

UNIVERSITÉ BORDEAUX I

**THÈSE**

Pour obtenir le titre de :

**Docteur de l'Université Bordeaux I**  
**Spécialité : Chimie-Physique**

présentée et soutenue publiquement le 10 février 2005 par :

**Chantal TASSIUS**

---

**Modèles et méthodes expérimentales pour la caractérisation *in situ*  
de la dynamique d'enzymes immobilisés**

---

Directeur de thèse :

**Françoise ARGOUL**

Devant la commission d'examen formée de :

M. Laurent SERVANT	Président
M. Michel DESMADRIL	Rapporteur
M. Francis RONDELEZ	Rapporteur
M. Juan ELEZGARAY	
M. Jean-Pierre AIME	
M. Françoise ARGOUL	
M. Philippe MINARD	Invité



Au moment de mettre le point final au manuscrit, ce sont toutes les rencontres que j'ai faites grâce à cette thèse qui me reviennent à l'esprit. Ces années ne se résument pas au travail scientifique qui a pu être accompli, ce fut avant tout une aventure humaine. Je tiens donc à remercier tous ceux sans qui ces pages n'auraient certainement pas existé.

Tout d'abord, je remercie Françoise Argoul, sous la direction de qui a été réalisé ce travail. Elle a toujours su défendre mon cas aux moments opportuns. Comme elle me l'avait souhaité, ce fut une expérience pleine d'enseignements.

Ma reconnaissance va également à messieurs Francis Rondelez et Michel Desmadril qui ont accepté de rapporter ce travail. Merci pour votre lecture critique du manuscrit. Je remercie très sincèrement Juan Elezgaray et Jean-Pierre Aimé d'avoir accepté de faire également partie du jury et de quitter pour quelques jours, la douceur océanique pour les frimas lyonnais.

J'ai été très honorée que Laurent Servant ait accepté de présider ce jury de thèse. Depuis ce jour du 10 février 2005, il n'a cessé de m'étonner par sa disponibilité, son écoute et son enthousiasme communicatif. Je l'en remercie très sincèrement et espère que nos routes se croiseront de nouveau.

Je tiens également à remercier tout particulièrement Philippe Minard qui s'est laissé convaincre (de guerre lasse?) de figurer en tant qu'invité au jury. Les purifications en chambre froide, à 4°C toute la journée (si, si, je l'ai fait...) ont été un réel plaisir sous la houlette de ce "prof" à l'inaltérable sourire. Et en plus ça a marché du premier coup!!!

La première année de cette thèse s'est déroulée au Centre de Recherche Paul Pascal à Pessac. De Bordeaux et sa région, je retiendrai la bonne humeur et la convivialité que donnent aux aquitains le soleil et la douceur du climat. Un grand merci à Nadine, Béa, Marilyn et Christine qui ont toujours donné aux corvées administratives une légèreté incomparable.... Merci également aux mécanos et aux électroniciens, pour toutes leurs interventions sur la manip'.

J'ai aussi eu la chance d'y cotoyer JB, Seb et Laure, Fab et ses gars avec qui les contacts demeurent malgré la distance. Entre naissance et week-ends sous la pluie, les retrouvailles sont toujours un véritable plaisir.

La suite de l'histoire est rhodanienne et je remercie très sincèrement, pour leur investissement au quotidien, tous les membres qui ont fait ou font partie de cette équipe venue de Bordeaux et grandissant à Lyon. S'y mêlent théoriciens et expérimentateurs, extravertis et timides, royalistes et socialos, à la grande stupeur de nos voisins de table à la cantine. Merci également à toutes les personnes qui font vivre le laboratoire de Physique de l'Ecole Normale Supérieure. Leur accueil chaleureux et leur disponibilité ont permis d'aplanir nombre des difficultés liées à un déménagement.

Mais au-delà de l'atmosphère particulière qui règne dans cette école prestigieuse, au delà des rencontres souvent intimidantes de personnages tels Bernard Castaing, il y a eu la troisième année de thèse. Je tiens à exprimer toute ma gratitude à tous ceux (et ils sont nombreux!) qui m'ont soutenu et aidé à atteindre l'objectif que je m'étais fixé. J'ai failli abandonner à plusieurs reprises mais vos mots, votre patience et votre approche passionnée je crois, m'ont fait tenir jusqu'à l'heureux dénouement. Alors merci à Patrick R., Thierry, Loïc, Bernard, Angel, Claude, pour leur sollicitude, à Seb et Baptiste, les correcteurs attitrés, à Louis et Linda, les oreilles attentives. Un merci tout particulier à Hervé Gayvallet pour les séances de TP de douze heures (d'affilée avec ravitaillement express endive+pamplemousse), les randos de nuit entre ronciers et tourbières et les défis impossibles (comme allumer un feu par un soir d'orage).

Merci à Laurence et Nadine pour leur soutien, leur bonne humeur à toute épreuve et leur disponibilité ainsi qu'à Denis, Franck, Marc et le "petit" dernier pour leur travail et leurs blagues assaisonnées d'huile de coupe. Je fais aussi un petit clin d'oeil à Hervé et Bertrand, nos informaticiens et à Louis-Paul, Christine et toute la joyeuse bande des bibliothécaires. Leur serviabilité et leur constante bonne humeur ont souvent rendu mes journées plus belles.

Enfin merci à Cathy, Seb et Cendrine pour leur abnégation. Vos relectures m'ont beaucoup aidé dans l'écriture de ce manuscrit. Un merci tout spécial à Cendrine, dont les éclats de rire toujours présents même aux moments les moins faciles, m'ont permis de relativiser. J'espère que tu sais que ce n'est pas uniquement pour toutes les corvées que je t'ai imposées que je te remercie, mais bien parce que tu es restée la Cendrine au grand coeur. Que le temps n'ait jamais d'emprise sur ta bonne humeur même si avec les manips, c'est souvent "une de réussite pour ... dix mois de galère" !

Merci aux Barentin-Ybert et aux Moska pour tous les instants-détente, à Lisa ma colloc', à Cyril mon binôme devenu ami et tous mes proches, parents et amis, qui m'ont supporté en me supportant.

Bon vent à ceux pour qui viendra bientôt le tour : Fanfan, Romain, Bruno, Josef, Seb, Béber, Brice, Corinne, Louis, Linda, Michaël, Fred, Ed, Samuel, Mathieu C., Mathieu G., Aristide, Jalal, Maxime.

# Table des matières

<b>I</b>	<b>Activité d'enzymes immobilisés</b>	<b>15</b>
<b>1</b>	<b>Présentation des enzymes</b>	<b>17</b>
1.1	Généralités sur les protéines. Cas particulier de la PGK. . . . .	17
1.2	Activité d'un enzyme en solution . . . . .	22
1.2.1	Modèle général . . . . .	22
1.2.2	Complexité du fonctionnement . . . . .	28
1.2.3	Modélisation dans le cas de la PGK . . . . .	33
<b>2</b>	<b>Effets physiques induits par l'immobilisation d'enzymes</b>	<b>42</b>
2.1	Effet de la diffusion seule . . . . .	43
2.1.1	Hypothèse du régime stationnaire . . . . .	44
2.1.2	Cas non stationnaire . . . . .	50
2.2	Contribution électrostatique . . . . .	61
2.2.1	Modèle classique de la double couche électrique . . . . .	61
2.2.2	Modification des équations du régime diffusif stationnaire. Equation de Nernst-Planck . . . . .	65
2.2.3	Autres conséquences de l'accrochage . . . . .	79
2.3	Activité de la PGK . . . . .	81
<b>II</b>	<b>Approche expérimentale par les plasmons de surface</b>	<b>85</b>
<b>3</b>	<b>Présentation des plasmons</b>	<b>86</b>
3.1	Présentation du phénomène physique . . . . .	87
3.1.1	Propriétés fondamentales dans le cas de surfaces lisses. . . . .	87
3.1.2	Excitation des plasmons par la lumière. . . . .	89
3.2	Applications . . . . .	95
3.2.1	Utilisation des appareils commerciaux : études portant sur du matériel biologique . . . . .	96
3.2.2	Autres études utilisant la SPR . . . . .	98
<b>4</b>	<b>Dispositif expérimental et résultats</b>	<b>99</b>
4.1	Montage optique . . . . .	101
4.2	Surfaces testées . . . . .	104
4.2.1	Protocole d'accrochage des protéines sur les dépôts d'or par l'intermédiaire d'une monocouche auto-assemblée . . . . .	104
4.2.2	Dépôts d'or . . . . .	106
4.2.3	Intermédiaire d'accrochage : monocouche auto-assemblée (SAM) . . . . .	110
4.2.4	Accrochage des protéines . . . . .	112

4.2.5	Déroulement d'une expérience de résonance de plasmon et exploitation des données . . . . .	127
4.3	Résultats des expériences de résonance plasmon . . . . .	130
4.3.1	Amplitude du bruit et influence du pH . . . . .	130
4.3.2	Caractérisation de la réponse à une injection . . . . .	134
4.3.3	Conclusion . . . . .	142
<b>III</b>	<b>Annexes</b>	<b>145</b>
<b>A</b>	<b>Protocole du test d'activité biochimique de la PGK</b>	<b>146</b>
A.1	Tampons et solutions . . . . .	146
A.1.1	Tampon d'activité . . . . .	146
A.1.2	Préparation du milieu réactionnel . . . . .	146
A.1.3	Solution d'enzyme de couplage . . . . .	147
A.1.4	Dilution préalable de la PGK . . . . .	147
A.2	Mesure de l'activité en solution . . . . .	147
<b>B</b>	<b>Protocole de purification de la PGK</b>	<b>148</b>
B.1	Tampons et solutions . . . . .	148
B.1.1	Purification . . . . .	148
B.1.2	Electrophorèse . . . . .	148
B.2	Produits divers . . . . .	149
B.3	Préparation des colonnes de chromatographie . . . . .	149
B.4	Purification . . . . .	150
B.4.1	Préparation de la solution protéique de départ . . . . .	150
B.4.2	Purification à partir du lysat . . . . .	150
B.5	Gel d'électrophorèse . . . . .	151
B.5.1	Préparation du gel SDS-PAGE inférieur . . . . .	151
B.5.2	Préparation du gel SDS-PAGE supérieur . . . . .	152
B.5.3	Préparation des échantillons . . . . .	152
B.5.4	Révélation du gel . . . . .	152
B.6	Résultats commentés de la purification de la PGK mutée 140C . . . . .	153
B.6.1	Etapés préliminaires . . . . .	153
B.6.2	Purification à partir du lysat . . . . .	154
B.6.3	Bilan de l'extraction . . . . .	156
<b>C</b>	<b>Calculs relatifs au chapitre 3</b>	<b>158</b>
C.1	Equation de <i>Gouy-Chapman</i> . . . . .	158
C.2	Valeurs de $\eta$ dans les cas-limites $\mu/\beta_b \gg 1$ et $\mu/\beta_b \ll 1$ . . . . .	158
<b>D</b>	<b>La microscopie à force atomique</b>	<b>160</b>
<b>E</b>	<b>Calculs et données relatifs aux plasmons</b>	<b>162</b>
E.1	Relation de dispersion à la surface d'un solide semi-infini . . . . .	162
E.2	Valeurs de la constante diélectrique de l'or utilisées dans le calcul des profils théoriques	164

# Introduction générale

## *Vers la visualisation des échelles moléculaires*

Au fur et à mesure que notre compréhension du monde du vivant progresse, l'ingéniosité des processus mis en jeu à l'échelle moléculaire s'impose à nous. De là viennent peut-être une certaine fascination et l'envie de développer des approches toujours plus précises et informatives.

Les expériences menées en tubes à essais ou sur un ensemble d'objets accrochés à une surface donnent accès à des effets moyens prenant en compte les contributions de tous les éléments et masquant les comportements individuels. Ces derniers sont pourtant indispensables à la compréhension et/ou la modélisation de dynamiques d'ensemble. On peut accéder aux comportements individuels par des expériences de molécule unique dont nous donnerons quelques exemples. Les deux approches sont tout aussi nécessaires : l'information à l'échelle individuelle est plus riche mais les molécules considérées ne sont pas, en général, isolées au sein des cellules vivantes dans lesquelles elles manifestent parfois des comportements collectifs.

La mise au point de microscopes à sondes locales comme le microscope à effet tunnel (STM) ou le microscope à force atomique (AFM), permettent aujourd'hui une visualisation directe des échelles nanométriques et sub-nanométriques (fig. 1). Le principe de fonctionnement de ces microscopes repose sur les forces d'interaction mises en jeu entre une pointe (la sonde) et une surface (voir l'annexe D pour le principe de l'AFM).

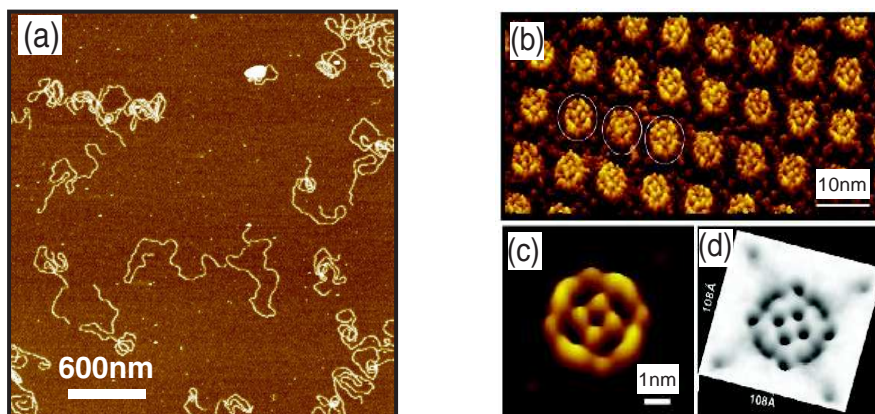


FIG. 1 – Images obtenues par AFM (a) Image de molécules d'ADN déposées sur des surfaces mica fraîchement clivé (mode tapping en tampon aqueux) [1]. (b) Cristal 2D d'aquaporines-Z. (c) Image d'une seule protéine et (d) paysage énergétique associé [2].

En plus d'un énorme potentiel informatif, l'AFM peut être utilisé en milieu liquide et n'impose pas de propriétés particulières des échantillons, contrairement au STM qui ne permet d'imager que des surfaces conductrices. Ces qualités de l'AFM ont permis une application rapide à l'étude d'objets biologiques. La possibilité de sonder le comportement d'une seule molécule constitue un autre avantage de taille de ces appareils. Si les études de molécule unique par AFM se multiplient, les approches indirectes (microscopie optique, pinces optiques) donnent depuis une dizaine d'années déjà, de formidables résultats. Dans ces expériences, on ne suit pas directement la molécule étudiée, mais un objet diffusant, souvent une bille de latex fixée à la molécule.

## Deux exemples d'études sur molécule unique

Ces expériences élégantes sont le résultat d'un travail expérimental remarquable et de la mise en commun de plusieurs domaines de compétences. Nous donnons ici l'exemple des travaux de Bustamante *et al.* portant sur l'ARN polymérase [3]. Cette protéine réalise la transcription de l'information génétique, c'est-à-dire le passage de l'ADN à un ARN messager. Ce messager sera ensuite traduit pour conduire à la formation d'une nouvelle protéine.

Nous donnons dès le début du chapitre 1, quelques généralités sur les protéines. Retenons pour l'instant, qu'elles forment une grande classe de macromolécules biologiques. Les acides nucléiques, ADN et ARN, en constituent une autre grande famille.

Lors de la transcription, l'ARN polymérase se déplace de façon orientée, le long d'un brin d'ADN et génère le brin d'ARN correspondant, par complémentarité des bases. L'enchaînement des bases A, C, G, T constitutives de l'ADN imposent celui des bases A, C, G, U de l'ARN. Dans l'ADN, l'adénine (A) est complémentaire de la thymine (T) et la cytosine (C), de la guanine (G). Dans la molécule d'ARN, l'uracile (U) remplace la thymine.

Dans l'expérience considérée, la protéine est accrochée à une bille maintenue fixe au bout d'une micropipette. La molécule d'ADN est accrochée, par l'extrémité où débute la transcription, à une seconde bille dont on suit le déplacement (fig. 2). Les fixations aux deux billes sont réalisées peu après la formation du complexe impliquant l'ARN polymérase et l'ADN, l'évolution de ce complexe étant inhibé le temps de l'accrochage. Dans la situation initiale, les deux billes sont donc toutes proches. Au fur et à mesure de la progression de la polymérase pour former l'ARN, le brin d'ADN entre les deux billes s'allonge et est étiré par un flux hydrodynamique. L'observation et la mesure de l'écart entre les deux billes renseigne sur la distance parcourue par la polymérase sur l'ADN et donc, sur la dynamique de la protéine.

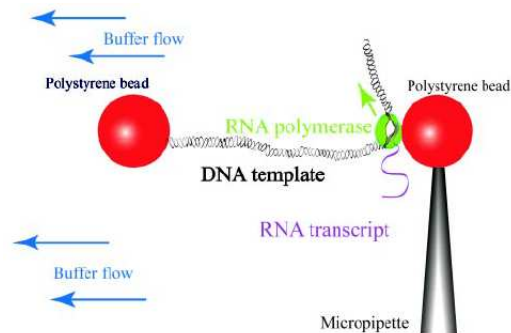


FIG. 2 – Schéma de principe d'une expérience de molécule unique appliquée à l'étude de la dynamique de l'ARN polymérase le long d'un brin d'ADN [3].

Cette expérience a permis de mettre en évidence des temps de pause dans la dynamique de la polymérase et la variabilité de ce temps selon l'individu considéré. Au-delà des résultats propres au fonctionnement des ARN polymérases, cet exemple illustre toute la pertinence des expériences de molécule unique. On s'affranchit des effets de moyenne et on accède ainsi à des comportements individuels, susceptibles de montrer une grande dispersion.

Nous présentons maintenant les suites d'une des premières expériences de molécule unique montée en 1993 par S. Block et son équipe [4]. Ces travaux portent sur les moteurs moléculaires, protéines permettant la conversion, à l'échelle des cellules, de l'énergie stockée dans l'ATP (adénosine triphosphate)



en travail mécanique. L'ATP joue donc le rôle de carburant pour les moteurs moléculaires. Ceux-ci sont notamment à l'origine des phénomènes de contraction musculaire et d'oscillation des flagelles des spermatozoïdes leur permettant de se déplacer, ou des mécanismes d'audition [5].

Dans le cas des études menées par S. Block [4, 6], le moteur considéré est une kinésine fixée à une bille de latex. Cette dernière est piégée optiquement par un faisceau laser (pinces optiques) au moyen duquel on peut également contrôler la force exercée sur le moteur. On peut alors déduire de l'observation des mouvements de la bille, la dynamique d'avancée du moteur le long d'un microtubule (fig. 3). Les microtubules sont des filaments constitutifs du cytosquelette (le « squelette cellulaire ») et vont servir de rails aux moteurs dans leurs déplacements au sein des cellules. L'un des buts de l'expérience est de comprendre comment s'opère la conversion de l'énergie moléculaire, libérée par l'hydrolyse de l'ATP, en énergie mécanique.

Les auteurs ont estimé le « pas de la kinésine » à 8 nm [4]. C'est le déplacement que permet l'hydrolyse d'une molécule d'ATP. On atteint là encore une résolution à l'échelle nanométrique, comme dans le cas des microscopes à force atomique et à effet tunnel. De plus, on est pratiquement assuré que le signal mesuré n'est imputable qu'à un seul moteur.

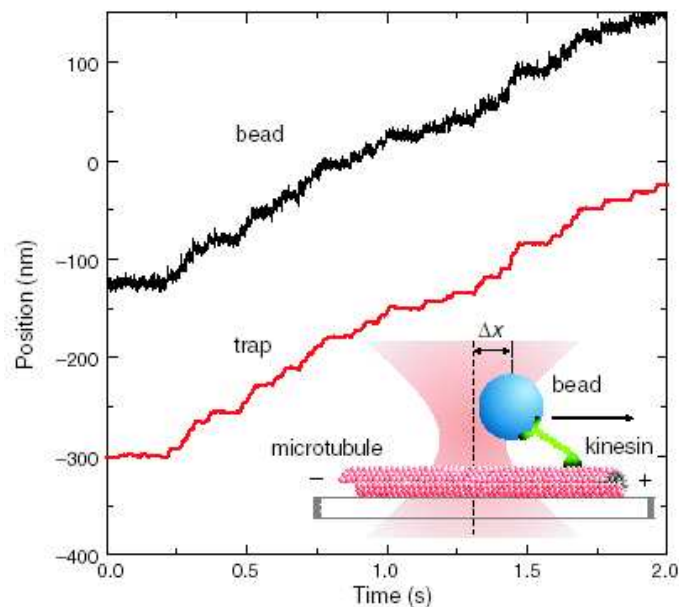


FIG. 3 – Suivi de la progression d'une kinésine le long d'un microtubule [4]. Le laser est, dans cette expérience, asservi aux déplacements de la bille de façon à maintenir une distance  $\Delta x$  constante entre le centre du faisceau laser et le centre de la bille.

Cette technique permet de mesurer les vitesses atteintes par le moteur en fonction de la concentration d'ATP ou de la force associée au piégeage qui retient la bille plus ou moins fortement. On peut ainsi caractériser le fonctionnement de la kinésine.

Nous nous sommes ici limités à l'exemple d'un type de moteurs moléculaires, mais il en existe d'autres (dynéines, myosines). Les myosines interagissent quant à elles, avec des filaments d'actine au lieu des microtubules, lors du processus de contraction musculaire.

Grâce aux expériences de molécule unique, on accède au comportement d'un seul moteur pour lequel un modèle pertinent peut alors être proposé. A partir du modèle pour un moteur et de considérations relevant de la physique statistique, on peut rendre compte des comportements collectifs impliquant un grand nombre de ces moteurs et observés expérimentalement [7]. C'est l'objet des travaux théoriques de J. Prost et de ses collaborateurs [8, 9], dont les résultats s'appliquent aux différents types de moteurs cités.

L'essentiel des observations expérimentales est reproduit en prenant pour chacun des moteurs un modèle simplifié à deux états notés 1 et 2. A chacun de ces états correspond un potentiel d'interaction avec le filament considéré (microtubule ou actine), notée  $W_{i \in \{1,2\}}$ . D'autre part, le couplage des moteurs modélisé ici est un couplage rigide.

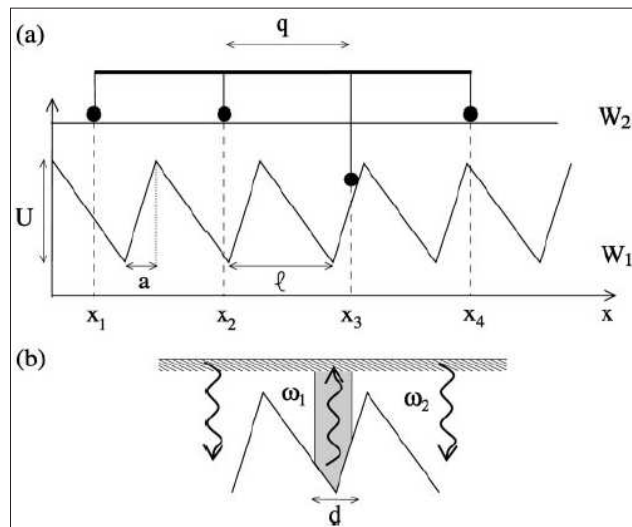


FIG. 4 – Modélisation schématique de moteurs couplés par l'intermédiaire d'une « barre » de longueur fixe  $q$  et interagissant avec un filament : (a) potentiels d'interaction et (b) probabilités de transitions entre les deux états. L'excitation  $w_1$  ( $1 \rightarrow 2$ ) est localisée près du minimum de  $W_1$  et  $w_2$  est une constante de l'espace.

La périodicité et l'asymétrie du potentiel  $W_1$  sont le reflet de la structure moléculaire des polymères orientés que sont les filaments d'actine ou les microtubules. D'un point de vue théorique, cette asymétrie (de  $W_1$  et de  $w_1$ ) est nécessaire à l'observation d'un déplacement spontané du moteur [5].

Les comportements mesurés sur des ensembles de moteurs sont intrinsèquement des phénomènes collectifs, dans lesquels les dynamiques des individus sont couplées et génèrent un mouvement global aisément observable. Pour comprendre le lien entre la sensibilité de la mesure et le nombre d'individus, on peut s'imaginer être un observateur regardant un groupe de personnes. Si l'on ne regarde qu'une seule personne, on est sensible à tous ses mouvements, mais pas (ou peu) à ceux du groupe. En revanche, si l'on s'intéresse à l'ensemble des personnes présentes, elles peuvent très bien se déplacer les unes par rapport aux autres, sans que le groupe ne change de place : on est beaucoup moins sensible aux mouvements individuels. En revanche, si tout le monde bouge de concert, l'évolution sera aisément perceptible.

Nous avons illustré par deux exemples la richesse et la précision des expériences de molécule unique, mais notre intérêt se porte sur des dynamiques d'ensembles non nécessairement synchronisés. Nous nous demandons donc s'il est possible d'observer ces dynamiques avec une sensibilité avoisinant celle des montages de molécules uniques. Nous montrons sur un exemple que la résonance de plasmons de surface fournit des résultats particulièrement intéressants en ce sens.

## *Un détecteur de précision pour sonder des dynamiques d'ensemble*

Le plasmon de surface est une onde de densité électronique observée dans les métaux et qui se propage, comme son nom l'indique, à la surface. Nous décrirons en détail dans ce manuscrit le phénomène physique relatif aux plasmons. Retenons que leur caractéristique essentielle est une grande sensibilité aux variations d'indice optique, au voisinage de la surface du métal. Cette propriété découle de la décroissance exponentielle du champ électromagnétique associé à l'onde, lorsque l'on s'éloigne de cette surface. En ce sens, le phénomène présente les avantages des microscopies en champ proche optique ou en champ évanescent : on est essentiellement sensible à ce qui se passe à proximité de la surface.

On peut donc observer sélectivement le comportement des objets adsorbés ou fixés sur le support métallique. L'atout supplémentaire de la résonance de plasmon de surface (SPR) réside comme nous l'avons dit, dans la sensibilité de la condition de résonance, donc d'excitation de l'onde, vis-à-vis des variations d'indice  $n$ .

Prenons l'exemple de protéines en solution aqueuse. Les variations d'indice résulteront de l'approche, au voisinage de la surface, de la matière protéique, d'indice différent de celui de la solution. Les variations  $\Delta n$  s'associent donc à des variations de masse : plus il y aura de protéines près de la surface, plus l'indice variera, faisant évoluer la condition de résonance.

Pour visualiser l'excitation du plasmon, on mesure l'intensité d'une onde lumineuse réfléchiée par la surface métallique, au moyen d'un dispositif adéquat, présenté dans le chapitre 3. Si le plasmon est excité, une partie de l'énergie incidente alimentera l'onde et ne sera plus réfléchiée : on observe une diminution de l'intensité mesurée. Nous verrons que la condition porte sur l'angle d'incidence de la lumière, et que la diminution est plus ou moins piquée autour d'un angle noté  $\theta_p$ , selon l'indice du milieu en contact avec la surface métallique.

L'évolution de l'angle  $\theta_p$  est reliée à des variations d'indice dues à des flux de matière, donc à des variations de masse. L'action d'une ADN polymérase le long d'un ADN simple brin est suivie par ce biais (courbes  $\theta_p(t)$ ), dans l'expérience menée par Buckle *et al.* [10]. Des séquences poly-A (oligomère de 300 unités en moyenne) portant une biotine en bout de chaîne, sont fixées à la surface métallique par l'intermédiaire d'une matrice polymère. Cette couche polymère est liée chimiquement au métal et fonctionnalisée par de la streptavidine. La formation d'une liaison biotine-streptavidine permet l'accrochage des oligomères à la surface.

Considérons une surface de  $1 \text{ mm}^2$  (taille de la zone sondée par le faisceau lumineux) sur laquelle il y a  $0.5 \text{ ng}$  d'ADN fixé (oligomère poly-A). Cette masse correspond à  $7,5 \cdot 10^{-14}$  mole d'un 20-mère simple brin. L'ajout d'une seule base sur toutes les molécules accrochées se manifesterait par un déplacement du minimum de 25 RU. Le RU est l'unité de résonance fournie par l'appareil utilisé, sachant que le niveau du bruit est de 5 RU [10]. Les vitesses d'acquisition du dispositif utilisé, inférieures à 10 Hz, ne permettent pas de détecter l'ajout des bases une par une. En revanche, même si toutes les molécules d'ADN ne sont pas associées à une polymérase, la sensibilité de la mesure assure que l'observation d'un déplacement du minimum est possible, dès l'ajout de quelques bases.

Lorsque des polymérases et le dTTP (base T, complémentaire de l'adénine) sont mis en présence de l'échantillon, la polymérisation peut avoir lieu. De la mesure du déplacement du minimum, on peut déduire la vitesse de polymérisation et étudier l'influence d'inhibiteurs.

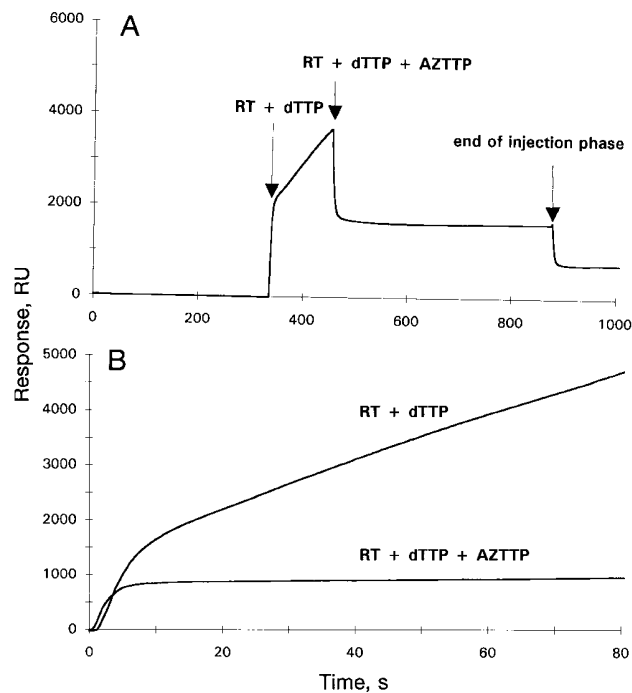


FIG. 5 – Effet de l'inhibiteur AZTTP [10]. (A) L'échantillon est soumis à un flux de  $5 \mu\text{L}/\text{min}$  de polymérase (RT) et de dTTP pendant 2 minutes avant d'ajouter l'inhibiteur. (B) Comparaison des réponses plasmon à l'injection des solutions avec et sans inhibiteur sur deux échantillons séparés.

L'augmentation rapide du signal mesuré (fig. 5 A et B) au début de l'injection est liée à l'arrivée des polymérases près de la surface et à leur association aux oligomères. La croissance linéaire qui suit est directement proportionnelle à la vitesse moyenne de polymérisation. Lorsque débute l'injection de la solution additionnée d'inhibiteur, le signal chute brusquement et se stabilise (graphe A). Les données du graphe B aident à la compréhension. On remarque qu'en début d'injection de la solution sans inhibiteur, le signal atteint un niveau, avant la phase de polymérisation, plus élevé qu'avec l'inhibiteur. Dans le cas où ce dernier est présent, les polymérases s'approchent de la surface (augmentation du signal mesuré), mais l'association est inhibée et il n'y a pas de polymérisation possible.

A travers ce dernier exemple, nous avons voulu illustrer la sensibilité des mesures réalisées par la résonance de plasmons de surface. C'est la principale raison qui a motivé notre choix parmi toutes les techniques permettant l'étude des systèmes biologiques, et dont nous avons donné quelques exemples ici. De plus, le choix des exemples d'expériences de molécule unique et de SPR s'est volontairement porté sur un certain type de protéines : les enzymes.

Les cellules utilisent ces protéines pour catalyser les réactions chimiques nécessaires à leur fonctionnement. Le rôle d'un catalyseur est d'abaisser les barrières d'énergie à franchir, et ainsi de faciliter les réactions chimiques considérées. Les enzymes sont donc des protéines primordiales, ce qui justifie l'intérêt qu'ils suscitent. Nous nous intéresserons à l'un d'entre eux, la phosphoglycérate kinase (PGK).

## *Objet de la thèse et structure du manuscrit*

Notre objectif initial était de mettre au point un appareil capable :

- de détecter des dynamiques de changements conformationnels, c'est-à-dire de modification d'organisation spatiale, dans le cas de protéines accrochées sur un support solide
- d'observer d'éventuels comportements collectifs.

Il fallait donc une molécule qui subisse de façon naturelle un changement conformationnel important, donc plus aisément détectable. La PGK remplit cette condition : lors de son fonctionnement enzymatique, détaillé dans le chapitre 1, elle « s'ouvre » et se « ferme » à la manière d'une pince, dans un mouvement dont l'amplitude est de l'ordre du nanomètre.

Les conditions expérimentales choisies contraignent l'enzyme et peuvent considérablement modifier son comportement par rapport à la situation où il est libre en solution. En effet, le choix de la résonance de plasmon pour sa sensibilité, impose d'accrocher la protéine à une surface métallique. La PGK sera alors confinée au voisinage d'une surface chargée.

Nous nous intéressons donc, dans la première partie, aux propriétés des enzymes en général et de la PGK en particulier. Nous considérons le cas idéal en solution, mais également des situations plus proches de la réalité des expériences que nous avons menées.

Dans le premier chapitre, nous présentons les modèles de référence, permettant l'étude de la cinétique d'enzymes non confinés. Nous terminons ce chapitre par la présentation du modèle enzymatique de notre protéine d'intérêt, valable pour l'enzyme libre en solution.

Dans le second chapitre nous examinons les contributions des phénomènes diffusifs et électrostatiques à la cinétique d'enzymes accrochés à une surface chargée. Dans un premier temps, nous envisageons les cas stationnaire et non stationnaire, lorsque seule la diffusion est prise en compte. Nous appliquons ensuite certains résultats de la littérature au cas de la PGK, lorsque les deux contributions (électrostatique et diffusion) sont considérées, et uniquement en régime stationnaire.

Les calculs présentés s'efforcent d'être, dans la mesure du possible, représentatifs des paramètres, grandeurs ou conditions correspondant au dispositif expérimental. L'introduction de paramètres sans dimension dans chacun des cas, permet de souligner les points communs et différences des trois situations envisagées.

Nous terminons cette partie par la mesure de l'activité de la PGK fixée sur une surface d'or, selon un protocole identique à celui utilisé pour les expériences de plasmons. Cette mesure d'activité valide le protocole choisi, légèrement différent de ceux traditionnellement rencontrés. Nous avons en effet cherché à diminuer la taille de l'intermédiaire d'accrochage pour augmenter la contribution relative de la protéine, dans la réponse plasmon mesurée. Nous nous affranchissons également des phénomènes de diffusion dans la couche polymère usuellement utilisée pour la fixation des objets à la surface métallique.

La seconde partie est consacrée à l'approche expérimentale proprement dite. Dans le chapitre 3, nous nous intéressons plus particulièrement aux plasmons. Après la présentation du phénomène physique et de ses caractéristiques, nous en donnons quelques applications. Nous passons ensuite, dans le chapitre 4 à une description détaillée du dispositif expérimental (montage optique et préparation des surfaces), du traitement des données et des résultats obtenus. Nous montrons en effet par une étude comparative, que la présence des protéines affecte la réponse plasmon détectée selon plusieurs critères.

Afin de guider la lecture et la compréhension, en particulier au long des calculs des chapitres 2 et 3, les idées ou résultats intermédiaires importants sont encadrés. De plus, nous avons préféré faire des bilans ou des conclusions partielles plutôt qu'une conclusion globale qui rassemblerait trop d'idées différentes. Ces résumés se rattachent donc au sujet traité sur les quelques pages précédant la synthèse et donnent des points de repère en soulignant l'essentiel du propos.

Nous nous sommes efforcés d'éviter les anglicismes. Toutefois, lorsque le terme est couramment employé, nous l'avons indiqué en *italique*. Nous utilisons également cette notation dans le cas des expressions latines.

Les notions nouvelles, ou particulières au domaine présenté, sont soulignées. Bien sûr, le choix des notions soulignées conserve une part de subjectivité, que nous avons cependant cherché à limiter.

Première partie

**Activité d'enzymes immobilisés**





# Chapitre 1

## Présentation des enzymes

Les notions très simples rappelées ici, visent à préciser le vocabulaire et les concepts ou les données, utilisés dans la suite du texte.

### 1.1 Généralités sur les protéines. Cas particulier de la PGK.

Les protéines sont des macromolécules biologiques indispensables au fonctionnement des cellules vivantes. Ces polymères linéaires sont synthétisés à partir de 20 acides  $\alpha$ -aminés standards que nous noterons A.A. par la suite. Ces acides  $\alpha$ -aminés ont tous la même formule générique (fig. 1.1) : ils portent les groupes fonctionnels acide carboxylique (-COOH) et amine (-NH<sub>2</sub> le plus souvent) sur le même atome de carbone. On appelle peptides, les oligomères d'acides aminés formés de seulement quelques unités. Lors de la digestion des protéines (ou polypeptides), la liaison entre deux peptides, donc entre deux acides aminés est rompue. Le groupement caractéristique (-CO-NH-) associé à cette liaison, appelée liaison peptidique, est le produit de la condensation des fonctions acide carboxylique et amine de deux A.A. quelconques.

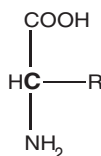


FIG. 1.1 – Formule chimique générale des acides aminés. Le groupement R représente la chaîne latérale.

Les A.A. diffèrent par leur chaîne latérale R, dont nous donnons les formules brutes dans le tableau 1.1 ci-après. A chacun d'entre eux est associé un symbole de 3 lettres ou une lettre unique également indiqués dans ce tableau.

Les protéines sont synthétisées à partir de l'ADN au cours de la transcription, puis de la traduction, processus compliqués et encore à l'étude que nous ne détaillerons pas ici. La transcription permet le passage de la séquence des bases A, C, G, T de l'ADN à un ARN messager. La traduction assure quant à elle, le passage de cet ARN à la séquence protéique, qualifiée de structure primaire de la protéine. La description de la chaîne polypeptidique commence conventionnellement à l'extrémité N-terminale (fig. 1.3), c'est-à-dire le bout de la chaîne présentant la fonction  $\alpha$ -amine non engagée dans une liaison peptidique.

On appelle structures supérieures de la chaîne protéine, les structures secondaire (organisation en feuillet  $\beta$  et hélice  $\alpha$ ) et tertiaire (agencement spatial des structures secondaires). On distingue facilement de nombreuses hélices  $\alpha$  sur la figure (1.3), les feuillet  $\beta$  étant symbolisés par des flèches. La structure quaternaire désigne le positionnement relatif des différentes chaînes polypeptidiques lorsque la protéine comporte plusieurs sous-unités.

Les études portant sur les protéines et leur(s) fonction(s) restent nombreuses du fait, entre autres, du séquençage des génomes. Celui-ci a permis la découverte de nouvelles structures protéiques, dont le rôle reste à éclaircir. La difficulté vient de la complexité du fonctionnement de ces systèmes. Ils impliquent de nombreux partenaires et peuvent évoluer selon les conditions imposées par le milieu, ou le stade du développement de l'organisme étudié.

Nous nous intéresserons dans la suite de ce manuscrit à une classe particulière de protéines : les enzymes. Ces catalyseurs biologiques atteignent des performances rarement égalées par les autres catalyseurs utilisés en chimie notamment. Ils sont très sélectifs, c'est-à-dire qu'ils catalysent une réaction précise, et extrêmement efficaces du point de vue de leur rendement.

Les protéines, dites structurales ou de structure telles les histones par exemple, constituent une autre grande classe de ces macromolécules, tout aussi indispensables aux cellules, mais dont nous ne parlerons pas ici.

La phosphoglycérate kinase (fig. 1.3), notée PGK dans la suite, a été choisie pour réaliser le travail présenté ici pour deux raisons. La première d'entre elles, déjà évoquée en introduction, concerne l'amplitude du changement conformationnel observé lors du cycle enzymatique. Il était en outre préférable d'orienter notre choix vers une protéine dont le comportement soit bien connu et de bénéficier de l'expertise de biochimistes. Dans le cas qui nous concerne, plusieurs expériences de mutagenèse dirigée ont déjà été réalisées et caractérisées quant à leurs conséquences sur la fonction de la PGK [13].

Cet enzyme, polypeptide de 415 acides aminés, intervient dans la glycolyse, principale voie métabolique de production d'énergie cellulaire stockée sous forme d'adénosine triphosphate (ATP). La PGK catalyse le transfert réversible de phosphate suivant, selon un modèle présenté en section 1.2.3 :



FIG. 1.2 – Réaction catalysée par la phosphoglycérate kinase (PGK).

Les molécules, réactifs ou produits selon le sens de la réaction, sont :

- l'adénosine triphosphate (ATP)
- l'adénosine diphosphate (ADP)
- le 3-phosphoglycérate (3-PG)
- le 1,3-biphosphoglycérate (1,3-bPG ou simplement bPG)

Nous parlerons des nucléotides que sont l'ATP et l'ADP, par opposition aux phosphoglycérates que sont le 3-PG et le bPG.

Nom, Symbole de 3 lettres Lettre unique	Chaîne latérale R	Représentativité (%)	pK <sub>a</sub> chaîne latérale
Glycine, Gly G	H	7.2	
Alanine, Ala A	CH <sub>3</sub>	7.8	
Valine, Val V	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	6.6	
Leucine, Leu L	C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>	9.1	
Isoleucine, Ile I	C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> (optiquement actif)	5.3	
Méthionine, Met M	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> S	2.2	
Proline, Pro P	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub>	5.2	
Phénylalanine, Phe F	C <sub>7</sub> H <sub>8</sub>	3.9	
Tryptophane, Trp W	C <sub>9</sub> H <sub>7</sub> N	1.4	
Sérine, Ser S	CH <sub>2</sub> OH	6.8	
Thréonine, Thr T	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> OH	5.9	
Asparagine, Asn N	C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> ONH <sub>2</sub>	4.3	
Glutamine, Gln Q	C <sub>3</sub> H <sub>4</sub> ONH <sub>2</sub>	4.3	
Tyrosine, Tyr Y	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> OH	3.2	10.46
Cystéine, Cys C	CH <sub>3</sub> S	1.9	8.37
Lysine, Lys K	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> NH <sub>3</sub> <sup>+</sup>	5.9	10.54
Arginine, Arg R	C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> N <sub>2</sub> NH <sub>2</sub> <sup>+</sup>	5.1	12.48
Histidine, His H	C <sub>4</sub> H <sub>5</sub> N <sub>2</sub>	2.3	6.04
Acide aspartique, Asp D	C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	5.3	3.90
Acide glutamique, Glu E	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	6.3	4.07

TAB. 1.1 – Formules et symboles des acides aminés (pour les formules développées des chaînes latérales, voir [11]). Représentativité évaluée d'après une estimation sur 207 protéines a priori sans rapport entre elles [12].

Certaines modifications de la séquence ADN de la PGK dite sauvage (non modifiée), permettent d'obtenir des protéines mutées avec des propriétés contrôlées. Dans notre cas, nous voulions pouvoir, le cas échéant, choisir la direction principale d'accrochage de la PGK à la surface métallique.

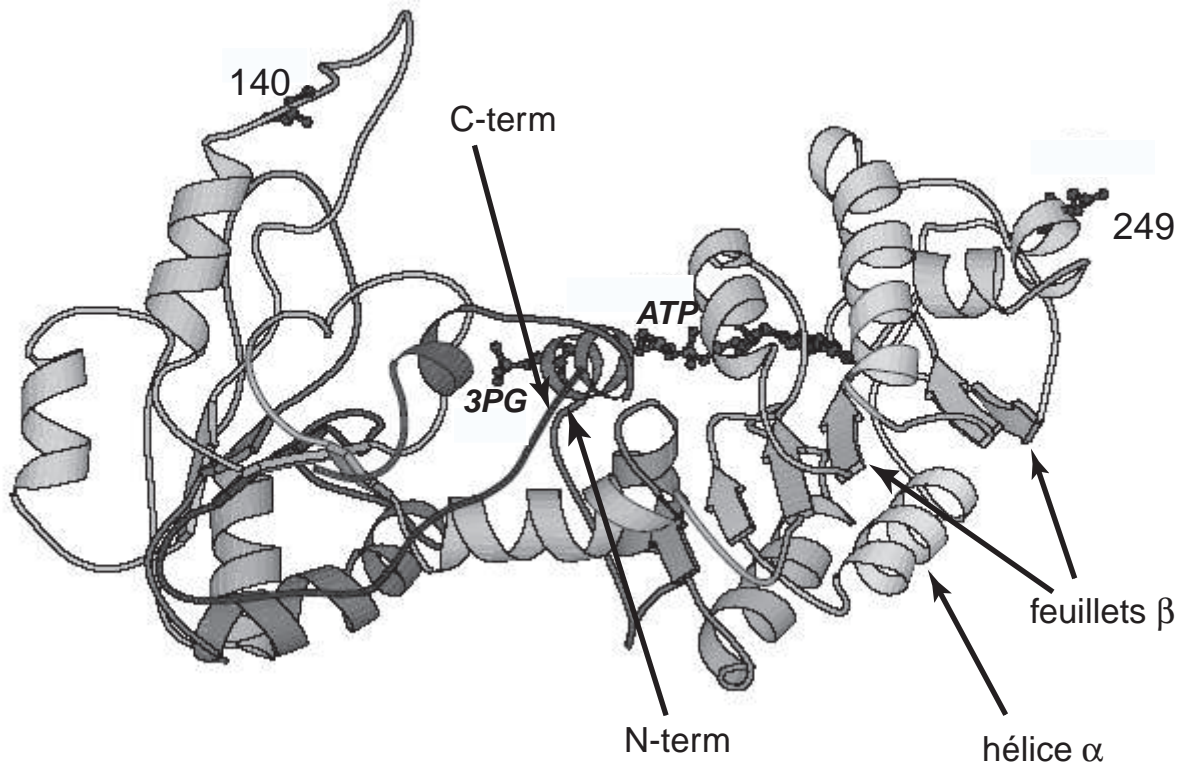


FIG. 1.3 – Schéma des structures secondaire et tertiaire de la PGK. Les hélices  $\alpha$  et feuillets  $\beta$  apparaissent selon leur représentation conventionnelle. Les substrats de l'enzyme (ici ATP et 3PG) viennent se positionner dans le site catalytique pour que la réaction puisse avoir lieu. Les emplacements des cystéines introduites par mutagenèse dirigée (obtention d'une protéine mutée) ainsi que les extrémités C- et N-terminales sont également indiqués.

La purification, dont le protocole est indiqué en annexe B, permet d'obtenir un concentré de protéines, utilisé ensuite pour étudier le fonctionnement contraint de cet enzyme. On l'accroche pour ce faire, à un film métallique qui nous servira de détecteur via la résonance de plasmons de surface (voir chapitre 3). Le lien chimique utilisé est une chaîne alkyle comportant 15 atomes de carbone, fonctionnalisée à ses deux extrémités. D'un côté une fonction thiol (-SH) garantit une liaison avec l'or (S-Au) d'énergie comparable à celle d'une liaison covalente. De l'autre, une fonction acide carboxylique (-CO<sub>2</sub>H) permet un accrochage facilement applicable à une autre protéine. Cet accrochage résulte de la liaison peptidique qui se crée avec les fonctions amines des lysines, A.A. très fréquent dans les structures protéiques (tableau 1.1).

## *Purification et intérêt de la mutagenèse dirigée*

Cette étape, nécessaire à la caractérisation d'un constituant cellulaire particulier, n'est pas toujours aisée. En effet, les cellules contiennent des milliers de constituants aux propriétés physico-chimiques parfois similaires. Le protocole employé se doit donc d'être suffisamment spécifique pour atteindre des degrés de pureté élevés en fin de purification. On s'efforcera tout particulièrement d'éliminer les protéases qui détruisent les protéines par coupure des liaisons peptidiques, ainsi que les protéines dont la structure ou la fonctionnalité sont proches de celle que l'on désire caractériser.

Les protocoles utilisés ont été entièrement mis au point par l'équipe d'Orsay<sup>1</sup> qui nous a accueillies et encadrées. Ils nous ont également fait profiter de leur expertise sur cette protéine en produisant les protéines mutées [13]. Le but de ces mutations est de positionner une cystéine (seul A.A possédant une fonction thiol -SH) en changeant la séquence ADN de la PGK sauvage, sans pénaliser son activité. Cette modification autorise une orientation et une spécificité de l'accrochage. Les deux mutants sélectionnés, c'est-à-dire les souches de levure dont le génome a été modifié, correspondent à la double mutation (Cys97→Ala, Ser140→Cys) d'une part et (Cys97→Ala, Glu249→Cys) d'autre part. On utilise ici les notations du tableau 1.1, les chiffres donnant la position dans la chaîne polypeptidique des A.A. concernés (fig. 1.3). Les mutations sont telles qu'il n'y ait qu'une seule cystéine dans la séquence de la PGK mutée et exactement à la position désirée.

Une connaissance approfondie de la PGK, en particulier quant aux conséquences de ces mutations sur la fonction, est essentielle. Là encore, nous avons pu bénéficier des travaux et des résultats des biochimistes de l'IBBMC.

Nous présentons également dans l'annexe 4.2.4, le principe de la mesure de spectrophotométrie qui intervient à deux niveaux :

- comme illustré en annexe B, elle guide la purification et permet de mesurer la concentration de PGK dans une solution.
- elle permet de suivre la cinétique de la réaction catalysée par la PGK et de mesurer son activité.

---

<sup>1</sup>Institut de Biochimie et Biophysique Moléculaire et Cellulaire (IBBMC), UMR CNRS 8619, Université Paris Sud, bât 430, 91405 ORSAY Cedex, France

## 1.2 Activité d'un enzyme en solution

Les enzymes, catalyseurs d'une efficacité exceptionnelle présents dans les cellules vivantes, interviennent dans des réactions chimiques très diverses : hydrolyse, oxydo-réduction, transfert d'un groupe fonctionnel, pour n'en citer que quelques-unes. Il en résulte une grande variabilité des mécanismes réactionnels mis en jeu lors de leur fonctionnement. Certains enzymes n'agissent que sur une seule molécule, alors que d'autres se lient à deux réactifs ou plus, que nous appellerons substrats dans toute la suite. Leur ordre d'association avec l'enzyme peut éventuellement être important.

L'étude cinétique des réactions de catalyse enzymatique, riche d'informations, permet de valider ou de rejeter les modèles de mécanismes réactionnels proposés et d'évaluer les constantes caractéristiques de l'activité des enzymes. Dans le cas d'un enzyme libre en solution dans un tampon de pH contrôlé, l'évolution temporelle du système n'est pas sensible aux limitations par le transport des substrats et des produits. Le terme de substrat souligne la sélectivité des enzymes : elles ne seront sensibles qu'à un nombre très restreint de réactifs, leurs substrats.

Dans cette première partie, nous reprenons quelques résultats établis dans le cas d'enzymes en solution [14]. La modélisation la plus simple est d'abord présentée avant d'exposer les divers degrés de complexité, nécessaires à une exploitation cohérente des résultats expérimentaux. En particulier, nous terminons cette introduction aux principes généraux de l'enzymologie, par le modèle retenu pour la protéine support de notre étude, la PGK. Bien que trop compliqué pour être utilisé dans les simulations, ce modèle est néanmoins indispensable à la compréhension et à la justification des approximations considérées.

### 1.2.1 Modèle général

#### Rappels de cinétique chimique

On rappelle ici les quelques définitions et hypothèses utilisées dans toute la suite. Considérons la réaction chimique de constante de vitesse  $k$  :



Les coefficients stoechiométriques  $\nu_i$  sont par convention négatifs quand ils se rapportent à un réactif ( $\nu_r < 0$  pour tout  $r$ ), positifs sinon ( $\nu_p > 0$  pour tout  $p$ ).

On définit l'avancement  $\xi$  de la réaction par :

$$n_i(t) = n_{i,0} + \nu_i \xi(t) \quad \text{d'o} \quad \frac{d\xi}{dt} = \frac{1}{\nu_i} \frac{dn_i}{dt} \quad (1.2)$$

où  $n_i(t)$  et  $n_{i,0}$  représentent le nombre de moles de l'espèce  $i$  présentes en solution aux instants  $t$  et  $t = 0$  respectivement.

On définit la vitesse  $v$  de la réaction par :

$$v = \frac{1}{V} \frac{d\xi}{dt} = \frac{1}{\nu_i} \frac{dC_i}{dt} \quad \text{si} \quad V = \text{cste} \quad (1.3)$$

où  $V$  est le volume total concerné par la réaction, et  $C_i$  la concentration molaire de l'espèce  $i$ .

On dit que la réaction chimique (eq. 1.1) suit la loi de Van't Hoff, lorsque sa vitesse définie par (eq. 1.3), s'exprime en fonction de la concentration des réactifs selon :

$$v = k \prod_r [A_r]^{|\nu_r|} \quad (1.4)$$

Un acte élémentaire implique peu d'espèces (2 ou 3 en général). Il décrit, d'un point de vue microscopique, une étape de la réaction chimique. Le schéma réactionnel, constitué de l'ensemble des actes élémentaires, propose une description microscopique permettant de rendre compte des vitesses globales observées (grandeurs macroscopiques).

**Propriété** : Les actes élémentaires suivent la loi de Van't Hoff<sup>2</sup>.

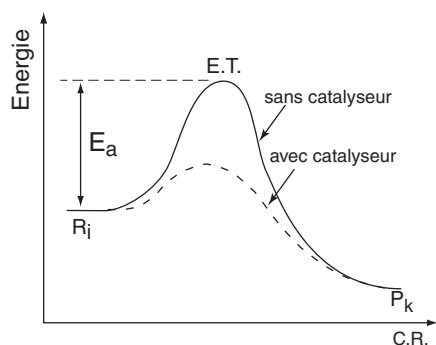


FIG. 1.4 – Profil énergétique simplifié associé à une réaction chimique quelconque.

Considérons une réaction chimique permettant de passer des réactifs  $R_i$  aux produits  $P_k$  via un état de transition E.T. Nous raisonnons sur le profil simplifié ci-contre représentant l'évolution de l'énergie du système en fonction d'une coordonnée (C.R.) du paysage énergétique judicieusement choisie.

La loi d'Arrhénius relie la constante de vitesse  $k$  à  $E_a$  :

$$\frac{d(\ln k)}{dT} = \frac{E_a}{RT^2} \quad (1.5)$$

où  $R$  est la constante des gaz parfaits et  $T$  la température. En général,  $E_a \simeq \Delta_r H^{0,\neq}$  (enthalpie standard de réaction associée à l'équilibre entre les réactifs  $R_i$  et E.T.)

Le rôle de l'enzyme est de diminuer  $E_a$ , sans modifier les constantes d'équilibre de la réaction (profil en pointillés).

### Enzymologie en solution

Le modèle de Brown introduit au début du XX<sup>e</sup> siècle permet de représenter l'action d'un enzyme sur ses substrats selon le schéma réactionnel :



FIG. 1.5 – Schéma réactionnel d'un enzyme E catalysant la réaction permettant de passer du substrat S au produit P, via la formation d'un complexe enzyme-substrat, noté E.S

$k_1$  et  $k_{-1}$  sont les constantes de vitesse associées aux réactions élémentaires de formation et de dissociation du complexe enzyme-substrat,  $k_2$  est associée à la formation des produits concomitante de la régénération de l'enzyme. En adoptant la notation usuelle  $[X]$  pour désigner la concentration de l'espèce X, on définit la vitesse de la réaction enzymatique par :

$$v = \frac{d[P]}{dt} = k_2[E.S] \quad (1.6)$$

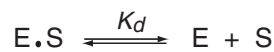
<sup>2</sup>En revanche, les réactions qui suivent la loi de Van't Hoff ne sont pas nécessairement toutes, des actes élémentaires.

La première étape du schéma (fig. 1.5) s'identifie souvent à un équilibre rapide (formation d'un complexe de collision) et par conséquent  $v$ , à la vitesse globale mesurée. En effet, l'étape cinétiquement limitante, celle qui fixe la vitesse observée macroscopiquement, correspond à la formation du produit.  $k_2$  est alors la constante de vitesse apparente du processus enzymatique dans son ensemble.

Un bilan des vitesses d'apparition et de disparition sur les quantités ES et S, conduit au système d'équations différentielles :

$$\begin{cases} \frac{d[E.S]}{dt} = k_1[E][S] - (k_{-1} + k_2)[E.S] \\ \frac{d[S]}{dt} = k_{-1}[E.S] - k_1[E][S] \end{cases} \quad (1.7)$$

On définit  $K_d$ , la constante thermodynamique associée à l'équilibre correspondant à la dissociation du complexe.



soit

$$K_d = \frac{[E][S]}{[E.S]}$$

qui vaut donc  $k_{-1}/k_1$  (à l'équilibre  $d[S]/dt = 0$ ).

L'affinité  $\mathcal{A}$  est une grandeur thermodynamique, dont le signe indique le sens d'évolution d'un système, siège d'une réaction chimique pouvant conduire à un équilibre. Elle est définie par :

$$\mathcal{A} = -\Delta_r G \quad \text{d'o} \quad \mathcal{A}^0 = -\Delta_r^0 G = RT \ln K$$

où  $K$  est la constante d'équilibre de la réaction considérée, à la température  $T$ .

Considérons l'équilibre relatif à la formation du complexe enzyme-substrat, auquel on associe la constante  $K_{ass}$  ( $K_{ass} = K_d^{-1}$ ). L'affinité standard  $\mathcal{A}^0$  s'écrit :

$$\mathcal{A}^0 = RT \ln K_{ass} = -RT \ln K_d$$

$\mathcal{A}^0$  augmente donc quand  $K_d$  diminue.

$K_d$  reflète l'affinité d'un enzyme pour son substrat. On dit que le système est d'autant plus affin que le complexe est stable et se forme dès les faibles concentrations de substrat en solution.

Si on fait l'hypothèse que  $d[E.S]/dt \simeq 0$  :

$$k_1[E][S] = (k_{-1} + k_2)[E.S] \quad (1.8)$$

C'est l'hypothèse de l'état stationnaire<sup>3</sup> pour le complexe ES.

---

<sup>3</sup>A ne pas confondre avec l'hypothèse d'état stationnaire de Bodenstein portant sur un intermédiaire réactionnel M, et fréquemment utilisée en cinétique chimique. Il suppose que  $[M] \simeq 0$  et que M est très réactif : il disparaît plus facilement qu'il ne se forme.



Elle implique, entre autres, que les vitesses de disparition du substrat et d'apparition du produit sont égales :

$$\frac{d[S]}{dt} = -\frac{d[P]}{dt} = -v$$

Chaque fois qu'un complexe enzyme-substrat se forme (disparition de substrat), un autre disparaît (apparition du produit), de façon à maintenir constante la quantité  $[E.S]$  en solution.

Le bilan de matière sur l'enzyme s'écrit :  $[E]_T = [E] + [E.S]$ , où  $[E]_T$  est la concentration totale d'enzyme introduite en solution. Donc

$$k_1[E][S] = k_1([E]_T - [E.S])[S] = (k_{-1} + k_2)[E.S] \quad (1.9)$$

et

$$[E.S] = [E]_T[S] \left( \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} + [S] \right)^{-1} \quad (1.10)$$

En reportant l'expression obtenue pour  $[E.S]$  dans ces conditions dans l'équation (eq. 1.6), on aboutit à l'*équation de Michaelis-Menten* :

$$v_0 = \frac{v_{max}[S]}{K_M + [S]} \quad (1.11)$$

donnant l'expression de la vitesse initiale de la réaction enzymatique  $v_0$  en fonction : de la vitesse maximale  $v_{max}$ , de la concentration du substrat  $[S]$  et de la constante de Michaelis  $K_M$  homogène à une concentration.

Ces deux vitesses sont définies comme suit :

$$v_0 = \left( \frac{d[P]}{dt} \right)_{t=0} \quad (1.12)$$

$$v_{max} = k_2[E]_T \quad (1.13)$$

La constante de Michaelis  $K_M$  s'exprime en fonction des différentes constantes de vitesse :

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad (1.14)$$

L'hypothèse de stationnarité formulée pour résoudre les équations est mise en défaut dans les deux cas limites suivants :

- lors de la phase transitoire correspondant au mélange des différents partenaires (enzyme et substrat), on a essentiellement formation du complexe ES avant qu'elle ne s'équilibre avec la disparition par les actes élémentaires de vitesse  $k_2$  et  $k_{-1}$ . Ce transitoire n'est en général pas détectable. Dans le cas contraire, il convient bien sûr d'attendre d'avoir atteint le régime stationnaire pour réaliser l'estimation de cette vitesse<sup>4</sup>.
- lorsque la concentration de substrat n'est plus suffisante (en fin de réaction dans le cas d'un réservoir fermé, non alimenté par un flux continu de réactifs), la quantité d'enzyme complexée diminue. Ceci justifie que l'on s'intéresse essentiellement à la vitesse initiale de la réaction,  $v_0$ , bien que le raisonnement permettant d'aboutir à l'équation (eq. 1.11) soit a priori valable pour tout  $t$ . Autrement dit, la valeur pertinente de l'analyse cinétique sera la pente de la courbe  $[P](t)$ , prise au début de l'acquisition (ou dès que cette pente prend une valeur constante).

Dans la limite où  $v_0 = v_{max}$ , tous les enzymes en solution participent à la réaction. On atteint ainsi la vitesse maximale d'apparition des produits, qui ne dépend plus que de la concentration totale d'enzymes.

$K_M$  correspond à la concentration en substrat  $[S]$  pour laquelle la vitesse initiale  $v_0$  vaut  $v_{max}/2$ . On la détermine en mesurant  $v_0$  pour différentes valeurs de  $[S]$  et en traçant  $v_0^{-1}$  en fonction de  $[S]^{-1}$  (méthode Lineweaver-Burk). D'après l'équation de Michaelis-Menten (eq. 1.11) :

$$\frac{1}{v_0} = \frac{1}{v_{max}} + \left( \frac{K_M}{v_{max}} \right) \frac{1}{[S]} \quad (1.15)$$

dont l'ordonnée à l'origine (obtenue par extrapolation) fournit  $v_{max}$ , ce qui permet ensuite de calculer  $K_M$  grâce à la valeur de la pente.

Plus  $K_M$  est petit et plus l'enzyme atteint son efficacité maximale pour de faibles concentrations de substrat en solution : on dit que l'enzyme est très spécifique. Cette propriété rappelle celle de l'affinité évoquée plus haut. En effet, ces deux grandeurs ne sont pas totalement indépendantes. La vitesse globale et donc, la valeur de  $K_M$ , dépendent du caractère limitant des étapes d'association d'un substrat ou de dissociation d'un produit.

Remarquons enfin que si on se place dans le cas limite où  $k_2 \ll k_{-1}$ ,  $K_M = K_d$  dans l'expression (1.14). Notons tout de même que nous préférons en général l'hypothèse ( $k_{-1} \ll k_2$ ), compte-tenu du rôle catalytique de l'enzyme : la disparition de l'espèce ES est essentiellement attribuable à la formation des produits.

Des valeurs de  $K_M$ , choisies pour quelques enzymes, sont reportées dans le tableau 1.2. Elles montrent une dispersion de plusieurs ordres de grandeur suivant la nature du catalyseur et de son substrat. La spécificité d'un enzyme pour son substrat qui, rappelons-le, augmente lorsque  $K_M$  diminue, dépend donc beaucoup du rôle de cet enzyme et de la voie métabolique dans laquelle elle est impliquée.

L'autre grandeur cinétique importante également reportée dans ce tableau,  $k_{cat}$ , s'identifie dans le modèle simple du schéma réactionnel (fig. 1.5), à  $k_2$  mais s'exprimera en fonction de plusieurs constantes de vitesse dans le cas de mécanismes plus compliqués. Cette constante catalytique, définie de façon très générale par  $v_{max}/[E]_T$ , indique le nombre de réactions enzymatiques réalisées par unité de temps et par enzyme (communément appelé *turnover* de l'enzyme) : elle mesure donc le rendement enzymatique de l'enzyme considéré.

<sup>4</sup>Il est possible de mettre ce transitoire en évidence (voir la partie *Activité de la PGK* en fin de chapitre).

Enzyme	Substrat(s)	$K_M(M)$	$k_{cat}(s^{-1})$	$k_{cat}/K_M(M^{-1}s^{-1})$
Catalase	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	2,5.10 <sup>-2</sup>	1,0.10 <sup>7</sup>	4,0.10 <sup>8</sup>
Chymotrypsine	ester N-acétyléthylglycine	4,4.10 <sup>-2</sup>	5,1.10 <sup>-2</sup>	1,2.10 <sup>-1</sup>
	ester N-acétyléthylvaline	8,8.10 <sup>-2</sup>	1,7.10 <sup>-1</sup>	1,9
	ester N-acétyléthyltyrosine	6,6.10 <sup>-4</sup>	1,9.10 <sup>2</sup>	2,9.10 <sup>5</sup>
Fumarase	fumarate	5,0.10 <sup>-6</sup>	8,0.10 <sup>2</sup>	1,6.10 <sup>8</sup>
	malate	2,5.10 <sup>-5</sup>	9,0.10 <sup>2</sup>	3,6.10 <sup>7</sup>

TAB. 1.2 – Valeurs des constantes caractéristiques de quelques enzymes (tirées de [14])

*La catalase réalise la conversion de l'oxydant fort H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, en H<sub>2</sub>O et O<sub>2</sub> ; elle l'utilise également pour oxyder des toxines contenant certains groupes caractéristiques (phénols -C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>OH, alcools -OH). La chymotrypsine est un enzyme du suc pancréatique réalisant l'hydrolyse de peptides dans lesquels des acides aminés aromatiques engagent leur fonction acide. La fumarase, localisée dans la matrice des mitochondries, permet l'addition d'une molécule d'eau sur le fumarate et donne spécifiquement le L-malate.*

Dans le cas où  $[S] \ll K_M$ , l'enzyme existe essentiellement en solution sous sa forme libre ( $[E.S] \ll [E]_T$  et  $[E] \sim [E]_T$ ) ; on aboutit à une expression simplifiée de  $v_0$  :

$$v_0 \simeq \left( \frac{k_2}{K_M} \right) [E]_T [S] \simeq \left( \frac{k_{cat}}{K_M} \right) [E][S] \quad (1.16)$$

$k_{cat}/K_M$  s'interprète alors comme la constante de vitesse apparente de la réaction enzymatique et mesure l'efficacité catalytique de l'enzyme. En évaluant la fréquence de collision des partenaires en solution (fixée par le coefficient de diffusion), on se rend compte que les valeurs indiquées dans le tableau 1.2 correspondent aux valeurs maximales accessibles.

On peut en effet estimer l'ordre de grandeur des coefficients de diffusion moléculaire  $D_m$  dans les liquides en introduisant une force de friction visqueuse, la force de Stokes, valable pour des valeurs du nombre de Reynolds petites devant 1 [15]. Ce nombre sans dimension compare les contributions des forces inertielle et de viscosité dans l'équation de Navier-Stokes (issue de l'application du principe fondamental de la dynamique à un élément de volume du fluide).

En utilisant par ailleurs la relation d'Einstein liant  $D_m$  au coefficient de mobilité  $\mu$  [16], on propose un ordre de grandeur de  $D_m$  valant  $10^{-10} \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  (soit  $100 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ ). De plus, on a la relation très générale :

$$D_m = f_{coll} l^2 \quad (1.17)$$

où  $f_{coll}$  est la fréquence des collisions entre les molécules de soluté et  $l$  la distance caractéristique entre ces molécules (ou libre parcours moyen).

En estimant  $l$  via la concentration :  $l \sim \left( \frac{1}{C} \right)^{\frac{1}{3}}$  avec  $C = 1 \text{ mol/L}$ , on trouve  $f_{coll}$  de l'ordre de  $10^7$ - $10^8 \text{s}^{-1}$ . Dans les mesures d'activité, les concentrations manipulées sont plutôt de l'ordre du milli- au nanomolaire, celles dans le milieu cellulaire parfois de l'ordre du picomolaire ; ce qui diminue d'autant la fréquence  $f_{coll}$  : elle vaudrait environ  $10^5$ - $10^6 \text{s}^{-1}$  en solution millimolaire et 0.1 à  $1 \text{s}^{-1}$  dans une solution picomolaire.

Pour pallier les effets de la dilution, les enzymes très efficaces tels la catalase ou la fumarase (tableau 1.2) adoptent deux stratégies :

- soit l'enzyme est très spécifique mais aux dépens du rendement enzymatique (cas de la fumarase)
- soit le rendement enzymatique est très bon, mais l'enzyme peu spécifique (cas de la catalase)

L'ordre de grandeur de  $f_{coll}$  calculé ici est essentiellement valable dans la situation où la protéine et le substrat sont en quantités stoechiométriques, afin que la fréquence évaluée soit voisine de celle des chocs entre les deux partenaires. De plus, nous avons pris ici les coefficients de diffusion des protéines et des substrats égaux, bien que les tailles de ces molécules ne soient pas comparables en général.

Une hypothèse, valable dans le cas de notre enzyme d'intérêt, invoque une optimisation de l'acheminement du substrat jusqu'au site catalytique par guidage électrostatique par les résidus chargés présents à la surface des protéines. Les constantes de vitesse et les cinétiques mesurées seront dans ce cas, très dépendantes de l'intensité et de la portée des forces électrostatiques, donc des effets de charge.

Dans toute cette partie, nous n'avons envisagé qu'un modèle minimaliste pour décrire le mécanisme de fonctionnement de l'enzyme. Nombre d'enzymes montrent en réalité des comportements plus compliqués, mais que l'on essaiera d'expliquer en apportant des corrections au schéma (fig. 1.5) pris comme référence. On va donc tenter maintenant de rendre plus réaliste le modèle proposé en examinant diverses contributions.

