \longrightarrow \frac{1}{\Delta x_n} \left[\frac{c_{n+1} - c_n}{x_{n+1} - x_n} - \frac{c_n - c_{n-1}}{x_n - x_{n-1}} \right] = \frac{1}{\Delta x_n} \left[\frac{c_{n+1} - c_n}{\Delta x \exp \left[\beta \left(i - \frac{1}{2} \right) \right]} + \frac{c_{n-1} - c_n}{\Delta x \exp \left[\beta \left(i - \frac{3}{2} \right) \right]} \right] \quad (\text{A.5})$$

Au point 1, l'équation est légèrement différente, puisque $x_0 = 0$; nous y reviendrons plus tard. Par ailleurs, la dérivée temporelle de l'élément n devient simplement

$$\frac{\partial c}{\partial t} \longrightarrow \frac{c'_n - c_n}{\Delta t} \quad (\text{A.6})$$

où les grandeurs primées sont prises au temps $t + \Delta t$. Il est préférable d'utiliser un modèle implicite, où les grandeurs utilisées dans la dérivée spatiale sont prises au temps $t + \Delta t$: cette approche confère une stabilité inconditionnelle au système [160] et permet d'utiliser un paramètre β plus grand [87]. L'équation différentielle peut donc s'écrire, sous forme discrète, pour $n \geq 1$

$$c_n = -k_n^g c'_{n-1} - k_n^d c'_{n+1} + (1 + k_n^g + k_n^d) c'_n \quad (\text{A.7})$$

Avec, en posant $\gamma = \frac{\Delta t}{\Delta x^2}$,

$$k_n^d = \gamma \exp \left[-2\beta \left(n - \frac{3}{4} \right) \right] \quad (\text{A.8})$$

$$k_n^g = \gamma \exp \left[-2\beta \left(n - \frac{5}{4} \right) \right] \quad \text{pour } n > 1 \quad (\text{A.9})$$

$$k_1^g = \gamma \frac{\exp[\beta] - 1}{\exp[\beta/2] - 1} \quad (\text{A.10})$$

Il nous faut une condition aux limites supplémentaire¹, qui est fixée par la valeur du courant à l'électrode :

$$\left. \frac{\partial c}{\partial \tilde{x}} \right|_{\tilde{x}=0} = (\check{k}_f + \check{k}_b) c(\tilde{x}=0) - \check{k}_b \quad (\text{A.11})$$

Soit en version discrète

$$\frac{\exp[\beta] - 1}{\Delta x \exp[\beta/2] - 1} (c'_1 - c'_0) = (\check{k}_f + \check{k}_b) c'_0 - \check{k}_b \quad (\text{A.12})$$

ou encore

$$(\check{k}_f + \check{k}_b + \kappa) c'_0 - \kappa c'_1 = \check{k}_b \quad \text{avec} \quad \kappa = \frac{\exp[\beta] - 1}{\Delta x \exp[\beta/2] - 1} = \sqrt{\frac{1}{\gamma \Delta t}} k_1^g \quad (\text{A.13})$$

Les équations (A.7) et (A.13) constituent un système tridiagonal. Ces derniers sont faciles à résoudre [160, chap. 2.4] et moult librairies implémentent des solveurs de systèmes tridiagonaux. Remarquons que le courant est donné par

$$\check{j} = \kappa c_1 - c_0 \quad (\text{A.14})$$

Pour finir, remarquons que Δt est la valeur absolue de la variation du potentiel adimensionné au cours d'un pas de temps.

A.2 Implémentation

Pour implémenter cet algorithme, j'ai choisi d'utiliser le langage de programmation Ruby pour sa clarté, son confort d'utilisation et une bonne maîtrise d'une librairie afférente² pour manipuler des tableaux de flottants. Notons que la constante INC représente de fait Δt .

¹En vérité, il faut une condition aussi à l'infini. Cependant, en pratique, celle-ci n'a pas d'influence sur les résultats de la simulation. Je me suis contenté de considérer qu'il n'y a pas d'élément correspondant à $n + 1$, soit $k_n^d = 0$.

²Dobjects : :Dvector, issue du projet Tioga, voir rubyforge.org/projects/tioga. Elle inclut un code efficace pour les résolutions de systèmes tridiagonaux.

```

#!/usr/bin/ruby
# -*- coding: utf-8; -*-

# Pour Dvector:
require 'Dobjects/Dvector'
include Dobjects
# Pour les opérations mathématiques naturelles:
include Math

# La constante k_s, en unités naturelles;
# c'est le premier argument en ligne de commande
k_s = ARGV[0].to_f
# La constante alpha, deuxième argument
alpha = ARGV[1].to_f

# Le nombre de points selon l'axe des x:
NB_X = 60
# L'excursion de potentiel (en termes de kBT/q), de chaque côté
# du potentiel 0.
if ARGV[2]
  NB_V = ARGV[2].to_f
else
  NB_V = 10 # 10 par défaut
end
# Le nombre de points dans un demi-voltammogramme
if ARGV[3]
  NB_T = ARGV[3].to_i
else
  NB_T = 500 # 500 par défaut
end
# Une petite aide:
INC = (2.0 * NB_V) / NB_T
# Le paramètre beta
BETA = 0.99
# Le coefficient gamma
GAMMA = 10
# Le profil de concentration en espèce oxydée, 1 au début
concentration = Dvector.new(NB_X, 1)
# Un vecteur pour le stockage
temp = Dvector.new(NB_X, 1)

# les vecteurs utilisés pour la tridiagonale
a = Dvector.new(NB_X) # (g)
b = Dvector.new(NB_X) # diagonale
c = Dvector.new(NB_X) # (d)

# Le potentiel à l'instant t:
def pot(t)
  if t > NB_T
    return - NB_V + (t - NB_T) * INC
  else

```

```

    return NB_V - t * INC
end
end

# Les constantes de réaction
def k_f(pot, ks, alpha)
    return ks * exp( - alpha * pot)
end
def k_b(pot, ks, alpha)
    return ks * exp( (1 - alpha) * pot)
end

# Initialisation des vecteurs pour la tridiagonale:
NB_X.times do |i|
    if i == 1
        # cas particulier i = 1;
        a[i] = - GAMMA * (exp(BETA) - 1)/(exp(0.5 * BETA) - 1)
    else
        a[i] = - GAMMA * exp(2 * BETA * (1.25 - i))
    end
    c[i] = - GAMMA * exp(2 * BETA * (0.75 - i))
    b[i] = 1 - a[i] - c[i]
end

kappa = sqrt(1 / (GAMMA*INC)) * (- a[1])
c[0] = - kappa # toujours vrai.

# calculs des extrema
min_p = pot(0)
max_p = pot(0)
min_i = 0
max_i = 0

(NB_T * 2).times do |t|
    # On ajuste les premiers éléments:
    p = pot(t)
    kf = k_f(p, k_s, alpha)
    kb = k_b(p, k_s, alpha)
    # équation du courant à l'électrode:
    concentration[0] = kb
    b[0] = (kf + kb + kappa)
    temp.tridag(a,b,c,concentration)
    # On échange les deux
    temp, concentration = concentration, temp
    # Calcul du courant: (- pour ma convention de signe)
    courant = - kappa * (concentration[1] - concentration[0])
    if courant < min_i
        min_p = p
        min_i = courant
    elsif courant > max_i

```

```

    max_p = p
    max_i = courant
end
puts "#{p}\t#{courant}"
end
# on sort les statistiques sur stderr
$stderr.puts "Min i #{min_i} en #{min_p}"
$stderr.puts "Max i #{max_i} en #{max_p}"
$stderr.puts "Delta p = #{(max_p - min_p).abs}"

```

A.3 Simulations de voltamogrammes catalytiques

Nous allons ici adapter l'algorithme des sections précédentes dans le cas de voltamogrammes réversibles avec catalyse. L'équation réduite du système est

$$\frac{\partial c}{\partial \check{t}} = \frac{\partial^2 c}{\partial \check{x}^2} + \check{k}(1 - c) \quad \text{avec} \quad \begin{cases} \lim_{\check{x} \rightarrow \infty} c = 1 \\ c(\check{x} = 0) = 1 - \gamma(\check{t}) \end{cases} \quad (\text{A.15})$$

où l'on a posé

$$\gamma = \frac{1}{1 + \exp(f(E - E_0))} \quad (\text{A.16})$$

Il est de fait plus pratique de raisonner en termes de la concentration d'espèces réduites, $d = 1 - c$; le système devient alors

$$\frac{\partial d}{\partial \check{t}} = \frac{\partial^2 d}{\partial \check{x}^2} - \check{k}d \quad \text{avec} \quad \begin{cases} \lim_{\check{x} \rightarrow \infty} d = 0 \\ d(\check{x} = 0) = \gamma(\check{t}) \end{cases} \quad (\text{A.17})$$

