



**HAL**  
open science

# Interfaces électrochimiques appliquées à l'étude de composés d'intérêt biologique : application à l'étude de l'interaction entre cytochrome c et cardiolipide

Antoine Perhirin

► **To cite this version:**

Antoine Perhirin. Interfaces électrochimiques appliquées à l'étude de composés d'intérêt biologique : application à l'étude de l'interaction entre cytochrome c et cardiolipide. Chimie analytique. Université de Bretagne occidentale - Brest, 2012. Français. NNT : 2012BRES0094 . tel-01636044

**HAL Id: tel-01636044**

**<https://theses.hal.science/tel-01636044v1>**

Submitted on 16 Nov 2017

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

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

The logo for Université de Bretagne Occidentale (WBLO) consists of the letters 'WBLO' in a stylized, white, sans-serif font. The 'W' and 'B' are connected, and the 'L' and 'O' are also connected. The 'O' has a small circle inside it.

université de bretagne  
occidentale



**THÈSE / UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE**

*sous le sceau de l'Université européenne de Bretagne*

pour obtenir le titre de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE**

*Mention : Sciences de la Matière ; Spécialité : Chimie Analytique*

**École Doctorale SICMA**

présentée par

**Antoine Perhirin**

Préparée à l'UFR Sciences et Techniques  
de Brest

# **Interfaces électrochimiques appliquées à l'étude de composés d'intérêt biologique: application à l'étude de l'interaction entre cytochrome *c* et cardiolipide**

**Thèse soutenue le 20 décembre 2012**

devant le jury composé de :

**Arnaud BONDON**

Directeur de recherche, CNRS, UMR6290, Rennes / rapporteur

**Frédéric Barrière**

Maître de conférence, UMR6226, Rennes / rapporteur

**Frédéric GLOAGUEN**

Directeur de recherche CNRS, UMR6521, Brest / directeur de thèse

**Edouard KRAFFE**

Maître de conférence, UMR6539, Plouzané / co-encadrant

**Yanic MARTY**

Ingénieur de recherche CNRS, UMR6521, Brest / invité

**Nicolas LE POUL**

Chargé de recherche CNRS, UMR6521, Brest / invité



## LISTE DES ABREVIATIONS

AA : Acide aminé  
AAC : ADP/ATP Carrier  
ACV : AC Voltametry  
AFM : Atomic Force Microscopy  
AG : Acides gras  
Ala : Alanine  
Arg : Arginine  
ATP : Adénosine triphosphate  
BB : “bovine brain”, provient de cerveau de boeuf  
BH : “bovine heart”, provient de coeur de boeuf  
CCO : Cytochrome c Oxidase  
CL : Cardiolipide  
CPG : Chromatographie Phase Gazeuse  
CV : Voltamétrie cyclique  
Cys : Cystéine  
cyt c : Cytochrome c  
DHA : Docosahexaenoic Acid  
EIS : Electrochemical Impedance Spectroscopy  
EPA : Eicosapentaenoic Acid  
ET : Electron Transfer  
GC : Glassy carbon  
Gly : Glycine  
His : Histidine  
Ile : Isoleucine  
Lys : Lysine  
Met : Methionine  
MPT : Mitochondrial Permeability Transition  
NHE : Normal Hydrogen Electrode  
PA : Phosphatidic Acid  
PC : Phosphatidylcholine  
PCET : Proton Coupled Electron Transfer  
PE : Phosphatidylethanolamine  
PG : Phosphatidylglycerol  
Phe : Phenylalanine  
PI: Phosphatidylinositol  
PS: Phosphatidylserine  
PUFA : PolyUnsaturated Fatty Acid  
ROS : Espèce réactive de l’oxygène (Reactive Oxygen Species)  
SB : « soy bean », provient de graines de soja  
SCE : Saturated Calomel Electrode  
TLC : Thin Layer Chromatography  
YE : “Yeast”, provient de l’organisme *Saccharomyces cerevisae*

INTRODUCTION GÉNÉRALE .....	1
CHAPITRE 1 : ETAT DE L'ART .....	7
Généralités sur les phospholipides.....	7
Le cardiolipide .....	10
La chaîne respiratoire.....	14
Le cytochrome c .....	15
Présentation générale.....	15
Cyt c, CL et apoptose.....	17
Etat de l'art sur l'interaction cyt c - CL.....	21
Mise en évidence de l'interaction .....	21
« Extended lipid anchorage ».....	21
Evolution du modèle « extended lipid anchorage » .....	24
Modification des propriétés électroniques du cyt c .....	27
Etat de l'art sur l'effet de la nature de la partie hydrophobe sur l'interaction cyt c-lipides.....	29
Electrochimie du cyt c.....	32
Electrochimie sur électrode nue .....	32
Electrochimie avec un promoteur de surface .....	34
Electrochimie avec des SAMs.....	35
Electrochimie avec des lipides .....	36
Electrodes modifiées avec des phospholipides.....	38
Les différentes stratégies de dépôt des lipides.....	38
Phospholipides et réorganisation membranaire.....	40
L'importance des espèces moléculaires du CL .....	42
Le CL 22:6n-3 chez les bivalves .....	42
Fonctions de l'espèce moléculaire CL 22:6n-3 .....	45
CL 22:6n-3 et métabolisme énergétique.....	47
Synthèse et liens avec les objectifs de thèse.....	49
Références.....	50

## CHAPITRE 2 : PROTOCOLES – MISES AU POINT ..... 61

Introduction.....	61
Techniques en chimie des lipides .....	61
Séparation des lipides sur microcolonne .....	61
Extraction des phospholipides par la technique de « Bligh and Dyer » .....	63
Techniques en TLC :.....	63
Synthèse de variants moléculaires.....	69
Préparation de l'électrode modifiée .....	73
Equipement électrochimique.....	73
Description de la technique .....	74
Caractérisation de l'électrode modifiée.....	77
Etude du transfert électronique.....	88
ACV : Voltamétrie en potentiel alternatif .....	88
Simulation du comportement électrochimique du cyt c adsorbé.....	92
Analyses statistiques .....	103
Références .....	104

## CHAPITRE 3 : ETUDE PAR AC VOLTAMÉTRIE DE L'INTERACTION CL - CYT C .....107

Introduction.....	107
Caractérisation du signal électrochimique non idéal du cyt c adsorbé.....	108
Publication.....	112
Resumé.....	112
Discussion .....	130
Conclusion - Perspectives .....	136
Electrochimie sur la forme adsorbée du cyt c.....	136
Influence de la nature du lipide .....	136
Références.....	138

## CHAPITRE 4 - PARTIE 1 : ETUDE DE LA SOUS-POPULATION 2 DU CYT C ..... 141

Introduction.....	141
Effet du pH.....	142
Effet du $\text{Ca}^{2+}$ sur l'anchorage.....	151
Effet du à l'état réduit du cyt c.....	156
Conclusion .....	157
Références.....	158

## CHAPITRE 4 - PARTIE 2 : MEDIATION ELECTROCHIMIQUE DU CYT C, LIPID ANCHORAGE..... 163

Introduction.....	163
Les différentes espèces électroactives du cyt c.....	164
Variation de l'adsorption de cyt c en fonction de la classe de phospholipides.....	165
Effet du $\text{Ca}^{2+}$ sur le système cyt c - PG.....	171
Cinétiques d'adsorption de cyt c.....	172
Rétention de cyt c sur une électrode modifiée PC-PA.....	174
Immobilisation de cyt c avec du dilyso cardiolipide.....	176
Phospholipides neutres, cas de la PC.....	178
Réflexion sur la variation du potentiel d'oxydation du cyt c lors de la phase d'adsorption.....	183
Conclusion .....	186
Références.....	189

## CHAPITRE 4 - PARTIE 3 : EFFET DES CHAINES DU CL ET DE LA NATURE DU CYT C .. 193

Introduction.....	193
Etude de la composition en AG du CL.....	194
Les différentes formes moléculaires de CL.....	194
Précautions prises par rapport à ces formes moléculaires.....	195
Influence de la température de transition de phase.....	195
Oxydation des chaines grasses polyinsaturées.....	196

Paramètres liés à l'adsorption de cyt c .....	196
Paramètres électrochimiques pour des sous-populations de cyt c .....	199
Variations des potentiels lors du transfert de cellule .....	201
Espèce moléculaire du CL et liens avec la nature du cyt c.....	202
Affinité CL – cyt c.....	202
Comportement électrochimique en CV des différents cyt c.....	207
Conclusion .....	209
Références.....	212

## CONCLUSION GENERALE..... 215

Rappel de la problématique .....	215
Originalité de l'étude réalisée .....	215
Résultats principaux sur le lipid anchorage et la spécificité cyt CL .....	216

## PERSPECTIVES ..... 219

Introduction.....	219
Cytochrome c oxidase .....	219
Activité peroxydase du cyt c – biocapteur.....	221
Etude de la peroxydation des chaines du CL sur l'interaction cyt c – CL.....	222
Utilisation du CL comme greffage de silice.....	223
Références.....	224

## ANNEXES..... 227

Composition en AG des différentes sources de phospholipides .....	227
Paramètres de dosage des phospholipides par CPG .....	230
Protocole de réduction du cytochrome C.....	230





## INTRODUCTION GENERALE

Ce sujet de thèse s'est mis en place grâce à la contribution de deux équipes autour d'un thème commun : l'équipe d'analyse en électrochimie et celle d'analyse des lipides en milieu vivant. D'un côté, l'équipe d'analyse des lipides en milieu vivant s'est focalisée pendant la dernière décennie sur les phospholipides spécifiques au milieu marin. Les phospholipides sont les constituants lipidiques majoritaires des membranes biologiques. Ce sont des assemblages moléculaires constitués d'une tête polaire hydrophile et de, majoritairement, deux chaînes grasses qui composent ce que l'on appelle la queue hydrophobe. Les phospholipides s'organisent naturellement en bicouches ce qui permet de séparer des compartiments cellulaires et subcellulaires.

Pendant longtemps les phospholipides ont été considérés uniquement comme des éléments de structure de la cellule. Cependant, leur rôle n'est pas restreint à cette fonction structurelle. Outre cette fonction de compartimentation, Singer a proposé avec la théorie de la mosaïque fluide de considérer la membrane biologique comme une matrice fluide bidimensionnelle qui permet le mouvement latéral de protéines membranaires (Singer 1972). C'est le début de l'intérêt de l'aspect fonctionnel des phospholipides. Par exemple, la composition en acide gras des membranes a été à la base d'une théorie dite de l'adaptation homéovisqueuse (Sinensky 1974). Cette théorie prévoit que les organismes adaptent leur composition lipidique membranaire aux variations de température afin de conserver une fluidité membranaire idéale. Un autre exemple de fonction associées aux phospholipides est formulé par Hazel (Hazel and Williams 1990) qui a montré que les organismes vivants pouvaient moduler la composition des membranes biologiques afin de s'adapter aux conditions environnementales. Enfin, la théorie du pacemaker a été plus loin par rapport à la théorie de l'adaptation homéovisqueuse (Hulbert and Else 2005). Cette théorie est partie de l'observation de la corrélation forte existant entre la composition globale lipidique d'un organisme vivant et son activité métabolique basale. Plus précisément, elle montre un lien entre la présence de certains types de lipides et l'activité enzymatique de certaines protéines membranaires. Même si cette théorie s'est montrée incomplète par la suite, elle a permis de donner un nouvel élan à l'étude de propriétés fonctionnelles des lipides.

Parallèlement, il a été démontré que certaines classes de phospholipides étaient impliquées dans le maintien de l'intégrité structurelle ou fonctionnelle de protéines membranaires. Par exemple, on peut citer des pores transmembranaires répondant à une classe de phospholipide spécifique comme le cardiolipide ou encore le cas de complexes enzymatiques enchâssés dans la membrane de la mitochondrie dont la structure nécessite plusieurs phospholipides spécifiques (Tsukihara et al. 1996). Cela démontre que la structure globale du lipide est déterminante pour ces associations lipides-protéines.

Les dernières études du laboratoire pointent particulièrement le rôle fonctionnel des lipides notamment celui des différentes classes de phospholipides et de leur composition en acides gras. La découverte des caractéristiques uniques du cardiolipide (CL) chez les bivalves marins par le laboratoire a été le point de départ du projet (Kraffe et al. 2002). Le CL est le seul des phospholipides à être constitué de quatre chaînes grasses. De plus, ces quatre chaînes grasses sont majoritairement constituées du même acide gras, ce qui donne au CL une composition très spécifique, propre à chaque organisme voire à chaque organe. Chez les mammifères par exemple, le CL de cœur de bœuf contient plus de 80% de chaînes grasses de type 18:2n-6 ce qui tranche nettement avec les autres classes de phospholipides dont la nature des chaînes grasses est plus variable. Chez les bivalves épigés (comme l'huître japonaise, la coquille Saint-Jacques ou la moule bleue), le CL présente une composition en chaînes grasses majoritairement composé de 22:6n-3 (Kraffe et al. 2002). Cela en fait un cas unique dans le milieu vivant.

Il existe une riche bibliographie à propos de ce lipide concernant son implication dans les transferts d'électrons de la chaîne respiratoire des organismes vivants. La chaîne respiratoire est un des processus nécessaires à la production d'énergie de la cellule. Elle est composée d'une série de complexes enzymatiques enchâssés dans la membrane interne de la mitochondrie. Cette chaîne a deux fonctions : Elle utilise l'excès d'électrons produits par le cycle de Krebs pour réduire l'oxygène en eau et elle crée un gradient de protons de part et d'autre de la membrane interne mitochondriale. Le rétablissement de ce gradient de protons s'effectue via un canal spécifique appelé  $F_0F_1$ -ATPsynthase et est couplé à une production d'ATP, molécule universelle porteuse d'énergie pour la cellule.

Il a été montré qu'il existe des interactions entre le CL et toutes les protéines de la chaîne respiratoire mitochondriale. Ces interactions sont impliquées dans le fonctionnement de ces protéines (Fry and Green 1980; Fry and Green 1981; Robinson 1993). De plus, ces interactions font généralement intervenir la partie hydrophobe du CL (Pinheiro et al. 1993). Or les chaînes grasses du CL chez les bivalves ont une composition spécifique qui n'a jamais été retrouvée dans d'autres organismes. La question de la relation entre la structure particulière de ce lipide et sa fonction s'est naturellement posée (Kraffe et al. 2008). Le transfert d'électrons le long de la chaîne respiratoire fait intervenir une petite protéine soluble, le cytochrome c (cyt c), dont le rôle principal peut se décrire comme une navette de transport d'électrons entre le complexe III et le complexe IV.

C'est dans ce contexte que le cyt c a été choisi comme modèle d'étude. En effet, le CL présente des interactions spécifiques avec cette petite métalloprotéine, qui est une protéine modèle concernant l'étude du transfert d'électrons. Le sujet de recherche s'est ainsi rapproché du domaine de l'électrochimie aux interfaces.

Comme dans plusieurs autres domaines de recherche en chimie étudiés à Brest, l'électrochimie est de plus en plus orientée vers l'étude de systèmes moléculaires issus du vivant, le biomimétisme ou la maîtrise de systèmes enzymatiques inspirés du vivant. En particulier, l'étude du comportement catalytique des hydrogénases est devenue une spécialité (Gloaguen and Rauchfuss 2009). Le laboratoire a aussi une bonne

expérience de l'immobilisation des systèmes bioinspirés sur des électrodes modifiées reproduisant une membrane biologique (Thèse Gomila 2010).