Tout d'abord, des caractéristiques du milieu tels que le pH (égal à  $-\log[\text{H}_3\text{O}^+]$ ) et la force ionique  $I$  (liée à la quantité d'espèces chargées présentes en solution (eq. 1.22)) vont influencer le fonctionnement de l'enzyme en modifiant son environnement électrostatique local.

Ensuite, les enzymes sont le plus souvent régulés. Cela signifie que, selon le contexte, leur efficacité peut être modulée par la cellule, en recourant à des inhibiteurs par exemple.

Enfin, plus de la moitié des enzymes recensés engagent deux substrats, leur rôle catalytique consistant souvent à faciliter la réaction entre les partenaires en optimisant leur positionnement dans l'espace. C'est d'ailleurs le cas de la phosphoglycérate kinase.

## 1.2.2 Complexité du fonctionnement

### Effet du pH et de la force ionique

Certains acides aminés ont des chaînes latérales possédant des propriétés acido-basiques, donc susceptibles d'être chargées selon la valeur du pH. Ils se retrouvent pour cette raison, dans la plupart des protéines dont ils facilitent la solubilisation. L'hypothèse du guidage électrostatique précédente, laisse donc supposer une évolution des grandeurs cinétiques selon l'état de charge de ces acides aminés, donc selon le pH.

Il a été montré [14] que l'on peut encore exprimer la vitesse initiale sous une forme analogue à celle du modèle Michaelis-Menten lorsque l'on prend en compte l'influence du pH :

$$v_0 = \frac{v'_{max}[S]}{K'_M + [S]} \quad (1.18)$$

où  $v'_{max}$  et  $K'_M$  sont des fonctions de  $v_{max}$ ,  $K_M$ , des constantes d'acidité  $K_i$  des couples mis en jeu et de la concentration en protons  $[\text{H}_3\text{O}^+]$ .

L'expression (1.18) découle du modèle (fig. 1.6), les expressions des constantes apparentes étant :

$$v'_{max} = \frac{v_{max}}{f_2} \quad \text{et} \quad K'_M = K_M \left( \frac{f_1}{f_2} \right) \quad (1.19)$$

où

$$f_1 = \frac{[\text{H}_3\text{O}^+]}{K_{E1}} + 1 + \frac{K_{E2}}{[\text{H}_3\text{O}^+]} \quad \text{et} \quad f_2 = \frac{[\text{H}_3\text{O}^+]}{K_{ES1}} + 1 + \frac{K_{ES2}}{[\text{H}_3\text{O}^+]} \quad (1.20)$$

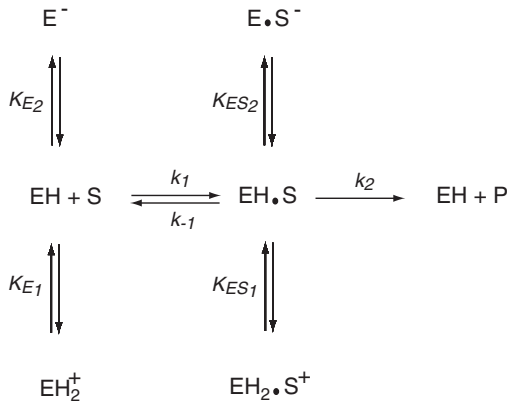


FIG. 1.6 – Schéma réactionnel prenant en compte les différents couples acido-basiques incluant l'enzyme qui pourraient être impliqués.

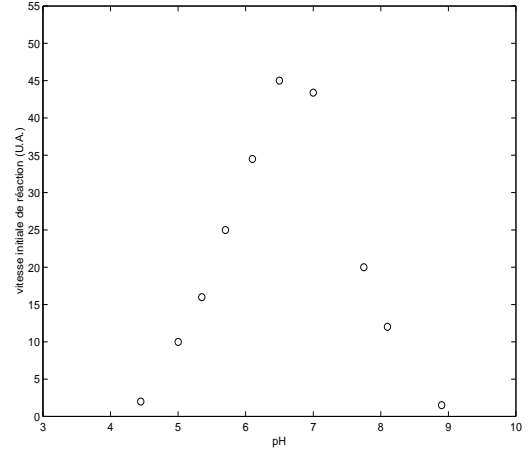


FIG. 1.7 – Influence du pH sur  $v_0$  dans le cas de la fumarase (d'après [17]).

En faisant l'hypothèse de telles dépendances (eq. 1.19) on peut, grâce à l'évolution de la cinétique enzymatique en fonction du pH, accéder aux valeurs des constantes  $K_i$  et avoir des indications quant aux résidus essentiels au fonctionnement optimal de l'enzyme. Cette modélisation de l'évolution de  $v_0$  avec le pH conduit, dans la plupart des cas, à une courbe présentant un maximum dont on essaiera de se rapprocher pour un meilleur rendement. Nous citons ici l'exemple de la catalase (fig. 1.7).

On peut donner une justification d'un tel comportement qui est certes sommaire, mais permet de mieux le comprendre. Les acides aminés présentant des propriétés acido-basiques les plus fréquents, possèdent une ou plusieurs fonctions amine (primaire  $-\text{NH}_2$  ou secondaire  $-\text{NHR}$  : lysine et arginine), ou acide carboxylique ( $-\text{COOH}$  : acides aspartique et glutamique).

Pour des pH supérieurs à 6 (les  $\text{p}K_A$  concernés valant environ 4)<sup>5</sup>, la fonction acide carboxylique sera sous sa forme ionisée (forme basique,  $-\text{COO}^-$ ). La fonction amine, quant à elle sera ionisée (sous forme  $-\text{NH}_3^+$  ou  $-\text{NHR}_2^+$  selon l'amine considérée) pour des pH inférieurs à 8-10 ( $\text{p}K_A$  de l'ordre de 10-12). Les interactions électrostatiques s'exerçant entre espèces chargées, il y aura donc une gamme de valeurs de pH pour laquelle les deux fonctions seront ionisées et ces interactions favorisées.

<sup>5</sup>les valeurs mentionnées ici, ainsi que les formules développées de ces acides aminés figurent dans le tableau (fig. 1.1) de la section 1.1

La contribution des effets électrostatiques à la cinétique d'un enzyme accroché à une surface chargée est largement discutée dans la suite de ce chapitre (section 2.2). Nous y présentons l'approximation de Debye-Hückel (solution de l'équation de Poisson-Boltzmann linéarisée dans le cas des faibles potentiels), en géométrie plane. Quand les électrolytes considérés sont symétriques, on parle d'électrolyte  $[z : z]$  : les anions portent une charge  $(-z)$ , les cations, une charge  $(+z)$ .

En restant dans le cadre de ce modèle pour les faibles potentiels ( $\psi \ll kT/ze$ ), on adopte la symétrie sphérique qui convient mieux au cas de l'enzyme en solution. On l'assimile grossièrement à une sphère chargée de rayon  $r_{prot}$ . L'expression de  $\kappa^{-1}$ , longueur caractéristique de décroissance du potentiel électrostatique, est la même que l'on se place en symétrie sphérique ou plane [18] :

$$\kappa^{-1} = \left( \frac{2 \cdot 10^3 \mathcal{F}^2}{\varepsilon_0 \varepsilon_r RT} I \right)^{-1/2} \quad (1.21)$$

où  $\mathcal{F}$  est la constante de Faraday,  $\varepsilon_0$  la permittivité du vide,  $\varepsilon_r$  la permittivité relative du milieu,  $R$  la constante des gaz parfaits,  $T$  la température,  $I$  la force ionique exprimée en  $\text{mol.L}^{-1}$ . La force ionique s'exprime pour un électrolyte quelconque par :

$$I = \frac{1}{2} \sum_i C_i z_i^2 \quad (1.22)$$

où  $C_i$  est la concentration molaire de l'espèce  $i$  (en  $\text{mol.L}^{-1}$ ) et  $z_i$  sa charge.

La longueur sur laquelle les contre-ions vont neutraliser la charge portée par la protéine (considérée comme une charge de surface dans ce modèle), fixe l'extension spatiale de la couche diffuse et caractérise la portée des interactions électrostatiques. Au-delà de 4 ou  $5 \kappa^{-1}$ , la charge de la protéine est compensée et l'ensemble [protéine-couche diffuse], de rayon  $R \simeq r_{prot} + 5 \kappa^{-1}$ , se comporte comme une espèce neutre vis-à-vis d'autres espèces chargées présentes en solution.

Une diminution de la force ionique se traduit par une augmentation de la portée des interactions électrostatiques. Dans le cadre de l'hypothèse du guidage électrostatique des substrats jusqu'au site actif de l'enzyme, la force ionique devient alors un facteur cinétique pertinent. De plus, les constantes de dissociation des substrats et des produits (grandeurs thermodynamiques caractéristiques des équilibres entre espèces libres E, S, P, et liées à l'enzyme, ES, EP) résultent notamment d'interactions électrostatiques et dépendront elles aussi de la valeur de  $I$ .

On peut retenir qu'en solution aqueuse à 25 °C,  $\kappa^{-1}$  vaut  $(3.288\sqrt{I})^{-1}$  nm. Pour un électrolyte [1 : 1] à la concentration  $10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ ,  $\kappa^{-1}$  vaut environ 10 nm.

Les évolutions de la force ionique et de la portée des interactions se font en sens inverse.

La force ionique intervient à deux niveaux sur la vitesse de réaction : en modulant la portée des interactions électrostatiques elle influence le transport, mais aussi l'association ou la dissociation des différentes espèces avec l'enzyme.

### Effet d'agents inhibiteurs

Ce sont des substances, en général similaires quant à leur structure au(x) substrat(s) de l'enzyme, et qui vont altérer son fonctionnement :

- soit elles se lient à l'enzyme libre et bloquent le site actif, diminuant ainsi la quantité apparente d'enzymes (ou de sites actifs) en solution.
- soit elles se lient au complexe enzyme-substrat et empêchent la deuxième étape correspondant à l'apparition du produit P dans le schéma de référence (fig. 1.5).

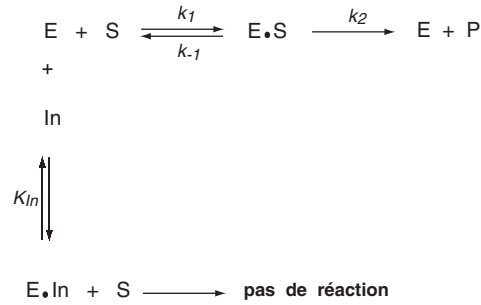


FIG. 1.8 – Schéma réactionnel associé à une inhibition compétitive

Le premier mécanisme évoqué est qualifié d'inhibition compétitive (schéma ci-dessous). Dans le cas d'une fixation compétitive entre deux ligands S et In au même site, on définit une constante de Michaelis apparente [14] :

$$K'_M = \left(1 + \frac{[In]}{K_{In}}\right) K_M = \alpha K_M \quad \text{avec} \quad \alpha = \left(1 + \frac{[In]}{K_{In}}\right) \quad (1.23)$$

S est le substrat naturel de l'enzyme, In le compétiteur et  $[In]$  sa concentration. On peut en limiter les effets en augmentant la quantité de substrat en solution, l'enzyme aura donc une plus grande probabilité de rencontrer son vrai substrat que l'inhibiteur (compétition entre les deux entités). En revanche, cette altersauvage ne sera plus envisageable dans le cas d'une inhibition non compétitive (schéma 1.9 ci-dessous).

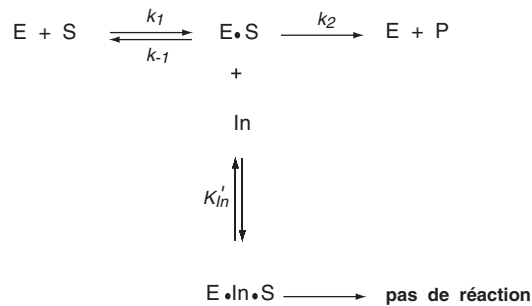


FIG. 1.9 – Schéma réactionnel associé à une inhibition non compétitive

Dans le cas du modèle simple à un substrat (schéma 1.5), rappelons que l'on peut écrire (eq. 1.15) :

$$\frac{1}{v_0} = \frac{1}{v_{max}} + \left(\frac{K_M}{v_{max}}\right) \frac{1}{[S]}$$

Dans le cas d'une inhibition compétitive,  $K_M$  est remplacée par  $K'_M$  dans cette équation. Elle devient, dans le cas d'une inhibition **non** compétitive :

$$\frac{1}{v_0} = \frac{\alpha'}{v_{max}} + \left(\frac{K_M}{v_{max}}\right) \frac{1}{[S]} \quad (1.24)$$

$$\alpha' = \left(1 + \frac{[In]}{K'_{In}}\right)$$

Ces deux types d'inhibitions peuvent coexister et contribuer au ralentissement global de la vitesse de réaction. Dans ce cas, on parle d'inhibition mixte. En tenant compte des deux contributions on a alors :

$$\frac{1}{v_0} = \frac{\alpha'}{v_{max}} + \left( \frac{\alpha K_M}{v_{max}} \right) \frac{1}{[S]} \quad (1.25)$$

On peut ainsi distinguer les différents types d'inhibition en traçant les droites correspondantes pour plusieurs concentrations en inhibiteur. Dans le cas d'une inhibition compétitive, les droites ont même ordonnée à l'origine mais la pente évolue alors qu'en cas d'inhibition non compétitive, la pente est conservée et on obtient un réseau de droites parallèles. Donc, si on a une inhibition mixte, la pente évolue lorsque l'on fait varier la quantité d'inhibiteur et le point d'intersection des droites ne se trouve plus sur l'axe des ordonnées.

### Cas des enzymes à deux substrats

Le modèle le plus simple correspondant à une telle situation (fig. 1.10) n'entre pas dans le détail des réactions, mais permet une vision schématique globale. Nous verrons dans le cas particulier de la PGK que la décomposition en actes élémentaires d'une telle réaction peut s'avérer compliquée et que les constantes cinétiques caractéristiques de chacune des étapes ne sont pas toujours facilement accessibles expérimentalement.



FIG. 1.10 – Schéma global d'une réaction enzymatique impliquant deux substrats

Lors de ces réactions, il peut y avoir échange d'électrons (réactions d'oxydo-réduction) ou d'un groupement fonctionnel spécifique X (classe générique des transférases, dont font partie les kinases comme la PGK). Nous adoptons ici une notation légèrement différente de la précédente afin de souligner le transfert du groupement X (A et Q ont été remplacés par P-X et B-X respectivement (schéma fig. 1.11)).



FIG. 1.11 – Schéma global de l'action d'une transférase

Ces réactions à deux substrats (fig. 1.10) peuvent être :

- des réactions séquentielles : les deux substrats doivent être liés à l'enzyme pour que la réaction ait lieu et que les produits soient relargués. De plus, l'ordre de fixation des substrats peut être imposé, on parle alors de mécanisme ordonné. Si l'ordre de fixation est libre, on parle de mécanisme aléatoire.
- des réactions “Ping-Pong” : on a relargage d'un ou plusieurs produits avant que tous les substrats ne se soient fixés. Dans le cas où on a deux substrats, on remarque qu'il n'y a pas d'interaction directe entre eux au niveau du site actif du catalyseur.



### 1.2.3 Modélisation dans le cas de la PGK

La 3-phosphoglycérate kinase (PGK), protéine monomérique de 45 kDa ( $\sim 45.10^3$  g.mol<sup>-1</sup>), catalyse le transfert réversible d'un groupement phosphate entre un nucléotide (ATP ou ADP) et un phosphoglycérate (3-PG ou 1,3bPG) selon la réaction



FIG. 1.12 – Réaction catalysée par la phosphoglycérate kinase (PGK).

Cette protéine est très conservée : on la retrouve avec une grande similitude aussi bien au niveau de la fonction, que de la séquence en acides aminés associée, dans différents organismes. Nous citerons des études réalisées aussi bien sur la PGK de levure [19, 20], que celle de l'agent infectieux de la maladie du sommeil [21, 22], ou celle du muscle de porc ou de cheval [23, 24, 25].

La structure de la PGK ainsi que le changement de conformation observé lors de la catalyse, ont été largement étudiés tant par résonance magnétique nucléaire [19, 26] que par diffraction des rayons X [23, 27] ou par mutagenèse dirigée. Cette dernière technique, couplée par exemple [28] à des mesures spectroscopiques d'absorbance et de fluorescence, a également fourni des informations sur le rôle d'acides aminés particuliers dans l'acte catalytique [13, 29, 30, 31].

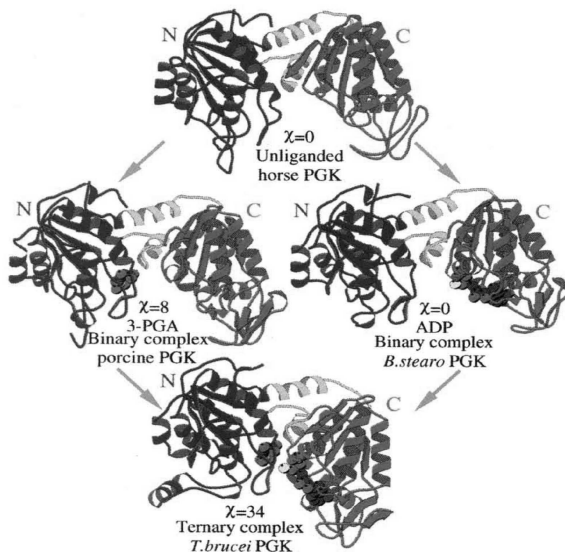


FIG. 1.13 – Changements conformationnels induits par les substrats de la PGK.

Quatre états d'association sont représentés (les différents homologues ont été orientés en superposant les domaines N-terminaux), l'angle de « fermeture »  $\chi$  est évalué par rapport à la forme « ouverte » (i.e. sans ligands) [21].

Un changement de conformation notable est observé dès la fixation du 3-PG seul, il induit une « fermeture » partielle de 8°. Le changement conformationnel complet permettant le tranfert de phosphate n'est observé qu'en la présence simultanée des deux substrats.

Le mécanisme réactionnel de la PGK est de type séquentiel, aléatoire en général. En présence des deux substrats, les domaines de la protéine se rapprochent : elle se « ferme » d'un angle de 32-34°<sup>6</sup>. Cependant, des changements structuraux ont été observés lors de la formation des complexes tant avec le phosphoglycérate seul que le nucléotide seul. Il existe une véritable synergie des effets induits par la fixation de chacun des substrats, synergie qui conduit au changement conformationnel majeur rattaché à l'activité catalytique.

<sup>6</sup>les deux valeurs apparaissent dans l'article [21], qui nous sert ici de référence. Nous n'avons pas voulu modifier la valeur de 34° apparaissant sur la figure 1.13 extraite de l'article, malgré la valeur de 32° citée plusieurs fois dans le texte.

En utilisant un double analogue, c'est-à-dire une seule molécule avec, à chacune de ses extrémités un analogue d'un des substrats, la même équipe a réussi à isoler et cristalliser [22] une forme intermédiaire entre la forme « ouverte » et la forme « fermée ». Ces résultats renseignent sur les étapes du changement conformationnel et permettent de choisir, entre tous les chemins possibles dans le paysage énergétique qui s'offrent à la protéine, ceux qui seraient les plus probables.

Cependant, le détail de ces étapes et en particulier les différents intermédiaires réactionnels apparaissant lors d'un cycle enzymatique, sont mal connus. Plusieurs caractéristiques de la PGK, compliquant la cinétique, peuvent justifier de la difficulté d'accéder à de telles informations :

- son rendement enzymatique (*turnover*) est important :  $k_{cat}$  est de l'ordre de  $10^3 \text{ s}^{-1}$  dans le sens de production d'ATP.
- elle implique deux substrats et deux produits (équation-bilan fig. 1.12), la réaction étant réversible.
- son affinité pour l'ATP, à l'instar des autres kinases, est assez faible ( $K_d \simeq 10 \mu\text{M}$  en solution aqueuse). Rappelons que la notion d'affinité renvoie à la facilité de former le complexe enzyme-substrat. Au contraire, l'affinité pour le 1,3-bPG est grande :  $K_d \simeq 0.05 \mu\text{M}$  pour  $I=0.15\text{M}$  (tableau 1.4).
- pour des concentrations importantes des substrats en solution, leur ordre de fixation à la protéine n'est plus aléatoire [20].
- il existe un second site de fixation des nucléotides (ou autres anions multivalents comme les sulphates ou les phosphates), qualifié de site électrostatique ou anionique selon les auteurs.

Plusieurs études ont permis d'apporter des preuves expérimentales de l'existence de ce site supplémentaire [19, 20, 32]. Il est situé dans la zone de fixation des phosphoglycérates et semble avoir un rôle dans la régulation de l'activité enzymatique. En effet, la grande affinité de l'enzyme pour le 1,3-bPG ferait du relargage de ce produit l'étape cinétiquement limitante de la réaction. On peut imaginer une dissociation en plusieurs étapes, les nucléotides (ou autres anions multivalents) orientant alors la réaction vers une dissociation totale une fois celle-ci amorcée [20]. L'occupation du site électrostatique permettrait donc d'expliquer les valeurs de  $k_{cat}$  mesurées alors que la constante de vitesse associée au relargage du 1,3-bPG est environ vingt à cent fois plus faible.

En revanche, pour des concentrations trop élevées d'anions (forces ioniques élevées par exemple), on observe une inhibition compétitive. Les anions sont alors susceptibles d'occuper le site catalytique où viennent normalement se fixer les nucléotides [32].

Afin de s'affranchir des interférences entre les deux sites (catalytique et électrostatique) lors d'une étude cinétique, Scopes [20, 32] préconise les conditions expérimentales suivantes : utilisation d'un tampon acétate 0.1M (pH  $\simeq 7.5 \pm 0.3$ ) et de faibles concentrations d'ATP (inférieures à 2mM) en proportions quasi-stoechiométriques avec les ions  $\text{Mg}^{2+}$ . Ce cation contribue à la stabilisation de la forme « fermée » de la PGK (en présence de ses deux substrats) et est donc essentiel à l'acte catalytique (fig. 1.14).

En présence du bPG, l'ion  $\text{Mg}^{2+}$  interagirait avec le 1-phosphate de ce dernier et le  $\beta$ -phosphate de l'ADP. Il aide ainsi au positionnement spatial des différents partenaires en vue du transfert de phosphate (fig. 1.14 à droite). Sur cette représentation, les squelettes carbonés du phosphoglycérate et de l'ADP sont en blanc, le phosphate transféré en gris et l'ion  $\text{Mg}^{2+}$  est figuré par une boule blanche. Sur les deux schémas les interactions électrostatiques stabilisantes sont en pointillés. Les liaisons hydrogène sont symbolisées en trait continu (fig. 1.14, à gauche), les liaisons rompue et formée au cours du transfert, en trait discontinu (fig. 1.14, à droite).

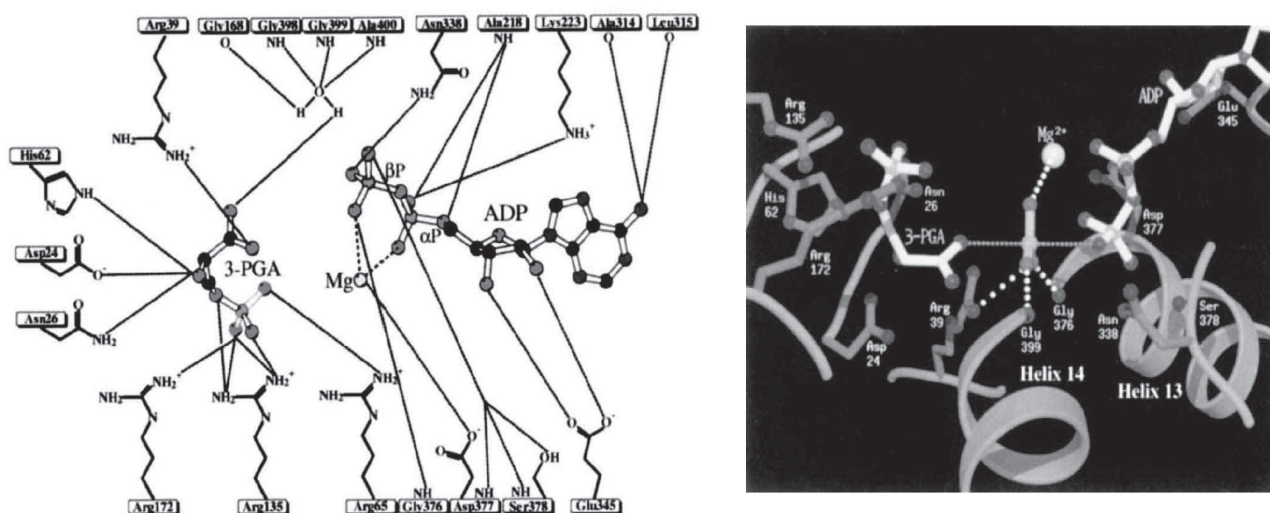


FIG. 1.14 – Importance de l'ion  $Mg^{2+}$  quant au positionnement des substrats dans le site actif (ici dans le cas du complexe Mg-ADP) [21].

Dans le tableau 1.3 ci-dessous sont reportés les résultats d'une étude concernant l'influence du magnésium sur les constantes de dissociation de l'ADP.

Proportions molaires (Mg : ADP) en solution	$K_d(mM)$ au site électrostatique	$K_d(mM)$ au site catalytique
ADP seul	0.55	> 0.55
Mg : ADP (0.5 : 1)	0.60	$\approx 1.0$
Mg : ADP (1 : 1)	> 0.50	0.08
Mg : ADP (2 : 1)	0.49	0.02
Mg : ADP (10 : 1)	$\approx 10.0$	0.01

TAB. 1.3 – Constantes de dissociation du complexe PGK.ADP (l'ADP étant complexé ou non par  $Mg^{2+}$ ) D'après le suivi par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) du proton, du titrage par complexation des différents substrats dans une solution de PGK donnée. (tampon utilisé : 100mM d'acétate de sodium,  $pH=7.1$ .  $T=300K$ ). La constante  $K_d^{Mg.ADP}$  est prise égale à 0.91mM. [19]

Les constantes de dissociation, liées aux constantes de vitesse à l'équilibre (ce sont des grandeurs thermodynamiques), ne peuvent être ignorées lors des études cinétiques. De faibles valeurs de celles-ci se traduisent par des étapes cinétiquement limitantes comme dans le cas déjà évoqué du 1,3-bPG.

Dans la première colonne figurent les divers substrats considérés selon la proportion molaire d'ions  $Mg^{2+}$ . Ainsi, la dernière ligne indique les valeurs des constantes de dissociation pour les deux sites, lorsque l'on a dix fois plus d'ions  $Mg^{2+}$  que d'ADP en solution. Cette constante évolue peu pour le site électrostatique (2<sup>ème</sup> colonne), tant que l'on reste dans des proportions raisonnables de  $Mg^{2+}$ . En revanche, elle diminue considérablement dans le cas du site catalytique (3<sup>ème</sup> colonne). La dissociation de l'ADP est donc fortement réduite quand la quantité relative de  $Mg^{2+}$  augmente au-delà de la proportion stoechiométrique (Mg : ADP) = (1 : 1) ; l'affinité de l'enzyme augmente donc en son site catalytique pour le substrat ADP complexé au magnésium.

En comparant les deux colonnes pour un même degré de complexation (lecture horizontale), puis pour différents degrés de complexation (lecture verticale), on se rend compte que l'augmentation de la quantité d'ions  $Mg^{2+}$  en solution et donc de complexe Mg.ADP, favorise la fixation au site catalytique. En effet, l'ordre relatif des valeurs de  $K_d$  des deux sites s'inverse quand on augmente  $[Mg^{2+}]$ .

Lors d'une précédente étude, la même équipe avait mis en évidence pour l'ATP, un comportement similaire à celui de l'ADP en présence de ces mêmes ions. Lorsque l'on augmente  $[Mg^{2+}]$ , la fixation du substrat complexé se fait préférentiellement sur le site catalytique.

Pour des concentrations en ions  $Mg^{2+}$  trop élevées, on peut observer une activation de la réaction enzymatique [32]. Il est donc conseillé de ne pas dépasser des concentrations de l'ordre de 1 mM de  $Mg^{2+}$  en utilisant de préférence de l'acétate de magnésium, les contre-ions étant alors indifférents, pour des concentrations raisonnables de nucléotides (inférieures à 2mM).

### Effet de la force ionique

Comme signalé précédemment (eq. 1.21), un accroissement de la force ionique diminue la portée des interactions électrostatiques. Ceci aura donc une conséquence immédiate sur les constantes de dissociation des substrats. En effet, leur guidage jusqu'à la protéine est moins efficace et ils sont moins « retenus » au voisinage de celle-ci, les deux effets s'ajoutent et résultent en une augmentation de la constante de dissociation  $K_d$ .

Les données relatives à la PGK sont reportées dans le tableau 1.4 ci-après. A  $I=0.015$  M correspond une valeur de  $\kappa^{-1}$  de l'ordre de 3 nm, et de l'ordre du nanomètre pour  $I=0.15$  M.

Ligand	$K_d(mM)$ ( $I=0.015$ M)	$K_d(mM)$ ( $I=0.15$ M)
<u>Mg.ATP</u>		
$K_{d1}$ (site catal.)	$0.009 \pm 0.001$	$0.105 \pm 0.005$
$K_{d2}$ (site électrost.)	n.d.	$4.0 \pm 1.0$
<u>Mg.ADP</u>		
$K_{d1}$ (site catal.)	$0.010 \pm 0.002$	$0.040 \pm 0.005$
$K_{d2}$ (site électrost.)	n.d.	$1.0 \pm 0.2$
<u>3-PG</u>	$0.011 \pm 0.002$	$0.032 \pm 0.003$
<u>1,3-bPG</u>	$< 5.10^{-5}$	$5.10^{-5} \pm 2.10^{-5}$

TAB. 1.4 – Constantes de dissociation de ligands de la phosphoglycérate kinase de levure, obtenues par chromatographie d'affinité et analyse enzymatique [20]. (n.d. : non déterminé)

Lorsque  $\kappa^{-1}$  varie (elle est plus faible dans le cas des données de la dernière colonne) :

- on observe comme attendu, une augmentation systématique de la constante de dissociation quand I augmente (première ligne relative à chaque ligand).
- on retrouve ici qu'à forte force ionique, le site catalytique est globalement favorisé (lignes relatives à l'ADP et à l'ATP, dernière colonne) : le rapport des constantes associées à chacun des sites  $K_{d2}/K_{d1}$ , vaut environ 30 (en tenant compte des incertitudes annoncées). L'affinité de la protéine tant pour l'ATP que pour l'ADP, est donc environ 30 fois plus grande au niveau du site catalytique (référéncé 1) qu'au site électrostatique (référéncé 2), lorsque I=0.15 M.

En augmentant la force ionique, on diminue la portée des interactions électrostatiques et donc la composante purement électrostatique de tous les phénomènes observés. En particulier, le site secondaire est rendu moins compétitif, vis-à-vis du site catalytique. C'est ce que traduisent en partie les valeurs des constantes présentées ici.

La régulation de l'activité de la PGK est complexe<sup>7</sup> et nous avons indiqué les conditions optimales conseillées pour la réalisation de tests cinétiques. Nous allons maintenant exposer le schéma réactionnel proposé afin d'expliquer les cinétiques observées.

### Schéma réactionnel

Nous citons ici principalement les travaux de Schmidt *et al.* [30, 33], qui exploitent les avantages de différentes techniques pour s'affranchir de certaines des contraintes imposées par la PGK à l'étude cinétique. Ces études tirent notamment profit du caractère instable du 1,3-bPG comparativement aux autres substrats dans les conditions expérimentales choisies. Sa cinétique de formation est suivie par un dosage indirect qui résulte du couplage d'une méthode de blocage par flux de la réaction enzymatique (*flow quench*), à un marquage isotopique du phosphate transféré.

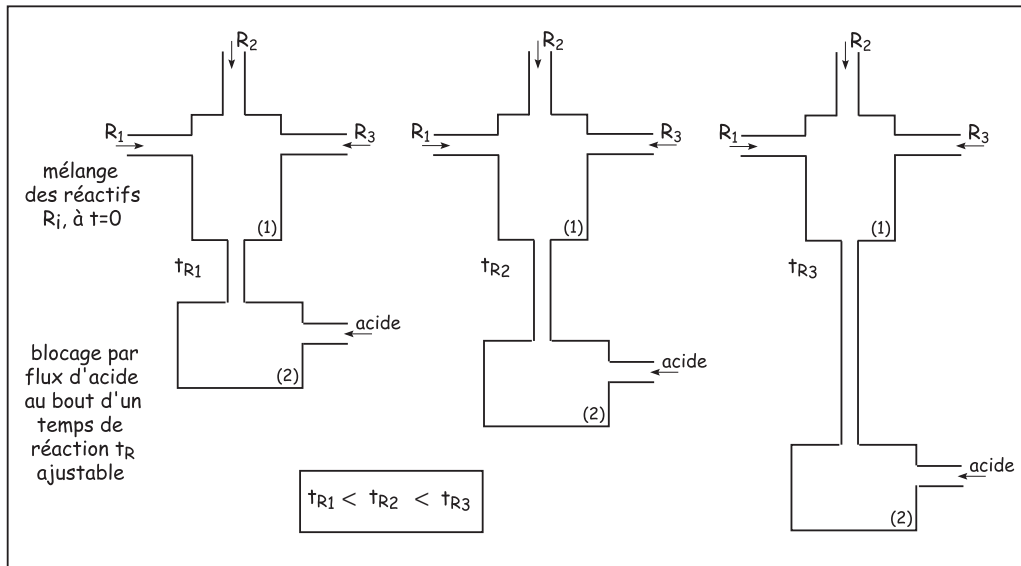


FIG. 1.15 – Schéma de principe explicatif de la méthode de blocage par flux (*flow quench*).

<sup>7</sup>pour plus de détails, sur les inhibiteurs de cet enzyme en particulier, voir les travaux de Scopes [20, 32]

La méthode de blocage par flux (fig. 1.15) permet de contrôler avec une grande précision, grâce à des systèmes d'injection performants, le début et la fin de la réaction donc l'intervalle de temps entre les deux, que nous noterons  $t_R$ . Les temps de réaction très courts, compris entre 4 et 300 ms, requièrent l'utilisation du blocage par flux rapide (*rapid flow quench* ou *RFQ*); le blocage retardé (*time delay flow quench*) donnant accès à des temps de réaction supérieurs.

Les réactifs sont mélangés dans le compartiment (1) du schéma 1.15 explicatif de la technique, puis ce mélange « vieillit » en traversant un tube dont la longueur détermine  $t_R$  (on travaille à débit constant). L'arrêt de la réaction se fait par addition d'acide (blocage ou *quench* acide) dans le compartiment (2) de la figure.

Les techniques de blocage par flux présentées ici sont en général utilisées en parallèle d'une étude en flux arrêté (*stopped-flow*) : le mélange des réactifs est réalisé le plus rapidement possible et la solution propulsée dans un réservoir où l'écoulement est arrêté; l'évolution temporelle du milieu réactionnel est alors suivie par spectroscopie (mesures de fluorescence, d'absorption, de dichroïsme, etc...). Si cette méthode permet d'obtenir rapidement des informations sur l'ensemble de la cinétique et nécessite des quantités restreintes de réactifs (contrairement aux méthodes de blocage par flux), elle manque de spécificité. On ne peut s'en contenter si on désire attribuer le signal mesuré à des complexes particuliers dans le cas de cinétiques compliquées.

Le sens de fonctionnement de la PGK choisi dans ces expériences, est celui de la production du 1,3-bPG (l'enzyme fonctionne en ATPase). Ce choix se justifie par un rendement enzymatique moins élevé :  $k_{cat} \simeq 200 \text{ s}^{-1}$  en solvant aqueux à 25°C [30] contre  $10^3 \text{ s}^{-1}$  dans le sens de production d'ATP. L'ATP, dont le  $\gamma$ -phosphate a été marqué, réagit avec le 3-PG en présence de la PGK pendant un temps  $t_R$  avant le blocage par flux d'acide. Le système évolue ensuite pendant un temps suffisant à la disparition du 1,3-bPG instable et la radioactivité provenant du phosphate inorganique  $P_i$  en solution est mesurée. L'hypothèse de stabilité des autres substrats, conduit à considérer que  $P_i$  provient exclusivement de la dégradation du 1,3-bPG formé pendant  $t_R$ .

Le choix d'un cryosolvant adéquat autorise des expériences à des températures inférieures à 0°C, auxquelles les cinétiques sont ralenties. Ce solvant apporte éventuellement une perturbation contrôlée au mécanisme enzymatique considéré. Plusieurs cryosolvants ont été testés dans ces travaux [30, 33], dans le but d'optimiser les conditions d'observation du transitoire lié à la formation d'intermédiaires contenant le 1,3-bPG :

- dans une solution du tampon aqueux à 40% d'éthylèneglycol, la vitesse de réaction est certes réduite mais de façon insuffisante et les constantes d'affinité de la PGK pour ses substrats restent inchangées. Le régime transitoire demeure trop bref pour être convenablement étudié.
- les mélanges méthanol-tampon, en particulier la solution à 30% de méthanol, permettent d'obtenir à la fois des cinétiques davantage ralenties que dans le solvant précédent et des constantes d'affinité modifiées. L'étude du régime transitoire y devient possible.
- des problèmes de reproductibilité des expériences dans le cas du DMSO (diméthylsulfoxyde) et d'inactivation de l'enzyme dans l'acétate d'ammonium invalident ces deux solvants pour toute étude ultérieure.

A composition en réactifs donnée du milieu réactionnel, la mesure des constantes  $k_f$  et  $k_d$  (présentées ci-dessous et reportées dans le tableau 1.5), reflète respectivement l'évolution des vitesses de formation et de disparition des intermédiaires recherchés.

- $k_f$  est évaluée dans des conditions où la protéine est en excès par rapport à l'ATP, ce qui rend l'étape de fixation de ce substrat au complexe (PGK.3-PG) cinétiquement limitante. On se place dans l'hypothèse d'un équilibre rapide (caractérisé par la constante  $K_3$  (fig. 1.16 ci-après), et d'un changement conformationnel tel que sa dynamique ne constitue pas l'étape cinétiquement limitante dans ce cas :  $k_f$  s'identifie à la constante de vitesse de formation des complexes contenant du 1,3-bPG. On peut donc, dans ces conditions (il n'y a pas suffisamment de substrat en solution pour que la protéine puisse réaliser plusieurs cycles enzymatiques, on dit que l'on est en condition de *single turnover*), faire l'approximation suivante :

$$\frac{d}{dt}[E.PG.ATP] \simeq \underbrace{k_1[E.PG][ATP]}_{k_f} = k_f [ATP] \quad (1.26)$$

- La mesure de  $k_d$  est réalisée dans des conditions où la dissociation du bPG, donc la disparition de ces complexes, est cinétiquement limitante ; cette constante s'identifie à la constante  $k_4$  du modèle (fig. 1.16) ci-dessous.

Solvant S	%v <sub>S</sub> /v <sub>Tp</sub>	$k_f$ (s <sup>-1</sup> )	$k_d$ (s <sup>-1</sup> )	$k_d/k_f^*$
tampon aqueux (Tp)		1.3	35	1.0
éthylèneglycol	40	0.14	3.5	1.1
méthanol	20	0.43	4.7	2.5
méthanol	30	0.21	2.5	2.3
méthanol	40	0.079	1.1	2.0 <sup>a</sup>

TAB. 1.5 – Evolution des constantes de vitesses  $k_f$ , de fixation de l'ATP (0.8μM PGK-0.08μM ATP-5mM PG) et  $k_d$ , de dissociation du 1,3-bPG (0.1μM PGK-100μM ATP-5mM PG) en fonction du solvant à 4°C [33]. (<sup>a</sup> la valeur reportée de l'article est légèrement différente (à 5% près) de la valeur calculée à partir des données des 2 autres colonnes). \*Le rapport relatif  $k_d/k_f$  est normalisé par rapport à sa valeur dans le tampon aqueux.

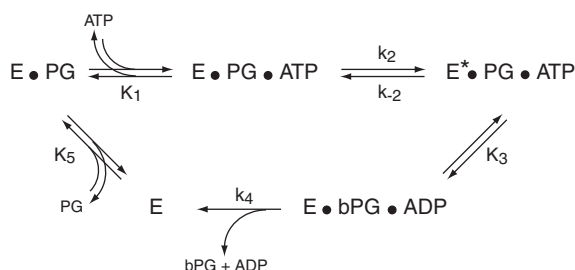


FIG. 1.16 – Schéma réactionnel proposé pour la cinétique enzymatique de la PGK [33]. On y trouve quatre types de réactions : deux correspondant à des équilibres rapides par formation d'un complexe de collision ( $K_1$  et  $K_5$ ) ou transfert du phosphate ( $K_3$ ) ; un changement de conformation protéique ( $k_2, k_{-2}$ ) et la dissociation en une étape de l'ADP et du 1,3-bPG ( $k_4$ ).

La valeur du rapport  $k_d/k_f$  dans le tampon aqueux est prise comme référence pour guider le choix d'un solvant adéquat. Les intermédiaires réactionnels contenant le bPG seraient, au regard du paramètre  $k_d/k_f$ , environ deux fois plus stables dans l'une quelconque des solutions contenant du méthanol qu'en solution aqueuse (dernière colonne du tableau 1.5).

Le choix des auteurs s'est finalement porté sur le solvant à 30% de méthanol pour le reste des mesures (rapport relatif de 2.3). Conformément aux prévisions faites à partir du rapport  $k_f/k_d$ , il ont pu définir une gamme de concentrations d'ATP pour lesquelles le régime transitoire recherché est accessible. Néanmoins, pour des concentrations trop faibles en ATP, l'amplitude de ce transitoire est trop petite pour être exploitable et pour des concentrations trop élevées, il est trop bref pour être observable.

La stabilité de la PGK dans le cryosolvant a été vérifiée à différentes températures et il semblerait par ailleurs que ce solvant ne perturbe pas la réaction enzymatique elle-même. En effet :

- la constante thermodynamique  $K_{eq}$  relative à l'équilibre de la réaction (fig. 1.12) s'établissant en régime stationnaire s'écrit :

$$K_{eq} = \frac{[ADP][bPG]}{[ATP][PG]}$$

Sa valeur à 4°C passe de  $(1.5 \pm 0.4) \cdot 10^{-4}$  en solvant aqueux à  $(1.2 \pm 0.1) \cdot 10^{-4}$  dans la solution à 30% de méthanol, variation négligée dans le cadre de l'étude présentée ici.

- Les  $k_{cat}$  mesurés en solvant aqueux et cryosolvant suivent des lois d'Arrhénius de pentes identiques. Cela signifie que la barrière d'activation à franchir pour passer des réactifs aux substrats reste la même lorsque l'on change de solvant.

A partir des mesures physico-chimiques réalisées [33], le schéma réactionnel (1.16) est proposé et les valeurs des constantes non accessibles expérimentalement sont estimées par simulation numérique. Ainsi, les paramètres ajustables ont été optimisés pour que l'ensemble des données expérimentales puissent être interprétées dans le cadre du schéma (1.16). Les valeurs des constantes qui y figurent sont reportées dans le tableau 1.6 ci-dessous, où  $\alpha$  est le taux de sites actifs (exprimé en mol de sites actifs/mol d'enzymes). Les mesures expérimentales fournissent une borne inférieure pour  $\alpha$  ( $\alpha > 0.56$ ), dont la valeur indiquée dans le tableau résulte d'une optimisation par simulation numérique.

Constante	Valeur
$\alpha$ (mol de sites actifs/mol d'enzymes)	$0.7 \pm 0.3$ <sup>a</sup>
$k_2/K_1$ ( $\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ )	$0.37 \pm 0.03$ <sup>b</sup>
$k_{-2}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$33 \pm 4$ <sup>a</sup>
$K_3$	$4 \pm 0.5$ <sup>a</sup>
$k_4$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$7.1 \pm 0.6$ <sup>a</sup>
$K_5$ ( $\mu\text{M}$ )	$1.5 \pm 0.4$ <sup>c</sup>
$K_1$ ( $\mu\text{M}$ )	$102 \pm 5$ <sup>c</sup>

TAB. 1.6 – Valeurs des constantes correspondant au schéma (1.16). <sup>a</sup> valeur issue de la simulation (méthode développée dans [33]). <sup>b</sup> valeur cinétique expérimentale. <sup>c</sup> valeur thermodynamique expérimentale.



Ce modèle, nécessaire pour rendre compte des écarts à une cinétique de Michaelis-Menten observés expérimentalement, reste trop compliqué pour les aspects que nous allons aborder dans la partie suivante.

Nous nous limiterons donc à un modèle « simple » de Michaelis (fig. 1.17), identique à celui introduit dans la section 1.2.1.



FIG. 1.17 – Modèle utilisé dans la suite pour la PGK, avec  $k_1 \simeq 2 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$  ( $=k_2/K_M$ ) et  $k_2 \simeq k_{cat}=200 \text{s}^{-1}$ , en solution aqueuse à 25°C (d'après les valeurs tirées de [20, 30]).

Afin de rendre plus réaliste une telle description du système, on préincubera la PGK dans une solution 5mM de 3-PG (conditions correspondant à la valeur de  $K_M$  rapportée pour l'ATP). Cette réaction est préférée pour les expériences de résonance de plasmons, afin de limiter le nombre d'espèces différentes présentes en solution.

Néanmoins, l'étude de la réaction directe, celle qui se produit lors du cycle de la glycolyse ([34] et encadré de la figure (fig. 1.18)), n'est possible que si l'on produit *in situ* le 1,3-bPG. Rappelons que pour les tests d'activité par spectrométrie dans l'ultraviolet, on utilise un test couplé : le 1,3-bPG est formé lors d'une réaction d'oxydo-réduction catalysée par la glycéraldéhyde phosphate deshydrogénase (GAPDH).



FIG. 1.18 – Modèle utilisé dans la suite pour la réaction de la PGK avec production d'ATP

Dans cette configuration, les valeurs de  $k_{cat}$  pour la PGK sont de l'ordre de  $10^3 \text{s}^{-1}$  et celles de  $K_M^{ADP}$  de l'ordre de 0.1 mM. On pourra comparer ces ordres de grandeur, utilisés dans les simulations numériques, aux mesures réalisées en volume.

En pratique, les quantités de GAPDH et des substrats NAD et GAP sont maintenues constantes dans toutes les expériences, et on fait éventuellement varier la quantité d'ADP. On fait par ailleurs l'hypothèse, s'appuyant sur la faible valeur de  $K_d^{bPG}$ , que le complexe (PGK.bPG) se forme rapidement et que l'on peut utiliser la description de type michaelienne du schéma (fig. 1.18) dans les simulations numériques.

## Chapitre 2

# Effets physiques induits par l'immobilisation d'enzymes

Jusqu'ici, nous n'avons considéré que des solutions diluées d'enzymes en présence de leurs substrats et éventuellement d'inhibiteurs. Cette situation reste très éloignée de celle rencontrée le plus fréquemment *in vivo*. Les protéines, lorsqu'elles ne sont pas transmembranaires, se retrouvent dans le cytoplasme très dense en protéines, en ions et autres molécules ; l'approximation du milieu très dilué n'y est donc pas applicable. L'enzyme est soumise à de nombreuses interactions, d'où la nécessité pour les cellules d'avoir des systèmes très spécifiques vis-à-vis des substrats.

L'accrochage à une surface impose de nouvelles contraintes à la protéine qui pourraient permettre de modéliser les effets du confinement sur la cinétique enzymatique. Ainsi, lors de la réaction de catalyse il y aura une consommation, localisée près de la surface d'accrochage, des substrats de l'enzyme et une accumulation des produits. Ces gradients de concentrations (notées  $C$ ), dont l'importance dépend de la vitesse de la réaction, génèrent alors des flux moléculaires tendant vers un retour à une répartition homogène des espèces. Ce retour à l'équilibre pour un problème à une dimension (de taille caractéristique  $L$ ), se fait sur un temps  $\tau_{diff} \simeq L^2/D_m$ , soit  $10^4$  s pour  $L = 1$  mm et  $D_m = 10^{-10}$  m<sup>2</sup>.s<sup>-1</sup> (ordre de grandeur introduit en section 1.2.1).

Nous devons également prendre en compte l'influence de la surface sur la répartition des charges dans le milieu. Dans le système considéré coexistent de nombreuses espèces chargées dont les interactions dépendent du champ électrique, donc de la répartition des charges : celles des enzymes, des ions du tampon, des substrats de l'enzyme et des produits de la réaction ; en outre, la charge de la surface sélectionnée est en général modifiée par des couches fonctionnalisées, susceptibles d'être chargées, qui permettent l'accrochage des enzymes. A l'interface [surface chargée-solution ionique], les ions de la solution vont s'organiser de façon à neutraliser la charge de surface sur une couche d'extension spatiale  $\kappa^{-1}$ , la longueur de Debye.

L'apparition de cette couche diffuse de charges ioniques se fait sur un temps caractéristique  $\tau_D$  tel que  $\tau_D \simeq (\kappa^{-1})^2/D_m$ , soit  $0.25\mu$ s pour  $\kappa^{-1} = 5$  nm. En revanche, l'équilibre de cette couche diffuse avec la totalité du volume de solution, pour neutraliser la charge de la surface solide, se fera sur une durée plus longue :  $\tau'_D \simeq L\kappa^{-1}/D_m$ , soit 0.5 s [35].

Nous allons dans la suite nous appuyer sur les valeurs comparées de ces temps caractéristiques afin de justifier l'approche que nous proposons pour la modélisation de l'activité enzymatique contrainte par l'accrochage. Retenons donc que :

$$\boxed{\begin{array}{ccc} \tau_{diff} & \gg & \tau'_D & \gg & \tau_D \\ 10^4 & & 0.5 & & 2,5 \cdot 10^{-7} \end{array}} \quad (2.1)$$

avec :

- $\tau_{diff}$  le temps caractéristique des phénomènes de diffusion
- $\tau_D$  celui de la réponse dynamique de la couche de Debye d'épaisseur  $\kappa^{-1}$
- $\tau'_D$  celui de la réponse dynamique de la totalité du volume de solution électrolytique considéré

## 2.1 Effet de la diffusion seule

Sur des temps expérimentaux allant de la minute à quelques dizaines de minutes, nous faisons l'hypothèse que la couche de Debye est toujours à l'équilibre. En effet, sa dynamique est caractérisée par  $\tau'_D$  et  $\tau_D$ , tous deux inférieurs à la seconde. Si cette approximation est moins évidente dans le cas de la couche de diffusion, nous supposons d'abord pour simplifier le calcul que l'on puisse limiter, en agitant la solution, la taille  $\delta$  de cette couche à une valeur compatible avec la durée des expériences. Dans le cas où le transport est purement diffusif (sans agitation forcée), la couche d'épaisseur  $\delta$  présentant le gradient de concentration croît avec le temps ; on n'atteint jamais de régime stationnaire de transport de matière. Par contre sous agitation, la convection assure le transport jusqu'à la couche de diffusion dont la taille se stabilise alors à une valeur constante que l'on notera  $\delta_0$ . On peut faire varier cette épaisseur en changeant la vitesse d'agitation c'est-à-dire l'efficacité du transport convectif. Ce raisonnement n'est valide que si on peut considérer qu'au-delà de la couche de diffusion on a un réservoir de substrat, où la concentration en substrat reste constante au cours de l'expérience. Pour ce faire, on peut se placer en large excès de substrat de façon à pouvoir négliger la diminution due à la réaction enzymatique, ou alimenter le compartiment où se déroule la réaction par un flux continu d'espèce(s) réactive(s).

*Dans un premier temps, on néglige la couche de Debye et on suppose que l'arrivée des substrats et le départ des produits au niveau de la surface solide sont uniquement gouvernés par la diffusion. Nous reprenons le modèle de Michaelis-Menten présenté à la section 1.2.1 (système d'équations 1.7) et nous introduisons un terme diffusif dans les équations.*

La loi phénoménologique de Fick (eq. 2.2), relie la cause (l'inhomogénéité de concentration de l'espèce considérée dans le volume de la solution), à la conséquence (le flux des particules,  $\vec{J}_m$ ) et fait apparaître le coefficient de diffusion  $D_m$ .

$$\vec{J}_m = -D_m \overrightarrow{\text{grad}}(C) \quad (2.2)$$

Le signe négatif indique que le transport se fait dans le sens opposé à celui du gradient qui le crée et contribue ainsi au retour vers un état d'équilibre. Nous traiterons le cas unidimensionnel, avec  $x$  la distance à la surface, considérée plane dans toute la suite. Cela revient à se placer dans le cadre de l'hypothèse d'invariance par translation selon toute direction colinéaire à la surface d'accrochage. En particulier, seule la composante selon  $x$  du flux  $\vec{J}_m$  est non nulle. On notera  $J_m$  cette composante (algébrique) dans toute la suite.

En combinant la loi de Fick au bilan de matière sur un volume fixé<sup>1</sup> qui s'écrit :

$$\frac{\partial C}{\partial t} = -\frac{\partial J_m}{\partial x} \quad (2.3)$$

on obtient l'équation de diffusion dans le volume de solution, qui s'applique à toutes les espèces mobiles :

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D_m \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} \quad (2.4)$$

### 2.1.1 Hypothèse du régime stationnaire

Reprenons le modèle de cinétique michaelienne (eq. 1.7) qui nous permet d'écrire les conditions limites à la surface, c'est-à-dire en  $x = 0$ , pour les espèces impliquées dans la réaction enzymatique.

$$\begin{cases} \frac{d[E.S]_0}{dt} = k_1([E]_0 - [E.S]_0)s_0 - (k_{-1} + k_2)[E.S]_0 \\ \frac{ds_0}{dt} = k_{-1}[E.S]_0 - k_1([E]_0 - [E.S]_0)s_0 - J_s(x=0) \\ \frac{dp_0}{dt} = k_2[E.S]_0 + J_p(x=0) \end{cases} \quad (2.5)$$

Les concentrations surfaciques ou molaires, le cas échéant, des espèces diffusantes sont ici notées en minuscules ( $p$  et  $s$ ) pour les distinguer de celles relatives aux espèces accrochées ( $[E]_0$ , concentration totale d'enzymes accrochés à la surface et  $[E.S]_0$ , concentration d'enzymes liés au substrat). Dans la suite, nous parlerons de densités d'enzymes accrochés, en négligeant la dimension transverse (selon  $x$ ) de la couche protéique de l'ordre de 10 nm, devant les autres longueurs.

De plus, les flux particuliers sont ici pris algébriques, d'où la différence de signe devant le flux de substrats  $J_s$  et celui des produits  $J_p$  dans les équations portant sur ces espèces (eq. 2.5).

Rappelons que la vitesse de la réaction enzymatique a été définie par  $v = k_2 [E.S]_0$  (section 1.2.1, eq. 1.6). Dans l'hypothèse d'une solution stationnaire du système (eq. 2.5), les grandeurs considérées ne dépendent plus du temps, ce qui implique que :

- de façon analogue au cas de l'enzyme libre en solution, la quantité d'enzymes liés au(x) substrat(s) est constante et les vitesses d'apparition des produits et de disparition des substrats sont égales. Elles s'identifient toutes deux à la vitesse de la réaction enzymatique.

---

<sup>1</sup>il s'agit ici du flux calculé à travers la surface délimitant le volume considéré, orientée par la normale sortante. On compte positivement les *flux sortants*.

- les flux  $J_s$  et  $J_p$  sont des constantes de l'espace du fait de l'hypothèse de stationnarité appliquée à l'équation (eq. 2.3). En particulier, le flux de substrats va alimenter la réaction qui a lieu à la surface ( $x = 0$ ) et celui de produits assurer leur transport dans le volume. Le système ne sera stationnaire que si ces flux sont égaux à la vitesse de la réaction enzymatique :  $|J_s| = v = |J_p|$ .

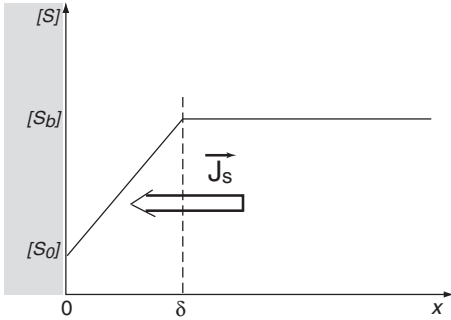


FIG. 2.1 – Profil de concentration en régime stationnaire

Dans toute la suite, le raisonnement portera sur les quantités de substrat :  $|J_s| = v$ . La couche de diffusion conserve une taille  $\delta$  constante, ce qui permet d'exprimer le flux surfacique par :

$$|J_s| = D_s \frac{(s_b - s_0)}{\delta} = k_D (s_b - s_0) \quad \text{et} \quad k_D = \frac{D_s}{\delta} \quad (2.6)$$

où  $D_s$  est le coefficient de diffusion du substrat ;  $s_b$  et  $s_0$  les concentrations molaires de substrat en  $x = \delta$  et  $x = 0$  respectivement ;  $k_D$  en  $\text{m.s}^{-1}$ , caractérise les phénomènes diffusifs.

Remarquons que la stationnarité du système implique que les flux particuliers sont des constantes d'espace. Dans ce cas, on a une évolution affine de la concentration de substrat dans la couche de diffusion. On n'a pas besoin, contrairement au cas non stationnaire, d'utiliser les densités surfaciques des espèces diffusantes dans l'expression du flux. Afin de passer des concentrations molaires (en  $\text{mol.m}^{-3}$ ) aux densités surfaciques utilisées dans les simulations en régime stationnaire, on moyenne sur la couche de plus faible épaisseur intervenant dans le problème : l'épaisseur de la couche de protéines.

L'hypothèse de stationnarité assure que l'équation de Michaelis-Menten ( $v = v_{max}[S]/(K_M + [S])$ , (eq. 1.11)), est toujours valable. Il suffit de remplacer  $[S]$  par  $s_0$ , concentration de substrat effectivement perçue par l'enzyme.

$|J_s| = v$  s'écrit donc :

$$k_D (s_b - s_0) = \frac{v_{max} s_0}{K_M + s_0} \quad (2.7)$$

avec

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad \text{et} \quad v_{max} = k_2 [E]_0$$

On comprend assez bien que, de même qu'avec l'enzyme en solution (section 1.2.1, équation (eq. 1.6)), la vitesse maximale soit théoriquement atteinte lorsque tous les enzymes sont liés à des molécules de substrat et participent au bilan global d'apparition des produits.

*Nous chercherons à savoir comment les phénomènes qui se produisent à la surface sont perçus en volume. Autrement dit, nous exprimerons la concentration de substrat  $s_b$  imposée ou mesurée dans le volume en fonction de celle effectivement perçue par l'enzyme  $s_0$ , et qui remplace  $[S]$  dans les équations établies en volume.*

On a donc à résoudre une équation du second degré en  $s_0$  :

$$s_0^2 - Bs_0 - C = 0 \quad (2.8)$$

avec

$$B = s_b - K_M - \frac{k_2[E]_0}{k_D} \quad \text{et} \quad C = K_M s_b \quad (2.9)$$

soit

$$s_0 = \frac{1}{2}(B + \sqrt{B^2 + 4C}) \quad (2.10)$$

### a. Approximations

Dans le modèle (1.5), on peut faire l'hypothèse, déjà évoquée dans les généralités, que  $k_2 \gg k_{-1}$ . cela revient à supposer que la disparition du complexe enzyme-substrat est essentiellement due à l'apparition de produit(s), plutôt qu'au retour aux espèces E et S libres en solution. Ainsi, on peut écrire :

$$K_M \simeq \frac{k_2}{k_1} \quad \text{et} \quad B = s_b - K_M \left(1 + \frac{k_1[E]_0}{k_D}\right) = s_b - K_M(1 + \mu), \quad \mu = \frac{k_1[E]_0}{k_D} \quad (2.11)$$

On fait ainsi apparaître un paramètre sans dimension,  $\mu$  qui compare une vitesse caractéristique de la réaction enzymatique (ici la vitesse de disparition du substrat) à une vitesse caractéristique de la diffusion des espèces.

Examinons donc les deux cas limites  $\mu \ll 1$  et  $\mu \gg 1$ .

#### • la réaction enzymatique impose la cinétique ( $\mu \ll 1$ )

La constante de vitesse associée à la diffusion est suffisamment grande (ou la vitesse de la réaction enzymatique suffisamment faible) pour que l'on ne soit pas limité par le transport. C'est la vitesse de réaction qui est limitante.

$$\begin{aligned} B &\simeq s_b - K_M \\ s_0 &= \frac{1}{2} \left( B + \sqrt{(s_b - K_M)^2 + 4s_b K_M} \right) = \frac{1}{2} \left( s_b - K_M + \sqrt{(s_b + K_M)^2} \right) = s_b \\ s_0 &= s_b \end{aligned} \quad (2.12)$$

On n'observe pas de déplétion importante près de la surface : le transport diffusif compense efficacement la consommation due à la réaction d'une part, et empêche l'accumulation des produits d'autre part.

Les cinétiques observées sont analogues à celles décrites en volume (courbes en trait continu fig. 2.2(a) et (b)). En particulier  $v = v_{max}/2$  pour  $s_b = K_M$ . La droite horizontale  $v = v_{max}/2$  est représentée en pointillés sur la figure (2.2(a)), où l'abscisse a été normalisée par rapport au  $K_M$  mesuré en volume, que l'on pourra qualifier d'effectif par opposition à la constante apparente déterminée dans le cas où  $\mu \gg 1$ .

• *la diffusion impose la cinétique* ( $\mu \gg 1$ )

On peut définir deux sous-régimes dans lesquels la résolution de l'équation (eq. 2.7) est immédiate.

★ Si  $s_0 \gg K_M$ ,

$$v = v_{max} \frac{s_0}{(K_M + s_0)} = v_{max}$$

Comme  $\mu \gg 1$ ,  $B \simeq s_b - \mu K_M$ .

Si de plus la concentration en volume vérifie :  $s_b \gg \mu K_M$ , l'expression (eq. 2.10) de  $s_0$  confirme que l'on est bien dans le cas  $s_0 \gg K_M$ .

Les concentrations en volume  $s_b$ , requises pour atteindre ce régime, sont donc d'autant plus importantes que  $\mu$  est grand, ou que  $k_D$  est faible. Les figures (fig. 2.2 (c) et (d)) représentent l'évolution de la concentration de substrat près de la surface  $s_0$ , en fonction de celle en volume  $s_b$  pour une valeur de  $\mu$  de 500, certes exagérée mais qui permet d'illustrer les deux points suivants :

- pour des concentrations  $s_b$  de substrat suffisantes (telles que  $s_0 \gg K_M$ ), l'effet de la diffusion est compensé et on atteint la vitesse maximale avec  $s_b = s_0$  (la droite limite pour  $s_b \rightarrow \infty$  est de pente 1).
- $s_0 \gg K_M$  n'implique pas forcément que  $s_b \gg \mu K_M$ . Ainsi pour  $s_0 = 100 K_M$  (droite en pointillés à  $s_0 = 10$  mM, graphe (d)),  $s_b \simeq \mu K_M$  (avec les valeurs numériques prises pour le calcul,  $\mu K_M$  vaut 50 mM).

Comme nous le verrons dans le cas où  $s_0 \ll K_M$ , la grandeur  $\mu K_M$  peut s'interpréter comme la constante de Michaelis apparente  $K_M^{app}$ , lorsque la diffusion a une contribution non négligeable.

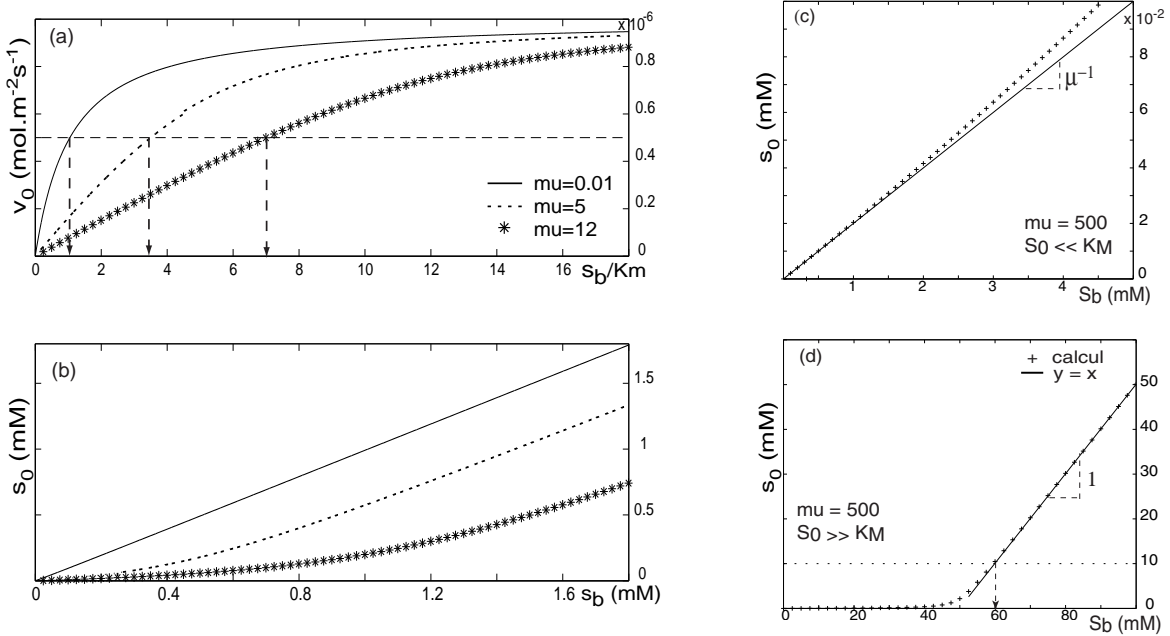


FIG. 2.2 – (a) Vitesse de réaction en fonction de la quantité de substrat en volume  $s_b$ , normalisée par rapport à  $K_M$  (avec la droite  $v = v_{max}/2$  en pointillés). (b) Concentration en substrat près de la surface  $s_0$ , en fonction de  $s_b$ . D'après l'expression (2.10) et  $v = v_{max}s_0/(K_M + s_0)$ , avec  $K_M = 10^{-4}$ M,  $k_2 = 10^3$  s<sup>-1</sup> et  $[E]_0 = 10^{-9}$  mol.m<sup>-2</sup> pour les mêmes valeurs de  $\mu$  qu'en (a). (c) et (d) Mise en évidence des régimes  $s_0 \ll K_M$  (c) et  $s_0 \gg K_M$  (d) pour  $\mu = 500$  et les mêmes valeurs des autres paramètres.

Cependant, il semble plus pertinent dans les cas extrêmes de raisonner toujours sur les quantités de substrats auxquelles sont effectivement soumis les enzymes, soit  $s_0$ .

★ Si  $s_0 \ll K_M$ ,

$$v = \frac{v_{max}s_0}{K_M + s_0} = \frac{v_{max}}{K_M}s_0 = k_D(s_b - s_0)$$

on résoud l'équation en  $s_0$ , ce qui conduit, d'après la définition de  $\mu$ , à :

$$s_0 = \left( \frac{1}{1 + \mu} \right) s_b \simeq \frac{s_b}{\mu} \quad \text{car } (\mu \gg 1) \quad (2.13)$$

On en déduit l'expression de la vitesse :

$$v = \frac{v_{max}}{K_M}s_0 = \frac{v_{max}}{K_M^{app}}s_b \quad \text{avec} \quad K_M^{app} = \mu K_M \quad (2.14)$$

On retrouve une cinétique analogue à celle obtenue lors de l'étude de l'enzyme en solution (dans le domaine où  $[S] \ll K_M$ ), mais avec une constante de Michaelis apparente bien supérieure et valant  $\mu K_M$ .

Cette pente se retrouve d'ailleurs sur les simulations, mais n'est clairement perceptible que dans le cas extrême déjà pris comme exemple précédemment ( $\mu = 500$ ). En effet, ce domaine est extrêmement réduit vers la gauche des graphes (a) et (b).

En conclusion, dans le cas d'une cinétique contrôlée par la diffusion, la surestimation de la valeur de  $K_M$  dépend de  $\mu$ . Une telle cinétique pourrait être mise en évidence en faisant varier la taille de la couche de diffusion (en agitant plus ou moins vite par exemple, pour faire varier la contribution de la convection au transport des espèces). La courbe  $v(s_b)$  devrait alors évoluer (car  $k_D = D_m/\delta$  est modifiée) notamment en présentant une pente à l'origine d'autant plus faible que  $k_D$  est faible.

$K_M$  est définie comme la concentration pour laquelle la vitesse enzymatique vaut  $v_{max}/2$ . Du fait de la diffusion, phénomène d'autant plus perceptible que  $k_D$  diminue (ou que  $\mu$  est grand devant 1), la concentration effective en substrat près de la surface  $s_0$  est plus faible que la concentration imposée en volume  $s_b$  : la vitesse maximale n'est atteinte que pour de plus grandes valeurs de  $s_b$ . La valeur correspondant à  $v_{max}/2$  et permettant la détermination expérimentale de  $K_M$  se décale vers la droite (flèches de la figure 2.2(a)) :  $K_M^{app} > K_M$ .