En procédant de la même manière que précédemment, on aboutit à la version discrète suivante du système (A.17) :

$$d_n = -k_n^g d'_{n-1} - k_n^d d'_{n+1} + (1 + \lambda + k_n^g + k_n^d) d'_n \quad (\text{A.18})$$

où l'on a posé $\lambda = \Delta t \check{k}$ et où les coefficients k_n^i sont donnés par les équations (A.8), (A.9) et (A.10). Par ailleurs, la condition aux limites est grandement simplifiée, puisqu'il s'agit de

$$d'_0 = \gamma(\check{t}) \quad (\text{A.19})$$

Le code permettant d'effectuer ces simulations est très proche de celui de la section précédente. Il suffit d'effectuer les modifications suivantes. La ligne

```
b[i] = 1 - a[i] - c[i]
```

devient

```
b[i] = 1 + K * INC - a[i] - c[i]
```

pour tenir compte du terme supplémentaire. Par ailleurs, on a maintenant

```
c[0] = 0
```

```
b[0] = 1
```

puisque la condition aux limites à l'électrode ne fait plus intervenir les dérivées spatiales. Pour la même raison, on remplace

```
concentration[0] = kb  
b[0] = (kf + kb + kappa)
```

```
par
```

```
concentration[0] = gamma(t)
```

Il ne reste plus qu'à changer le signe du courant (puisque l'on s'intéresse maintenant à la concentration d'espèces réduites) et à interpréter le premier argument en ligne de commande en tant que constante d'interaction. Notons que les simulations effectuées dans ces conditions sont correctes tant que la constante λ , soit $K * INC$ dans le programme, est de l'ordre de 1 ou moins. Pour des valeurs supérieures, les variations de concentrations sont trop rapides au voisinage de l'électrode et ne sont plus correctement représentées par le système.

Annexe

Informations pratiques

B

Ce chapitre est destiné à être utilisé par toutes les personnes susceptibles de prendre ma succession dans la fabrication et l'utilisation des électrodes.

B.1 Électrodes

Dans cette section, quelque conseils pratiques pour tout ce qui a trait aux électrodes, et en particulier à leur fabrication.

B.1.1 Solutions oxydantes

Pour les lavages, deux solutions particulièrement oxydantes ont été utilisée : le mélange sulfo-chromique et la solution piranha. Voici la manière de les préparer.

Pour faire de l'acide sulfo-chromique, rajouter 19 volumes d'acide sulfurique dans un volume de solution saturée en dichromate de potassium $K_2Cr_2O_7$. L'ensemble chauffe pour atteindre une soixantaine de degrés. Utiliser immédiatement, le mélange sulfochromique perd ses propriétés avec le temps.

Pour faire la solution piranha, rajouter deux volumes d'acide sulfurique dans un volume de peroxyde d'hydrogène à 30%. Attention, le mélange se met à bouillir violemment. Comme pour le mélange sulfo-chromique, il est conseillé d'utiliser la solution piranha rapidement après fabrication.

Attention ! La solution piranha agit comme un comburant très réactif : les composés organiques brûlent littéralement au contact de cette solution. Il faut donc absolument éviter de plonger un objet contenant plus que des traces de matières organiques, sinon c'est l'explosion garantie.

B.1.2 Colles

Voici la manière de préparer les colles utilisées au cours de cette thèse.

L'araldite se prépare en mélangeant 1 masse de durcisseur avec 2,5 de résine. Il faut mélanger **longtemps**, au moins une demi-minute si ce n'est plus, pour obtenir une colle homogène. Par ailleurs, il faut utiliser au moins 500 mg de résine pour que la colle soit suffisamment facile à mélanger.

La colle à l'argent se prépare en mélangeant 1 masse de durcisseur avec 12,5 masses de résine. Le mélange est plus facile et moins critique ici. Pour économiser la colle, j'utilise environ entre 10 mg et 30 mg de durcisseur à chaque mélange.

B.1.3 Lavage des lames de verres

Obtenir une surface propre pour une évaporation n'est pas aussi facile qu'il n'y paraît. Un lavage rigoureux est nécessaire. Plusieurs méthodes ont été utilisées au cours de la thèse, avec plus ou moins de succès. Voici les deux protocoles apparemment les plus efficaces ; il est conseillé d'essayer

des variations sur ces protocoles. Il est en outre recommandé, quoi que non obligatoire, de trier les lames de verre pour sélectionner les plus propres, histoire de partir de mieux.

Le premier, celui utilisé le plus récemment est une variation de :

- 45 minutes de sonication dans de l'eau avec détergent, puis rinçage ;
- 30 minutes de sonication dans du chloroforme¹ ;
- à nouveau 45 minutes de sonication dans de l'eau avec détergent puis rinçage ;
- 30 minutes dans une solution piranha
- 25 minutes de sonication dans l'eau pure pour rincer.

Un protocole plus ancien :

- 30 minutes dans du chloroforme ;
- 45 minutes sonication dans de l'eau avec détergents, rinçage ;
- 30 minutes dans du mélange sulfo-chromique.

Il est possible d'utiliser un mélange de 1 volume de méthanol pour 2 volumes de chloroforme à la place du chloroforme pour dégraisser, c'est sensiblement plus efficace².

Après avoir lavé les lames, il est conseillé de les sécher à l'argon (ou à l'azote) et de les peser pour être en mesure d'estimer l'épaisseur de la couche d'or déposée.

B.1.4 Évaporation

Les feuilles d'or utilisées pour fabriquer les électrodes sont produites par évaporation sous vide dans un évaporateur Edwards FL 400.

Pour allumer l'évaporateur, s'assurer en premier lieu qu'une circulation d'eau de refroidissement est établie (et que le tuyau ne risque pas de se détacher, sinon, c'est l'inondation garantie). Ensuite, mettre l'évaporateur sous tension et appuyer sur «Reset» puis sur «Start». Il faut ensuite compter au moins une demi-heure avant que la pompe à diffusion soit suffisamment chaude pour entrer en activité.

On ouvre l'évaporateur en appuyant sur «Vent». Pour les électrodes à feuille collée, il faut deux grammes d'or, un lingot de un gramme par filament. Les lames sont placées sur le support à environ 9cm au-dessus des filaments. Bien repérer le numéro des filaments utilisés avant de refermer le compartiment.

Avant de refermer l'évaporateur, il faut s'assurer que rien ne gêne l'étanchéité : la présence de poussières sur le joint ou la partie correspondante peuvent être rédhibitoires. Il faut donc bien les nettoyer avec un chiffon imbibé d'éthanol avant de refermer. La totalité des problèmes liés au vide que j'ai constaté disparaissaient en rouvrant le compartiment sous vide et en nettoyant consciencieusement le joint. Il faut **absolument** remplir la garde d'azote liquide avant de commencer le pompage : un oubli peut endommager la pompe de manière plus ou moins irréversible. «Cycle» commence le cycle de pompage. Tant que la pompe mécanique est en action, l'évaporateur affiche le message «Roughing». Après que la pompe à diffusion est entrée en action, il annonce «Fine pumping».

Il faut que la pression descende en dessous de 5×10^{-9} bar pour démarrer l'évaporation ; il est en fait recommandé d'attendre jusqu'à 2×10^{-9} bar³. Il faut ensuite sélectionner le filament approprié avec la molette du bas, positionner l'interrupteur de la source sur LT (*low tension*) et tourner la molette de tension jusqu'à 4. Ouvrir en même temps l'obturateur (le bouton S1) et activer le cristal de mesure du dépôt en appuyant sur «Run». Quand le barreau d'or fond, la couleur de la lumière émise change brutalement, et la vitesse de dépôt commence à monter. Il est conseillé alors de redescendre la molette de tension aux alentours de 3. Pour la position du cristal que j'utilise, un lingot de 1 gramme d'or correspond à un affichage final de environ 300 nm. Attention, cette affichage dépend fortement de la position du cristal : il faut veiller à ce qu'il soit directement exposé à la source et le plus bas possible. Répéter ensuite l'opération avec le deuxième lingot et ouvrir l'évaporateur en

¹La sonication n'est pas obligatoire : simplement laisser dans du chloroforme est déjà suffisant.

²Mais pas forcément aussi bon pour la santé...

³La pression est affichée en millibar sur la machine.