L'étude des réactions chimiques in-vivo est une voie d'inspiration de choix pour la recherche en électrochimie. Nombreuses de réactions majeures chez les organismes vivants impliquent des réactions de transfert d'électrons comme la photosynthèse ou la respiration. La complexité de ces réactions in-vivo et leur efficacité n'a généralement pas d'égal in-vitro. Un cas très parlant concerne la photosynthèse. Bien étudiée in-vitro dans chacune de ses étapes, les conditions de son fonctionnement in vivo restent mal définies. Jamais le processus complet de photosynthèse créé in-vitro n'a pu égaler son efficacité in-vivo. Cela est révélateur de la grande complexité de fonctionnement de ces systèmes biochimiques et de l'importance de leur interaction avec leur environnement direct qui comprend entre autres, des lipides membranaires.

L'étude des systèmes hydrogénases implique la maîtrise des techniques électrochimiques appliquées aux protéines contenant des noyaux Fer et/ou Soufre. Ces atomes sont à la base de l'activité catalytique. La bonne compréhension de l'influence de leur environnement direct est la clé de la maîtrise de leur activité catalytique.

Il existe également des techniques non électrochimiques pour étudier les transferts électroniques de ces systèmes. Le choix de les étudier par électrochimie se justifie par le fait qu'elle reste l'une des méthodes les plus simples à mettre en œuvre et également une méthode facile à contrôler. En effet, la force motrice nécessaire à l'addition ou au retrait d'un électron est facilement contrôlable par le potentiel d'électrode.

Comme pour de nombreuses métalloprotéines, l'utilisation d'électrodes métalliques ou de carbone vitreux non modifiées ne permet pas l'étude électrochimique du cytochrome *c* (Betso et al. 1972). La protéine se dénature au contact de l'électrode et l'atome de fer n'a plus son environnement natif protéique. Le recours à des modifications d'électrode inspirées des membranes biologiques a permis de contourner ce problème (Salamon and Tollin 1991).

Les premiers travaux réalisés sur les interactions entre CL et cytochrome *c* ont rapidement mis en évidence leur nature complexe. La décennie 1990-2000 a été très riche en terme de publication d'articles sur les interactions entre CL et cytochrome *c*. Les travaux de l'équipe de Kinnunen ont été novateurs dans ce domaine. Ils ont été les premiers à proposer le modèle de l'« extended lipid anchorage ». Cette théorie prévoit l'interaction spécifique du CL avec le cytochrome *c* avec l'insertion d'une ou deux chaînes grasses dans un patch hydrophobe du cytochrome *c*, les autres chaînes grasses sécurisant l'accroche de la protéine à la surface de la membrane (Rytömaa et al. 1992). Plus précisément, deux sites d'accroches ont été identifiés sur le cytochrome *c*. Un premier site est caractérisé par des interactions de type électrostatique avec le cytochrome *c* tandis que le deuxième site est caractérisé par des interactions de type hydrophobes. Si ce phénomène de « lipid anchorage » a été confirmé par plusieurs études par la suite, il n'y a toujours pas de consensus sur le mécanisme précis d'introduction de la chaîne grasse au

sein du *cyt c*. Les recherches menées jusqu'ici accordent une large part à l'étude de la séquence peptidique du *cyt c* en cherchant à déceler les acides aminés déterminants impliqués dans le « lipid anchorage ». Certains résidus lysine chargés positivement sont reconnus comme étant déterminants pendant la phase d'approche électrostatique mais il n'y a pas de consensus sur l'identification des acides aminés clés qui interagissent avec la partie hydrophobe du CL. Il n'y a alors que peu d'étude s'intéressant à l'effet des chaînes du CL dans cette interaction. Ce n'est qu'après la découverte de l'importance du CL pour l'induction de l'apoptose (Liu et al. 1996) que le CL et la nature de ses chaînes intéresseront les scientifiques.

L'apoptose, ou la mort programmée cellulaire, est le processus de contrôle des organismes pluricellulaires pour détruire les cellules non désirées. Ce processus peut être déficient pour certains cancers. Un des mécanismes d'induction de l'apoptose repose sur le « relargage » de *cyt c* hors de la mitochondrie. Ce phénomène, qui n'est pas encore complètement compris, implique également le CL et son interaction avec le *cyt c* (Liu et al. 1996). Permettre l'étude de l'interaction *cyt c* – CL ainsi que la question de l'impact des chaînes d'AG sur ces interactions est devenu l'enjeu de ce sujet de thèse.

L'objectif majeur de mon travail de thèse a été de mettre au point et d'optimiser une méthode électrochimique utilisant une électrode modifiée avec du CL. Des applications pour l'étude électrochimique du *cyt c* ou de la CCO devraient permettre de mettre en place des études permettant de mieux comprendre le lien entre CL et la chaîne respiratoire. La réalisation d'un tel assemblage ouvre aussi la voie à des études comparatives pour la compréhension des spécificités structurales du CL observées dans la nature.

Après une présentation de l'état des connaissances concernant les divers domaines abordés (chapitre 1), nous présenterons les méthodes expérimentales utilisées dans le cadre de ces travaux et tout particulièrement la mise au point d'une technique électrochimique originale basée sur l'AC voltamétrie (chapitre 2). Le chapitre 3 présente une publication soumise et acceptée dans « *Biochimica et Biophysica Acta* » sur l'application de cette méthode électrochimique pour une électrode modifiée au CL ayant adsorbé du *cyt c*. Dans le chapitre 4, les applications de cette méthode concernant l'étude de la nature des interactions entre le CL et le *cyt c*, la théorie du « lipid anchorage », l'effet des chaînes du CL et enfin l'effet de la source de *cyt c* sont présentées et discutées.

- Betso, S. R., M. H. Klapper and L. B. Anderson **1972**. "Electrochemical studies of heme proteins. Coulometric, polarographic, and combined spectroelectrochemical methods for reduction of the heme prosthetic group in cytochrome c." Journal of the American Chemical Society 94(23): 8197-8204.
- Fry, M. and D. E. Green **1980**. "Cardiolipin requirement by cytochrome oxidase and the catalytic role of phospholipid." Biochemical and Biophysical Research Communications 93(4): 1238-46.
- Fry, M. and D. E. Green **1981**. "Cardiolipin requirement for electron transfer in complex I and III of the mitochondrial respiratory chain." Journal of Biological Chemistry 256(4): 1874-1880.
- Gloaguen, F. and T. B. Rauchfuss **2009**. "Small molecule mimics of hydrogenases: hydrides and redox." Chemical Society Reviews 38(1): 100-108.
- Hazel, J. R. and E. E. Williams **1990**. "The role of alterations in membrane lipid composition in enabling physiological adaptation of organisms to their physical environment." Progress in Lipid Research 29(3): 167-227.
- Hulbert, A. J. and P. L. Else **2005**. "Membranes and the setting of energy demand." Journal of Experimental Biology 208(9): 1593-1599.
- Kraffe, E., J. Grall, M. Le Duff, P. Soudant and Y. Marty **2008**. "A Striking Parallel Between Cardiolipin Fatty Acid Composition and Phylogenetic Belonging in Marine Bivalves: A Possible Adaptative Evolution?" Lipids 43(10): 961-970.
- Kraffe, E., P. Soudant, Y. Marty, N. Kervarec and P. Jehan **2002**. "Evidence of a tetradocosahexaenoic cardiolipin in some marine bivalves." Lipids 37(5): 507-514.
- Liu, X., C. N. Kim, J. Yang, R. Jemmerson and X. Wang **1996**. "Induction of Apoptotic Program in Cell-Free Extracts: Requirement for dATP and Cytochrome c." Cell 86(1): 147-157.
- Pinheiro, T. J. T., P. J. Bratt, I. H. Davis, D. C. Doetschman and A. Watts **1993**. "Spin-lattice relaxation times of phospholipid aminoxyl spin labels in cardiolipin-cytochrome c bilayers: a pulse saturation-recovery EPR study." Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2 1993(11): 2113-2117-2113-2117.
- Robinson, N. C. **1993**. "Functional binding of cardiolipin to cytochrome c oxidase." Journal of Bioenergetics and Biomembranes 25(2): 153-63.
- Rytömaa, M., P. Mustonen and P. K. Kinnunen **1992**. "Reversible, nonionic, and pH-dependent association of cytochrome c with cardiolipin-phosphatidylcholine liposomes." Journal of Biological Chemistry 267(31): 22243-8.
- Salamon, Z. and G. Tollin **1991**. "Reduction of cytochrome c at a lipid bilayer modified electrode." Bioelectrochemistry and Bioenergetics 25(3): 447-454.
- Sinensky, M. **1974**. "Homeoviscous Adaptation" A Homeostatic Process that Regulates the Viscosity of Membrane Lipids in *Escherichia coli*." Proceedings of the National Academy of Sciences 71(2): 522-525.
- Singer, S. J. **1972**. "A fluid lipid-globular protein mosaic model of membrane structure." Annals of the New York Academy of Sciences 195(1): 16-23.
- Tsukihara, T., H. Aoyama, E. Yamashita, T. Tomizaki, H. Yamaguchi, K. Shinzawa-Itoh, R. Nakashima, R. Yaono and S. Yoshikawa **1996**. "The whole structure of the 13-subunit oxidized cytochrome c oxidase at 2.8 Å." Science 272(5265): 1136-1144.



## CHAPITRE 1 : ETAT DE L'ART

### INTRODUCTION

Ce chapitre introduit les notions théoriques nécessaires à la bonne compréhension de la problématique abordée dans cette thèse. Il peut concerner à la fois la biochimie, la médecine, la chimie analytique ou encore la biophysique. Si beaucoup de ces notions appartiennent à des domaines très éloignés, cela montre bien ici le caractère multidisciplinaire, de plus en plus présent dans nos structures de recherche. Toutefois, toutes ces notions se recouperont dans la dernière partie du chapitre qui fait la synthèse et tente de rassembler toutes les pièces du puzzle pour aboutir à l'explication de la thématique qui est posée dans cet ouvrage.

### GENERALITES SUR LES PHOSPHOLIPIDES

Les lipides sont en fait un regroupement mal défini de molécules naturelles aux structures très diverses qui partagent cependant une propriété commune : une bonne solubilité dans les solvants organiques. Dans les organismes vivants, certains lipides ont des fonctions de signalisation, de réserve d'énergie ou de structure. Les phospholipides, majoritairement des glycérophospholipides, appartiennent à cette dernière catégorie. Ils sont les constituants majeurs des membranes biologiques qui permettent de délimiter les cellules et les compartiments cellulaires. A ce titre, on les nomme aussi lipides membranaires. C'est une grande famille de lipides dont le point commun est une partie triester de glycérol. Sur les positions 1 et 2 du glycérol, une chaîne hydrocarbonée est estérifiée. En position 3 est estérifié un acide phosphorique dont le substituant terminal définit la classe du phospholipide. Dans certains phospholipides, un aminodiol remplace le glycérol. Les classes majeures de phospholipides sont présentées en [Figure 1.1](#) et [Figure 1.2](#). Leur dénomination courante est dépendante de la nature de la tête polaire. Si un groupement choline est lié à l'acide phosphorique, le phospholipide s'appelle une phosphatidylcholine.



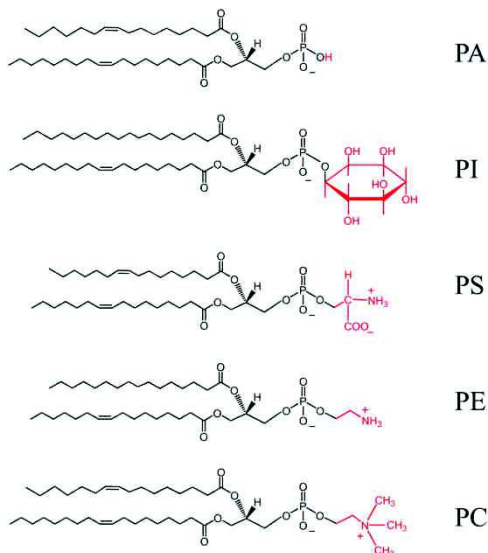


Figure 1.1 : Différentes classes de phospholipides, PA : Acide phosphatidique, PI : Phosphatidylinositol, PS : Phosphatidylsérine, PE : Phosphatidyléthanolamine, PC : Phosphatidylcholine.

Mon travail s'est principalement focalisé sur deux classes de phospholipides que sont la PG (phosphatidylglycérol) dont la tête polaire est composée d'un motif glycérol et du cardiolipide (CL) qui a la particularité de contenir quatre chaînes grasses. On peut considérer que sa structure résulte de l'association d'une PA et d'une PG (Figure 1.2).

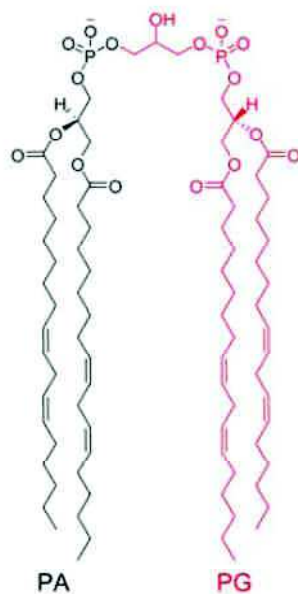


Figure 1.2 : Structure moléculaire du CL et de la PG. Le CL comprend quatre chaînes 18:2n-6. Sa structure peut être considérée comme l'assemblage de motifs PA et PG.

Au sein d'une même classe de phospholipides, une grande variété de chaînes grasses peut être observée permettant de moduler les propriétés physiques des phospholipides. Les chaînes grasses, que l'on appelle acides gras (AG) sous leur forme libre ont généralement entre 12 et 22 carbones et peuvent également posséder des insaturations (double liaison carbone-carbone), cycles ou ramifications. Même s'il existe des noms usuels pour nommer les différents acides gras, on utilise souvent une nomenclature systématique qui permet généralement une meilleure visualisation du type d'acide gras. La dénomination est la suivante :

$Cl:xn-p$

Avec **l** la longueur de la chaîne carbonée (12 à 22 atomes de carbones), **x** le nombre d'insaturations présentes sur la chaîne et **p** la position de la première insaturation en partant du groupement méthyle terminal (Figure 1.3).

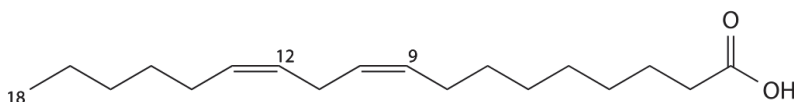


Figure 1.3 : Structure semi développée de l'acide gras C18:2n-6

Les insaturations peuvent avoir une configuration cis ou trans. Ces configurations ne sont pas équivalentes du point de vue des propriétés physique des chaînes grasses (Tableau 1.1). En l'absence d'indication, la configuration cis est supposée, car c'est la configuration rencontrée dans la nature à quelques exceptions près. De part les mécanismes de biosynthèse de ces acides gras, les doubles liaisons sont séparées par un groupement méthyle (-CH<sub>2</sub>-). Par conséquent, dans le cas de chaînes grasses polyinsaturées, on ne renseigne généralement pas sur la position des insaturations suivantes.