## b. Ordres de grandeur pour la PGK

Nous justifions ici les valeurs choisies pour les simulations numériques afin qu'elles soient compatibles avec le système étudié expérimentalement. Evaluons tout d'abord les constantes de vitesse de diffusion  $k_D$  observables (en considérant comme auparavant que  $D \simeq 10^{-10} m^2.s^{-1}$ ).

$$k_D = \frac{D}{\delta} \quad \begin{cases} \delta = 10 \text{ nm} & \implies k_D = 10^{-2} \text{ m.s}^{-1} & (a) \\ \delta = 1 \mu\text{m} & \implies k_D = 10^{-4} \text{ m.s}^{-1} & (b) \\ \delta = 100 \mu\text{m} & \implies k_D = 10^{-6} \text{ m.s}^{-1} & (c) \end{cases}$$

L'effet de la diffusion ne sera observable que dans les cas (b) et (c). En effet, dans le premier cas, la taille de la protéine (que l'on va modéliser par un pavé de dimensions 3 nm x 5 nm x 8 nm), est du même ordre que celle de la couche de diffusion : on est proche de la situation où l'enzyme est en solution.



En admettant que l'on puisse par une agitation efficace maintenir la taille de la couche de diffusion à  $1\ \mu\text{m}$ , une valeur de  $k_1[E]_0$  10 fois plus faible soit  $10^{-5}\ \text{m.s}^{-1}$ , permettrait d'observer les deux régimes de la figure 2.3, en faisant varier le paramètre  $\mu$  grâce à la vitesse d'agitation. On se place dans la configuration expérimentale où l'on contrôle l'agitation et on s'impose une densité surfacique d'enzymes. On pourrait ainsi espérer avoir accès à des valeurs de  $\delta$  variant du micron à la centaine de microns et visualiser l'évolution de la réponse d'un même échantillon protéique. Or d'après l'approximation de  $K_M$  utilisée dans l'équation (eq. 2.11) :

$$k_1 \simeq \frac{k_2}{K_M} \simeq \frac{10^3}{10^{-4}} \quad \text{soit} \quad k_1 \simeq 10^7\ \text{M}^{-1}.\text{s}^{-1} \quad \text{ou} \quad 10^4\ \text{mol}^{-1}.\text{s}^{-1}.\text{m}^3$$

pour avoir  $k_1[E]_0$  de l'ordre de  $10^{-5}\ \text{m.s}^{-1}$ , il faudrait donc une densité d'enzymes immobilisés **et actifs** de l'ordre de  $10^{-9}\ \text{mol.m}^{-2}$ .

La surface du pavé modélisant la protéine vaut  $40\ \text{nm}^2$ , soit pour un recouvrement compact de la surface par les protéines :

$$[E]_0 = \frac{1}{40 \cdot 10^{-18} \times 6 \cdot 10^{23}} \simeq 4 \cdot 10^{-8}\ \text{mol.m}^{-2} \quad (2.15)$$

Cette situation de recouvrement compact, correspondant à une densité maximale pour une monocouche protéique, n'est ni réalisable principalement à cause de la gêne stérique, ni souhaitable car contraignant fortement le fonctionnement des enzymes. Une « dilution » au quarantième suffirait pour se trouver dans la gamme de concentrations surfaciques désirée.

Néanmoins, il peut être expérimentalement difficile d'assurer de telles densités d'enzymes actifs après accrochage sur une monocouche. En effet, les tests d'activité présentés ont été réalisés avec la protéine sauvage. Si le protocole d'accrochage semble remarquablement efficace par l'évaluation grossière que l'on peut en faire grâce aux images de microscopie de force atomique (voir sec. 4.2.4), le signal mesuré reste faible. Il est très probable que les contraintes inhérentes à l'accrochage (site actif partiellement ou totalement masqué, dénaturation partielle) fassent notablement chuter le taux d'enzymes actifs. Moins on a de protéines accrochées susceptibles de consommer le substrat près de la surface et moins il y a de NADH produit dans le milieu (espèce dont on mesure l'absorbance). De plus, dans ce cas l'effet de la déplétion près de la surface et du transport conséquent seront peu perceptibles (voir la partie *Activité de la PGK* en fin de chapitre).

Nous nous sommes par ailleurs placés dans le cas non stationnaire, en résolvant numériquement l'équation de diffusion (eq. 2.4) avec les conditions-limites fournies par le système (eq. 2.5). Cette approche permet de préciser et/ou valider la pertinence de l'hypothèse du régime stationnaire. De plus, elle permet d'évaluer, en fonction de la quantité d'enzymes actifs, l'évolution de la couche de diffusion et donc de fournir des arguments quantitatifs à l'analyse des résultats expérimentaux.

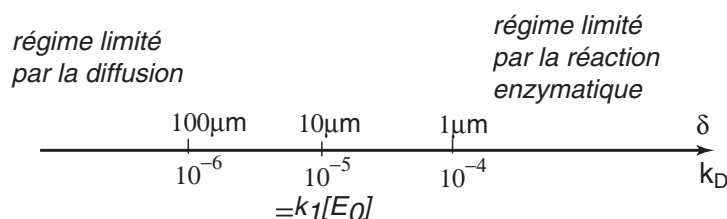


FIG. 2.3 – Prédiction des régimes commandant la cinétique à densité d'enzymes fixée (soit  $10^{-9}\ \text{mol.m}^{-2}$ )

### 2.1.2 Cas non stationnaire

Le flux de substrats  $J_s$  n'est plus constant mais l'équation de diffusion relative au substrat dans le volume reste :

$$\frac{\partial s}{\partial t} = D_s \frac{\partial^2 s}{\partial x^2} \quad (2.16)$$

le système de conditions au bord comporte ici un terme explicite de couplage des variables d'espace et de temps (terme en gras) :

$$\begin{cases} \frac{d[ES]_0}{dt} = k_1([E]_0 - [ES]_0)s_0 - (k_{-1} + k_2)[ES]_0 \\ \frac{ds_0}{dt} = k_{-1}[ES]_0 - k_1([E]_0 - [ES]_0)s_0 + \mathbf{D_s} \frac{\partial s}{\partial x} \end{cases} \quad (2.17)$$

Dans ce modèle, l'accumulation de molécules de produit près de la surface n'influence pas la vitesse de réaction enzymatique (pas de terme dépendant de  $p$  dans la première équation du système). On a simplement un phénomène de diffusion de ces molécules, dont on ne tient pas en compte ici.

#### a. Cadre de la simulation

Nous utilisons des discrétisations d'espace  $\delta x$  et de temps  $\delta t$  vérifiant le critère  $\delta t \leq (\delta x)^2/2D_s$  (convergence du calcul intégral) pour résoudre pas à pas l'équation de diffusion selon un schéma FCTS (*forward time centered space*) [36].

La valeur de la concentration du substrat à la surface  $s(x \rightarrow 0)$ , est égale à  $\varepsilon S[x_1]$ .

$S[x_n = n\delta x]_{n \in \{1, \dots, N\}}$  est la matrice associée à la concentration de substrat à un instant donné.

$\varepsilon$  caractérise l'échelle spatiale que l'on veut négligeable devant toutes les autres longueurs du problème. Nous avons ici fixé la plus petite échelle spatiale par la taille de la couche protéique évaluée à 10 nm et dans la suite,  $\delta x \geq 10\varepsilon$ .

Les conditions (eq. 2.17) liées à la réaction enzymatique décrivent, pour tout  $t$ , la condition-limite en  $x = 0$  et on impose  $S[x_N] = C_0$ .  $C_0$  est également la concentration initiale de substrat, homogène dans tout le volume :  $s(x, t = 0) = C_0$  pour tout  $x$ . Le choix du nombre  $N$  de boîtes est tel que le profil déformé de  $S[x_1]$  n'ait pas atteint la  $N/2^{ime}$  boîte à la fin de la simulation.

Nous prenons toujours le schéma (fig. 1.5) comme modèle de la cinétique de réaction et les valeurs des constantes :

$$\begin{aligned} k_2 &= 10^3 \text{ s}^{-1} \\ k_1 &= 10^4 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1} \\ D_s &= 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1} \\ k_{-1} &= K_d \cdot k_1 = 10^{-5} \cdot 10^7 = 100 \text{ s}^{-1} \end{aligned}$$

La densité d'enzymes accrochés  $[E]_0$  et la concentration initiale de substrat  $C_0$  étant des paramètres.

Nous conservons la valeur numérique de  $k_1$  en dépit du changement de dimension du problème. Cette constante de vitesse est reliée à la probabilité et à l'efficacité des chocs entre l'enzyme et son substrat. On fait l'hypothèse que ce n'est pas l'efficacité de ces chocs mais leur probabilité qui sera influencée par la présence de la surface, ce qui modifiera la vitesse de réaction.

Dans ce modèle, la vitesse de réaction, rigoureusement définie par  $dp_0/dt$  (vitesse d'apparition du substrat), ne s'identifie plus à  $ds_0/dt$ , contrairement au cas du régime stationnaire. Nous avons considéré que l'accumulation du produit et l'évolution spatio-temporelle de la quantité  $p$  ne perturbait pas la réaction. On n'envisage pas, dans les simulations présentées, que ce produit puisse avoir une action inhibitrice par exemple. On ne va donc s'intéresser qu'aux grandeurs  $s_0(t)$  et  $[ES]_0(t)$  dans la suite, la vitesse de réaction étant donnée par  $k_2[ES]_0(t)$ .

## b. Comportements aux temps courts

Cette étude du comportement de la couche d'enzymes aux temps courts va nous permettre de comprendre l'influence des différents paramètres utilisés dans la simulation. Bien que la modélisation et les calculs numériques présentés ici restent simples, ils offrent la possibilité de faire varier des grandeurs caractéristiques du système étudié, en particulier la densité d'accrochage. On peut ainsi, tenter de suppléer aux limitations intrinsèques à l'expérience, par une approche « in silico » (avec toutes les réserves inhérentes à la méthode).

### • *Evolutions de la quantité d'enzymes complexés ( $[ES]_0$ ) et de la concentration de substrat ( $s_0$ ) à la surface*

Les figures 2.4 et 2.5 présentent les évolutions temporelles pour plusieurs conditions initiales de concentration de substrat ( $C_0 = 2 \text{ mM}$ ,  $0.2 \text{ mM}$  ou  $0.02 \text{ mM}$ ), de :

- la concentration  $s_0$  de substrat à la surface sur deux échelles de temps (fig. 2.4)
- la quantité d'enzymes  $[E.S]_0$  impliqués dans la consommation de ce substrat et participant ainsi au bilan global de la réaction (fig. 2.5(a), (b) et (c)). Rappelons que  $v(t) = k_2[E.S]_0(t)$ .
- la concentration de substrat à  $20 \mu\text{m}$  de la surface dans les trois cas, ce qui permet de visualiser le « passage » du front de diffusion (fig. 2.5(d)).

pour une densité d'enzymes accrochés et **supposés actifs** fixée à  $[E]_0 = 2.10^{-9} \text{ mol.m}^{-2}$ .

L'examen de ces deux séries de figures amène les commentaires suivants :

Quelle que soit la concentration initiale  $C_0$ , la fonction  $s_0(t)$  est décroissante. On trace le rapport  $s_0/C_0$  afin de comparer les évolutions de  $s_0$  dans les trois situations considérées. Les différences observées aux temps très courts ( $t \sim 10^{-4} \text{ s}$ , fig. 2.4(a), (b) et (c)), sont explicables par le choix de  $\delta x = 100 \text{ nm}$ . Les temps inférieurs à  $\delta x^2/D_s$ , soit  $10^{-14}/10^{-10} = 10^{-4} \text{ s}$ , ne sont pas accessibles et les comportements constatés à ces échelles de temps n'ont pas de pertinence physique : on atteint la limite de résolution numérique.

Pour la concentration initiale la plus forte ( $C_0 = 2 \text{ mM}$ , fig. 2.5(a)), on atteint très rapidement une situation de « saturation » dans laquelle la quasi-totalité des enzymes sont engagés dans la réaction enzymatique. On peut rapprocher ce cas de celui obtenu en volume pour des concentrations de substrat grandes devant  $K_M$ . On est en situation de vitesse maximale et tous les enzymes susceptibles d'être impliqués le sont très vite, ce qui conduit à une diminution de  $s_0$  (fig. 2.4(a)).

L'importance du flux  $J_s$  qui alimente la surface, dépend des échelles spatiales impliquées. En effet, le processus de transport diffusif est d'autant plus efficace que les distances  $L$  mises en jeu sont petites ( $L \propto \sqrt{t}$ ). Au début, les molécules de substrat venant du volume pour compenser la consommation à la surface ont peu de distance à parcourir. Les zones proches de la surface se déplètent ensuite progressivement en substrat, ce qui augmente d'autant le temps de transport : de  $0.1 \text{ ms}$  pour parcourir  $100 \text{ nm}$  on passe à  $10 \text{ ms}$  pour une distance d'un micron.

C'est ce qui justifie que l'on n'observe pas une évolution « en dents de scie » de  $s_0$ , qui refléterait une succession d'appauvrissements et d'excès de substrat près de la surface. Plus les distances mises en jeu augmentent et moins le flux de surface  $J_s(x=0)$  est important, l'efficacité du transport comparée à la vitesse de la réaction enzymatique diminue. Le comportement aux temps très courts vient du fait

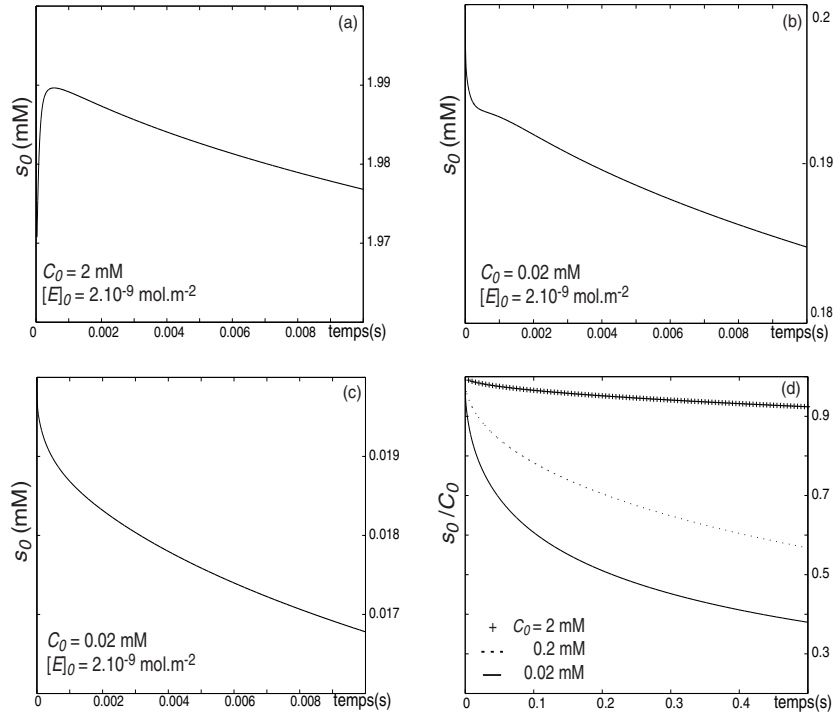


FIG. 2.4 – Evolution temporelle de la quantité de substrat en  $x = 0$  pour  $[E]_0 = 2.10^{-9} \text{ mol.m}^{-2}$ ,  $\delta t = 1 \mu\text{s}$ ,  $\delta x = 100 \text{ nm}$ , et  $C_0 = 2 \text{ mM}$ (a),  $C_0 = 0.2 \text{ mM}$ (b),  $C_0 = 0.02 \text{ mM}$ (c) sur 10 ms. (d) Comparaison des trois jeux de paramètres avec normalisation de  $s_0$  par  $C_0$ .

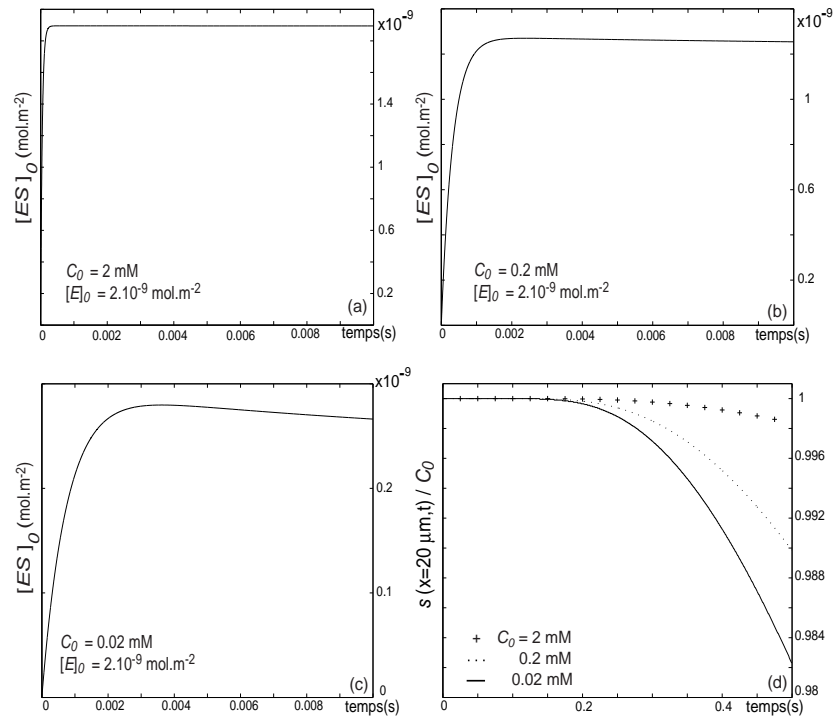


FIG. 2.5 – Evolution temporelle de la quantité d'enzymes participant à la consommation du substrat pour  $[E]_0 = 2.10^{-9} \text{ mol.m}^{-2}$ ,  $\delta t = 1 \mu\text{s}$ ,  $\delta x = 100 \text{ nm}$ , et  $C_0 = 2 \text{ mM}$ (a),  $C_0 = 0.2 \text{ mM}$ (b),  $C_0 = 0.02 \text{ mM}$ (c) sur 10 ms. (d) Evolution temporelle de la concentration de substrat à  $20 \mu\text{m}$  de la surface.

que l'on ne peut pas choisir un pas  $\delta x$  suffisamment petit pour bien décrire le problème et le flux est artificiellement important. Il crée un excès de substrat à la surface qui, comme expliqué précédemment, n'a pas de pertinence physique.

Une fois le plateau de  $[ES]_0$  atteint, tous les enzymes ne sont pas liés à des molécules de substrat. Pour les constantes cinétiques et thermodynamiques choisies dans cette simulation, en moyenne 5% des enzymes accrochés restent libres à tout instant. En volume, on aurait exactement la même proportion d'enzymes disponibles et qui proviennent soit de la dissociation du complexe enzyme-substrat (de constante de vitesse  $k_{-1}$ ), soit de celle du complexe enzyme-produit en fin de cycle enzymatique.

Lorsque l'on diminue  $C_0$ , le pourcentage maximal d'enzymes impliqués diminue (on passe de 95% dans le cas précédent à 60% pour  $C_0 = 0.2\text{mM}$  (fig. 2.5(b)) et 15% pour  $C_0 = 0.02\text{mM}$  (fig. 2.5(c))). On résume dans le tableau ci-dessous, les proportions d'enzymes engagés dans la réaction pour l'enzyme libre et accroché.

$C_0$ mM	0.02	0.2	2
volume	17%	67%	95%
surface	<15%	60%	95%

TAB. 2.1 – Comparaison des pourcentages  $[E.S]/[E]_0$  dans les deux situations envisagées pour l'enzyme.

Pour  $C_0 = 0.02\text{mM}$ , on n'observe pas de plateau sur cette échelle de temps : la fonction  $[E.S]_0(t)$  passe par un maximum au bout d'environ 3.6 ms, avant de décroître lentement. Pour des concentrations de substrat trop faibles, la vitesse de réaction ne peut pas rester constante, elle diminue et s'adapte : la cinétique est sous contrôle diffusif. On observe néanmoins une diminution du niveau maximal d'enzymes impliqués avec  $C_0$ , analogue à ce qui se passe en volume.

Avec l'enzyme libre et même pour des concentrations inférieures à  $K_M$ , le régime stationnaire s'établit et se maintient sur des durées de l'ordre de la minute (voir section 2.3). Avec l'enzyme accroché, le régime stationnaire n'est observé que pour des concentrations de substrat élevées, qui permettent de négliger l'effet de la diffusion et d'avoir un plateau de  $[E.S]_0(t)$  ( $v$  constante) aux temps courts. Pour  $C_0 = 0.02\text{mM}$ , la valeur de 15% correspond uniquement au maximum de la figure 2.5(c).

Le pourcentage d'enzymes impliqués est réduit par rapport à sa valeur en système homogène, et ce d'autant plus que  $C_0$  diminue. A cause de la localisation spatiale des enzymes, on atteint rapidement une situation où ils sont en excès : pour  $C_0 = 0.2\text{mM}$  on a autant de molécules d'enzyme que de substrat près de la surface dès le début de la simulation. En effet, pour cette concentration et  $[E]_0 = 2.10^{-9}\text{mol.m}^{-2}$ ,  $s_0 \varepsilon/[E]_0$  vaut 1 et diminue au fur et à mesure, comme  $s_0$ .

L'augmentation de la quantité de substrat atténue les effets de la diffusion car la diminution relative de  $s_0$  due à la consommation par l'enzyme reste faible.

Cette diminution vaut moins de 10% pour  $C_0 = 2\text{mM}$  (fig. 2.4(d)) et les gradients engendrés, donc le flux  $J_s$  qui leur est proportionnel, restent faibles également. Lorsque l'on augmente  $C_0$ , c'est-à-dire la quantité de substrat présentée à la protéine, l'amplitude de la perturbation provoquée par la déplétion en surface est plus petite. C'est ce qu'illustre la figure 2.5(d) pour laquelle on se place à une distance donnée de la surface ( $x = 20\text{ }\mu\text{m}$ ).

• *Influence de la densité totale d'enzymes accrochés ( $[E]_0$ )*

La figure 2.6 présente l'influence de la densité d'enzymes accrochés sur les cinétiques calculées, pour une concentration initiale de 0.02 mM. Pour ces valeurs des paramètres, l'effet de la déplétion de surface est rapidement perceptible : les rapports  $s_0 \varepsilon / [E]_0$  initiaux valent 0.1 pour  $[E]_0 = 2.10^{-9} \text{ mol.m}^{-2}$  et 0.01 pour  $[E]_0 = 2.10^{-8} \text{ mol.m}^{-2}$ .

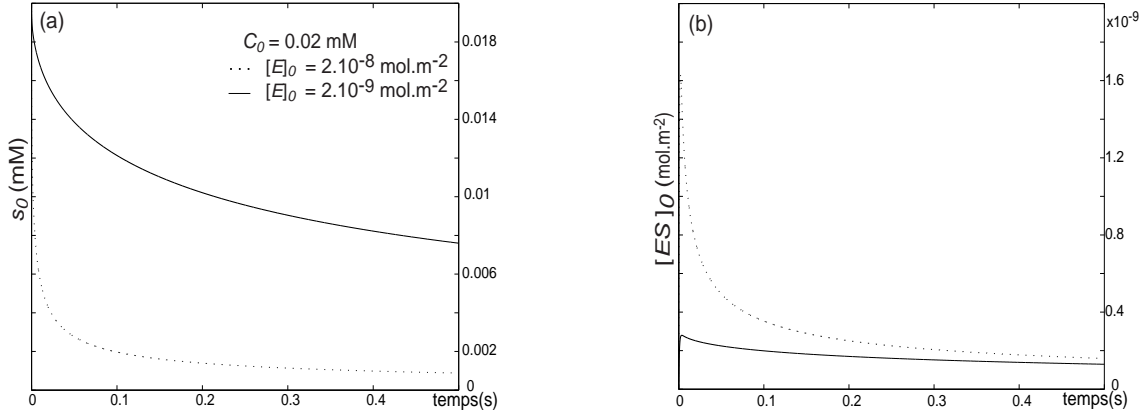


FIG. 2.6 – Influence de la densité d'enzymes à la surface ( $[E]_0 = 2.10^{-9} \text{ mol.m}^{-2}$  et  $[E]_0 = 2.10^{-8} \text{ mol.m}^{-2}$ , pour  $C_0 = 0.02 \text{ mM}$ ) sur les évolutions temporelles calculées sur 0.5 s, de  $s_0$  (a) et  $[E.S]_0$  (b). Les autres paramètres de la simulation restent inchangés.

Dans le modèle de Michaelis, la vitesse de formation d'enzymes liés au substrat à l'instant  $t$  vaut  $k_1[E](t)s_0(t)$ , où  $[E](t)$  est la quantité d'enzymes libres à cet instant. En particulier, à  $t = 0$ , cette vitesse est proportionnelle à la densité d'enzymes accrochés  $[E]_0$ .

A  $C_0$  donnée et tant que la diffusion ne limite pas la vitesse de la réaction, plus les densités d'enzymes accrochés sont importantes et plus le nombre d'enzymes impliqués (donc la vitesse de réaction) est grand. C'est ce que l'on observe sur la figure 2.6(b) dans les premiers instants de la simulation.

La concentration initiale est suffisamment faible pour que, dès le début de la simulation et même pour  $[E]_0 = 2.10^{-9} \text{ mol.m}^{-2}$ , on n'atteigne pas la vitesse maximale. On se retrouve dans une situation analogue à celle où  $[S] \ll K_M$  en volume.

Notons enfin que pour les deux densités d'enzymes considérées, on semble tendre rapidement (en un temps de l'ordre de la seconde) vers une quantité d'enzymes liés  $[E.S]_0$  commune et apparemment invariante dans le temps. Ces observations sont confirmées par l'étude sur des temps plus longs.

Il y a, dès les premiers instants de la simulation et du fait d'une plus grande quantité d'enzymes actifs, une consommation rapide du substrat pour  $[E]_0 = 2.10^{-8} \text{ mol.m}^{-2}$  (fig. 2.6(a)). Un ralentissement se fait très vite sentir et au bout de 0.1 s, l'évolution de  $s_0$  est beaucoup plus lente que dans le cas où  $[E]_0 = 2.10^{-9} \text{ mol.m}^{-2}$  (la pente de la courbe en pointillés est plus faible que celle de la courbe en trait continu pour  $t > 0.2$  s).

La pente des courbes  $s_0(t)$  renseigne sur l'écart entre la vitesse de diffusion  $v_2$  et la vitesse de disparition du substrat par la réaction  $v_1$ . On peut réécrire la deuxième équation du système (eq. 2.17) :

$$\frac{ds_0}{dt} = \underbrace{k_{-1}[E.S]_0 - k_1([E]_0 - [E.S]_0)s_0}_{\frac{ds_0^R}{dt} = v_1} + \underbrace{D_s \frac{\partial s}{\partial x}}_{\frac{ds_0^{diff}}{dt} = v_2}$$

Ces vitesses vont définir deux régimes cinétiques et l'importance de l'écart entre  $v_1$  et  $v_2$  conditionne la rapidité des variations de la pente de  $s_0(t)$  (courbe en pointillés, fig. 2.6(a)).

Si  $ds_0^R/dt \gg ds_0^{diff}/dt$ , la pente varie plus vite pour deux raisons qui se conjuguent. Tout d'abord, cette pente s'identifie à  $v_1$  aux temps courts et à  $v_2$  aux temps plus longs. De plus, si les vitesses sont très différentes, cela signifie que la consommation de substrat est très importante et que le régime diffusif est atteint rapidement. Le passage d'un régime à l'autre se fait au contraire progressivement si ces deux vitesses ont des valeurs proches (courbe en trait continu), le régime diffusif étant atteint sur des temps plus longs, comparativement à la situation précédente.

Quand le milieu proche de la surface aura été appauvri en molécules de substrat, c'est le transport qui assurera le réapprovisionnement. Encore une fois, tant que les distances impliquées sont petites ce transport sera suffisamment rapide pour ne pas trop pénaliser la réaction enzymatique. On peut encore exprimer cette idée en disant que les protéines disposent d'un réservoir de substrat défini par  $C_0$  avant d'être sensibles à la limitation par la diffusion. Dans le cas présent, ce réservoir est le même pour les deux couches protéiques et l'épuisement des ressources en substrat se fait donc sentir plus rapidement pour la couche la plus compacte.

On retrouve l'idée intuitive qu'il existe une valeur optimale de la densité d'enzymes accrochés, au-delà de laquelle les contraintes imposées par la diffusion limitent le gain apporté par un plus grand nombre d'unités actives.

On observe l'implication d'un grand nombre d'enzymes au début (fig. 2.6 b), en réponse à la présence du substrat, puis un réajustement selon le renouvellement de cette espèce par le transport de matière. Autrement dit, dès que la diffusion impose la cinétique, la vitesse de disparition de  $s_0$  est fortement ralentie (fig. 2.6 a) et la vitesse de réaction (fig. 2.6 b) s'adapte à la quantité  $s_0$  de substrat disponible. On atteint un régime quasi-stationnaire lié à une évolution très lente de la couche touchée par le gradient de substrat. Rappelons que l'hypothèse du régime stationnaire conduit à un gradient d'espèces qui est une constante du temps et de l'espace. Elle impose donc que cette couche, sur laquelle existe un gradient de concentration, garde une épaisseur  $\delta_0$  constante.

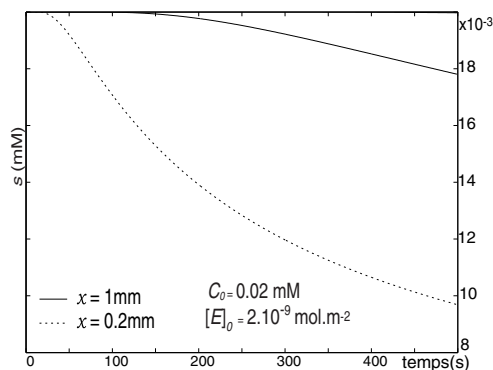


FIG. 2.7 – Evolutions  $s(x_{obs}, t)$  à des abscisses  $x_{obs}$  différentes

Dès qu'elle est régie par la diffusion, l'évolution temporelle du front de déplétion ralentit au fur et à mesure qu'il avance. Plus on se place loin de la surface, plus la diminution de la concentration  $s$  de substrat à l'abscisse considérée, est lente. Ce comportement est illustré par la figure ci-contre sur laquelle sont tracées les évolutions de  $s(x_{obs}, t)$  pour  $x_{obs} = 0.2\text{ mm}$  et  $x_{obs} = 1\text{ mm}$ . Les simulations s'étendent cette fois sur des temps du même ordre de grandeur que ceux des expériences de mesure d'absorbance, que nous qualifierons de « longs ». On peut remarquer par ailleurs que la position du front à  $t = 500\text{ s}$ , ne correspond pas à  $x = \sqrt{D_s t} = \sqrt{500 \cdot 10^{-10}} \simeq 0.2\text{ mm}$ . En effet, on constate une diminution de la concentration au point d'abscisse  $x = 0.2\text{ mm}$  dès  $t \simeq 150\text{ s}$ . Nous ne donnons ici qu'une justification qualitative d'une telle observation.

Les solutions d'une équation de diffusion sont en permanence sensibles à leurs conditions aux limites. Si on ne considère que l'équation en volume (eq. 2.16), on peut construire le nombre sans dimension  $x/\sqrt{D_m t}$ . On se place souvent dans le cas de conditions aux bords telles que  $x/\sqrt{D_m t} = \text{constante}$ . Par contre, une dépendance temporelle des conditions aux limites peut conduire à ce que ce rapport soit une fonction du temps. Montrons que c'est le cas ici par une analyse dimensionnelle du problème.

Nous disposons de  $p = 8$  paramètres pour notre système, dont  $q = 2$  « dimensions » (le temps et l'espace) :

$$\begin{aligned} x & (\longleftrightarrow L) \\ t & (\longleftrightarrow T) \\ D_s \text{ et } k_1 & (\longleftrightarrow L^2 \cdot T^{-1}) \\ k_{-1} \text{ et } k_2 & (\longleftrightarrow T^{-1}) \\ C_0 & (\longleftrightarrow L^{-3}) \\ [E_0] & (\longleftrightarrow L^{-2}) \end{aligned}$$

Selon le théorème de Buckingham, un des théorèmes sur lesquels repose l'analyse dimensionnelle, la forme la plus générale d'une équation physique complète s'écrit :

$$f(\pi_1, \pi_2, \pi_3, \dots, \pi_{p-q}) = 0$$

où les  $\pi_i$  sont des nombres sans dimension indépendants.

On peut donc construire 6 nombres sans dimension indépendants et exprimer  $x/\sqrt{D_s t}$  en fonction, par exemple, de :

$$\frac{k_{-1}}{k_2} \quad \frac{C_0^{1/3}}{[E_0]^{1/2}} \quad \frac{D_s}{k_1} \quad \frac{k_2}{[E_0] D_s} \quad k_2 t \quad (2.18)$$

Le temps apparaît explicitement dans le dernier des nombres construits et  $x/\sqrt{D_s t}$  est fonction du temps. On remarque que cette dépendance est liée à l'existence de la réaction enzymatique. Aux temps longs, lorsque son influence est moindre, nous vérifions (fig. 2.8) que l'évolution du front de déplétion suit une loi en  $t^{1/2}$ .

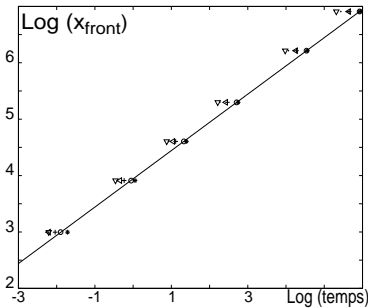


FIG. 2.8 – Représentation en échelle logarithmique de l'abscisse du front en fonction du temps.

Nous avons déterminé  $x_{front}$  en fixant une valeur seuil en dessous de laquelle on estime qu'il est pertinent de considérer la déplétion. Les comportements restent les mêmes quand on fait le rapport à la concentration initiale. Les temps, évalués pour les simulations correspondant à 6 conditions  $(C_0, [E_0])$  de la gamme explorée, sont reportés sur la figure ci-contre. La pente de la courbe fournit bien une loi d'évolution du front en  $\sqrt{t}$ .

Sans disposer de statistiques suffisantes pour déterminer la loi temporelle, on confirme qu'aux temps courts, c'est-à-dire dans le régime enzymatique, le front n'avance pas selon une loi en  $t^{1/2}$ . Pour mettre en évidence cet effet, on trace l'évolution de la concentration en substrat selon la distance  $x$  à la surface, pour des temps vérifiant la relation indiquée sur la figure 2.9. Si on se trouve dans un régime purement diffusif, ce choix des temps  $t_k$  conduit à un ensemble de courbes régulièrement espacées. On se rend compte que ce n'est le cas que pour des temps suffisamment grands.



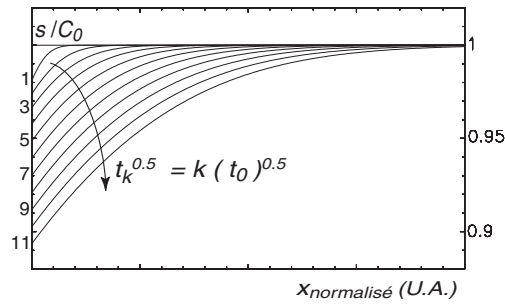


FIG. 2.9 – Profils de concentration à différents intervalles de temps.

Après avoir présenté en détail le comportement du système sur les temps courts, nous nous intéressons maintenant au comportement sur des temps plus longs, accessibles à la mesure.

### c. Comportements aux temps longs

Les figures 2.10 et 2.11 ci-après donnent les évolutions sur quelques minutes correspondant aux figures 2.4 et 2.5 précédentes. Nous y avons rajouté les simulations pour  $C_0 = 2 \mu\text{M}$ , ce qui nous permet d'illustrer les points suivants :

Afin de comparer les évolutions pour les quatre  $C_0$  envisagées, nous avons considéré le rapport  $s_0/C_0$ . Au bout de 5 minutes, il a la même valeur, quelle que soit  $C_0$  (fig. 2.10(b) et (c)). En considérant ce rapport, on s'affranchit du fait que l'amplitude de la perturbation dépende de  $C_0$ . C'est la diffusion seule qui contrôle la cinétique aux temps longs. Cette cinétique ne dépend alors que peu des paramètres liés à l'enzyme. De plus, ce régime s'établit d'autant plus tôt que  $C_0$  est faible puisque les effets de la déplétion sont plus vite ressentis. Pour des concentrations initiales de substrat inférieures à 0.02 mM, le régime diffusif est atteint suffisamment vite pour que les évolutions observées à ces échelles de temps soient identiques (fig. 2.10(a)).

L'implication des enzymes dans la cinétique est néanmoins différente selon que les proportions enzyme/substrat soient supérieures ou inférieures à 1/1. A  $t=0$ , l'enzyme et le substrat sont en quantités stoechiométriques pour  $C_0 = 0.2 \text{ mM}$ . Dans tous les cas, la quantité d'enzymes participant à la réaction diminue au cours du temps (fig. 2.11(a) et (b)), mais avec des allures distinctes. Le changement de concavité observé pour  $C_0 = 2 \text{ mM}$  (soit 10 molécules de substrat par enzyme à  $t=0$ ), n'est perceptible que si la cinétique est contrôlée par la réaction suffisamment longtemps. Rappelons que cette concentration permettait, aux temps courts, d'observer un plateau de la quantité d'enzymes impliqués  $[ES]_0$ , inexistant pour les autres  $C_0$ <sup>2</sup>.

De plus, le poids de la contribution du transport dans la cinétique dépend de ce paramètre. Les régimes diffusifs, observables dans tous les cas, se distinguent par la quantité d'enzymes alors impliqués dans la réaction ( $[E.S]_0(t=500 \text{ s})$  différentes). Or  $[E.S]_0(t)$  dépend en particulier de  $s_0(t)$ , donc du flux  $J_s$  et de  $C_0$ . Le paramètre  $C_0$  intervient à deux niveaux :

- il impose la quantité de substrat présentée aux enzymes à  $t=0$  (plus ou moins grande sensibilité du système aux effets de déplétion).
- il conditionne à tout instant, la quantité de ce même substrat qui est disponible et susceptible de diffuser.

<sup>2</sup>Nous avons limité la gamme des  $C_0$  explorée à des concentrations utilisées expérimentalement.

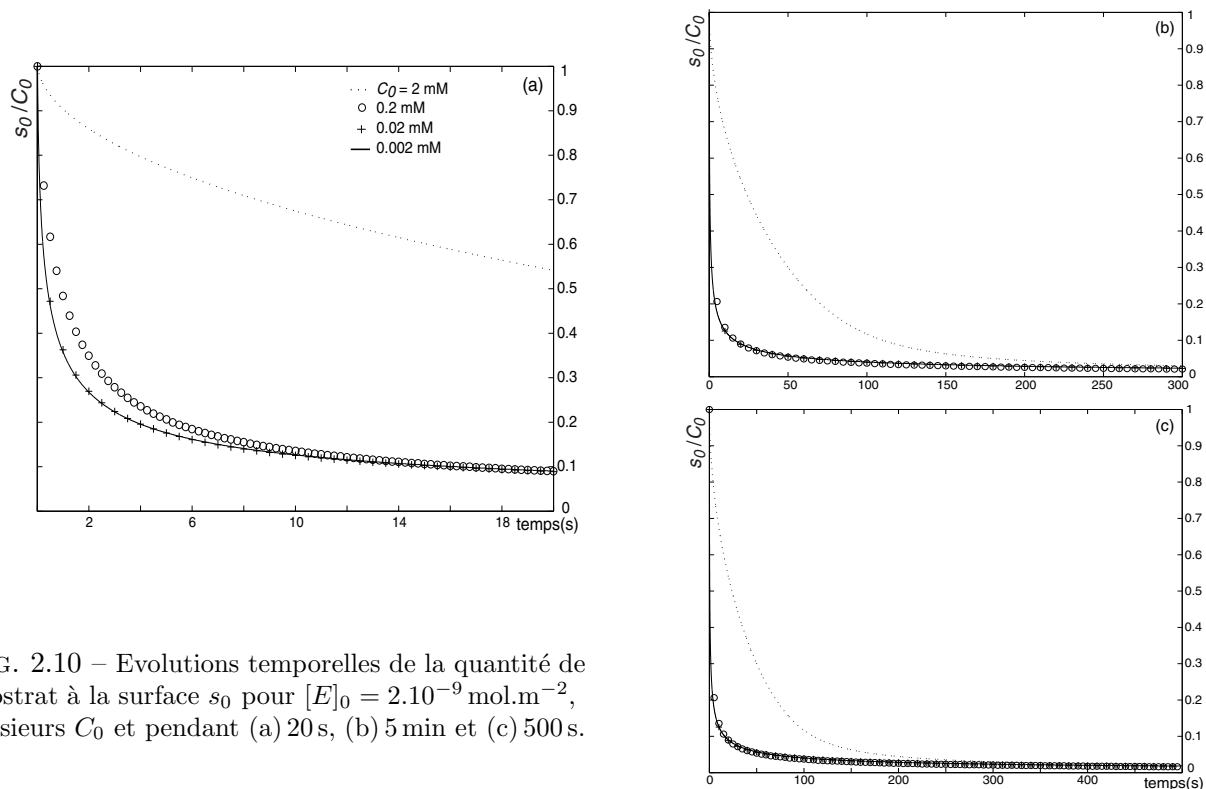


FIG. 2.10 – Evolutions temporelles de la quantité de substrat à la surface  $s_0$  pour  $[E]_0 = 2.10^{-9} \text{ mol.m}^{-2}$ , plusieurs  $C_0$  et pendant (a) 20 s, (b) 5 min et (c) 500 s.

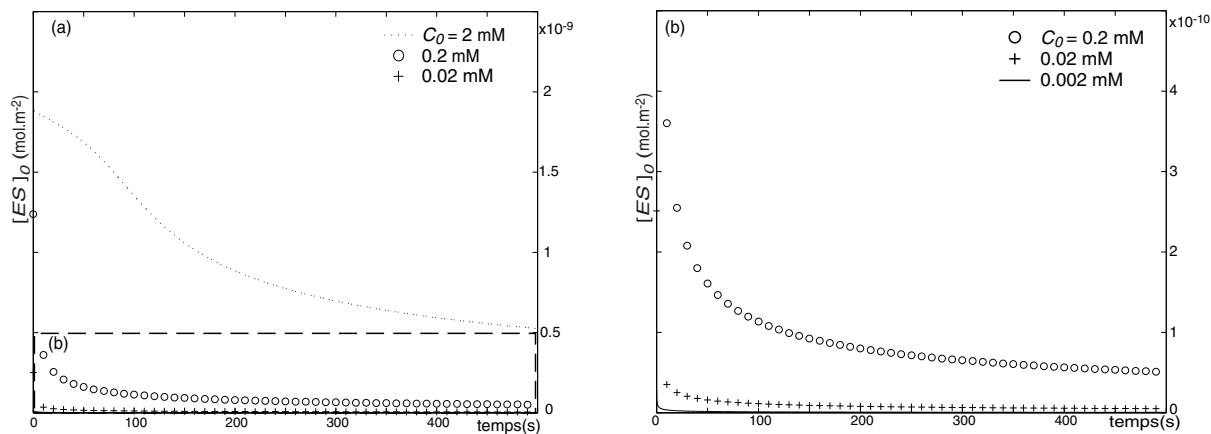


FIG. 2.11 – Evolutions temporelles de la quantité d'enzymes impliqués pour les mêmes conditions initiales que pour la figure 2.10 ci-dessus ( $[E]_0 = 2.10^{-9} \text{ mol.m}^{-2}$ ). (a)  $C_0 = 2$  mM, 0.2 mM et 0.02 mM. (b) Agrandissement pour les plus faibles valeurs de  $C_0$  : 0.2 mM, 0.02 mM et 0.002 mM.

La figure 2.12 ci-dessous correspond à l'évolution sur quelques secondes (a) et quelques minutes (b) correspondant à la figure 2.6. On vérifie qu'à partir de  $t = 10$ s, la quantité d'enzymes participant à la réaction est la même quelle que soit la densité d'accrochage, comme nous l'avions suggéré auparavant.

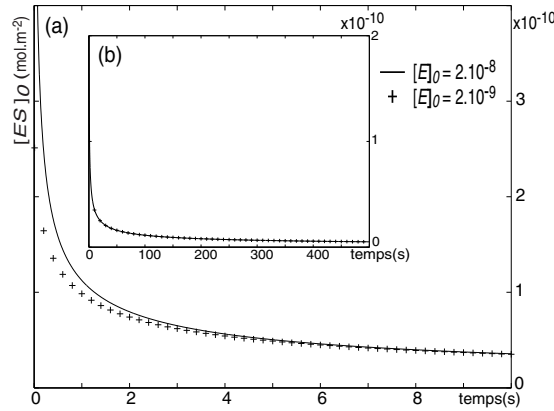


FIG. 2.12 – Influence de la densité d'enzymes à la surface ( $[E]_0 = 2.10^{-9}$  mol.m<sup>-2</sup> et  $[E]_0 = 2.10^{-8}$  mol.m<sup>-2</sup>, pour  $C_0 = 0.02$ mM) sur les évolutions temporelles calculées sur (a) 10 s et (b) 500 s.

#### d. Bilan des simulations

Il n'est pas équivalent de faire varier la densité d'enzymes accrochés et la quantité de substrat. En effet,  $[E]_0$  n'intervient que dans la condition au bord (système d'équations 2.17), alors que  $s$  intervient aussi dans l'équation de volume. Dit autrement, puisqu'une seule des deux espèces considérées diffuse, leurs rôles ne sont pas symétriques et les variations de ces deux paramètres ( $[E]_0$  et  $C_0$ ) n'induisent pas les mêmes effets.

Au regard de la réaction enzymatique, l'augmentation des deux quantités  $[E]_0$  et  $C_0$ , tend à accélérer la cinétique. En revanche, la limitation par la diffusion est d'autant plus importante et influence d'autant plus tôt la cinétique, que la densité d'accrochage est grande et  $C_0$  faible. Les variations des valeurs de ces deux paramètres agissent, cette fois en sens inverse.

Nous essayons, par l'intermédiaire d'un nombre sans dimension noté  $\mu_{N.S.}$ , de déterminer le jeu de paramètres optimal.  $\mu_{N.S.}$  est construit de façon analogue au paramètre  $\mu$  introduit dans le cas stationnaire. Cette quantité compare donc une vitesse enzymatique (caractérisée par la constante de vitesse  $k_{enz}$  et fonction de la quantité d'enzymes  $[E]_0$ ), à  $k_D$ , caractéristique de la diffusion :

$$\mu_{N.S.} = \frac{k_{enz} ([E]_0)^\alpha}{k_D}, \quad \alpha \text{ dterminer}$$

D'autre part :

- l'influence de la diffusion se fait d'autant plus sentir que la concentration initiale de substrat  $C_0$ , est faible et que la densité d'enzymes accrochés  $[E]_0$  est grande. C'est le rapport  $([E]_0)^\alpha / C_0$  qui interviendra dans  $\mu_{N.S.}$ .
- on prendra en compte la constante de Michaelis de l'enzyme considéré en comparant  $C_0$  à  $K_M$ .

- nous avons dans notre approche, privilégié le rôle du substrat par rapport à celui du produit. Il nous semble donc plus pertinent d'identifier  $k_{enz}$  à  $k_1$ , plutôt qu'à  $k_2$ , pour évaluer une vitesse enzymatique caractéristique du régime non stationnaire. Cela revient à considérer l'étape de formation du complexe enzyme-substrat comme cinétiquement limitante.
- $\mu_{N.S.}$  est censé donner une indication sur le poids de la contribution diffusive à partir des paramètres d'une expérience. Nous évaluons  $k_D$  par  $D_s/\varepsilon$  : c'est le temps de diffusion sur une couche de même épaisseur que la couche protéique. En effet, les effets de diffusion deviendront pénalisants quand  $\varepsilon$  sera négligeable devant la taille de la couche de diffusion.

On aboutit à :

$$\mu_{N.S.} = \frac{k_1 ([E]_0)^\alpha}{(D_s/\varepsilon) (C_0/K_M)}$$

ce qui amène à poser  $\alpha = 0.5$  et

$$\mu_{N.S.} = \frac{k_1 \sqrt{[E]_0}}{(D_s/\varepsilon) (C_0/K_M)} \quad (2.19)$$

Ce nombre vaut 1 pour  $C_0 = 20 K_M$  et  $[E]_0 = 4.10^{-10} \text{ mol.m}^{-2}$ , soit une couche « diluée » 100 fois par rapport la densité maximale évaluée pour la PGK (voir *Ordres de grandeur pour la PGK*). Nous donnons dans le tableau ci-dessous quelques valeurs du paramètre  $\mu_{N.S.}$ , correspondant à certaines des simulations présentées.

$[E]_0$ $C_0$	$4.10^{-9} \text{ mol.m}^{-2}$	$4.10^{-8} \text{ mol.m}^{-2}$
$20 K_M$ (2mM)	$10^{0.5}$	10
$0.2 K_M$ ( $2.10^{-2}$ mM)	$10^{2.5}$	$10^3$

Dans toutes les simulations présentées, nous nous sommes placés, au regard du paramètre  $\mu_{N.S.}$  construit, dans des configurations telles que la diffusion soit limitante ( $\mu_{N.S.} \gg 1$ ). Nous verrons que, dans le cas des mesures expérimentales réalisées avec la PGK, on déduit une densité d'enzymes accrochés qui conduit à  $\mu_{N.S.} \ll 1$  : on pourra négliger la diffusion.

Toutes les autres grandeurs étant fixées, on choisit  $[E]_0$  et  $C_0$  de façon à augmenter le rendement de la couche d'enzymes accrochés, en restant dans un régime où la diffusion ne devient pas limitante.

## 2.2 Contribution électrostatique

Cette partie, largement inspirée des articles de Shuler *et al.* [37], Hamilton *et al.* [38] et Shirai-shi [39], présente la contribution d'un potentiel électrostatique à la cinétique enzymatique en régime stationnaire. Cet état de l'art pourra ensuite servir de point de départ à des simulations numériques dans la continuité de celles déjà présentées, et aider à la modélisation des expériences de plasmons de surface.

Après quelques rappels d'électrostatique, nous verrons comment est modifiée l'équation (eq. 2.7) de la vitesse de la réaction enzymatique lorsque les substrats sont des espèces chargées se déplaçant dans un potentiel électrostatique. Nous évoquerons ensuite quelques conséquences de l'existence d'un champ électrique sur la répartition en solution des espèces chargées non réactives.

### 2.2.1 Modèle classique de la double couche électrique

#### a. L'équation de Poisson-Boltzmann

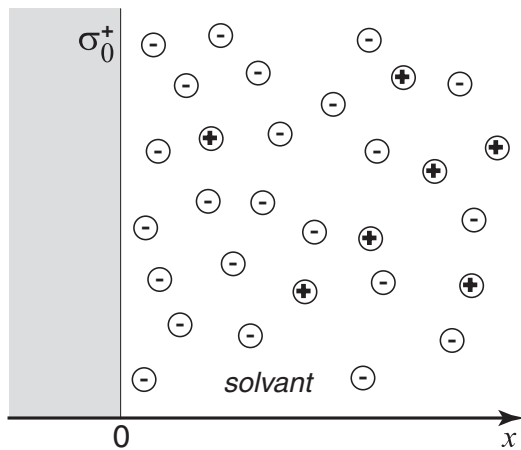


FIG. 2.13 – Distribution schématique des ions au voisinage d'une surface uniformément chargée.

Considérons une surface plane et présentant une densité surfacique de charge uniforme et positive  $\sigma_0^+$  en regard d'une solution électrolytique. On cherche à connaître les profils des concentrations ioniques molaires et du potentiel électrostatique dans la solution.

L'équation de Poisson-Boltzmann résulte de la combinaison de l'équation de Poisson portant sur  $\psi$  :

$$\nabla^2 \psi = -\frac{\rho}{\varepsilon_0 \varepsilon_r} \quad \text{o} \quad \rho = \sum_i C_i z_i \mathcal{F} \quad (2.20)$$

et de l'hypothèse selon laquelle la répartition des ions déterminant la densité de charge, dans ce potentiel  $\psi$ , obéit à une statistique de Boltzmann :

$$C_i(x) = C_i^\infty \exp\left(\frac{-z_i \mathcal{F} \psi(x)}{RT}\right) \quad (2.21)$$

les notations utilisées dans cette partie sont :

$\psi(x)$  : le potentiel électrostatique

$\rho$  : la densité volumique de charge

$\varepsilon_0$  : la permittivité du vide

$\varepsilon_r$  : la constante diélectrique du solvant

$C_i(x)$  : la concentration molaire des ions de l'espèce  $i$

$z_i$  : le nombre de charge (algébrique) de l'ion  $i$  :  $z_{cation} > 0$  et  $z_{anion} < 0$

$e$  : la charge élémentaire

$\mathcal{F} = \mathcal{N}_A e$  : la constante de Faraday ( $\mathcal{N}_A$  est le nombre d'Avogadro et  $e$  la charge élémentaire)

$R$  : la constante des gaz parfaits

$T$  : la température

$\sigma_0$  : la densité surfacique de charge, supposée uniforme

$\kappa^{-1}$  : la longueur de Debye, définie par l'équation (eq. 1.21)

$\lambda$  : le potentiel de surface adimensionné ( $z \mathcal{F} \psi(0)/RT$ )

$\vec{\nabla}$  désigne l'opérateur Nabla,  $\nabla^2$  le Laplacien

Précisons par ailleurs le cadre du modèle présenté ici :

- on considère les ions comme ponctuels
- seules les interactions électrostatiques sont prises en compte
- le solvant est considéré comme un milieu continu de constante diélectrique uniforme
- la description résulte d'une approximation de champ moyen : chaque ion n'interagit avec ses voisins que par l'intermédiaire du potentiel électrostatique global qu'ils créent.

Ainsi, pour le problème à une dimension considéré ici (du fait de l'invariance par translation selon les deux autres directions de l'espace), l'équation de Poisson-Boltzmann, notée P.B., s'écrit :

$$\boxed{\frac{d^2\psi}{dx^2} = \frac{-\mathcal{F}}{\varepsilon_0\varepsilon_r} \sum_i C_i^\infty z_i \exp\left(\frac{-z_i \mathcal{F} \psi}{RT}\right)} \quad (2.22)$$

avec les conditions aux limites :

$$\lim_{x \rightarrow \infty} C_i = C_i^\infty \quad (2.23)$$

$$\lim_{x \rightarrow \infty} \psi(x) = 0 \quad (2.24)$$

Le théorème de Gauss fixe par ailleurs la valeur du champ électrique à la surface :

$$\varepsilon_0 \varepsilon_r \left. \frac{d\psi}{dx} \right|_{x=0} = -\sigma_0 \quad (2.25)$$

### • *L'approximation de Debye-Hückel*

On se place dans la limite des faibles potentiels, c'est-à-dire tels que l'énergie électrostatique soit petite devant  $k_B T$ . Cette condition s'écrit  $\psi \ll RT/z_i \mathcal{F}$ , soit  $\psi(0) \ll 25\text{mV}$  (et  $\lambda \simeq 1$ ) à température ambiante et pour un électrolyte [1 : 1]. On peut alors linéariser et résoudre l'équation P.B. (eq. 2.22) :

$$\psi(x) = \psi(0) e^{-\kappa x} \quad (2.26)$$

où  $\kappa$  est définie par l'équation (eq. 1.21) que nous rappelons ici :

$$\kappa = \sqrt{\frac{2.10^3 \mathcal{F}^2}{\varepsilon_0 \varepsilon_r RT}} \sqrt{I}$$

soit  $\kappa = 3,288 \sqrt{I} \text{ nm}^{-1}$  si on exprime  $I$  en  $\text{mol.L}^{-1}$ .

La constante  $\kappa^{-1}$ , homogène à une longueur, est appelée la longueur de Debye. Elle caractérise la décroissance du potentiel  $\psi$  : à  $4-5 \kappa^{-1}$  de la surface, le potentiel tend vers 0. Les valeurs de potentiels mesurés expérimentalement [40] ne vérifient pas les hypothèses de l'approximation linéaire. Pour la suite de la discussion, nous choisirons des systèmes électrolytiques qui permettent de résoudre analytiquement l'équation de Poisson-Boltzmann. C'est le cas des électrolytes symétriques ( $z : z$ ), et des électrolytes asymétriques les plus simples ( $2 : 1$ ) tel  $\text{CaCl}_2$ , et ( $1 : 2$ ) tel  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (tampon phosphate utilisé dans les expériences).

• *Solutions de l'équation de Poisson-Boltzmann complète*

Posons :

$$y(x) = \frac{\mathcal{F}\psi(x)}{RT}$$

L'équation (eq. 2.22) devient alors :

$$\frac{d^2y}{dx^2} = -K \sum_i C_i^\infty z_i e^{-z_i y(x)} \quad \text{avec} \quad K = \frac{\mathcal{F}^2}{\varepsilon_0 \varepsilon_r RT}$$

En multipliant par  $dy/dx$  et en intégrant une fois, on arrive à :

$$\frac{1}{2} \left( \frac{dy}{dx} \right)^2 = -K \sum_i C_i^\infty \left( 1 - e^{-z_i y(x)} \right) \quad (2.27)$$

Avec les conditions  $dy/dx \rightarrow 0$  et  $y \rightarrow 0$ , quand  $x \rightarrow \infty$ .

Electrolyte symétrique :  $z^+ = -z^- = z$  (ici,  $z$  est positif)

L'équation (2.27) conduit à :

$$\frac{d\psi}{dx} = -\frac{2\kappa RT}{z\mathcal{F}} \text{sh} \left( \frac{z\mathcal{F}\psi}{2RT} \right) \quad (2.28)$$

qui s'intègre en (calcul présenté en annexe) :

$$\psi(x) = \frac{2RT}{z\mathcal{F}} \ln \left( \frac{1 + \gamma e^{-\kappa x}}{1 - \gamma e^{-\kappa x}} \right), \quad \gamma = \text{th} \left( \frac{\lambda}{4} \right) \quad \text{et} \quad \lambda = \frac{z\mathcal{F}\psi_0}{RT} \quad (2.29)$$

$\lambda$  est le potentiel de surface adimensionné et  $\kappa^{-1}$  la longueur de Debye.

Electrolyte asymétrique simple :

Nous présentons les résultats pour l'électrolyte ( $1 : 2$ ) ( $z_{cat.} = +1$  et  $z_{an.} = -2$ ). Le calcul est analogue dans le cas de l'électrolyte ( $2 : 1$ ) ( $z_{cat.} = +2$ ,  $z_{an.} = -1$ ).

L'électroneutralité en volume s'écrit :  $C_1^\infty = 2 C_2^\infty$ .

En posant  $u = e^y$ , l'équation (eq. 2.27) devient :

$$\left( \frac{du}{dx} \right)^2 = 2 K C_2^\infty u (u - 1)^2 (u + 2)$$

soit

$$\frac{du}{(u-1)\sqrt{u(u+2)}} = \sqrt{2K C_2^\infty} dx \quad (2.30)$$

qui s'intègre en :

$$\psi(x) = \frac{RT}{\mathcal{F}} \ln \left( \frac{3}{u_0 \cosh(x \sqrt{6K C_2^\infty}) - 2} + 1 \right) \quad \text{et} \quad u_0 = \frac{3}{\exp\left(\frac{\mathcal{F}\psi(0)}{RT}\right) - 1} + 2 \quad (2.31)$$

### b. Relation entre $\psi(0)$ et $\sigma_0$ .

Des équations (eq. 2.25) et (eq. 2.27) on déduit la relation, valable quel que soit l'électrolyte :

$$\sigma_0^2 = 2 RT \varepsilon_r \varepsilon_0 \sum_i C_i^\infty \left( e^{-z_i y(x)} - 1 \right) \quad (2.32)$$

Electrolyte symétrique :

Dans ce cas, on déduit directement  $\sigma_0$ , des équations (2.25) et (2.28) :

$$\left. \frac{d\psi}{dx} \right|_{x=0} = -\frac{2\kappa RT}{z\mathcal{F}} \text{sh} \left( \frac{z\mathcal{F}\psi(0)}{2RT} \right)$$

donc

$$\sigma_0 = \frac{2\kappa RT \varepsilon_0 \varepsilon_r}{z\mathcal{F}} \text{sh} \left( \frac{\lambda}{2} \right), \quad \lambda = \frac{z\mathcal{F}\psi(0)}{RT} \quad (2.33)$$

En posant

$$\zeta = \frac{\mathcal{F} z \sigma_0}{2 \varepsilon_r \varepsilon_0 RT} = \kappa \text{sh} \left( \frac{\lambda}{2} \right)$$

on peut exprimer  $\lambda$  de façon explicite pour une densité surfacique de charge  $\sigma_0$  donnée :

$$\lambda = 2 \text{Arcsh} \left( \frac{\zeta}{\kappa} \right) = 2 \ln \left( \frac{\zeta}{\kappa} + \left[ 1 + \left( \frac{\zeta}{\kappa} \right)^2 \right]^{\frac{1}{2}} \right) \quad (2.34)$$

Electrolyte asymétrique :

Dans le cas de l'électrolyte (1 : 2),  $C_{\text{cation}}^\infty = 2 C_{\text{anion}}^\infty = 2 C^\infty$ , l'équation (2.32) devient :

$$\sigma_0^2 = 2 \varepsilon_r \varepsilon_0 RT C^\infty (e^{2y} + 2e^{-y} - 3) \quad (2.35)$$

$$e^{2y} + 2e^{-y} - 3 = (e^y - 1)^2 (1 + 2e^{-y})$$

En posant  $X = e^y$ , on obtient un polynôme à coefficients réels de degré 3 qui admet au moins une racine réelle. Les formules de Cardan [41] fournissent l'expression exacte des solutions.



## 2.2.2 Modification des équations du régime diffusif stationnaire. Equation de Nernst-Planck

### a. Hypothèses

Dans toute la suite :

- nous supposons les solutions suffisamment diluées pour identifier activités et concentrations.
- nous supposons que les enzymes accrochés contribuent de façon uniforme à la charge de surface  $\sigma_0$ . Cette approximation permet d'utiliser les résultats présentés sur la double couche électrique, sans entrer dans une description très détaillée des modifications locales du champ induites par la présence de ces macromolécules chargées.
- nous négligerons toute perturbation du potentiel  $\psi$  due au mouvement des substrats et produits de l'enzyme. Autrement dit, on considère que ces ions se déplacent dans un potentiel  $\psi$  statique, et on néglige leur contribution à ce potentiel. Cette hypothèse peut se justifier par les concentrations en espèces réactives impliquées : de l'ordre de quelques mM pour des concentrations de sel allant de 20 à 100mM environ. Néanmoins, lorsque l'on introduit des anions plus chargés, comme c'est le cas dans les expériences de SPR, il semblerait que ceux-ci aient tendance à remplacer ceux qui constituaient la couche de Debye auparavant. Ce phénomène semble réversible, d'après la réponse plasmon lors du rinçage par le tampon présent initialement.

### b. Equation de Nernst-Planck et résolution

On conserve les notations introduites précédemment, et on définit le potentiel électrochimique  $\bar{\mu}_i$  :

$$\bar{\mu}_i = \mu_i + z_i \mathcal{F}\psi = \mu_i^0 + RT \ln C_i + z_i \mathcal{F}\psi$$

$\mu_i^0$  est le potentiel chimique standard d'une mole d'ions  $i$  en solution, fonction uniquement de la température.

On définit pour l'espèce  $i$ , un flux particulaire généralisé  $\vec{J}_i$  généré par l'existence d'un gradient de potentiel électrochimique [18] :

$$\vec{J}_i = -\frac{D_i}{RT} C_i \vec{\nabla} \bar{\mu}_i \quad (2.36)$$

Montrons que l'on retrouve l'expression du flux particulaire défini selon (2.2) dans le cas où  $\psi = 0$ .

$$\begin{aligned} \vec{\nabla} \ln C_i &= \frac{1}{C_i} \vec{\nabla} C_i \\ \vec{J}_i &= -\left( D_i \vec{\nabla} C_i + \frac{\mathcal{F}}{RT} D_i z_i C_i \vec{\nabla} \psi \right) \end{aligned} \quad (2.37)$$

C'est l'équation de Nernst-Planck dont le premier terme correspond à celui fourni par la loi de Fick (eq. 2.2), et le second donne la contribution du champ électrique existant dans la solution électrolytique.

En l'appliquant au substrat de concentration  $s$ , de charge algébrique  $z$  et de coefficient de diffusion  $D_s$  :

$$\vec{J}_s = - \left( D_s \vec{\nabla} s + \frac{\mathcal{F}}{RT} D_s z s \vec{\nabla} \psi \right) \quad (2.38)$$

L'hypothèse de stationnarité du système et l'équation (eq. 2.3) impliquent que le flux  $J_s$  soit une constante dans le temps et dans l'espace. Pour l'exprimer, on multiplie l'équation (eq. 2.38) par  $D_s^{-1} \exp\left(\frac{\lambda \psi(x)}{\psi(0)}\right)$  et on obtient une expression aisément intégrable qui conduit, avec les notations de la section 2.1, à :

$$J_s = -M k_D (s_b - s_0 e^\lambda) \quad \text{avec} \quad M^{-1} = \frac{1}{\delta} \int_0^\delta \exp\left(\lambda \frac{\psi(x)}{\psi(0)}\right) dx \quad (2.39)$$

On retrouve bien entendu l'expression (2.6) du flux stationnaire lorsque le champ est nul : dans ce cas,  $M$  et  $e^\lambda$  valent 1.

### **Expression de $M$**

Nous nous plaçons dans le cas d'un électrolyte symétrique ( $z : z$ ) et avec un substrat portant une charge  $\pm z$ . Nous nous contenterons ici du cadre particulier de ces hypothèses pour illustrer notre propos. Le calcul exact reste possible du moment qu'il existe une expression analytique du potentiel, mais est moins immédiat.

Remplaçons  $\psi(x)$  par sa valeur dans l'expression (eq. 2.39)<sup>3</sup> :

$$M^{-1} = \frac{1}{\delta} \int_0^\delta \left( \frac{1 + \gamma e^{-\kappa x}}{1 - \gamma e^{-\kappa x}} \right)^2 dx = \frac{1}{\delta} \int_0^\delta \left( 1 + \frac{2\gamma e^{-\kappa x}}{1 - \gamma e^{-\kappa x}} \right)^2 dx$$

soit

$$M^{-1} = 1 + \frac{4}{\kappa \delta} \int_0^\delta \frac{du}{u^2} \quad \text{avec} \quad u = 1 - \gamma e^{-\kappa x}$$

$$M^{-1} = 1 + \frac{4}{\kappa \delta} \left[ \frac{1}{1 - \gamma} - \frac{1}{1 - \gamma e^{-\kappa \delta}} \right] = 1 + \frac{2(e^{\lambda/2} - 1)}{\kappa \delta} \left[ \frac{1 - e^{-\kappa \delta}}{1 - e^{-\kappa \delta} \text{th}(\lambda/4)} \right] \quad (2.40)$$

Cette expression se simplifie pour les grandes valeurs de  $\kappa \delta$ , ce qui est le cas en pratique, ce facteur valant 200 pour  $\kappa^{-1} = 5 \text{ nm}$  et  $\delta = 1 \mu\text{m}$  (ordres de grandeur considérés dans la section 2.1)) :

$$M^{-1} = 1 + \frac{2(e^{\lambda/2} - 1)}{\kappa \delta} \quad (2.41)$$

Dans le cas où la surface et les espèces réactives présentent des charges opposées,  $\lambda$  est négatif et  $e^{\lambda/2} < 1 \ll \kappa \delta$ ;  $M$  vaut 1 quelle que soit la forme du potentiel considérée. Nous n'envisagerons que le cas  $\lambda < 0$ , mais pour  $\lambda > 0$ ,  $e^{\lambda/2}$  peut prendre des valeurs grandes devant  $\kappa \delta$ ; la valeur de  $M$  dépend alors de l'expression de  $\lambda$  donc de  $\psi(0)$ .

---

<sup>3</sup>si la charge du substrat est différente de celle des ions fixant le potentiel, la fonction à intégrer est à la puissance  $\alpha = 2z_s/z$  au lieu de 2

Signalons que la résolution de l'équation de Nernst-Planck (2.37) présentée ici n'est pas généralisable à tous les systèmes présentant des gradients de potentiel et de concentration. Une telle approche modélise mal, par exemple, les phénomènes de transport à travers les membranes biologiques<sup>4</sup>. En revanche, des simulations numériques [43], conduites sur la base du modèle présenté ici et développé dans la partie suivante, sont en bon accord avec les résultats expérimentaux concernant les cinétiques d'enzymes accrochés.

### c. Conséquences sur la cinétique de la réaction enzymatique

Comme en section 2.1, le flux particulaire de substrats en régime stationnaire va alimenter la réaction enzymatique :  $|J_s| = v$ , ce qui s'écrit aussi :

$$M k_D (s_b - s_0 e^\lambda) = \frac{v_{max} s_0}{K_M + s_0} \quad (2.42)$$

soit :

$$M k_D s_b \left(1 - \frac{s_0}{s_b} e^\lambda\right) = s_0 \frac{v_{max}}{K_M} \left(1 + \frac{s_0}{K_M}\right)^{-1}$$

Introduisons les grandeurs adimensionnées suivantes :

$$\boxed{\mu = \frac{v_{max}}{M k_D K_M} \quad \beta_b = \frac{s_b}{K_M} \quad \varsigma = \frac{s_0}{s_b}}$$

Le paramètre  $\mu$  compare, de façon analogue au cas où seule la diffusion était considérée, la vitesse maximale qu'est susceptible d'atteindre la réaction enzymatique, au flux l'alimentant. La présence d'un champ électrique se retrouve alors dans le facteur  $M$ .  $\beta_b$  compare la concentration de substrat en volume à la constante de Michaelis  $K_M$ . Enfin,  $\varsigma$  va mesurer, pour la concentration du substrat, l'écart à la situation en volume.