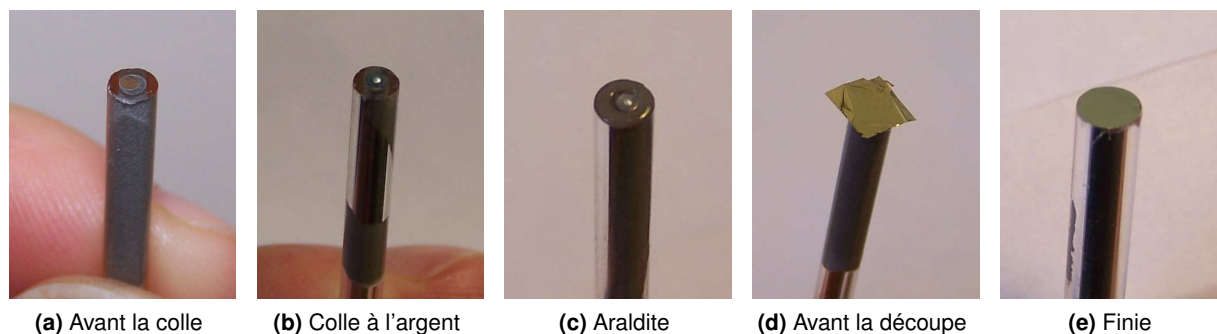


FIG. B.1 : Les différentes étapes de la fabrication des électrodes «à feuille collée»

appuyant sur «Vent». Peser les lames au sortir de l'évaporateur ; une différence de 30 mg correspond environ à une épaisseur de 1 μm .

Après avoir utilisé l'évaporateur, il est chaudement conseillé de placer la chambre sous un vide faible (quelques millibar) et de la fermer (en appuyant sur «Seal»). Pour éteindre l'évaporateur, appuyer sur «Stop», attendre qu'il affiche «Standby» (environ une demi-heure), couper le contact et fermer l'alimentation d'eau de refroidissement. Il est conseillé de stocker les lames produites sous vide dans un dessiccateur jusqu'à leur utilisation.

B.1.5 Préparation des électrodes à feuilles collées

Les supports doivent préalablement être polis jusqu'à l'obtention d'une surface plane sur laquelle un disque d'inox est bien visible (figure B.1a) ; il est important que la surface obtenue soit bien perpendiculaire au support. La fabrication est assez longue, et dans la plupart des cas il est préférable et bien plus rapide de recycler les supports des électrodes utilisées en enlevant la couche d'or, en nettoyant les restes de colle et en polissant rapidement. Un support peut aisément supporter une cinquantaine de recyclages, le principal facteur limitant étant l'agilité du manipulateur⁴.

Pour fabriquer l'électrode proprement dite, on commence par nettoyer l'extrémité du support à l'éthanol. On dépose ensuite à l'aide d'une aiguille une petite pointe d'adhésif conducteur⁵ (figure B.1b). On entoure ensuite ce point d'adhésif structural (figure B.1c), puis on applique la surface sur un carré d'or d'environ 4 millimètres de côté (figure B.1d). Comme on colle directement sur la lame de verre, c'est le côté en contact avec la lame de verre qui sera en contact avec la solution. Ce côté est en effet apparemment plus lisse et plus propre. Après environ deux heures de séchage, quand l'adhésif structural est devenu très visqueux sans être pour autant complètement solide, on découpe au scalpel l'or qui dépasse du support ; le résultat final est montré figure B.1e. Les électrodes sont généralement fabriquées par séries de 12 ou de 24.

Pour des raisons pratiques (taille des portoirs), il est préférable de fabriquer les électrodes par série de 12 (sans entraînement) ou de 24 (avec un peu plus d'habitude). Il faut compter au moins une heure à partir du moment où les supports sont polis et prêts à être encollés.

Je préfère mettre d'abord la colle à l'argent puis l'entourer d'araldite, mais cela n'a rien d'obligatoire.

B.2 Tampons utilisés

Pour les expériences avec le photosystème I sans utilisation de GLDH, deux tampons ont essentiellement été utilisés :

⁴Il est particulièrement facile d'enlever des morceaux de verre du tube au moment de nettoyer les restes de colle : le support est alors inutilisable.

⁵Colle à l'argent, voir page 93.

- 20 mM tricine pH 8 ;
- 20 mM Na_2SO_4 ;
- 5 mM Mg_2SO_4 ;
- 20 mM MES pH 7 ;
- 20 mM Na_2SO_4 ;
- 5 mM Mg_2SO_4 ;

Pour les expériences avec la FNR et la GLDH, le tampon «partiel» suivant a été fabriqué en solution stock :

- 20 mM tricine pH 8 ;
- 25 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$;
- 5 mM MgSO_4 ;
- 15 mM α -kétooglutarate ;

Il a été complété pour les expériences d'électrochimie avec 2 mM de NADP^+ et 0,03 % de β -DM. Pour les expériences avec le photosystème II, le tampon suivant a systématiquement été utilisé, éventuellement avec 0,03 % de β -DM :

- 20 mM MES pH 6,5 ;
- 20 mM CaSO_4 ;
- 5 mM MgSO_4 ;
- 10% glycérol ;

B.3 Préparation des protéines

Le cytochrome c_6 a été purifié à partir d'extraits prépurifiés de *Thermosynechococcus elongatus* (précipitation par sulfate d'ammonium, colonne échangeuse d'anions et chromatographie hydrophobe) par passage sur une colonne de chromatographie par perméation de gel Superdex 75. Le cytochrome c_6 oxydé a été produit par oxydation avec un excès de ferricyanure, enlevé par lavage sur une colonne de phenyl-sepharose avec un tampon MES pH 6,5 à 50% de saturation de sulfate d'ammonium. Les concentrations ont été mesurées par spectrométrie avec un coefficient d'absorption de $25,5 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ à 553 nm pour la forme réduite et $11,5 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ à 526 nm pour la forme oxydée.

Le photosystème I de *Synechocystis* et *Thermosynechococcus* ont été purifiés dans leurs formes monomériques d'après Rögner *et al.* [161].

La ferrédoxine et la FNR de *Synechocystis* ont été surexprimées dans *E. coli* et purifiées par des étapes successives de précipitation par le sulfate d'ammonium, d'échange d'anions et de chromatographie hydrophobe [162]. Leurs concentrations ont été mesurées par spectrométrie avec des coefficients d'extinction de $9,7 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ à 422 nm pour la ferrédoxine et $10,5 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ à 460 nm pour la FNR.

Annexe Bibliographie

C

- [1] J. Houghton. Global warming. *Reports on Progress in Physics*, **68** (6), 1343–1403, 2005.
- [2] J. M. Ogden. Prospects for building a hydrogen energy infrastructure. *Annu. Rev. Energy Env.*, **24** (1), 227–279, 1999.
- [3] S. Dunn. Hydrogen futures: toward a sustainable energy system. *Int. J. Hydrogen Energy*, **27** (3), 235–264, Mar. 2002.
- [4] P. Jordan, P. Fromme, H. T. Witt, O. Klukas, W. Saenger, and N. Krauss. Three-dimensional structure of cyanobacterial photosystem I at 2.5 Å resolution. *Nature*, **411** (6840), 909–917, Jun 2001.
- [5] K. N. Ferreira, T. M. Iverson, K. Maghlaoui, J. Barber, and S. Iwata. Architecture of the photosynthetic oxygen-evolving center. *Science*, **303** (5665), 1831–1838, Mar. 2004.
- [6] J. Chen, J. B. Anderson, C. DeWeese-Scott, N. D. Fedorova, L. Y. Geer, S. He, D. I. Hurwitz, J. D. Jackson, A. R. Jacobs, C. J. Lanczycki, C. A. Liebert, C. Liu, T. Madej, A. Marchler-Bauer, G. H. Marchler, R. Mazumder, A. N. Nikolskaya, B. S. Rao, A. R. Panchenko, B. A. Shoemaker, V. Simonyan, J. S. Song, P. A. Thiessen, S. Vasudevan, Y. Wang, R. A. Yamashita, J. J. Yin, and S. H. Bryant. Mmdb: Entrez's 3d-structure database. *Nucleic Acids Res.*, **31** (1), 474–477, Jan 2003.
- [7] W. Humphrey, A. Dalke, and K. Schulten. Vmd: visual molecular dynamics. *J Mol Graph*, **14** (1), 33–8, 27–8, Feb 1996.
- [8] W. Hillier and G. Babcock. Photosynthetic reaction centers. *Plant Physiol*, **125** (1), 33–7, Jan 2001.
- [9] K. Brettel and W. Leibl. Electron transfer in photosystem I. *Biochim. Biophys. Acta*, **1507** (1-3), 100–114, Oct. 2001.
- [10] M. Guergova-Kuras, B. Boudreaux, A. Joliot, P. Joliot, and K. Redding. Evidence for two active branches for electron transfer in photosystem I. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **98** (8), 4437–4442, Apr 2001.
- [11] P. Joliot and A. Joliot. In vivo analysis of the electron transfer within photosystem I: are the two phylloquinones involved? *Biochemistry*, **38** (34), 11130–6, Aug 1999.
- [12] M. Medina, R. O. Louro, J. Gagnon, M. L. Peleato, J. Mendes, C. Gomez-Moreno, A. V. Xavier, and M. Teixeira. Characterization of cytochrome *c*₆ from the cyanobacterium *Anabaena pcc 7119*. *J. Biol. Inorg. Chem.*, **2** (2), 225–234, Apr. 1997.
- [13] I. Díaz-Moreno, A. Díaz-Quintana, F. P. Molina-Heredia, P. M. Nieto, O. Hansson, M. A. D. la Rosa, and B. G. Karlsson. Nmr analysis of the transient complex between membrane photosystem I and soluble cytochrome *c*₆. *J. Biol. Chem.*, **280** (9), 7925–7931, Mar 2005.
- [14] I. Diaz-Moreno, A. Diaz-Quintana, G. Subias, T. Mairs, M. A. De la Rosa, and S. Diaz-Moreno. Detecting transient protein-protein interactions by x-ray absorption spectroscopy: The cytochrome *c*₆-photosystem I complex. *FEBS Lett.*, **580** (13), 3023–3028, May 2006.
- [15] P. Fromme, A. Melkozernov, P. Jordan, and N. Krauss. Structure and function of photosystem I: interaction with its soluble electron carriers and external antenna systems. *FEBS Lett.*, **555** (1), 40–44, Nov. 2003.
- [16] M. Hervás, J. A. Navarro, A. Díaz, H. Bottin, and M. A. D. la Rosa. Laser-flash kinetic analysis of the fast electron transfer from plastocyanin and cytochrome *c*₆ to photosystem I. experimental evidence on the evolution of the reaction mechanism. *Biochemistry*, **34** (36), 11321–11326, Sep 1995.
- [17] M. Beissinger, H. Sticht, M. Sutter, A. Ejchart, W. Haehnel, and P. Rösch. Solution structure of cytochrome *c*₆ from the thermophilic cyanobacterium *synechococcus elongatus*. *EMBO J.*, **17** (1), 27–36, Jan 1998.
- [18] R. H. H. van den Heuvel, D. I. Svergun, M. V. Petoukhov, A. Coda, B. Curti, S. Ravasio, M. A. Vanoni, and A. Mattevi. The active conformation of glutamate synthase and its binding to