Les propriétés biophysiques des acides gras dépendent de leur longueur de chaîne mais aussi beaucoup de la présence et de la nature des insaturations sur la chaîne grasse (Tableau 1.1). De par les nombreuses combinaisons possibles entre le nombre de carbones et/ou d'insaturations, il existe une grande variété de chaînes grasses possible. Cette diversité se retrouve in-vivo et chaque classe de phospholipides contient tout un panel de chaînes grasses différentes. Dans le milieu marin, on retrouve une plus grande diversité d'AG que chez les animaux terrestres et on peut compter jusqu'à 50 AG différents dans les tissus des bivalves marins par exemple (Kraffe et al. 2004).

Type de chaîne	Nom commun	point de fusion (°C)
C12:0	laurique	44.2
C14:0	myristique	54.4
C16:0	palmitique	62.9
C16:1n-7	palmitoléique	-0.1
C18:0	stéarique	69.6
C18:1n-9 cis	oléique	16.3
C18:1n-9 trans	oléique	45
C18:2n-6	linoléique	-5
C18:3n-3	linoléinique	-11
C20:4n-6	arachidonique ou ARA	-43.5
C20:5n-3	timnodonique ou EPA	-53.5
C22:6n-3	DHA	-44.6

Tableau 1.1 : Type de chaîne grasse/acide gras et nom usuel associé ainsi que le point de fusion.

Pour étudier la fonction d'une classe de phospholipides, on choisit généralement de cibler une espèce moléculaire (phospholipide ne contenant qu'un seul type de chaîne grasse). Parfois, une fonction ou un processus cellulaire peut être relié à une seule espèce moléculaire. C'est particulièrement le cas pour le cardiolipide (CL) dont la composition en acide gras est très homogène.

## LE CARDIOLIPIDE

Le CL, ou 1-2-bis-(3-sn-phosphatidyl)-glycérol est le seul phospholipide présentant quatre chaînes grasses (Figure 1.2). On le trouve dans certaines membranes de bactéries ou dans la membrane interne des mitochondries d'eucaryotes (Daum 1985). Plus généralement, le cardiolipide est présent dans toutes les membranes dont la fonction est de créer un gradient électrochimique pour la production d'énergie cellulaire. Sa proportion au sein de ces membranes est de l'ordre de 15 - 20%. La répartition du CL entre le feuillet externe et interne de la bicouche membranaire n'est pas équivalente. Des mesures faites sur des mitochondries de pancréas humain démontrent une accumulation de CL sur les feuillets externes des membranes mitochondriales (Hovius et al. 1993). Sa découverte en 1942 dans le cœur de bœuf qui contient une grande concentration de mitochondries lui a donné son nom usuel (Pangborn 1942).

Malgré l'apparente symétrie de la molécule, les deux moitiés du cardiolipide ne sont pas équivalentes. Le carbone des deux glycérols latéraux en sn2 est chiral. On peut donc avoir les configurations RR, SS et RS (Mileykovskaya et al. 2005). Il existe aussi un centre prochiral sur l'atome central du glycérol central. Concernant le cardiolipide naturel, seule la configuration RR est retrouvée. Les deux phosphates du CL présentent des  $pK_a$  très différents ( $pK_{a1} = 2.8$  et  $pK_{a2} = 7.5 - 9.5$ ). Toutefois, cette différence serait davantage due à la formation d'une structure cyclique qui stabiliserait la première protonation (Kates et al. 1993) plutôt qu'à sa chiralité (Figure 1.4).

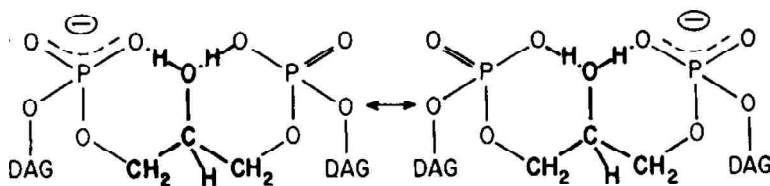


Figure 1.4 : Structure bicyclique du cardiolipide, d'après Kates et al. 1993.

La charge nette du cardiolipide serait donc de  $-1$  à pH physiologique. De part ses quatre chaînes grasses, le cardiolipide devrait avoir une grande diversité de structures moléculaires due aux multiples combinaisons d'acides gras possibles. Or, la composition en acide gras de cette classe de phospholipides est très homogène et se distingue nettement des autres classes de phospholipides (Figure 1.5) (Schlame et al. 1990).

Source of mitochondria	Molecular species	Composition
		mol/100 mol
<i>S. cerevisiae</i>	(18:1-16:1)-(18:1-18:1)	36.0
	(18:1-16:1)-(18:1-16:1)	31.7
	(18:1-18:1)-(18:1-18:1)	14.5
	(16:1-16:1)-(18:1-16:1)	14.0
	(16:1-16:1)-(16:1-16:1)	3.1
	not identified	0.9
Rat liver	(18:2-18:2)-(18:2-18:2)	57.0
	(18:1-18:2)-(18:2-18:2)	35.1
	(18:1-18:2)-(18:1-18:2)	7.9
Bovine heart	(18:2-18:2)-(18:2-18:2)	47.7
	(18:3-18:2)-(18:2-18:2)	21.0
	(18:1-18:2)-(18:2-18:2)	14.6
	(18:3-18:2)-(18:3-18:2)	5.2
	(18:1-18:2)-(18:1-18:2)	4.6
	(18:1-18:1)-(18:1-18:2)	0.7
	not identified	6.0

Figure 1.5 : Diversité des espèces moléculaires du CL intra et inter organismes (Schlame et al. 1993).

Si l'homogénéité de la composition en acides gras du CL est commune à tous les organismes vivants, la nature même des acides gras du CL peut varier dans la phylogénie. Les bactéries ont davantage de chaînes courtes et saturés. Certaines chaînes chez les bactéries sont par ailleurs ramifiées (Figure 1.6) ou présentant des cycles comme la présence de chaînes C17:0cyclo dans la bactérie *Escherichia coli*.

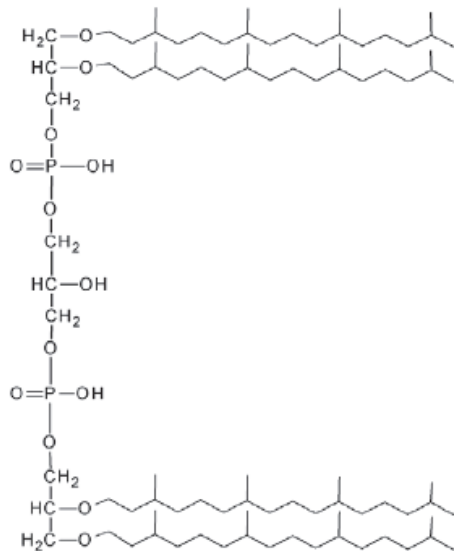


Figure 1.6 : Structure prédominante du CL des archée bactéries caractérisée par 4 chaînes 4Me16:0. D'après Corcelli et al. 2007.

Les insectes ont des chaînes majoritairement en 16:1 (Malhotra et al. 2009), les mammifères en 18:1n-9 et 18:2n-6 et on retrouve des acides gras à longues chaînes polyinsaturées chez les organismes marins comme les bivalves (Figure 1.7) (Kraffe et al. 2002).

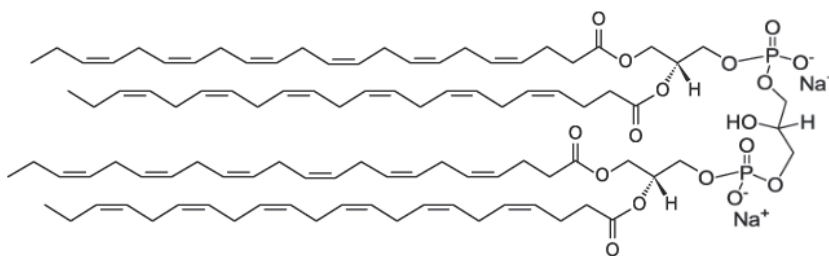


Figure 1.7 : CL à quatre chaînes grasses en 22:6n-3, Espèce moléculaire prédominante chez la coquille St Jacques, *Pecten maximus* (Kraffe et al. 2002).

Certains processus de contrôle de la composition des acides gras du CL ont été mis en évidence (Malhotra et al. 2009) ce qui démontre l'importance pour l'organisme d'avoir une certaine structure moléculaire du CL.

L'apparente symétrie des CLs serait nécessaire à l'affinité particulière observée du CL pour diverses protéines (Schlame et al. 1990; Berger et al. 1992). Le CL est connu pour avoir une grande importance dans le maintien de l'activité enzymatique optimale de nombre d'enzymes clés impliquées dans le métabolisme énergétique de la mitochondrie tels que les complexes I et III (Fry and Green 1981; Bazán et al. 2013), la cytochrome *c* oxidase appelée CCO ou complexe IV (Arnarez et al. 2013), les transporteurs d'ADP-ATP ou le complexe  $F_0F_1$  ATP-synthase. La CCO a par exemple besoin d'au moins deux CL liés pour maintenir une structure fonctionnelle (Figure 1.8) (Robinson 1993).

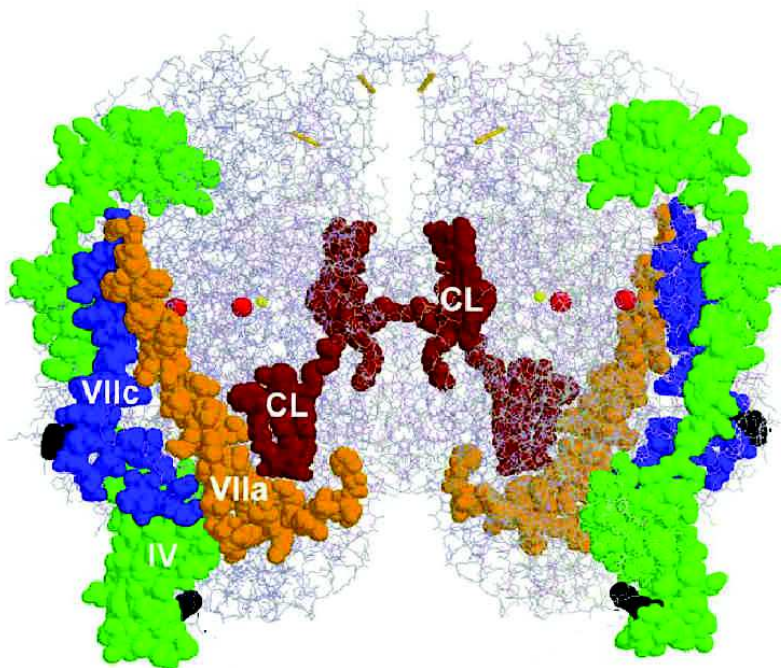


Figure 1.8 : Exemple d'un complexe enzymatique impliquant la présence de deux CL (en brun) : Structure dimérique de la cytochrome *c* oxidase (D'après Musatov 2006).

La CCO débarrassée de ses CL perd sa configuration spatiale native. Le CL est aussi impliqué dans la formation de super complexes (association de plusieurs protéines) de la chaîne respiratoire (Claypool 2009; Schlame and Ren 2009). En plus de son rôle structurant pour la CCO, Vik a montré que le CL associé à la CCO a aussi un effet sur l'affinité du cyt *c* à la CCO (Vik et al. 1981).

## LA CHAÎNE RESPIRATOIRE

La chaîne respiratoire est le processus de production d'énergie de la cellule (procaryote ou eucaryote). La chaîne respiratoire est une association de complexes protéiques présents au sein de la membrane interne de la mitochondrie et est responsable, avec l'ATP synthétase, de la production d'ATP (phosphorylation oxydative).

A partir des coenzymes réduites (NADH et FADH<sub>2</sub>) issues du métabolisme énergétique mitochondrial, un flux d'électrons (flèches en pointillés, Figure 1.9) est généré et transféré grâce à quatre complexes protéiques et deux navettes (ubiquinone UQ et cyt c) jusqu'à l'oxygène moléculaire. Les complexes I, III, et IV de la chaîne respiratoire, en plus d'être des transporteurs d'électrons, sont également des pompes à protons qui font sortir des H<sup>+</sup> de la matrice vers l'espace inter membranaire, créant ainsi à la fois un gradient de pH ( $\Delta$  pH de -1) et un potentiel de membrane mitochondrial ( $\Delta\Psi_m \sim 200$ mV). La dissipation du gradient de protons via le complexe V ou F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP synthase fournit l'énergie nécessaire à la phosphorylation d'un ADP en ATP.

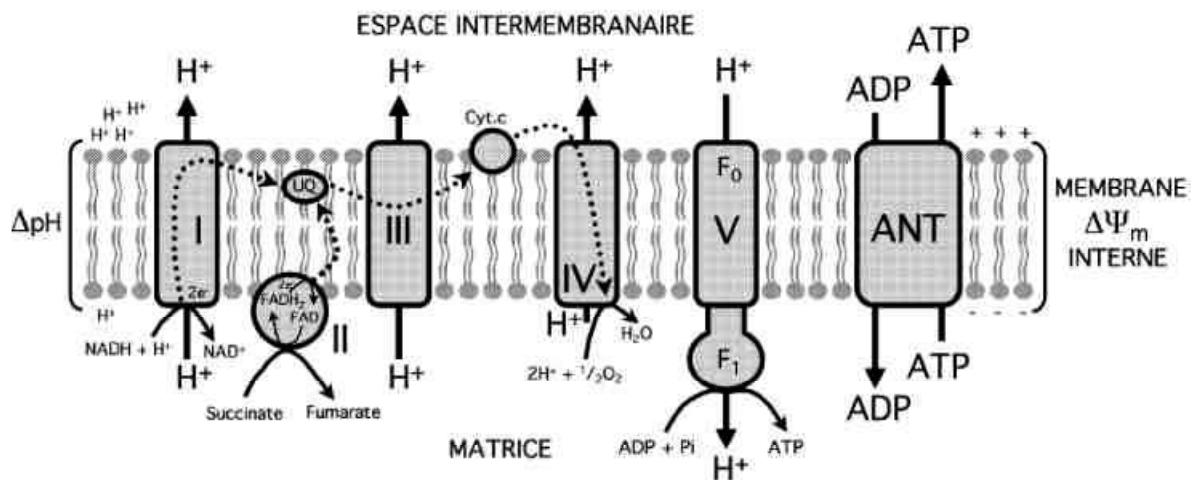


Figure 1.9 : Chaîne de phosphorylation oxydative sur la membrane interne de la mitochondrie.

Le cyt c peut se lier à ses deux partenaires de la chaîne respiratoire qui sont la Cytochrome c Oxidase (Complexe IV ou CCO) et le Cytochrome bc1 (complexe III). Il assure ainsi le transfert d'électrons entre ces deux complexes.