L'équation (2.42) devient :

$$(1 - \varsigma e^\lambda)(\beta_b \varsigma + 1) = \mu \varsigma \quad (2.43)$$

On définit le facteur d'efficacité  $\eta$ , comme la grandeur sans dimension rapportant la vitesse de réaction observée lorsque l'enzyme est accroché, à la vitesse donnée par l'équation de Michaelis-Menten (eq. 1.11) pour l'enzyme libre :

$$v = \eta \frac{v_{max} s_b}{K_M + s_b} \quad \text{ou} \quad v = v_{max} \frac{\eta \beta_b}{1 + \beta_b} \quad (2.44)$$

On peut donc écrire :

$$M k_D s_b \left(1 - \frac{s_0}{s_b} e^\lambda\right) = \eta s_b \frac{v_{max}}{K_M} \left(1 + \frac{s_b}{K_M}\right)^{-1} \quad \text{ou} \quad (1 - \varsigma e^\lambda)(\beta_b + 1) = \mu \eta \quad (2.45)$$

---

<sup>4</sup>voir les travaux de M. Kato [42] pour une discussion approfondie du sujet, en particulier sur les domaines de validité des hypothèses permettant la résolution dans chaque cas.

En éliminant  $\varsigma$  entre les équations (2.43) et (2.45), on obtient une équation du second degré en  $\eta$  :

$$\beta_b \eta^2 - \eta (\beta_b + \mu + e^\lambda) \left( \frac{1 + \beta_b}{\mu} \right) + \frac{(1 + \beta_b)^2}{\mu} = 0 \quad \text{note} \quad \eta^2 - S \eta + P \quad (2.46)$$

Le produit des racines valant  $(1 + \nu)^2 / \beta_b \mu$  et  $\beta_b \mu$  étant positif (comme l'assure l'expression de  $M^{-1}$  (eq. 2.39)), les deux racines réelles, si elles existent, sont de même signe. Leur somme  $S$  étant positive, elles seraient toutes les deux positives. Nous prendrons la plus petite des deux racines, quitte à sous-estimer la vitesse réelle de réaction. Reste à vérifier que le déterminant est positif, ce qui se ramène à l'étude du signe de :

$$(\beta_b + \mu + e^\lambda)^2 - 4\beta_b \mu = (\beta_b - \mu)^2 + e^\lambda (e^\lambda + 2\mu + 2\beta_b) > 0$$

On trouve donc :

$$\eta = \frac{1 + \beta_b}{2\beta_b \mu} \left\{ (\beta_b + \mu + e^\lambda) - [(\beta_b + \mu + e^\lambda)^2 - 4\beta_b \mu]^{1/2} \right\}$$

En posant :

$$\nu = \beta_b + \mu + e^\lambda \quad \text{et} \quad \varpi = \nu^2 - 4\beta_b \mu$$

l'expression de  $\eta$  devient :

$$\boxed{\eta = \frac{(1 + \beta_b)(\nu - \sqrt{\varpi})}{2\beta_b \mu}} \quad (2.47)$$

ou, en utilisant le produit des racines :

$$\eta = 2 \frac{1 + \beta_b}{\nu + \sqrt{\varpi}} \quad (2.48)$$

*Nous envisagerons uniquement le cas où le champ électrique aura tendance à accélérer la réaction, c'est-à-dire lorsque la surface et le(s) substrat(s) portent des charges opposées ( $\lambda < 0$ ).*

Il est intéressant d'examiner le cas limite où  $e^\lambda \rightarrow 0$ , car pour des potentiels de surface positifs de l'ordre de 150mV, contrebalancés par des ions divalents ( $z^- = -2$ ),  $\lambda$  vaut -11 et  $e^\lambda$  environ  $10^{-5}$  [37].

Quand  $e^\lambda \rightarrow 0$ , l'expression (2.48) de  $\eta$  se simplifie car :

$$\begin{aligned} \nu &\longrightarrow \beta_b + \mu \\ \varpi &\longrightarrow (\beta_b - \mu)^2 \end{aligned}$$

\* si  $\mu/\beta_b < 1$ , c'est la réaction qui impose la cinétique

$$\eta \longrightarrow \frac{1 + \beta_b}{\beta_b} \quad (2.49)$$

En reportant dans l'équation (2.44), on se rend compte que lorsque  $e^\lambda \longrightarrow 0$  et  $\mu/\beta_b < 1$ , la vitesse de réaction dépend uniquement des caractéristiques propres de l'enzyme (ici  $k_2$ ) et de la densité surfacique d'enzymes accrochés :  $v = v_{max} = k_2 [E]_0$ . Cette cinétique correspond à celle observée en volume lorsque  $[S] \gg K_M$  (figure 2.2).

\* si  $\mu/\beta_b > 1$ , c'est la diffusion qui impose la cinétique

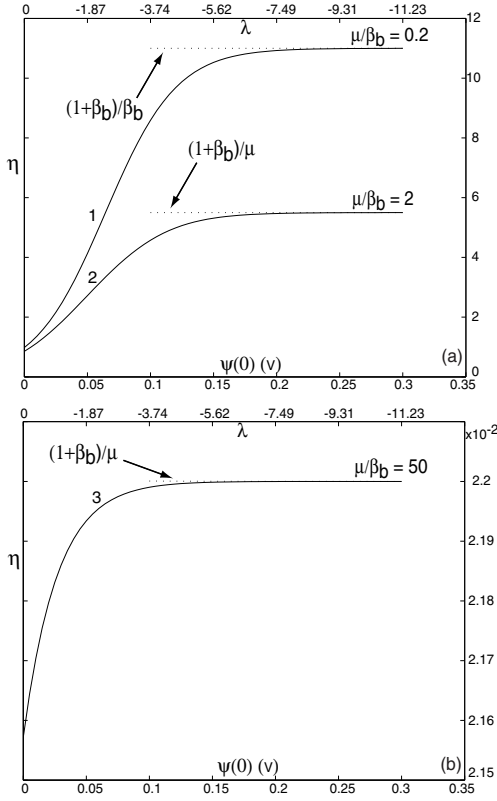
$$\eta \longrightarrow \frac{1 + \beta_b}{\mu} \quad \text{et} \quad v = v_{max} \frac{\beta_b}{\mu} = M k_D s_b \quad (2.50)$$

D'après l'expression de  $M$  (eq. 2.41),  $M \longrightarrow 1$  quand  $e^\lambda \longrightarrow 0$  et  $\kappa \delta \gg 1$ . La vitesse de la réaction est proportionnelle à  $s_b$  et imposée par la constante de diffusion  $k_D$ . L'effet du champ ( $\lambda < 0$ ) ne suffit plus à assurer le flux de substrats nécessaire pour que l'activité enzymatique soit maximale.

A la limite où  $e^\lambda \longrightarrow 0$ ,  $\mu = \beta_b$  (avec  $\beta_b = s_b/K_M$ ), marque la frontière entre les domaines où le transport est limitant ( $\mu/\beta_b > 1$ ) et où la réaction enzymatique est limitante ( $\mu/\beta_b < 1$ ). On retrouve un paramètre analogue à celui déjà utilisé dans l'étude de la diffusion seule si ce n'est qu'ici, on le compare à  $\beta_b$  et non plus à 1. Les deux situations ne sont identiques de ce point de vue que si  $s_b = K_M$ .

• *Evolution du facteur d'efficacité  $\eta$*

*en fonction du potentiel de surface  $\psi_0$*



Les courbes ci-contre sont obtenues d'après les équations (eq. 2.41) pour  $M$ , (eq. 2.47) ou (eq. 2.48) pour  $\eta$ , et les valeurs des paramètres :

$$T=300 \text{ K}$$

$$k_D = 10^{-4} \text{ m.s}^{-1}(1), 10^{-5} \text{ m.s}^{-1}(2), 4.10^{-7} \text{ m.s}^{-1}(3)$$

$$\kappa \delta = 10^4(1), 10^5(2), 25.10^5(3),$$

$$z = -1$$

$$\varepsilon_r = 80$$

$$s_b = 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$$

$$K_M = 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}, \text{ donc } \beta_b = 0.1$$

$$v_{max} = 2.10^{-7} \text{ mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$$

$$(k_2 = 10^3 \text{ s}^{-1} \text{ et } [E]_0 = 2.10^{-10} \text{ mol.m}^{-2})$$

Nous avons fait apparaître la double graduation en potentiel de surface  $\psi_0$  (échelle du bas) et en potentiel adimensionné  $\lambda$  (échelle du haut), ainsi que les valeurs-limites de  $\eta$  pour  $\lambda \rightarrow -\infty$ , données par les équations (eq. 2.49) ou (eq. 2.50) selon la valeur de  $\mu/\beta_b$ .

Les courbes, correspondant au régime stationnaire sans la contribution électrostatique et pour les mêmes valeurs de  $\mu$ , sont reportées sur la figure 2.15.

FIG. 2.14 – Evolution de  $\eta$  en fonction du potentiel  $\psi_0$ , pour  $\mu/\beta_b = 0.2$  (1), 2 (2) et 50 (3).

Quelle que soit la valeur du paramètre  $\mu/\beta_b$ , le facteur d'efficacité donc la vitesse de la réaction, augmente avec la force d'interaction électrostatique, c'est-à-dire quand  $\psi_0$  augmente (fig.2.14).

On note cependant que la valeur limite aux forts potentiels (figure 2.14) est d'autant plus faible que  $\mu$  est grand, c'est-à-dire que la vitesse de transport est faible ( $v_{max}$  et  $k_D$  sont maintenues constantes). Cette limite devient même inférieure à 1 dans le cas (3).

$$\lim_{e^{\lambda} \rightarrow 0} \eta_{(1)} > \lim_{e^{\lambda} \rightarrow 0} \eta_{(2)} > \lim_{e^{\lambda} \rightarrow 0} \eta_{(3)}$$

Dans cette limite, nous avons déjà vu que  $M \rightarrow 1$  et que l'expression de  $\mu$  se ramène à celle du cas où seule la diffusion était prise en compte. Plus la diffusion est lente ( $\mu$  grand) et moins les forces attractives entre la surface et le substrat parviennent à contrebalancer cet effet et à accélérer la réaction.

Précisons ce que signifie cette « accélération » de la cinétique : à la même concentration  $s_b$  de substrat en volume, correspond une vitesse plus grande dans le cas de l'enzyme accroché que dans le cas de l'enzyme libre. Ceci n'est possible que pour des valeurs de  $\beta_b$  inférieures à quelques unités. En effet, si  $s_b \gg K_M$  la vitesse correspondante en volume est proche de  $v_{max}$ . Les avantages liés à la présence d'un champ électrique sont moins perceptibles et  $\eta$  ne pourra pas prendre des valeurs très supérieures à 1. Les vitesses observées sur le système d'enzymes accrochés sont similaires à celles obtenues en volume.

On n'obtiendra des valeurs de  $\eta$  supérieures à 1, que pour des concentrations  $s_b$  ne permettant pas, en volume, d'atteindre  $v_{max}$ . Le champ électrique va permettre d'avoir une concentration de substrat  $s_0$  près de la surface, supérieure à celle du volume  $s_b$ . La vitesse est plus grande qu'attendue, et  $\eta > 1$ .

Nous avons ici fait varier l'épaisseur  $\delta$  de la couche de diffusion, en maintenant  $\beta_b$  constant. Les différentes courbes de la figure 2.14 représentent donc l'évolution du facteur d'efficacité en fonction du potentiel de surface pour des effets diffusifs plus ou moins importants. Ceux-ci sont volontairement mis en relief de façon artificielle pour aider la compréhension du phénomène. Ainsi, à  $\beta_b$  fixé, on n'observe une vitesse de réaction supérieure à celle de la réaction en volume ( $\eta > 1$ ), que lorsque  $\mu$  est suffisamment faible (fig. 2.14(a)). Nous rappelons sur la figure 2.15 ci-après, les résultats du régime stationnaire en présence de la diffusion seule, pour les valeurs de  $\mu = v_{max}/(k_D K_M)$  choisies. L'évaluation des constantes cinétiques apparentes en présence d'un champ électrique, et de  $K_M^{app}$  en particulier, est largement détaillée plus loin.

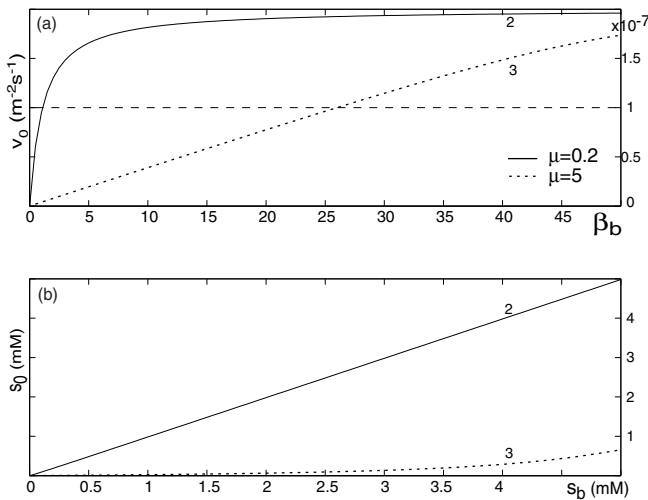


FIG. 2.15 – Tracés de  $v = f(\beta_b)$  (a) et  $s_0 = f(s_b)$  (b), en régime stationnaire et en présence de la diffusion seule.

Ci-contre, la vitesse de la réaction est représentée en fonction de  $\beta_b$  pour  $\mu = 0.2$  et  $\mu = 5$  qui correspondent aux courbes (2) et (3) de la figure précédente (fig. 2.14). Les tracés se rapportant à la courbe (1, (fig. 2.14),  $\mu = 0.02$ ) se superposent aux tracés notés (2) de la figure ci-contre. Pour  $\mu < 1$ , la diffusion est suffisamment rapide pour que l'on retrouve les comportements observés en volume.

Dans toute la suite, on garde constantes :

- l'épaisseur  $\delta$  de la couche de diffusion, donc  $k_D = D_s/\delta$
- la densité d'enzymes accrochés, donc  $v_{max} = k_2[E]_0$

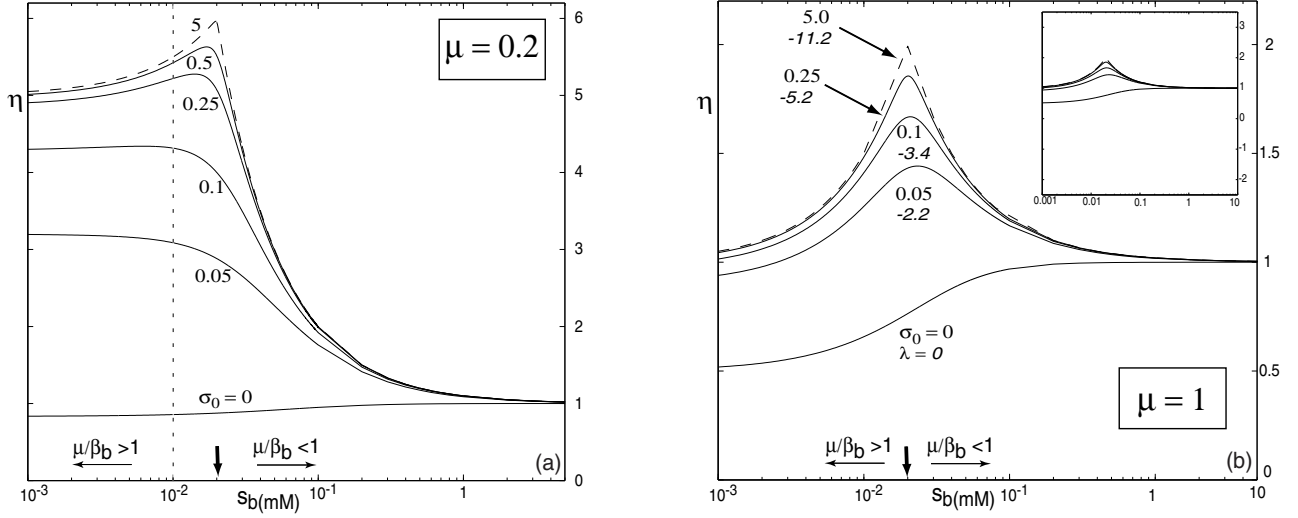


FIG. 2.16 – Tracés  $\eta = f(s_b)$  pour  $T=300\text{ K}$ ,  $k_D=10^{-5}\text{ m.s}^{-1}$ ,  $\kappa\delta=10^5$ ,  $z=-1$ ,  $v_{max}=2.10^{-7}\text{ mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . (a)  $K_M=10^{-4}\text{ mol.L}^{-1}$  ( $\mu=0.2$ ) et (b)  $K_M=2.10^{-5}\text{ mol.L}^{-1}$  ( $\mu=1$ ).  $\lambda$  est calculé à partir de  $\sigma_0$  d'après la formule (eq. 2.34). La droite verticale en pointillés (a) matérialise les conditions pour lesquelles était tracé le graphe (2) de la figure 2.14. Les échelles du graphe (a) et de l'encart du graphe (b) sont identiques, l'ordonnée du graphe (b) principal est dilatée d'un facteur 3.

Les deux figures 2.16(a) et 2.16(b) donnent l'évolution de  $\eta$  en fonction de  $s_b$ , pour différentes valeurs de  $\lambda$  et pour deux valeurs de  $K_M$ . On illustre ainsi les différences de comportements de deux enzymes pour lesquelles on aurait la même densité d'accrochage et la même valeur de  $k_{cat}$ . On remarque que :

- $\eta(\mu = 0.2) > \eta(\mu = 1)$  sur toute la gamme des valeurs de  $s_b$ , donc de  $\beta_b$  envisagée.
- lorsque  $\beta_b \gg \mu$  et  $\beta_b \gg 1$  (i.e.  $s_b \gg K_M$ ),  $\eta \rightarrow 1$ . Comme  $\lambda < 0$ ,  $e^\lambda < 1$  et on obtient cette valeur-limite grâce à l'expression (eq. 2.47) de  $\eta$ . On retrouve une cinétique michaélienne de volume pour des concentrations  $s_b$  élevées.
- La diminution de  $\eta$  (pour les faibles valeurs de  $s_b$ ) est d'autant plus prononcée que  $\sigma_0$  est élevée et que  $K_M$  est faible. En effet, un enzyme plus spécifique vis-à-vis de son substrat, c'est-à-dire dont le  $K_M$  est plus petit, sera plus contraint par la diffusion.  $k_D$  et  $v_{max}$  étant identiques dans les deux cas, la valeur de  $\mu = v_{max}/(k_D K_M)$  pour l'enzyme le plus spécifique est plus élevée. D'après l'étude de la figure 2.14, l'accélération attribuable au champ électrique est moindre et s'estompe rapidement quand  $s_b$  diminue : le maximum est plus marqué (décroissance de  $\eta$  de part et d'autre de cette valeur maximale), mais  $\eta_{max}$  moins élevé. Quand  $K_M$  augmente, toutes choses étant égales par ailleurs,  $\mu$  diminue et l'effet des forces électrostatiques attractives est d'autant plus visible ( $\eta_{max}$  plus élevé).
- dans les deux cas le maximum est obtenu pour  $\mu/\beta_b = 1$



Les différences d'évolution de  $\eta$  en fonction de  $s_b$ , selon que  $\mu/\beta_b$  soit supérieur ou inférieur à 1, ressortent lorsque l'on passe à la limite  $e^\lambda \rightarrow 0$  et sont illustrées sur la figure ci-dessous.

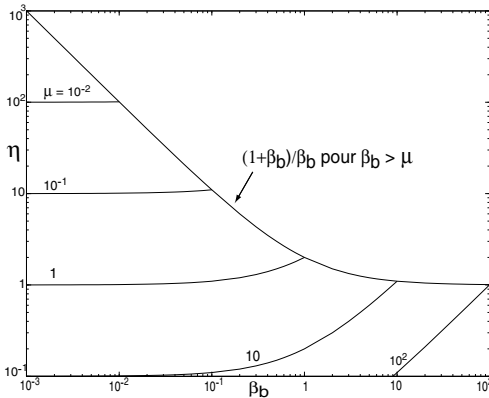


FIG. 2.17 – Tracés  $\eta=f(\beta_b)$  pour différentes valeurs de  $\mu$  et d'après les équations (eq. 2.49) et (eq. 2.50).

Ce réseau de courbes donne accès au comportement limite de  $\eta$  en fonction de  $s_b$  pour un enzyme donné, ou permet de comparer, le cas échéant, plusieurs enzymes grâce aux paramètres  $\mu$  et  $\beta_b$ . En effet, pour un enzyme déterminé, la valeur de  $K_m$  est fixée :  $s_b$  et  $\beta_b$  sont proportionnels.

★ Si  $\beta_b > \mu$ , la réaction est limitante

$\eta = (1 + \beta_b)/\beta_b$  et  $v = v_{max}$ .  $\eta$  est d'autant plus grand, donc la cinétique d'autant plus accélérée par le champ que le substrat fait défaut. En volume, la vitesse serait alors beaucoup plus faible que  $v_{max}$ . Quand  $\beta_b$  augmente, on tend vers un excès de substrat et les deux situations (enzyme libre ou accroché) se rapprochent :  $\eta \rightarrow 1$ .

★ Si  $\beta_b < \mu$ , la diffusion est limitante

L'action du champ est d'autant plus visible que la diffusion est moins contraignante (ou que  $\mu$  est faible). Pour des valeurs de  $\mu$  élevées, l'attraction électrostatique ne parvient plus à compenser le ralentissement é par le transport des espèces et  $\eta$  est inférieur à 1.

### **Conclusions sur le comportement du facteur d'efficacité $\eta$**

Quand on ne tient compte que de la contribution du transport, la cinétique est dictée par la valeur de  $\mu$  par rapport à 1. En revanche, la concentration en substrat devient un paramètre non négligeable en présence d'un champ électrique. Le comportement dépend alors des valeurs relatives de  $\mu$  et  $\beta_b$  (où  $\beta_b = s_b/K_M$ ), comme le résume le schéma ci-dessous.

Si  $\mu > \beta_b$ , la diffusion est limitante quelle que soit la valeur de  $\beta_b$ .

Par contre, lorsque  $\mu < \beta_b$ , deux situations peuvent se présenter selon la valeur de  $\beta_b$ .

- dans le cas où la concentration en substrat  $s_b$  est petite devant  $K_M$  ( $\beta_b \ll 1$ ), la vitesse correspondante pour l'enzyme libre est très différente de  $v_{max}$ . Grâce à l'attraction électrostatique, le substrat se retrouve, près de la surface, à une concentration supérieure à  $s_b$ . Les vitesses de réaction avec l'enzyme accroché sont supérieures à celles que l'on aurait avec l'enzyme libre et  $\eta > 1$ . C'est le régime qualifié d'électrostatique sur le schéma 2.18.

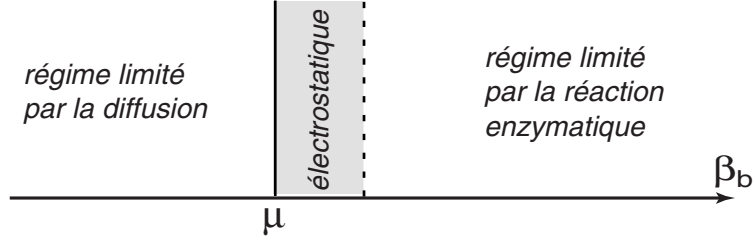


FIG. 2.18 – Régimes cinétiques en présence des contributions électrostatique et de diffusion.

- si  $\beta_b \gg 1$ , les quantités de substrat permettent aux enzymes libres d'atteindre leur vitesse maximale. L'effet du champ est peu perceptible et  $\eta$  ne pourra pas prendre des valeurs très différentes de 1. La vitesse maximale est atteinte dans les deux configurations envisagées pour l'enzyme.

• **Constantes cinétiques apparentes  $v_{max}^{app}$  et  $K_M^{app}$**

Lors de l'étude prenant uniquement en compte les effets de la diffusion, nous avons pu interpréter, sous certaines conditions, la grandeur  $\mu K_M$  comme une constante de Michaelis apparente. On peut, ici encore, donner des expressions pour  $K_M^{app}$  dans les limites  $\beta_b \ll \mu$  ou  $\beta_b \gg \mu$ , à partir de l'expression de  $\eta$  (le détail des calculs est présenté en annexe).

Nous conserverons dans les deux cas, le terme correctif pour souligner sa dépendance en  $s_b$  qui justifie le calcul présenté ensuite. Ce calcul permet d'obtenir des expressions des constantes considérées, valables quelles que soient les concentrations de substrat en volume  $s_b$ .

★ si  $\mu/\beta_b \ll 1 + e^\lambda/\beta_b$ , soit  $\mu \ll \beta_b + e^\lambda$  :

$$\eta \sim \frac{1 + \beta_b}{\beta_b + e^\lambda (1 + \mu/(\beta_b + e^\lambda))} \quad (2.51)$$

En combinant les équations (2.44) de la vitesse et (2.51),

$$v = \eta \frac{v_{max} \beta_b}{\beta_b + 1} = \frac{v_{max}}{1 + e^\lambda/\beta_b (1 + \mu/(\beta_b + e^\lambda))}$$

qui se réécrit :

$$v = v_{max} s_b \left( s_b + K_M e^\lambda \left( 1 + \frac{v_{max}}{M k_D (s_b + K_M e^\lambda)} \right) \right)^{-1} = \frac{v_{max} s_b}{s_b + K_M^{app}} \quad (2.52)$$

Ainsi

$$K_M^{app} = K_M e^\lambda \left( 1 + \frac{\mu}{\beta_b + e^\lambda} \right) \quad (2.53)$$

ou

$$K_M^{app} = K_M e^\lambda \left( 1 + \frac{v_{max}}{M k_D (s_b + K_M e^\lambda)} \right)$$

En négligeant le terme correctif dépendant de  $s_b$  :

$$\boxed{K_M^{app} \sim K_M e^\lambda} \quad (2.54)$$

Lorsque  $e^\lambda \rightarrow 0$ ,  $K_M^{app} \rightarrow 0$  et on retrouve bien, dans l'équation (2.54), le cas limite où la réaction enzymatique impose la vitesse. On atteint alors la vitesse maximale :  $v = v_{max}$ .

★ si  $\mu/\beta_b \gg 1$  et  $e^\lambda \ll \mu - \beta_b$  :

$$\eta \sim \frac{1 + \beta_b}{\mu} \left( 1 - \frac{e^\lambda}{\mu - \beta_b} \right) \quad (2.55)$$

Un calcul analogue au cas où  $\mu \ll \beta_b + e^\lambda$  conduit à une constante de Michaelis apparente qui vaut :

$$K_M^{app} = s_b \left( \frac{1 + \beta_b}{\beta_b \eta} - 1 \right) = \frac{s_b \mu}{\beta_b} \left( 1 - \frac{e^\lambda}{\mu - \beta_b} \right)^{-1} - s_b$$

Or  $e^\lambda \ll \mu - \beta_b$ ,

$$\left( 1 - \frac{e^\lambda}{\mu - \beta_b} \right)^{-1} \sim \left( 1 + \frac{e^\lambda}{\mu - \beta_b} \right)$$

$$K_M^{app} = K_M \left( \mu \left( 1 + \frac{e^\lambda}{\mu - \beta_b} \right) - \beta_b \right) \quad (2.56)$$

ou

$$K_M^{app} = \frac{v_{max}}{M k_D} \left( 1 + \frac{K_M e^\lambda}{(v_{max}/M k_D) - s_b} \right) - s_b$$

Dans le cadre des approximations considérées :

$$\boxed{K_M^{app} \sim \mu K_M} \quad (2.57)$$

et

$$v = \frac{v_{max} s_b}{\mu K_M + s_b} \sim M k_D s_b$$

car  $\mu \gg \beta_b$  et que  $\beta_b = s_b/K_M$ . On retrouve les résultats issus de l'étude de  $\eta$  précédente.

Dans ces deux cas limites,  $K_M^{app}$  est fonction de  $s_b$ . Cette dépendance conduit à des erreurs systématiques dans l'évaluation de  $K_M^{app}$ . Nous allons exposer une méthode, proposée par Shiraishi [39], permettant une évaluation plus rigoureuse de  $K_M^{app}$ , et donnant également accès à  $v_{max}^{app}$ .

Expression générale des constantes apparentes  $K_M^{app}$  et  $v_{max}^{app}$ .

Considérons la fonction  $s_b/v$  de  $s_b$ . D'après l'expression (eq. 2.44) définissant  $\eta$ , on peut écrire :

$$\frac{s_b}{v} = \frac{1}{\eta} \left( \frac{1}{v_{max}} s_b + \frac{K_M}{v_{max}} \right) \quad (2.58)$$

Si  $\eta = 1$ , la fonction est linéaire et on extrait les valeurs de  $K_M$  et  $v_{max}$  de la pente et de l'ordonnée à l'origine de cette droite.

Dans le cas contraire,  $\eta$  est fonction de  $s_b$  et la relation cesse d'être linéaire. En général, les constantes pour les enzymes accrochés sont déterminées à partir des données expérimentales en paramétrant quand même  $s_b/v = f(s_b)$  par une droite. En effet, si la gamme des concentrations explorées est trop restreinte, l'écart à la relation linéaire est faible. En fait, une évaluation plus rigoureuse va consister en une approximation de la courbe considérée par sa tangente en chaque point.

Au point d'abscisse  $s_{b,0}$ , l'équation de la tangente s'écrit :

$$Y = \frac{s_b}{v}(s_{b,0}) + (s_b - s_{b,0}) \left. \frac{d(s_b/v)}{ds_b} \right|_{s_{b,0}} \quad (2.59)$$

En faisant l'hypothèse que cette droite est la même que celle que l'on obtient dans le cas où la relation est linéaire, cela s'écrit aussi :

$$Y = \frac{1}{v_{max,0}^{app}} s_b + \frac{K_{M,0}^{app}}{v_{max,0}^{app}} \quad (2.60)$$

En remplaçant  $\eta$  par sa valeur (donnée par (eq. 2.47)) dans l'équation (eq. 2.58) et en identifiant les deux expressions précédentes, on aboutit à :

$$v_{max,0}^{app} = \gamma_1 v_{max} = \frac{\eta^2}{\eta - (\beta_b + 1) \frac{d\eta}{d\beta_b}} v_{max} \quad (2.61)$$

et

$$K_{M,0}^{app} = \gamma_2 K_M = \frac{\eta + \beta_b (\beta_b + 1) \frac{d\eta}{d\beta_b}}{\eta - (\beta_b + 1) \frac{d\eta}{d\beta_b}} K_M \quad (2.62)$$

avec

$$\frac{d\eta}{d\beta_b} = \frac{1}{2\beta_b^2 \mu} \left( \beta_b (\beta_b + 1) \left( 1 - \frac{\nu - 2\mu}{\sqrt{\varpi}} \right) - \nu + \sqrt{\varpi} \right) \quad (2.63)$$

La figure 2.19(a) permet d'illustrer l'écart entre l'évaluation de la constante de Michaelis apparente  $K_M^{app} = \gamma_2 K_M$  par dérivation de l'expression (eq. 2.58) (courbes 1), et les valeurs obtenues par passage à la limite de  $\eta$  (courbes 2 et 3).

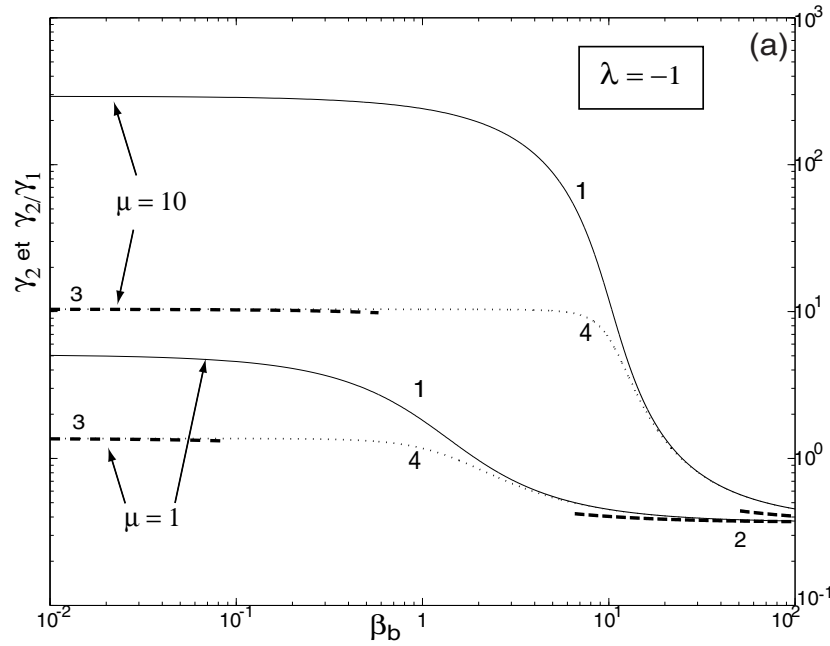


FIG. 2.19 – Comparaison des différentes expressions de  $\gamma_2$  obtenues par (1) dérivation (eq. 2.62) ou par passage à la limite de  $\eta$  pour (2)  $\mu/\beta_b \ll 1$  (eq. 2.53) et (3)  $\mu/\beta_b \gg 1$  (eq. 2.56). (4) Rapport  $\gamma_2/\gamma_1$  calculé à partir des équations (eq. 2.62) et (eq. 2.61).

*Notations relatives à la figure 2.19*

- $\gamma_2^1$  : obtenu par dérivation et représenté par (1)
- $\gamma_2^2$  : correspondant à  $\gamma_2$  évalué dans la limite où la réaction est limitante ( $\mu \ll \beta_b$ ), soit à  $\mu$  fixé, valable pour les grands  $\beta_b$ , et représenté par (2)
- $\gamma_2^3$  : correspondant à  $\gamma_2$  évalué dans la limite où la diffusion est limitante ( $\mu \gg \beta_b$ ), soit à  $\mu$  fixé, valable pour les faibles valeurs de  $\beta_b$ , et représenté par (3)

Pour les deux valeurs de  $\mu$  considérées, le comportement limite pour  $\mu \ll \beta_b$ , donné par  $\gamma_2^2$  (courbe 2) et les valeurs issues du paramétrage de  $s_b/v = f(s_b)$  (courbe 1) coïncident. Par contre, les courbes 1 et 3 ( $\gamma_2^3$  correspond au comportement limite pour  $\mu \gg \beta_b$ ) présentent un écart systématique.

Le rapport  $\gamma_2/\gamma_1$  (courbe 4), évalué grâce au paramétrage de  $s_b/v = f(s_b)$ , permet d'avancer une explication quant à cet écart. Dans les deux cas limites permettant l'évaluation de  $\gamma_2^3$  et  $\gamma_2^2$ ,  $v_{max}^{app} = v_{max}$  et  $\gamma_1$  est donc égal à 1. L'expression de  $\gamma_1$  obtenue par dérivation (eq. 2.61) permet de considérer l'influence de la diffusion et du champ électrique sur  $v_{max}$ .

Quelle que soit la valeur de  $\mu$ , que nous avons fait varier sur plusieurs ordres de grandeur (courbes non représentées), la courbe (4) s'identifie parfaitement à la courbe (3) pour  $\mu/\beta_b \gg 1$ .

L'écart entre les deux expressions de  $\gamma_2$  n'existe plus lorsque  $\mu/\beta_b \ll 1$  parce qu'alors  $\gamma_1 \rightarrow 1$ . En effet, dans cette limite,  $v \rightarrow v_{max}$  donc  $v_{max}^{app} \rightarrow v_{max}$  : les courbes 1 et 4 se confondent pour  $\beta_b \gg \mu$ .

Le calcul conduisant à  $\gamma_2^3$  et  $\gamma_2^2$  inclue implicitement une vitesse maximale apparente, mais sans séparer nettement les  $\gamma$  respectifs des deux constantes cinétiques.

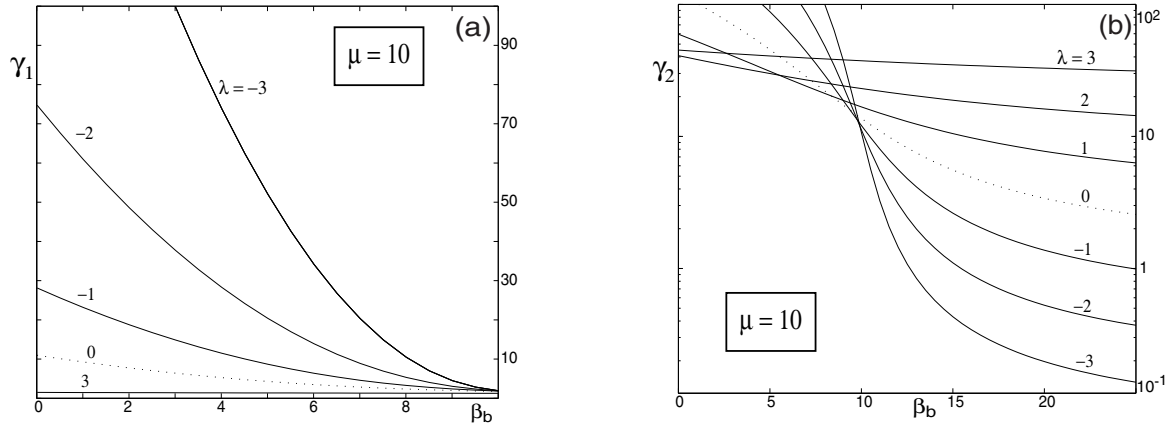


FIG. 2.20 – Tracés de  $\gamma_1$  (a) et  $\gamma_2$  (b), d'après (eq. 2.61) et (eq. 2.62) respectivement.

Les figures 2.20(a) et (b) donnent les évolutions de  $\gamma_1$  et  $\gamma_2$  en fonction de  $\beta_b$  à  $\mu$  fixé et pour différentes valeurs du potentiel de surface adimensionné  $\lambda$ . Comme évoqué précédemment,  $\gamma_1$  est toujours supérieur à 1 quelle que soit la valeur des paramètres  $\mu$  et  $\lambda$  (courbes non présentées). Contrairement au cas de  $\gamma_1$ , nous pouvons donner une justification assez intuitive de l'évolution de  $\gamma_2$  en fonction de  $\beta_b$ .

Si on se place à  $\lambda$  fixé et pour de faibles valeurs de  $\beta_b$  inférieures à  $\mu$ , la diffusion est limitante (figure 2.18). La concentration en substrat près de la surface est inférieure à celle du volume et  $K_M^{app} > K_M$  : de plus grandes concentrations de substrat en volume sont nécessaires pour pouvoir observer la même vitesse de réaction.

Lorsque  $\beta_b$  augmente, l'effet de déplétion s'estompe et l'influence relative du champ électrique s'intensifie : on passe dans le régime « électrostatique » du schéma (fig. 2.18). Si la force électrostatique est attractive ( $\lambda < 0$ ), la concentration de substrat à la surface est supérieure à celle du volume  $s_b$  et  $K_M^{app}$  peut prendre des valeurs inférieures à  $K_M$ . On atteint en effet la vitesse enzymatique maximale pour des valeurs de  $s_b$  plus faibles avec l'enzyme accroché, qu'avec l'enzyme libre.  $K_M^{app}$  est d'autant plus petite que la force est attractive ( $|\lambda|$  augmente). Cette accélération par le champ électrique n'existe bien sûr pas lorsque la force est répulsive ( $\lambda > 0$ ).

Lorsque l'on quitte le régime électrostatique on retrouve une cinétique totalement gouvernée par la réaction enzymatique. La valeur de la constante de Michaelis n'est plus fonction de  $s_b$  comme précédemment, et s'identifie à celle que l'on mesurerait avec l'enzyme libre.

### Conclusion

La constante de Michaelis est une caractéristique incontournable quand on s'intéresse à la cinétique d'un système enzymatique. Cependant, son évaluation, dans le cas d'enzymes accrochés sur une surface chargée, est délicate.

En effet,  $K_M$  n'est plus une constante, et dépend de la concentration en substrat à laquelle sont soumis les enzymes. Ce biais conduit en général à une évaluation erronée de  $K_M$ , car elle est quand même considérée constante lors du paramétrage des données expérimentales. Cette approximation est d'autant plus tentante que le caractère non constant de  $K_M$  peut ne se manifester que sur plusieurs ordres de grandeur en concentration de substrat. Selon les valeurs des paramètres  $\lambda$  et  $\mu$ , l'évolution de  $K_M$  avec  $s_b$  peut être suffisamment lente pour la considérer négligeable.

Nous avons ici rapporté une méthode permettant une évaluation plus rigoureuse de la « constante » de Michaelis.

## 2.2.3 Autres conséquences de l'accrochage

### a. Coefficient de partition des espèces chargées non réactives

Nous nous sommes intéressés dans la partie précédente à l'aspect dynamique des conséquences de l'accrochage, c'est-à-dire aux équations régissant la cinétique de la réaction étudiée. Notre propos était centré sur le substrat, espèce chargée réactive, donc diffusant dans un potentiel  $\psi$ . Nous avons également supposé que les réactifs et produits de la réaction ne sont pas les principales sources du potentiel  $\psi$ , et que l'évolution spatio-temporelle de leur concentration ne perturbait pas ce dernier. Nous allons ici préciser l'influence de ce potentiel sur les autres espèces chargées présentes en solution. En reprenant l'équation (2.21) supposant que leur répartition suit une statistique de Boltzmann,

$$C_i^0 = C_i^\infty \exp\left(\frac{-z_i \mathcal{F} \psi_0}{RT}\right)$$

soit

$$C_i = C_i^\infty e^{-\lambda_i} \quad \text{ou} \quad \lambda_i = \frac{z_i \mathcal{F} \psi_0}{RT} \quad (2.64)$$

on définit le coefficient de partition  $e^{-\lambda_i}$ .

Cette inhomogénéité de concentration nous amène donc à revenir sur les effets, déjà mentionnés en volume (section 1.2.2), du pH et des inhibiteurs de l'enzyme s'ils sont chargés.

#### • Influence du pH

Dans le cas des ions oxonium  $\text{H}_3\text{O}^+$ ,

$$C_{\text{H}}^0 = C_{\text{H}}^\infty \exp\left(\frac{-\mathcal{F} \psi_0}{RT}\right)$$

soit

$$\Delta\text{pH} = \text{pH}_0 - \text{pH}_b = 0.43 \frac{\mathcal{F} \psi_0}{RT} \quad (2.65)$$

avec  $\text{pH} = -\log[\text{H}_3\text{O}^+]$

Si la charge de surface  $\sigma_0$  est positive,  $[\text{H}_3\text{O}^+]$  augmente lorsque l'on s'éloigne de la surface : le pH ressenti par l'enzyme est supérieur à celui mesuré en volume. Le maximum d'activité observé en volume devrait donc être décalé vers les pH plus faibles. Inversement, dans le cas où la surface porte une charge négative, la courbe est décalée vers la droite.

Cette évolution a été observée pour des dérivés anioniques et cationiques de la chymotrypsine (fig. 2.21). Le système et les détails des interactions s'exerçant entre les différents partenaires sont assez éloignés du cas que nous avons modélisé, mais dans les deux configurations les ions oxonium seront attirés et localement plus concentrés dans le cas où  $\sigma_0 < 0$  ou avec le dérivé polyanionique et inversement, repoussés et localement moins concentrés dans le cas où  $\sigma_0 > 0$  ou avec le dérivé polycationique. A charge de surface (ou analogue) constante, la portée des interactions donc les écarts au comportement en volume dus à une composante électrostatique, diminuent quand la force ionique augmente.

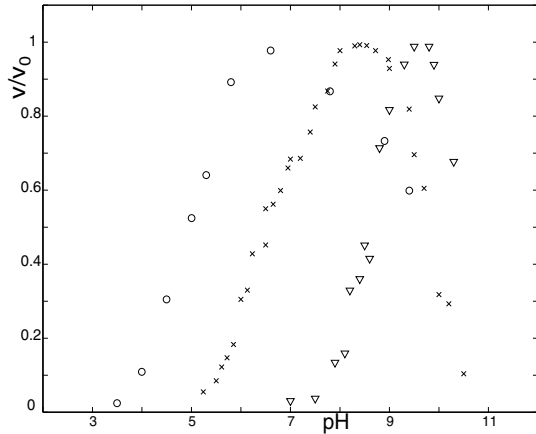


FIG. 2.21 – Activité en fonction du pH pour la chymotrypsine ( $\times$ ) et un de ses dérivés polycationique (chaînes latérales polyornithyles) ( $\circ$ ) et polyanionique (couplage de la chymotrypsine au copolymère formé d'acide maléique et d'éthylène) ( $\nabla$ ).  $I=1\text{mM}$  et le substrat utilisé est l'ester de N-acétyléthyltyrosine (d'après [44, 45])

### • Action des inhibiteurs

La réaction enzymatique peut être avantagée par l'existence du potentiel dans le cas où substrats et inhibiteurs portent des charges opposées. On considère ici le cas simple où ces derniers ne sont pas des sous-produits de la réaction. Le choix de la charge de surface adéquate, de signe opposé à celui des substrats, permet à la fois de favoriser la présence des substrats près de la surface et d'en éloigner les inhibiteurs.

Dans le cas où les inhibiteurs de l'enzyme sont des produits de la réaction enzymatique, la situation est plus complexe. Considérons par exemple, le cas d'une inhibition compétitive (schéma réactionnel de la fig. 1.8), et une situation où la diffusion est limitante ( $\mu \gg 1$ ). Lorsque l'on met la solution de substrat en contact avec la couche d'enzymes accrochés, il y a déplétion en substrat et accumulation du produit près de la surface. Quand on ne considère que la diffusion, tout se passe comme si la quantité d'enzymes actifs diminuait. La vitesse maximale de réaction diminue et  $\mu$ , donné par l'expression (eq.(2.11)) diminue. Si cette diminution est suffisante, on peut changer de régime et observer des cinétiques correspondant au cas où la réaction est limitante, mais avec des vitesses maximales plus faibles. L'effet inhibiteur rend le système moins sensible aux limitations par le transport. L'équilibre atteint dépend de la vitesse de la réaction en absence des inhibiteurs (situation initiale), de la valeur de  $k_D$  et de la constante de dissociation du complexe enzyme-inhibiteur.

Dans le cas où la réaction considérée génère des produits de signe opposé à celui des substrats, l'existence d'un potentiel électrostatique permet de limiter les effets de l'inhibiteur et de favoriser l'approche des substrats. Une prévision du comportement d'un système quelconque dans le cas où les substrats et les inhibiteurs portent des charges de même signe est difficile, les différentes grandeurs caractéristiques du système et leurs valeurs relatives étant à considérer.

### b. Diminution des conformations accessibles

La réaction d'accrochage covalent (chimisorption) de la protéine sauvage implique les fonctions acide carboxylique  $-\text{COOH}$  de la monocouche auto-assemblée ou SAM (*self-assembled monolayer*) et les nombreuses fonctions amines  $-\text{NH}_2$  de la PGK (section 4.2.4). La SAM ( $\text{HS}-(\text{CH}_2)_{15}-\text{COOH}$ ) assure la liaison entre la surface d'or (par sa fonction thiol  $-\text{SH}$ ) et la protéine. Elle empêche par ailleurs la dénaturation de cette dernière observée dans le cas d'une adsorption sur la surface métallique nue. Dans ce cas, il n'y a pas de spécificité de l'accrochage, ni d'orientation privilégiée : la protéine peut se fixer en plusieurs points, changeant ainsi considérablement le paysage d'énergie de conformation qu'elle est susceptible de visiter. Ces contraintes, associées à une diminution de l'entropie du système, pourraient conduire à des modifications de la structure-même des protéines, plus précisément au niveau



des structures secondaire et tertiaire. De nouvelles liaisons intramoléculaires (liaisons hydrogène par exemple) peuvent alors se former. Le système serait stabilisé et sa résistance aux variations de pH et de température accrue, les points de fixation retardant la dénaturation qui survient lorsque l'on chauffe le système ou quand on s'éloigne des conditions de pH optimales de l'enzyme [46].

Des études sur les contraintes et changements de conformation imposés par la présence d'une surface ont été menées dans le cas de l'adsorption de protéines ou physisorption [47, 48]. Si les interactions avec la surface sont telles que l'adsorption ne conduise pas à une dénaturation systématique de l'enzyme, les contraintes imposées par la chimi- et la physisorption sont similaires, bien que les énergies mises en jeu dans les interactions surface-protéine ne soient pas comparables. Les interactions guidant l'adsorption sont de type Van der Waals (hydrophobie, hydrophilie) et sont associées à des énergies de quelques  $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  environ 100 fois plus faibles que les énergies de liaisons covalentes. Les liaisons hydrogènes évoquées plus haut impliquent des énergies intermédiaires de quelques dizaines de kilojoules par mole.

L'accrochage n'étant pas orienté, le site actif peut être masqué ou le changement conformationnel correspondant à l'acte catalytique gêné, voire inhibé : le taux d'enzymes actifs est alors inférieur à 1 et  $\eta$  (coefficient d'efficacité défini par l'équation 2.44) diminué d'autant. L'activité, mesurée par spectrophotométrie par exemple, sera le reflet de tous les paramètres évoqués dans ces deux premières parties. Si les modélisations abordées ici semblent sommaires, elles sont déjà riches en informations. Elles permettent en particulier de mieux appréhender les résultats expérimentaux afin d'approcher les grandeurs caractéristiques des enzymes ( $k_{cat}$ ,  $K_M$ ) ou de l'accrochage (taux d'enzymes actifs) par l'exploitation et le paramétrage des courbes de mesure, lorsque cela est possible.

## 2.3 Activité de la PGK

Le principe des mesures que ce soit avec les enzymes libres, ou accrochés sur les dépôts d'or fonctionnalisés, est présenté en annexe 4.2.4. La première configuration (enzyme libre) nous permet de déterminer les constantes  $k_{cat}$  et  $K_{M,ADP}^*$  (constante apparente) de la PGK. En effet, dans le test couplé, on n'impose pas vraiment la concentration en 1,3-bPG qui est produit *in situ* par le GAPDH : on n'a pas accès au véritable  $K_M^{ADP}$ . Cette constante apparente nous indique la gamme de concentrations qui permet de se placer en situation de vitesse maximale.

La seconde configuration permet de confirmer que l'enzyme reste actif après accrochage et valide ainsi le protocole utilisé.

### a. Mesures avec l'enzyme libre

Nous profitons de ces mesures, classiques pour les enzymologistes, pour illustrer sur le système GAPDH/PGK, quelques aspects des principes généraux de l'enzymologie en solution présentés en début de chapitre.

Le graphe (a) de la figure 2.22, donne l'évolution de la vitesse initiale (proportionnelle à la vitesse mesurée correspondant à l'apparition du NADH, voir sec. 4.2.4) en fonction de la concentration d'ADP. Elle obéit à l'équation de Michaelis-Menten (eq. 1.11).

Le graphe (b) est la représentation linéaire qui conduit à :

$$K_M^{exp} = 0.35 \pm 0.03 \text{ mM}$$

$$k_{cat}^{exp} = 1970 \text{ s}^{-1}$$

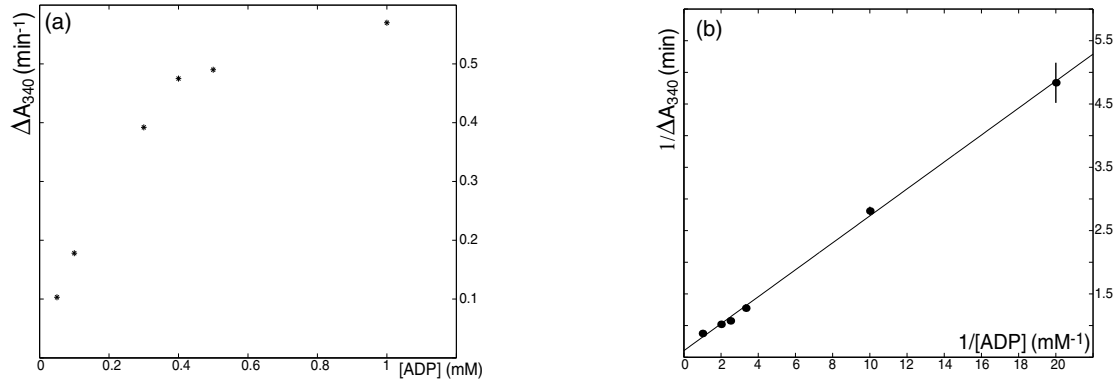


FIG. 2.22 – (a)  $v_0 = f([ADP])$  et (b)  $1/v_0 = f(1/[ADP])$  à  $T = 23^\circ\text{C}$  et  $[\text{PGK}] = 2 \text{ nM}$ .

Ces valeurs sont légèrement supérieures à celles rapportées dans la littérature :

$k_{cat} = 1480 \text{ s}^{-1}$  [49] et  $K_M^{ADP} = 0.18 \pm 0.05 \text{ mM}$  (mesures réalisées en présence de  $10 \text{ mM}$  de  $\text{MgCl}_2$  et  $0.05$  et  $0.16 \text{ mM}$  de  $1,3\text{bPG}$  [24]).

Les vitesses mesurées avec et sans agitation, sont du même ordre de grandeur. Cependant, toutes les mesures avec l'enzyme libre ont été faites sous une agitation modérée (entre  $400$  et  $700 \text{ trs/min}$ ) identique à celle utilisée pour les mesures avec la protéine accrochée.

Nous avons par ailleurs utilisé l'agitation pour illustrer le retard à l'établissement du régime stationnaire avant homogénéisation du milieu réactionnel. On introduit pour cela la PGK à un coin de la cuve sous agitation et on observe un temps de latence avant l'augmentation régulière de l'absorbance (fig. 2.23 : les deux flèches indiquent les instants d'introduction de la PGK dans le milieu et le début de la croissance d'absorbance due à l'activité de cet enzyme).

On observe également très nettement le ralentissement de la cinétique en fin d'acquisition (incurvation de la courbe), conséquence de l'appauvrissement du milieu réactionnel en substrat.

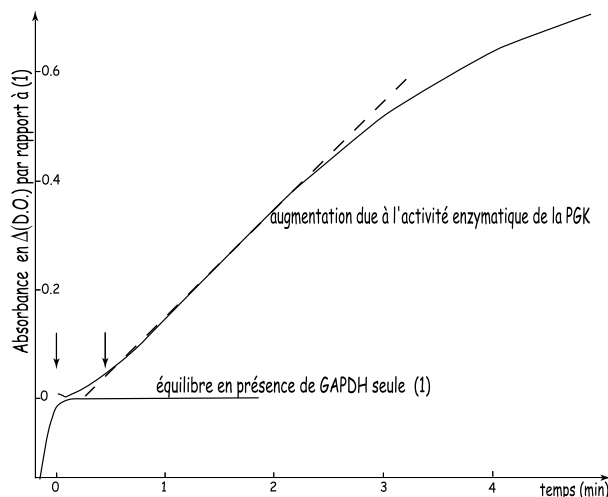


FIG. 2.23 – (a) Mesures d'absorbance sous agitation avec  $[\text{PGK}] = 1.6 \text{ nmol.L}^{-1}$  et dans une enceinte thermostatée à  $T = 23^\circ\text{C}$  (reproduction des données acquises sur table traçante). L'absorbance est indiquée en  $\Delta(\text{D.O.})$  par rapport à l'équilibre avec la GAPDH seule.

Avec l'enzyme libre, et même pour des concentrations de substrat de l'ordre ou inférieures à  $K_{M,ADP}^*$ , le régime stationnaire s'établit et se maintient sur des durées de l'ordre de la minute (figures ci-dessous). Avec l'enzyme accroché, ce régime n'est observé que pour des concentrations de substrat élevées qui permettent de négliger l'effet de la diffusion et d'avoir un plateau de  $[E.S]_0(t)$  ( $v$  constante) aux temps courts.

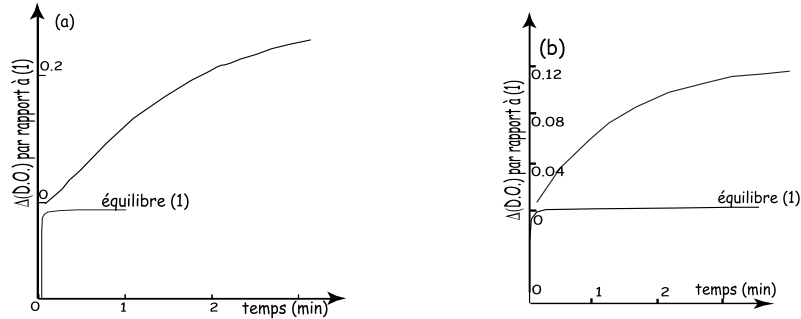


FIG. 2.24 – Mesures expérimentales d'absorbance avec la PGK libre en solution à la concentration de 2 nM.  $[ADP] = 0.1$  mM(a) et 0.05 mM(b).

### b. Mesures avec l'enzyme accroché

La démarche adoptée a été motivée par les contraintes expérimentales présentées par le système. Nous voulions réaliser l'analogie de la figure 2.22 a, avec l'enzyme accroché. Mais pour des concentrations de substrat trop élevées (supérieures à 10 mM), on n'observe plus d'augmentation d'absorbance après introduction de la GAPDH (tests réalisés en volume). D'autre part, on atteint la limite de détection de l'appareil lors des mesures réalisées pour  $[ADP] = 1$  mM. On ne peut donc pas diminuer plus cette concentration.

Les vitesses mesurées avec et sans agitation sont les mêmes. Pour le comprendre, nous avons comparé les résultats des simulations présentées dans le cas non stationnaire aux temps longs avec la mesure d'absorbance. Ces résultats sont résumés sur la figure 2.25 ci-après.

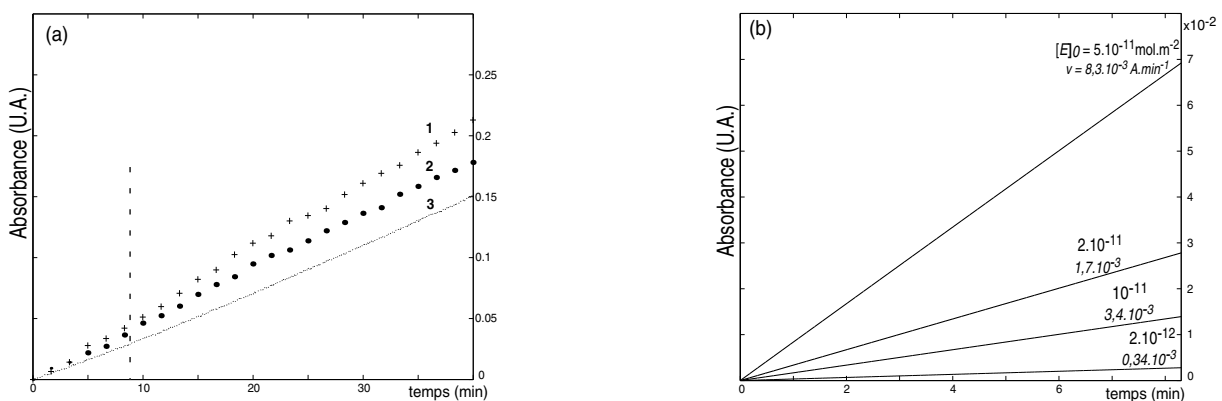


FIG. 2.25 – (a) Mesures d'absorbance sans agitation : accrochages réalisés selon le même mode opératoire (courbes 1 et 2) et (3) dérive due à la GAPDH seule. Les pointillés matérialisent l'échelle de temps du graphe (b). (b) Résultats des simulations numériques (vitesses  $V_{NADH}$  en  $\Delta_{DO} \cdot \text{min}^{-1}$ , indiquées à titre de comparaison), pour différentes valeurs de  $[E]_0$  et pour la même quantité de substrat en volume ( $C_0 = 1$  mM).

## Conditions expérimentales et résultats

Nous avons réalisé plusieurs expériences de mesures d'activité par le dosage du NADH en solution avec la protéine accrochée. Sur les dix échantillons préparés pour chacune des conditions (avec et sans agitation), seuls deux ont conduit à des résultats exploitables. Rappelons que d'après les équations cinétiques,  $v = 2.V_{NADH}$  (voir annexe 4.2.4), où  $V_{NADH}$  est la pente de la courbe d'absorbance donnée par la figure 2.25(a).

Les courbes 1 et 2 correspondent à des accrochages réalisés à un jour d'intervalle et dans les mêmes conditions, les mesures étant faites sans agitation. Les lamelles de verre utilisées proviennent du même dépôt d'or et du même bain de synthèse de la SAM. Les accrochages précèdent immédiatement chacune des expériences de spectrophotométrie présentées.

Les vitesses  $V_{NADH}$  mesurées valent  $5.32 \Delta_{DO} \cdot \text{min}^{-1}$ (1) et  $4.44 \Delta_{DO} \cdot \text{min}^{-1}$ (2), pour une concentration d'ADP de 1 mM.

Les vitesses  $V_{NADH}$  mesurées sur deux plaques issues d'un même bain d'accrochage et testées avec agitation (700 trs/min) sont de  $4.89 \Delta_{DO} \cdot \text{min}^{-1}$  et  $5.08 \Delta_{DO} \cdot \text{min}^{-1}$  pour une concentration d'ADP de 1 mM.

## Commentaires

- Les quatre mesures réalisées avec les protéine accrochées fournissent donc des vitesses de réaction similaires, indépendamment de l'agitation. Dans le cas où les phénomènes diffusifs sont limitants, on modifie ainsi l'épaisseur de la couche de diffusion par agitation et on teste donc l'hypothèse d'une telle limitation.

- La courbe 3 représente la dérive du signal d'absorbance en présence de la GAPDH seule, sur des temps d'observation longs (ici 40 minutes). De par son instabilité, une partie du 1,3bPG produit par cet enzyme disparaît au cours du temps, provoquant une production de NADH dans le milieu même en l'absence de la PGK. La courbe de dérive présentée résulte de la moyenne sur 10 expériences et reste bien distincte de la mesure en présence de PGK accrochée sur un support solide.

- Les vitesses issues des simulations indiquent que celle mesurée expérimentalement correspondrait à une densité d'enzymes accrochés comprise entre 2 et  $5 \cdot 10^{-11} \text{ mol} \cdot \text{m}^{-2}$  (fig. 2.25(b)).

Evaluons la densité d'enzymes accrochés grâce aux mesures d'absorbance, en faisant l'hypothèse que la cinétique n'est pas influencée par la diffusion, le substrat étant en excès. Expérimentalement, cette hypothèse est justifiée par le fait que pour 1 mM d'ADP en volume ( $[ADP] = 3 K_M$ ), la variation d'absorbance est environ 100 fois plus forte avec l'enzyme libre qu'avec l'enzyme accroché.

Les mesures d'absorbance sur 1 mL de milieu réactionnel contenant 2 nM de PGK, conduisent à une vitesse de  $0.57 \Delta_{DO} \cdot \text{min}^{-1}$ . Elles correspondent donc à une quantité de  $2 \cdot 10^{-9} \times 10^{-3} = 2 \cdot 10^{-12}$  mole de PGK.

Deux lamelles de 1 cm de large, sur lesquelles sont fixées les protéines, baignent dans le milieu réactionnel sur une hauteur de 2.5 cm. Cela correspond à  $2 \times 2.5 \cdot 10^{-4} \text{ m}^2$  immergés. Elles conduisent à des vitesses 100 fois plus faibles, ce qui conduit à une densité d'enzymes actifs de l'ordre de  $4 \cdot 10^{-11} \text{ mol} \cdot \text{m}^{-2}$ , tout à fait en accord avec le résultat des simulations.

Le bon accord de ces résultats est corroboré par la valeur du  $\mu_{N,S}$  correspondant aux paramètres de la simulation, on trouve :  $\mu_{N,S} = 2 \cdot 10^{-4.5}$  pour une densité d'enzymes  $[E]_0 = 4 \cdot 10^{-11} \text{ mol} \cdot \text{m}^{-2}$ . On est dans le cas où  $\mu_{N,S} \ll 1$  : la diffusion n'est pas limitante.

- Ce taux d'enzymes actifs après accrochage peut se justifier par la non spécificité de la liaison impliquée. Même si le taux de greffage (en proportion d'une monocouche compacte) est de l'ordre de quelques pourcents (voir images AFM, sec. 4.2.4), toutes les molécules fixées ne sont pas capables d'avoir un comportement analogue à celui observé en solution dans un tampon.

Nous disposons d'une PGK mutante dont l'accrochage orienté, pourrait améliorer cette proportion d'enzymes actifs après accrochage. Si les premiers résultats quant à la spécificité de l'accrochage dans ce cas sont prometteurs (voir sec. 4.2.4), le protocole reste à perfectionner.

## Deuxième partie

# Approche expérimentale par les plasmons de surface

## Chapitre 3

# Présentation des plasmons

Les propriétés électroniques des solides cristallins peuvent être décrites grâce à une modélisation du cristal par un ensemble d'électrons individuels se déplaçant dans une structure tridimensionnelle et périodique. Une approche particulièrement adaptée aux métaux, consiste à négliger en première approximation les atomes, supposés fixes. Les électrons libres du métal forment un gaz dans lequel peuvent se propager des ondes longitudinales de densité appelés plasmons de volume. Cette dénomination vient de l'analogie de la description du métal avec celle des plasmas, gaz ionisés. Ces ondes de volume sont quantifiées et le quantum d'énergie associé, de l'ordre de 10 eV a pour expression :

$$E_{p0} = \hbar \omega_p = \hbar \sqrt{4\pi n e^2 / m_0} \quad (3.1)$$

$\omega_p$  est la pulsation de l'onde,  $n$  la densité électronique du métal considéré,  $e$  et  $m_0$ , respectivement la charge et la masse de l'électron. La relation (eq. 3.1) peut-être obtenue en appliquant la relation fondamentale de la dynamique aux électrons (approche corpusculaire).

Dans la suite, nous allons plutôt nous intéresser aux plasmons de surface, auxquels une description ondulatoire convient mieux. Ritchie [50] fut le premier en 1957, à prédire l'existence de ces ondes électromagnétiques, susceptibles de se propager le long d'une surface métallique au voisinage de laquelle le plasmon reste confiné.

Dès 1960, Powell et Swan [51] apportent les preuves expérimentales de l'existence du phénomène, en bombardant une surface métallique par un faisceau d'électrons. D'après la relation de dispersion  $\omega(\mathbf{k})$  de ces ondes transversales, nous verrons qu'elles ne peuvent a priori pas être excitées par la lumière. Il existe néanmoins des montages particuliers qui permettent le couplage photon-plasmon. C'est Otto [52] qui réussit le premier, en 1968, à réaliser ce couplage.

Comme c'est généralement le cas, le confinement de l'onde se manifeste par une décroissance exponentielle de son amplitude quand on s'éloigne selon la normale à la surface. Mais ces plasmons présentent une particularité intéressante : le champ électromagnétique à la surface est considérablement amplifié. Cette propriété justifie que l'on parle de résonance de plasmons de surface, que l'on notera SPR (*surface plasmon resonance*) par la suite.

L'amplification importante du champ a ouvert un large domaine d'application à la SPR. On peut citer l'amplification surfacique de la diffraction Raman (SERS : *surface enhanced Raman scattering*), comme tirant notamment profit de cette propriété [53, 54, 55].

Les plasmons, sensibles par essence aux phénomènes de surface, sont aussi très employés dans l'étude dynamique de ces processus, en biologie en particulier. On peut citer l'adsorption de protéines à l'interface solide-liquide, la cinétique de fixation sur un partenaire accroché ou la mesure d'épaisseurs de films par exemple. De plus, la technique ne requiert aucun marquage radioactif, par un fluorophore ou un objet diffusant, procédés potentiellement invasifs mais nécessaires à la détection. On s'affranchit donc des éventuelles perturbations et des doutes sur les grandeurs effectivement mesurées, associés à ces marquages.

### 3.1 Présentation du phénomène physique

La théorie des plasmons de surface dans différentes configurations utilisées expérimentalement a été largement développée par H. Raether [56], dont nous reprenons ici quelques résultats. Nous présenterons les calculs et conditions d'observation des plasmons dans le cas de surfaces lisses. Toutefois, l'analyse topographique des surfaces utilisées montrent une rugosité non négligeable. Nous évoquerons donc rapidement l'influence de ce paramètre.

#### 3.1.1 Propriétés fondamentales dans le cas de surfaces lisses.

##### a. Relation de dispersion.

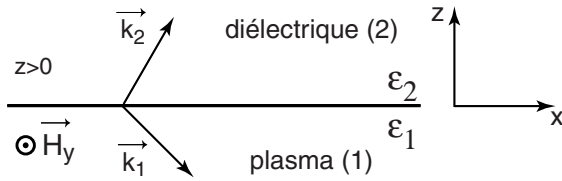


FIG. 3.1 – Schéma de l'interface entre le milieu 1 (métal de constante diélectrique  $\varepsilon_1$ ) et le milieu 2 (diélectrique, de l'air par exemple, de constante  $\varepsilon_2$ ).

On cherche une onde plane monochromatique, polarisée dans le plan  $(x, z)$  (on parlera de polarisation  $p$  dans toute la suite), qui se propage le long d'une interface diélectrique/métal et vérifie les équations de Maxwell. On considère dans la suite des milieux linéaires, homogènes et isotropes (la constante diélectrique  $\varepsilon$  est un scalaire). La seule composante du champ magnétique est  $\mathbf{B}_y$  et la composante  $\mathbf{E}_z$  du champ électrique décroît exponentiellement quand  $|z| \rightarrow \infty$  : on parle de champ évanescent.

Si on se place en polarisation  $s$  (onde polarisée perpendiculairement au plan d'incidence), cela revient à échanger les rôles de  $\mathbf{E}$  et  $\mathbf{B}$ . Dans ce cas, le champ électrique n'a pas de composante normale à l'interface. Il n'y a pas d'apparition de modulation de la charge de surface et pas de plasmon excité.