- ferredoxin. *J. Mol. Biol.*, **330** (1), 113–128, Jun 2003.
- [19] R. Morales, M. H. Charon, G. Hudry-Clergeon, Y. Pétillot, S. Norager, M. Medina, and M. Frey. Refined x-ray structures of the oxidized, at 1.3 Å, and reduced, at 1.17 Å, [2Fe-2S] ferredoxin from the cyanobacterium *Anabaena pcc7119* show redox-linked conformational changes. *Biochemistry*, **38** (48), 15764–15773, Nov 1999.
- [20] P. Q. Sétif and H. Bottin. Laser flash absorption spectroscopy study of ferredoxin reduction by photosystem I: spectral and kinetic evidence for the existence of several photosystem I-ferredoxin complexes. *Biochemistry*, **34** (28), 9059–9070, Jul 1995.
- [21] C. Lelong, E. J. Boekema, J. Kruip, H. Bottin, M. Rögner, and P. Sétif. Characterization of a redox active cross-linked complex between cyanobacterial photosystem I and soluble ferredoxin. *EMBO J.*, **15** (9), 2160–2168, May 1996.
- [22] P. Sétif. Ferredoxin and flavodoxin reduction by photosystem I. *Biochim. Biophys. Acta*, **1507** (1-3), 161–179, Oct. 2001.
- [23] P. Sétif, N. Fischer, B. Lagoutte, H. Bottin, and J.-D. Rochaix. The ferredoxin docking site of photosystem I. *Biochim. Biophys. Acta*, **1555** (1-3), 204–209, Sept. 2002.
- [24] P. Q. Y. Sétif and H. Bottin. Laser flash absorption spectroscopy study of ferredoxin reduction by photosystem I in *Synechocystis* sp. pcc 6803: Evidence for submicrosecond and microsecond kinetics. *Biochemistry*, **33** (28), 8495–8504, 1994.
- [25] P. Q. Y. Sétif and H. Bottin. Laser flash absorption spectroscopy study of ferredoxin reduction by photosystem I: Spectral and kinetic evidence for the existence of several photosystem I-ferredoxin complexes. *Biochemistry*, **34** (28), 9059–9070, 1995.
- [26] N. Cassan, B. Lagoutte, and P. Sétif. Ferredoxin-NADP⁺ reductase. Kinetics of electron transfer, transient intermediates, and catalytic activities studied by flash-absorption spectroscopy with isolated photosystem I and ferredoxin. *J. Biol. Chem.*, **280** (28), 25960–25972, Jul 2005.
- [27] M. Shin and D. Arnon. Enzymic mechanisms of pyridine nucleotide reduction in chloroplasts. *J. Biol. Chem.*, **240**, 1405–11, Mar 1965.
- [28] M. E. Corrado, A. Aliverti, G. Zanetti, and S. G. Mayhew. Analysis of the oxidation-reduction potentials of recombinant ferredoxin-nadp⁺ reductase from spinach chloroplasts. *Eur. J. Biochem.*, **239** (3), 662–667, Aug 1996.
- [29] C. Batie and H. Kamin. The relation of pH and oxidation-reduction potential to the association state of the ferredoxin . ferredoxin:NADP⁺ reductase complex. *J. Biol. Chem.*, **256** (15), 7756–63, Aug 1981.
- [30] C. Batie and H. Kamin. Electron transfer by ferredoxin:NADP⁺ reductase. Rapid-reaction evidence for participation of a ternary complex. *J. Biol. Chem.*, **259** (19), 11976–85, Oct 1984.
- [31] C. Batie and H. Kamin. Ferredoxin:NADP⁺ oxidoreductase. Equilibria in binary and ternary complexes with NADP⁺ and ferredoxin. *J. Biol. Chem.*, **259** (14), 8832–9, Jul 1984.
- [32] C. Batie and H. Kamin. Association of ferredoxin-NADP⁺ reductase with NADP(H) specificity and oxidation-reduction properties. *J. Biol. Chem.*, **261** (24), 11214–23, Aug 1986.
- [33] Z. Deng, A. Aliverti, G. Zanetti, A. K. Arakaki, J. Ottado, E. G. Orellano, N. B. Calcaterra, E. A. Ceccarelli, N. Carrillo, and P. A. Karplus. A productive nadp⁺ binding mode of ferredoxin-nadp⁺ reductase revealed by protein engineering and crystallographic studies. *Nat. Struct. Biol.*, **6** (9), 847–853, Sep 1999.
- [34] Y. Nicolet, C. Piras, P. Legrand, C. E. Hatchikian, and J. C. Fontecilla-Camps. Desulfovibrio desulfuricans iron hydrogenase: the structure shows unusual coordination to an active site Fe binuclear center. *Structure*, **7** (1), 13–23, Jan. 1999.
- [35] T. Akashi, T. Matsumura, T. Ideguchi, K. Iwakiri, T. Kawakatsu, I. Taniguchi, and T. Hase. Comparison of the electrostatic binding sites on the surface of ferredoxin for two ferredoxin-dependent enzymes, ferredoxin-NADP(+) reductase and sulfite reductase. *J. Biol. Chem.*, **274** (41), 29399–405, Oct 1999.
- [36] M. Hirasawa, L. M. Rubio, J. L. Griffin, E. Flores, A. Herrero, J. Li, S.-K. Kim, J. K. Hurley, G. Tollin, and D. B. Knaff. Complex formation between ferredoxin and *Synechococcus* ferredoxin:nitrate oxidoreductase. *Biochim. Biophys. Acta*, **1608** (2-3), 155–162, Feb. 2004.
- [37] J. K. Hurley, J. T. Hazzard, M. Martínez-Júlvez, M. Medina, C. Gómez-Moreno, and G. Tollin. Electrostatic forces involved in orienting *Anabaena* ferredoxin during binding to *Anabaena* ferredoxin:nadp⁺ reductase: site-specific mutagenesis, transient kinetic measurements, and electrostatic surface potentials. *Protein Sci.*, **8** (8), 1614–1622, Aug 1999.
- [38] M. Martínez-Júlvez, I. Nogués, M. Faro, J. K. Hurley, T. B. Brodie, T. Mayoral, J. Sanz-Aparicio, J. A. Hermoso, M. T. Stankovich, M. Medina, G. Tollin, and C. Gómez-Moreno. Role of a cluster of hydrophobic residues near the FAD cofactor in *Anabaena* pcc 7119 ferredoxin-nadp⁺ reductase for optimal complex formation and electron transfer to ferredoxin. *J. Biol. Chem.*, **276** (29), 27498–27510, Jul 2001.