## LE CYTOCHROME C

## PRESENTATION GENERALE

Le cytochrome *c* (cyt *c*) est une métalloprotéine présente dans tous les organismes vivants. Il en a été recensé environ 150 formes différentes contenant entre 1 et 16 hèmes (Fedurco 2000). Malgré cette apparente diversité, le cyt *c* est l'une des protéines les plus conservées au cours de l'évolution. Sa séquence de 104 acides aminés est une des séquences peptidiques parmi les plus conservées chez les mammifères. 27 acides aminés du cyt *c* mammifère sont d'ailleurs communs à tous les cyt *c* d'eucaryotes. La conservation de cette séquence démontre l'importance cruciale de cette protéine pour le bon fonctionnement de la machinerie cellulaire. Son rôle clé de transporteur d'électrons de la chaîne respiratoire est probablement à l'origine de cette homogénéité de structure dans tous les êtres vivants. Sa forme globulaire (13 kDa) est majoritairement constituée d'hélices alpha avec insertion d'hème à noyau ferrique à l'intérieur de la protéine (Figure 1.10). Elle est facilement soluble dans l'eau au contraire des autres complexes de la chaîne respiratoire enchâssés dans la membrane. Cela est surtout dû aux multiples charges positives (+7/+8 à pH physiologique) portées majoritairement par des résidus lysines situés à la surface de la protéine. Son point isoélectrique se situe aux alentours de 10. Ces charges ne sont pas également réparties et le cyt *c* présente un moment dipolaire (Rytömaa and Kinnunen 1995).

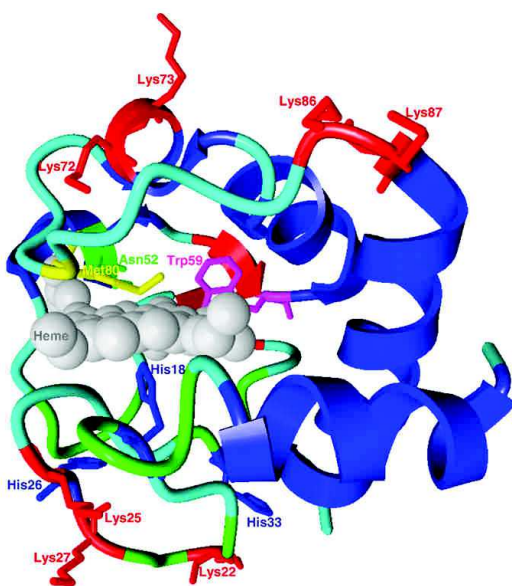


Figure 1.10 : Structure protéique du cyt *c* humain, les atomes de l'hème sont représentés en gris. D'après Kagan 2009



Le cyt *c* est une des protéines les plus étudiées. Sa structure a été résolue par diffraction X en 1967. C'était alors l'une des toutes premières résolutions de structure protéique par cette méthode (Dickerson et al. 1967). Sa séquence protéique est la première à être archivée dans la base de données mondiale Swiss-Prot créée en 1986. De part sa grande stabilité en solution aqueuse et ses propriétés d'absorption de la lumière qui rendent facile son étude par spectrophotométrie visible ( $\epsilon = 129100 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  à 416 nm –Margoliash and Frohwirt 1959). Le cyt *c* est également considéré comme une référence pour l'étude des métalloprotéines.

Les propriétés de transfert électronique du cyt *c* à l'état natif sont issues de son hème situé à l'intérieur d'une cavité protéique. Sur la totalité de la surface de l'hème, seuls 7.5% sont potentiellement en contact avec du solvant et permettent une interaction avec une autre entité moléculaire (Bushnell et al. 1990). L'ion fer central est entouré de groupements aromatiques et aliphatiques plutôt hydrophobes. Pour tous les cyt *c* étudiés, les ligands axiaux de l'ion fer sont constitués des AA Met80 (Met80 : 80<sup>ème</sup> acide aminé – une méthionine) et His18 (histidine en position 18). Cet environnement permet au cyt *c* d'avoir un potentiel redox d'environ 0.26 V vs NHE à pH physiologique alors que le couple en solution  $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$  est à 0.77 V vs NHE (Salemme 1977).

Si historiquement le cyt *c* est associé à un rôle de transporteur d'électrons, on lui a par la suite découvert d'autres fonctions dans divers processus cellulaires (Huttemann et al. 2011) (Figure 1.11). On peut citer, sans être exhaustif la fonction peroxydase du cyt *c* (Ju et al. 2002), son rôle de facteur d'induction de l'apoptose (Liu et al. 1996), de régulation du calcium (Hanson et al. 2004) ou encore son activité nitrite réductase (Basu et al. 2008) récemment découverte.

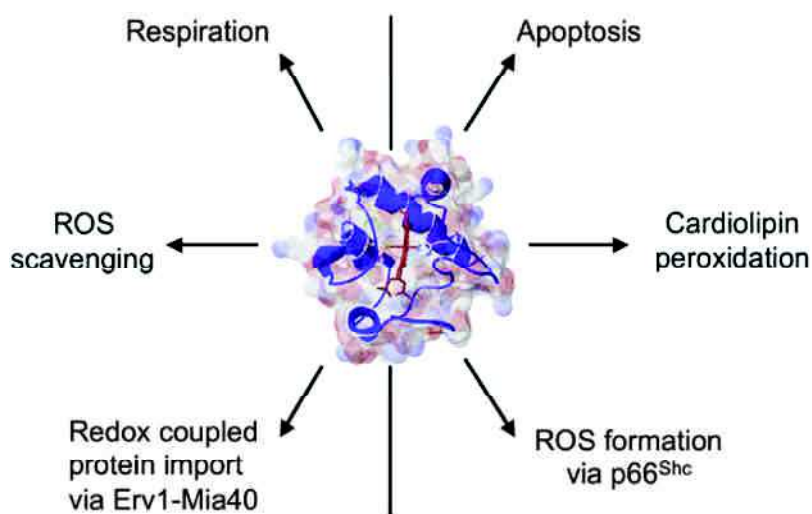


Figure 1.11 : Cyt *c* et ses différentes fonctions majeures associées. D'après Huttemann 2011.

Il est peu courant qu'une protéine soit associée à la fois à des processus cellulaires vitaux comme la chaîne respiratoire et à un processus antagoniste comme la mort cellulaire programmée (apoptose). Cela explique probablement le nombre impressionnant de publications concernant cette metalloprotéine (63 000 dans les 40 dernières années selon la base de données «ISI : Web of Knowledge »).

---

## CYT C, CL ET APOPTOSE

Dans les dernières décennies, la recherche dans le secteur médical s'est tout particulièrement intéressée au cyt c dans le cadre du processus cellulaire appelé apoptose.

En 1996, Liu découvre l'implication du cyt c dans l'induction de l'apoptose, appelée aussi mort cellulaire programmée. Dans les organismes pluricellulaires, l'apoptose a pour fonction d'éliminer des cellules pour maintenir la bonne organisation et la fonction des tissus. C'est un processus intracellulaire vital pour l'organisme. Il a deux voies d'induction qui sont respectivement la voie extrinsèque et la voie intrinsèque. Cette dernière voie est également appelée la voie mitochondriale. Son activation provoque la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale (processus MPT : Membrane Permeability Transition) et le relargage de cyt c hors de la mitochondrie. Le cyt c forme alors avec des récepteurs pro-apoptotiques (Apaf-1, Casp 9) un assemblage moléculaire appelé apoptosome qui entraîne une cascade de réactions cataboliques menant à la destruction de la cellule ([Figure 1.12](#)).

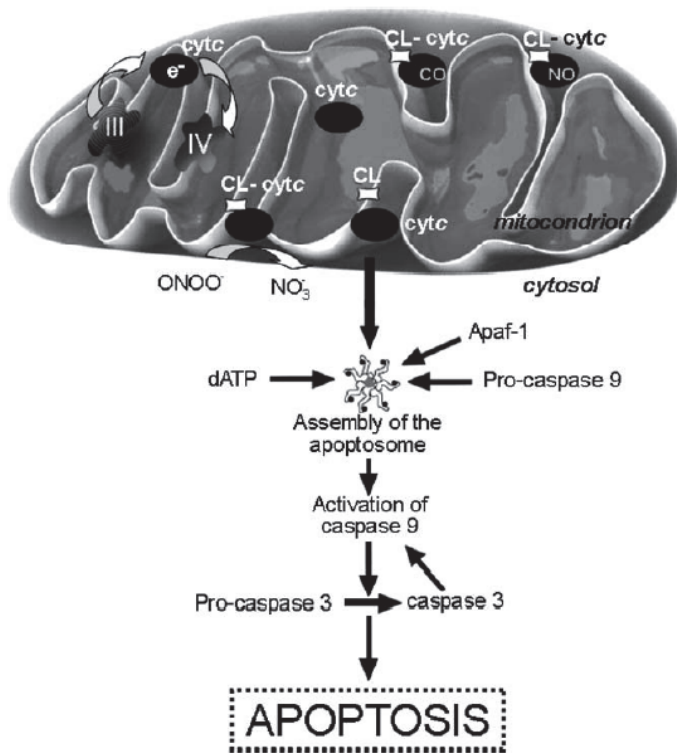


Figure 1.12 : Apoptose induit par la voie mitochondriale (Ascenzi et al. 2011).

La bonne compréhension des mécanismes de l'apoptose et de son contrôle reste un enjeu majeur dans le secteur de la santé. En effet, la majorité des cancers résulte de tumeurs, c'est-à-dire des amas cellulaires hors de contrôle de l'organisme. Ces cellules ne sont pas réceptives aux signaux de l'organisme qui devraient induire leur apoptose. Le déclenchement de l'apoptose pour ces cellules qui refusent de mourir est une des voies d'étude de traitement des cancers. L'équipe de Kagan a montré que l'interaction du *cyt c* avec le CL jouait un rôle clé dans le relargage des facteurs proapoptotiques (Kagan et al. 2005). Le détachement du *cyt c* des mitochondries se fait en deux étapes. D'abord le *cyt c* se détache du CL dans l'espace inter membranaire et constitue donc une réserve de *cyt c* dissous. Ensuite dans la deuxième étape, la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale permet le passage de *cyt c* dans le cytosol (Ott et al. 2002; Piccotti et al. 2004). Durant la phase d'induction de l'apoptose, le contenu en CL dans la membrane interne mitochondriale baisse. Cette perte de CL n'a jamais fait consensus en ce qui concerne son origine et plusieurs études ont suivi des voies très différentes :

La présence de CL peroxydé pourrait expliquer cette perte de CL (Petrosillo et al. 2001). Un mécanisme réactionnel a été identifié concernant la peroxydation du CL. Il établit que le *cyt c* lié au CL peut modifier sa structure tridimensionnelle menant à un état de l'hème pentacoordiné. Dans cette configuration, l'accès à l'hème est grandement facilité et une fonction peroxydase devient possible. En présence d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), ce complexe *cyt c* – CL catalyse la peroxydation du CL (Figure 1.13) (Tyurina et al. 2006).

Parallèlement des études montrent que le CL péroxydé agit comme un signal pour l'induction de la perméabilisation de la membrane permettant ainsi le relargage du cyt c dans le cytosol (Kagan et al. 2005).

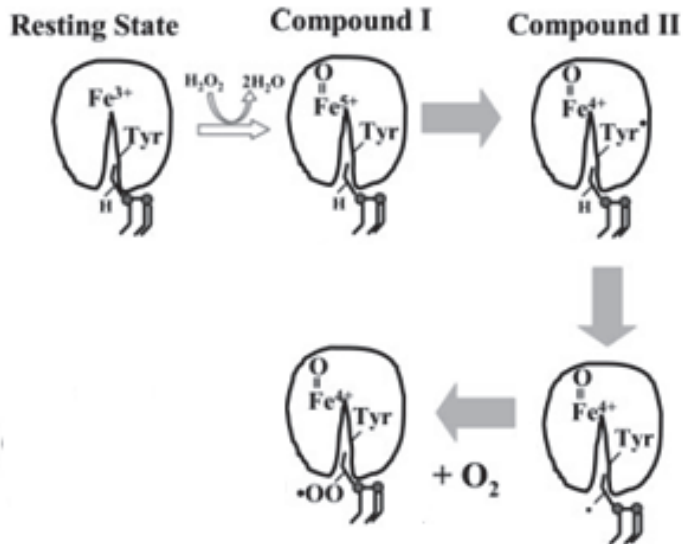


Figure 1.13 : Peroxydation du CL par la fonction cyt c peroxidase. Modifié d'après Tyurina 2006.

Le cardiolipide péroxydé a également une moindre affinité pour le cyt c, ce qui précipiterait la migration de ce dernier dans le cytosol (Orrenius and Zhivotovsky 2005).

Une grande quantité de monolysoCL et dilysoCL est par ailleurs retrouvée dans les cellules préapoptotiques (McMillin and Dowhan 2002). Ce sont des formes de CLs ayant perdu une (monolyso) ou deux chaînes grasses (dilyso) au cours d'un processus de déacylation. La présence de ces formes déacylées pendant cette phase n'a pas été entièrement expliquée. Toutefois, l'activation de la Phospholipase A2 (enzyme coupant les chaînes grasses en position sn2) de même qu'un dysfonctionnement des mécanismes de réacylation des phospholipides a été proposé (McMillin and Dowhan 2002). Il est supposé que les CLs ayant perdu des chaînes grasses perturberaient l'interaction CL - cyt c, précipitant le départ de cyt c de la mitochondrie (Sorice et al. 2004).

Une autre hypothèse formulée pour expliquer la baisse de CL pendant l'apoptose est le transport actif de CL hors de la mitochondrie. Ce phénomène a été observé et expliqué par l'action de la protéine transmembranaire de transport Bid (Kim et al. 2004). Bid est aussi responsable de l'exportation du cyt c hors de la mitochondrie (Esposti et al. 2001). On peut raisonnablement penser que le cyt c relargué de la mitochondrie lors de l'induction de l'apoptose est lié à un CL (modifié ou pas). Cette supposition est confortée par le fait que

le cyt *c* sous sa forme oxydée native ne peut pas se lier aux facteurs proapoptotiques du cytosol et ne peut pas induire l'apoptose (Jemmerson et al. 1999). Seul le cyt *c* sous sa configuration à haut spin, c'est-à-dire dont le fer a perdu son ligand axial Met80, permet cette réaction.

Enfin, d'autres facteurs peuvent perturber l'interaction entre cyt *c* et CL menant à la perte de cyt *c* de la mitochondrie. Une hausse de la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  est observée pendant la phase d'induction de l'apoptose (Iverson and Orrenius 2004). Or il est établi que le  $\text{Ca}^{2+}$  possède une forte affinité pour le CL et provoque la désorption du cyt *c* qui y est lié (Buratta et al. 2006; Huang et al. 2006). Des concentrations plus élevées en sels ou en phosphate peuvent également provoquer le départ du cyt *c* dans le cytosol (Buratta et al. 2006).