Le système est invariant par translation selon l'axe  $y$  et on décrit les champs dans les milieux 1 et 2 par :

$$\begin{aligned} z > 0 \quad \mathbf{B}_2 &= (0, B_{y2}, 0) \exp[i(k_{x2}x + k_{z2}z - \omega t)] \\ \mathbf{E}_2 &= (E_{x2}, 0, E_{z2}) \exp[i(k_{x2}x + k_{z2}z - \omega t)] \end{aligned} \quad (3.2)$$

$$\begin{aligned} z < 0 \quad \mathbf{B}_1 &= (0, B_{y1}, 0) \exp[i(k_{x1}x - k_{z1}z - \omega t)] \\ \mathbf{E}_1 &= (E_{x1}, 0, E_{z1}) \exp[i(k_{x1}x - k_{z1}z - \omega t)] \end{aligned} \quad (3.3)$$

Les équations de Maxwell et les relations de passage permettent d'écrire (calculs présentés en annexe) :

$$\begin{aligned} k_x^2 + k_{zi}^2 &= \varepsilon_i \left( \frac{\omega}{c} \right)^2, \quad i = \{1, 2\} \\ k_x &= \frac{\omega}{c} \sqrt{\frac{\varepsilon_1 \varepsilon_2}{\varepsilon_1 + \varepsilon_2}} \end{aligned} \quad (3.4)$$

Considérons l'interface entre deux milieux d'indices réels :

l'air ( $\varepsilon_2 = 1$ ) et un milieu tel que  $\varepsilon_1 < 0$ ,  $|\varepsilon_1| > 1$  aux fréquences optiques. On a alors  $k_x > \omega/c$  et  $k_{zi}$  imaginaire pur. L'onde est bien une onde de surface qui se propage selon l'axe des  $x$  et dont l'amplitude décroît quand  $|z| \rightarrow \infty$ .

Certains métaux, dont l'indice est complexe aux fréquences optiques, remplissent les conditions d'observation du plasmon. C'est le cas de l'or, l'argent, le cuivre, l'aluminium, le sodium et l'indium. Dans la suite, nous ne donnerons de valeurs numériques que dans le cas des métaux les plus utilisés que sont l'or et l'argent. Ceci se justifie par la qualité de la résonance (pic très marqué) et par des raisons pratiques (coût, réactivité).

Si  $\omega$  et  $\varepsilon_2$  sont réels et  $\varepsilon_1$  complexe, on peut écrire l'équation (3.4) sous la forme :

$$\varepsilon_2(\varepsilon_1' + i\varepsilon_1'') \left(\frac{\omega}{c}\right)^2 = (\varepsilon_2 + \varepsilon_1' + i\varepsilon_1'')(k_x' + ik_x'')^2$$

Après identification des parties réelle et imaginaire, on peut se ramener aux équations :

$$k_x'^2 - k_x''^2 = \left(\frac{\omega}{c}\right)^2 \left( \frac{\varepsilon_1'\varepsilon_2^2 + (\varepsilon_1''^2 + \varepsilon_1'^2)\varepsilon_2}{(\varepsilon_2 + \varepsilon_1')^2 + \varepsilon_1''^2} \right)$$

$$k_x' k_x'' = \left(\frac{\omega}{c}\right)^2 \left( \frac{\varepsilon_2^2 \varepsilon_1''}{2[(\varepsilon_2 + \varepsilon_1')^2 + \varepsilon_1''^2]} \right)$$

*Hypothèse* : le milieu 1 est peu absorbant ( $\varepsilon_1'' \ll |\varepsilon_1'|$ ).

C'est le cas de l'or (annexe E.2) et de l'argent [56] dans une grande partie du visible. A 670 nm par exemple,  $\varepsilon_{Ag} = -20.3 + 0.81i$  et  $\varepsilon_{Au} = -13.4 + 1.4i$ . Les équations précédentes se simplifient alors :

$$k_x'^2 - k_x''^2 = \left(\frac{\omega}{c}\right)^2 \left( \frac{\varepsilon_1'\varepsilon_2}{\varepsilon_2 + \varepsilon_1'} \right) \quad (3.5)$$

$$k_x' k_x'' = \left(\frac{\omega}{c}\right)^2 \left( \frac{\varepsilon_2^2 \varepsilon_1''}{2(\varepsilon_2 + \varepsilon_1')^2} \right) \quad (3.6)$$

On cherche une onde qui se propage selon  $x$ . En première approximation, on va donc négliger le terme d'absorption  $k_x''$  dans la relation (3.5). On aboutit aux expressions :

$$k_x' = \frac{\omega}{c} \sqrt{\frac{\varepsilon_1'\varepsilon_2}{\varepsilon_1' + \varepsilon_2}} \quad (3.7)$$

$$k_x'' = \frac{\omega}{c} \left( \frac{\varepsilon_1'\varepsilon_2}{\varepsilon_1' + \varepsilon_2} \right)^{\frac{3}{2}} \frac{\varepsilon_1''}{2\varepsilon_1'^2} \quad (3.8)$$

Il suffit que  $\varepsilon_1' < 0$  et  $|\varepsilon_1'| > \varepsilon_2$  pour assurer que  $k_x'$  soit effectivement réel, ce qui est le cas des deux métaux cités en exemple. Par ailleurs, ces conditions imposent que  $k_x' > \omega/c$  : on a de nouveau  $k_{zi}$  imaginaire pur.



## b. Longueurs de pénétration (selon $z$ ) et de propagation (selon $x$ ) des plasmons.

On définit  $\delta_i$ , l'épaisseur de peau (longueur caractéristique sur laquelle l'onde pénètre dans le milieu) :  $\delta_i = |k_{zi}|^{-1}$ . Dans le milieu de constante diélectrique  $\varepsilon_2$  et pour la longueur d'onde  $\lambda$  :

$$\delta_2 = \frac{c}{\omega} \sqrt{\frac{|\varepsilon'_1 + \varepsilon_2|}{\varepsilon_2^2}} = \frac{\lambda}{2\pi} \sqrt{\frac{|\varepsilon'_1 + \varepsilon_2|}{\varepsilon_2^2}}$$

Dans le métal :

$$\delta_1 = \frac{\lambda}{2\pi} \sqrt{\frac{|\varepsilon'_1 + \varepsilon_2|}{\varepsilon_1'^2}} \quad (3.9)$$

A 670 nm pour une interface air/métal,

$$\begin{array}{ll} \text{pour l'argent} & \delta_{2,Ag} = 468 \text{ nm} \quad \delta_{1,Ag} = 23 \text{ nm} \\ \text{pour l'or} & \delta_{2,Au} = 375 \text{ nm} \quad \delta_{1,Au} = 28 \text{ nm} \end{array}$$

Le champ électromagnétique du plasmon perçoit donc ce qui se passe près de l'interface, à une distance inférieure à une fraction de longueur d'onde dans le diélectrique. Si on considère une solution aqueuse peu concentrée en sel par exemple, ces propriétés de champ évanescent permettent de s'affranchir de ce qui se passe dans le volume de la solution. Les techniques utilisant les champs évanescents font ressortir les effets de surface, qui seraient noyés dans le bruit donc imperceptibles, si on sondait tout le volume.

Evaluons de même la partie imaginaire de  $k_x$  pour les deux métaux considérés à 670 nm et pour une interface air/métal. Les longueurs de propagation des plasmons valent :

$$L_{p,Ag} = \frac{\lambda}{\pi} \left( \frac{\varepsilon'_1 + \varepsilon_2}{\varepsilon_1' \varepsilon_2} \right)^{\frac{3}{2}} \frac{(\varepsilon_1')^2}{\varepsilon_1''}$$

$$\begin{array}{ll} \text{soit pour l'argent} & L_{p,Ag} = 100 \mu\text{m} \\ \text{pour l'or} & L_{p,Au} = 24 \mu\text{m} \end{array}$$

$k_x''$  est une fonction croissante de  $\varepsilon_2$  (eq. 3.8) :  $L_p$  diminue quand on passe de l'air à une solution aqueuse.

### 3.1.2 Excitation des plasmons par la lumière.

La propriété  $k_x' > \omega/c$  assure un champ évanescent, mais empêche que ces ondes soient excitées par la lumière. En effet, pour une pulsation  $\omega$  donnée, le vecteur d'onde du plasmon est plus grand que celui du photon (voir les courbes présentant les relations de dispersion, fig. 3.2). A l'énergie  $\hbar\omega$  du photon correspond le vecteur d'onde  $\omega/c$  qui doit être augmenté de  $\Delta k_x'$  pour parvenir à générer un plasmon. On peut citer deux façons d'y parvenir :

- lorsque les photons entrent en collision avec un réseau de pas  $a$ , sous un angle  $\theta_0$ , la composante  $k_x$  de leur vecteur d'onde peut prendre les valeurs  $(\omega/c)\sin\theta_0 \pm 2\pi m/a$ , où  $m$  est un entier. La condition  $k_x = k_{\text{SPR}}$  peut donc être remplie pour certaines valeurs de  $m$ .
- si la lumière traverse un diélectrique d'indice plus grand que 1, la pente de la droite correspondant à la relation de dispersion de la lumière diminue et peut couper la courbe correspondant aux plasmons (fig. 3.2 ci-dessous). C'est le choix qui a été fait dans le cadre du travail présenté ici. On parle de réflexion totale frustrée, couramment notée ATR (*attenuated total reflexion*).

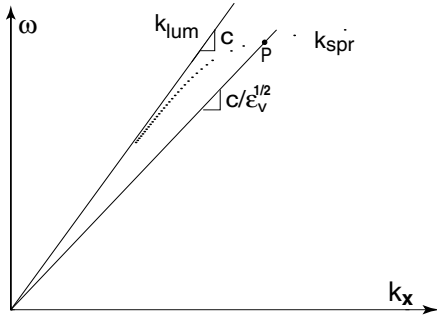


FIG. 3.2 – Principe de la méthode de couplage photon/plasmon par réflexion totale frustrée (méthode ATR).

Relations de dispersion  $\omega = f(k_x)$ , pour la lumière : droites  $k_{lum}$  de pente  $c/\sin \theta_0$  dans l'air ( $\theta_0$  est l'angle d'incidence, fig. 3.3, ci-dessous) et  $c\sqrt{\epsilon_v}/\sin \theta_0$  dans un milieu de constante  $\epsilon_v > 1$ . Seules les droites de plus faible pente (incidence rasante) sont représentées.

Relation de dispersion associée aux plasmons : courbe  $k_{spr}$ , d'après (eq. 3.7) à l'interface air/or et les données expérimentales pour  $\epsilon_1$  [56].

La droite de pente  $c$ , et a fortiori celle de pente  $c/\sin \theta_0$ , ne coupe pas la courbe  $k_{spr}$ . Le passage dans un milieu d'indice  $n_v = \sqrt{\epsilon_v}$  plus élevé (en général le verre ou le quartz d'un prisme), augmente la valeur du vecteur d'onde et permet l'excitation de plasmons par la lumière. Pour un milieu d'indice  $n_v$  donné, le plus grand vecteur d'onde  $k_x$  de plasmon accessible est donc celui associé au point P de la figure.

### a. Réalisation expérimentale.

Les deux montages expérimentaux possibles sont représentés sur la figure (3.3). Nous utilisons pour notre part, le montage de Krestschmann (fig. 3.3(b)). Un film de quelques dizaines de nanomètres de métal est amené au contact du milieu d'indice  $n_v = \sqrt{\epsilon_v}$ , qui est généralement un prisme. Le champ électromagnétique décroît dans le film de façon exponentielle et excite le plasmon à l'interface 1/2. Remarquons que l'épaisseur du film correspond à l'ordre de grandeur calculé précédemment pour l'épaisseur de peau  $\delta_1$  dans le métal (eq. 3.9).

La configuration proposée par Otto (fig. 3.3(a)), est plus adaptée dans le cas où l'on ne veut pas que la surface soit abîmée ou touchée par le prisme.

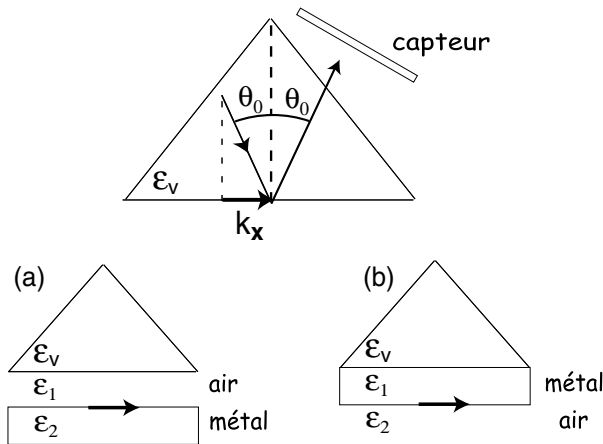


FIG. 3.3 – Montages expérimentaux pour la méthode ATR.

(a) Configuration proposée par Otto [52] : le diélectrique (air) se trouve entre le métal et le prisme.

(b) Configuration proposée par Kretschmann [57] : le métal vient au contact du prisme et couple le plasmon au champ évanescents généré par la réflexion totale de la lumière à l'interface  $v/1$ .

Lorsqu'un plasmon est excité à l'interface diélectrique/métal, il y a un transfert d'énergie au métal qui se traduit par une diminution de l'intensité réfléchie perçue par le capteur.

## b. Expression de la réflectivité.

Nous présentons ici les résultats des calculs de Raether [56] exprimant la réflectivité  $\mathcal{R}_p$ , rapport des intensités lumineuses réfléchie et incidente, pour un système dissymétrique à 3 couches (diélectrique (verre ou quartz)/métal/diélectrique (air, solution aqueuse)).

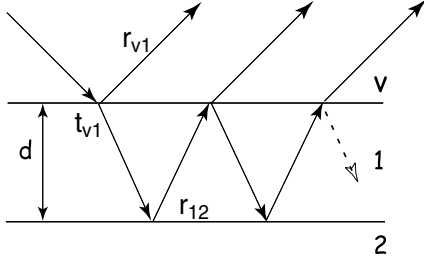


FIG. 3.4 – Principe du calcul de  $r_{012}^p$ .

Si on note  $E_0^p$  et  $E_r^p$  les amplitudes des champs incident et réfléchi de l'onde polarisée  $p$ , et  $d$  l'épaisseur du film 1, alors :

$$\mathcal{R}_p = |r_{012}^p|^2 = \left| \frac{E_r^p}{E_0^p} \right|^2$$

$$\mathcal{R}_p = \left| \frac{r_{01}^p + r_{12}^p \exp(2ik_{z1}d)}{1 + r_{01}^p r_{12}^p \exp(2ik_{z1}d)} \right|^2 \quad (3.10)$$

Le facteur de réflexion en amplitude complexe à l'interface  $i/k$  s'obtient à partir des relations de continuité des composantes tangentielles des champs :

$$r_{ik}^p = \left( \frac{k_{zi}}{\varepsilon_i} - \frac{k_{zk}}{\varepsilon_k} \right) \left( \frac{k_{zi}}{\varepsilon_i} + \frac{k_{zk}}{\varepsilon_k} \right)^{-1} \quad (3.11)$$

Posons  $k_x$ , la projection du vecteur d'onde de la lumière incidente (fig. 3.3) :

$$k_x = \frac{\omega}{c} \sqrt{\varepsilon_v} \sin \theta_0$$

et  $k_x^0$ , celle du vecteur d'onde du plasmon se propageant à l'interface 1/2, dans le cas du métal semi-infini présenté précédemment :

$$k_x^0 = \frac{\omega}{c} \sqrt{\frac{\varepsilon_1 \varepsilon_2}{\varepsilon_1 + \varepsilon_2}}$$

Sous les hypothèses  $|\varepsilon_1'| \gg 1$  et  $|\varepsilon_1''| \ll |\varepsilon_1'|$ , l'expression de la réflectivité près de la résonance, dans laquelle on égale  $k_x'^0$  à  $k_x^0$ , est celle d'une Lorentzienne :

$$\mathcal{R}_p = 1 - \frac{4\Gamma_i \Gamma_{\text{rad}}}{[k_x - (k_x^0 + \Delta k_x)]^2 + (\Gamma_i + \Gamma_{\text{rad}})^2} \quad (3.12)$$

- La condition de résonance (minimum de  $\mathcal{R}_p$ ) s'écrit :  $k_x = k_x^0 + \Delta k_x$ . On remarque le terme supplémentaire  $\Delta k_x$ , par rapport à la situation dans laquelle on ne considèrerait qu'une interface diélectrique/métal.

- A la limite  $\exp(2ik_{z1}d) \ll 1$  ( $k_{z1}$  est imaginaire pur donc l'argument de l'exponentielle est réel), on peut écrire :

$$\Delta k_x = \text{Re} \left( \frac{\omega}{c} \exp(-2d |k_{z1}|) r_{01}^p(k_x^0) f(\varepsilon_1, \varepsilon_2) \right)$$

où  $f$  est une fonction de  $\varepsilon_1$  et  $\varepsilon_2$ .

- l'atténuation  $\Gamma_i$  du plasmon dûe aux pertes par effet Joule est caractérisée par  $k_x''$ .

- L'expression (eq. 3.12) montre que le minimum de  $\mathcal{R}_p$ ,  $\mathcal{R}_{p,res}$  atteint 0 si  $\Gamma_{rad} = \Gamma_i$ . Sachant que :

$$\Gamma_{rad} = \text{Im} \left( \frac{\omega}{c} \exp(-2d |k_{z1}|) r_{01}^p(k_x^0) f(\varepsilon_1, \varepsilon_2) \right)$$

à  $\lambda$  et  $\varepsilon_{i,i \in \{0,1,2\}}$  donnés, il existe une épaisseur du film métallique qui permet d'optimiser la résonance de plasmon. Pour les autres valeurs de  $d$ , les deux  $\Gamma$  prennent des valeurs différentes et le minimum est non nul (fig. 3.5).

A la résonance, la réflectivité est minimale : de l'énergie est absorbée par le métal lorsqu'il y a excitation des plasmons.

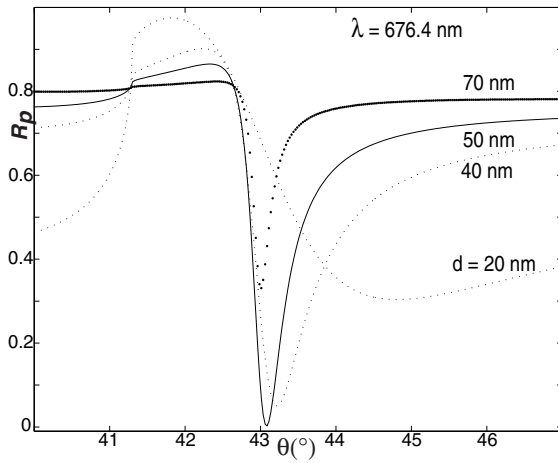


FIG. 3.5 – Evolution de la courbe de réflectivité en fonction de l'angle d'incidence lorsque l'épaisseur du film métallique varie, à  $\lambda$  fixée ( $\lambda = 676.4$  nm).

Les profils théoriques ci-contre sont obtenus par un modèle multi-couches type Abelès pour un système verre/or/air (d'après les données de la 3<sup>eme</sup> colonne du tableau E.1 de l'annexe E.2). Ce modèle consiste en une résolution matricielle de l'évolution des champs électrique et magnétique à la traversée de chacune des strates d'épaisseur  $d_i$  et de constante diélectrique  $\varepsilon_i$  du système multi-couches [58].

On peut donner une justification plus intuitive de l'évolution de  $\mathcal{R}_p$  et de l'existence d'une épaisseur optimale. Lorsque la lumière se réfléchit sur l'interface prisme/métal, une partie est transmise dans le métal sous la forme d'une onde dont l'amplitude décroît exponentiellement (réflexion « totale » sur une surface métallique). A l'interface métal/diélectrique, cette onde génère un plasmon si l'énergie est suffisante et que la relation  $k_x = k_x^0 + \Delta k_x$  est vérifiée. Si  $d$  est trop grand, l'atténuation de l'onde, liée à  $\Gamma_i$ , sera trop importante avant qu'elle n'atteigne la seconde interface. L'amplitude du plasmon et l'énergie fournie au métal décroissent toutes deux :  $\mathcal{R}_{p,res}$  augmente. Quand on augmente  $d$ , c'est  $\Gamma_i$  qui limite l'acuité de la résonance.

$\Gamma_{rad}$  mesure l'importance du transfert d'énergie des plasmons aux photons, phénomène réciproque de l'excitation optique des plasmons de surface. Quand ce transfert d'énergie augmente, une partie de l'énergie est rétrodiffusée et se traduit par une augmentation de  $\mathcal{R}_{p,res}$ . Cette conversion augmente quand  $d$  diminue : plus les deux interfaces se rapprochent et moins les pertes dans le métal pénalisent la rétrodiffusion. Quand on diminue  $d$ , c'est  $\Gamma_{rad}$  qui limite l'acuité de la résonance.

Dans les deux cas, cela se traduit sur le capteur de la figure (3.3) qui mesure directement la réflectivité  $\mathcal{R}_p$ , par une résonance de moins en moins marquée (fig. 3.5). L'influence de  $\Gamma_i$  se fait peu sentir quand  $d$  est petit, mais c'est justement le domaine où  $\Gamma_{rad}$  devient important. Inversement, lorsque  $d$  augmente,  $\Gamma_{rad}$  diminue, mais c'est  $\Gamma_i$  qui empêche cette fois une excitation efficace de l'onde de surface. L'équation (3.12) confirme que l'excitation des plasmons se fait de façon optimale quand ces deux termes sont égaux.

Etant données la longueur d'onde de travail  $\lambda$ , et les constantes  $\varepsilon_1$  et  $\varepsilon_2$ , il existe une épaisseur  $d_{opt}$  du film métallique qui optimise la résonance. Elle est moins marquée à cause de  $\Gamma_{rad}$  quand  $d \leq d_{opt}$ , et de  $\Gamma_i$  quand  $d \geq d_{opt}$ .

La figure (3.6 a) illustre l'évolution de la courbe de réflectivité lorsque l'on fait varier la longueur d'onde de la lumière excitatrice. Le minimum se décale vers la droite lorsque  $\lambda$  diminue. On peut donner une justification qualitative d'un tel comportement.

D'après les mesures expérimentales,  $\varepsilon'_1$  est une fonction décroissante de  $\lambda$  [56]. Si on néglige  $\Delta k_x$  en première approximation, la condition de résonance s'écrit :

$$k_x^0 = \frac{\omega}{c} \sqrt{\frac{\varepsilon_1 \varepsilon_2}{\varepsilon_1 + \varepsilon_2}} \simeq \frac{\omega}{c} \sqrt{\frac{\varepsilon'_1 \varepsilon_2}{\varepsilon'_1 + \varepsilon_2}} = \frac{\omega}{c} \sqrt{\varepsilon_v} \sin \theta_0$$

soit

$$\sqrt{\frac{\varepsilon'_1 \varepsilon_2}{\varepsilon'_1 + \varepsilon_2}} = \sqrt{\varepsilon_v} \sin \theta_0 \quad (3.13)$$

Les constantes diélectriques  $\varepsilon_2$  et  $\varepsilon_v$ , caractéristiques du milieu 2 (air ou eau) et du prisme (verre ou quartz) respectivement, varient peu avec la longueur d'onde contrairement à  $\varepsilon_1$ , associée au métal. Le membre de gauche de l'égalité ci-dessus diminue lorsque  $\lambda$  augmente. L'angle de résonance se décale donc vers les petits angles quand  $\lambda$  augmente.

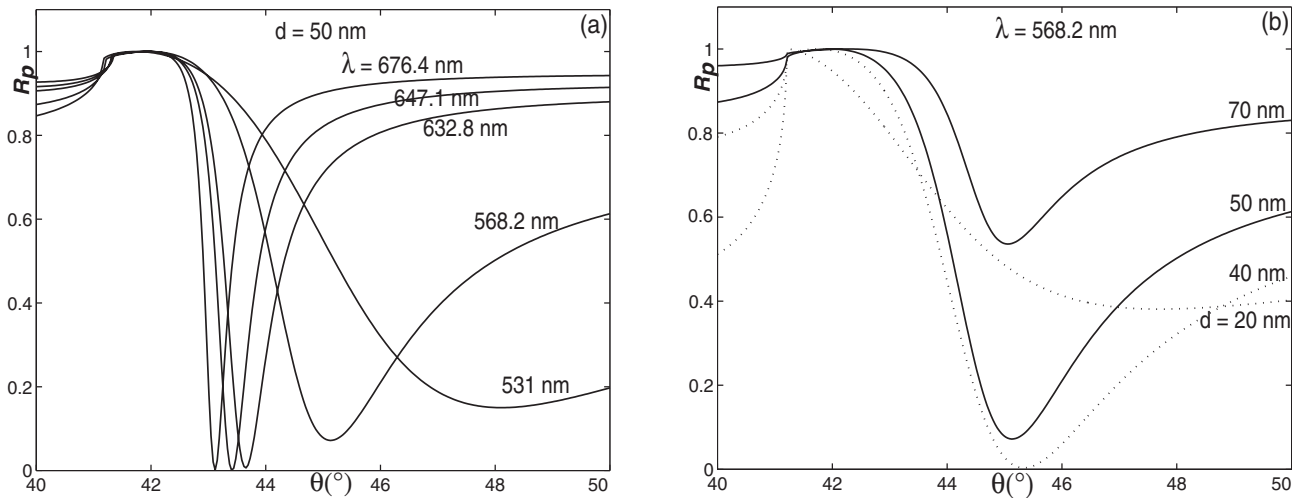


FIG. 3.6 – Evolution de la courbe de réflectivité lorsque la longueur d'onde de la lumière excitatrice varie, à  $d = 50$  nm fixé (a) et lorsque l'épaisseur du film métallique varie, à  $\lambda$  fixée ( $\lambda = 568.2$  nm) (b). Profils théoriques obtenus par un modèle multi-couches type Abelès pour un système verre/or/air.

La figure (3.6(b)) souligne l'influence de la longueur d'onde sur  $d_{opt}$ . L'épaisseur optimale dépend de la longueur d'onde de travail choisie. Les profils plasmons utilisés pour illustrer le propos sont tracés dans le cas où le diélectrique en contact avec le métal est l'air. Les expériences impliquant des molécules biologiques sont le plus souvent réalisées en milieu aqueux. D'après (eq. 3.13), l'angle de résonance se décale vers les grands angles lorsque l'on passe de l'air ( $n_2 = 1$ ) à l'eau ( $n_2 = 1.33$ ). De plus, la

forme-même du pic de résonance, en particulier la largeur à mi-hauteur, évolue quand on fait varier  $\lambda$ ,  $d$  ou  $\varepsilon$ .

Sauf indication contraire, les expériences de plasmons présentées ici sont réalisées à 676.4 nm. On mesure l'intensité réfléchie  $I_p$  en fonction de l'angle  $\theta$ , à intensité incidente  $I_0$  fixée.  $\mathcal{R}_p$  est proportionnelle à  $I_p$  et il existe un angle d'incidence noté  $\theta_p$ , associé à la résonance de plasmon, donc au minimum de réflectivité. On s'intéressera en particulier, à l'évolution temporelle de  $\theta_p$ .

L'intérêt de la résonance de plasmons réside dans sa sensibilité. Dans les expériences, le film métallique et le diélectrique permettant le couplage photon-plasmon (milieux  $v$  et 1) sont fixés et on fait varier les propriétés (épaisseur et indice) du milieu immédiatement en contact avec le métal. En effet, nous avons présenté un système à 3 couches dans les calculs, mais la situation réelle se modélise mieux en introduisant une couche supplémentaire entre le métal et la solution aqueuse. Dans notre cas, cette couche supplémentaire est formée de l'intermédiaire d'accrochage des protéines et des protéines elles-mêmes. Toutefois, la technique SPR ne se limite pas aux molécules biologiques (voir section 3.2).

On va s'intéresser dans la suite à l'évolution de l'épaisseur et/ou de l'indice moyen  $\tilde{n}_P$  de cette couche. La forme et la position angulaire du pic de résonance sont d'autant plus sensibles à ces paramètres que la résonance est marquée. Cette exigence écarte le cuivre et l'aluminium dont les pics sont trop larges. L'indium est pour sa part trop cher et il ne reste plus que le sodium, l'argent et l'or. Le sodium est trop réactif pour être manipulé facilement et l'argent s'oxyde lui aussi assez facilement. L'or apparaît donc, en dépit de son coût, comme le métal de choix pour les expériences de SPR : il est pratiquement inerte chimiquement et peu oxydable.

### c. Amplification du champ et rugosité des surfaces métalliques.

A partir du coefficient de transmission complexe du système multicouche, Raether a montré qu'il peut y avoir amplification du champ électrique au voisinage de la surface métallique [56, 59]. Cette amplification du champ atteint son maximum à la résonance de plasmon de surface. En notant  $\mathbf{E}_{SP}(0^+)$ , le champ électrique au voisinage immédiat de la surface dans le métal, en présence du plasmon, on définit :

$$T_{max}^{el} = \left| \frac{\mathbf{E}_{SP}(0^+)}{\mathbf{E}_0} \right|^2$$

Ce coefficient est de l'ordre de 100, dans le visible pour un système quartz/argent/air et vaut environ 30 à  $\lambda = 600$  nm, si on remplace l'argent par de l'or ; 40 dans le cas de l'aluminium et 7 dans le cas du cuivre [56]. Les valeurs des constantes diélectriques dépendant fortement des conditions expérimentales (voir annexe E.2), ces valeurs de  $T_{max}^{el}$  ne sont qu'approximatives.

On peut retrouver ces résultats par un bilan d'énergie [60]. A la résonance, la puissance dissipée dans le métal compense exactement la puissance incidente transmise au métal par l'intermédiaire du système de couplage. L'énergie électromagnétique dissipée par unité de surface  $S = dx dy$  obéit à l'équation :

$$-\frac{d\mathcal{P}_{SP}}{dx} = 2k_x''\mathcal{P}_{SP} \quad (3.14)$$

où  $k_x''$  donne l'atténuation du champ électrique  $\mathbf{E}$  lié au plasmon, dans la direction de propagation. La puissance étant quadratique en  $E$ , la décroissance est caractérisée par  $2k_x''$ . La puissance transportée par le plasmon est évaluée en calculant la composante selon  $x$ , du vecteur de Poynting  $\mathbf{\Pi} = \mathbf{E} \times \mathbf{H}$  associé au plasmon.

Caractérisons le système de couplage permettant le transfert d'énergie du photon au plasmon par son coefficient de transmission en puissance  $T$ . La puissance moyenne (par unité de surface) fournie au métal vaut :

$$\mathcal{P}_{inc} = \frac{1}{2\mu_0} \sqrt{\varepsilon_v} \cos \theta_0 |\mathbf{E}_0|^2 T \quad (3.15)$$

Sous l'hypothèse  $\varepsilon_1'' \ll -\varepsilon_1'$ , on exprime  $T_{max}^{el}$  en résolvant  $2k_x'' \mathcal{P}_{SP} = \mathcal{P}_{inc}$ .

Une surface présentant une rugosité (modulation du profil de hauteur par rapport à une surface plane) périodique, va jouer le même rôle qu'un réseau. Une telle surface permet, comme nous l'avons vu, le couplage plasmon/photon. Une partie de l'énergie fournie au métal par la lumière incidente pourra être réémise par ce biais. Lorsque la rugosité croît, ou dit autrement, lorsque l'amplitude de la modulation du profil de hauteur augmente, la longueur de propagation du plasmon diminue : on parle de « localisation des plasmons de surface ». Cette localisation tend à augmenter le phénomène d'amplification du champ [56].

En revanche, il n'y aurait plus d'amplification dans le cas d'une surface présentant une rugosité irrégulière [60] :  $T_{max}^{el} \sim 1$ . Les dépôts d'or réalisés par évaporation conduisent à des surfaces très rugueuses et dont on ne contrôle pas la régularité avec précision. On peut penser, au regard des différentes études citées, que l'amplification du champ au voisinage de la surface ne sera pas nécessairement très importante.

Cela n'enlève rien aux avantages de la technique : on conserve la sensibilité de la condition de résonance aux variations des paramètres considérés (indice et/ou épaisseur des entités chimisorbées à la surface métallique). De plus, les applications de la SPR à des systèmes biologiques poussent à préférer une configuration qui n'induit pas de fortes localisations d'énergie. Ces dernières peuvent en effet s'accompagner d'une élévation de la température, non contrôlée et potentiellement nocive aux objets étudiés.

## 3.2 Applications

Depuis la commercialisation en 1991 du premier BIAcore, les études utilisant la résonance de plasmons de surface se sont multipliées. La majorité des études recensées [61] portent sur des molécules biologiques. Cependant, la SPR est aussi appliquée à des systèmes physiques et mise en oeuvre sur des montages non commerciaux. Cette technique apparaît comme l'outil de prédilection dès qu'il y a une variation d'indice près de la surface métallique. La détection par SPR s'applique aussi bien aux phénomènes propres aux interfaces, comme l'adsorption à une interface liquide/solide par exemple, qu'à l'étude de systèmes accrochés. Mais l'accrochage impose de nouvelles contraintes et comporte quelques inconvénients tel que la prise en compte de la diffusion. Dans le cas des protéines ou des cristaux liquides par exemple, la fixation à un support solide impose également une certaine organisation spatiale. Dans le cas des protéines, il se peut que l'on diminue la quantité d'unités participant effectivement au phénomène observé.

Cependant, soulignons une fois de plus, les avantages non négligeables qui justifient le recours aux plasmons de surface :

- le champ évanescent permet de faire ressortir ce qui se passe à la surface et d'occulter les effets de volume
- la sensibilité de la résonance plasmon aux variations d'indice permet la détection d'effets subtils.

- le rôle-clef joué par la surface elle-même, offre des possibilités supplémentaires de raffinement du dispositif expérimental. Citons par exemple les travaux de Jordan et Corn [62] : des surfaces obtenues par photolithographie permettent l'étude du processus d'adsorption protéique sur des surfaces chargées. Les charges de surface sont générées par la synthèse de couches mixtes constituées d'un alcanethiol anionique et de polylysine<sup>1</sup>, polymère cationique. La modulation de la charge de surface vue par les protéines qui vont venir s'adsorber, est obtenue notamment en modifiant la longueur du polymère.

Notre objectif est de donner ici un aperçu de la richesse de la technique, sans entrer dans le détail des études présentées.

### 3.2.1 Utilisation des appareils commerciaux : études portant sur du matériel biologique

Les fabricants des appareils proposés n'ont eu de cesse d'améliorer tant les possibilités qu'offrent le dispositif expérimental, que les programmes d'exploitation des données. Le perfectionnement des systèmes d'injection, de la précision de la détection (résolution spatiale et taille des molécules détectées), de la régénération des échantillons mais aussi le développement de logiciels d'utilisation et de paramétrage des courbes obtenues ont permis d'accroître le nombre des utilisateurs de la technique SPR.

On la retrouve [61] :

- dans l'industrie alimentaire, pour les contrôles-qualité
- dans l'industrie pharmaceutique, appliquée à l'étude de l'immunotoxicité des médicaments
- dans l'étude du protéome : pour la caractérisation et la sélection de molécules (y compris des anticorps) interagissant avec une ou plusieurs protéines-cibles. La SPR est également utilisée pour confirmer les résultats et prédictions d'autres études de reconnaissance moléculaire, comme la méthode du double hybride par exemple, ou pour identifier de nouveaux partenaires. Enfin, de nombreux travaux portent sur le suivi de cinétiques de fixation récepteur/ligand et la détermination de constantes d'affinité.

Le dispositif utilisé est commun à quelques détails près à toutes les applications citées ci-dessus. Les échantillons sont constitués de surfaces d'or, sur lesquelles un intermédiaire d'accrochage permet d'obtenir une couche comportant un grand nombre de sites de fixation. Ces intermédiaires sont formés d'une monocouche auto-assemblée, notée SAM (*self-assembled monolayer*) d'alcanethiols, à laquelle est fixée covalamment une matrice de caboxyméthyl-dextran non pontée. L'accrochage du récepteur à la surface est aussi le résultat d'une réaction chimique. Le lien covalent s'établit entre une fonction acide  $-CO_2H$  de la matrice de dextran et ce récepteur, fonctionnalisé si nécessaire.

La résonance de plasmon est sensible à la différence d'indice optique créée par les ligands en solution qui viennent interagir avec les récepteurs. Par ailleurs, l'indice varie linéairement avec la quantité de matière liée aux récepteurs, du moins tant qu'il s'agit de protéines [63, 64]. Il n'en reste pas moins que la détection est d'autant plus aisée que les ligands sont gros. On pourrait s'affranchir de cette limitation en utilisant des ligands de faible poids moléculaire comme des compétiteurs de ligands de poids moléculaire plus élevé [65]. La perturbation de la cinétique mesurée permet d'accéder à des informations sur des molécules a priori en-dessous du seuil de détection de l'appareil.

---

<sup>1</sup>tableau 1.1 pour la formule de la lysine



Certaines des études utilisant des montages commerciaux sont assez proches du travail présenté ici et il est intéressant de comparer les deux approches. Deux types d'informations sont usuellement tirées de la courbe  $\theta_p(t)$  :

- la valeur de  $k_{on}$  et  $k_{off}$ , constantes cinétiques d'association et de dissociation respectivement du ligand au récepteur ; et celle de la constante d'affinité  $K_D$  [65, 66, 67].
- le suivi de la dénaturation/renaturation à froid [68] ou plus généralement des changements conformationnels d'une protéine [69].

Nous avons sélectionné, pour illustrer ces deux aspects, des études qui soulignent certains inconvénients de la méthode et justifient ainsi les choix expérimentaux que nous avons privilégiés.

Concernant le premier point, l'expérience se déroule en deux temps : le ligand est d'abord mis en présence du récepteur accroché et l'évolution temporelle permet d'estimer  $k_{on}$ . En rinçant l'échantillon, on provoque la dissociation du ligand et on peut évaluer la constante  $k_{off}$  ainsi que  $K_D = k_{off}/k_{on}$ . Cependant, l'utilisation d'une matrice de dextran, si elle a l'avantage d'augmenter le signal détecté, implique dans le même temps de prendre en compte de nouveaux paramètres. Il faut notamment tenir compte, dans le modèle de paramétrage des données, du transport dans la matrice et de la réassociation du ligand aux sites libres de cette dernière, lors du rinçage. Il a été montré [67] que sans la donnée de la probabilité de réassociation à tout instant, les valeurs des constantes d'affinité avancées sont entachées d'erreur. Les auteurs de l'article proposent d'y remédier en mesurant les constantes cinétiques en présence d'un compétiteur. D'autres modèles de paramétrage des courbes expérimentales ont également été suggérées [66], mais aucune des approches ne semble fournir de protocole aisément applicable à plusieurs systèmes différents.

Quant aux études portant sur les changements conformationnels de protéines accrochées à un support, elles sont pour le moins délicates. Winzor [70] s'intéresse au suivi par SPR (dispositif non commercial) de l'isomérisation d'une protéine. Il en profite pour mettre en garde contre les conclusions hâtives qui peuvent être tirées des données de SPR. L'utilisation d'une SAM simple, sans carboxyméthyl-dextran, est conseillée afin d'augmenter la proportion molaire du matériel protéique par rapport à l'intermédiaire d'accrochage. Dans le même temps, on s'affranchit des complications inhérentes à la matrice de dextran et c'est le choix qui a été fait dans nos expériences. On ne peut toutefois négliger totalement la contribution de l'intermédiaire d'accrochage. Nous aurons recours à des tests comparatifs avec la SAM seule pour mettre en évidence la part du signal provenant de la couche protéique.

Nous nous intéressons particulièrement à la réponse de cette couche à l'injection de molécules censées induire un changement conformationnel. Il subsiste néanmoins une indéterminée de taille : doit-on considérer que la courbe  $\theta_p(t)$  observée est la conséquence de changements conformationnels induits au moment de l'injection ou préexistants ?

D'autres interrogations, proches de la précédente, surviennent lorsque l'on soumet l'échantillon observé à une suite d'injections. Quel est le temps de réponse de la couche protéique ? L'évolution constatée au cours d'une injection s'explique-t-elle par la seule expérience en cours ? Quelle est la contribution des expériences précédentes ?

Bien que des réponses claires et définitives ne soient pas ressorties de notre étude dans son état actuel d'avancement, nous reviendrons sur toutes ces questions dans le chapitre 4.3.

### 3.2.2 Autres études utilisant la SPR

La technique SPR peut s'appliquer dès que le phénomène que l'on désire observer s'accompagne d'un changement d'indice dans la proximité de la surface métallique. Son utilisation sur des systèmes impliquant des cristaux liquides semble alors toute indiquée. En effet, lorsque l'on augmente la température, on observe une transition de phase du cristal liquide. On passe d'une phase où l'organisation des molécules conduit à une anisotropie<sup>2</sup> des propriétés optiques, à une phase isotrope pour des températures plus élevées. Dans la phase anisotrope, on dit que le matériau est biréfringent. La propagation de la lumière y est gouvernée par deux indices optiques,  $n_O$  et  $n_E$  et non plus un seul, comme c'est le cas en milieu isotrope. Ces indices sont respectivement qualifiés d'ordinaire et d'extraordinaire. Lorsqu'un tel milieu vient au contact du métal, les conditions de résonance sont modifiées en conséquence. On peut utiliser les plasmons pour réaliser une étude du cristal liquide lui-même dans sa réponse à une sollicitation extérieure [71], ou pour caractériser la transition de phase [72].

Il ne faut toutefois pas restreindre les anisotropies optiques aux cristaux liquides. Une anisotropie photo-stimulée a pu être mise en évidence par le biais de la SPR, dans des films polymères certes particuliers, mais qui n'exhibent pas de propriétés de cristal liquide [73]. Ces films polymères contiennent des composés qui sont, dans les cas cités dans cet article, des pigments et dont les propriétés optiques peuvent être modifiées par irradiation. La liaison au polymère empêche la relaxation après irradiation du pigment en solution, et conduit à une anisotropie durable du film dans son ensemble.

Lorsque nous avons présenté le phénomène de résonance de plasmons, nous avons évoqué l'amplification du champ électromagnétique et la localisation spatiale du plasmon par la rugosité. L'amplification du champ peut par exemple, être mise à profit pour une détection plus fine, impliquant des quantités moindres de matière que pour d'autres techniques. Citons par exemple une étude de spectroscopie d'absorption [74] qui utilise une configuration où l'angle d'incidence est fixé, mais la longueur d'onde de la lumière excitatrice varie. Une amplification d'un facteur 40 par rapport à d'autres mesures d'absorption est avancé, ce qui permet d'avoir des informations précises même en-dessous d'une monocouche de molécules adsorbées.

On parle de résonance de plasmon de surface localisée (*localized surface plasmon resonance*, LSPR) lorsqu'elle concerne des nanoparticules de métaux nobles (or, argent, platine). On observe alors une forte absorption, généralement située dans le visible et l'ultraviolet. Cette appellation s'étend à des films présentant une rugosité de surface très importante. Ils peuvent être élaborés grâce à un dépôt d'or sur une monocouche de nanosphères de polystyrène [75]. Une telle configuration permettrait des résolutions spatiale et temporelle accrues. D'autre part, on pourrait l'utiliser pour des mesures de diffraction Raman, éventuellement menées simultanément [76]. Le capteur fabriqué a été validé par l'étude du système avidine-antiavidine, et ses performances ont été comparées à celles de la résonance de plasmon sur des supports classiques (films d'or déposés sur des lames de verre).

---

<sup>2</sup>Les valeurs des grandeurs observées dépendent de la direction d'observation

## Chapitre 4

# Dispositif expérimental et résultats

Nous avons voulu mettre au point un dispositif permettant d'avoir accès à la dynamique des changements conformationnels d'une protéine en général, et de la PGK dans notre cas particulier. Nous allons pour cela suivre l'évolution de la condition de résonance de plasmons (déplacement de l'angle  $\theta_p$  de minimum de réflectivité) selon l'état conformationnel de la protéine.

En effet, les changements d'organisation spatiale des enzymes en présence de leurs substrats sont susceptibles d'induire des changements d'indice au voisinage de la surface métallique, pour deux raisons a priori :

- le changement conformationnel peut s'accompagner d'une évolution de la densité protéique près de la surface, donc d'une modification de l'indice optique.
- on peut également s'attendre à une évolution de la constante diélectrique, donc de l'indice de la protéine lors du changement conformationnel.

Nous illustrons sur la figure 4.1 ci-dessous, le comportement idéal de la couche de protéines, accrochées chimiquement à une couche d'or à la surface de laquelle se propage un plasmon.

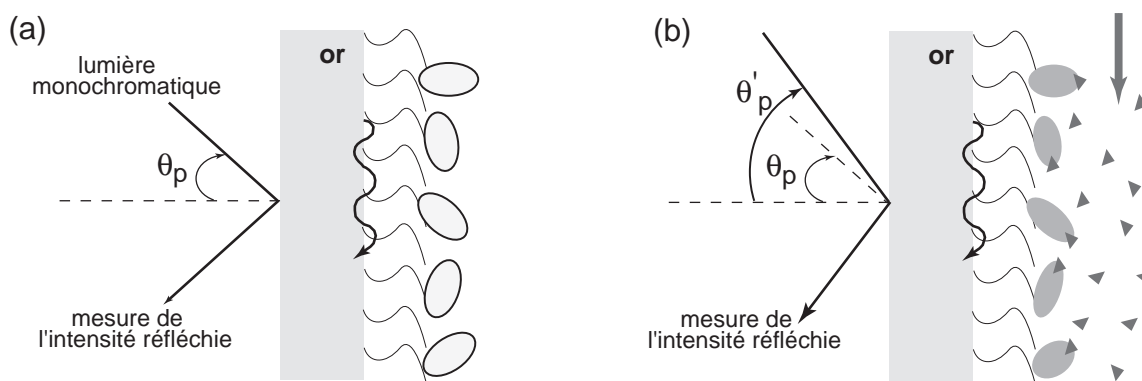


FIG. 4.1 – Schéma de principe du suivi par SPR des changements conformationnels.

On va passer, lors du cycle enzymatique, de la configuration (a) à la configuration (b). La première modélise la situation avec les enzymes (ellipses) non liés aux substrats (triangles, fig. 4.1 b). En présence de ceux-ci, les enzymes remplissent leur rôle de catalyseur et facilitent la réaction chimique de façon cyclique. Ils se retrouvent tantôt dans la configuration initiale (une fois les produits relargués), tantôt associés aux substrats (situation b). A chacune des deux situations correspond un angle de résonance, repéré grâce à la mesure de l'intensité réfléchie.

La première étape consiste donc à montrer que l'influence de la présence des substrats sur l'état de la couche d'enzymes est détectable expérimentalement. C'est essentiellement l'objet du travail présenté ici.

L'accès à la dynamique du changement conformationnel constitue une seconde étape dont la difficulté essentielle va résider dans la mise au point d'un détecteur suffisamment rapide pour accéder à la résolution temporelle requise. Cette étape en est encore au stade des essais préliminaires et ne sera pas discutée dans le manuscrit.

Le but ultime d'un tel dispositif et l'originalité de la mesure proposée consistent à forcer ensuite le système par un champ électrique externe. On espère arriver, par cette excitation extérieure, à synchroniser toutes les protéines accrochées. On observerait alors une augmentation significative du rendement de la couche d'enzymes. Avant de pouvoir accomplir ce projet ambitieux, de nombreuses étapes préliminaires sont à valider.

La partie expérimentale de ce travail de thèse a consisté en la réalisation du montage optique et la mise au point d'un protocole de synthèse des échantillons, reproductible et n'inhibant pas l'activité de la PGK. Afin de valider le protocole proposé, nous avons complété les mesures de plasmons par d'autres techniques expérimentales :

- des mesures classiques d'électrochimie nous permettent de vérifier l'homogénéité de la couche auto-assemblée (SAM) utilisée comme intermédiaire d'accrochage des protéines. De plus, la SAM permet d'isoler les enzymes de l'or et d'éviter ainsi leur dénaturation au contact de la surface métallique.
- la microscopie de force atomique (AFM) confirme l'accrochage des protéines sur la surface et nous fournit un ordre de grandeur de la densité d'enzymes fixés.
- nous avons adapté le test d'activité par spectrophotométrie, couramment utilisé par les biochimistes, à notre configuration expérimentale. Il assure qu'une proportion acceptable des enzymes accrochés restent fonctionnels.
- enfin, la mesure de plasmons met en évidence des différences significatives d'évolution de la condition de résonance, selon que les protéines soient présentes ou non. On compare pour cela les réponses de deux types d'échantillons (avec et sans PGK), après l'injection de molécules de substrats.

Comme nous l'avons précisé dans le chapitre précédent, l'observation des plasmons requiert un montage optique particulier. Dans un premier temps, nous présentons le dispositif retenu afin de réaliser les mesures présentées ici. Nous détaillons ensuite le protocole d'accrochage dans ses différentes étapes, ainsi que les tests se rattachant à chacune d'entre elles. Nous terminons ce chapitre par la présentation des résultats des expériences de résonance plasmon.

## 4.1 Montage optique

Les expériences sont réalisées à longueur d'onde fixée à l'aide d'une source blanche (lampe Xénon Oriel 66901 de 150 W), qui éclaire un monochromateur Oriel 77700 (fig. 4.2). Les ouvertures des fentes d'entrée et de sortie du monochromateur résultent d'un compromis entre la résolution spectrale  $\Delta\lambda$  de l'appareil et la puissance lumineuse récupérée en sortie. Lorsque l'on augmente l'ouverture des fentes, on a plus de luminosité en sortie, au détriment du caractère monochromatique. Le faisceau lumineux, légèrement divergent en sortie du monochromateur est rendu parallèle au moyen de la lentille convergente.

Tous les calculs du chapitre précédent ont été menés en considérant une onde plane polarisée  $p$ , c'est-à-dire telle que le champ électrique soit contenu dans le plan d'incidence (fig. 3.1). En effet, le plasmon est une onde transversale : la direction de déplacement des électrons (donné par la direction de  $\mathbf{E}$ ), est perpendiculaire à la direction de propagation le long de l'interface. Le champ électrique excitateur doit donc posséder une composante selon la normale à la surface pour générer un plasmon.

Le polariseur permet d'optimiser la détection de la résonance de plasmon en augmentant la proportion de lumière polarisée  $p$  dans le faisceau incident.

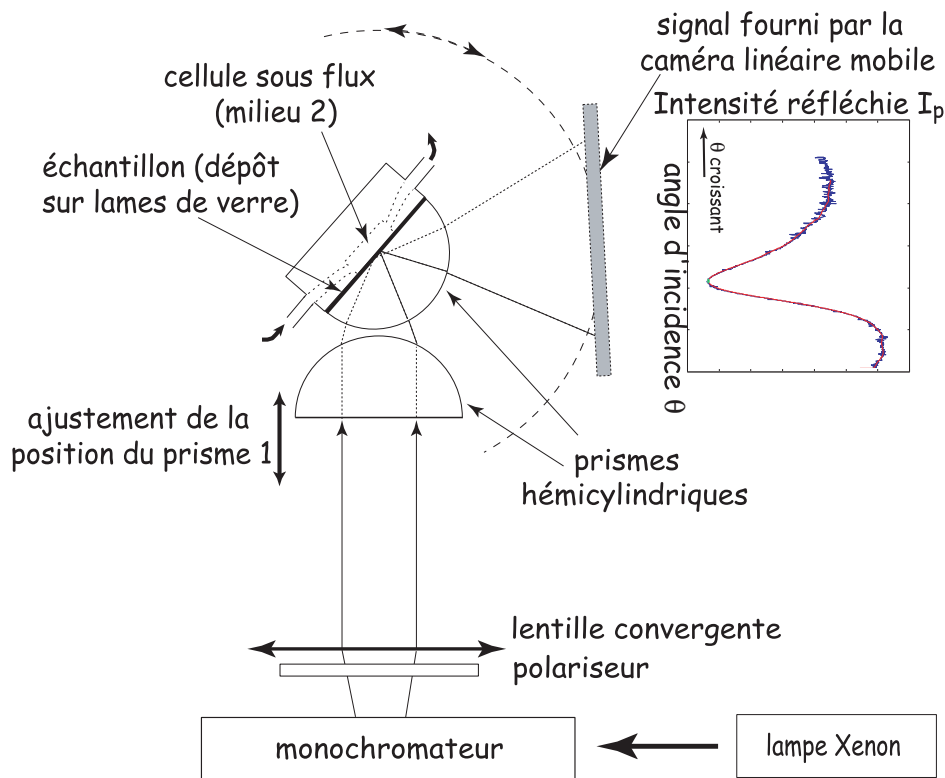


FIG. 4.2 – Schéma de principe du montage expérimental.

Les deux prismes hémicylindriques sont taillés dans le même cylindre de BK7 ( $n_v = 1.515$ ). Le premier permet de faire arriver sur la surface étudiée un faisceau présentant une dispersion angulaire. En faisant tourner le second cylindre autour de son axe, on peut centrer le minimum de réflectivité correspondant au plasmon, au centre du détecteur. Les mouvements du prisme 2 et du photodétecteur sont circulaires et motorisés avec une précision au centième de degré pour le moteur du prisme (figures 4.2 et 4.3).

Le détecteur utilisé est une caméra linéaire N-MOS de 1024 pixels (Hamamatsu S3904-1024Q). Elle permet de faire l'observation sur une ouverture angulaire réglable selon la distance à l'axe du prisme 2. Nous nous plaçons de telle sorte que cette ouverture soit de  $\pm 5^\circ$  autour du minimum (soit une fenêtre angulaire de  $10^\circ$ ). Comme nous travaillons à intensité incidente fixée, nous parlerons dans toute la suite de réflectivité, même si la mesure porte en réalité sur l'intensité réfléchie. Pour des comparaisons quantitatives, nous rapporterons, sauf cas exceptionnel, les intensités mesurées en polarisation  $p$  à celles mesurées en polarisation  $s$ .

La carte d'acquisition assurant la conversion analogique-numérique et le transfert des données vers l'ordinateur limite la fréquence d'acquisition à quelques kHz. Ces fréquences sont trop lentes si l'on veut accéder aux dynamiques enzymatiques les plus rapides. En effet, les constantes de vitesse  $k_{cat}$  associées au fonctionnement des enzymes peuvent avoisiner  $10 \mu s$  (tableau 1.2 du chapitre 1).

En se limitant à la seule observation du minimum et en remplaçant la barette N-MOS par une diode à quadrants, on pourrait atteindre de telles vitesses d'acquisition. Ce dispositif est en cours de réalisation.

Le second prisme a été tronqué de telle sorte que les lames de verre sur lesquelles sont effectués les dépôts et accrochages, reconstituent exactement le demi-cylindre. Un liquide d'adaptation d'indice est interposé entre le prisme et la lame, l'ensemble étant ensuite maintenu au moyen de deux bagues.

La distance entre les axes des deux prismes optimise la focalisation sur la partie plane du cylindre reconstitué. Sur cette face de la lame de verre, nous avons déposé par évaporation thermique un film d'environ 50 nm d'or, à la surface duquel vont se propager les plasmons. Les échantillons utilisés seront des dépôts de 3 sortes : or seul, or et SAM ou or, SAM et protéines accrochées sur la SAM.

Ces échantillons sont disposés en regard d'une cellule creusée dans le support du prisme, et alimentée par un flux de solution grâce à une pompe de précision (Pharmacia P-500). Les flux accessibles vont de 1 à 500 mL/h et on peut également injecter quelques centaines de microlitres de solution dans le réservoir en un temps de l'ordre de la seconde. Ce dispositif permet en première approximation, un mélange efficace du contenu du réservoir lors de l'injection.

### *Réglage du zéro*

Afin d'exploiter le profil plasmon dans son intégralité, il faut pouvoir déterminer la position angulaire absolue du minimum avec au moins la précision de la mesure plasmon. Dans ce but, nous utilisons un montage interférométrique à division d'amplitude (principe du Michelson, fig. 4.3).

On observe sur l'écran une figure d'interférences résultant de la superposition cohérente des ondes réfléchies sur le miroir  $M_1$  et sur la surface d'or. La surface métallique joue ici le rôle du miroir  $M_2$  dans le montage usuellement rencontré sur les Michelson. On parle de dispositif interférentiel à division d'amplitude car au niveau du cube séparateur, une partie de l'onde incidente est transmise (vers  $M_2$ ) et une partie, réfléchie vers  $M_1$ . La figure d'interférence obtenue permet d'ajuster la position angulaire du prisme 2 autour d'un axe vertical (perpendiculaire au plan de la figure ci-dessus).

On suppose implicitement que la plaque supportant le dépôt d'or est rigoureusement perpendiculaire au plan de la figure 4.3. En réalité, le support du prisme tel qu'il a été conçu ne permet pas de réaliser un réglage fin selon les deux autres directions. Cela pénalise la précision du réglage et nous empêchera de comparer les positions des minima entre deux échantillons différents. C'est une des améliorations portées sur un nouveau dispositif actuellement en cours de test.

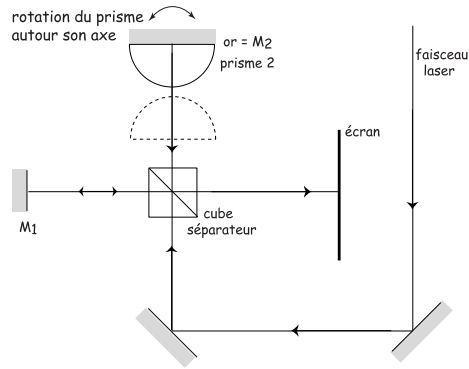


FIG. 4.3 – Schéma de principe du réglage du zéro. Il se fait en l'absence du prisme 1 qui est représenté afin de situer ce réglage par rapport au montage général (fig. 4.2).

Toutes les exploitations concerneront les déplacements du minimum de réflectivité relatifs à sa position en début d'expérience. De plus, pour mettre en évidence la contribution des protéines dans les signaux mesurés, nous comparerons systématiquement les résultats obtenus en présence de la SAM, avec et sans protéines.

Lorsque l'onde est polarisée  $s$  (champ électrique normal au plan d'incidence), on n'observe pas de diminution de la réflectivité. Ce signal est utilisé pour diminuer le bruit sur la mesure, dû aux différents éléments d'optique (lentilles, prismes) utilisés. Nous montrons ci-dessous un signal mesuré avec une onde polarisée  $p$  (a) et le signal corrigé (b). La correction consiste à faire le rapport des intensités (qui s'identifie au rapport des réflectivités  $\mathcal{R}_p$  et  $\mathcal{R}_s$ ), puis à diviser ce rapport par un facteur qui dépend de la longueur d'onde. On le mesure en l'absence de surface métallique, au-delà de l'angle de réflexion totale. Le rapport des intensités  $I_p$  et  $I_s$  reçues par le détecteur dans ce cas, ne vaut pas 1. Nous indiquons dans le tableau 4.1, les valeurs de ce coefficient correctif moyen selon la longueur d'onde (évalué d'après trois séries de mesure). Ces facteurs seront utilisés pour tous les profils expérimentaux présentés dans la suite.

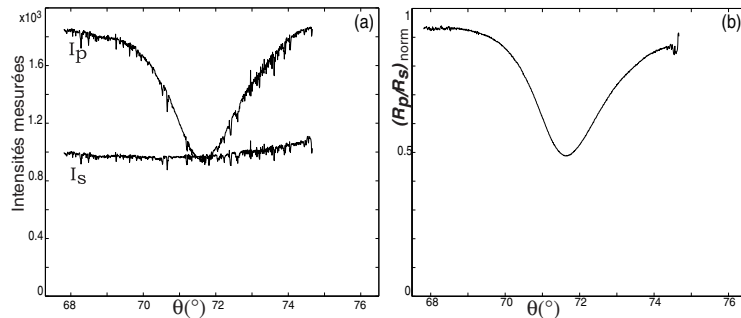


FIG. 4.4 – Profils plasmons : (a) données brutes en polarisation  $p$  et  $s$  et (b) rapport  $I_p/I_s$  corrigé.

$\lambda(\text{nm})$	676.4	647.1	632.8	568.2	530.9
facteur correctif	$1.9 \pm 0.1$	$1.83 \pm 0.01$	$1.80 \pm 0.01$	$1.65 \pm 0.03$	$1.6 \pm 0.1$

TAB. 4.1 – Facteurs correctifs du rapport  $I_p/I_s$  permettant de calculer  $(\mathcal{R}_p/\mathcal{R}_s)_{\text{norm}}$ .

## 4.2 Surfaces testées

Dans cette partie, nous commençons par présenter le protocole détaillé de l'accrochage des protéines, avant de revenir sur chacune des étapes. Sur des surfaces de verre préalablement nettoyées avec soin, nous réalisons un dépôt d'or par évaporation thermique. Les échantillons obtenus sont ensuite directement plongés dans une solution permettant la synthèse d'une monocouche auto-assemblée (SAM). A cette étape, les échantillons peuvent être conservés plusieurs semaines à l'abri de la poussière. L'accrochage des protéines sur la SAM est effectué juste avant chaque expérience de résonance de plasmons.

### 4.2.1 Protocole d'accrochage des protéines sur les dépôts d'or par l'intermédiaire d'une monocouche auto-assemblée

#### Nettoyage des supports en verre (lames de microscopes, lamelles pour l'étude spectrophotométrique)

##### Produits :

- Decon 90
- eau distillée

##### Mode opératoire :

- Préparer une solution à 2% de Decon (tensioactifs). Cette solution se garde aisément.
- Faire tremper les lames ou lamelles 8 à 10 h dans cette solution sous agitation douce.
- Réaliser deux ou trois rinçages à l'eau distillée sous agitation douce pendant 1/2h à 1h. Deux rinçages suffisent si on n'observe pas de persistance de bulles à la surface de l'eau (il reste alors peu de tensioactifs en solution)
- Faire un dernier rinçage abondant des lames (lamelles), une à une à la pissette avec de l'eau ultrapure
- Sécher les lamelles à l'éthanol et au pistolet à air comprimé filtré.

#### Dépôt d'or et SAM

- dépôt d'or par évaporation thermique : la pression en début d'évaporation est d'environ  $5 \cdot 10^{-9}$  bars et ne dépasse jamais  $10^{-8}$  bars. On dépose entre 45 et 50 nm d'or à 0.02-0.03 nm/s.
- à la fin du dépôt, plonger immédiatement les échantillons dans une solution millimolaire d'acide mercapto-hexadécanoïque, préalablement dégazée sous argon pendant au moins 30 minutes.
- laisser agir à température ambiante pendant toute la nuit.
- éliminer les molécules physisorbées par passage aux ultrasons pendant moins d'une minute.  
**Attention :** selon le degré de propreté des lames, le dépôt d'or est plus ou moins fragile. Cette étape est délicate car le dépôt peut se décoller (en cas d'ultrasons trop puissants).
- rincer à l'éthanol absolu et sécher à l'air comprimé filtré.



## Accrochage des protéines

Dans toute la suite le tampon de dilution des différents produits est un tampon phosphate (50 mM de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  soit 6,8 g pour 1 L de solution, pH ramené à 7.5 par une solution de soude NaOH 4N)

### Produits utilisés

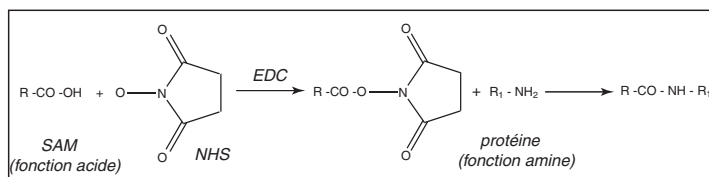
- N-hydroxysuccinimide (NHS)
- N-éthyl-N'-(diméthylaminopropyl)carbodiimide (EDC)
- triéthanolamine

### Protocole

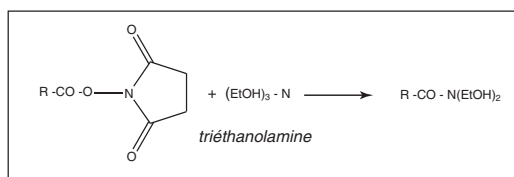
(inspiré de [77], quantités des solutions d'activation et de neutralisation indiquées pour une plaque du dispositif expérimental de SPR)

#### ● accrochage non orienté (par les lysines)

- tremper les surfaces fonctionnalisées (par la SAM) dans le tampon phosphate pendant la préparation du mélange NHS/EDC
- Préparer séparément 2 tubes dont un contenant 8 mg de NHS dans 1 mL de tampon, et l'autre 70  $\mu\text{L}$  d'EDC dans 1 mL de tampon. Remplacer le tampon par le mélange des deux tubes, homogénéisé avant d'être mis en présence de la SAM : c'est l'étape d'activation des fonctions acides. On augmente ainsi la réactivité de la couche vis-à-vis des fonctions amines des protéines.
- Remplacer la solution d'activation par une solution de protéines (dilution entre 1/100 et 1/1000). Laisser tremper au moins deux heures à 4°C.



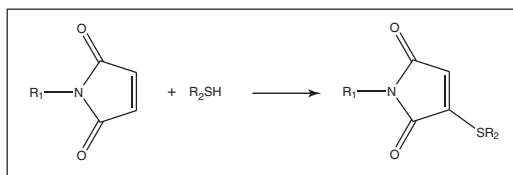
- Remplacer la solution précédente par la solution de neutralisation : 30  $\mu\text{L}$  de triéthanolamine dans 2 mL de tampon.



- Rincer abondamment au tampon et utiliser l'échantillon le plus rapidement possible.

#### ● accrochage orienté (par les cystéines)

Dans le protocole précédent, on remplace le NHS par le maléimide et la réaction de fixation de la protéine se fait par sa fonction cystéine (il n'y en a qu'une dans le cas des protéines mutées).



## 4.2.2 Dépôts d'or

On dépose usuellement une couche de quelques nanomètres de chrome entre le verre et le dépôt d'or, afin de rendre l'accrochage plus résistant. Dans le but de réaliser *in fine* des paramétrages des courbes de plasmons, nous avons décidé de nous affranchir du dépôt de chrome. La manipulation des échantillons requiert alors plus de minutie après l'évaporation, et une plus grande propreté des lames de verre utilisées pour le dépôt.

Les surfaces d'or continuent à évoluer après l'évaporation. A moins de vouloir les caractériser et les utiliser directement sur le montage optique, nous les plongeons au sortir de l'évaporation dans la solution de préparation de la SAM.

Nous présentons sur la figure 4.5, quelques mesures expérimentales de plasmons sur de l'or nu, réalisées à différentes longueurs d'onde. Les profils théoriques  $\mathcal{R}_p/\mathcal{R}_s$  obtenus pour un système de couches planes, sont donnés à titre de comparaison (fig. 4.6).

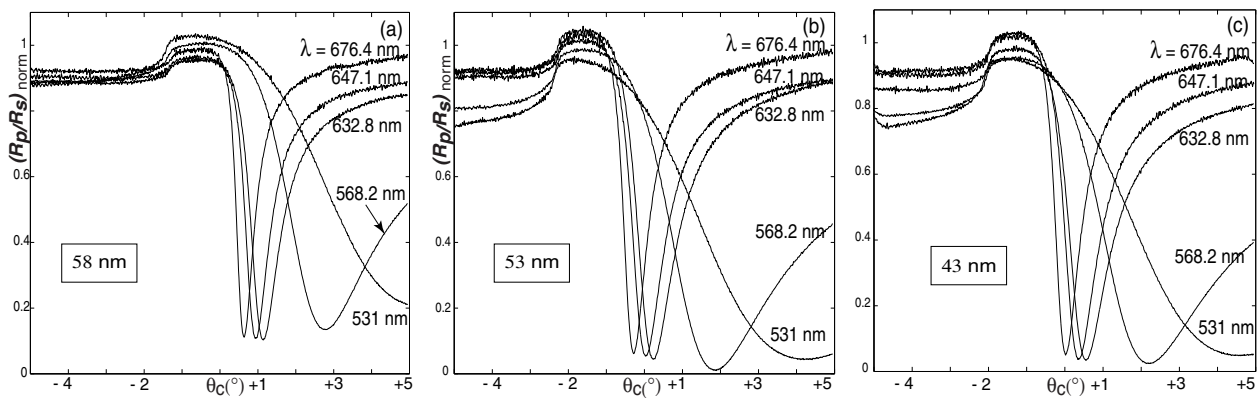


FIG. 4.5 – Profils plasmons expérimentaux dans l'air, sur dépôts d'or seul d'épaisseur (a) 58 nm, (b) 53 nm, (c) 43 nm.

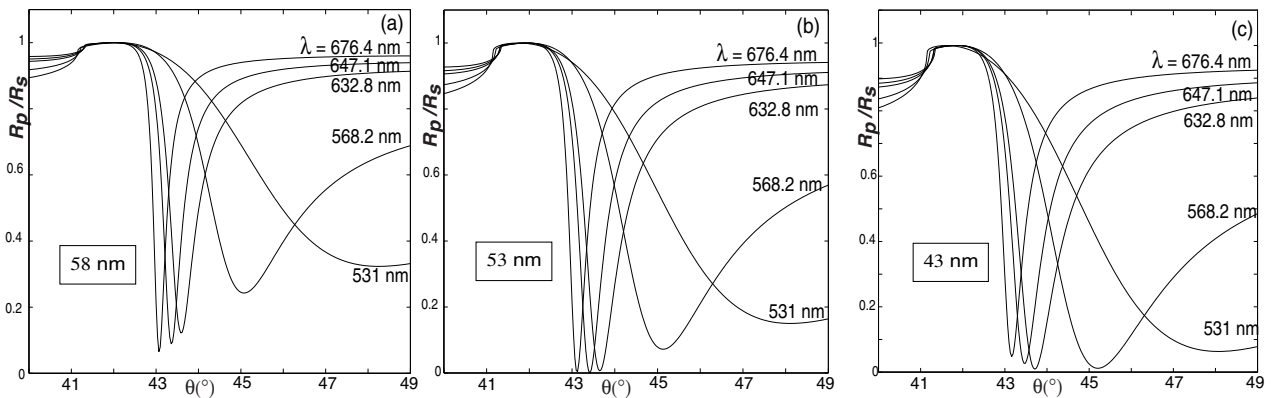


FIG. 4.6 – Profils plasmons théoriques dans l'air pour une couche d'or plane d'épaisseur (a) 58 nm, (b) 53 nm, (c) 43 nm.