- [39] P. Razquin, M. F. Fillat, C. Gomez-Moreno, and M. Luisa Peleato. The 36 kda form of ferredoxin-nadp⁺ reductase from anabaena co-purifies with phycobiliproteins. *Bioelectrochem. Bioenerg.*, **38** (1), 57–61, Aug. 1995.
- [40] J.-C. Thomas, B. Ughy, B. Lagoutte, and G. Ajlani. A second isoform of the ferredoxin:nadp oxidoreductase generated by an in-frame initiation of translation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **103** (48), 18368–18373, Nov 2006.
- [41] J. van Thor, T. Geerlings, H. Matthijs, and K. Hellingerwerf. Kinetic evidence for the PsaE-dependent transient ternary complex photosystem I/Ferredoxin/Ferredoxin:NADP(+) reductase in a cyanobacterium. *Biochemistry*, **38** (39), 12735–46, Sep 1999.
- [42] N. Carrillo and E. A. Ceccarelli. Open questions in ferredoxin-NADP⁺ reductase catalytic mechanism. *Eur. J. Biochem.*, **270** (9), 1900–15, May 2003.
- [43] A. L. De Lacey, V. M. Fernandez, and M. Rousset. Native and mutant nickel-iron hydrogenases: Unravelling structure and function. *Coord. Chem. Rev.*, **249** (15-16), 1596–1608, Aug. 2005.
- [44] J. W. Peters. Structure and mechanism of iron-only hydrogenases. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **9** (6), 670–676, Dec. 1999.
- [45] M. Forestier, P. King, L. Zhang, M. Posewitz, S. Schwarzer, T. Happe, M. L. Ghirardi, and M. Seibert. Expression of two [Fe]-hydrogenases in *Chlamydomonas reinhardtii* under anaerobic conditions. *Eur. J. Biochem.*, **270** (13), 2750–2750, 2003.
- [46] T. Happe and J. Naber. Isolation, characterization and N-terminal amino acid sequence of hydrogenase from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eur. J. Biochem.*, **214** (2), 475–81, Jun 1993.
- [47] T. Happe, B. Mosler, and J. Naber. Induction, localization and metal content of hydrogenase in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eur. J. Biochem.*, **222** (3), 769–74, Jun 1994.
- [48] H. A. O. Hill, N. I. Hunt, and A. M. Bond. The transient nature of the diffusion controlled component of the electrochemistry of cytochrome c at bare gold electrodes: an explanation based on a self-blocking mechanism. *J. Electroanal. Chem.*, **436** (1-2), 17–25, Oct. 1997.
- [49] A. E. G. Cass, G. Davis, G. D. Francis, H. A. O. Hill, W. J. Aston, I. J. Higgins, E. V. Plotkin, L. D. L. Scott, and A. P. F. Turner. Ferrocene-mediated enzyme electrode for amperometric determination of glucose. *Anal. Chem.*, **56** (4), 667–671, 1983.
- [50] C. Bourdillon, C. Demaille, J. Gueris, J. Moiroux, and J. M. Savéant. A fully active monolayer enzyme electrode derivatized by antigen-antibody attachment. *J. Am. Chem. Soc.*, **115** (26), 12264–12269, 1993.
- [51] M. Dequaire, B. Limoges, J. Moiroux, and J.-M. Savéant. Mediated electrochemistry of horseradish peroxidase. Catalysis and inhibition. *J. Am. Chem. Soc.*, **124** (2), 240–53, Jan 2002.
- [52] Z. Zhang, H. Liu, and J. Deng. A glucose biosensor based on immobilization of glucose oxidase in electropolymerized o-aminophenol film on platinized glassy carbon electrode. *Anal. Chem.*, **68** (9), 1632–1638, 1996.
- [53] T. Nakaminami, S. Ito, S. Kuwabata, and H. Yoneyama. A biomimetic phospholipid/alkanethiolate bilayer immobilizing uricase and an electron mediator on an Au electrode for amperometric determination of uric acid. *Anal. Chem.*, **71** (19), 4278–83, Oct 1999.
- [54] F. A. Armstrong, P. Anthony Cox, H. A. O. Hill, V. J. Lowe, and B. Nigel Oliver. Metal ions and complexes as modulators of protein-interfacial electron transport at graphite electrodes. *J. Electroanal. Chem.*, **217** (2), 331–366, Feb. 1987.
- [55] A. Sucheta, R. Cammack, J. Weiner, and F. Armstrong. Reversible electrochemistry of fumarate reductase immobilized on an electrode surface. Direct voltammetric observations of redox centers and their participation in rapid catalytic electron transport. *Biochemistry*, **32** (20), 5455–65, May 1993.
- [56] K.-F. Aguey-Zinsou, P. V. Bernhardt, U. Kappler, and A. G. McEwan. Direct electrochemistry of a bacterial sulfite dehydrogenase. *J. Am. Chem. Soc.*, **125** (2), 530–5, Jan 2003.
- [57] E. Lojou, F. Cutruzzola, M. Tegoni, and P. Bianco. Electrochemical study of the intermolecular electron transfer to pseudomonas aeruginosa cytochrome cd1 nitrite reductase. *Electrochim. Acta*, **48** (8), 1055–1064, 2003.
- [58] S. J. Elliott, A. E. McElhaney, C. Feng, J. H. Enemark, and F. A. Armstrong. A voltammetric study of interdomain electron transfer within sulfite oxidase. *J. Am. Chem. Soc.*, **124** (39), 11612–3, Oct 2002.
- [59] C. Léger, A. K. Jones, W. Roseboom, S. P. J. Albracht, and F. A. Armstrong. Enzyme electrokinetics: hydrogen evolution and oxidation by *Allochrocatium vinosum* [NiFe]-hydrogenase. *Biochemistry*, **41** (52), 15736–46, Dec 2002.
- [60] K. F. Aguey-Zinsou, P. V. Bernhardt, and S. Leimkühler. Protein film voltammetry of *Rhodobacter capsulatus* xanthine dehydrogenase. *J. Am. Chem. Soc.*, **125** (50), 15352–8, Dec 2003.