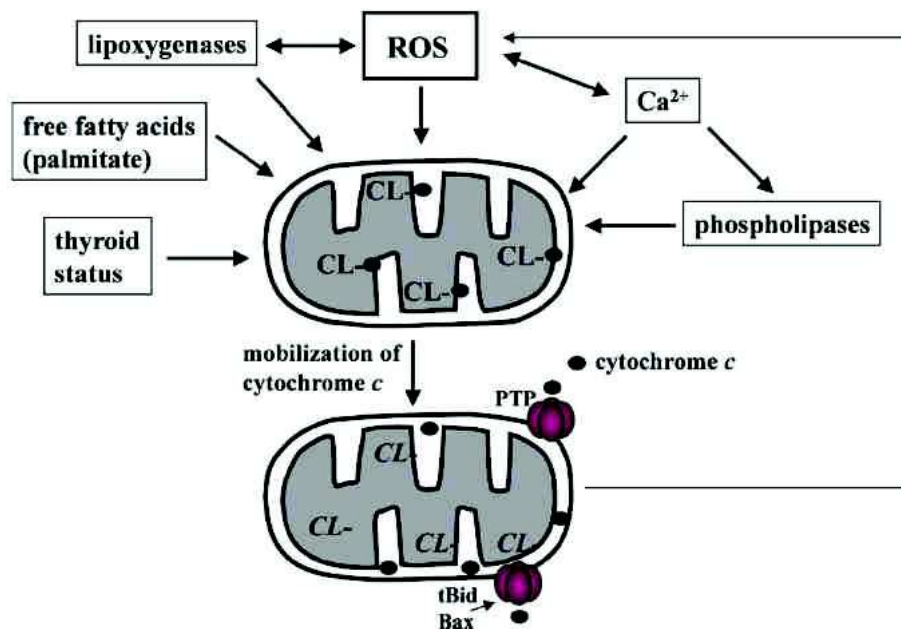


Figure 1.14 : Vue générale des facteurs pouvant perturber l'interaction cyt *c* – CL pendant le processus apoptotique. D'après Iverson and Orrenius 2004.

L'ensemble de ces processus sont plausibles et peuvent être interconnectés. Par exemple, la présence de  $\text{Ca}^{2+}$  ou la peroxydation de CL peut bloquer la chaîne de transport des électrons (Basova et al. 2007; Paradies et al. 2009). Le blocage de cette chaîne provoque une production accrue de ROS. Récemment, le lien entre ROS et  $\text{Ca}^{2+}$  a été établi comme une voie de signalisation du métabolisme énergétique mitochondrial (Feissner et al. 2009). De même, si la hausse de la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  peut décrocher directement le cyt *c* du CL, c'est aussi un activateur des phospholipase A2 (Figure 1.14).

## ETAT DE L'ART SUR L'INTERACTION CYT C - CL

### MISE EN EVIDENCE DE L'INTERACTION

Une interaction entre cyt *c* et les lipides membranaires des mitochondries a été proposée au début des années 1960. Ces travaux montraient un relargage de cyt *c* des mitochondries traitées par une solution saline (Morrison et al. 1960). Plus tard, Green mettait en évidence l'affinité du cyt *c* chargé positivement pour les phospholipides anioniques des mitochondries (Green and Fleischer 1963). Comme cité précédemment, le cyt *c* possède une charge nette à pH physiologique nettement positive. Le cyt *c* peut se lier aux membranes biologiques contenant des phospholipides chargés négativement. Il sera clairement établi que la seule condition requise est que la charge globale de la membrane soit négative (Mustonen et al. 1987). Quinn émet en 1969 l'idée que le CL serait responsable de l'affinité du cyt *c* pour la membrane interne mitochondriale (Quinn and Dawson 1969). Ses études de l'adsorption de cyt *c* suivies par marquage isotopique sur des bicouches lipidiques se concluent par cette phrase: « If cytochrome *c* is associated with a phospholipid in mitochondria then cardiolipin would fulfil the characteristics of the binding most adequately. ». Par la suite, plusieurs études en RMN et diffraction X démontrèrent la forte interaction du cyt *c* pour des vésicules contenant spécifiquement du CL (Brown and Wuthrich 1977; MacNaughtan et al. 1985).

Si la connaissance de cette interaction n'est pas récente, sa nature sera sujette à controverse. Dès 1966, il est montré que les mitochondries soumises à une solution saline menant au relargage de cyt *c* conservent cependant une fraction non négligeable de cyt *c* (environ 15%) ce qui avait permis de supposer l'existence d'interactions fortes résiduelles dans la mitochondrie (MacLennan et al. 1966).

### « EXTENDED LIPID ANCHORAGE »

Pendant la décade 1992-2002, des études faites principalement en spectroscopie UV-visible ont démontré l'interaction spécifique du cardiolipide avec le cyt *c*. Les études de l'équipe de Kinnunen ont été novatrices dans ce domaine. Leurs premiers travaux visaient à tester l'affinité du cyt *c* pour différents lipides membranaires anioniques. Les essais ont été réalisés sur des liposomes contenant du CL, PG, lyso-PG ou DCP (dicétylphosphate). Tous ces phospholipides sont chargés  $-1$  à pH physiologique. Les résultats indiquent que si

tout les liposomes contenant ces espèces moléculaires avaient la capacité d'adsorber du *cyt c*, seul les liposomes contenant du CL permettent une bonne accroche de *cyt c* et surtout qu'une fraction de celui-ci reste accroché à la membrane quel que soit la méthode choisie pour le décrocher. En effet, en plus d'une interaction électrostatique, des interactions plus fortes existent vraisemblablement comme le démontre l'impuissance d'une solution concentrée de NaCl ou d'ATP à décrocher le *cyt c* accroché à une membrane de liposome contenant du CL (Rytömaa et al. 1992). Ce résultat est confirmé sur une membrane de mitochondrie interne par l'étude de Cortese qui démontre qu'après traitement équivalent à une forte force ionique une fraction de *cyt c* lié à cette membrane persiste (Cortese et al. 1998).

Pour expliquer ces résultats, l'équipe de Kinnunen a proposé le modèle de l'« extended lipid anchorage ». Cette théorie prévoit l'insertion d'une ou deux chaînes d'AG du CL à l'intérieur du *cyt c*, les autres chaînes sécurisant l'accroche de la protéine à la surface de la membrane (Rytömaa et al. 1992; Kinnunen 1996). Plus précisément, deux sites d'accroche ont été identifiés sur le *cyt c* (Figure 1.15). Un premier site est caractérisé par des interactions de type électrostatique, il est appelé A-site (A comme sensible aux Anions). Le deuxième site est caractérisé par des interactions plus spécifiques au cardiolipide, il est appelé C-site (C comme sensible au Cardiolipide).

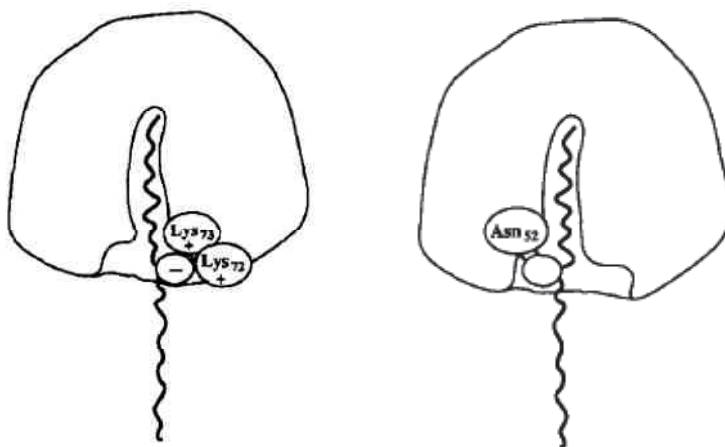


Figure 1.15 : Modèle d'interactions entre le *Cyt C* et le PG (demi CL), sites de fixation A (à gauche) et C (à droite) des groupes phosphate du lipide aux résidus du *Cyt C* (Rytömaa and Kinnunen 1995).

Le site A peut se lier au phosphate du CL non hydrogéné (CL chargé -1 ou -2) par deux résidus Lysine (Lys 72, Lys 73) tandis que le site C serait lié à un groupe phosphate du CL par un résidu Asparagine (Asn 52) (Rytömaa and Kinnunen 1995). Les acides aminés concernés font partie des acides aminés les plus conservés de la séquence protéique du *cyt c* et sont communs dans quasiment tous les phylums. La liaison entre les groupes phosphates des phospholipides et les résidus lysines 72 et 73 à la surface du *cyt c* fait consensus. Cette interaction a été confirmée par des études en infrarouge (FTIR) (Schlereth and Maentele 1993; Lojou and Bianco 2000) ou par des données spectroscopiques (Stewart et al. 2000; Kalanxhi and Wallace 2007).

L'interaction du CL sur le site C du cyt *c* est plus forte, apparemment irréversible et stœchiométrique (Rytömaa and Kinnunen 1995; Tuominen et al. 2002). Elle implique des liaisons hydrogène et des interactions de type Van der Waals. Contrairement aux interactions électrostatiques entre le cyt *c* et les phospholipides anioniques (site A) qui sont bien expliquées et qui n'ont jamais été remises en question, les interactions avec le site C sont sujettes à discussion. En effet, l'observation d'interactions hydrophobes entre les chaînes du CL et le cyt *c* seraient induites par ces interactions des sites A et surtout C.

Si l'existence d'interactions hydrophobes était déjà supposée entre la membrane mitochondriale interne et le cyt *c* (Letellier and Shechter 1973), il était davantage considéré que cela était le fruit d'une insertion partielle du cyt *c* dans la membrane mitochondriale. Bien qu'il y ait des données spectroscopiques et de diffraction X qui montrent qu'il n'y a pas de pénétration du cyt *c* dans la partie hydrophobe de la bicouche (MacNaughtan et al. 1985), il y a aussi des données qui montrent le contraire (par RMN - Brown and Wuthrich 1977, par sondes fluorescente - Teissie 1981). Certaines études démontrent même que le cyt *c* se liant aux vésicules contenant du CL pénètre dans la bicouche lipidique jusqu'à un point où il peut communiquer avec l'espace interne des liposomes (Szebeni and Tollin 1988).

Des études par transfert d'énergie par résonance (FRET) (Gorbenko and Domanov 2003; Domanov et al. 2005; Gorbenko et al. 2006) de même qu'avec des techniques de résonance des plasmons de surface (SPR) (Salamon and Tollin 1996) ont mis également en évidence l'insertion, au moins partielle, du cyt *c* dans une membrane contenant du CL.

La présence d'un patch hydrophobe composé des acides aminés Ile 81, Phe 82, Ala 83, Gly 84 (ou Phe 84) et Ile 85 est compatible avec l'hypothèse de l'insertion d'une chaîne grasse du CL dans ce patch (Figure 1.16). La présence des sites A et C de coordination au CL décrits par Rytömaa à proximité de ce patch hydrophobe confirmerait cette théorie (Rivas et al. 2002).

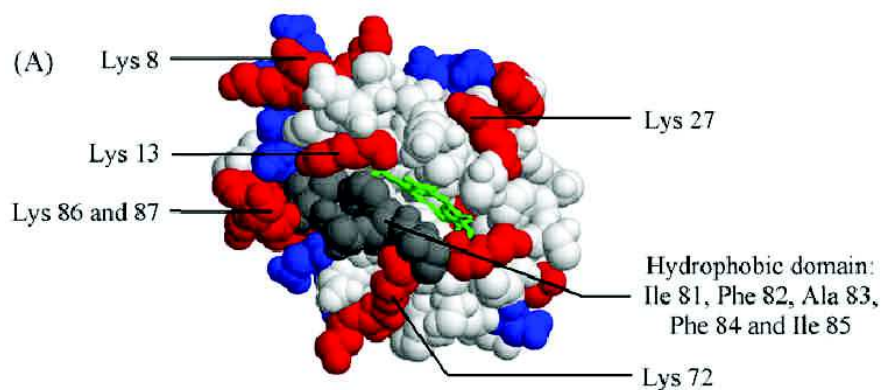


Figure 1.16 : En gris : Patch hydrophobe décrit par Rivas - En rouge : Acides aminés cationiques type Lysine, Arginine - En bleu : Acides aminés anioniques type Aspartate, Glutamate. D'après El Kirat and Morandat 2009.



Le mécanisme d'insertion d'une chaîne grasse dans une cavité hydrophobe du cyt *c* requiert théoriquement une première étape d'approche du CL par des AAs « pilotes » situés à la surface du cyt *c*. Les études se sont massivement focalisées sur ce mécanisme d'induction de l'insertion d'une chaîne grasse car il est à la base des fonctions secondaires du cyt *c*. La quasi-totalité de ces études mettent à profit la synthèse de mutants de cyt *c* dont des résidus choisis sont modifiés. Toutefois, aucun consensus n'a pu être dégagé de ces études (Rytömaa and Kinnunen 1995; Kostrzewa et al. 2000; Kawai et al. 2005; Kalanxhi and Wallace 2007; Sinibaldi et al. 2010; Hanske et al. 2012; Rajagopal et al. 2012) comme le montre le tableau récapitulatif (Tableau 1.2).

Auteur	Année	Site impliqué dans l'interaction cyt <i>c</i> - CL					
		Lys72/73	Lys22/27	Asn52	Cys66/92	Lys87	Arg91
Rytömaa	1995	x		x			
Kostrzewa	2000	x				x	
Kawai	2005	x	x			x	
Kalanxhi	2007	x		Non pos		x	x
Sinibaldi	2010	x		x			
Rajagopal	2012	x					x
Hanske	2012				x		

**Tableau 1.2 : Comparatif des AAs impliqués dans l'interaction cyt *c* – CL par divers auteurs. Non pos : les auteurs ont montré l'absence d'interaction de ce résidu.**

## EVOLUTION DU MODELE « EXTENDED LIPID ANCHORAGE »

Pour tenter d'expliquer cette dispersion des résultats, des théories alternatives apparaissent. Tout d'abord, certains auteurs tentent d'écarter l'implication de certains AAs qui ne faisaient pas consensus. L'équipe de Kalanxhi a démontré que le résidu Asn52 n'a pas le rôle d'acide aminé pilote supposé jusqu'alors. Cette même étude suggère également que le patch hydrophobe peut être séparé en deux zones distinctes ce qui pourrait multiplier les possibilités d'insertion d'une chaîne grasse (Figure 1.17) (Kalanxhi and Wallace 2007).

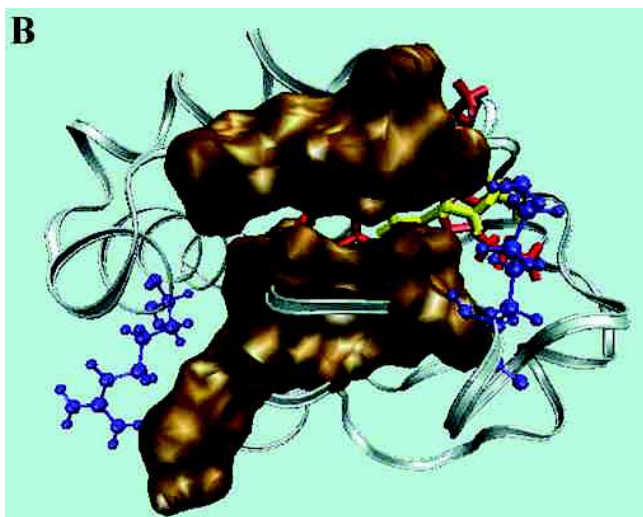


Figure 1.17 : Les deux patchs hydrophobes sur le cyt c identifiés par Kalanxhi

Plus tard, les travaux de Sinibaldi et al. (Sinibaldi et al. 2008; Sinibaldi et al. 2010; Sinibaldi et al. 2010) réaffirment l'existence de deux sites C. L'un serait un site C à haute affinité composé de l'Asn52 et du patch hydrophobe décrit plus haut. Le deuxième site C dit à basse affinité serait aussi composé d'acides aminés hydrophobes mais ceux-ci sont situés à proximité de l'hème. De par la présence de deux sites de fixation de type hydrophobe, Sinibaldi avance l'hypothèse de l'insertion simultanée de deux chaînes grasses du cardiolipide dans le cyt c (Figure 1.18). La mesure de deux cinétiques d'adsorption distinctes du cyt c sur des liposomes contenant du CL serait pour Sinibaldi une preuve de l'insertion conjointe de deux chaînes du CL (Sinibaldi et al. 2010).