Ces expériences ont guidé nos choix quant à l'optimisation du dépôt et la mise au point d'un protocole reproductible au niveau de la réponse plasmon.

Les épaisseurs indiquées sur chacun des graphes résultent du meilleur compromis entre les courbes expérimentales et les courbes théoriques pour les 5 longueurs d'onde utilisées.

Pour l'expérience correspondant à une épaisseur d'or de 58 nm (graphe (a), fig. 4.5), on observe comme prédit par la théorie, la remontée du minimum de réflectivité. Cet effet est nettement moindre pour les deux autres courbes. Les dépôts réalisés par la suite, vont tous correspondre à des épaisseurs d'or comprises entre 43 et 50 nm.

Un optimum de la résonance de plasmon se manifeste par une plus faible valeur de  $\mathcal{R}_{pmin}$ . Nous observons sur le graphe (b) que la valeur de  $\mathcal{R}_{pmin}$  est plus faible à 568.2 nm qu'à 676.4 nm. C'est la raison pour laquelle nous limiterons l'épaisseur de dépôt à 50 nm. Le paramétrage se fait essentiellement grâce aux longueurs d'onde les plus élevées (676.4, 647.1 et 632.8 nm). Une correspondance parfaite pour 568.2 et 530.9 nm conduit à des valeurs incohérentes de l'épaisseur d'or.

Nous avons fait le choix de travailler à 676.4 nm, afin de ne pas être limités, en solution aqueuse, par l'angle maximal d'incidence accessible expérimentalement. Le choix de cette longueur d'onde présente un double intérêt : le pic est plus fin et la résonance est observée pour des angles d'incidence plus faibles.

La figure 4.7 ci-dessous présente les mesures expérimentales dans l'eau pure, réalisées sur les mêmes échantillons que les profils de la figure 4.5, ainsi que les profils théoriques correspondants.

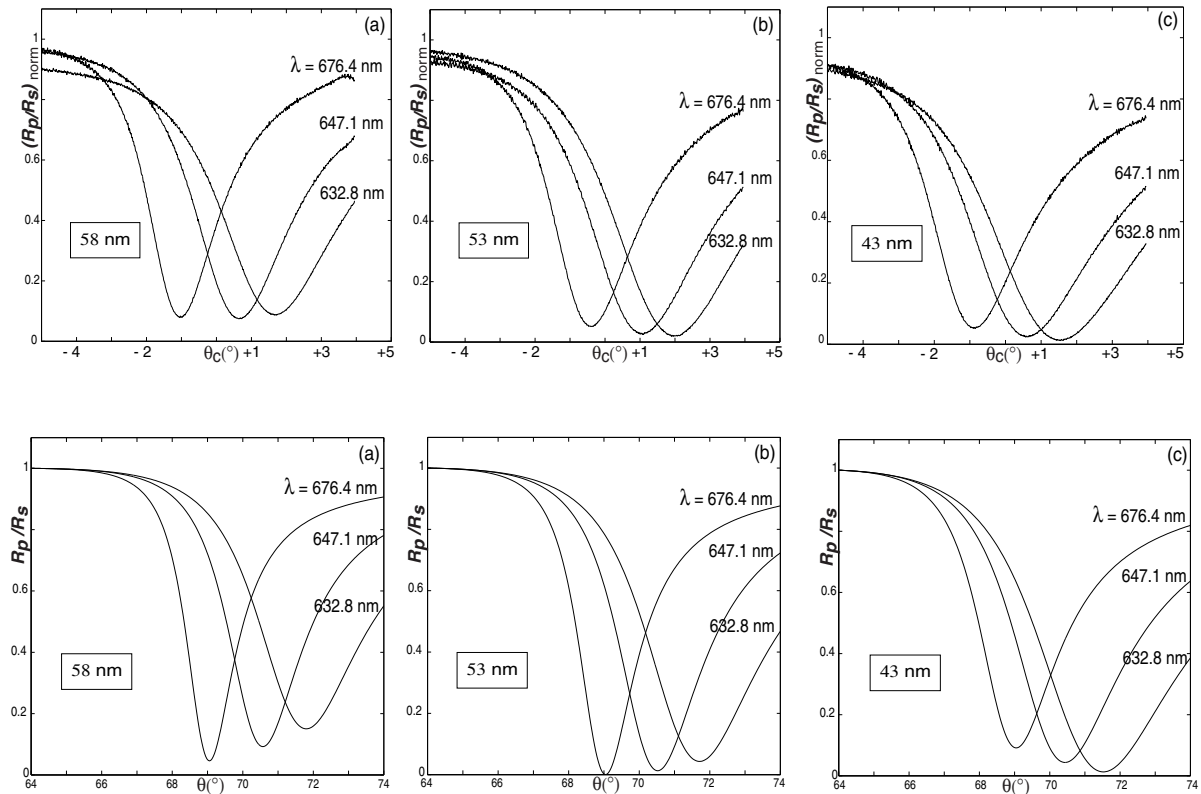


FIG. 4.7 – Profils plasmons expérimentaux (rangée supérieure) et théoriques (rangée inférieure), dans l'eau pure sur dépôts d'or seul d'épaisseur (a) 58 nm, (b) 53 nm, (c) 43 nm.

Nous remarquons immédiatement que le pic est beaucoup plus large que dans l'air et que la résonance a lieu pour des angles d'incidence plus importants. De l'ordre de 43° dans l'air, il vaut environ 70° dans l'eau. Pour les longueurs d'onde les plus faibles ( $\lambda = 568.2$  nm et 530.9 nm), le pic s'élargit encore et finit par ne plus être perceptible.

### Remarques

L'angle central  $\theta_c$  des courbes de réflectivité présentées ici, correspond à l'angle sur lequel on règle le centre du détecteur pour la plus grande longueur d'onde ( $\lambda = 676.4$  nm). On ne modifie plus ensuite les positions des moteurs pour les mesures aux différentes longueurs d'onde.

Nous estimons les résonances observées et l'accord avec les prédictions théoriques satisfaisantes dans l'air (tout au moins pour les longueurs d'onde les plus grandes, fig. 4.8). Nous n'avons pas fait varier davantage l'épaisseur d'or. Si l'on diminuait encore l'épaisseur du dépôt, la contribution  $\Gamma_{\text{rad}}$  associée à la conversion d'énergie des plasmons vers les photons deviendrait non négligeable. Nous savons, d'après l'approche théorique précédente que ce phénomène détériore la résonance, l'intensité détectée par le capteur augmentant avec  $\Gamma_{\text{rad}}$ , y compris à la résonance.

### *Retour sur l'évaluation de l'épaisseur d'un dépôt d'or*

Les figures 4.8 et 4.9 présentent la superposition des courbes de réflectivité théorique et expérimentale, pour le dépôt de 43 nm et les longueurs d'onde les plus grandes. Nous y avons laissé la courbe correspondant aux données expérimentales non décalées (courbes 1 des figures), pour montrer que l'écart angulaire par rapport au résultat théorique évolue peu avec la longueur d'onde. Un décalage a été rajouté de manière à faire correspondre la position des minima. D'autre part, nous avons ramené les réflectivités maximales des deux courbes à 1, afin d'en faciliter la comparaison.

L'accord entre les profils théoriques et expérimentaux n'est pas parfait. Néanmoins, on retrouve expérimentalement l'évolution du minimum de réflectivité avec la longueur d'onde (à une constante près), et l'allure du profil sur l'ouverture angulaire expérimentale.

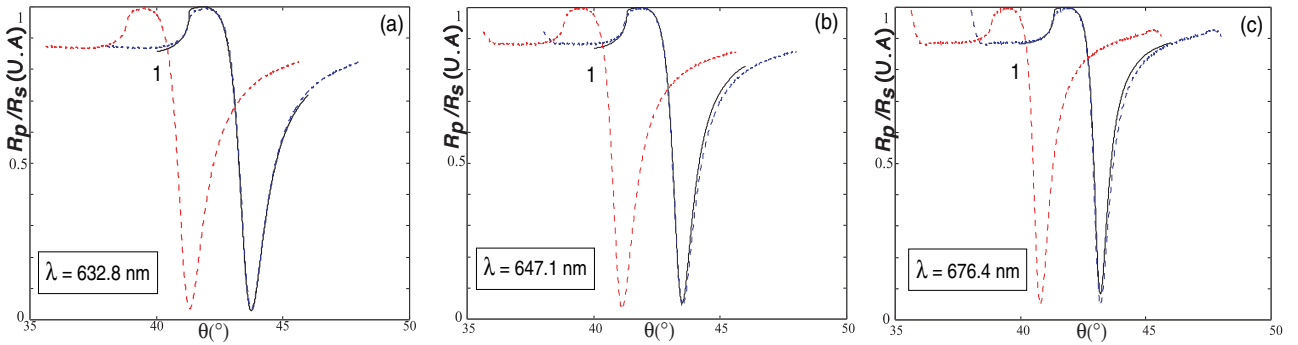


FIG. 4.8 – Paramétrage des profils plasmons expérimentaux dans l'air, sur dépôts d'or seul. Les courbes théoriques (trait continu) sont obtenues pour  $n_v = 1.515$  et une épaisseur d'or de 43 nm, et à (a) 632.8 nm, (b) 647.1 nm, (c) 676.4 nm (valeurs des constantes diélectriques fournies par Johnson & Christie, annexe E.2).

Nous constatons que l'accord entre le modèle sans rugosité et les mesures expérimentales se dégrade lorsque l'on se place dans l'eau pure (fig. 4.9). On peut se demander si cette différence n'est pas imputable au vieillissement de la surface sur le temps d'une expérience dans l'air. Cette hypothèse est réfutée par la reproductibilité des expériences dans l'air sur des temps suffisamment longs.

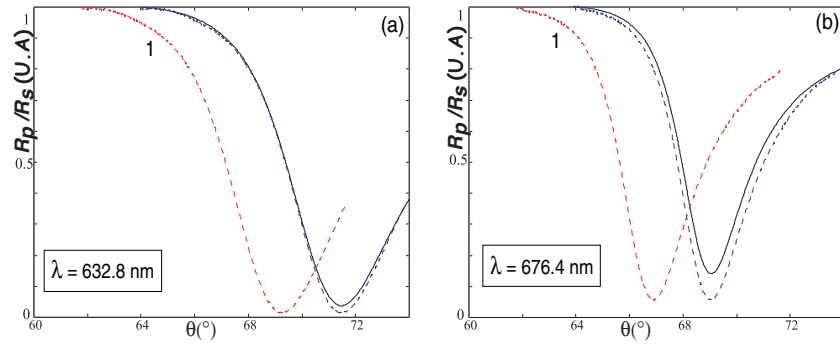


FIG. 4.9 – Paramétrage des profils plasmons expérimentaux dans l'eau, sur dépôts d'or seul. Les courbes théoriques (trait continu) sont obtenues pour  $n_v = 1.515$  et une épaisseur d'or de 43 nm, et à (a) 632.8 nm, (b) 676.4 nm,. Les valeurs de constantes diélectriques sont celles de Johnson & Christie (voir annexe E.2).

L'influence de la rugosité semble une hypothèse séduisante. Cependant, pour la tester, il faudrait pouvoir contrôler précisément cette rugosité de la surface. On pourrait par exemple réaliser des « marches » sur la surface par des techniques de photolithographie ou y coller des billes polymères. On déposerait ensuite un film d'or sur cette surface à la rugosité imposée. Nous n'avons pas essayé de développer cette idée, mais des expériences similaires sont rapportées dans la littérature [74].

Nous n'avons pas poussé plus loin la modélisation des profils expérimentaux. Dans toute la suite nous nous intéressons à l'évolution temporelle du minimum de réflectivité. Il est clair que nous réduisons de la sorte le potentiel informatif des mesures réalisées mais l'exploitation des courbes  $\theta_p(t)$  se révèle déjà très riche.

Nous montrerons toutefois comment la prise en compte de la rugosité dans une modélisation *ad hoc* du plasmon, permet de rendre compte de la grande sensibilité de la SPR.

### 4.2.3 Intermédiaire d'accrochage : monocouche auto-assemblée (SAM)

L'organisation de molécules d'alkanethiols sur une surface d'or se rapproche de celle de tensioactifs à l'interface air/eau. Les molécules de tensioactifs possèdent une partie hydrophile A et une partie hydrophobe B, souvent une longue chaîne alkyle. On parle de molécules amphiphiles qui auront tendance à s'organiser de façon à présenter la partie A à l'eau et la partie B à l'air.

On obtient une monocouche de tensioactifs à l'interface air/eau, dont l'organisation dépend des interactions hydrophobes entre les chaînes alkyles. Ces interactions augmentent avec la longueur de la chaîne et le nombre de molécules, les chaînes se rapprochant lorsque la densité de la couche augmente.

Ce comportement se retrouve dans les couches auto-assemblées d'alkanethiols [78] dont la partie B est une chaîne alkyle. Il se forme entre le soufre de la fonction thiol -SH et l'or une liaison d'énergie comparable à celle d'une liaison covalente et qui stabilise la couche de molécules auto-assemblées.

Notre choix s'est porté sur la molécule d'acide mercapto-hexadécanoïque commerciale (Aldrich) et représentée sur la figure 4.10. Elle possède une longue chaîne alkyle (15 atomes de carbone) terminée par une fonction acide. L'accrochage de la protéine par une ou plusieurs liaisons covalentes résultera de la réaction entre ces fonctions -COOH activées chimiquement par le mélange NHS/EDC et les fonctions amines (-NH<sub>2</sub>) des lysines de la protéine.

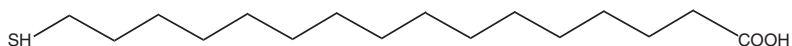


FIG. 4.10 – Molécule d'alkylthiol fonctionnalisée choisie.

Des études de microscopie par effet tunnel permettent de mettre en évidence la corrélation entre la structure cristalline de l'or sous-jacent et l'organisation de la monocouche [78]. C'est un aspect qui n'existe bien sûr pas dans le cas des tensio-actifs organisés à l'interface air/eau.

#### *Caractérisation de la SAM*

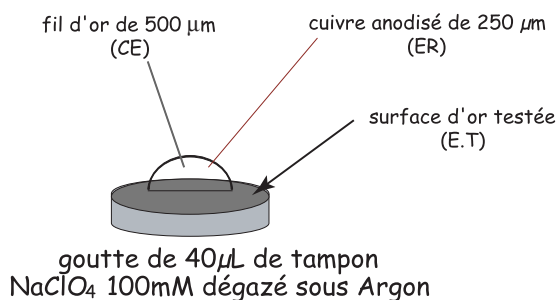


FIG. 4.11 – Montage 3 électrodes de voltamétrie cyclique.

Afin de tester l'homogénéité de la monocouche formée, nous avons réalisé des mesures de voltamétrie cyclique pilotées par un potentiostat (Princeton Applied Research 203). Cette mesure consiste à imposer un potentiel entre l'électrode travail notée E.T, ici la surface d'or testée, et une électrode de

référence (fig. 4.11). L'électrode de référence est un fil de cuivre anodisé, c'est-à-dire recouvert d'une fine couche d'oxyde. On mesure le courant circulant dans le circuit formé par l'électrode de travail, la contre-électrode (C.E, ici un fil d'or) et la solution électrolytique (tampon  $\text{NaClO}_4$  100 mM). La solution tampon est dégazée afin de limiter le signal correspondant à la réduction de l'oxygène. On commence à le percevoir sur la partie des courbes correspondant aux potentiels négatifs

Dans le cas de l'or nu, avant formation de la monocouche, on observe une vague d'adsorption (encadré fig. 4.12) des ions  $\text{ClO}_4^-$  du tampon pour des potentiels de l'ordre de 300 mV mesuré par rapport à une électrode au calomel saturé (ECS). Une vague de désorption apparaît lorsque l'on diminue ensuite le potentiel au cours du balayage.

Les anions sont attirés à la surface de l'électrode de travail quand son potentiel prend des valeurs positives ; inversement ils seront repoussés quand on diminuera ce potentiel.

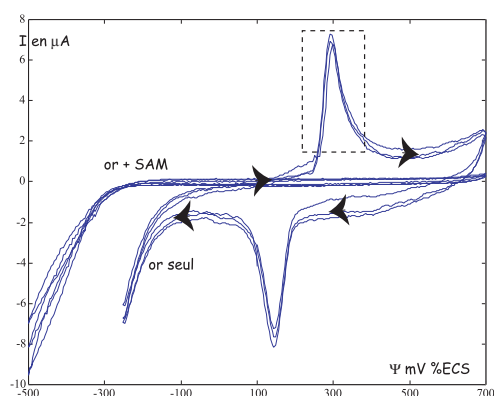


FIG. 4.12 – Voltammogrammes comparés de l'or nu et de l'or recouvert d'une monocouche auto-assemblée (SAM). Balayage cyclique à 100 mV/s.

La SAM va isoler la surface d'or de la solution. Elle va donc y diminuer le champ électrique et limiter l'approche des anions du tampon : le courant dans le circuit diminue. Le pic d'adsorption détecté en présence de la SAM n'est pas réduit à zéro du fait des défauts de la monocouche, mais il est atténué d'un facteur 40.

Ce résultat est très satisfaisant. La SAM nous permettra non seulement d'accrocher la PGK, mais aussi d'éviter les interactions directes avec l'or. En effet, si l'on met les protéines directement en présence de la surface d'or, elles ont tendance à se dénaturer sur la surface. Elles perdent leurs structures secondaire et tertiaire et se comportent comme des polymères ordinaires. Nous voulons accéder au comportement dynamique de ces molécules et donc éviter cette dénaturation.



## 4.2.4 Accrochage des protéines

### Caractérisation de l'accrochage des protéines par microscopie à force atomique (AFM)

Ce sont, avant tout, le côté pratique (pas de préparation particulière des échantillons pour la visualisation) et les performances (haute résolution spatiale, de l'ordre du nanomètre) de cette technique, qui font de la microscopie à force atomique un outil de choix. En particulier, nous avons pu tester l'effet de la concentration des solutions protéiques utilisées pour l'accrochage, ainsi que la « reproductibilité » de cet accrochage. Enfin, les résultats préliminaires d'un accrochage orienté sont encourageants du point de vue des images AFM, même si la robustesse du protocole n'a pas pu être éprouvée.

Toutes les images présentées ont été réalisées en *tapping mode* (TM), en milieu liquide. En effet, la formation de cristaux de sel lors du séchage du tampon (pH et force ionique physiologiques) altèrent les images et nous a conduit à rester dans ce milieu liquide pour imager les échantillons. On visualise ainsi les protéines dans un environnement qui leur permet de conserver des conformations proches de celles qu'elles adoptent *in vivo*. Les contraintes associées au séchage tendent à compacter les protéines et peuvent par conséquent, modifier considérablement leur organisation spatiale. Nous ne montrons ici que quelques images démonstratives et reflétant les effets observés le plus souvent. L'échelle de gris utilisée (échelle de hauteur) est commune à toutes les images présentées afin d'en faciliter la comparaison. Les points brillants correspondent aux altitudes les plus élevées.

#### Comparaison des surfaces aux différentes étapes de préparation des échantillons.

Les images de taille  $2\mu\text{m} \times 2\mu\text{m}$  nous permettent de vérifier l'homogénéité des échantillons à « grande échelle ». On ne remarque pas de différence majeure entre les 3 images ci-dessous, correspondant au dépôt d'or seul (a), à la surface après ajout de la monocouche auto-assemblée (SAM) (b) et enfin, après accrochage de la protéine sur la SAM (c). On note néanmoins qu'en présence de protéines, il peut y avoir de petits agrégats (indiqué par une flèche sur la figure 4.13(c)), que l'on n'observe pas aux étapes précédentes de l'accrochage. Ces agrégats restent tout de même suffisamment petits et peu nombreux pour valider le protocole (on trouve en moyenne au plus un de ces agrégats par image de taille  $2\mu\text{m} \times 2\mu\text{m}$ , quand on balaye la surface de l'échantillon).

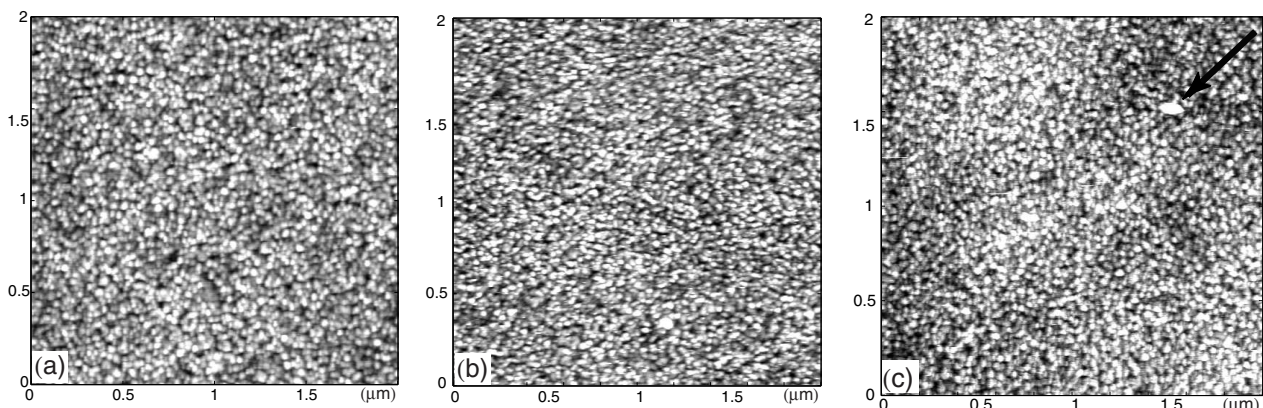


FIG. 4.13 – Images AFM (TM)  $2\mu\text{m} \times 2\mu\text{m}$ , dans du tampon phosphate (50 mM, pH=7.5) de (a) l'or seul, (b) la surface or + SAM, (c) la surface or + SAM + PGK. Echelle de gris :  $\Delta z = 10$  nm.



Lorsque l'on explore des échelles plus petites (400 nm x 400 nm), les différences entre les images en présence et en absence de protéines ressortent nettement (figure 4.14). Ces dernières apparaissent comme de « petites boules » posées sur les structures des deux images précédentes (fig 4.14(c)).

Afin de mieux visualiser ces différences, on réalise des coupes des images considérées (figure 4.14). On remarque qu'à ces échelles, la surface d'or est très rugueuse. Cette rugosité va influencer le profil SPR, comme nous l'avons souligné lors de la présentation des plasmons.

La présence de la SAM, dont l'épaisseur vaut quelques nanomètres, ne change pas considérablement la largeur à mi-hauteur des pics, évaluée sur les deux surfaces le long d'une coupe. Cette couche a tendance à suivre la rugosité de l'or : on observe peu de différences entre les coupes correspondant aux images (a) et (b) de la figure 4.14.

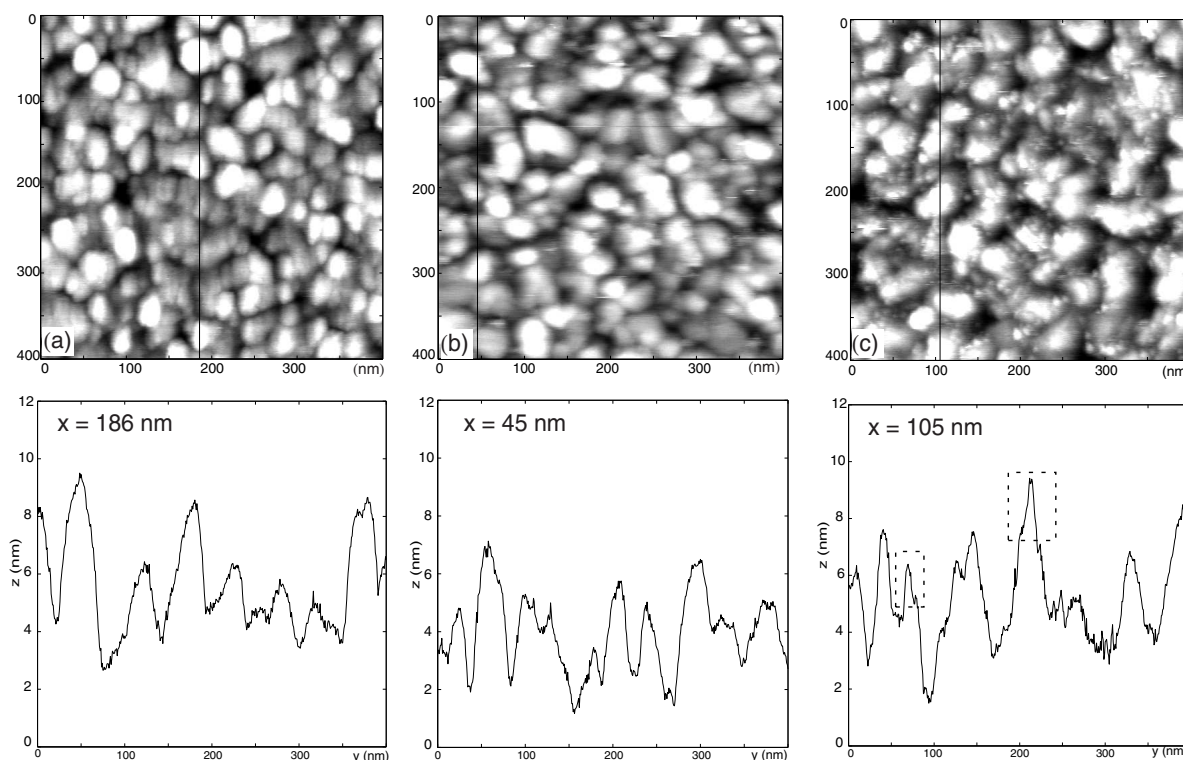


FIG. 4.14 – Images AFM (TM) 400 nm x 400 nm, dans du tampon phosphate (50 mM, pH=7.5) de (a) l'or seul, (b) la surface or + SAM, (c) la surface or + SAM + PGK, et coupes associées. Echelle de gris :  $\Delta z = 10$  nm.

Sur la figure 4.14(c), on observe des pics plus fins, caractéristiques des protéines que l'on a accrochées à la SAM par un lien covalent. La largeur de ces pics, dont deux exemples sont encadrés sur la figure, est généralement de l'ordre de 10 nm (fig. 4.15 et 4.17) et peut atteindre 15 ou 20 nm.

On pourrait s'en étonner, la plus grande dimension des objets que l'on cherche à visualiser étant proche de 8 nm. Ce « grossissement » est directement lié à la taille de la pointe AFM qui permet de sonder la surface. En effet, les images résultent de la convolution de la taille effective des objets par celle de la pointe. Le rayon de l'extrémité est de l'ordre de quelques nanomètres pour une pointe neuve, mais celle-ci peut se détériorer rapidement dès qu'elle est utilisée. Si les dimensions de la pointe et de l'objet que l'on veut imager sont du même ordre de grandeur, on s'attend à ce que le profil effectif soit élargi d'un facteur 2 environ.

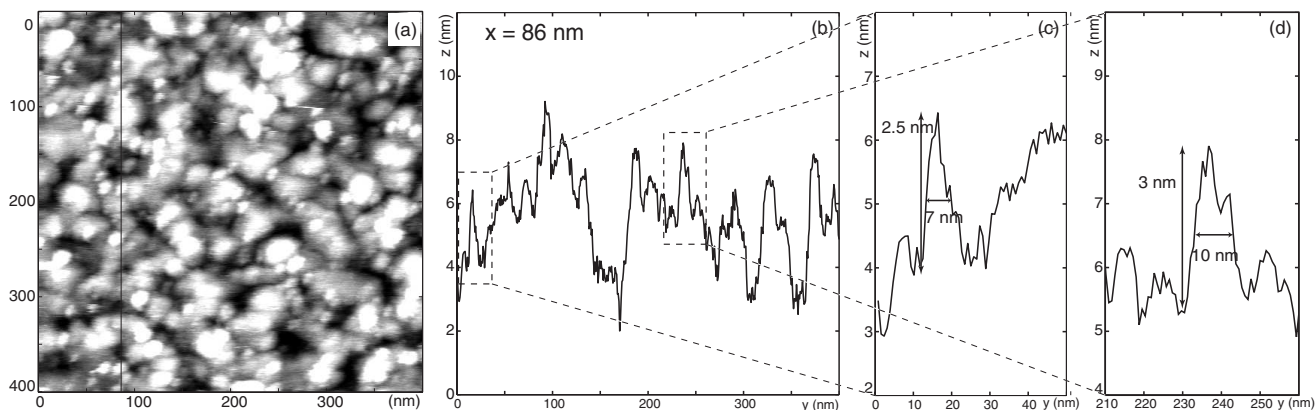


FIG. 4.15 – a) Image AFM (TM) 400 nm x 400 nm (tampon phosphate 50 mM, pH=7.5) de l'or + SAM + PGK, (b) coupe associée, (c) et (d) agrandissements du profil de hauteur. Echelle de gris :  $\Delta z = 10$  nm.

On choisit une image permettant d'isoler facilement ces pics fins du profil de hauteur (fig.4.15 b). De leurs amplitude et largeur à mi-hauteur, évaluées sur les agrandissements (fig.4.15 c et d), on déduit qu'ils sont associés à une ou deux molécules uniquement. Nous en déduisons que l'on obtient par ce protocole une monocouche non compacte de protéines, avec une densité relativement homogène. De plus, la hauteur des objets est souvent comprise entre 2 et 3 nanomètres, ce qui correspond à la plus petite dimension de la protéine (contenue dans un pavé d'environ 3 nm x 5 nm x 8 nm).

La PGK sauvage (par opposition à la mutée) se fixe préférentiellement « couchée » exposant ainsi un plus grand nombre de sites de fixation à la surface.

Afin de confirmer notre interprétation, on réalise des accrochages sur des surfaces de mica dont la planéité résulte du clivage des échantillons selon un plan atomique. Dans ce cas (fig. 4.16), seules les protéines (à l'intermédiaire d'accrochage près, responsable des petites fluctuations du niveau moyen) contribuent aux évolutions des profils de hauteur (fig. 4.16 b et c).

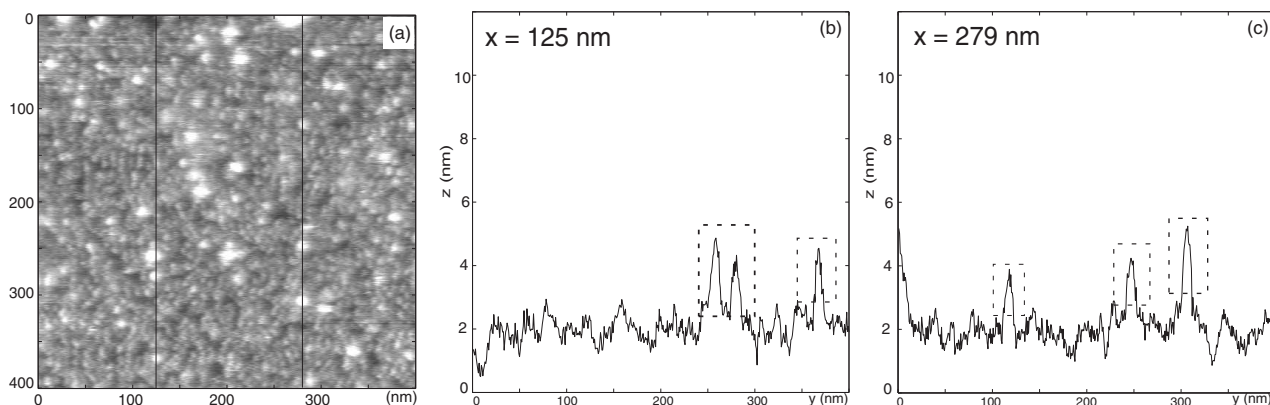


FIG. 4.16 – (a) Image AFM (TM) 400 nm x 400 nm, dans du tampon phosphate (50 mM, pH=7.5) du mica + SAM + PGK, (b) et (c) coupes associées. Echelle de gris :  $\Delta z = 10$  nm.

L'image 4.16 a été réalisée en *tapping mode* en milieu liquide pour observer la PGK accrochée sur une monocouche auto-assemblée de 3-mercaptopropyltriméthoxysilane (MPTS).

Nous retrouvons des pics (encadrés pointillés des figures 4.16 (b) et (c), figure 4.17), tout à fait similaires à ceux obtenus sur les surfaces d'or. Ils ont une hauteur de 2 à 3 nm et une largeur de 7 à 10 nm.

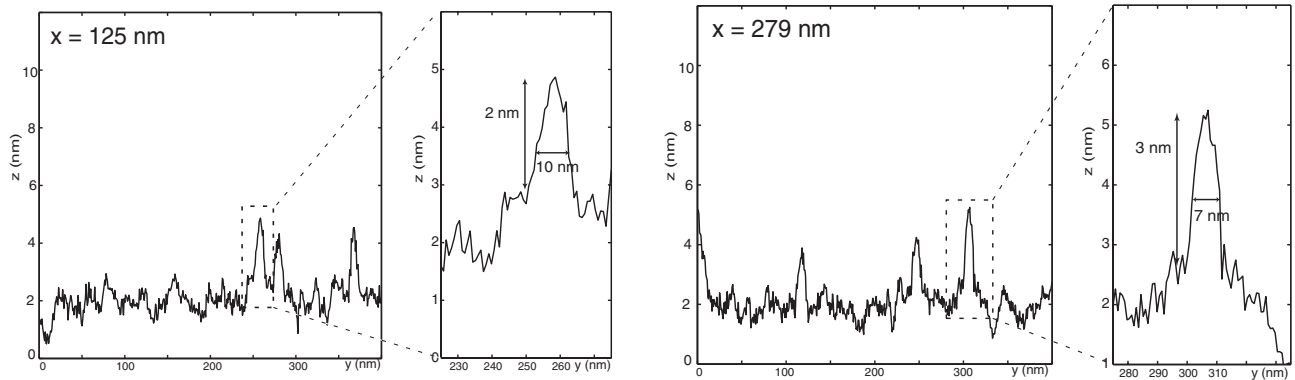


FIG. 4.17 – Agrandissements réalisés sur les coupes de l'image AFM de l'échantillon mica + SAM + PGK précédente.

### Autour du protocole

Sans avoir réalisé une étude systématique sur un grand nombre d'échantillons, nous présentons les images AFM après avoir :

- fait varier la concentration de la solution protéique utilisée lors de l'accrochage (en gardant constante la durée de cette étape)
- reproduit la totalité de la préparation des échantillons dans les mêmes conditions, depuis le rinçage des lames et le dépôt d'or jusqu'à l'accrochage de la protéine, pour en tester la robustesse

#### • Influence de la concentration de la solution d'accrochage

Nous avons dilué 100 ou  $10^3$  fois la solution-mère de protéines (de concentration 4.5 mg/mL environ, issue de la purification), pour réaliser la solution de trempage des surfaces d'or fonctionnalisées par la SAM (voir protocole, sec. 4.2.1). Toutes les autres étapes de la préparation des deux échantillons sont les mêmes. En particulier, le rinçage des lames, l'évaporation et la synthèse de la SAM ont été simultanés et/ou avec les mêmes solutions. Les préparations des deux échantillons ne diffèrent donc que par la dernière étape du protocole.

Dans les deux cas, les images « grande échelle » c'est-à-dire  $2\ \mu\text{m} \times 2\ \mu\text{m}$ , montrent une homogénéité de l'accrochage. Un exemple d'image AFM d'une couche de protéines accrochées avec une solution de trempage diluée  $10^3$  fois, a déjà été donné (fig. 4.14 c). Sur la figure 4.18, nous comparons les images  $400\ \text{nm} \times 400\ \text{nm}$  relatives aux deux accrochages.

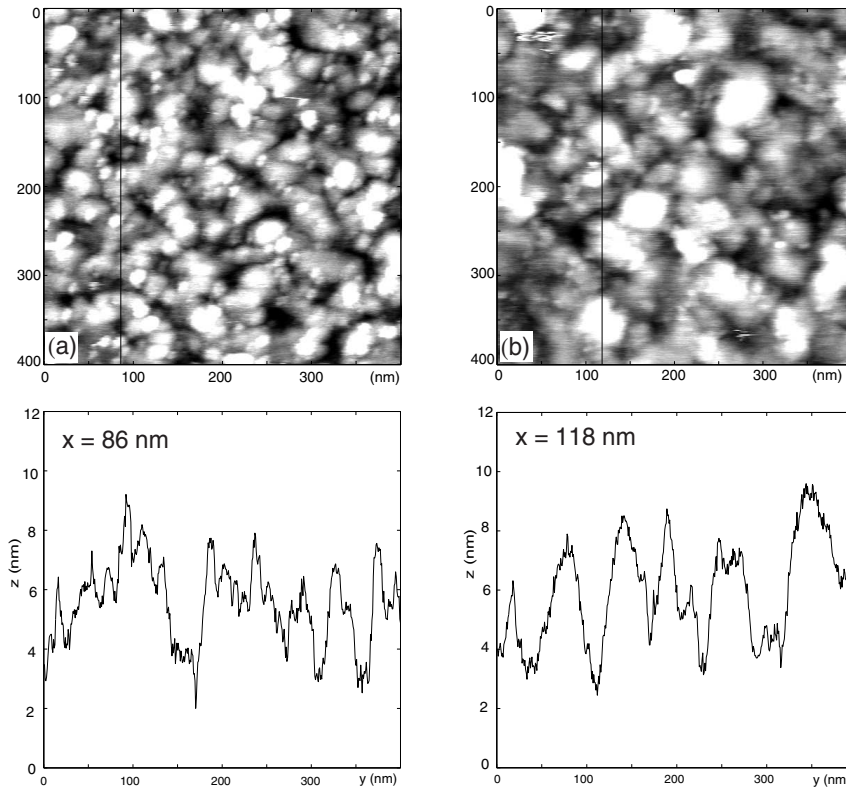


FIG. 4.18 – Comparaison de deux conditions d'accrochage grâce aux images AFM (TM) 400 nm x 400 nm, en tampon phosphate (50 mM, pH=7.5). (a) dilution  $10^{-3}$  et (b) dilution  $10^{-2}$  de la solution protéique. Echelle de gris :  $\Delta z = 10$  nm.

Dans le cas de la solution la plus concentrée (fig. 4.18(b)), on ne distingue pas d'objets d'aussi petite taille que sur la figure 4.18(a). L'aspect « granuleux » de cette image, reste cependant différent de celui des images où l'on a uniquement l'or et la SAM. En fait, on a plutôt des « îlots » de protéines (la hauteur reste à peu près inchangée), accrochés à la surface et on s'éloigne considérablement de la monocouche précédente.

En faisant une coupe de l'image, comme précédemment, on retrouve quelques pics aussi fins sur la figure (b) que sur la figure (a), mais ils sont beaucoup moins nombreux.

Nous avons essayé de prolonger l'accrochage dans la solution la plus diluée ou d'augmenter de façon moins drastique la concentration (essai avec une solution diluée 500 fois). Cependant on n'observe pas de remplissage progressif de la monocouche, mais plutôt du « tout ou rien ». Soit on se retrouve dans une situation très proche de celle de la figure 4.18(a), avec un accrochage homogène non compact, soit on retrouve des îlots de protéines, ce que l'on essaiera d'éviter.

- Comparaison de deux échantillons issus des mêmes conditions de préparation :

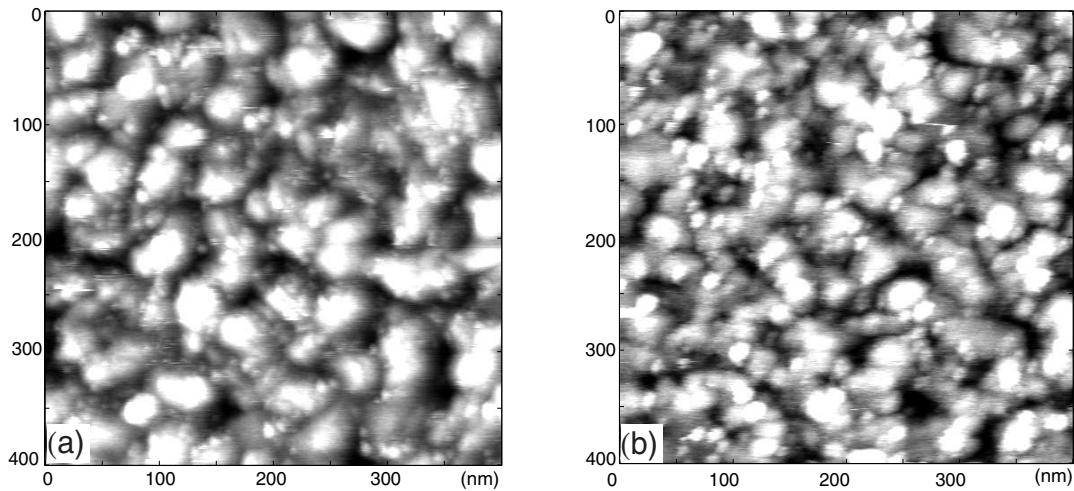


FIG. 4.19 – Comparaison des échantillons obtenus dans les mêmes conditions d'accrochage (dilution au millièème) grâce aux images AFM (TM) 400 nm x 400 nm, en tampon phosphate (50 mM, pH=7.5). Echelle de gris :  $\Delta z = 10$  nm.

Les deux séries d'expériences ont été réalisées à 6 mois d'intervalle et nous voulions tester la reproductibilité de l'accrochage. Ces deux surfaces ont été préparées selon le même protocole mais avec des solutions et des dépôts d'or différents. Les deux échantillons sont très semblables. On peut remarquer que sur la figure 4.19(a) les protéines apparaissent plus petites. Il se peut que l'état de la pointe soit différent et rende son rayon effectif suffisamment petit pour que les effets de convolution diminuent.

Tous les accrochages en vue des expériences de plasmons ont été réalisés avec une dilution au millièème.

### Résultats préliminaires d'un accrochage orienté : utilisation d'une protéine mutée

En suivant les protocoles indiqués précédemment, nous avons accroché la PGK sauvage et la mutée sur des surfaces or et SAM obtenues par une même préparation. Nous présentons les résultats obtenus sur un échantillon correspondant à chaque variant de la protéine. Nous n'avons pas confirmé le résultat présenté ici pour deux raisons :

- ce protocole d'accrochage (la solution d'activation est différente afin de favoriser la réaction par les thiols) fragilise considérablement le dépôt. Nous avons, plusieurs fois, irrémédiablement dégradé l'échantillon à cette étape.
- l'accrochage a pu être mené à son terme sur un deuxième échantillon mais les résultats ont été nettement moins probants que ceux qui sont présentés ici.

Nous n'avons pas essayé les autres protocoles d'accrochage par une fonction thiol plus sophistiqués et utilisant au choix [77] :

- le 2-(2-pyridinyldithio)éthanamine (PDEA)
- la cystamine couplée au dithioérythritol (DTE)

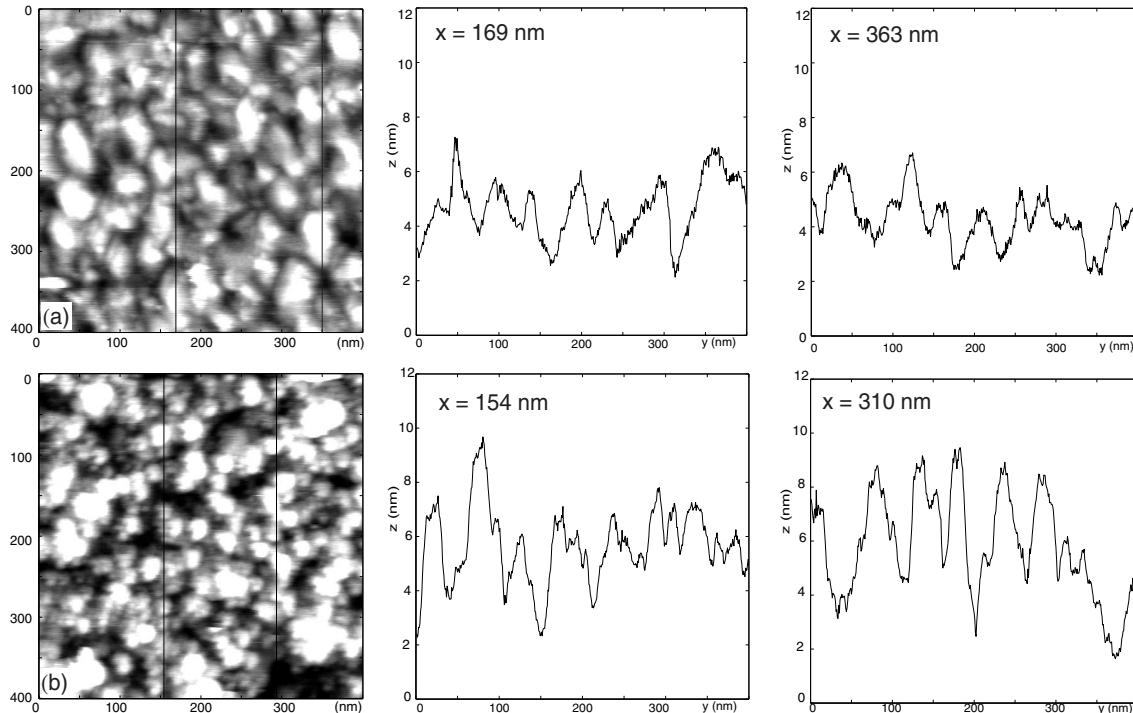


FIG. 4.20 – Comparaison des images AFM (TM, 400 nm x 400 nm, en tampon phosphate, 50 mM et pH=7.5) et des coupes associées de (a) la PGK sauvage, (b) la PGK mutée. Echelle de gris :  $\Delta z = 10$  nm.

La première rangée de figures correspond à la PGK sauvage et la seconde, à la PGK mutée. Les zones brillantes, associées aux altitudes maximales, semblent plus nombreuses sur la figure 4.20(b). Cette impression est confirmée par la comparaison des deux coupes réalisées dans les images (a) et (b) (figure 4.20). On observe plus de pics fins et de plus grande amplitude dans le cas de la PGK mutée, ces résultats étant, une fois de plus, à confirmer. Les hauteurs des objets, évaluées grossièrement, sont cette fois de l'ordre de 5 à 7 nm. Cela correspond à la plus grande dimension de la protéine qui se fixerait donc « debout ».

L'accrochage semble orienté dans le cas de la protéine mutée.

### Bilan

Les images AFM nous assurent que des protéines sont effectivement accrochées à la surface solide. On extrait de ces images un taux de couverture de l'ordre de quelques pourcents de la monocouche compacte. On compte en effet au moins  $300 \text{ protéines} \cdot \mu\text{m}^2$ , soit une densité d'environ  $5 \cdot 10^{-10} \text{ mol} \cdot \text{m}^{-2}$ . Il reste encore à vérifier que ces enzymes restent actifs. Ce contrôle s'appuie sur le test d'activité usuellement utilisé en biochimie pour quantifier l'activité de la PGK.



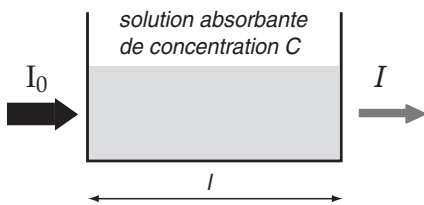
## Test d'activité de la PGK par mesure d'absorbance

### Principe de la mesure d'absorbance classique

Considérons une solution contenant une concentration  $C$  d'une espèce. Cette espèce est dite absorbante si certaines longueurs d'onde de la lumière incidente, d'intensité  $I_0$  sont atténuées à la traversée du milieu. On appelle transmittance  $T$ , le rapport  $I/I_0$ , où  $I$  est l'intensité du faisceau après un trajet de longueur  $l$  dans la solution. L'absorbance  $A = \log T^{-1}$ , est reliée à  $C$  par une loi linéaire, la loi de Beer-Lambert, pour une longueur de trajet et une espèce données.

Cette linéarité justifie l'utilisation de l'absorbance plutôt que la transmittance lors des mesures. D'autre part, avec une telle définition, l'absorbance mesurée augmente avec le pouvoir absorbant du milieu considéré. Plus ce milieu absorbe et plus  $I$ , l'intensité en sortie est faible.  $T$  diminue et  $A$  augmente donc.

En résumé, la loi de Beer-Lambert s'énonce comme suit :



$$A = \varepsilon(\lambda) \cdot l \cdot C \quad (4.1)$$

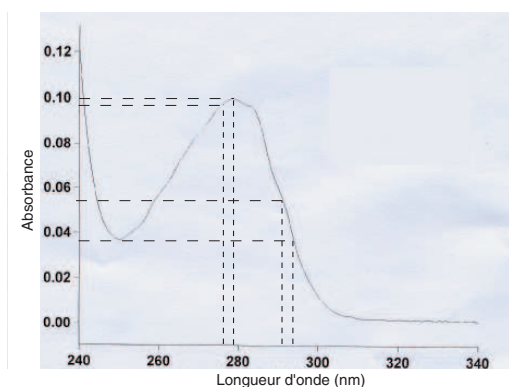
$\varepsilon$  est le coefficient d'extinction molaire caractéristique de l'espèce absorbante et fonction de la longueur d'onde  $\lambda$ . On l'exprimera en  $\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

$l$ , le parcours de la lumière à travers la solution en cm  
 $C$ , la concentration de la solution en  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ .

### a. Application et limites de la loi de Beer-Lambert

On se place à longueur d'onde fixée, afin de considérer constant le coefficient d'extinction molaire  $\varepsilon$ . On utilise un spectromètre qui va fournir une lumière quasi monochromatique en découpant au moyen d'un système dispersif (prisme ou réseau), la fenêtre spectrale de la source en éléments de largeur  $\Delta\lambda$  finis. Cette propriété du spectromètre est quantifiée par le pouvoir de résolution  $\Upsilon_r = \Delta\lambda/\lambda$  qui, à longueur d'onde fixée, est d'autant plus grand que le découpage réalisé par l'appareil est fin.

On choisit souvent la longueur d'onde correspondant au maximum d'absorbance. Ceci se justifie par une plus grande précision sur l'évaluation de  $\varepsilon$ . Considérons le spectre d'absorbance suivant :



Pour une longueur d'onde  $\lambda$  et un trajet de longueur  $l$  fixés,  $\varepsilon$  est la pente de la droite  $A = f(C)$ , absorbance d'une solution de concentration  $C$  en l'espèce considérée. L'erreur sur la pente de cette droite d'étalonnage provient essentiellement de l'erreur sur la valeur de  $A$ . On constate sur le graphe ci-contre que celle-ci est réduite si on choisit une longueur d'onde telle que l'absorbance correspondante soit proche de son maximum. L'erreur sur  $\lambda$  donnée par  $\Delta\lambda$  est liée au pouvoir de résolution du spectromètre.

FIG. 4.21 – Schéma explicatif du choix de la longueur d'onde de travail.

Une fois le coefficient d'extinction molaire estimé et tabulé, les mesures d'absorbance permettent :

- de suivre une cinétique de réaction et d'analyser les facteurs influençant cette évolution temporelle (température, concentration en espèces non absorbantes à la longueur d'onde considérée)
- de réaliser des dosages directs (i.e. de l'espèce absorbante elle-même) ou indirects.

Nous appliquons les deux aspects de la mesure de spectrophotométrie au cas de la PGK.

Les mesures d'absorbance, bien qu'absolues, sont le plus souvent réalisées par rapport à une solution de référence. On dit que l'on « fait le blanc » avec cette solution. L'absorbance de la référence sert de zéro à la mesure.

Pour des solutions trop concentrées ( $C > 10^{-2}$  mol.L<sup>-1</sup>), la loi linéaire de Beer-Lambert cesse d'être valable essentiellement à cause des interactions entre les molécules et des variations d'indice optique. On perd également la linéarité si l'échantillon est fluorescent ou phosphorescent et que la mesure se fait sur une fenêtre spectrale trop large. En effet, dans ces deux cas, la lumière absorbée est ensuite réémise à des longueurs d'onde plus élevées (ou des énergies plus faibles). On peut donc s'en affranchir si on dispose d'un monochromateur suffisamment performant, c'est-à-dire dont le pouvoir de résolution  $\Upsilon_r$  est élevé.

### b. Test d'activité de la phosphoglycérate kinase (PGK)

On utilise un test couplé pour mesurer l'activité de la PGK dans le sens de la formation d'ATP, les détails du protocole étant indiqués en annexe A. Les substrats de l'enzyme sont donc le 1,3-bPG et l'ADP.

Le 1,3-bPG est un composé instable et qui doit donc être produit *in situ*. Cette production est assurée par la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase ou GAPDH. Les réactions mises en jeu sont donc :

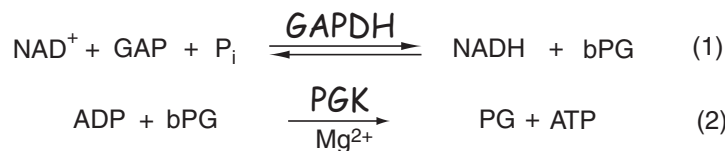


FIG. 4.22 – Réactions enzymatiques mises en jeu lors du test d'activité de la PGK

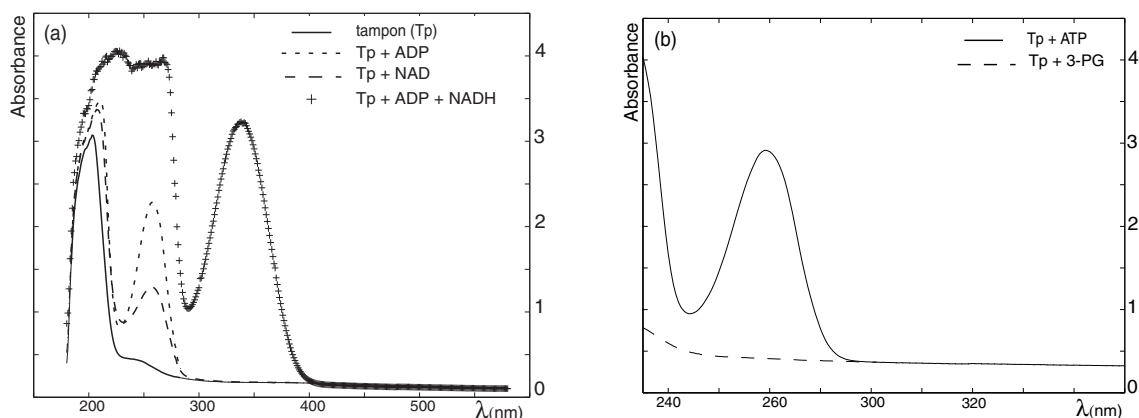


FIG. 4.23 – Spectres des différents constituants du tampon d'activité



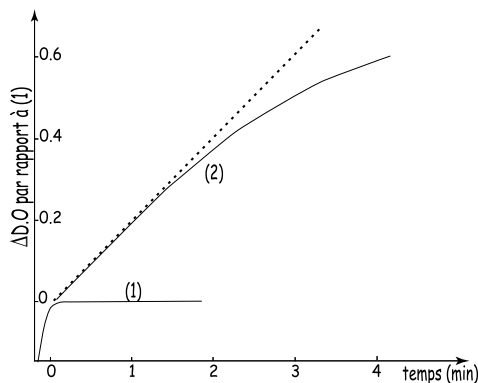
On appelle tampon d'activité, le milieu réactionnel à  $t = 0$ , contenant les deux substrats de la GAPDH, le  $NAD^+$  (nicotinamide adénine dinucléotide sous sa forme oxydée) et le GAP (glycéraldéhyde-3-phosphate) ainsi que l'ADP, un des substrats de la PGK. L'absorbance de ce milieu va servir de référence quand on va rajouter successivement les deux enzymes dans la solution. Sur la figure 4.23, nous avons reporté les spectres d'absorbance des différents composés présents dans le milieu réactionnel à un instant  $t$  de la mesure.

Le milieu dont l'absorbance sert de référence pour ces spectres, noté Tp sur la figure 4.23, est différent du tampon d'activité. Il ne contient aucun substrat hormis le GAP qui n'absorbe pas dans cette gamme. Les spectres du NAD et de l'ADP présentent un pic à 260 nm. On utilise cette propriété pour doser les deux molécules dans le tampon d'activité final.

Le NADH est la seule molécule de la solution qui absorbe de façon importante autour de 340 nm :  $\epsilon_{NADH}^{340} = 6220 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ . Le suivi de la vitesse de la réaction est réalisé par l'intermédiaire de la vitesse d'apparition du NADH. On dit que l'on utilise un test couplé (la vitesse à laquelle on veut accéder n'est pas mesurée directement) et que la GAPDH sert d'enzyme de couplage.

Même si le bPG absorbe à 340 nm, sa contribution à l'absorbance totale est négligeable. En effet, on observe expérimentalement une augmentation de l'absorbance à l'ajout de la PGK qui correspond à une disparition de bPG en solution. C'est bien l'apparition concomitante de NADH qui prévaut.

### Réalisation pratique du test d'activité en volume



On ajoute tout d'abord la GAPDH et on attend que l'équilibre (1) soit établi. Lorsqu'ensuite on ajoute la PGK, cet équilibre est perturbé. La consommation du 1,3-bPG va entraîner la production de NADH (forme réduite du  $NAD^+$ ) et l'absorbance va augmenter.

On réalise ainsi une mesure indirecte de l'activité de la PGK. La vitesse  $V_{NADH}$  s'obtient par évaluation de la pente de la courbe d'absorbance (fig. 4.24, droite en pointillés)

FIG. 4.24 – Test d'activité de la PGK.

### Relation entre les vitesses d'apparition du NADH ( $V_{NADH}$ ) et du 3-PG ( $V_{3PG}$ ).

L'équilibre (1) est caractérisé par une constante  $K_{eq}$  qui vaut :

$$K_{eq} = \frac{[NADH][bPG]}{[GAP][NAD^+]}$$

Evaluons ces concentrations à un instant  $t$ , peu après l'introduction de la PGK :

- $[NAD^+] = [NAD^+]_0 - [NADH]_t$
- $[GAP] = [GAP]_0 - [NADH]_t$
- $[bPG] = [NADH]_t - [3PG]$

On suppose que l'équilibre n'est pas rompu. La constante  $K_{eq}$  s'écrit alors :

$$K_{eq} = \frac{[NADH]_t ([NADH]_t - [3PG])}{([NAD^+]_0 - [NADH]_t) ([GAP]_0 - [NADH]_t)}$$

On en déduit l'expression de  $[3PG]$  :

$$[3PG] = [NADH]_t - \frac{K_{eq}}{[NADH]_t} ([NAD^+]_0 - [NADH]_t) ([GAP]_0 - [NADH]_t)$$

Les substrats de la GAPDH sont en excès et on se place en situation de vitesse initiale. La réaction est peu avancée et  $[NAD^+]_0 - [NADH]_t \simeq [NAD^+]_0$ ,  $[GAP]_0 - [NADH]_t \simeq [GAP]_0$ . Ce qui permet d'écrire que :

$$[NADH]_t^2 - [3PG][NADH]_t = \text{cte}$$

Dérivons cette expression en négligeant le terme  $[3PG] V_{NADH}$  devant  $[NADH] V_{3PG}$ . Encore une fois, la concentration de 3-PG est faible car on se place en début de réaction, mais la variation de cette concentration n'est pas négligeable.

$$\boxed{V_{3PG} = 2 V_{NADH}} \quad (4.2)$$

### Cas où les protéines sont accrochées à un support solide

Nous voulons valider ainsi l'accrochage de la protéine en vérifiant que l'enzyme reste actif. Nous utilisons des lamelles adaptées au format des cuves de spectrophotométrie, que l'on soumet au protocole d'accrochage utilisé pour les expériences de plasmons (voir section 4.2.4).

Lorsque l'on réalise le test d'activité dans cette configuration, l'accrochage des molécules de PGK implique que :

- les quantités d'enzymes testées sont réduites par rapport au cas où l'enzyme est libre en solution
- le NADH sera essentiellement produit près des surfaces sur lesquelles la PGK est fixée.
- la proportion d'enzymes actifs peut être largement diminuée du fait de la non spécificité de l'accrochage réalisé et des modifications du micro-environnement de la protéine.

Pour toutes ces raisons, il y aura beaucoup moins de NADH produit dans le volume que dans le cas précédent.

Pour ne pas être sensible à la diffusion des produits, on place les lamelles avec la PGK dans le faisceau. Ainsi, l'augmentation de la quantité de NADH en solution sera immédiatement détectée. Les dépôts d'or sont plus ou moins transparents selon leur épaisseur. Comme nous n'avons pas ici d'épaisseur minimale imposée par l'observation de plasmons, nous réalisons des dépôts d'or d'environ 20 nm. Nous avons soigneusement évité d'utiliser le chrome dans les dépôts pour les expériences de plasmons (voir section 4.2.2), mais il retrouve ici tout son intérêt. En effet, une couche de chrome de quelques nanomètres permet d'obtenir un dépôt qui tient mieux à la surface et est plus résistant aux manipulations, tout en restant assez fin pour laisser passer la lumière.

## Réalisation pratique du test d'activité en surface

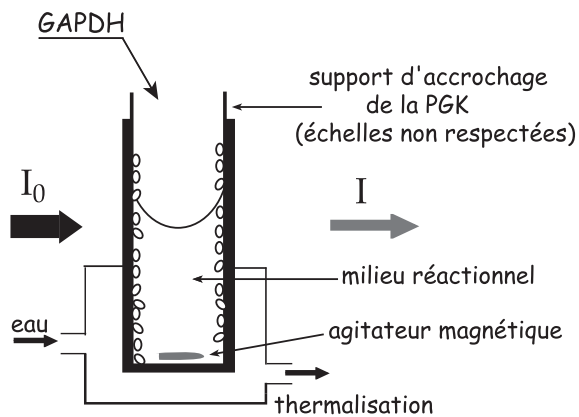


FIG. 4.25 – Test d'activité de la PGK accrochée.

On place les lamelles sur lesquelles est accrochée la PGK dans la cuve et on laisse le système se réguler en température.

On ajoute alors la GAPDH dans le milieu réactionnel et on compare la mesure ainsi effectuée à la dérive observée avec la GAPDH seule (sans PGK dans le milieu).

On peut également faire varier la vitesse d'agitation de la solution (de 0 à 900 trs/min).

### Remarques

- Pour des raisons pratiques, c'est d'abord la PGK qui est introduite dans le milieu réactionnel. Les conditions d'utilisation de l'enzyme de couplage diffèrent donc du cas où la PGK est libre en solution. Nous justifions ci-après les approximations faites pour l'exploitation des mesures d'absorbance.
- Toutes les mesures sont réalisées à 24°C et le système d'agitation permet de tester l'éventuelle influence de la diffusion.

On observe une augmentation rapide de l'absorbance à l'ajout de la GAPDH, suivi d'une évolution beaucoup plus lente. Nous avons considéré que cette situation était analogue à celle du volume : une fois atteint le régime d'évolution lente, la pente de la courbe d'absorbance donne  $V_{NADH}$  et donc  $V_{3PG}$  qui vaut toujours  $2V_{NADH}$ .

Nous justifions une telle approximation par les deux arguments suivants :

- l'équilibre (1) en présence de la GAPDH seule est atteint en quelques secondes. La vitesse de production du bPG par la GAPDH n'était pas limitante en volume et elle le sera encore moins dans ce cas, où la quantité de PGK est réduite.
- la relation entre la vitesse mesurée et  $V_{3PG}$  repose essentiellement sur l'hypothèse que les quantités de 3-PG produites restent faibles. En effet, cela implique aussi que l'équilibre (1) soit peu déplacé.

### Bilan

Dans le cadre de la mesure avec les protéines accrochées, on atteint les limites de détection de l'appareil. Nous vérifions que l'absorption détectée est bien due à la présence de la PGK en comparant les mesures à la dérive observée en présence de la GAPDH seule. Cette dérive est due à l'instabilité du bPG en solution. Sur des temps expérimentaux longs, la diminution de la concentration de bPG en solution est perceptible (figure 4.26 ci-dessous). Ce phénomène aura les mêmes conséquences que la présence de la PGK dans la solution, c'est-à-dire que la quantité de NADH va augmenter.

Quand on a suffisamment de PGK, comme c'est le cas dans les mesures de volume, on peut omettre cette contribution. Le test est suffisamment rapide et la quantité de NADH produit à cause de l'activité de la PGK suffisamment grande, pour rendre la dérive négligeable.

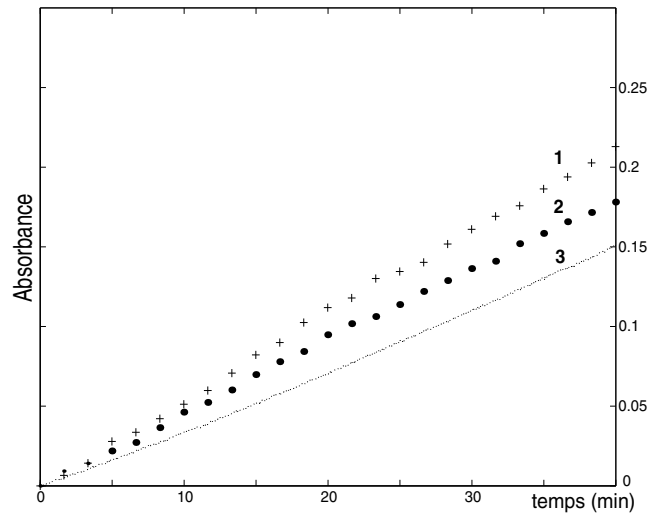


FIG. 4.26 – Mesures d'absorbance mettant en évidence la dérive due à la GAPDH seule (courbe 3). On compare cette dérive à deux mesures réalisées en présence de protéines accrochées selon un mode opératoire rigoureusement identique, à un jour d'intervalle (courbes 1 et 2).

A partir de ces mesures d'absorbance, on évalue la densité d'enzymes actifs à  $4.10^{-11} \text{ mol.m}^{-2}$  (sec. 2.3) soit de l'ordre de la dizaine de pourcents des enzymes accrochés. Cette faible proportion d'enzymes actifs après accrochage peut se justifier par la non-spécificité de ce dernier. En effet, il est fort probable qu'il restreigne les conformations accessibles aux enzymes et gêne ou empêche le changement conformationnel associé à l'activité catalytique.

### Sensibilité de la mesure de plasmon et rugosité

On détecte, lors d'expériences de plasmons d'accrochage *in situ* (fig.4.27), la présence des protéines par une évolution du profil de réflectivité.

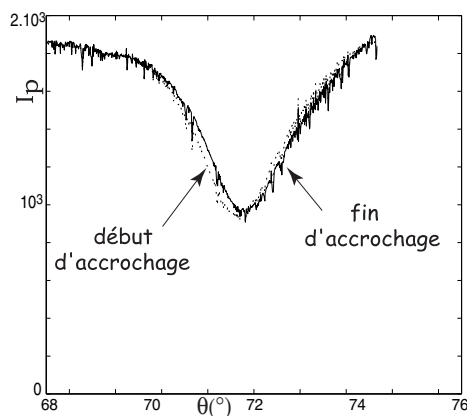


FIG. 4.27 – Déplacement du minimum lors de l'accrochage de la PGK sauvage, dilution au 1/1000 de la solution-mère. Profils en début (pointillés) et en fin (trait continu) d'accrochage à 676.4 nm.

Nous présentons sur la figure 4.27 les deux profils plasmons correspondant au début (surface or/SAM) et à la fin (surface or/SAM/protéine, après rinçages) du protocole d'accrochage. La solution protéique utilisée est une dilution 1/1000 de la solution-mère (4.5 mg/mL), dans du tampon phosphate 50 mM,  $\text{pH} = 7.5$ .

Nous évitons de toucher aux réglages en cours d'expérience : les profils correspondant à la polarisation  $s$  sont acquis en début et en toute fin d'expérience. D'autres mesures ayant été faites après l'acquisition en fin d'accrochage, nous n'avons pas les valeurs de  $I_s$  correspondant à cette étape. Cela explique le bruit sur les mesures.

Les deux acquisitions sont réalisées dans le même tampon, la seule différence étant la présence de la protéine. Nous évaluons un décalage de  $0.15 \pm 0.01^\circ$  entre ces deux courbes. Les valeurs couramment utilisées sont de  $0.1^\circ$  de déplacement angulaire du minimum, pour  $1 \text{ ng/mm}^2$  de protéine accrochée, ou adsorbée selon le cas [79]. La masse molaire de la PGK est de 45 kDa, ce qui conduit à une densité de  $2.10^{-8} \text{ mol.m}^2$ . Nous avons calculé (eq. 2.15) la densité correspondant à une couche compacte et trouvé  $4.10^{-8} \text{ mol.m}^2$ .

Cette évaluation très éloignée de celle fournie par les images AFM peut s'expliquer en partie par les différences entre les protocoles. Dans le cas de l'AFM, toutes les réactions sont réalisées hors du montage optique, ce qui permet de meilleurs rinçages, en fin d'accrochage en particulier. Cependant, on peut se demander comment il est possible de détecter par le plasmon des phénomènes attribuables aux faibles quantités de matière protéique présente sur la surface après accrochage *ex situ*. Nous proposons ci-après une justification impliquant la rugosité de l'or, que nous avons testée par un modèle théorique *ad hoc*.