- [61] M. J. Eddowes and H. A. O. Hill. Novel method for the investigation of the electrochemistry of metalloproteins: cytochrome *c*. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **21**, 771b–772, 1977.
- [62] M. J. Eddowes and H. A. O. Hill. Electrochemistry of horse heart cytochrome *c*. *J. Am. Chem. Soc.*, **101** (16), 4461–4464, 1979.
- [63] J. Zhang, K. Seo, and I. C. Jeon. Application of a gold electrode, modified by a self-assembled monolayer of 2-mercaptodecylhydroquinone, to the electroanalysis of hemoglobin. *Anal. Bioanal. Chem.*, **375** (4), 539–43, Feb 2003.
- [64] V. Proux-Delrouyre, C. Demaille, W. Leibl, P. Sétif, H. Bottin, and C. Bourdillon. Electrocatalytic investigation of light-induced electron transfer between cytochrome *c*6 and photosystem I. *J. Am. Chem. Soc.*, **125** (45), 13686–92, Nov 2003.
- [65] W. J. Albery, M. J. Eddowes, H. A. O. Hill, and A. R. Hillman. Mechanism of the reduction and oxidation reaction of cytochrome *c* at a modified gold electrode. *J. Am. Chem. Soc.*, **103** (13), 3904–3910, 1981.
- [66] X. Chen, B. M. Discher, D. L. Pilloud, B. R. Gibeau, C. C. Moser, and P. L. Dutton. De novo design of a cytochrome *b* maquette for electron transfer and coupled reactions on electrodes. *J. Phys. Chem. B*, **106** (3), 617–624, 2002.
- [67] J. Wei, H. Liu, A. R. Dick, H. Yamamoto, Y. He, and D. H. Waldeck. Direct wiring of cytochrome *c*'s heme unit to an electrode: electrochemical studies. *J. Am. Chem. Soc.*, **124** (32), 9591–9, Aug 2002.
- [68] M. Zayats, E. Katz, and I. Willner. Electrical contacting of flavoenzymes and NAD(P)⁺-dependent enzymes by reconstitution and affinity interactions on phenylboronic acid monolayers associated with Au-electrodes. *J. Am. Chem. Soc.*, **124** (49), 14724–35, Dec 2002.
- [69] M. Green and H. A. O. Hill. Amperometric enzyme electrodes. *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 1*, **82**, 1237–1243, 1986.
- [70] J. W. Lee, I. Lee, and E. Greenbaum. Platinization: a novel technique to anchor photosystem I reaction centres onto a metal surface at biological temperature and pH. *Biosens. Bioelectron.*, **11** (4), 375–387, 1996.
- [71] J. Maly, E. Illiano, M. Sabato, M. De Francesco, V. Pinto, A. Masci, D. Masci, J. Masojidek, M. Sugiura, R. Franconi, and R. Pilloton. Immobilisation of engineered molecules on electrodes and optical surfaces. *Materials Science and Engineering: C*, **22** (2), 257–261, 2002.
- [72] J. Maly, C. D. Meo, M. D. Francesco, A. Masci, J. Masojidek, M. Sugiura, A. Volpe, and R. Pilloton. Reversible immobilization of engineered molecules by Ni-NTA chelators. *Bioelectrochemistry*, **63** (1-2), 271–5, Jun 2004.
- [73] L. J. C. Jeuken, J. P. McEvoy, and F. A. Armstrong. Insights into gated electron-transfer kinetics at the electrode-protein interface: A square wave voltammetry study of the blue copper protein azurin. *J. Phys. Chem. B*, **106** (9), 2304–2313, 2002.
- [74] A. Avila, B. W. Gregory, K. Niki, and T. M. Cotton. An electrochemical approach to investigate gated electron transfer using a physiological model system: Cytochrome *c* immobilized on carboxylic acid-terminated alkanethiol self-assembled monolayers on gold electrodes. *J. Phys. Chem. B*, **104** (12), 2759–2766, 2000.
- [75] C. Léger, A. K. Jones, S. P. J. Albracht, and F. A. Armstrong. Effect of a dispersion of interfacial electron transfer rates on steady state catalytic electron transport in [nife]-hydrogenase and other enzymes. *J. Phys. Chem. B*, **106** (50), 13058–13063, 2002.
- [76] D. Murgida and P. Hildebrandt. Proton-coupled electron transfer of cytochrome *c*. *J. Am. Chem. Soc.*, **123** (17), 4062–8, May 2001.
- [77] P. Boivin and C. Bourdillon. Rapid electrocatalytic procedure for hydrogenase kinetic determination in the H₂ evolution direction. *Biochem Biophys Res Commun*, **135** (3), 928–33, Mar 1986.
- [78] A. L. De Lacey, J. Moiroux, and C. Bourdillon. Simple formal kinetics for the reversible uptake of molecular hydrogen by [Ni-Fe] hydrogenase from *Desulfovibrio gigas*. *Eur. J. Biochem.*, **267** (22), 6560–6570, 2000.
- [79] T. Parpaleix, J. Laval, M. Majda, and C. Bourdillon. Potentiometric and voltammetric investigations of H₂/H⁺ catalysis by periplasmic hydrogenase from *Desulfovibrio gigas* immobilized at the electrode surface in an amphiphilic bilayer assembly. *Anal. Chem.*, **64** (6), 641–6, Mar 1992.
- [80] S. J. Elliott, C. Léger, H. R. Pershad, J. Hirst, K. Heffron, N. Ginet, F. Blasco, R. A. Rothery, J. H. Weiner, and F. A. Armstrong. Detection and interpretation of redox potential optima in the catalytic activity of enzymes. *Biochim. Biophys. Acta*, **1555** (1-3), 54–9, Sep 2002.
- [81] J. F. Rusling and K. Ito. Voltammetric determination of electron-transfer rate between an enzyme and a mediator. *Anal. Chim. Acta*, **252** (1-2), 23–27, 1991.
- [82] C. Léger, S. Dementin, P. Bertrand, M. Rousset, and B. Guigliarelli. Inhibition and aerobic inactivation kinetics of *Desulfovibrio fructosovorans* NiFe hydrogenase studied by protein film voltammetry. *J. Am. Chem. Soc.*, **126** (38), 12162–72, Sep 2004.

- [83] A. Anne, A. Bouchardon, and J. Moiroux. 3'-Ferrocene-labeled oligonucleotide chains end-tethered to gold electrode surfaces: novel model systems for exploring flexibility of short DNA using cyclic voltammetry. *J. Am. Chem. Soc.*, **125** (5), 1112-3, Feb 2003.
- [84] A. J. Bard and L. R. Faulkner. *Electrochemical methods: Fundamentals and Applications*. Wiley, 2nd edition, 2000.
- [85] R. S. Nicholson and I. Shain. Theory of stationary electrode polarography. single scan and cyclic methods applied to reversible, irreversible, and kinetic systems. *Anal. Chem.*, **36** (4), 706-723, 1964.
- [86] S. W. Feldberg. Optimization of explicit finite-difference, simulation of electrochemical phenomena utilizing an exponentially expanded space grid : Refinement of the joslin-pletcher algorithm. *J. Electroanal. Chem.*, **127** (1-3), 1-10, Oct. 1981.
- [87] M. Rudolph. A fast implicit finite difference algorithm for the digital simulation of electrochemical processes. *J. Electroanal. Chem.*, **314** (1-2), 13-22, Sept. 1991.
- [88] M. Rudolph. Digital simulations with the fast implicit finite difference (FIFD) algorithm : Part II. an improved treatment of electrochemical mechanisms with second-order reactions. *J. Electroanal. Chem.*, **338** (1-2), 85-98, Oct. 1992.
- [89] R. Janek, W. Fawcett, and A. Ulman. Impedance spectroscopy of self-assembled monolayers on au(111): Evidence for complex double-layer structure in aqueous NaClO₄ at the potential of zero charge. *J. Phys. Chem. B*, **101** (42), 8550-8558, Oct. 1997.
- [90] Y. Xing, S. Li, A. Lau, and S. O'Shea. Electrochemical impedance spectroscopy study of mixed thiol monolayers on gold. *J. Electroanal. Chem.*, **583** (1), 124-132, Sept. 2005.
- [91] D. Rand and R. Woods. The nature of adsorbed oxygen on rhodium, palladium and gold electrodes. *J. Electroanal. Chem.*, **31** (1), 29-38, June 1971.
- [92] R. Woods. *Electroanalytical chemistry, A series of advances*, volume 9. Marcel Dekker, Inc. New York, 1976.
- [93] Y. Golan, L. Margulis, and I. Rubinstein. Vacuum-deposited gold films : I. factors affecting the film morphology. *Surface Science*, **264** (3), 312-326, Mar. 1992.
- [94] H. O. Finklea, D. A. Snider, , and J. Fedyk. Passivation of pinholes in octadecanethiol monolayers on gold electrodes by electrochemical polymerization of phenol. *Langmuir*, **6** (2), 371-376, 1990.
- [95] H. O. Finklea. *Electroanalytical chemistry, A series of advances*, volume 19. Marcel Dekker, Inc. New York, 1976.
- [96] G. Che, Z. Li, H. Zhang, and C. R. Cabrera. Voltammetry of defect sites at a self-assembled monolayer on a gold surface. *J. Electroanal. Chem.*, **453** (1-2), 9-17, Aug. 1998.
- [97] H. O. Finklea, S. Avery, M. Lynch, , and T. Furtzsch. Blocking oriented monolayers of alkyl mercaptans on gold electrodes. *Langmuir*, **3** (3), 409-413, 1987.
- [98] M. Sjodin. Personal communication.
- [99] C. D. Bain and G. M. Whitesides. Molecular-level control over surface order in self-assembled monolayer films of thiols on gold. *Science*, **240** (4848), 62-63, Apr. 1988.
- [100] C. D. Bain, E. B. Troughton, Y. T. Tao, J. Evall, G. M. Whitesides, , and R. G. Nuzzo. Formation of monolayer films by the spontaneous assembly of organic thiols from solution onto gold. *J. Am. Chem. Soc.*, **111** (1), 321-335, 1989.
- [101] C. D. Bain and G. M. Whitesides. Modeling organic surfaces with self-assembled monolayers. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **28** (4), 506-512, 1989.
- [102] C. D. Bain, J. Evall, , and G. M. Whitesides. Formation of monolayers by the coadsorption of thiols on gold: variation in the head group, tail group, and solvent. *J. Am. Chem. Soc.*, **111** (18), 7155-7164, 1989.
- [103] C. D. Bain and G. M. Whitesides. Correlations between wettability and structure in monolayers of alkanethiols adsorbed on gold. *J. Am. Chem. Soc.*, **110** (11), 3665-3666, 1988.
- [104] C. D. Bain and G. M. Whitesides. Depth sensitivity of wetting: monolayers of ω -mercapto ethers on gold. *J. Am. Chem. Soc.*, **110** (17), 5897-5898, 1988.
- [105] C. D. Bain and G. M. Whitesides. Formation of two-component surfaces by the spontaneous assembly of monolayers on gold from solutions containing mixtures of organic thiols. *J. Am. Chem. Soc.*, **110** (19), 6560-6561, 1988.
- [106] R. G. Nuzzo, F. A. Fusco, , and D. L. Allara. Spontaneously organized molecular assemblies. 3. preparation and properties of solution adsorbed monolayers of organic disulfides on gold surfaces. *J. Am. Chem. Soc.*, **109** (8), 2358-2368, 1987.
- [107] R. G. Nuzzo and D. L. Allara. Adsorption of bifunctional organic disulfides on gold surfaces. *J. Am. Chem. Soc.*, **105**, 4481-4483, 1983.
- [108] L. Strong and G. M. Whitesides. Structures of self-assembled monolayer films of organosulfur compounds adsorbed on gold single crystals: electron diffraction studies. *Langmuir*, **4** (3), 546-558, 1988.