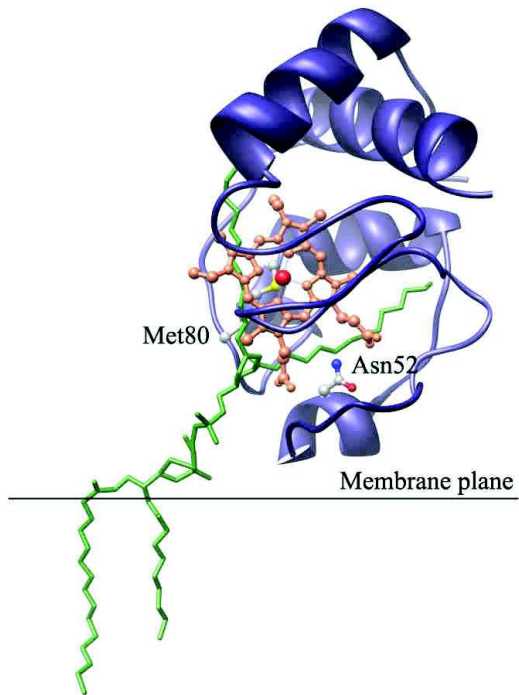


Figure 1.18 : Insertion de deux chaînes grasses du CL (en vert) sur le cyt *c* (en violet) et son interaction avec l'hème central (en orange). D'après Sinibaldi et al. 2010.

Les dernières études sur le « lipid anchorage » suggèrent une remise à plat des hypothèses formulées précédemment. L'équipe de Hanske et al. a ainsi récemment postulé que certains résidus du cyt *c* interagissent de manière électrostatique avec le CL mais que cette interaction provoquerait le déroulement du cyt *c* sur la surface membranaire (Figure 1.19). Ce déroulement permettrait alors une interaction hydrophobe entre une chaîne du CL et le cyt *c* (Hanske et al. 2012).

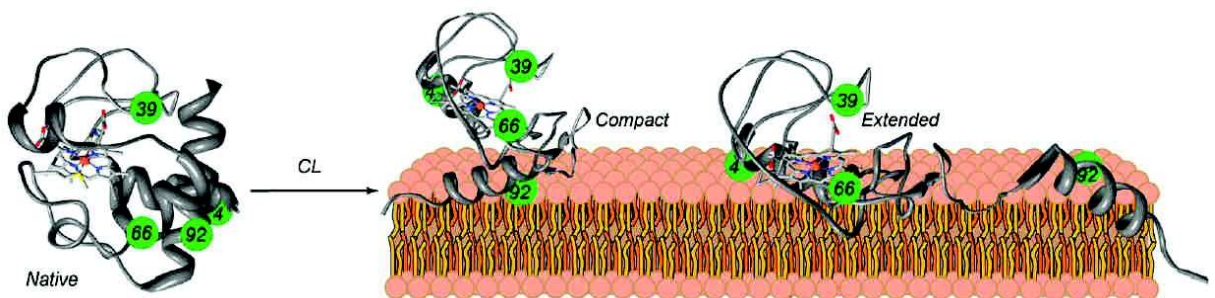


Figure 1.19 : Modèle de l' « extended cyt *c* anchorage » vue par Hanske. D'après Hanske et al. 2012.

## MODIFICATION DES PROPRIETES ELECTRONIQUES DU CYT C

Les études de l'interaction entre le cyt c et les lipides ont mené à une observation concernant l'état électronique du fer coordonné à l'hème. Le cyt c oxydé, à l'état natif, possède un ion de fer hexacoordonné (Figure 1.20). L'hème donne par ses atomes d'azote les ligands équatoriaux tandis que la Met80 et le His18 forment les ligands axiaux (Fedurco 2000).

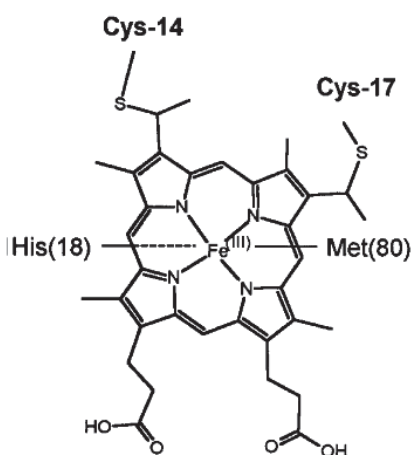


Figure 1.20 : Etat de coordination du Fer<sup>III</sup> hexacoordonné du cyt c. D'après Fedurco 2000.

Quand le Fer passe à l'état d'oxydation II (réduit), un changement de coordination est observé avec la rupture du ligand axial Met80. Cela serait dû à une réorganisation conformationnelle du cyt c qui subirait un déroulement partiel de sa séquence peptidique.

Letellier identifie une réorganisation spatiale différente du cyt c adsorbé sur une membrane dépendante de l'état d'oxydation du fer central (Letellier and Shechter 1973). Cette configuration majoritairement associée à l'état d'oxydation du fer II est bien identifiée, en particulier par des techniques spectrophotométriques (Vincent and Levin 1986). La conformation « déroulée » du cyt c réduit serait impliquée dans le mécanisme de transfert électronique vers son partenaire redox de la chaîne respiratoire, la CCO (Döpner et al. 1999). L'hypothèse est que suite à la réduction du cyt c, l'accès à l'hème est facilité suite au déroulement d'une partie de sa séquence peptidique.

Des études ont aussi montré qu'une configuration non-native du cyt c pouvait aussi se retrouver à l'état oxydé si le cyt c se liait à un lipide (Letellier and Shechter 1973; Vincent and Levin 1986; Spooner and

Watts 1991). Ce changement de conformation provoque la modification de la configuration de l'hème avec le FeIII devenant pentacoordonné. Il perd le lien avec la Met80 axial et passe dans un état à haut spin exactement comme pour un cyt c réduit. Le cyt c réduit, sous sa configuration non native peut interagir librement avec des phospholipides sans spécificité apparente mais la forme native oxydée interagit spécifiquement avec le CL (Choi and Swanson 1995).

Le changement de l'environnement immédiat de l'atome de fer va influencer directement sur le potentiel redox du couple  $Fe^{III}/Fe^{II}$  (Hildebrandt and Stockburger 1989; Hildebrandt and Stockburger 1989b). Fedurco a calculé par EPR les potentiels que l'on devrait observer suite à un changement du ligand Met80 du cyt c (Figure 1.21).

Axial ligands	$E^{o'}$ (V)
His/Met	0.265
His pyridine	-0.029
His/Lys	-0.055
His $CN^{-}$	(-0.400)
His His	-0.150
His Im	-0.161

Figure 1.21 : Variation du potentiel redox ( $E^{o'}$ ) du cyt c en fonction de l'état de coordination axiale du fer. D'après Fedurco 2000.

Une hypothèse a été formulée concernant l'impact in-vivo de ce décalage en potentiel. Le décalage du potentiel redox du cyt c sous une conformation non native peut empêcher le transfert électronique vers son partenaire redox naturel dans la chaîne respiratoire. Un blocage du transport électronique vers le complexe IV (CCO) peut également produire des ROS (Figure 1.22) et indirectement une induction de l'apoptose (Basova et al. 2007).

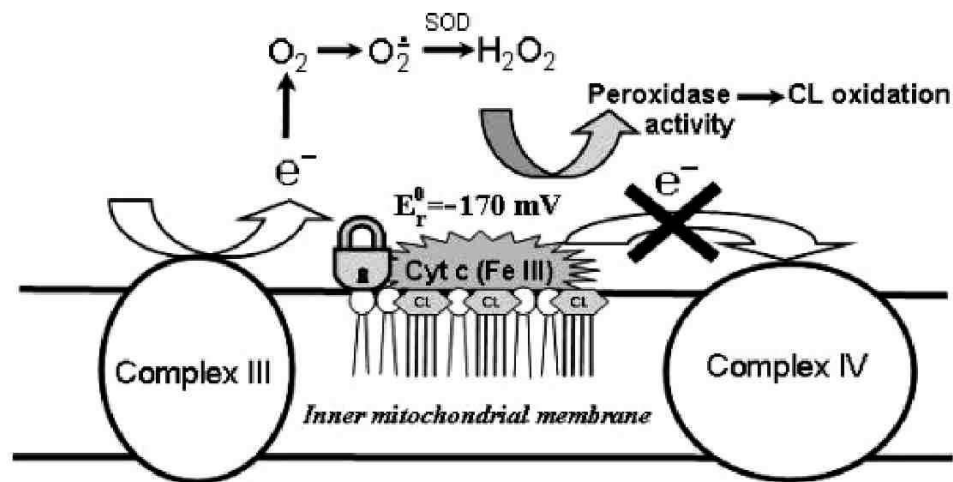


Figure 1.22 : Lien entre blocage du transport d'électrons de la chaîne respiratoire et la production de ROS. D'après Basova 2007.

Ces différents états d'adsorption et/ou de conformation associés provoquent un comportement électrochimique différent de celui du cyt c natif. Tout comme le signale les travaux de El Kasmi *et al.* (El Kasmi et al. 2002), on peut observer pour le cyt c un comportement électrochimique quasiréversible inhabituel (UQR en anglais) attribué aux différentes conformations de la protéine. Ces deux configurations spatiales correspondant aux deux états de spin différents de l'ion fer de l'hème. Selon son état d'oxydation, le cyt c sera préférentiellement sous la conformation la plus stable.

#### ETAT DE L'ART SUR L'EFFET DE LA NATURE DE LA PARTIE HYDROPHOBE SUR L'INTERACTION CYT C-LIPIDES

L'étude de la nature des chaînes grasses dans les interactions hydrophobes lipides-protéines est peu développée dans le cas du CL. La grande homogénéité des types de chaînes grasses du CL chez les mammifères peut certainement expliquer le peu d'intérêt pour étudier ce paramètre. Mais l'observation de la modification des chaînes grasses du CL pour des pathologies (Schlame et al. 2003) ou plus généralement dans le cas du processus d'apoptose ont permis d'apporter quelques éclaircissements.

La première étude pointant le rôle de la nature de la chaîne grasse du CL sur l'interaction avec le cyt c a été réalisée par des mesures de RPE par l'équipe de Pinheiro (Pinheiro et al. 1993; Pinheiro and Watts 1994).

Ils ont démontré que la zone insaturée du CL 18:2 de mammifère interagissait avec le cyt c laissant supposer une implication de ces insaturations pour cette interaction hydrophobe (Pinheiro et al. 1993).

En 2000, L'équipe de Stewart pose la problématique suivante : si des liaisons non covalentes peuvent modifier le comportement électrochimique du cyt c, est-ce un avantage dû à la nature de la partie hydrophobe ou bien de la partie hydrophile du lipide ?

Pour tester cette hypothèse, ils étudient la cinétique d'accroche et l'affinité du cyt c sur des suspensions de dérivés lipidiques de différentes nature par cinétique à flux interrompu, par liaison d'acides gras radioactifs, par spectrophotométrie et par RMN (Figure 1.23).

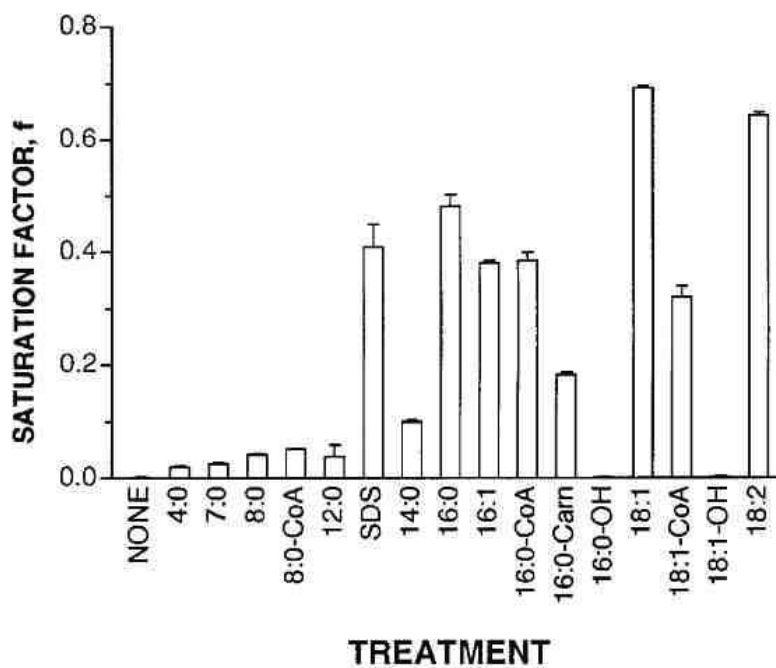


Figure 1.23 : Etude par spectrophotométrie de l'affinité de différents types d'AG et de ses dérivés pour le cyt c. Nature de la tête polaire (par défaut : acide carboxylique) : -OH : alcool, -CoA : coenzyme A, -Carn : carnitine, SDS : dodécylsulfate de sodium. D'après Stewart et al. 2000.

Ces résultats confirment l'importance de la partie hydrophile, hypothèse déjà vérifiée avec l'étude de classes de phospholipides mais également de la partie hydrophobe pour une interaction entre le cyt c et des lipides. Littéralement, sa conclusion est « Il est clair que la longueur de la chaîne des acides gras est un facteur important pour l'association avec le cyt c. ».

Les travaux de Piccotti sur le CL directement mettent plus particulièrement l'accent sur le degré d'insaturation, c'est-à-dire le nombre moyen d'insaturations présentes par chaîne grasse (Piccotti et al. 2004). L'utilisation de mitochondries entières possédant des CL dont les degrés globaux d'insaturation sont très variés

montre des cinétiques de décrochage du cyt *c* intermembranaire différentes. Le CL de cœur de rat (80% de chaînes 18:2) retient moins bien le cyt *c* que le CL de cerveau de rat (20% de chaînes 18:2, 34% de chaînes 18:1 et 22% de chaînes 20:4).

L'impact de la longueur et du degré d'insaturation du CL dans son association avec le cyt *c* est également confirmé par les études de Belikova et al. qui montrent que l'énergie de liaison entre le cyt *c* et le CL est plus importante avec le CL 18:2 qu'avec le CL 14:0 (Belikova et al. 2006). Une hypothèse est alors avancée pour expliquer cette accroche plus facile du CL 18:2. La présence d'insaturations fait baisser l'hydrophobicité des chaînes grasses et pourrait faciliter leur sortie du plan de la bicouche lipidique pour « accrocher » le cyt *c* (Belikova et al. 2006). Des travaux récents sont en désaccord avec le rôle joué par les insaturations. Par exemple, les travaux de Stepanov (Stepanov et al. 2009) démontrent que le CL 14:0 a une plus grande constante d'affinité pour le cyt *c* que tous les autres phospholipides testés (dont le CL 18:1). Pour Abe (Abe et al. 2011), c'est le CL 18:0 qui a la meilleure affinité pour le cyt *c*. Cependant, tous les auteurs s'accordent sur le fait que l'affinité ou l'accroche du cyt *c* sont des processus indépendants du niveau d'activité de la fonction peroxydase induite par cette accroche.