Nous avons donc décidé d'opter pour un protocole qui permette de réaliser des mesures de résonance de plasmons, de microscopie de force atomique et d'absorbance sur des échantillons préparés dans les mêmes conditions. Nous pouvons ainsi caractériser les surfaces utilisées pour les mesures de plasmon de façon plus fiable.

Dans toute la suite, les accrochages de la protéine seront réalisés *ex situ*, juste avant de commencer les mesures de plasmons et hors montage optique. Les échantillons sont utilisés immédiatement et ne sont pas conservés. En revanche, on peut conserver les surfaces or/SAM séchées, à l'abri de la poussière pendant plusieurs semaines.

### ***Importance de la rugosité***

Si on calcule les profils plasmons avec et sans protéines pour les densités d'accrochage fournies par les images AFM et en occultant la rugosité de la surface d'or (modèle à plusieurs couches planes de type Abélès), on n'observe pas d'évolution du plasmon entre les deux situations. Nous avons donc cherché à introduire la rugosité de l'or dans ce modèle.

Les images AFM nous permettent :

- de modéliser la rugosité observée sur les images d'or seul (fig 4.13 a) avec des valeurs pertinentes. La hauteur moyenne des pics évaluée sur cette image est de 6 nm et leur largeur de 40 nm. Nous modéliserons donc le dépôt d'or par une couche plane de 45 nm d'épaisseur sur laquelle sont posées des calottes sphériques de hauteur 6 nm et de diamètre 40 nm (voir fig. 4.28).
- de considérer une densité de protéines accrochées proche de ce que l'on observe. Nous évaluons cette densité à environ 300 protéines par  $\mu\text{m}^2$ , soit une distance moyenne entre elles  $d = \sqrt{1/300} = 60 \text{ nm}$ . Nous répartissons les enzymes de façon homogène sur la surface. Avec les valeurs numériques que nous avons prises, on a 4 protéines en moyenne par carré de  $120 \times 120 \text{ nm}^2$ . On en met deux dans les creux et deux au sommet des bosses.

La figure 4.28 présente une coupe du modèle choisi pour le calcul des indices effectifs que nous introduirons dans un modèle Abélès multi-couches planes.

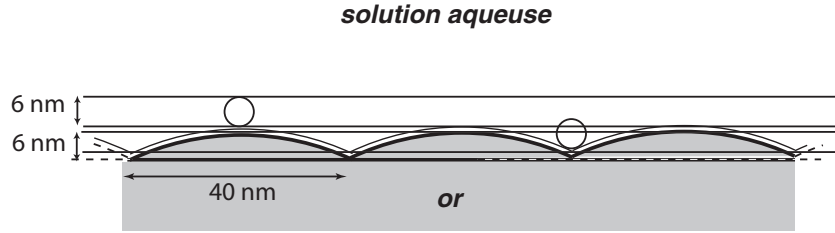


FIG. 4.28 – Modélisation d'une surface utilisée pour les expériences de plasmon

Nous ne considérons que des volumes simples de façon à pouvoir évaluer les fractions volumiques de chacune des espèces aisément. En effet, on veut calculer les constantes diélectriques effectives en utilisant la formule (eq. 4.3) établie en 1904 [80] et reposant sur la théorie de Maxwell-Garnett.

Considérons une matrice de constante  $\varepsilon_m$  comportant des inclusions de  $p$  types différents de fraction volumique  $\phi_k$  et de constante diélectrique  $\varepsilon_k$ . La constante diélectrique moyenne de l'ensemble vaut  $\bar{\varepsilon}$  et est donnée par :

$$\frac{\bar{\varepsilon} - \varepsilon_m}{\bar{\varepsilon} + 2\varepsilon_m} = \sum_k \phi_k \frac{\varepsilon_k - \varepsilon_m}{\varepsilon_k + 2\varepsilon_m} \quad (4.3)$$

Cette évaluation de la constante diélectrique moyenne est d'autant plus pertinente que les fractions volumiques des inclusions sont faibles. De plus, la formule n'est pas symétrique : la matrice joue un rôle privilégié. Nous prendrons pour matrice le milieu de fraction volumique la plus importante dans la couche considérée.

Nous modélisons la protéine par des boules de 6 nm de diamètre et reprenons les valeurs des constantes diélectriques déjà données (à 676,4 nm, sec. 4.2.2) :

- $\varepsilon_{SAM} = 2.074$
- $\varepsilon_{or} = -16.01 + 0.94 i$
- $\varepsilon_{prot} = 2.46$
- $\varepsilon_{eau} = 1.77$

Nous prenons l'indice de l'eau pour le milieu liquide semi-infini qui constitue la dernière couche du modèle. La présence des ions du tampon modifie probablement l'indice, mais son évaluation n'est pas triviale. Nous nous sommes contentés de cette approximation dans notre approche.

En présence de la protéine (fig. 4.28), nous avons un système à 6 couches d'épaisseur  $e_i$  et de constantes diélectriques (à 676,4 nm)  $\varepsilon_i$  :

- couche d'or pur :  $e_1 = 45$  nm et  $\varepsilon_1 = -16.01 + 0.94 i$
- couche mixte or et SAM :  $e_2 = 1.5$  nm et  $\varepsilon_2 = -9.80 + 0.57 i$   
(inclusions de SAM dans une matrice d'or avec  $\phi_{SAM} = 0.306$ )
- couche or, SAM, protéine (des creux), solution :  $e_3 = 4.5$  nm et  $\varepsilon_3 = 6.124 + 0.172 i$   
(inclusions de SAM, de protéine et d'or dans une matrice liquide avec  $\phi_{SAM} = 0.218$ ,  
 $\phi_{prot} = 0.004$  et  $\phi_{or} = 0.308$ )

- couche SAM, protéine, liquide :  $e_4 = 1.5$  nm et  $\varepsilon_4 = 1.803$   
(inclusions de SAM et de protéine dans une matrice liquide avec  $\phi_{SAM} = 0.110$  et  $\phi_{prot} = 0.002$ )
- couche protéine, liquide :  $e_5 = 6$  nm et  $\varepsilon_5 = 1.772$   
(inclusions de protéine dans une matrice liquide avec  $\phi_{prot} = 0.004$ )
- couche liquide semi-infinie :  $\varepsilon_6 = 1.77$

En introduisant ces valeurs d'indice et d'épaisseur de couche dans un modèle à plusieurs couches planes de calcul du plasmon, on obtient un profil dont le minimum se situe à  $72.774^\circ$ .

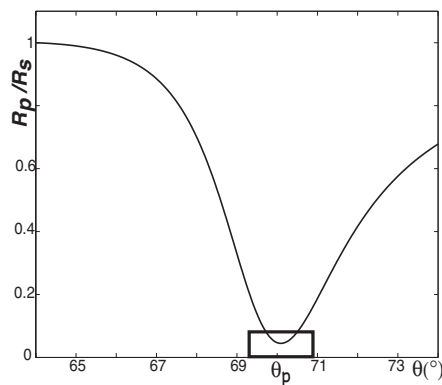
En l'absence de la protéine, on supprime la couche 5, et les indices des couches 3 et 4 valent respectivement  $\varepsilon_3 = 6.115 + 0.172i$  et  $\varepsilon_4 = 1.802$ . La position angulaire du minimum est alors à  $72.738^\circ$ , soit un décalage entre les deux situations de  $0.03^\circ$  environ. En dépit des nombreuses approximations faites, la prise en compte de la rugosité, même de façon simpliste, rend compte d'un déplacement du minimum observable expérimentalement pour de faibles quantités de protéines sur la surface. On utilise en général des matrices polymères pour réaliser l'accrochage dans les expériences de plasmons. Cela peut gommer les effets de rugosité et expliquer les écarts d'évaluation de la densité de protéines entre cette approche et celle utilisant l'équivalence  $0.1^\circ$  pour 1 ng de protéine par  $\text{mm}^2$  [79].

Néanmoins, on n'observe pas, avec ce modèle, d'évolution du plasmon résultant de différences de hauteur des protéines de l'ordre du nanomètre (déformation des sphères en ellipses). On pourrait améliorer l'approche proposée en découpant en tranches plus fines le milieu (de l'ordre du nanomètre). Cette opération aura pour but de mettre en exergue le mouvement de hauteur des protéines, qui passeront alors d'une couche donnée à une couche inférieure.

Il est de plus fort probable qu'à ce niveau de subtilité, l'influence des ions du tampon soit primordiale et une évaluation fine de l'indice nécessaire. Nous n'avons pas poursuivi dans cette voie mais nous souhaitons fournir des arguments pouvant justifier la sensibilité de détection par résonance de plasmon observée expérimentalement.

#### 4.2.5 Déroulement d'une expérience de résonance de plasmon et exploitation des données

Nous voulons observer la réponse plasmons d'une couche d'enzymes après l'injection d'un ou plusieurs substrats. Nous travaillons à une fréquence de 10 Hz, fixée et permettant des expériences sur des durées appréciables (quelques minutes). De plus, la longueur d'onde de la lumière excitatrice est maintenue à 676.4 nm dans toutes les expériences.



Sur les courbes plasmons présentées précédemment (fig. 4.27), on observe un déplacement de la courbe de résonance dans son ensemble. C'est la modification d'indice créée par la présence des protéines qui induit le déplacement.

Dans toute la suite, on se limite à l'évolution du minimum de réflectivité  $\theta_p$  (encadré ci-contre), consécutive à l'injection d'un ou plusieurs substrats. Cette injection s'accompagne d'un flux de liquide qui va perturber l'équilibre initial. L'indice des couches au contact de la surface évolue avant d'atteindre une nouvelle valeur d'équilibre. La condition de résonance est donc modifiée et la valeur de  $\theta_p$  a varié dans le temps.

La durée d'acquisition d'une expérience d'injection est de quelques minutes. On rince ensuite la cellule et après le retour à l'équilibre on réalise une nouvelle injection. On observe donc l'évolution temporelle du minimum de réflectivité en réponse à une suite d'injections et de rinçages.

Les produits injectés sont des solutions (5 mmol/L) des substrats de l'enzyme, à l'exception du bPG, peu stable en solution et difficile à manipuler. Nous utiliserons le 3PG, l'ADP et l'ATP seuls et l'association 3PG/ATP (en proportion 1/1 et de concentration finale 5 mmol/L du mélange). En effet, l'association de l'ATP et du 3PG, en présence d'ions  $Mg^{2+}$ , devrait induire le changement conformationnel complet (sec. 1.2.3).

Sur la figure 4.29 ci-dessous, on représente les résultats d'une expérience type. Ils sont issus d'un premier traitement des données brutes de réflectivité fournies par la caméra linéaire. Le minimum de chacune des courbes de plasmon est repéré par le passage à zéro de la dérivée des profils lissés (lissage par fenêtre glissante). On construit ainsi la courbe  $\theta_p(t)$  point par point.

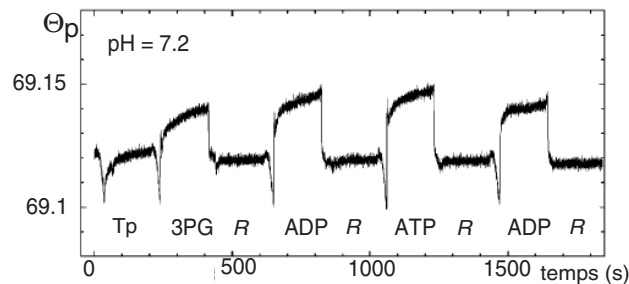


FIG. 4.29 – Déplacement du minimum de réflectivité  $\theta_p$  lors d'une suite d'injections et de rinçages (R) dans un tampon phosphate 50 mM à  $pH=7.2$ . L'expérience présentée ici est réalisée sur une surface or + SAM.

Les paramètres variables d'une expérience à l'autre sont :

- la valeur du pH du tampon phosphate 50 mM, utilisé pour le rinçage et la mise en solution des différents substrats (5 mM finaux pour chaque substrat et  $Mg^{2+}$  quand on en met).
- le nombre d'injections successives sur le même échantillon (3 séries de 8 injections généralement)
- l'ordre d'injection des substrats

Examinons de plus près une injection (fig. 4.30). Il y a une première phase pendant laquelle le plasmon évolue très peu : c'est la fin du rinçage précédent. Puis, on met la cellule sous flux de tampon pendant 30 secondes avant de procéder à l'injection elle-même qui dure deux à trois secondes et après laquelle on cesse tout flux ( $V_{inj} = 500 \mu L$  pour un volume de réservoir de  $270 \mu L$ ).

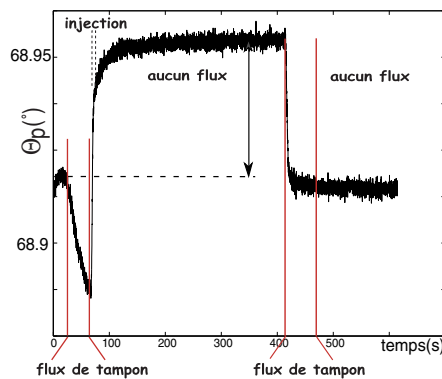


FIG. 4.30 – Détail d'une injection et du rinçage qui suit. Principe du calcul des sauts.



Le rinçage consiste en un flux de tampon qui dure une minute, après quoi on arrête le flux. La durée totale de cette acquisition est de trois minutes.

On observe une montée plus ou moins rapide du signal lors de l'injection, qui correspond à un déplacement du minimum de réflectivité vers les plus grands angles. On peut l'interpréter par une augmentation soit globale, soit locale de l'indice de la solution. Cette montée s'observe aussi bien lorsque les protéines sont accrochées sur la SAM que lorsque la SAM seule est mise en présence des solutions considérées.

Pour évaluer l'amplitude de ce saut (matérialisé par la flèche, fig. 4.30), nous faisons une moyenne sur les 30 premiers points et les 500 derniers. Les expériences sur lesquelles on observe une dérive encore importante du minimum en fin d'acquisition ne seront pas concernées par ce calcul de saut.

L'allure exponentielle de cette courbe nous a par ailleurs suggéré de rechercher un ou plusieurs temps caractéristiques de cette dynamique. Cette approche nous permet de soumettre toutes les expériences au même traitement. Elle est sans doute biaisée, puisque l'on impose la forme de la solution, mais présente le mérite d'un premier dépouillement des données expérimentales.

Nous avons donc essayé de paramétrer ces montées après injection par une somme de deux exponentielles, certaines réalisations montrant clairement qu'un équilibre n'était pas nécessairement atteint. Nous illustrons la méthode de paramétrage par la figure 4.31 ci-dessous.

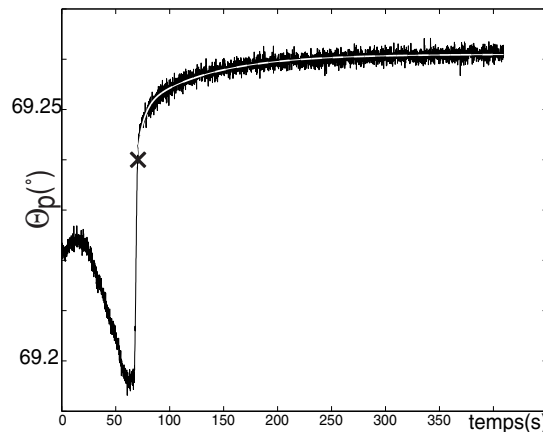


FIG. 4.31 – Paramétrage des réponses à une injection (début du paramétrage repéré par la croix). Sur la courbe expérimentale (en noir) est superposé le résultat du paramétrage (courbe blanche)

On recherche une solution de la forme :  $A \exp(-(t - t_1^0)/\tau_1) + B \exp(-(t - t_1^0)/\tau_2) + C$ .

En fixant  $t_1^0$ , nous déterminons le nombre de points concernés par le paramétrage de façon à l'optimiser. Si on commence trop tôt, la qualité du paramétrage se dégrade. Si on commence trop tard, on ne tient pas compte de la dynamique rapide.

### 4.3 Résultats des expériences de résonance plasmon

Nous apportons ici les preuves expérimentales qui, selon nous, sont la signature de la présence des protéines. Pour cela, nous commenterons et exploiterons les courbes  $\theta_p(t)$ . Nous verrons que selon que les enzymes soient présents ou non, l'amplitude du bruit sur ces courbes et leur évolution en fonction du pH sont différentes.

L'analyse de l'amplitude des variations de position du minimum (amplitude du saut dans les courbes  $\theta_p(t)$ ) permet :

- sur la SAM seule, de définir une gamme de pH favorables à l'approche des substrats de la surface sur laquelle sont accrochés les enzymes.
- de souligner d'autres caractéristiques de la présence des protéines

L'étude de la dynamique des variations de  $\theta_p(t)$  après une injection se montre par ailleurs très instructive quant aux améliorations à porter au dispositif.

#### 4.3.1 Amplitude du bruit et influence du pH

##### • Amplitude du bruit

La figure 4.32 illustre la différence sur le bruit des mesures dans les deux configurations que nous avons choisi de comparer : surface or + SAM (fig. 4.32 (b)) et surface or + SAM + PGK (fig. 4.32 (a)). Le spectre des signaux choisis (correspondant à une position moyenne constante de  $\theta_p(t)$ ) n'est pas très informatif du fait de l'étroite gamme spectrale sondée (fig. 4.32 (c) et (d)).

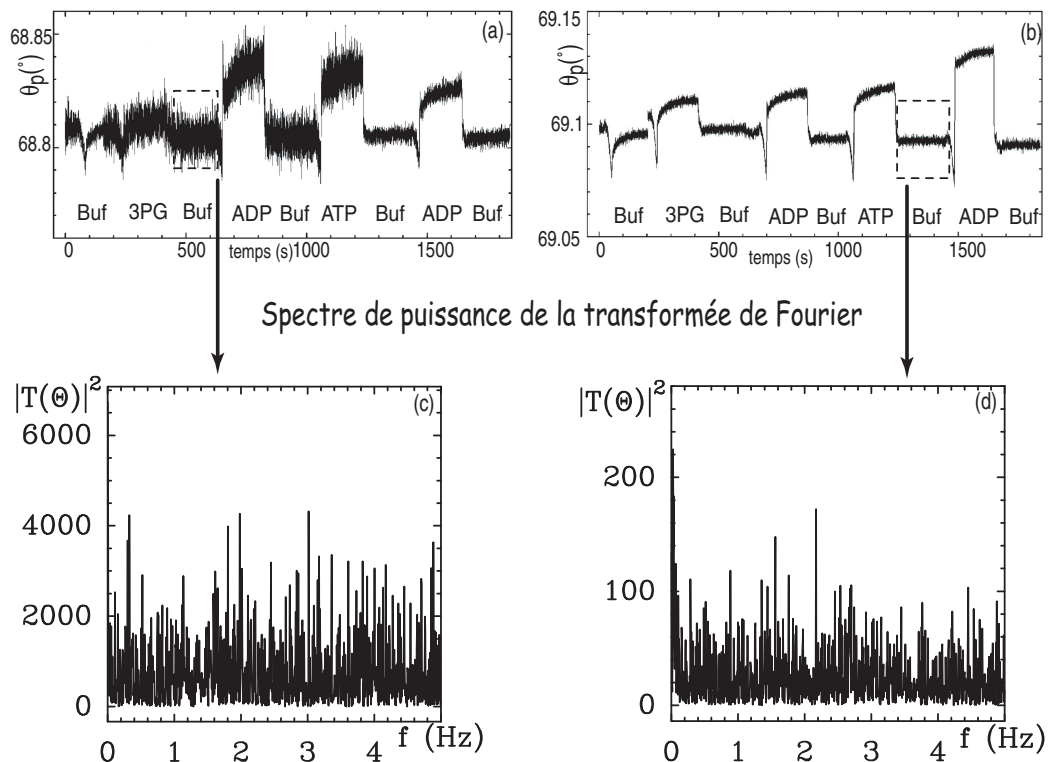


FIG. 4.32 – Réponses (SPR a) d'une couche de PGK immobilisée sur une SAM et (b) de la SAM seule, à l'injection des substrats de l'enzyme (3PG, ADP, ATP). Les injections et les rinçages au tampon (Buf) sont réalisés avec un tampon phosphate 50 mM à pH=6.4. (c) et (d) Spectres de puissance de la transformée de Fourier des signaux encadrés.

On ne met pas en évidence de fréquence caractéristique de la présence des protéines dans la gamme accessible expérimentalement. Cependant, la comparaison des signaux en absence et en présence de la protéine met en évidence l'augmentation des fluctuations temporelles en présence de la PGK. Ces observations nous font penser que la technique SPR pourrait s'appliquer à l'étude de la dynamique des couches fluides en général. Afin de caractériser ce bruit de façon rigoureuse, des acquisitions à des fréquences plus élevées doivent être réalisées.

Le montage tel qu'il est utilisé ici (acquisition à 10 Hz), donne accès aux comportements dynamiques très basses fréquences des couches protéiques. Une façon de pallier cette limitation est d'utiliser une photodiode à quadrants. On fait le réglage optique de telle sorte que le minimum de réflectivité soit centré sur le détecteur. Le nombre de pixels est considérablement réduit, mais on peut théoriquement gagner trois ordres de grandeur sur les fréquences d'acquisition accessibles. Ce dispositif est en cours de réalisation.

L'amplitude du bruit varie au cours d'une même suite d'injections (à pH constant) et quand on change le pH du tampon (voir fig. 4.33 (a)) lors d'expériences successives.

Les mesures dans les 3 tampons considérés (fig. 4.33 (a1), 4.33 (a2) et 4.33 (a3)) sont réalisées les unes après les autres et dans cet ordre, avec un « équilibrage » préalable dans le tampon utilisé ensuite. Cette étape de prétempage dure 20 à 30 minutes.

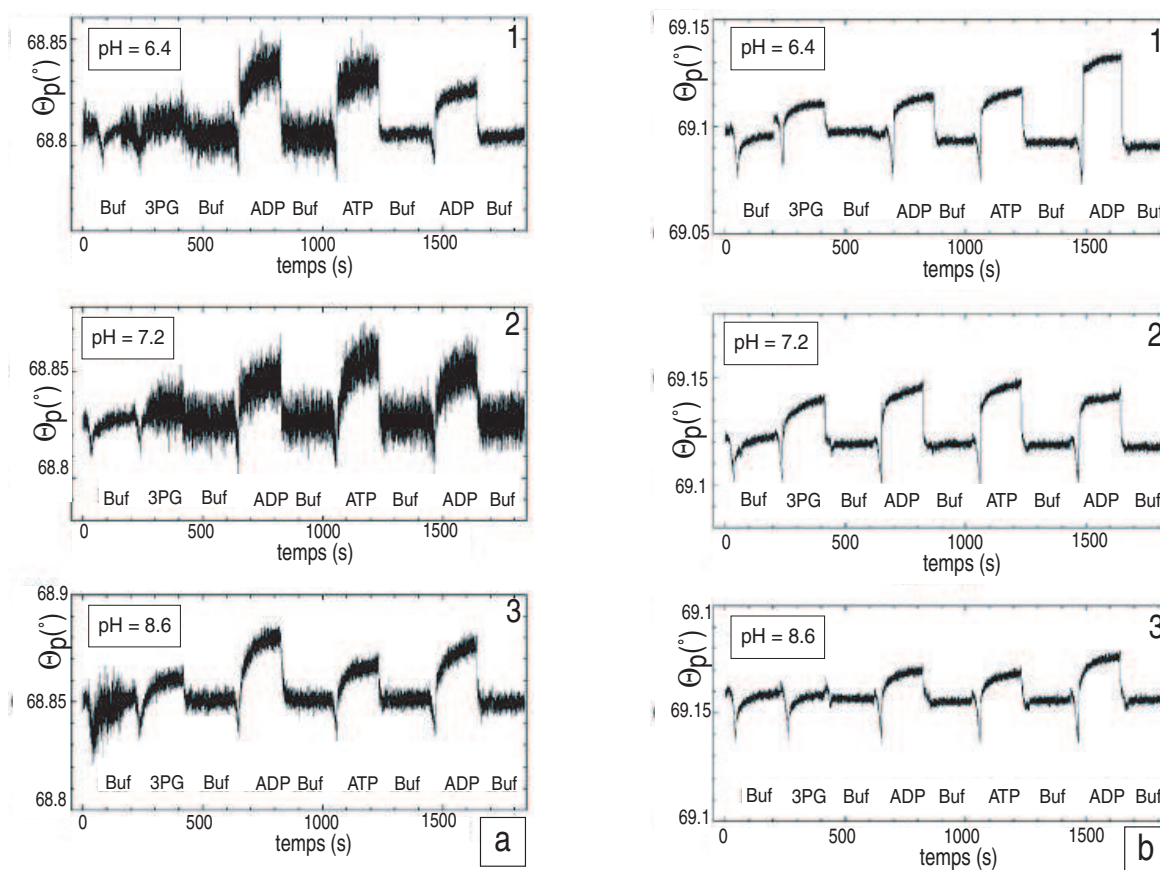


FIG. 4.33 – Comparaison par SPR des réponses (a) d'une couche de PGK immobilisée sur une SAM et (b) de la SAM seule, à l'injection des substrats de l'enzyme (solutions à  $5.10^{-3}$  mol.L<sup>-1</sup>). Les séries d'injections sont réalisées avec des tampons phosphate 50 mM (Buf) à 3 pH différents (pH = 6.4 (1), pH = 7.2 (2), pH = 8.6 (3)).

La diminution du bruit observée sur la figure 4.33 (a1) n'est donc pas synonyme de dénaturation, mais plutôt d'un état transitoire de la couche. Le bruit retrouve une amplitude importante lors d'injections postérieures (fig.4.33 (a2)) avant de se réduire de nouveau (fig.4.33 (a2)).

Ces variations au cours d'une même expérience assurent que le bruit ne provient pas de la méthode d'estimation du minimum. Une interprétation plus approfondie des effets observés est toutefois difficile pour le moment.

L'amplitude du bruit des mesures est le premier critère selon lequel les deux types de surfaces présentent des différences évidentes. Les mesures réalisées à différents pH et reportées sur la figure 4.33 (extraite de [81]) illustrent également une variation de l'amplitude des sauts de la courbe  $\theta_p(t)$ , lorsque l'on fait varier la valeur du pH des solutions utilisées.

Sur la SAM, le décalage du minimum plasmon lors de l'injection de substrats s'atténue lorsque le pH augmente. Ce comportement n'est pas observé avec une monocouche de protéines accrochées à la SAM, dans les mêmes conditions de pH. Pour en comprendre l'origine, examinons de plus près les propriétés acido-basiques de la monocouche auto-assemblée.

#### • Influence du pH sur la réponse de la SAM seule

Cette couche présente des fonctions acide (-COOH) que nous activons pour réaliser l'accrochage de la protéine (voir sec. 4.2.1). Lors de l'étape de neutralisation consécutive de l'accrochage, on fait réagir le triéthanolamine ((C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH)<sub>3</sub>N) sur les fonctions acides encore activées et qui n'ont pas formé de liaison avec les protéines. La SAM peut donc théoriquement présenter des fonctions acide et alcool (-OH) à la solution, après la neutralisation.

Nous avons mesuré la réponse plasmon lorsque l'on soumet la SAM et la SAM neutralisée à des solutions millimolaires d'ATP, à différents pH. Raisonnons pour l'instant sur les fonctions acides de la monocouche. Pour des pH suffisamment élevés, elles sont présentes en solution aqueuse sous leur forme ionisée COO<sup>-</sup>. On s'attend à ce que les anions soient alors repoussés et parviennent moins facilement à proximité de la surface. Du fait du champ évanescence qui lui est associé, le plasmon sera particulièrement sensible à cet effet. La différence par rapport à la situation de référence avec le tampon seul et donc l'amplitude du saut, devraient décroître lorsque l'on augmente le pH. C'est effectivement ce que l'on observe sur les graphes de la colonne de droite (fig. 4.33 b).

Le but du calibrage de la réponse de la SAM est de se placer à des pH favorables à l'arrivée des substrats près de la surface. Nous avons choisi l'ATP (fig. 4.34) parce que c'est le substrat de la PGK qui porte la charge négative la plus importante (-4) et qui est stable en solution. La force de répulsion sera donc accrue avec cet ion : s'il n'est pas gêné dans son approche de la surface du fait de la force électrostatique, les autres anions ne le seront pas non plus.

Le 1,3-bPG porte la même charge que l'ATP, mais il est instable en solution, et les autres substrats (fig. 4.34) portent des charges plus faibles : (-3) pour l'ADP, (-2) pour 3-PG.

Ces mesures nous permettent aussi de vérifier que les comportements de la SAM neutralisée et de la SAM non traitée sont très similaires (fig. 4.35). L'étape de neutralisation ne modifie pas de façon importante le comportement de la SAM vis-à-vis du pH. Nous utilisons des monocouches auto-assemblées non neutralisées pour toutes les études comparatives présentées.

Le fait que les comportements soient très similaires que la SAM soit neutralisée ou pas, nous pousse à penser que l'étape d'activation n'a pas un rendement suffisant. Les temps d'incubation dans cette solution ont été modifiés sans amélioration notable de la densité d'accrochage. Il faut maintenant trouver un activateur plus efficace de la fonction acide pour augmenter le rendement de cet accrochage.

Ce faible taux d'activation pourrait aussi expliquer les résultats de microscopie à force atomique, lorsque l'on a fait varier la concentration de la solution de trempage pour l'étape d'accrochage des enzymes. Seule une partie des fonctions acides sont réactives et permettent l'accrochage des protéines. Même si l'on augmente la concentration de la solution, une fois que tous les sites activés sont utilisés, les enzymes ne peuvent plus se fixer. La densité de la monocouche formée n'évolue pas, jusqu'à ce que la concentration de la solution de trempage soit telle que se forment des agrégats en solution qui s'accrochent par une de leurs fonctions lysine à la SAM.

Sauf indication contraire, les expériences comparant les comportements des deux surfaces (SAM et monocouche protéique accrochée sur la SAM) seront réalisées à des pH compris entre 6.4 et 7.5 (zone hachurée fig.4.35).

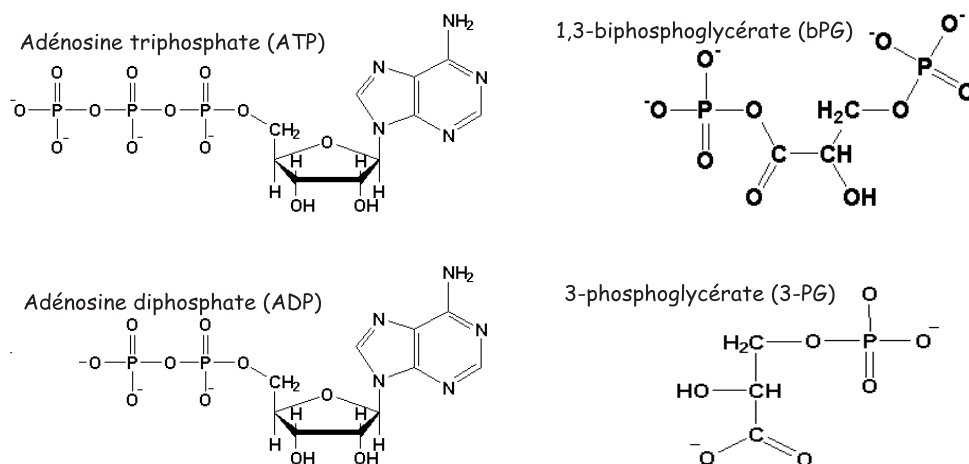


FIG. 4.34 – Formule chimique des substrats de la PGK.

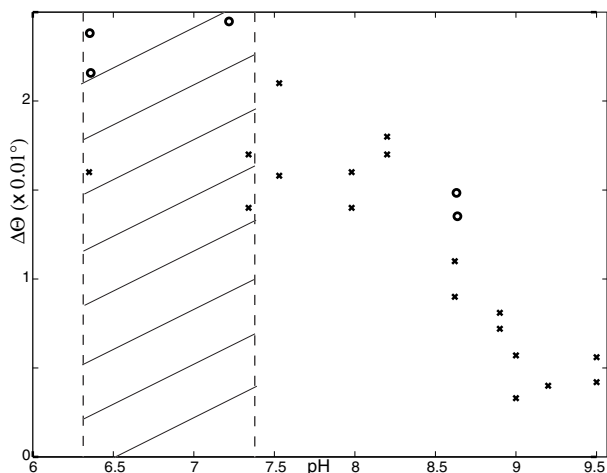


FIG. 4.35 – Déplacement du minimum à l'injection d'ATP, en fonction du pH pour (x) la SAM non traitée et (o) la SAM neutralisée au triéthanolamine. Le pH des solutions utilisées par la suite sera ajusté, grâce à une solution de soude, à des valeurs comprises dans la zone hachurée.

### Remarques :

- En présence de la PGK, on retrouve cette diminution d’amplitude du saut observée sur la SAM à des pH de l’ordre de 8 (voir fig. 4.35), pour des pH supérieurs à 9. On a alors très probablement une dénaturation partielle ou totale de la protéine. Les enzymes perdent leur spécificité et ne sont plus que des poly-ions qui vont contribuer à la charge de surface effective perçue par les ions de la solution.
- En dépit des différences sur les réponses aux injections, le niveau du plasmon retourne à sa position d’origine (dans le tampon phosphate) à chaque rinçage et sur chacune des deux surfaces (fig. 4.33). La reproductibilité de ces rinçages fournit un test indirect de la tenue du dépôt d’or. Lorsqu’il est trop fragile, celui-ci est emporté par le flux de tampon au fur et à mesure des rinçages. Si tel est le cas, on observe une dérive importante du signal. De plus, la similarité des comportements des deux types de surfaces testées (avec et sans PGK), vis-à-vis du rinçage, pourrait être interprétée comme un indice supplémentaire de la spécificité de la réponse des enzymes. En effet, les ions du tampon ne sont pas des substrats des enzymes et de fait, la position du minimum de réflectivité dans ce milieu reste (relativement à la position de départ) toujours la même. Au contraire, quand on introduit les substrats, la présence des enzymes entraîne une réponse plasmon caractéristique que nous décrivons dans la suite.
- Le pH du tampon phosphate est ajusté par une solution de soude. La mesure par réfractométrie de l’indice optique d’un volume des solutions obtenues ne traduit pas d’évolution avec ce paramètre. En revanche, la valeur de la charge effective de la surface (incluant celles de l’or et protéines), et l’état d’ionisation des ions en solution sont susceptibles de changer. Les différences de répartition de charges provoquées par les variations de pH peuvent se traduire par des différences d’indices effectifs au voisinage de la surface. Cependant, pour comprendre et arriver à prévoir les évolutions du plasmon à un tel niveau de précision, il faut un modèle robuste et réaliste du profil plasmon. Ce problème non trivial est à l’étude par une approche essentiellement théorique pour l’instant.

### 4.3.2 Caractérisation de la réponse à une injection

Nous avons réalisé, sur les données SPR, une étude statistique comparée des deux types de surfaces (avec et sans PGK). Dans chaque cas, nous avons construit l’histogramme (nombre de réalisations en fonction des valeurs de la grandeur étudiée) de l’amplitude des sauts et des deux temps caractéristiques issus du paramétrage du déplacement plasmon après injection. Mais ce traitement statistique masque une autre propriété du système.

Les histogrammes, particulièrement dans le cas avec PGK, montrent une large dispersion des données que l’on peut comprendre en s’intéressant à plusieurs suites d’injections consécutives : le système, en présence de la protéine, semble sensible aux injections antérieures. Ce constat nous permet de discuter de la possible spécificité de la réponse des enzymes détectable par les plasmons. Cependant, nous ne disposons pas de suffisamment d’acquisitions en présence de la PGK pour une étude statistique sérieuse tenant compte de l’histoire de la surface. Pour cette raison, nous nous sommes limités dans le cadre de la discussion sur l’amplitude des sauts, à un histogramme global complété par une discussion approfondie d’une expérience-type. Cette influence de l’histoire de l’échantillon est moins flagrante sur les temps caractéristiques. En revanche, l’allure des histogrammes associés évolue lorsque l’on classe les substrats selon leur nature. Un tel changement n’est pas perceptible lorsque le même traitement est appliqué à l’histogramme de l’amplitude des sauts.

## Temps caractéristiques

La figure 4.36 présente les histogrammes des deux temps caractéristiques  $\tau_1$  et  $\tau_2$ , pour la SAM (fig. 4.36 a) et pour la couche de protéines (fig. 4.36 b).

Notons  $\tau_{1moy}$  et  $\tau_{2moy}$ , les deux temps caractéristiques moyens issus de ces analyses.

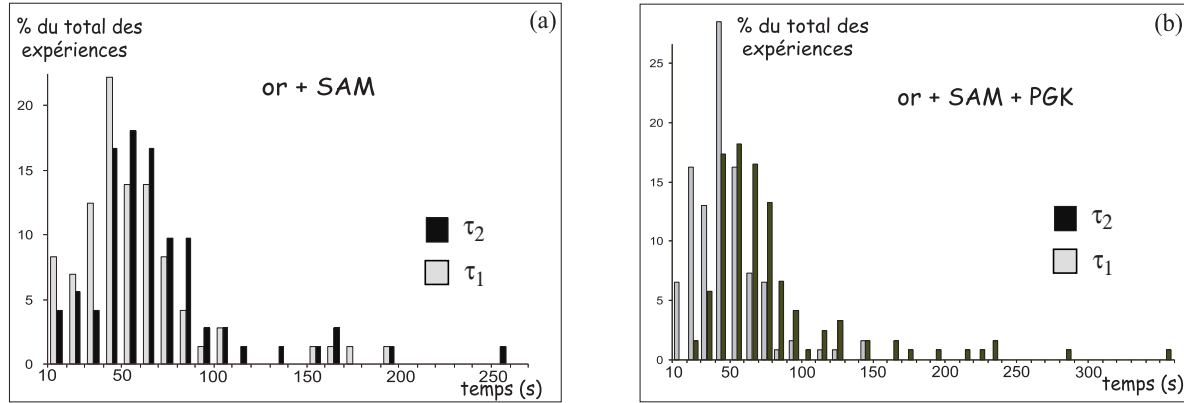


FIG. 4.36 – Histogrammes des deux temps caractéristiques sur (a) la SAM et (b) sur la couche protéique.

Les deux valeurs sont assez proches pour la SAM ( $\tau_{1moy} = 48 \pm 35$  s et  $\tau_{2moy} = 60 \pm 41$  s), alors qu'il y a pratiquement un facteur 2 en présence de la protéine ( $\tau_{1moy} = 37 \pm 23$  s et  $\tau_{2moy} = 69 \pm 52$  s). Rappelons que la durée totale de l'acquisition après injection est de l'ordre de 6 minutes.

Deux problèmes se posent à nous :

- les écarts-types sont très importants, ce qui peut rendre douteuse la pertinence de ces deux temps
- même en l'admettant, une telle différence reste difficile à expliquer

C'est la raison pour laquelle nous nous limiterons à une justification qualitative de l'ordre de grandeur de ces temps. Nous retiendrons donc que le paramétrage des courbes fait ressortir un temps de l'ordre de quelques dizaines de secondes.

### • Interprétation de ce temps caractéristique.

Nous adoptons la vision schématique de la figure 4.37 pour modéliser notre dispositif expérimental (échelles non respectées), avec :

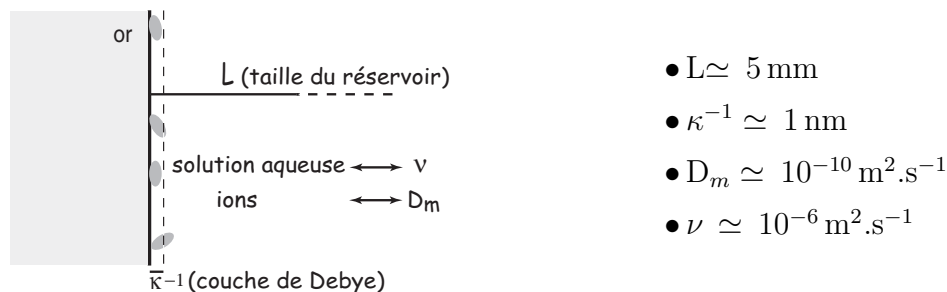


FIG. 4.37 – Modèle schématique utilisé pour l'évaluation des échelles de temps observables (voir texte).

Pour une concentration du tampon de 50 mM, l'extension  $\kappa^{-1}$  de la couche de Debye est de l'ordre du nanomètre. La taille  $L$  du réservoir de solution (selon la normale à la surface) est d'environ 0.5 cm. On garde la valeur du coefficient de diffusion prise précédemment pour les ions ( $D_m \simeq 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ ). La viscosité cinématique de la solution est prise égale à celle de l'eau, soit  $\nu \simeq 10^{-6} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ .

Avec ces grandeurs, on peut construire :

- un temps caractéristique des phénomènes de diffusion :  $\tau_{diff} = L^2/D_m = 25 \cdot 10^4 \text{ s}$
- un temps hydrodynamique de retour à l'équilibre :  $\tau_{hydro} = L^2/\nu = 25 \text{ s}$
- un temps de relaxation de la couche de Debye [35] :  $\tau_{Debye} = L\kappa^{-1}/D_m = 50 \text{ ms}$

Seul le temps caractéristique des phénomènes hydrodynamiques a une valeur compatible avec celui issu des expériences de plasmons. D'autres arguments appuient encore l'hypothèse d'une forte composante hydrodynamique dans le temps caractéristique mesuré par la résonance de plasmon. Calculons pour cela les nombres de Reynolds associés au flux de solution lors de l'injection et lors du rinçage.

Lors de l'injection, 500  $\mu\text{L}$  de solution traversent le réservoir en 2 secondes environ, soit un débit de  $0.25 \text{ mL} \cdot \text{s}^{-1}$  ( $2.5 \cdot 10^{-7} \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ ). La section de la cellule traversée par le flux est approximativement de  $0.5 \text{ cm}^2$ . Ce qui conduit à une vitesse  $V = 5 \cdot 10^{-3} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$ .

Le nombre de Reynolds correspondant vaut  $R_e = VL/\nu = (5 \cdot 10^{-3})^2/10^{-6} = 25$ . Une injection très « turbulente » correspondrait à  $R_e \gg 1$ . Sans que ce soit le cas, on peut considérer que l'agitation de la solution, au moment de l'injection, est efficace et va modifier la couche d'ions adsorbée. Lorsque le flux de liquide s'arrête (fin de l'injection proprement dite), ce sont les processus diffusifs qui vont assurer le retour à l'équilibre.

Si l'homogénéisation de tout le volume après la perturbation était assurée par la diffusion moléculaire, elle prendrait  $\tau = \tau_{diff} = 25 \cdot 10^4 \text{ s}$ . En revanche, la diffusion de quantité de mouvement assure un retour à une situation où le fluide est immobile, même aux petites échelles, sur des temps de l'ordre de  $\tau = \tau_{hydro} = 25 \text{ s}$ .

En déterminant les temps caractéristiques associés au rinçage, par un paramétrage analogue au calcul des temps relatifs à l'injection, on trouve  $\tau = 7.7 \pm 5 \text{ s}$ . Ces « temps de descente » ont été évalués sur 3 rinçages quelconques et pour deux surfaces de chaque type (soit sur un échantillon de 12 temps calculés). Il ressort du paramétrage un temps unique et plus court.

Si nous calculons le nombre de Reynolds dans le cas du flux de tampon de rinçage, on trouve  $R_e \sim 7$ . En effet, la vitesse assurée par la pompe est de 500 mL/h, soit environ 140  $\mu\text{L}/\text{s}$ . La perturbation est moins brutale dans ce cas ; les temps de relaxation associés sont plus courts et apparemment insensibles à la présence de la protéine.

Lors de l'injection, la mise en mouvement de la couche d'ions adsorbée provoque des modifications plus longues à revenir à un état d'équilibre que lorsque l'on soumet l'échantillon à un simple flux de tampon. Ce retour à l'équilibre s'accompagne d'une homogénéisation de l'indice du milieu au contact de la surface métallique. Tant que l'indice évolue, la valeur de l'angle de résonance évolue aussi.

Afin de mieux caractériser et contrôler la contribution hydrodynamique, le réservoir utilisé pour toutes les expériences décrites ici, pourra être remplacé par une cellule de microfluidique. Les profils de vitesse, mais aussi les gammes de flux accessibles seront alors bien maîtrisés et facilement ajustables.



• Organisation des données selon la nature du substrat.

La figure 4.39 rassemble les histogrammes correspondant à chaque type d'injection réalisée. Nous avons isolé l'histogramme se rapportant aux injections du mélange ATP/3PG (fig. 4.38) qui est le plus démonstratif et le plus intéressant.

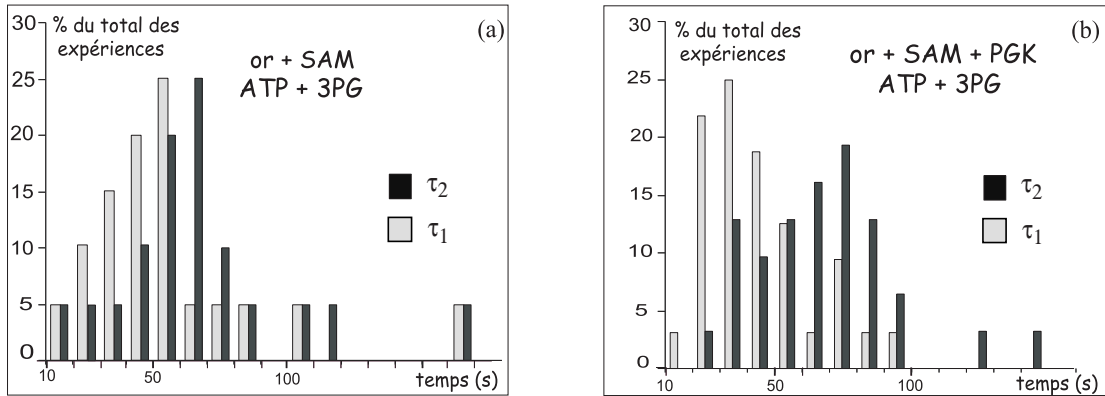


FIG. 4.38 – Histogrammes des deux temps caractéristiques issus du paramétrage des mesures sur (a) la SAM et (b) sur la couche protéique.

Deux « bosses » se détachent clairement dans le cas de l'injection conjointe des deux substrats ATP et 3PG sur la couche protéique (fig. 4.38 b). Cet effet est quasiment inexistant dans le cas de la SAM seule (fig. 4.38 a).

Rappelons que l'association de ces deux substrats est nécessaire au changement conformationnel complet de la protéine. Afin de confirmer le fait que cette dissymétrie reflète la spécificité du comportement enzymatique de la PGK, des tests complémentaires sont indispensables.

De plus, les ions  $Mg^{2+}$  sont supposés être eux aussi indispensables au fonctionnement optimal de l'enzyme. Pourtant, nous n'avons décelé aucune différence significative entre les expériences réalisées avec et sans magnésium.

L'étude des temps caractéristiques a permis de mettre en évidence l'importance des flux hydrodynamiques sur nos mesures de résonance de plasmons. On peut alors envisager des améliorations du montage qui permettront d'identifier et de préciser la part attribuable à la présence de la protéine dans les dynamiques observées.

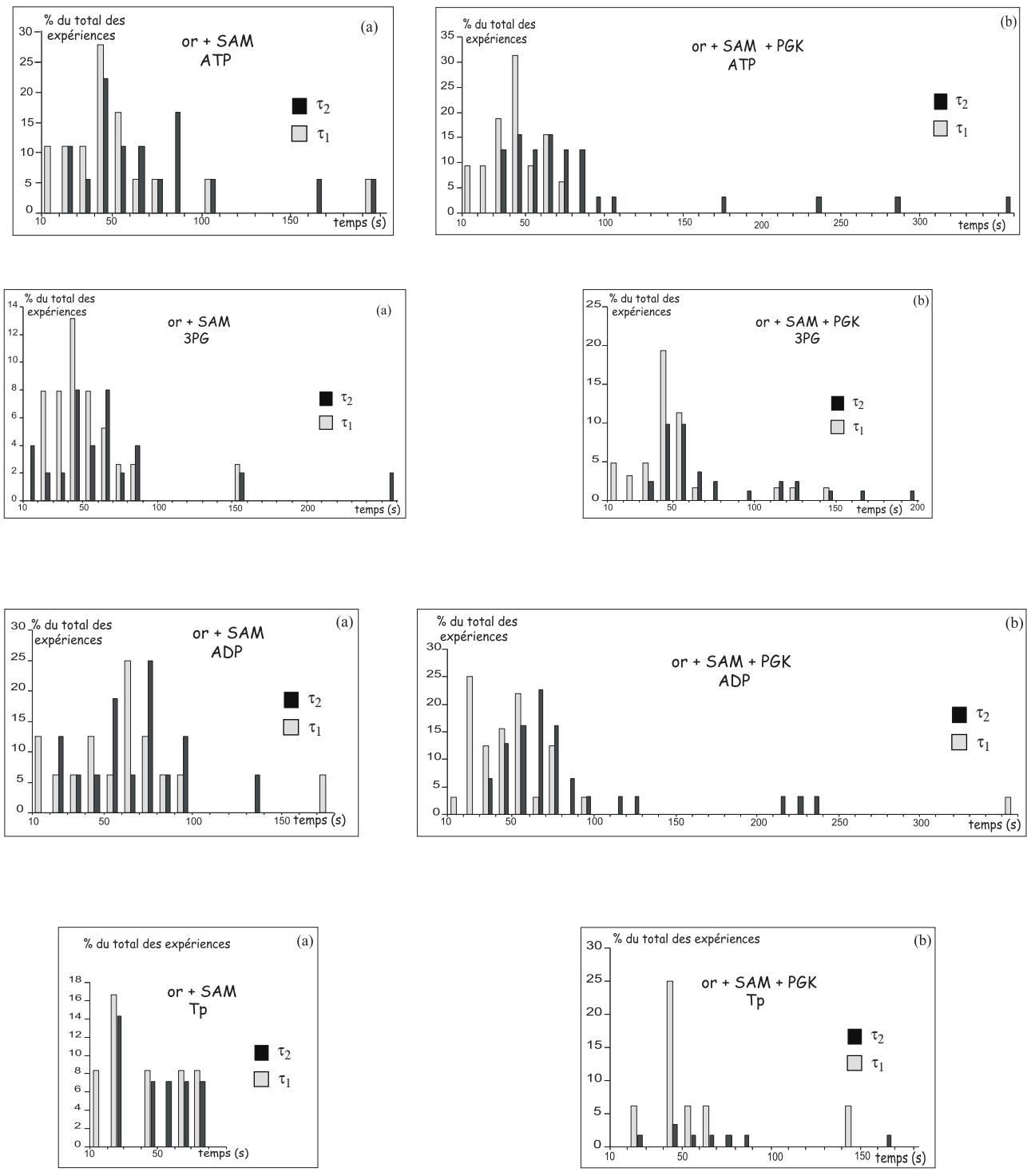


FIG. 4.39 – Histogrammes des deux temps caractéristiques issus du paramétrage des mesures sur (a) la SAM et (b) sur la couche protéique. Classement des données de l’histogramme global selon la nature de l’injection

## Amplitude des sauts

### • Histogramme des sauts.

On reporte sur l'histogramme ci-dessous (fig. 4.40) le nombre de réalisations en fonction de l'amplitude du saut évaluée sur chaque type de surface.

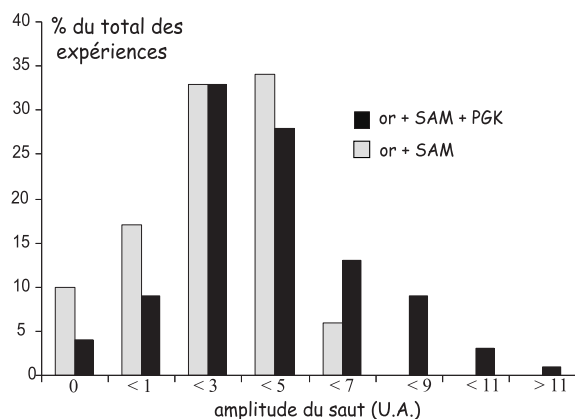


FIG. 4.40 – Histogrammes des sauts en réponse à l'injection des substrats de la PGK sur les deux couches considérées.

Les expériences correspondantes ont été réalisées dans le même tampon phosphate (50 mM,  $\text{pH} = 7.4 \pm 0.2$ ). Tous les sauts calculés y sont représentés, indépendamment de la nature du substrat injecté. De plus, les suites d'injections-rinçages comportent toutes le même nombre de réalisations pour chacun des substrats ou association de substrat. On y retrouve à chaque fois 2 injections de 3PG, 2 d'ADP, 2 d'ATP et 2 de l'association 3PG/ATP.

L'expérience relative à un échantillon se découpe en trois suites d'injections-rinçages (soit  $3 \times 8 = 24$  injections), auxquelles nous ajoutons deux injections de tampon en guise de référence. Les données présentées sur cet histogramme proviennent de 2 expériences sur la SAM seule et de 6 expériences avec la protéine accrochée à la SAM.

L'amplitude moyenne sur tous les sauts calculés vaut  $1.6 \pm 1.4$  UA sur la SAM seule, et  $3.2 \pm 5.0$  UA en présence de la PGK. 1 UA correspond à un déplacement angulaire du minimum de réflectivité de  $0.01^\circ$ . Les sauts d'amplitude inférieure à 1 correspondent aux injections de tampon, mais aussi, dans le cas de signaux très bruités (avec la PGK) à certaines injections de 3PG.

Les sauts ont pu être évalués sur toutes les injections dans le cas de la SAM. En revanche, certaines expériences avec la PGK, montrant une dérive trop importante, ont dû être exclues de cette analyse (150 sauts évalués sur 156 injections).

Nous retiendrons, en ce qui concerne l'amplitude du saut observé, deux différences essentielles selon que la protéine soit présente ou pas :

- les sauts en présence des enzymes sont en moyenne d'amplitude deux fois plus importante que sur la SAM seule.
- la dispersion des valeurs est plus grande en présence des protéines.

Cette différence de dispersion des données se comprend lorsque l'on examine une suite d'injections et de rinçages selon leur ordre chronologique. On fait tout d'abord ressortir l'importance de la nature du substrat injecté sur la réponse aux injections suivantes. On peut de plus extraire de ces données un autre temps caractéristique, propre cette fois à la protéine et qui pourrait correspondre à la relaxation de la couche d'enzymes sur des temps longs devant la durée d'un cycle enzymatique.

- Existence d'un effet-mémoire en présence des enzymes.

Nous appuyons ici le raisonnement sur une expérience pour laquelle l'effet est très marqué (fig. 4.41 b). On le retrouve néanmoins sur plusieurs expériences en présence de la protéine. Notons par ailleurs que les données obtenues sur la SAM (fig. 4.41 a) donnent une représentation assez fidèle de ce qui est observé en moyenne sur ce type de surface (en raison de la faible dispersion des mesures).

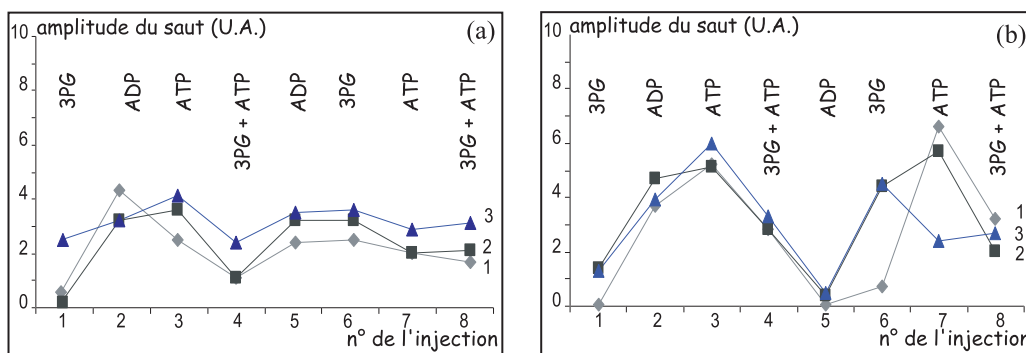


FIG. 4.41 – Chronologie des sauts en réponse à l'injection des substrats de la PGK sur (a) la SAM et (b) en présence de la protéine.

Les différentes réalisations de l'injection d'un même substrat conduisent à des réponses très similaires sur la SAM. En revanche, ce n'est pas toujours le cas en présence de la protéine. Examinons de plus près ces résultats :

- on retrouve bien sûr le fait que l'amplitude des sauts est plus importante en présence de la PGK
- intéressons-nous à l'injection d'ADP immédiatement consécutive de celle de l'association ATP-3PG (injection n° 5, fig. 4.41 b) et comparons-la à celle qui succède à une injection de 3PG seul (injection n° 2, fig. 4.41 b). On remarque une nette différence sur l'amplitude de ces deux sauts, l'un étant pratiquement nul et l'autre valant environ 4 U.A. De plus, cet effet se répète sur les trois suites d'injections-rinçages. Précisons qu'entre chacune des suites d'expériences 1, 2 et 3 on laisse tremper la surface dans le tampon de rinçage pendant 20 à 30 minutes.
- Sur les trois suites d'expériences, on observe une bonne reproductibilité des sauts jusqu'à la seconde injection d'ADP (n° 5). Ensuite, les valeurs des sauts correspondant aux injections de 3PG et d'ATP pris séparément (n° 6 et 7 respectivement), semblent assez aléatoires. On retrouve en revanche des valeurs similaires sur les trois suites d'expériences pour l'injection n° 8 d'ATP-3PG finale.

Remarquons d'abord que l'amplitude du saut associé aux injections d'ATP-3PG est très reproductible (les valeurs des 6 expériences présentées sur la figure 4.41 b sont très proches). On peut penser que les injections de l'association des deux substrats (injections n° 4 et n° 8) mettent la couche de protéines dans un état analogue du point de vue de la mesure SPR.

De plus, les observations précédentes nous conduisent à penser que l'injection conjointe des deux substrats de l'enzyme provoque une modification durable et/ou significative de la couche. L'injection n° 4 semble perturber les trois injections suivantes. Or les enregistrements de ces injections se font sur 6 minutes et ceux des rinçages sur 3. Il s'écoule moins d'une minute entre deux acquisitions. Nous en déduisons que la modification est perceptible sur des temps d'au moins la trentaine de minutes (durée séparant les injections 4 et 8), à comparer à la durée du cycle enzymatique, de l'ordre de la milliseconde.

Le comportement de la couche après l'injection n° 8 d'ATP-3PG finale semble confirmer l'ordre de grandeur de ce temps. Le trempage de 20 à 30 minutes dans le tampon qui suit l'injection n° 8 permet à la couche de protéines de revenir à son état initial et on retrouve au début de chaque série une couche qui répond de la même façon (bonne reproductibilité des sauts pour les injections 1 à 5).

En résumé, si les modifications imposées à la couche d'enzymes par l'injection de ses substrats ne sont pas détectables au niveau du rinçage (retour au niveau initial), elles le sont au niveau de la réponse aux injections postérieures.

Pour l'instant, on peut évaluer un temps caractéristique  $\tau_{prot}$ , de relaxation de la couche de l'ordre de la dizaine de minutes. Pour éclaircir ce point, il faudrait réaliser des expériences testant ce temps, en faisant varier l'attente entre l'injection ATP-3PG et une autre injection, dont la nature peut être importante. En répétant des injections ATP-3PG successives, on pourra par ailleurs tester l'hypothèse de la spécificité enzymatique dans la mesure SPR. On saura par exemple si ce type d'injection suffit à remettre la couche dans un certain état, toujours le même, quelle que soit la durée séparant les deux injections.

Pour prouver que c'est bien la spécificité de l'interaction enzyme-substrat qui génère les comportements observés, on peut utiliser des analogues des substrats non reconnus par l'enzyme, des analogues non hydrolysables (pouvant induire le changement conformationnel mais inhibant la réaction) ou encore des ions indifférents. On compare ensuite les temps de relaxation associés aux différentes situations envisagées. On s'attend à ce que ces temps soient de plus en plus longs quand on passe des ions indifférents aux analogues non reconnus par l'enzyme, puis aux analogues non hydrolysables.

### 4.3.3 Conclusion

La présence des enzymes sur les surfaces utilisées dans les mesures SPR se manifeste à plusieurs niveaux :

– amplitude du bruit sur les mesures :

Ce critère est pour l'instant très qualitatif. Des mesures sur une plus large fenêtre spectrale permettraient une caractérisation approfondie de ce que nous pensons être une dynamique caractéristique de la couche fluide formée de l'ensemble SAM-protéines.

– réponse aux variations de pH :

Dans le cas de la SAM seule, on observe une évolution de l'amplitude des sauts associés aux injections que nous avons caractérisée. Lorsqu'il y a une couche de protéines accrochées à la SAM, l'amplitude des sauts évolue peu, sur la même gamme de pH. On peut l'interpréter comme un effet de la protéine, macromolécule chargée, sur la charge de surface effective ressentie par les ions du volume de solution.

– réponse à une injection :

On peut retenir 3 points importants.

- l'amplitude moyenne du saut consécutif à l'injection est plus important en présence de la protéine
- avec la protéine, la réponse à une injection est fonction des injections précédentes. Ce n'est pas le cas avec la SAM seule pour laquelle les sauts correspondant à un substrat donné sont reproductibles.
- on cherche à savoir s'il existe une échelle de temps caractéristique de la dynamique de réponse. Grâce au paramétrage des courbes expérimentales, nous avons mis en évidence la forte contribution des phénomènes hydrodynamiques dans la dynamique d'évolution de  $\theta_p$ . On trouve en effet, avec le paramétrage, un temps de l'ordre de quelques dizaines de secondes compatible avec l'ordre de grandeur des temps de retour à l'équilibre du fluide au contact de la surface.

De plus, on souligne, grâce à l'étude chronologique des injections, l'existence d'un temps de relaxation  $\tau_{prot}$ , que nous attribuons à la protéine.

La présence de la protéine nous semble clairement décelable et ces premiers résultats laissent espérer une réponse SPR caractéristique de l'activité enzymatique. Cependant, beaucoup d'efforts restent encore à faire pour construire un modèle cohérent et bien établi, qui rende compte de toutes les observations rapportées.

# Conclusion générale

## Conclusion

Ce manuscrit est la synthèse d'un travail dans lequel ont été développés des aspects tant théoriques qu'expérimentaux. Les étapes préliminaires de préparation et de validation effectuées ici sont indispensables à l'étude *in fine* des comportements dynamiques d'une monocouche protéique. Les compétences mises en jeu sur la mise au point du dispositif d'observation s'étendent de la chimie (préparation des surfaces) à la biologie (purification des protéines, enzymologie), tout en gardant une place importante à la physique pour les approches tant théoriques qu'expérimentales.

### *Une modélisation nécessaire*

Dans la première partie, nous avons conduit les études théoriques issues de la bibliographie le plus loin possible, afin qu'elles soient utilisables pour la PGK. Ces simulations et calculs nous semblent nécessaires à une meilleure compréhension d'un système d'enzymes accrochés à une surface. Ils restent généralisables à d'autres systèmes enzymatiques que celui de notre étude et pour lesquels on peut appliquer, sous certaines conditions, un modèle de Michaelis.

De plus, bien que les comparaisons entre la théorie et les mesures expérimentales restent limitées pour l'instant, nous considérons ces calculs comme un point de départ de la modélisation des expériences à venir.

### *Des résultats expérimentaux stimulants*

Nous sommes parvenus à réaliser une monocouche peu dense de protéines, dont l'accrochage bien que non sélectif, permet d'obtenir des quantités d'enzymes actifs détectables, comme le montrent les mesures d'absorbance. Nous nous appuyons sur un modèle sommaire pour avancer des arguments justifiant l'observation d'un signal SPR imputable à la protéine, en dépit de la faible densité d'enzymes accrochés. Nous pensons d'autre part, que certains des effets que l'on détecte en présence de la couche de protéines portent la signature de comportements dynamiques spécifiques à leur qualité d'enzymes. Nous aurions là une technique d'une formidable sensibilité, adaptée à l'échelle des mouvements sondés. Bien que des modèles théoriques du plasmon prédisent un déplacement du minimum de réflectivité pour des variations d'indice de quelques millièmes, la vérification expérimentale sur ce système restait à faire.

Nous avons également pu extraire des données expérimentales quelques grandeurs caractéristiques du système considéré et avancer une ébauche d'explication. Les expériences complémentaires suggérées dans ce manuscrit devraient permettre d'étayer les idées proposées et de construire un modèle cohérent.

# Perspectives

Les résultats obtenus sont déjà très encourageants en dépit des incontournables et nombreuses améliorations à apporter. Nous avons signalé tout au long de ce manuscrit les points à revoir, en suggérant à chaque fois une ou plusieurs solutions susceptibles de répondre au problème posé. Nous ne revenons ici que sur les perspectives les plus séduisantes.

Commençons par le point théorique qui nous semble le plus important de développer. Pour profiter pleinement des performances de la résonance de plasmon, un modèle plus réaliste, tenant compte de la rugosité et/ou des indices effectifs des couches adsorbées notamment, mériterait d'être appliqué aux courbes expérimentales. Dans le même ordre d'idée, nous pouvons citer les travaux de J. Elezgaray qui s'intéresse à la résolution du problème inverse en microscopie plasmon. Dans ses simulations numériques, les surfaces présentent toutes au départ des rugosités périodiques, mais de période spatiale ou d'amplitude différentes. La question centrale est de pouvoir faire la distinction entre les réponses SPR associées à chacune de ces surfaces, lorsque viennent s'y adsorber des espèces de tailles variées et d'un indice différent de celui de la solution.

Les améliorations immédiates à porter au dispositif expérimental concernent le système d'injection et celui d'acquisition. Le fait que la contribution hydrodynamique semble prépondérante justifie d'attacher de l'importance à ce paramètre, en ayant par exemple recours à la microfluidique. Il semble également impératif de changer de capteur pour avoir accès à une fenêtre spectrale plus large.

A plus long terme, la modulation du potentiel de surface est l'extension la plus intéressante des expériences menées jusqu'ici. En effet, les informations qui en découleront permettront d'affiner la vision que l'on a du système et d'en améliorer la modélisation.

En statique, on pourra comparer les résultats expérimentaux aux prévisions théoriques données dans la première partie du manuscrit. De plus, selon les valeurs des paramètres caractéristiques du système, on peut concentrer les substrats près de la surface, ce qui augmente le rendement enzymatique et facilite la détection.

En dynamique, le forçage de la couche d'enzymes par le champ électrique pourrait permettre d'induire des comportements collectifs dont l'observation reste très attrayante.



## Troisième partie

# Annexes

# Annexe A

## Protocole du test d'activité biochimique de la PGK

### A.1 Tampons et solutions

#### A.1.1 Tampon d'activité

Pour 1 L de tampon phosphate : 50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  soit 6.8 g (ajustement du pH à 7.5 avec NaOH 4N). Se garde environ 1 semaine à 4°C. Sauf indication contraire, on utilise ce tampon pour toutes les solutions intervenant dans le test d'activité.

#### A.1.2 Préparation du milieu réactionnel

**MgCl<sub>2</sub>** 2 M : 2,033 g qsp 5 mL d'eau distillée.

**NAD** 50 mM : soit 179mg pour 5 mL d'eau (à conserver au congélateur à -20°C). On vérifie la concentration par une mesure d'absorbance à 260 nm ( $\epsilon=17800 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ ) : avec une dilution au 1/2000 d'une solution environ 50 mM  $C_0=A*0.112 \text{ M}$ .

**ADP** 100 mM :  $m=47.12 \text{ mg}$  pour 1 mL d'eau distillée. Cette solution se conserve à -20°C. On vérifie la concentration par une mesure d'absorbance à 260 nm ( $\epsilon=15400 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ ) : avec une dilution au 1/2000 d'une solution 0.1 M,  $C_0=A*0.260 \text{ M}$ .

**GAP (glycéraldéhyde-3-phosphate)**. A préparer à partir du sel de baryum du GAP diéthyl acétal.

#### *Lavage de la résine Dowex 50WX4-200R*

##### Solutions

- HCl 2N
- NaCl 1N

##### Mode opératoire

- 10 g de résine + 100 mL HCl 2N : agitation pendant 5 minutes. Laisser sédimenter et éliminer le surnageant (orange). Rincer avec 4x100 mL d'eau désionisée ( $\text{pH}_{\text{final}}=6$ )
- Résine + 100 mL NaCl 1N : agitation pendant 5 minutes. Laisser sédimenter et éliminer le surnageant (clair). Rincer avec 4x100 mL d'eau désionisée.
- Résine + 100 mL HCl 2N (id et 2 lavages). Le pH de fin du rinçage vaut 2.09 et est ajusté à 2.4.

Conserver la résine au réfrigérateur.

### ***Préparation du GAP***

- Dans un petit erlenmeyer, ajouter à froid 15 mL d'eau distillée, 3.75 g de résine lavée et 250 mg de DL-GAP diacétal.
- Chauffer progressivement au bain-marie en agitant continuellement. Le diacétal est peu soluble et surnage jusqu'à ce qu'il se décompose en aldéhyde à la chaleur et passe ainsi en solution.
- Refroidir **immédiatement** en plongeant l'erlenmeyer dans un bain de glace fondante.
- Centrifuger 10 minutes à  $10^4$  rpm à  $4^\circ\text{C}$ .
- Récupérer le surnageant et le fractionner par 0.5 mL pour le congeler à  $-20^\circ\text{C}$ .

### **Milieu réactionnel**

- $\text{MgCl}_2$  20 mM : 250  $\mu\text{L}$  du stock à 2 M
- NAD 500  $\mu\text{M}$  : 250  $\mu\text{L}$  du stock à 50 mM (ajustement du volume en fonction de la mesure d'absorbance)
- ADP 1mM : 250  $\mu\text{L}$  du stock à 0.1 M (id.)
- GAP 500  $\mu\text{M}$  : 500  $\mu\text{L}$
- qsp 25 mL tampon phosphate

### **A.1.3 Solution d'enzyme de couplage**

*Si la GAPDH est en suspension dans du sulfate d'ammonium* : Mettre 250  $\mu\text{L}$  de GAPDH dans un tube de 1 mL. Centrifuger 6min à  $10^4$  rpm à  $4^\circ\text{C}$ . Eliminer le surnageant et reprendre le culot dans 250  $\mu\text{L}$  de tampon phosphate (Se conserve au moins 4 jours à  $4^\circ\text{C}$ ).