- [109] E. B. Troughton, C. D. Bain, G. M. Whitesides, R. G. Nuzzo, D. L. Allara, , and M. D. Porter. Monolayer films prepared by the spontaneous self-assembly of symmetrical and unsymmetrical dialkyl sulfides from solution onto gold substrates: structure, properties, and reactivity of constituent functional groups. *Langmuir*, **4** (2), 365–385, 1988.
- [110] I. Taniguchi, K. Toyosawa, H. Yamaguchi, and K. Yasukouchi. Voltammetric response of horse heart cytochrome c at a gold electrode in the presence of sulfur bridged bipyridines. *J. Electroanal. Chem.*, **140** (1), 187–193, Nov. 1982.
- [111] F. A. Armstrong, H. A. O. Hill, , and N. J. Walton. Direct electrochemistry of redox proteins. *Acc. Chem. Res.*, **21** (11), 407–413, 1988.
- [112] S. Terrettaz, J. Cheng, C. Miller, and R. Guiles. Kinetic parameters for cytochrome c via insulated electrode voltammetry. *J. Am. Chem. Soc.*, **118** (33), 7857–7858, 1996.
- [113] D. E. Weisshaar, M. M. Walczak, , and M. D. Porter. Electrochemically induced transformations of monolayers formed by self-assembly of mercaptoethanol at gold. *Langmuir*, **9** (1), 323–329, 1993.
- [114] C. A. Widrig, C. Chung, and M. D. Porter. The electrochemical desorption of n-alkanethiol monolayers from polycrystalline au and ag electrodes. *J. Electroanal. Chem.*, **310** (1-2), 335–359, July 1991.
- [115] A. Badia, S. Arnold, V. Scheumann, M. Zizlsperger, J. Mack, G. Jung, and W. Knoll. Probing the electrochemical deposition and/or desorption of self-assembled and electropolymerizable organic thin films by surface plasmon spectroscopy and atomic force microscopy. *Sens. Actuators, B*, **54** (1-2), 145–165, Jan. 1999.
- [116] H. Landrum, R. Salmon, and F. Hawkrige. A surface-modified gold minigrid electrode which heterogeneously reduces spinach ferredoxin. *J. Am. Chem. Soc.*, **99** (9), 3154–8, Apr 1977.
- [117] H. Bottin and B. Lagoutte. Ferredoxin and flavodoxin from the cyanobacterium *synechocystis* sp pcc 6803. *Biochim. Biophys. Acta*, **1101** (1), 48–56, Jul 1992.
- [118] N. F. Ferreyra, L. Coche-Guérente, P. Labbé, E. J. Calvo, and V. M. Solís. Electrochemical behavior of nitrate reductase immobilized in self-assembled structures with redox polyviologen. *Langmuir*, **19** (9), 3864–3874, 2003.
- [119] C. Léger, K. Heffron, H. Pershad, E. Maklashina, C. Luna-Chavez, G. Cecchini, B. Ackrell, and F. Armstrong. Enzyme electrokinetics: energetics of succinate oxidation by fumarate reductase and succinate dehydrogenase. *Biochemistry*, **40** (37), 11234–45, Sep 2001.
- [120] C. Léger, S. J. Elliott, K. R. Hoke, L. J. C. Jeuken, A. K. Jones, and F. A. Armstrong. Enzyme electrokinetics: using protein film voltammetry to investigate redox enzymes and their mechanisms. *Biochemistry*, **42** (29), 8653–62, Jul 2003.
- [121] R. N. F. Thorneley. A convenient electrochemical preparation of reduced methyl viologen and a kinetic study of the reaction with oxygen using an anaerobic stopped-flow apparatus. *Biochim. Biophys. Acta*, **333** (3), 487–496, Mar. 1974.
- [122] V. V. Nikandrov, C. V. Nhi, G. P. Brin, and A. A. Krasnovskii. [methylviologen photoreduction by chloroplasts]. *Mol Biol (Mosk)*, **12** (6), 1278–1287, 1978.
- [123] L. G. Lee and G. M. Whitesides. Enzyme-catalyzed organic synthesis: a comparison of strategies for in situ regeneration of nad from nadh. *J. Am. Chem. Soc.*, **107**, 6999–7008, 1985.
- [124] G. Carrea, R. Bovara, P. Cremonesi, and R. Lodi. Enzymatic preparation of 12-ketochenodeoxycholic acid with nadp regeneration. *Biotechnol. Bioeng.*, **26** (5), 560–563, 1984.
- [125] H. Shimizu, T. Kuratsu, and F. Hirata. Purification and some properties of glutamate dehydrogenase from *proteus inconstans*. *J. Ferment. Technol.*, **57** (5), 428–433, 1979.
- [126] S. Khorobrykh, M. Mubarakshina, and B. Ivanov. Photosystem I is not solely responsible for oxygen reduction in isolated thylakoids. *Biochim. Biophys. Acta*, **1657** (2-3), 164–167, July 2004.
- [127] C. Bourdillon, C. Demaille, J. Moiroux, and J. M. Savéant. New insights into the enzymic catalysis of the oxidation of glucose by native and recombinant glucose oxidase mediated by electrochemically generated one-electron redox cosubstrates. *J. Am. Chem. Soc.*, **115** (1), 1–10, 1993.
- [128] B. K. Alsberg and O. J. Hagen. How octave can replace matlab in chemometrics. *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, **84** (1-2), 195–200, Dec. 2006.
- [129] J. Pueyo, C. Revilla, S. G. Mayhew, and C. Gomez-Moreno. Complex formation between ferredoxin and ferredoxin-nadp⁺ reductase from *anabaena* pcc 7119: Cross-linking studies. *Arch. Biochem. Biophys.*, **294** (2), 367–372, May 1992.
- [130] F. Camacho, M. P. Paez, M. C. Jimenez, and M. Fernandez. Application of the sodium dithionite oxidation to measure oxygen transfer parameters. *Chem. Eng. Sci.*, **52** (8), 1387–1391, Apr. 1997.
- [131] E. Gasana, P. Westbroek, K. D. Wael, E. Temmerman, K. D. Clerck, and P. Kiekens. Kinetics and