La découverte tardive de l'activité peroxydase du cyt *c* (Ju et al. 2002) et de son importance pour l'induction de l'apoptose (Kagan 2005) a provoqué une convergence de toutes les études vers le rôle du caractère hydrophobe du complexe cyt *c*-CL pour essayer de décrypter cette activité enzymatique. Les travaux menés à partir de cette époque (Belikova et al. 2006; Tyurina et al. 2006; Vladimirov et al. 2006; Basova et al. 2007; Kapralov et al. 2007; Borisenko et al. 2008; Belikova et al. 2009; Casalini et al. 2010; Abe et al. 2011) relient tous les chaînes du CL à l'induction de l'activité peroxydase du cyt *c*.

En effet, toutes les études s'accordent sur le fait que l'insertion d'une chaîne grasse dans la cavité du cyt *c* et à proximité de l'hème est un prérequis à l'exposition de l'hème au solvant et donc à l'activation de sa fonction peroxydase. Toutefois, il n'y a pas de consensus sur l'influence de la longueur des chaînes ou de la présence d'insaturation sur l'activation de cette activité peroxydase.



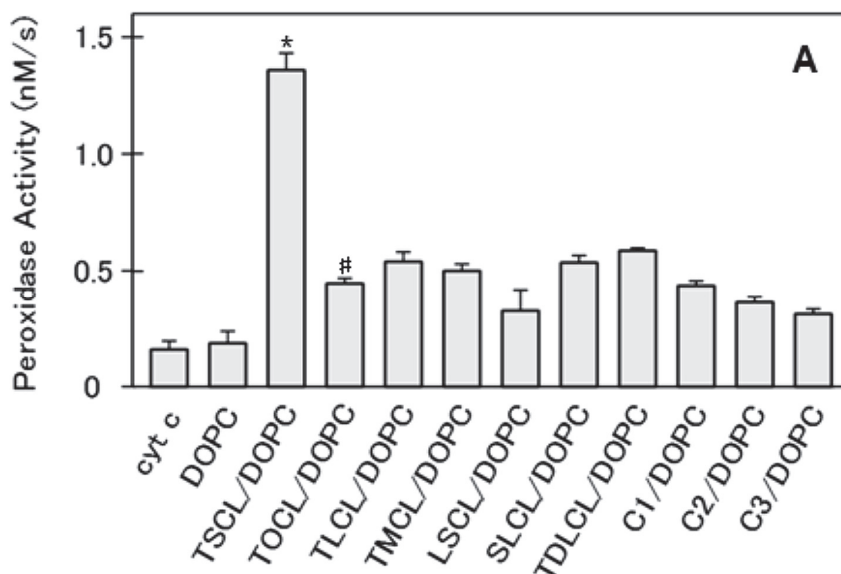


Figure 1.24 : Effet de différentes formes ou analogues moléculaires du CL sur l'activation de la fonction peroxydase du CL. DOPC : PC 18:2, TSCL : CL 18:0, TOCL : CL 18:1, TLCL : CL 18:2, TMCL : CL 14:0, LSCL/SLCL : CL 18:0/18:2, TDLCL : CL18:2 diméthyl. D'après Abe et al. 2011.

Pour certaines études, l'interaction du CL ayant des acides gras saturés provoque l'activité peroxydase la plus élevée (Figure 1.24). Pourtant, d'autres études démontrent le lien inverse avec une activation de la fonction peroxydase plus grande avec des chaînes polyinsaturées (Stepanov et al. 2009). Les profonds désaccords mis en évidence par ces études sont probablement dus aux techniques d'analyses très différentes utilisées. De plus, la question des propriétés biophysiques des lipides testés n'est généralement pas posée alors qu'elle semble primordiale pour comparer un CL 14:0 et un CL 18:2.

## ELECTROCHIMIE DU CYT C

### ELECTROCHIMIE SUR ELECTRODE NUE

L'adsorption de cyt *c* sur des électrodes modifiées est un sujet dont les premières publications apparaissent dès 1933 (Brdička 1933). Le point de départ de toute ces études concerne le fait que le cyt *c* n'est pas électroactif sur une surface de carbone nue. Plus généralement, cette électroinactivité concerne des espèces moléculaires comme un complexe de métaux de transition, une protéine, une molécule organique, ou toute autre entité qui n'est pas capable d'échanger un électron directement avec une électrode. Cette incapacité peut être liée à l'inaccessibilité du centre redox au sein de l'entité moléculaire due à un

encombrement stérique. Ce peut être le cas de complexes de coordination présentant des ligands imposants qui masquent le centre métallique. De même, les centres électroactifs de complexes protéiques sont généralement profondément « enfouis » au sein de la chaîne polypeptidique. Souvent, seule une orientation particulière de la protéine par rapport au plan de l'électrode peut permettre un transfert électronique. L'électroinactivité de ces entités chimiques peut également provenir de l'inactivation ou de la dénaturation de l'entité chimique au contact de l'électrode.

Ce problème d'électroinactivité des protéines sur des électrodes métalliques nues a été résolu de plusieurs façons. La première concerne l'utilisation de médiateurs redox dissous. Ce sont généralement des composés à faible poids moléculaire qui ont eux-mêmes des propriétés redox. Le médiateur sert de relais entre les composés présents en solution et la surface de l'électrode. Le transfert d'électrons est donc indirect et certains paramètres du comportement électrochimique (diffusion, réactivité, mécanismes de transfert) peuvent demeurer inaccessibles par cette méthode. Par exemple, Heineman a étudié le comportement électrochimique de la CCO grâce à un médiateur redox qu'est le méthyl-viologène. La CCO est inactive sur les électrodes métalliques nues. L'utilisation de méthyl-viologène a permis de déterminer qu'il faut 4 électrons pour réduire totalement chaque complexe CCO (Heineman et al. 1972). On appelle cette technique la médiation électrochimique.

Dans le cas du *cyt c*, sa dénaturation au contact d'une électrode nue est due au fait que l'ion fer de l'hème n'a plus son environnement protéique natif. Il en résulte la perte du signal électrochimique ou dans le meilleur des cas un comportement électrochimique irréversible (Betso et al. 1972). L'utilisation d'un médiateur redox qui fait le lien entre le *cyt c* en solution et la surface de l'électrode permet de contourner ce problème (Haladjian et al. 1985).

Toutefois, le problème de l'électroinactivité du *cyt c* avec des électrodes classiques a surtout été résolu par la modification de l'état de surface de l'électrode. Tout d'abord, l'apparition de nouveaux matériaux semi-conducteurs ont permis d'avoir un état de surface compatible avec une adsorption de *cyt c* sans dénaturation de ce dernier. L'oxyde d'indium dopé à l'étain (ITO) est la première électrode nue où l'on a observé un comportement redox réversible du *cyt c* (Yeh and Kuwana 1977). La faible vitesse du transfert d'électrons sur ces électrodes non modifiées d'ITO et surtout les résultats obtenus quasiment au même moment sur des électrodes modifiées ont rapidement mis de côté cette technique. Des chercheurs ont également eu l'idée de modifier l'état de la surface de l'électrode afin de faciliter le transfert électronique. Les promoteurs (appelés parfois facilitateurs) sont également de petites molécules mais dépourvues de propriétés redox. Les promoteurs ont deux grands rôles pour permettre l'électroactivité de l'entité électrochimique.

## ELECTROCHIMIE AVEC UN PROMOTEUR DE SURFACE

Le premier rôle d'un promoteur est celui d'agent de surface : La modification de la surface de l'électrode par ces promoteurs a pour but d'empêcher la dénaturation de l'entité moléculaire d'intérêt afin d'étudier son transfert électronique direct avec l'électrode. Par exemple, Eddowes publie la découverte d'une réaction quasi-réversible du cyt *c* sur une électrode d'or modifiée avec du 4,4'-bipyridyl (Eddowes and Hill 1977; Eddowes and Hill 1979). Puis les travaux de Taniguchi (Taniguchi et al. 1982), Bowden (Bowden et al. 1984) et finalement Allen (Allen et al. 1984) ont montré l'importance de la nature du modificateur de surface sur l'étude des propriétés électrochimique du cyt *c*. Cette première étape dans l'obtention d'un signal électrochimique de l'hème ferrique du cyt *c* en solution a permis ensuite de se pencher sur l'adsorption de la protéine sur la surface de l'électrode.

Le promoteur peut également avoir un rôle de fixation de l'espèce électrochimique à proximité de l'électrode : La fixation peut faire intervenir toutes sorte d'interactions : covalente, ionique, Van der Waals,... Le choix du promoteur permet de contrôler l'orientation d'une protéine et également sa distance par rapport au plan de l'électrode. Cette stratégie a comme caractéristique de produire des espèces électroactives adsorbées sur la surface de l'électrode. De ce fait, les quantités de centres redox étudiés sont bien plus faibles qu'avec une espèce en solution. Les courants résultants sont plus faibles et peuvent nécessiter des méthodes d'analyses adaptées. La fixation d'espèces redox à la surface de l'électrode peut également être d'une grande aide dans le cas de très faibles concentrations de l'espèce redox en solution. Il existe sur le sujet une revue très complète de Fedurco (Fedurco 2000).

Cette propriété d'adsorption de la protéine sur la surface de l'électrode a été montré pour une majorité de modificateurs de surface, y compris le 4,4'-bipyridyl (Allen et al. 1984; Sagara et al. 1990; Santucci et al. 1991; Ruzgas et al. 1998). Le mode d'action des modificateurs, qui sont alors une famille de molécules qui ne sont pas liés de façon covalente à l'électrode, est également perçu comme atténuateur de charges positives du cyt *c* (le cyt *c* est chargé +7/+8 à pH physiologique) ce qui permet une adsorption moins dénaturante de la protéine sur une surface chargée. Egalement, ces modificateurs de surfaces sont impliqués dans la réorientation des molécules de cyt *c* par rapport au plan de l'électrode pour favoriser le transfert d'électrons (Allen et al. 1984; Sagara et al. 1991).

## ELECTROCHIMIE AVEC DES SAMS

Une autre technique décrite en 1983 par l'équipe d'Allara a rapidement été prisée pour sa propension à obtenir des monocouches parfaitement organisées et reproductibles, les Monocouches Auto-Arrangées ou SAMs (Self-Assembled Monolayers). Ces électrodes modifiées par un greffage covalent de modificateurs ont comme principale qualité la possibilité de maîtriser avec une grande précision la modification de la surface de l'électrode (Nuzzo and Allara 1983) ainsi que la distance entre les espèces venant de la solution et le plan de l'électrode.

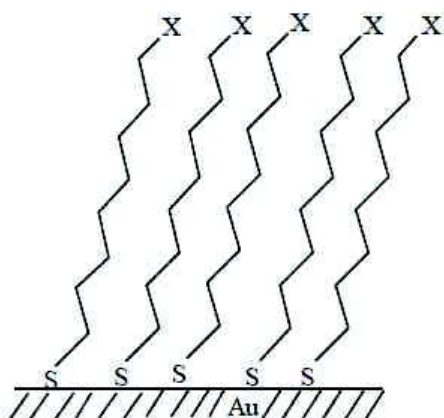


Figure 1.25 : Structure typique d'une SAM. Le groupement terminal X peut être un acide, une base ou toute autre fonction d'intérêt.

La réactivité des thiols (composés organiques contenant une fonction  $-SH$ ) vis-à-vis des métaux comme l'or ou l'argent a été mise à profit pour obtenir une surface métallique modifiée par une monocouche parfaitement homogène (Figure 1.25). Lors de l'adsorption d'organothiols sur une surface d'or, l'hydrogène est éliminé du groupement thiol et une liaison covalente S-Au est formée (Ulman 1996). Les greffages de type thiol-Au ou thiol-Ag sont stables à l'air, en solution aqueuse et se conservent dans des solutions alcooliques pendant plusieurs mois (Bain et al. 1989). Dès lors, la possibilité de contrôler la nature du modificateur de surface en choisissant le thiol adapté a ouvert un large champ d'étude pour les centres redox adsorbés. D'une part, la variation de la longueur de la chaîne carbonée des thiols a permis d'étudier l'effet tunnel sur le transfert d'électrons entre l'électrode d'or et les centres redox adsorbés (Finklea and Hanshew 1992), c'est-à-dire le lien entre la distance électrode-centre redox et la vitesse de transfert de(s) électron(s). A partir de cette époque, on observe la publication de nombreuses études concernant l'adsorption du cyt c sur les SAMs (Song et al. 1993; Feng et al. 1995; El Kasmi et al. 1998; Murgida and Hildebrandt 2001; Chen et al. 2002). Ces études ont confirmé le lien entre la longueur de chaîne des thiols utilisés et la vitesse de transfert des électrons entre le cyt c et l'électrode. De plus, l'intégration sur l'extrémité des thiols de fonctions chimiques variées a permis

de jouer directement sur les phénomènes d'adsorption. Ainsi des études concernant l'orientation des protéines adsorbées par rapport à l'électrode ou l'influence du champ électrostatique sur l'adsorption de protéines sont devenues accessibles. Si ces montages moléculaires permettent de faire varier de façon précise la longueur de chaîne des modificateurs, la nature de la « tête polaire », ils sont difficilement utilisables pour répondre à des questions biologiques sur les interactions entre membranes et cyt *c*.

## ELECTROCHIMIE AVEC DES LIPIDES

La découverte de nouvelles propriétés du cyt *c* pour le fonctionnement cellulaire, principalement l'apoptose en 1996 (Liu et al. 1996) a renforcé la nécessité d'avoir un modèle d'interactions cyt *c* – modificateur de surface le plus proche des conditions in-vivo. A cette époque également, on commence à comprendre l'influence des lipides sur l'activité de protéines membranaires (Paradies et al. 1993). De fait, des modifications de la surface de l'électrode par des composés présents in-vivo se développent à partir de cette époque. Des électrodes hybrides mêlant thiols greffés sur une électrode d'or et des phospholipides membranaires apparaissent (Figure 1.26) (Plant 1993; Burgess et al. 1998; Su et al. 2004; Lewis et al. 2006; Mechler et al. 2006; Lee et al. 2010).

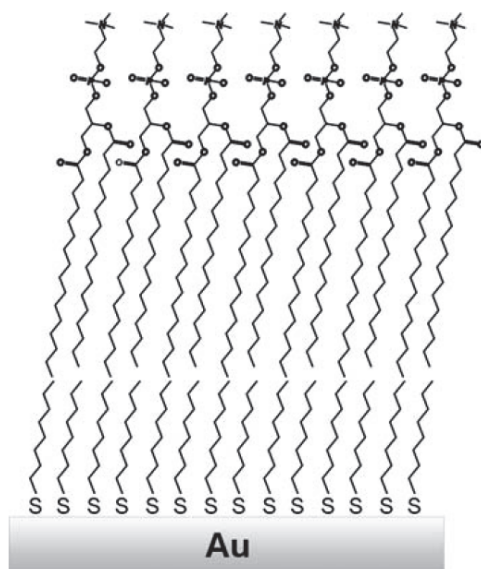


Figure 1.26 : Electrode modifiée hybride SAM/phospholipides (DMPC). D'après Mechler et al. 2006.