*Si la GAPDH est lyophilisée* : Dissoudre l'enzyme (10 U/mg) dans 250  $\mu\text{L}$  de tampon phosphate.

### **A.1.4 Dilution préalable de la PGK**

Les tests d'activité de la PGK se font à des concentrations comprises entre 0.2 et 2 nM. La concentration de la solution-mère étant de l'ordre de 4.5 mg/mL (soit 100  $\mu\text{M}$ ), il est nécessaire de procéder à une dilution intermédiaire. Pour une solution 200 nM de PGK :

- 1 mL de tampon phosphate
- 2  $\mu\text{L}$  de la solution de PGK 100  $\mu\text{M}$

On peut éventuellement préparer les contenants par trempage dans la BSA pour limiter l'adsorption sur les parois qui peut fausser le test en volume.

## **A.2 Mesure de l'activité en solution**

Mesure de l'absorbance à 340 nm,  $24^\circ\text{C}$ , dans une cuve de 1mL.

- 1mL de milieu réactionnel (thermalisé à  $24^\circ\text{C}$ ).
- ajouter 20  $\mu\text{L}$  de solution contenant la GAPDH, mélanger par retournement et enregistrer immédiatement l'augmentation d'absorbance sur 3 minutes
- ajouter x  $\mu\text{L}$  PGK, mélanger par retournement ou agiter (si le spectrophotomètre est équipé pour) et enregistrer immédiatement l'augmentation d'absorbance.

## Annexe B

# Protocole de purification de la PGK

### B.1 Tampons et solutions

*Toutes les concentrations indiquées sont les concentrations finales*

#### B.1.1 Purification

Tampon Tris-HCl :

Tris	20 mM (équilibré à pH=7.5 par HCl)
EDTA	1 mM
$\beta$ -mercapto-éthanol ( $\beta$ -MSH)	1 mM

Solution de nettoyage de la colonne *Bleu* : solution de chlorure de guanidinium (GnCl) 6M.

Tampon phosphate :

$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	20 mM (équilibré à pH=7.5)
EDTA	1 mM

Solution de lyse des levures :

Ammoniac	0.7 M (équilibré à pH=7.5 par HCl)
EDTA	3 mM

Solution de neutralisation après la lyse : acide acétique 0.5 M

Solution de phénylméthylsulfonyl fluoride (PMSF) : 0.1 M dans l'isopropanol tamponné à pH 8. **Très toxique** et instable (préparée juste avant d'être utilisée).

#### B.1.2 Electrophorèse

*Les ajouts de SDS se font toujours après ajustement du pH*

Tampon gel inférieur :

Tris	18.17 g/100 mL (1.5 M), équilibré à pH=8.8 par HCl
SDS	0.4 g/100 mL

Tampon gel supérieur :

Tris	6.06 g/100 mL (0.5 M), équilibré à pH=6.8 par HCl
SDS	0.4 g/100 mL

### Tampon de migration 10X :

Tris	30 g/L (0.025 M), équilibré à pH $\simeq$ 8 par HCl
Glycine	144 g/L
SDS	10 g/L

### Tampon d'échantillon (pour 50 mL 2X) :

Tris	0.125 M, équilibré à pH=6.8 par HCl	6.25 mL de stock 1M
SDS	4%	10 mL de stock 20%
glycérol	20%	10 mL
BME	10%	5 mL (on peut en mettre moins)
bromophénol blue	0.01%	5 mg
qsp H <sub>2</sub> O.		

### Tampon de coloration du gel (pour 1 L) :

- 2.5g de Bleu de Coomassie R-250 dissout dans 450 mL d'éthanol
- ajouter 450 mL d'eau distillée
- ajouter 100 mL d'acide acétique

### Solution de décoloration du gel (pour 1 L) :

Acide acétique	100 mL
Ethanol	450 mL
Eau distillée	450 mL

## **B.2 Produits divers**

### Sels :

- sulfate d'ammonium ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub>)
- chlorure de sodium (NaCl)

### Autres :

- glycérol
- persulfate (solution à 10%, à préparer juste avant utilisation ou congelée par aliquot de 0.2 mL)
- acrylamide 40%
- Temed (N,N-N',N'-tétraméthyléthylènediamine, pureté électrophorétique)

## **B.3 Préparation des colonnes de chromatographie**

tamis moléculaire Sephadex G25 : retient les poids moléculaires  $\leq$  10kD, V  $\simeq$  400 mL (medium). Equilibrée au tampon Tris-HCl.

Bleu Hyper D (affi-bluegel) : V  $\simeq$  200 mL. Nettoyage avant (facultatif si on est sûr de la colonne) et après utilisation :

- GnCl 6M (passage de 100 mL, débit 1.3 mL/min)
  - Rinçage immédiat à l'eau avec 5 volumes de colonne
- Equilibrage avec 2 ou 3 volumes de colonne de tampon Tris-HCl.

tamis moléculaire Sephacryl S200 HR : H=120 cm, diamètre 2.5 cm. Rinçage au tampon phosphate.

## B.4 Purification

*Les résultats détaillés et commentés d'une purification sont présentés ensuite.*

### B.4.1 Préparation de la solution protéique de départ

Culture des levures : Cette étape est donnée à titre indicatif et est réalisée en général par ceux qui se sont occupés de tout le génie génétique nécessaire en amont

- Culture de  $2 \times 100$  mL en milieu de sélection YOM-Leu (Yeast Omission Medium : milieu privé de Leucine) : 48h, 30°C.
- Culture de  $2 \times 1$  L en milieu de croissance YEPD (Yeast Extract Peptone Dextrose) : 24h, 30°C.
- Centrifugation à 3000 trs/min, à l'ambiante pendant 5 min. Élimination du surnageant (les culots peuvent être congelés à cette étape pour une purification ultérieure)

Lyse des levures :

1 mL de solution de lyse par mg du culot précédent. Laisser reposer 6-7 h sous la hotte à température ambiante.

### B.4.2 Purification à partir du lysat

Neutralisation du lysat :

- Ramener le pH à environ 7.5 avec la solution d'acide acétique.
- Récupérer le surnageant après centrifugation à 5000 trs/min à 4°C pendant 5 min.

Ajout de quelques mM de solution de PMSF.

**Tout le reste de la purification se fait en chambre froide à 4°C.**

Précipitation au sulfate d'ammonium : 291g/L de surnageant

- Effectuer précautionneusement et par petites quantités les premiers ajouts de sulfate d'ammonium, en vérifiant que les cristaux se dissolvent bien.
- Centrifugation à 15000 trs/min pendant 25 min.
- Saturation du surnageant au sulfate d'ammonium et nouvelle centrifugation avec les mêmes paramètres (facultatif)

**Ne jeter aucune solution avant les analyses finales validant la purification, les conserver séparément pour chaque étape dans de la vaisselle propre. En garder un échantillon (100-200  $\mu$ L) pour le gel final.**

Elution sur colonne G25 et analyse :

- Resuspendre délicatement le culot dans le Tris-HCl additionné de 1mM de PMSF, DNase et RNase respectivement
- Injecter la solution sur la colonne, débit 60 mL/h.
- Collection des fractions (4 mL), même débit.
- Analyse UV (280 et 290 nm) et sélection des fractions montrant la première vague d'absorbance.

### Elution sur colonne de Bleu, analyse et concentration de l'éluat :

- Injecter l'ensemble des fractions collectées (de volume  $V_1$  mL) sur la colonne, débit 45 mL/h.
- Lavage avec le même volume  $V_1$  de tampon Tris-HCl, débit 60 mL/h. (*On peut interrompre la purification à cette étape, dans ce cas on ne passe que les 2/3 de  $V_1$  pour le rinçage.*)
- Collection des fractions de 2.5mL dès le dernier tiers du rinçage
- Eluer avec le tampon Tris-HCl avec 0.5 M finaux de NaCl, même débit.
- Analyse UV des fractions collectées et mise en commun.
- Concentration sur cellule AMICON (ultrafiltration sur membrane millipore pour P.M.  $\geq$  10kD). Réduction du volume à moins de 10 mL, soit un rapport volumique *geq* 1/5. Il est préférable de ne pas descendre en dessous de 5 mL. Un échantillon de 20-30  $\mu$ L est suffisant pour le gel d'électrophorèse.

### Elution sur tamis moléculaire S200 :

- Tasser le gel avant le dépôt de la solution concentrée (pour éviter les bulles d'air) et laisser quelques mL de tampon **phosphate** au dessus (limiter la dilution).
- Déposer avec précaution la solution protéique (éviter de trop perturber le haut du gel).
- Eluer avec 80 mL de tampon phosphate, débit 60 mL/h.
- Collection des fractions (5 mL), débit 36 mL/h.
- Analyse UV et mise en commun des fractions correspondant au pic d'absorbance. Ne pas mélanger toutes les fractions afin de préserver la pureté de celles qui absorbent le plus.
- Aliquoter la solution d'enzyme purifié additionnée de glycérol (concentration volumique finale : 20% de glycérol) en tubes de 150-200  $\mu$ L.

## B.5 Gel d'électrophorèse

Toutes les préparations se font impérativement avec des gants

### B.5.1 Préparation du gel SDS-PAGE inférieur

Egalement appelé running gel, va permettre la migration différentielle des protéines dénaturées selon leur taille. On choisit ici le gel à 10% d'acrylamide.

#### Composition des différents gels selon leur pourcentage en acrylamide :

% acrylamide	7.5%	10%	12%	15%
Tampon gel inf.	2 mL	2 mL	2 mL	2 mL
Acrylamide	1.5 mL	2 mL	2.44 mL	3 mL
Eau	4.5 mL	4 mL	3.56 mL	3 mL

Ajouter l'acrylamide au tampon *gel inférieur* dans un tube de 10mL et homogénéiser. Ajouter l'eau distillée et bien homogénéiser. Ajouter très rapidement au mélange 80  $\mu$ L de persulfate et 8  $\mu$ L de Temed. Verser immédiatement entre les plaques de la cellule électrophorétique préparée (vérification de l'étanchéité de l'ensemble plaques de verre-spacer assurée par un joint), jusqu'à 1 cm du bord supérieur. Remplir avec précaution avec de l'éthanol ou de l'eau distillée pour assurer la planéité de la surface du gel. Les distances de migration depuis l'entrée dans le gel, seront les images des vitesses de migration propres à chacune des espèces déposées dans les puits. Attendre la polymérisation du gel inférieur avant de préparer le gel supérieur.

### B.5.2 Préparation du gel SDS-PAGE supérieur

Quand le gel inférieur est polymérisé, éliminer le solvant en renversant la cuve, et préparer le gel supérieur.

Composition du gel :

Tampon gel sup.	1.7 mL
Acrylamide	0.75 mL
Eau	4.25 mL
Persulfate	30 $\mu$ L
Temed	20 $\mu$ L

Rincer rapidement le gel inférieur avec 1 mL de gel supérieur puis couler celui-ci jusqu'à la limite des plaques. Mettre le peigne en place.

Remarque : si la polymérisation est trop rapide, on peut diminuer la quantité de Temed.

### B.5.3 Préparation des échantillons

Préparer dans un tube eppendorf (1 mL pour 10 puits) un mélange de 20  $\mu$ L de  $\beta$ -mercapto-éthanol par mL de tampon échantillon. Ajouter 10  $\mu$ L de cette solution à 10  $\mu$ L d'échantillon. Chauffer à 80-100°C pendant 1 à 2 minutes. Déposer ces solutions dans les puits (en prenant soin de ne pas les percer). Faire migrer (utilisation du tampon de dilution 1X, soit une dilution au 1/10 du stock), en s'arrêtant quand le front arrive à environ 1 cm du bord inférieur.

### B.5.4 Révélation du gel

Coloration du gel :

Recouvrir le gel (décollé précautionneusement des plaques et positionné dans une boîte en plastique) de la solution de coloration et chauffer 1 minute à puissance maximale aux micro-ondes. Agiter ensuite pendant environ 10 minutes.

Décoloration du gel :

Lavage du gel d'abord abondamment à l'eau, puis dans la solution de décoloration sous agitation. Les solutions de rinçage sont recyclées sur du charbon actif pour régénérer la solution de coloration. Changer la solution de rinçage dès qu'elle n'est plus transparente. On effectue autant de rinçages que nécessaires à la bonne visibilité des bandes.



## B.6 Résultats commentés de la purification de la PGK mutée 140C

Les résultats présentés ici (en italique quand ils ne s'appliquent qu'au cas particulier de cette purification) sont similaires à ceux obtenus avec l'enzyme natif et l'autre enzyme muté. La purification est suivie par spectrophotométrie, la PGK présentant une bande d'absorption entre 260 et 300 nm, avec un maximum vers 280 nm (fig. B.1) ci-dessous). Les mesures d'absorbance (appelées « analyse UV ») sont réalisées à 280 nm et 290 nm.

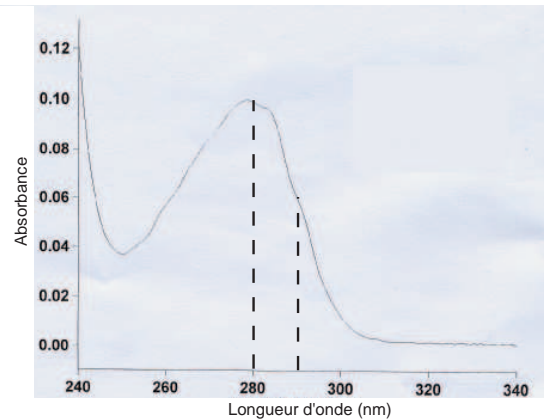


FIG. B.1 – Absorbance d'une solution de PGK diluée au 1/10 dans du tampon phosphate.

### B.6.1 Etapes préliminaires

#### Culture des levures

Afin d'obtenir de grandes quantités de la protéine d'intérêt, le gène de la PGK de la levure *Saccharomyces Cerevisiae* modifié (protéine mutée) ou pas (protéine sauvage) est surexprimé dans cet organisme. On y introduit la séquence d'ADN d'intérêt grâce à un vecteur d'expression souvent plasmidique (ADN circulaire). Ce plasmide contient le gène à exprimer, une ou plusieurs séquences permettant de favoriser la transcription donc l'expression du gène concerné et d'autres permettant la sélection des levures contenant le vecteur. Ces micro-organismes placés dans un milieu adéquat (riche en sucres et à 30°C pour la lignée utilisée dans ce protocole), se reproduisent rapidement et synthétisent, du fait de la surexpression et de la sélection, majoritairement la protéine souhaitée. La purification n'en est ensuite que plus aisée.

*Les levures sont cultivées 48h en milieu sélectif et 24h en milieu de croissance à 30°C. Des 2 litres initiaux, on récupère par centrifugation 30 g de levures fraîches dans 1,6 litre.*

#### Lyse des levures

On détruit les membranes des levures afin de récupérer les protéines synthétisées. Cette lyse à l'ammoniacale est arrêtée au bout de 6 ou 7 h. Une lyse trop longue favoriserait l'accumulation des protéases dans le milieu. Pour limiter les effets nocifs de ces enzymes, le phénylméthylsulfonyl fluoride (PMSF, inhibiteur de protéases) est introduit dans le milieu contenant la PGK après neutralisation du lysat, et juste avant la première chromatographie d'exclusion (ou gel-filtration). Tous les tampons utilisés lors de la purification contiennent de l'acide éthylènediaminotétraacétique (ou EDTA), qui sert d'inhibiteur des protéases à ions métalliques en chélatant ces derniers.

*On utilise une solution à 0.7 mol.L<sup>-1</sup> d'ammoniacale et contenant de l'EDTA (3 mM). Les proportions à respecter sont de 1 mL de solution ammoniacale par gramme de levures. Lyse de 6-7h, suivie d'une neutralisation du milieu acétique (pH ramené autour de 7)*

## B.6.2 Purification à partir du lysat

### Précipitation. Redissolution. Passage sur tamis moléculaire

On fait précipiter la protéine en introduisant du sulfate d'ammonium dans le milieu. En augmentant la salinité de la solution, on dépasse la limite de solubilité du polymère chargé qu'est la protéine. Plusieurs cycles (précipitation-centrifugation-récupération du surnageant) sont effectués afin de récupérer le maximum de protéines dans la phase solide. Le précipité obtenu est ensuite redissous dans le tampon d'éluion de la première colonne de gel-filtration, notée G25. Le surnageant récupéré après centrifugation de la solution précédente est injecté sur la colonne G25, tamis moléculaire laissant passer les protéines de poids moléculaire supérieur à 10 kD. L'éluat est récupéré par fraction de 4 mL et soumis à l'analyse UV.

Le tampon d'éluion contient de la DNase et de la RNase, enzymes détruisant l'ADN et l'ARN par coupure chimique, ce qui permet en complément du PMSF, d'éliminer les contaminants pouvant nuire à la conservation ultérieure de la protéine. Il contient en outre du  $\beta$ -mercapto-éthanol qui permet d'éviter la formation de ponts disulfure entre les protéines et donc leur agrégation.

*Par centrifugation du lysat neutralisé, on récupère 28mL de surnageant. On y ajoute 8.12g de sulfate d'ammonium au total pour faire précipiter les protéines. 30.5mL de surnageant, obtenu par redissolution du précipité en tampon Tris (pH=7.5) et centrifugation, sont déposés sur la colonne G25. On élue par le tampon Tris, sous un débit de 1mL/min, et on collecte la solution en sortie de colonne par fraction de 4mL.*

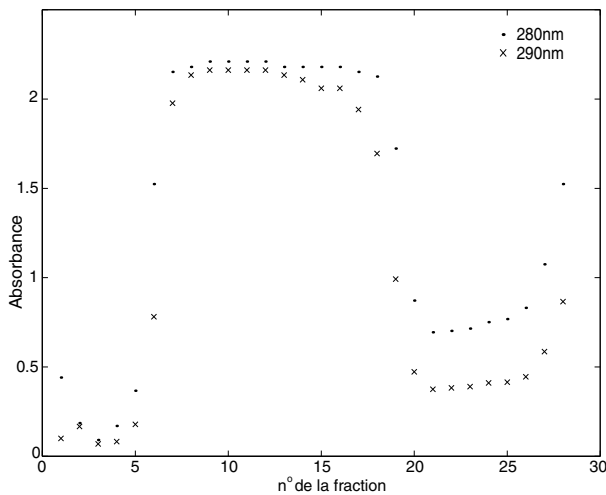


FIG. B.2 – Mesures d'absorbance en sortie de colonne de chromatographie d'exclusion (le tampon d'éluion est pris comme référence de la mesure d'absorbance).

*On sélectionne les fractions pour la suite de la purification grâce aux mesures d'absorbance à 280 et 290 nm reportées ci-contre. On garde les fractions 5 à 20 incluses, avec pour critère les variations notables de l'absorbance. A cette étape de la purification, on conserve toutes les fractions pouvant contenir de la PGK, y compris les fractions 5 et 20, adjacentes des fractions 6 à 19 qui absorbent le plus.*

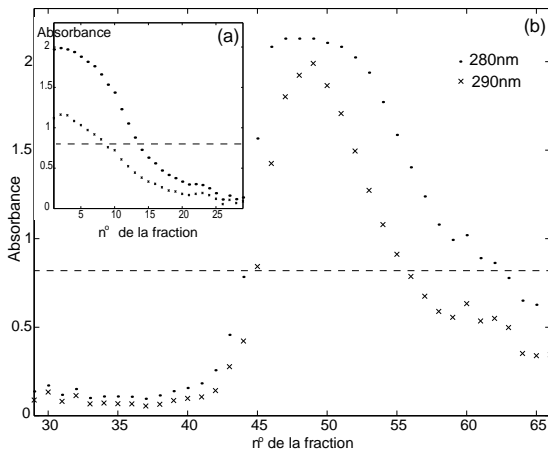
*L'absorbance augmente de nouveau à partir de la fraction 26 : il sort de la colonne des molécules présentant elles aussi un pic d'absorption à 280-290nm, mais elles sont de plus faible poids moléculaire. Elles séjournent plus longtemps dans la colonne dont elles peuvent pénétrer les pores. Ces fractions ne contiennent pas, ou très peu de PGK.*

*On récupère 59mL de solution, dont on garde un échantillon pour le gel d'électrophorèse final.*

### Chromatographie d'affinité

L'ensemble des fractions sélectionnées, de volume  $V \simeq 59$  mL, est déposé sur la colonne d'affinité *Sepharose blue*. Après rinçage avec le même volume  $V$  de tampon Tris, on induit le relargage de la protéine retenue en lavant avec du Tris additionné de chlorure de sodium ( $0.5 \text{ mol.l}^{-1}$ ). Pour éviter de perdre le matériel protéique, les sorties de colonne pendant le chargement de la solution et le début du rinçage sont recueillies séparément. Des fractions de 1 mL sont collectées dès la moitié du rinçage

et pendant tout le relargage afin d'en mesurer l'absorbance. Une fois la colonne chargée et rincée on peut y laisser la protéine et interrompre la purification pour la nuit.

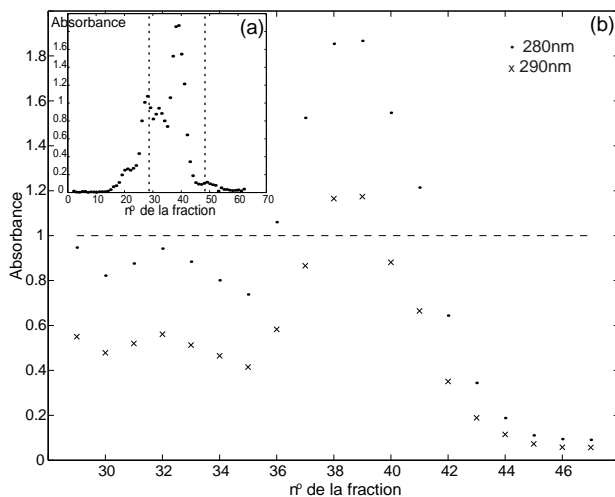


*On utilise à nouveau les résultats des mesures d'absorbance (ci-contre) pour la sélection des fractions intéressantes. On récupère les fractions 44 à 62. A cette étape, il vaut mieux en conserver un peu moins pour continuer la purification (on se fixe un critère de choix arbitraire :  $A \geq 0.8$ , figuré par la ligne horizontale en pointillés, au profit d'une plus grande pureté).*

FIG. B.3 – Mesures d'absorbance en sortie de colonne de chromatographie d'affinité (tampon d'éluat pris pour référence). (a) Absorbance des premières fractions. (b) Absorbance des fractions sélectionnées, la ligne pointillée matérialise la limite arbitraire retenue pour le choix des fractions intéressantes.

### Chromatographie finale

A cette étape, on change de tampon et on utilise un tampon phosphate pour l'équilibrage de la colonne, l'éluat et le stockage final de la protéine purifiée. On concentre l'éluat de la colonne d'affinité par ultrafiltration sur membrane millipore (cellule AMICON). On le passe sur un tamis moléculaire qui va cette fois retenir la PGK. On prend soin de bien tasser le gel avant d'y déposer la solution protéique pour éviter d'avoir des bulles d'air emprisonnées dans la colonne. Pour limiter la dilution de la solution en entrée de colonne, on ne laisse que quelques millimètres de tampon d'éluat au-dessus du gel. On commence à collecter l'éluat par fraction de 5 mL après avoir passé un volume d'environ 1/6 du volume total de la colonne.



*Dans la première chromatographie d'exclusion, la PGK faisait partie des premières fractions sortant de la colonne. Ici, elle pénètre les pores du gel, ce qui permet de la séparer des autres constituants de la solution. La concentration sur cellule AMICON permet de passer de 45 à 8.3 mL, qui sont ensuite déposés en haut de la colonne. On répartit les 6 fractions dont l'absorbance est supérieure à 1 (ci-contre) dans 3 tubes dont on réserve des échantillons pour le gel final : fraction 36 seule, fraction 37 seule et le mélange des 4 autres (fractions 38 à 41).*

FIG. B.4 – Mesures d'absorbance en sortie de colonne (avec le tampon d'éluat pour référence). (a) Absorbance de toutes les fractions (même échelle verticale). (b) Absorbance des fractions comprises entre les deux verticales en pointillés de (a), la ligne pointillée matérialise la limite arbitraire retenue pour le choix des fractions intéressantes.

### B.6.3 Bilan de l'extraction

#### Gels d'électrophorèse

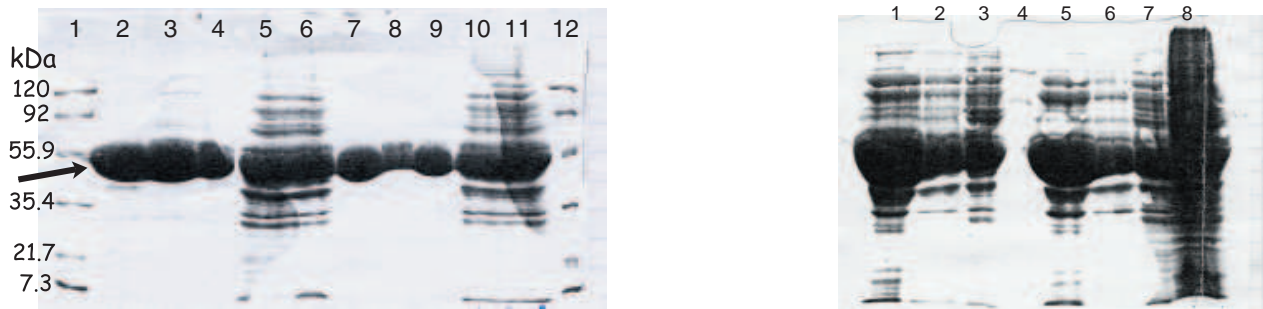


FIG. B.5 – Gels d'électrophorèse des solutions aux différentes étapes de la purification. Les dépôts correspondant aux puits du gel 1 (à gauche) et du gel 2 (à droite) sont indiqués dans le tableau B.1

n° du puits	Gel 1	Gel 2
1	I.P.M. <sup>a</sup>	140C après concentration sur AMICON
2	140C purifiée	140C sortie colonne d'affinité
3	140C purifiée (fr. 37)	140C sortie G25 (1 <sup>er</sup> tamis moléculaire)
4	140C purifiée (fr. 36)	I.P.M. <sup>a</sup>
5	140C après précipitation au sulfate d'ammonium	249C après concentration sur AMICON
6		249C sortie colonne d'affinité
7	249C purifiée	249C sortie G25 (1 <sup>er</sup> tamis moléculaire)
8	249C purifiée <sup>b</sup>	Lysat 249C
9	249C purifiée <sup>c</sup>	
10	249C après précipitation au sulfate d'ammonium	
11		
12	I.P.M. <sup>a</sup>	

TAB. B.1 – Pistes des deux gels d'électrophorèse. <sup>a</sup>Indicateur de Poids Moléculaire. <sup>b</sup>fraction précédant la première fraction d'absorbance supérieure à 1. <sup>c</sup>première fraction d'absorbance supérieure à 1.

C'est une caractérisation complémentaire de l'étude spectrophotométrique. On dépose sur gel d'électrophorèse, des échantillons prélevés aux différentes étapes de la purification et ayant subi une dénaturation préalable, ainsi qu'un indicateur de poids moléculaire. Les espèces, enrobées de SDS qui modifie leur charge, migrent d'autant plus vers le bas du gel qu'elles sont petites. Après dénaturation, on se retrouve avec des solutions de polymères qui progressent par reptation dans les pores du gel. On révèle par coloration du gel au bleu de Coomassie et on rince à l'eau pour éliminer l'excédent de colorant.

*Les différents dépôts sur les deux gels présentés (fig. B.5) sont précisés dans le tableau B.1. A partir du lysat (gel 2, puits 8) dans lequel sont présents des constituants de toutes les tailles dans la gamme considérée (7-200 kD), on aboutit à une seule bande en fin de purification (gel 1 : puits 2, 3, et 4 pour 140C et 7, 8, et 9 pour 249C). Avec la précipitation au sulfate d'ammonium on élimine une proportion non négligeable des constituants du lysat aux extrêmités de l'échelle de poids moléculaire (comparaison des puits 7 et 8 du gel 2).*

## Concentration finale

On évalue la concentration finale par une mesure d'absorbance des solutions protéiques. La densité optique à 280 nm varie d'une unité pour une concentration en protéine de  $2 \text{ mg.mL}^{-1}$ . Les concentrations des stocks de protéines, aliquotés en fractions de 150 ou 200  $\mu\text{L}$  sont de  $2.4 \text{ mg.mL}^{-1}$  pour les deux mutées et  $4.5 \text{ mg.mL}^{-1}$  pour la sauvage. On ajoute du glycérol à la solution obtenue en fin de purification avant la congélation. En augmentant ainsi la viscosité du solvant, on limite la formation de cristaux qui pourraient provoquer la dénaturation de la protéine lors de la congélation.

## Annexe C

# Calculs relatifs au chapitre 3

### C.1 Equation de *Gouy-Chapman*

$$\frac{d\psi(x)}{dx} = -\frac{2\kappa RT}{z\mathcal{F}} \operatorname{sh}\left(\frac{z\mathcal{F}\psi}{2RT}\right) \quad (\text{C.1})$$

or

$$\operatorname{sh}x = 2 \operatorname{sh}\left(\frac{x}{2}\right) \operatorname{ch}\left(\frac{x}{2}\right) \quad \text{d'o} \quad \frac{d(\operatorname{th}(\psi/2\alpha))}{\operatorname{th}(\psi/2\alpha)} = -\kappa dx \quad \text{avec} \quad \alpha = \frac{2RT}{z\mathcal{F}} \quad (\text{C.2})$$

qui s'intègre en

$$\ln\left(\frac{\operatorname{th}[\psi(x)/2\alpha]}{\operatorname{th}[\psi(0)/2\alpha]}\right) = -\kappa x \quad \text{soit} \quad \operatorname{th}\left(\frac{\psi(x)}{2\alpha}\right) = \gamma e^{-\kappa x} \quad (\text{C.3})$$

$$\gamma = \operatorname{th}\left(\frac{\psi(0)}{2\alpha}\right) = \operatorname{th}\left(\frac{\lambda}{4}\right) \quad \text{et avec} \quad \operatorname{th}x = \frac{1 - e^{-2x}}{1 + e^{-2x}} \quad (\text{C.4})$$

on obtient l'expression cherchée :

$$\psi(x) = \frac{2RT}{z\mathcal{F}} \ln\left(\frac{1 + \gamma e^{-\kappa x}}{1 - \gamma e^{-\kappa x}}\right), \quad \gamma = \operatorname{th}\left(\frac{\psi(0)}{2\alpha}\right) = \operatorname{th}\left(\frac{\lambda}{4}\right) \quad (\text{C.5})$$

### C.2 Valeurs de $\eta$ dans les cas-limites $\mu/\beta_b \gg 1$ et $\mu/\beta_b \ll 1$

si  $\mu \ll \beta_b + e^\lambda$  :

$$\eta \sim \frac{1 + \beta_b}{\beta_b + e^\lambda (1 + \mu/(\beta_b + e^\lambda))} \quad (\text{C.6})$$

En effet, en mettant  $\beta_b + e^\lambda$  en facteur dans l'expression (2.48), on obtient au premier ordre en  $\mu/\beta_b$  :

$$\eta \sim \frac{2(1 + \beta_b)}{\beta_b + e^\lambda} \left[1 + \frac{\mu}{\beta_b + e^\lambda} + \left(1 + \frac{2\mu(e^\lambda - \beta_b)}{(\beta_b + e^\lambda)^2}\right)^{\frac{1}{2}}\right]^{-1} \quad (\text{C.7})$$

Après un développement limité au premier ordre en  $\mu/\beta_b$  et réarrangement de l'expression entre crochets :

$$\eta \sim \frac{1 + \beta_b}{\beta_b + e^\lambda} \left[1 + \frac{\mu e^\lambda}{(1 + e^\lambda)^2}\right]^{-1} \quad (\text{C.8})$$

soit :

$$\eta \sim (1 + \beta_b) \left[ (\beta_b + e^\lambda) \left( 1 + \frac{\mu e^\lambda}{(1 + e^\lambda)^2} \right) \right]^{-1} = (1 + \beta_b) \left( \beta_b + e^\lambda \left( 1 + \frac{\mu}{\beta_b + e^\lambda} \right) \right)^{-1} \quad (\text{C.9})$$

qui donne l'expression (C.6) de  $\eta$ , pour  $\mu \ll \beta_b + e^\lambda$ .

si  $\mu/\beta_b \gg 1$  et  $e^\lambda \ll \mu - \beta_b$  :

$$\eta \sim \frac{1 + \beta_b}{\mu} \left( 1 - \frac{e^\lambda}{\mu - \beta_b} \right) \quad (\text{C.10})$$

En effet, l'expression entre accolades de l'équation (2.47) s'écrit aussi :

$$\frac{\beta_b + \mu}{\beta_b} \left( 1 + \frac{e^\lambda}{\beta_b + \mu} - \left[ \left( 1 + \frac{e^\lambda}{\beta_b + \mu} \right)^2 - 4 \frac{\mu \beta_b}{(\beta_b + \mu)^2} \right]^{\frac{1}{2}} \right) \quad (\text{C.11})$$

qui donne au premier ordre en  $e^\lambda/(\mu + \beta_b)$  :

$$\frac{\beta_b + \mu}{\beta_b} \left( 1 + \frac{e^\lambda}{\beta_b + \mu} - \left[ 1 + \frac{2e^\lambda}{\beta_b + \mu} - 4 \frac{\mu \beta_b}{(\beta_b + \mu)^2} \right]^{\frac{1}{2}} \right) \quad (\text{C.12})$$

soit :

$$\frac{\beta_b + \mu}{\beta_b} \left( 1 + \frac{e^\lambda}{\beta_b + \mu} - \frac{\mu - \beta_b}{\mu + \beta_b} \left[ 1 + \frac{2e^\lambda}{\mu - \beta_b} \frac{\beta_b + \mu}{\beta_b} \right]^{\frac{1}{2}} \right) \quad (\text{C.13})$$

Un développement limité conduit à :

$$\frac{\beta_b + \mu}{\beta_b} \left( \frac{2\beta_b}{\beta_b + \mu} - \frac{2e^\lambda/\beta_b}{(\mu + \beta_b)(\mu - \beta_b)} \right) \quad (\text{C.14})$$

En reportant dans l'équation (2.47), on obtient l'expression (C.10) pour  $\eta$ , quand  $\mu/\beta_b \gg 1$  et  $e^\lambda \ll \mu - \beta_b$ .

## Annexe D

# La microscopie à force atomique

Depuis l'invention du microscope à effet tunnel en 1982 [82], une nouvelle classe de microscopes s'est développée : les microscopes à champ proche ou à sonde locale. Ils sont principalement dédiés à l'étude des propriétés de surface des échantillons et ne requièrent aucun système optique (source lumineuse, lentilles). Les images obtenues sont le reflet de l'interaction entre la sonde et la surface et donnent des informations sur la topographie et les propriétés mécaniques des échantillons.

Pour réaliser de tels microscopes, il faut impérativement, comme leur nom l'indique, que les interactions mises en jeu soient de courte portée. De la portée de ces interactions dépend la résolution des appareils. Si on prend l'exemple du premier d'entre eux, le microscope à effet tunnel, la dépendance de l'interaction avec la distance à la surface est telle que l'on accède à la résolution atomique.

Le microscope à force atomique (AFM, *atomic force microscope*) peut fonctionner aussi bien dans le vide ou l'air qu'en milieu liquide (fig. D.1). Cette propriété en a rapidement fait un outil de choix pour l'étude de systèmes biologiques [83, 84]. Il donne accès à la topographie des échantillons de l'échelle moléculaire, avec une résolution de quelques angstroms, à l'échelle de la cellule dont il fournit des images en trois dimensions. Par ailleurs, les études par AFM des forces d'interaction intra- et intermoléculaires se multiplient et sont regroupées sous le terme générique de spectroscopie de force.

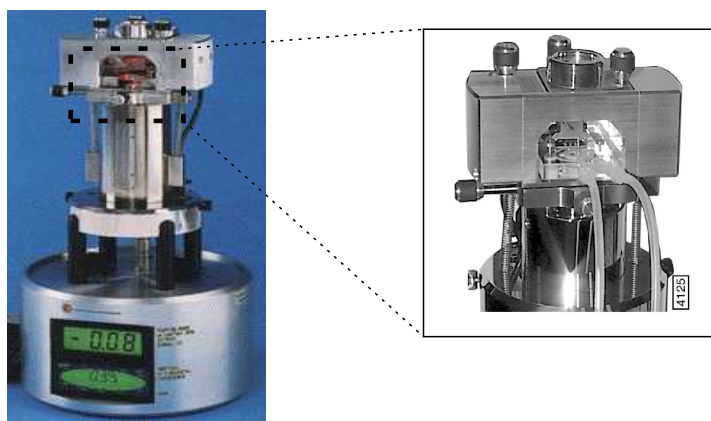


FIG. D.1 – AFM commercial avec agrandissement de la cellule utilisée dans les expériences en milieu liquide.



## Principe et modes de fonctionnement du microscope à force atomique

Le principe consiste à amener, soit au contact de l'échantillon, soit à une distance de quelques angstroms, une pointe dont l'extrémité a un rayon de quelques nanomètres (figure D.2 b). Elle se situe au bout d'un levier flexible, auquel on fait balayer la surface ligne par ligne, pour évaluer les forces mises en jeu en chaque point. Ces dernières vont se traduire par la déflexion du levier : la pointe va s'éloigner ou se rapprocher de la surface selon que les forces exercées sont répulsives ou attractives.

Les déplacements de la pointe sont suivies au moyen d'une photodiode quatre quadrants, par réflexion d'un faisceau laser sur le levier (figure D.2 a). En pratique, et dans le dispositif expérimental utilisé dans notre cas, on impose une valeur de consigne de déflexion du levier et une boucle de rétroaction ajuste la position verticale de l'échantillon, grâce à la céramique piézo-électrique (fig. D.2 a) mobile selon les trois directions, pour maintenir cette valeur : on travaille à force imposée et constante.

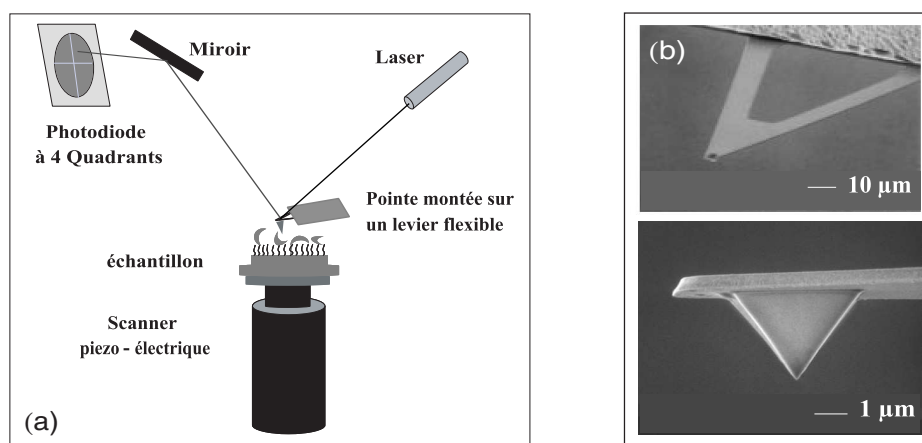


FIG. D.2 – (a) Principe de détection du microscope à force atomique. (b) Images de microscopie électronique d'une pointe AFM.

Nous citerons deux modes de fonctionnement de l'AFM : le mode contact (MC), dans lequel la pointe est en contact permanent avec l'échantillon, et le mode oscillant avec contact ou *tapping mode* (TM).

On préfère ce second mode quand on travaille sur des objets biologiques, « mous » comparativement à une surface solide, et que l'on risquerait d'endommager en mode contact, par friction avec la pointe. On fait osciller la pointe autour de la fréquence de résonance du levier, de telle sorte qu'elle ne touche l'échantillon que de façon transitoire, toutes les périodes d'oscillation.

Au-delà des informations topographiques, ce mode permet également d'apprécier les propriétés visco-élastiques locales, par l'intermédiaire du déphasage entre l'excitation et la réponse de la pointe. En effet, ce déphasage est directement lié à la dissipation d'énergie lorsque la pointe et l'échantillon interagissent.

Dans cette configuration, on impose une amplitude d'oscillation et la distance pointe-échantillon est ajustée pour la maintenir constante grâce à la boucle de rétroaction. On veut à la fois, minimiser la force avec laquelle on « appuie » sur la surface et optimiser la résolution de l'image topographique obtenue. L'amplitude choisie résulte d'un compromis satisfaisant au mieux ces deux contraintes.

Les images ont été réalisées avec un microscope Nanoscope III de Digital Instruments, en *tapping mode*. Les pointes utilisées, dont le rayon de courbure vaut 10-20 nm, sont en nitrure de silicium et montées sur des leviers triangulaires de raideur  $0.38 \text{ N.m}^{-1}$ . Les fréquences de résonance associées sont dans la gamme 7-10 kHz.

## Annexe E

# Calculs et données relatifs aux plasmons

### E.1 Relation de dispersion à la surface d'un solide semi-infini

On considère une onde monochromatique, polarisée  $p$  (champ électrique dans le plan  $(x, z)$ ) qui se propage le long d'une interface diélectrique/métal. La seule composante du champ magnétique est  $\mathbf{B}_y$  et  $E_z$  décroît exponentiellement quand  $|z| \rightarrow \infty$ . Le système est invariant par translation selon l'axe  $y$  (pas de dépendance en  $y$ ) et on décrit les champs dans les milieux 1 et 2 par :

$$\begin{aligned} z > 0 \quad \mathbf{B}_2 &= (0, B_{y2}, 0) \exp[i(k_{x2}x + k_{z2}z - \omega t)] \\ \mathbf{E}_2 &= (E_{x2}, 0, E_{z2}) \exp[i(k_{x2}x + k_{z2}z - \omega t)] \end{aligned} \quad (\text{E.1})$$

$$\begin{aligned} z < 0 \quad \mathbf{B}_1 &= (0, B_{y1}, 0) \exp[i(k_{x1}x - k_{z1}z - \omega t)] \\ \mathbf{E}_1 &= (E_{x1}, 0, E_{z1}) \exp[i(k_{x1}x - k_{z1}z - \omega t)] \end{aligned} \quad (\text{E.2})$$

Ces champs obéissent aux équations de Maxwell pour les milieux non magnétiques ( $\mathbf{B} = \mu_0 \mathbf{H}$ ), et  $\rho_{libres} = 0$ , où  $\rho_{libres}$  est la densité de charges libres :

$$rot(\mathbf{H}_i) = \varepsilon_0 \varepsilon_i \frac{\partial \mathbf{E}_i}{\partial t} \quad (\text{E.3})$$

$$rot(\mathbf{E}_i) = -\mu_0 \frac{\partial \mathbf{H}_i}{\partial t} \quad (\text{E.4})$$

$$div(\mathbf{H}_i) = 0 \quad (\text{E.5})$$

$$div(\varepsilon_i \mathbf{E}_i) = 0 \quad (\text{E.6})$$

avec les équations de continuité à la traversée de l'interface (conséquences de (eq. E.4), (eq. E.5), (eq. E.6) respectivement) :

$$E_{x1} = E_{x2} \quad (\text{E.7})$$

$$\varepsilon_1 E_{z1} = \varepsilon_2 E_{z2} \quad (\text{E.8})$$

$$H_{y1} = H_{y2} \quad (\text{E.9})$$

De la relation (eq. E.7) ou (eq. E.9), on déduit :

$$k_{x1} = k_{x2} = k_x \quad (\text{E.10})$$

Par ailleurs, l'équation (E.3) s'écrit :

$$\frac{\partial H_{yi}}{\partial z} = -i \varepsilon_0 \varepsilon_i \omega E_{xi}$$

soit

$$k_{z1} H_{y1} = \omega \varepsilon_0 \varepsilon_1 E_{x1} \quad \text{et} \quad k_{z2} H_{y2} = -\omega \varepsilon_0 \varepsilon_2 E_{x2}$$

qui grâce à l'équation (E.7) devient :

$$\frac{k_{z1}}{\varepsilon_1} H_{y1} + \frac{k_{z2}}{\varepsilon_2} H_{y2} = 0 \quad (\text{E.11})$$

Les équations (E.9) et (E.11) forment un système d'équations qui admet une solution non triviale ssi son déterminant est nul. Cela s'écrit :

$$\frac{k_{z1}}{\varepsilon_1} + \frac{k_{z2}}{\varepsilon_2} = 0 \quad (\text{E.12})$$

En prenant la dérivée temporelle de l'équation (E.3) et le rotationnel de (E.4), et avec (eq. E.10), on obtient la relation de dispersion :

$$k_x^2 + k_{zi}^2 = \varepsilon_i \left( \frac{\omega}{c} \right)^2 \quad \text{ou} \quad k_{zi} = \left[ \varepsilon_i \left( \frac{\omega}{c} \right)^2 - k_x^2 \right]^{\frac{1}{2}} \quad (\text{E.13})$$

Des équations (E.12) et (E.13), on déduit l'expression de  $k_x$  :

$$k_x = \frac{\omega}{c} \left( \frac{\varepsilon_1 \varepsilon_2}{\varepsilon_1 + \varepsilon_2} \right)^{\frac{1}{2}} \quad (\text{E.14})$$

## E.2 Valeurs de la constante diélectrique de l'or utilisées dans le calcul des profils théoriques

Nous avons utilisé plusieurs sources dans ce manuscrit :

- (1) Surface plasmons on smooth and rough surfaces and on gratings, *Raether* 1988 [56], d'après [85, 86, 87]
- (2) Optical constants of the noble metals, *Johnson, Christy* 1972 [88]
- (3) Resolution in surface plasmon microscopy, *Berger, Kooyman, Greve* 1994 [89]

Les valeurs de  $\varepsilon$  sont reportées dans le tableau ci-dessous sous la forme  $(\varepsilon', \varepsilon'')$ .

TAB. E.1 – Fonction  $\varepsilon(\lambda)$

$\lambda$ (nm)	Valeur tirée de (1)	Valeurs tirées de (2)	Valeur tirée de (3)
522.3		(-3.95, 2.58)	
530	(-3.8, 2.44)(-4.6, 2.49) (-4.8, 2.25)		
530.9			(-4.66, 2.47)
550	(-5.5, 1.98) (-6.0, 2.09) (-6.5, 1.91)	(-5.84, 2.11)	
560	(-6.1, 1.88) (-6.7, 1.94) (-7.3, 1.80)		
568.2			(-7.75, 1.77)
570	(-6.8, 1.80) (-7.4, 1.80) (-8.1, 1.72)		
580	(-7.5, 1.72) (-8.2, 1.67) (-8.8, 1.67)		
583.6		(-8.11, 1.66)	
610	(-9.5, 1.54) (-10.2, 1.35) (-11.2, 1.41)		
618.4		(-10.66, 1.37)	
620	(-10.1, 1.50) (-11.0, 1.27) (-12.0, 1.39)		
630	(-10.8, 1.45) (-11.6, 1.14) (-12.8, 1.32)		
632.8			(-12.33, 1.21)
647.1			(-13.67, 1.05)
650	(-12.1, 1.42) (-13.1, 1.08) (-14.3, 1.29)		
660	(-12.7, 1.41) (-13.7, 1.04) (-15.2, 1.29)		
661.2		(-13.65, 1.035)	
670	(-13.4, 1.40) (-14.4, 1.02)		
676.4			(-16.01, 0.94)

Les données des deux dernières colonnes sont issues de [88]. On ne trouve dans l'article de Berger [89] (colonne 3), que les valeurs de  $\varepsilon$  pour certaines longueurs d'onde, dans la gamme de fréquences considérée. Nous avons donc complété en reprenant les données de l'article [88] d'origine (colonne 2). Raether présente les résultats issus de plusieurs méthodes de mesures (3 couples de la première colonne). Cela donne une idée de la dispersion des mesures de  $\varepsilon$  et du domaine de validité des approximations présentées dans ce manuscrit.

# Bibliographie

- [1] A. A. Baker. <http://spm.phy.bris.ac.uk/research/dna/dna2.html>. University of Bristol, (2004).
- [2] J. H. K. Hörber & M. J. Miles. Scanning probe evolution in biology. *Science* **302**, 1002–1005 (2003).
- [3] R. J. Davenport, G. J. L. Wuite & C. Bustamante. Single-molecule study of transcriptional pausing and arrest by *Escherichia coli* RNA polymerase. *Science* **287**, 2497–2500 (2000).
- [4] K. Svoboda, C. F. Schmidt, B. J. Schnapp & S. M. Block. Direct observation of kinesin stepping by optical trapping interferometry. *Nature* **365**, 721–727 (1993).
- [5] T. Duke. Modelling motor protein systems, dans *Physics of biomolecules and cells*, édité par H. Flyvbjerg, F. Jülicher, P. Ormos & F. David (2002), p. 95–143.
- [6] K. Visscher, M. J. Schnitzer & S. M. Block. Single kinesin molecules studied with a molecular force clamp. *Nature* **400**, 184–189 (1999).
- [7] K. A. P. Edman. Double-hyperbolic force-velocity relation in frog muscle fibres. *J. Physiol.* **404**, 301–321 (1988).
- [8] M. Badoual, F. Jülicher & J. Prost. Bidirectional cooperative motion of molecular motors. *PNAS* **99**, 6696–6701 (2002).
- [9] F. Jülicher & J. Prost. Spontaneous oscillations of collective molecular motors. *Phys. Rev. Lett.* **78**, 4510–4513 (1997).
- [10] M. Buckle, R. M. Williams, M. Negroni & H. Buc. Real time measurements of elongation by a reverse transcriptase using surface plasmon resonance. *PNAS* **93**, 889–894 (1996).
- [11] D. Voet & J. G. Voet. *Biochemistry*, édité par J. Wiley & Sons (1995).
- [12] M. H. Kappler. The independent distribution of amino acid near neighbor pairs into polypeptides. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **78**, 1018–1024 (1977).
- [13] P. Minard, D. J. Bowen, L. Hall, J. A. Littlechild & H. C. Watson. Site directed mutagenesis of aspartic acid 372 at the ATP binding site of yeast phosphoglycerate kinase : Overexpression and characterization of the mutant enzyme. *Protein Engineering* **3**, 515–521 (1990).
- [14] D. Voet & J. G. Voet. 13, dans *Biochemistry*, édité par J. Wiley & Sons (1995), p. 351–367.
- [15] E. Guyon, L. Petit & J.-P. Hulin. 8, dans *Hydrodynamique physique*, édité par C. Edition (2000), p. 467.
- [16] E. Guyon, L. Petit & J.-P. Hulin. 2, dans *Hydrodynamique physique*, édité par C. Edition (2000), p. 51.
- [17] C. Tanford. dans *Physical Chemistry of Macromolecules*, édité par J. Wiley & Sons (1961), p. 647.
- [18] R. J. Hunter. 7, dans *Foundations of Colloid Science*, édité par O. U. Press (2001), p. 304–372.
- [19] H. C. Graham & R. J. P. Williams. The roles of  $ADP^{2-}$  and  $Mg^{2+}$  in control steps of phosphoglycerate kinase. *Eur. J. Biochem.* **197**, 81–91 (1991).
- [20] R. K. Scopes. Binding of substrates and other anions to yeast phosphoglycerate kinase. *Eur. J. Biochem.* **91**, 119–129 (1978).
- [21] B. E. Bernstein, P. A. M. Michels & W. G. J. Hol. Synergistic effects of substrate-induced conformational changes in phosphoglycerate kinase activation. *Nature* **385**, 275–278 (1997).
- [22] B. E. Bernstein, D. M. Williams, J. C. Bressi, P. Kuhn, M. H. Gelb, G. M. Blackburn & W. G. J. Hol. A bisubstrate analog induces unexpected conformational changes in phosphoglycerate kinase from *Tripanosoma brucei*. *J. Mol. Biol.* **279**, 1137–1148 (1998).
- [23] M. A. Sinev, O. I. Razgulyaev, M. Vas, A. A. Timchenko & O. B. Ptitsyn. Correlation between enzyme activity and hinge-bending domain displacement in 3-phosphoglycerate kinase. *Eur. J. Biochem.* **180**, 61–66 (1989).

- [24] M. Molnár & M. Vas.  $Mg^{2+}$  affects binding of ADP but not ATP to 3-phosphoglycerate kinase. Correlations between equilibrium dialysis and enzyme kinetic data. *Biochem. J.* **293**, 595–599 (1993).
- [25] P. Tompa, P. T. Hong & M. Vas. The phosphate group of 3-phosphoglycerate accounts for conformational changes occurring on binding to 3-phosphoglycerate kinase. Enzyme inhibition and thiol reactivity studies. *Eur. J. Biochem.* **154**, 643–649 (1986).
- [26] H. C. João & R. J. P. Williams. The anatomy of a kinase and the control of phosphate transfer. *Eur. J. Biochem.* **216**, 1–18 (1993).
- [27] H. C. Watson, N. P. C. Walker, P. J. Shaw, T. N. Bryant, P. L. Wendell, L. A. Fothergill, R. E. Perkins, S. C. Conroy, M. J. Dobson, M. F. Tuite, A. J. Kingsman & S. M. Kingsman. Sequence and Structure of yeast phosphoglycerate kinase. *EMBO J.* **1**, 1635–1640 (1982).
- [28] M. Desmadril, P. Minard, N. Ballery, S. Gaillard-Miran, L. Hall & J. M. Yon. Conformational changes in yeast phosphoglycerate kinase upon ligand binding : fluorescence of a linked probe and chemical reactivity of genetically introduced cysteinyl residues. *Proteins : Structure, Function and Genetics* **140**, 315–324 (1991).
- [29] P. Minard, M. Desmadril, N. Ballery, D. Perahia, L. Hall & J. M. Yon. Study of the fast-reacting cysteines in phosphoglycerate kinase using chemical modification and site-directed mutagenesis. *Eur. J. Biochem.* **185**, 419–423 (1989).
- [30] P. P. Schmidt, F. Travers & T. Barman. Transient and equilibrium kinetics studies on yeast 3-phosphoglycerate kinase. Evidence that an intermediate containing 1,3-biphosphoglycerate accumulates in the steady state. *Biochem.* **34**, 824–832 (1995).
- [31] N. Ballery, P. Minard, M. Desmadril, J.-M. Betton, D. Perahia, L. Mouawad, L. Hall & J. M. Yon. Introduction of internal cysteines as conformational probes in Yeast phosphoglycerate kinase. *Protein Engineering* **3**, 199–204 (1990).
- [32] R. K. Scopes. The steady-state kinetics of yeast phosphoglycerate kinase. Anomalous kinetic plots and the effects of salts on activity. *Eur. J. Biochem.* **85**, 503–516 (1978).
- [33] A. Geerlof, P. P. Schmidt, F. Travers & T. Barman. Cryoenzymic studies on yeast 3-phosphoglycerate kinase. Attempt to obtain the kinetics of the hinge-bending motion. *Biochem.* **36**, 5538–5545 (1997).
- [34] D. Voet & J. G. Voet. 16, dans *Biochemistry*, édité par J. Wiley & Sons (1995), p. 445–466.
- [35] F. Nadal. *Comportement collectif d'une assemble de colloides au voisinage d'une lectrode plane sous champ lectrique alternatif*. Thèse, Universit de Bordeaux I (2002).
- [36] S. A. Teukolsky, W. T. Vetterling & B. P. Flannery. *Numerical recipes in C*, édité par W. Press (Cambridge Univ. Press, 1992).
- [37] M. L. Schuler, R. Aris & H. M. Tsuchiya. Diffuse and electrostatic effects with insolubilized enzymes. *J. Theor. Biol.* **35**, 67–76 (1972).
- [38] B. K. Hamilton, L. J. Stockmeyer & C. K. Colton. Comments on diffusive and electrostatic effects with immobilized enzymes. *J. Theor. Biol.* **41**, 547–560 (1973).
- [39] F. Shiraiishi. Substrate-concentration dependences of the apparent, maximum-reaction rate and Michaelis-Menten constant in immobilized enzyme reactions. *International Chemical Engineering* **32**, 140–147 (1992).
- [40] L. Goldstein, Y. Levin & E. Katchalski. A water-insoluble polyanionic derivative of trypsin. II. Effect of the polyelectrolyte carrier on the kinetic behavior of the bound trypsin. *Biochem.* **3**, 1913–1919 (1964).
- [41] A. Bouvier, M. George & F. L. Lionnais. *Dictionnaire des mathematiques*, édité par PUF (2001).
- [42] M. Kato. Numerical analysis of the Nernst-Planck-Poisson system. *J. Theor. Biol.* **177**, 299–304 (1995).
- [43] F. Shiraiishi. Diffusional and electrostatic effects on apparent kinetic parameters of reactions catalyzed by enzyme immobilized on the external surface of a support. *J. Ferm. Bioeng.* **79**, 373–377 (1995).
- [44] L. Goldstein & E. Katchalski. Use of water-insoluble enzyme derivatives in biochemical analysis and separation. *Z. Anal. Chem.* **243**, 375–396 (1968).
- [45] L. Goldstein. Microenvironmental effects on enzyme catalysis. A kinetic study of polyanionic and polycationic derivatives of chymotrypsin. *Biochem.* **11**, 4072–4084 (1972).
- [46] S. Phadtare, V. P. Vinod, K. Mukhopadhyay, A. Kumar, M. Rao, R. V. Chaudhari & M. Sastry. Immobilization and biocatalytic activity of fungal protease on gold nanoparticle-loaded zeolite microspheres. *Biotech. Bioeng.* **85**, 629–637 (2004).

- [47] T. Zoungrana, G. H. Findenegg & W. Norde. Structure, stability, and activity of adsorbed enzymes. *J. Colloid Interface Sci.* **190**, 437–448 (1997).
- [48] S. Noinville, M. Revault & M.-H. Baron. Conformational changes of enzymes adsorbed at liquid-solid interface : relevance to enzymatic activity. *Biopolymers* **67**, 323–326 (2002).
- [49] B. Collinet, M. Herv, F. Pecorari, P. Minard, O. Eder & M. Desmadril. Functionally accepted insertions of proteins within protein domains. *J. Biol. Chem.* **275**, 17428–17433 (2000).
- [50] R. H. Ritchie. Plasma losses by fast electrons in thin films. *Phys. Rev.* **1**, 874–881 (1957).
- [51] C. J. Powell & J. B. Swan. Effect of oxidation on the characteristic loss spectra of aluminium and magnesium. *Phys. Rev.* **118**, 640–643 (1960).
- [52] A. Otto. Excitation of nonradiative surface plasma waves in silver by method of frustrated total reflection. *Z. Phys.* **216**, 398 (1968).
- [53] R. M. Hexter & M. G. Albrecht. Metal surface Raman spectroscopy : theory. *Spectrochim. Acta A* **35**, 233–251 (1979).
- [54] E. Burstein, Y. J. Chen, C. Y. Chen, S. Lundquist & E. Tosatti. Giant Raman scattering by adsorbed molecules on metal surfaces. *Solid State Comm.* **29**, 567–570 (1979).
- [55] J. C. Tsang, J. R. Kirtley & J. A. Bradley. Surface-enhanced Raman spectroscopy and surface plasmons. *Phys. Rev. Lett.* **43**, 772–775 (1979).
- [56] H. Raether. *Surface plasmons on smooth and rough surfaces and on gratings* dans *Springer tracts in modern physics*, édité par G. Höhler & E. Niekisch (1988).
- [57] E. Kretschmann & H. Raether. Radiative decay of non radiative surface plasmons excited by light. *Z. Naturforsch. Teil A.* **23**, 2135 (1968).
- [58] M.-P. Valignat. *Etude ellipsométrique de films minces de mouillage*. Thèse, Universit Paris XI (1994).
- [59] H. Raether. Roughness on silver films. *Surf. Sci.* **140**, 31–36 (1984).
- [60] W. H. Weber & G. W. Ford. Optical electric-field enhancement at a metal surface arising from surface-plasmon excitation. *Optics Letters* **6**, 122–124 (1981).
- [61] R. Karlsson. SPR for molecular interaction analysis : a review of emerging application areas. *J. Mol. Recognit.* **17**, 151–161 (2004).
- [62] C. E. Jordan & R. M. Corn. Surface plasmon resonance imaging measurements of electrostatic biopolymer adsorption onto chemically modified gold surfaces. *Anal. Chem.* **69**, 1449–1456 (1997).
- [63] J. G. Quinn, S. O’Neill, A. Doyle, C. McAtamney, D. Diamond, B. D. MacCraith & R. O’Kennedy. Development and application of surface plasmon resonance-based biosensors for the detection of cell-ligand interactions. *Anal. Biochem.* **281**, 135–143 (2000).
- [64] E. Stenberg, B. Persson, H. Roos & C. Urbaniczky. Quantitative determination of surface concentration of protein with SPR using radiolabeled proteins. *J. Colloid Interf. Sci.* **143**, 513–526 (1991).
- [65] R. Karlsson. Real-time competitive kinetic analysis of interactions between low-molecular-weight ligands in solution and surface-immobilized receptors. *Anal. Biochem.* **221**, 142–151 (1994).
- [66] R. Karlsson. Affinity analysis of non-steady state data obtained under mass transport limited conditions using BIAcore technology. *J. Mol. Recognit.* **12**, 285–292 (1999).
- [67] L. Nieba, A. Krebber & A. Plückthun. Competition BIAcore for measuring true affinities : large differences from values determined from binding kinetics. *Anal. Biochem.* **234**, 155–165 (1996).
- [68] T. Zako, K. Harada, T. Mannen, S. Yamaguchi, A. Kitayama, H. Ueda & T. Nagamune. Monitoring of the refolding process for immobilized firefly luciferase with a biosensor based on surface plasmon resonance. *J. Biochem. (Tokyo)* **129**, 1–4 (2001).
- [69] T. Mannen, S. Yamaguchi, J. Honda, S. Sugimoto, A. Kitayama & T. Nagamune. Observation of charge state and conformational change in immobilized protein using surface plasmon resonance sensor. *Anal. Biochem.* **293**, 185–193 (2001).
- [70] D. J. Winzor. Surface plasmon resonance as a probe of protein isomerization. *Anal. Biochem.* **318**, 1–12 (2003).
- [71] T.-S. Lin, C.-P. Pang & J.-T. Lue. Variation of attenuated total reflection due to the birefringence of liquid crystals by excitation of surface plasmons. *Appl. Phys. B* **74**, 401–405 (2002).

- [72] B. Kieser, D. Pauluth & G. Gauglitz. Nematic liquid crystals as sensitive layers for surface plasmon resonance sensors. *Anal. Chim. Acta* **434**, 231–237 (2001).
- [73] K. Tawa & W. Knoll. Out-of-plane photoreorientation of azo dyes in polymer thin films studied by surface plasmon resonance spectroscopy. *Macromol.* **35**, 7018–7023 (2002).
- [74] S. Wang, S. Boussaad & N. J. Tao. Surface plasmon resonance enhanced optical absorption spectroscopy for studying molecular adsorbates. *Rev. Sci. Instrum.* **72**, 3055–3060 (2001).
- [75] X. Hong & F.-J. Kao. Microsurface plasmon resonance biosensing based on gold-nanoparticle film. *Appl. Opt.* **43**, 2868–2873 (2004).
- [76] M. D. Malinsky, K. L. Kelly, G. C. Schatz & R. P. V. Duyne. Chain length dependence and sensing capabilities of the localized surface plasmon resonance of silver nanoparticles chemically modified with alkanethiol self-assembled monolayers. *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 1471–1482 (2001).
- [77] S. Löfaas, B. Johnsson, A. Edström, A. Hansson, G. Lindquist, R.-M. M. Hillgren & L. Stigh. Methods for site controlled coupling to carboxymethyl-dextran surfaces in surface plasmon resonance sensors. *Biosens. Bioelec.* **10**, 813–822 (1995).
- [78] E. Delamar, B. Michel, H. A. Biebuyck & C. Gerber. Golden interfaces : the surface of self-assembled monolayers. *Adv. Mater.* **8**, 719–729 (1996).
- [79] P. Y. Tsoi, J. Yang, Y.-T. Sun, S.-F. Sui & M. Yang. Surface plasmon resonance study of DNA polymerases bonding to template/primer DNA duplexes immobilized on supported lipid monolayers. *Langmuir* **16**, 6590–6596 (2000).
- [80] J. C. Maxwell-Garnett. Colours in metal glasses and in metallic films. *Philos. Trans. R. Soc. Lond.* **203**, 385–420 (1904).
- [81] C. Tassius, C. Moskalenko, P. Minard, M. Desmadril, J. Elezgaray & F. Argoul. Probing the dynamics of a confined enzyme by surface plasmon resonance. *Physica A* **342**, 402–409 (2004).
- [82] G. Binnig, H. Rohrer, C. Gerber & E. Weibel. Surface studies by scanning tunneling microscopy. *Phys. Rev. Lett.* **49**, 57–61 (1982).
- [83] G. Binnig, C. F. Quate & C. Gerber. Atomic force microscope. *Phys. Rev. Lett.* **56**, 930–933 (1986).
- [84] M.-C. Giocondi, P.-E. Milhiet, E. Lesniewska & C. L. Grimallec. Microscopie force atomique : de l'imagerie cellulaire à la manipulation moléculaire. *Med. Sci.* **19**, 92–99 (2003).
- [85] U. Schröder. Der einfluss dünner metallischer deckschichten auf die dispersion von oberflächenplasmaschwingungen in gold-silber-schichtsystemen. *Surf. Sci.* **102**, 118–130 (1981).
- [86] M. L. Thye. Investigation of the optical properties of Au by means of thin semi-transparent films. *Phys. Rev. B* **2**, 3060–3079 (1970).
- [87] M. M. Dujardin & M. L. Thye. Investigation of optical properties of Ag by means of thin semi-transparent films. *J. Phys. Chem. Solids* **32**, 2033 (1971).
- [88] P. B. Johnson & R. W. Christy. Optical constants of the noble metals. *Phys. Rev. B* **6**, 4370–4379 (1972).
- [89] C. E. H. Berger, R. P. H. Kooyman & J. Greve. Resolution in surface plasmon spectroscopy. *Rev. Sci. Instrum.* **65**, 2829–2836 (1994).



---

**Résumé :** Le travail présenté ici porte sur une approche théorique et expérimentale du comportement d'une monocouche peu dense d'enzymes, accrochés à un support solide. Les enzymes forment une classe de protéines, macromolécules biologiques, dont le rôle est de catalyser les réactions chimiques nécessaires au fonctionnement des cellules. Leur accrochage à une surface les contraint fortement et permet de se rapprocher de conditions plus réalistes qu'avec un enzyme en solution diluée. Nous voulons donc caractériser la réponse de ces couches en présence des substrats (réactifs de la réaction à catalyser).

L'approche théorique nous permet, au moyen de simulations numériques, de modéliser les effets de la localisation spatiale et de la charge de la surface solide sur la dynamique enzymatique de la monocouche accrochée. Les résultats de ces simulations sont comparés aux mesures d'activité par absorbance, réalisées sur les monocouches de l'enzyme phosphoglycérate kinase (PGK) de levure dont les constantes caractéristiques fournissent les valeurs numériques des calculs.

La résonance de plasmons de surface (SPR) est une technique optique sensible à des variations d'indice près d'une surface métallique. Les expériences réalisées présentent des caractéristiques liées à la présence de la PGK (amplitude du bruit, influence du pH de la solution utilisée). D'autre part, plusieurs arguments tendent à montrer que ces mesures SPR portent la signature de la spécificité des enzymes pour leur(s) substrat(s). Des mesures complémentaires de microscopie de force atomique (AFM) et d'absorbance permettent de quantifier le taux de couverture de la surface et le nombre d'enzymes actifs après accrochage. Nous validons de cette façon le protocole mis au point qui permet la formation d'une monocouche peu dense et n'annihile pas l'activité enzymatique, nécessaire à une mesure SPR sensible à la spécificité des interactions enzymes-substrats.

**Mots-clés :** résonance de plasmon de surface (SPR), phosphoglycérate kinase (PGK), dynamique enzymatique

---

**Abstract :** This thesis presents experimental and theoretical approaches of the behavior of a non-compact monolayer of enzymes linked to a solid surface. Enzymes are proteins that catalyse chemical reactions in cells. Comparing to enzymes in a dilute solution, surface attached enzymes should provide a better approximation of *in vivo* conditions. We examine the behavior of such layers in the presence of the substrates (reagents of the catalytic reaction). Enzymatic dynamics is studied analytically and numerically, and the effects of spatial localization and surface charge are analyzed in detail. We compare those simulations to absorption measurements done on the samples used in the experimental part. Yeast phosphoglycerate kinase (PGK) is used in the experiments and the numerical simulations.

Surface plasmons resonance (SPR) is an optical method that detects refractive index changes close to a metallic surface. We can see from SPR measurements whether the enzymes have been attached or not to the surface (noise amplitude of the signals, pH variations influence on the response). We think that the experiments also reflect the specificity of enzyme-substrate interaction. Complementary experiments of atomic force microscopy (AFM) and spectrophotometry were conducted to obtain an estimation of surface coverage and the number of enzymes remaining active after attachment, which is also a test of the protocol proposed here. Indeed, that activity of the proteins is necessary to link SPR studies to enzymatic behaviors.

**Keywords :** surface plasmon resonance (SPR), phosphoglycerate kinase (PGK), enzymatic dynamics.

---