- mechanism of the oxidation of sodium dithionite at a platinum electrode in alkaline solution. *J. Electroanal. Chem.*, **553**, 35–42, 2003.
- [132] S. Mayhew. The redox potential of dithionite and SO_2^- from equilibrium reactions with flavodoxins, methyl viologen and hydrogen plus hydrogenase. *Eur. J. Biochem.*, **85** (2), 535–47, Apr 1978.
- [133] G. Rakhely, A. Colbeau, J. Garin, P. M. Vignais, and K. L. Kovacs. Unusual organization of the genes coding for hydsl, the stable [NiFe] hydrogenase in the photosynthetic bacterium *thiocapsa roseopersicina* bbs. *J. Bacteriol.*, **180** (6), 1460–1465, Mar. 1998.
- [134] J. Schnackenberg, M. Miyake, J. Miyake, N. A. Zorin, and Y. Asada. In vitro and in vivo coupling of thiocapsa hydrogenase with cyanobacterial and algal electron mediators. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **88** (1), 30–34, 1999.
- [135] I. Mus-Veteau, A. Dolla, F. Guerlesquin, F. Payan, M. Czjzek, R. Haser, P. Bianco, J. Haladjian, B. Rapp-Giles, and J. Wall. Site-directed mutagenesis of tetraheme cytochrome c3. modification of oxidoreduction potentials after heme axial ligand replacement. *J. Biol. Chem.*, **267** (24), 16851–16858, Aug. 1992.
- [136] X. Chen, N. Hu, Y. Zeng, J. F. Rusling, and J. Yang. Ordered electrochemically active films of hemoglobin, didodecyldimethylammonium ions, and clay. *Langmuir*, **15** (20), 7022–7030, 1999.
- [137] H.-H. Liu, Z.-Q. Tian, Z.-X. Lu, Z.-L. Zhang, M. Zhang, and D.-W. Pang. Direct electrochemistry and electrocatalysis of heme-proteins entrapped in agarose hydrogel films. *Biosens. Bioelectron.*, **20** (2), 294–304, Sep 2004.
- [138] S.-F. Wang, T. Chen, Z.-L. Zhang, X.-C. Shen, Z.-X. Lu, D.-W. Pang, and K.-Y. Wong. Direct electrochemistry and electrocatalysis of heme proteins entrapped in agarose hydrogel films in room-temperature ionic liquids. *Langmuir*, **21**, 9260–9266, 2005.
- [139] S. Andreescu, L. Barthelmebs, and J.-L. Marty. Immobilization of acetylcholinesterase on screen-printed electrodes: comparative study between three immobilization methods and applications to the detection of organophosphorus insecticides. *Anal. Chim. Acta*, **464** (2), 171–180, 2002.
- [140] H. Randriamahazaka, V. Noel, S. Guillerez, and C. Chevrot. Interpenetrating organic conducting polymer composites based on polyaniline and poly(3,4-ethylenedioxythiophene) from sequential electropolymerization. *J. Electroanal. Chem.*, **585** (2), 157–166, Nov. 2005.
- [141] L. H. Eng, M. Elmgren, P. Komlos, M. Nordling, S.-E. Lindquist, and H. Y. Neujahr. Viologen-based redox polymer for contacting the low-potential redox enzyme hydrogenase at an electrode surface. *J. Phys. Chem.*, **98**, 7068–7072, 1994.
- [142] A. Ramanavicius, K. Habermuller, E. Csöregi, V. Laurinavicius, and W. Schuhmann. Polypyrrole-entrapped quinoxaline protein alcohol dehydrogenase. Evidence for direct electron transfer via conducting-polymer chains. *Anal. Chem.*, **71** (16), 3581–6, Aug 1999.
- [143] B. M. Smith, S. E. Lappi, S. H. Brewer, S. Dembowy, J. Belyea, and S. Franzen. Covalent attachment of a nickel nitrilotriacetic acid group to a germanium attenuated total reflectance element. *Langmuir*, **20** (4), 1184–1188, 2004.
- [144] E. Schmid, T. Keller, Z. Dienes, and H. Vogel. Reversible oriented surface immobilization of functional proteins on oxide surfaces. *Anal. Chem.*, **69** (11), 1979–85, Jun 1997.
- [145] G. Presnova, V. Grigorenko, A. Egorov, T. Ruzgas, A. Lindgren, L. Gorton, and T. Borchers. Direct heterogeneous electron transfer of recombinant horseradish peroxidases on gold. *Faraday Discussions*, **116**, 281–289, 2000.
- [146] E. E. Ferapontova, V. G. Grigorenko, A. M. Egorov, T. Borchers, T. Ruzgas, and L. Gorton. Direct electron transfer in the system gold electrode-recombinant horseradish peroxidases. *J. Electroanal. Chem.*, **509** (1), 19–26, Aug. 2001.
- [147] E. Ferapontova and L. Gorton. Effect of pH on direct electron transfer in the system gold electrode-recombinant horseradish peroxidase. *Bioelectrochemistry*, **55** (1-2), 83–87, Jan. 2002.
- [148] H. Onishi, T. Maita, G. Matsuda, and K. Fujiwara. Evidence for the association between two myosin heads in rigor acto-smooth muscle heavy meromyosin. *Biochemistry*, **28** (4), 1898–1904, Feb 1989.
- [149] H. Onishi, T. Maita, G. Matsuda, and K. Fujiwara. Carbodiimide-catalyzed cross-linking sites in the heads of gizzard heavy meromyosin attached to f-actin. *Biochemistry*, **28** (4), 1905–1912, Feb 1989.
- [150] M. Sugiura and Y. Inoue. Highly purified thermo-stable oxygen-evolving photosystem ii core complex from the thermophilic cyanobacterium *synechococcus elongatus* having his-tagged cp43. *Plant Cell Physiol.*, **40** (12), 1219–1231, Jan. 1999.
- [151] R. Hienerwadel, A. Boussac, J. Breton, and C. Berthomieu. Fourier transform infrared difference study of tyrosined oxidation and plastoquinone qa reduction in photosystem ii. *Biochemistry*, **35** (48), 15447–15460, Dec. 1996.

- [152] M. Roncel, A. Boussac, J. Zurita, H. Bottin, M. Sugiura, D. Kirilovsky, and J. Ortega. Redox properties of the photosystem II cytochromes b_{559} and c_{550} in the cyanobacterium *Thermosynechococcus elongatus*. *J. Biol. Inorg. Chem.*, **8** (1 - 2), 206–216, Jan. 2003.
- [153] Y. Kashino, W. Lauber, J. Carroll, Q. Wang, J. Whitmarsh, K. Satoh, and H. Pakrasi. Proteomic analysis of a highly active photosystem ii preparation from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. pcc 6803 reveals the presence of novel polypeptides. *Biochemistry*, **41** (25), 8004–8012, 2002.
- [154] S. Keller, Y. Riou, J.-M. Laval, and W. Leibl. Fusion of chromatophores from photosynthetic bacteria with a supported lipid layer: characterization of the electric units. *FEBS Lett.*, **487** (2), 213–218, Dec. 2000.
- [155] K. Alcantara, B. Munge, Z. Pendon, H. Frank, and J. Rusling. Thin film voltammetry of spinach photosystem II. proton-gated electron transfer involving the Mn_4 cluster. *J. Am. Chem. Soc.*, **128** (46), 14930–14937, 2006.
- [156] T. Antoine, P. M. Lindberg, V. Fourmond, M. Rousset, V. Méjean, and H. Bottin. Expression of a [Fe-Fe] hydrogenase from the alga *Chlamydomonas reinhardtii* in *Shewanella oneidensis*. submitted, 2007.
- [157] V. Fourmond. *Les expressions régulières par l'exemple*. Éditions H&K, 2005.
- [158] M. Wirtz, J. Klucik, and M. Rivera. Ferredoxin-mediated electrocatalytic dehalogenation of haloalkanes by cytochrome p450cam. *J. Am. Chem. Soc.*, **122** (6), 1047–1056, Feb. 2000.
- [159] T. Joslin and D. Pletcher. The digital simulation of electrode processes. procedures for conserving computer time. *J. Electroanal. Chem.*, **49** (2), 171–186, Jan. 1974.
- [160] W. T. Vetterling, S. A. Teukolsky, B. P. Flannery, and W. H. Press. *Numerical Recipes in C*. Cambridge University Press, 2nd edition, 1192.
- [161] M. Rögner, P. Nixon, and B. Diner. Purification and characterization of photosystem I and photosystem II core complexes from wild-type and phycocyanin-deficient strains of the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. *J. Biol. Chem.*, **265** (11), 6189–6196, 1990.
- [162] P. N. Palma, B. Lagoutte, L. Krippahl, J. J. G. Moura, and F. Guerlesquin. *Synechocystis* ferredoxin/ferredoxin-nadp(+)-reductase/nadp+ complex: Structural model obtained by nmr-restrained docking. *FEBS Lett.*, **579** (21), 4585–4590, Aug 2005.

Notations utilisées

Symboles	Définitions	Signification
$[X]$		concentration de X
$[X]_0$		concentration de toutes les espèces de X
$\tilde{X}$	(3.16), p. 22	transformée de Laplace de X
$\tilde{x}$		variable adimensionnée correspondant à x
α	(3.6), p. 20	paramètre du modèle de Butler-Volmer
C_0		concentration initiale, totale
$C_{\text{éq.}}$	page 27	capacité équivalente de la double couche
Γ	(3.26), p. 24	rapport entre les concentrations de forme réduite et oxydée d'un couple
γ	$\frac{1}{1 + \Gamma}$	proportion d'oxydé sur le total
D_x		coefficient de diffusion de x
E_0		potentiel standard d'un couple rédox
η	(5.15), p. 46	efficacité catalytique
$\mathcal{F}$		constante de Faraday
f	$\frac{RT}{\mathcal{F}}$	
I		courant électrique ou, plus rarement, intensité lumineuse
j		courant surfacique
k_a	pages 44 à 46	constante apparente du <i>premier</i> ordre
$k_{\text{app.}}$	(5.48), p. 63	constante apparente du <i>second</i> ordre
K_d		constante de dissociation d'un complexe
k_f, k_b, k_s	(3.5) et (3.6), p. 20	constantes de réaction à l'électrode
$R_{\text{éq.}}$	page 27	résistance équivalente de la double couche
S		aire géométrique de la surface électroactive d'une électrode
t_m	(3.24), p. 24	temps du milieu d'un voltamogramme cyclique
v	(3.24), p. 24	vitesse de balayage (mV.s^{-1}) d'un voltamogramme cyclique