Les structures en bicouches, plus proches des conditions in-vivo se développent (Haladjian et al. 1994; Plant 1999; Lojou and Bianco 2000) et donne les ME (Membrane électrodes) dont on peut voir la structure

Figure 1.27. Différentes stratégies d'immobilisation de protéines sur des bicouches ont alors permis l'étude électrochimique directe de complexes protéiques transmembranaires qui étaient alors inaccessibles jusqu'ici.

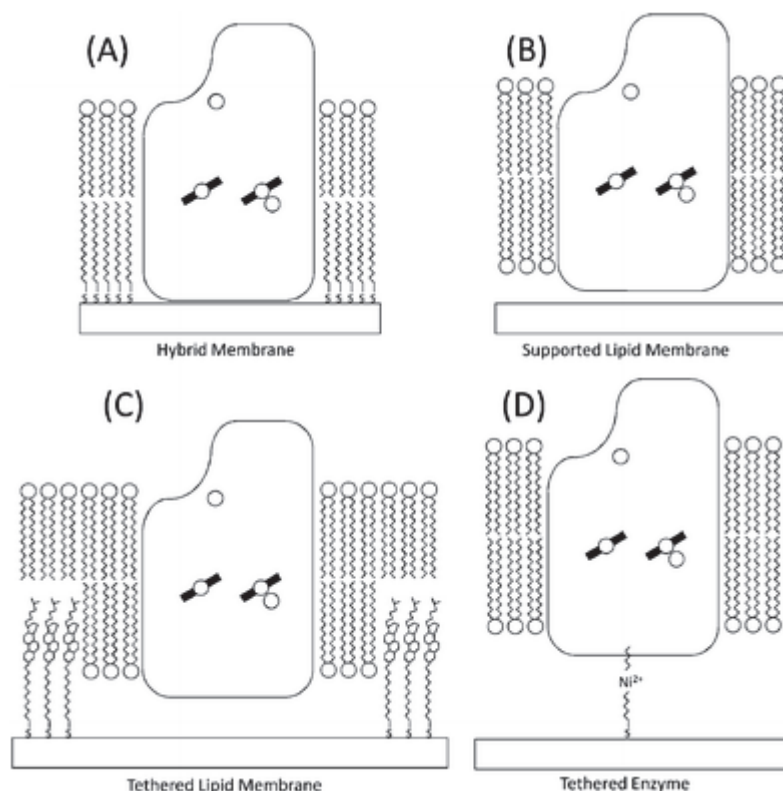


Figure 1.27 : Quatre stratégies différentes d'immobilisation de la CCO sur électrode. Hybrid membrane – solid supported lipid bilayer – Tethered lipid membrane – His-tag tethered membrane. D'après Jeuken 2009.

Souvent, l'électrochimie de ces protéines sur des ME donnent des résultats très satisfaisants par rapport à l'électrochimie pratiquée sur des SAMs uniquement. L'équipe de Mechler a fait un comparatif entre électrochimie du cyt *c* sur une monocouche de SAM et sur une bicouche hybride SAM/PC 14:0 (Figure 1.26). Malgré une plus grande passivation de l'électrode par rapport à la solution aqueuse dans le cas d'une électrode SAM/PC 14:0, le signal électrochimique du cyt *c* est amélioré (caractérisé par une adsorption de cyt *c* plus importante et une cinétique de transfert électronique  $k_{ET}$  plus élevée).

## ELECTRODES MODIFIEES AVEC DES PHOSPHOLIPIDES

## LES DIFFERENTES STRATEGIES DE DEPOT DES LIPIDES

Les électrodes modifiées dites CMEs (pour Chemically Modified Electrode) regroupent de très nombreuses techniques de modification de l'état de surface des électrodes. Le rapport de Durst sur le sujet est très complet (Durst et al. 1997). Parmi les différentes CMEs, Durst identifie les méthodes de dépôt suivantes :

- **Dip-coating** : Technique consistant à immerger l'électrode dans une solution jusqu'à ce qu'un film se forme spontanément à sa surface. Le contrôle de l'épaisseur d'un polymère déposé par cette technique est aisé.
- **Solvent evaporation** : Une goutte de solution du modificateur de surface est déposée sur l'électrode et est laissée à évaporer. L'avantage de cette technique réside dans le fait que la quantité de dépôt du modificateur est connue avec précision. (Alternate term: droplet evaporation).
- **Spin coating** : Une goutte est également déposée sur la surface de l'électrode. L'électrode est mise en rotation pour extraire l'excès de solvant. L'étape peut être répétée pour obtenir une électrode modifiée avec de multiples couches de modificateurs.
- **Electrochemical deposition** : La formation d'un dépôt se fait grâce à la réduction ou à l'oxydation d'un composé qui devient alors, généralement de façon irréversible, insoluble.
- **Electrochemical polymerization** : Une solution d'un monomère est oxydée ou réduite pour provoquer la polymérisation du monomère directement sur la surface de l'électrode.
- **Radiofrequency polymerization** : C'est une méthode pour obtenir un polymère de surface. Les monomères polymérisent suite à une décharge de plasma à radiofréquences.
- **Cross-linking** : C'est une réaction entre un polymère fonctionnalisé déposé sur la surface d'une électrode et un composé afin de modifier les propriétés de ce polymère.

Les lipides ont souvent l'avantage d'être à la fois agent de surface et fixateur, en particulier dans le cas d'enzymes membranaires. L'utilisation de surfactants ou de lipides permet de recréer l'environnement membranaire naturel de ces protéines qui est parfois essentiel à l'activation de leurs propriétés catalytiques (Figure 1.28) et de les maintenir à la surface de l'électrode.

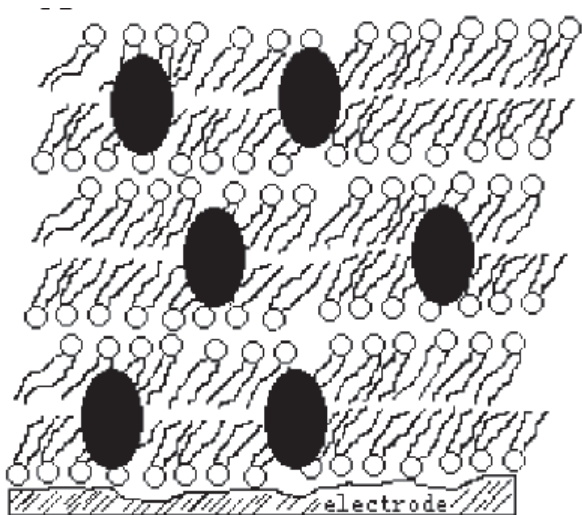


Figure 1.28 : vue conceptuelle d'une électrode modifiée surfactant-protéine. D'après Hu 2001.

La première étude du *cyt c* réalisée avec une électrode uniquement modifiée aux phospholipides est celle de Salamon (Salamon and Tollin 1991a). Elle faisait appel à la technique de spin-coating. Une électrode d'argent avait été immergée dans une suspension aqueuse de phospholipides. Les têtes polaires sont attirées par la nature très hydrophile de l'argent. Une deuxième couche de phospholipides se dépose naturellement dans une deuxième étape pour former une bicouche. Salamon a utilisé cette technique avec des médiateurs redox intégrés à la bicouche lipidique (Salamon and Tollin 1991b) mais aussi sans médiateur (Salamon and Tollin 1996; Salamon and Tollin 1997).

D'autres méthodes de préparation de l'électrode sont également possibles pour modifier une électrode par des phospholipides et ainsi promouvoir le transfert électronique du *cyt c*. Le dépôt par évaporation de solvant sur une électrode de carbone pyrolytique a été réalisé par l'équipe de Bianco (Bianco and Haladjian 1994). Lojou a utilisé des membranes de dialyses appliquées sur une électrode de carbone vitreux (Lojou and Bianco 2000).

La technique utilisée pour cette thèse est une technique de dépôt des lipides sur une électrode de GC faisant à la fois appel aux techniques de spin-coating et d'évaporation de solvant. Elle a déjà été utilisée par Park (Park et al. 1997) avec un dépôt de PC sur une électrode de GC. Puis, elle a été adaptée à l'étude électrochimique du *cyt c* en incorporant du CL dans le dépôt lipidique (Salamon and Tollin 1997; Park et al. 2001).



## PHOSPHOLIPIDES ET REORGANISATION MEMBRANAIRE

Quelque soit la technique utilisée pour mimer une monocouche ou une bicouche lipidique, ces techniques doivent prendre en compte les propriétés biophysiques des phospholipides. Les biomembranes sont principalement structurées par les phospholipides. On peut définir les biomembranes comme le réarrangement moléculaire de têtes polaires chargées et de queues hydrophobes constituées de chaînes grasses. La combinaison de ces parties hydrophiles et hydrophobes donne généralement, dans les conditions physiologiques, une structure lamellaire.

Sur une électrode, les propriétés naturelles de réarrangement des phospholipides sont utilisées pour créer des surfaces modifiées de mono ou bicouches lipidiques. Les phospholipides ne s'assemblent pas toujours dans cette phase dite lamellaire. La nature des lipides et plus spécifiquement la courbure des lipides détermine quel sera son comportement en présence d'un solvant protique. La courbure d'un phospholipide résulte principalement de la différence de l'encombrement stérique entre la tête polaire et la queue hydrophobe (Figure 1.29) (Janmey and Kinnunen 2006).

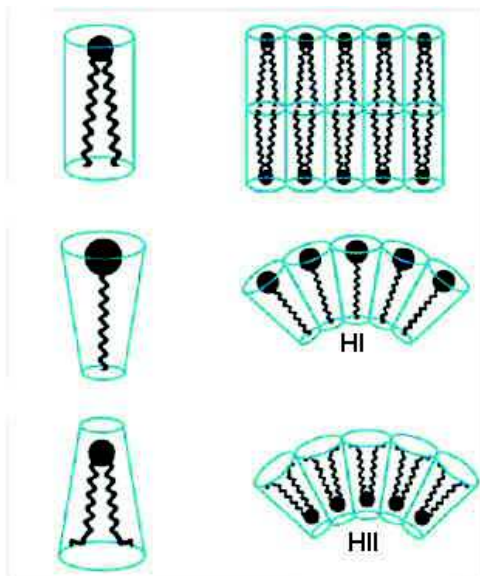


Figure 1.29 : Encombrement stérique de phospholipides et réarrangements associés. En haut – L : Phase lamellaire, HI : Phase hexagonal 1, HII : phase hexagonale inverse 2.

La nature des lipides testés peut donc interférer avec la structure lamellaire désirée sur une électrode modifiée (Figure 1.30). La classe de lipide et la nature des chaînes grasses associées déterminent principalement le type de phase que l'on obtiendra (avec la température et la pression comme deuxièmes variables notables). La question peut se poser dans le cas du cardiolipide car c'est une classe de phospholipide

dont les quatre chaînes grasses provoquent un fort encombrement stérique dans la partie hydrophobe. Les CL n'auraient pas une forte propension à former des structures hexagonales inverses sauf en cas de présence de cations divalents (Rand and Sengupta 1972; Vasilenko et al. 1982) ou de protéines spécifiques comme le cyt c (de Kruijff and Cullis 1980).

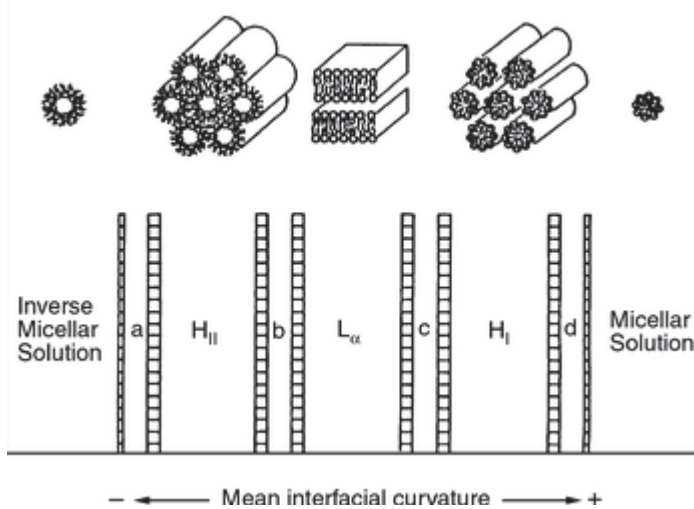


Figure 1.30 : Comportement de lipides en fonction de la courbure des phospholipides (Seddon et al. 2000). De gauche à droite, les phases de micelle inversée, hexagonale inverse II, lamellaire, Hexagonale I et micelle.

Toutefois, la présence de ces lipides dans les membranes biologiques ne compromet généralement pas l'intégrité physique de la structure lamellaire. En effet, la présence de certaines classes de phospholipides permet de préserver cette structure. C'est le cas de la PC dont la courbure quasiment nulle lui procure une tendance naturelle à former des structures lamellaires. La PC est le phospholipide le plus abondant dans les membranes biologiques. Ainsi la présence majoritaire de PC dans un mélange PC-CL permet de conserver cette phase lamellaire indispensable afin d'obtenir un réarrangement en monocouche sur une électrode de carbone.

Lors de l'arrangement de phospholipides en structure lamellaires de type monocouche ou bicouche, on peut distinguer plusieurs type d'états physiques liés à la température. En dessous d'une certaine température appelée température de transition de phase, les lipides sont dans une phase de type « gel compact » caractérisée par un déplacement latéral des chaînes grasses très limité et une concentration surfacique des lipides maximisée. Au dessus de ce seuil de température, on atteint un état de la membrane dit de « cristal liquide ». Les chaînes sont plus mobiles, l'épaisseur de la membrane diminue de l'ordre de 10 à 15% et les lipides occupent une surface plus importante (Figure 1.31).

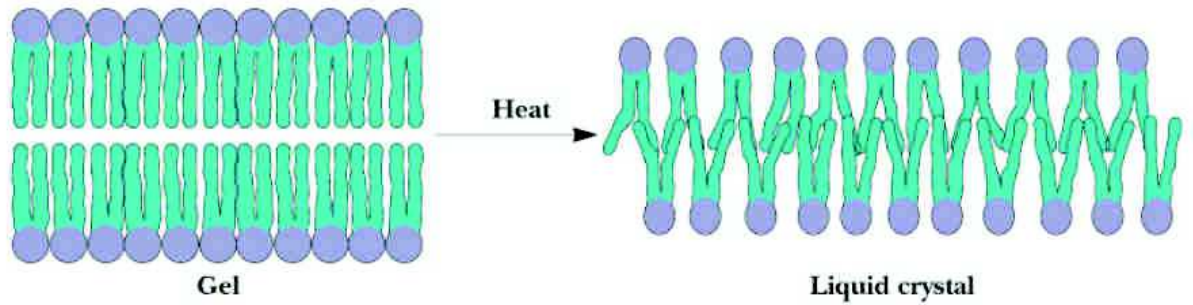


Figure 1.31 : Transition de phase d'une bicouche lipidique (D'après Garret and Grisham: *Biochemistry*, 2<sup>nd</sup> edition - figure 9.12)

Cette température de transition de phase dépend principalement de la composition en acides gras des phospholipides mais aussi de la nature de la tête polaire (c'est-à-dire la classe de phospholipides) et dans une moindre mesure du pH et de la force ionique.

Quelques exemples de températures de transition de phase (sources Avanti Polar Lipids, Sankaram et al. 1989) :

PC 14 :0	23°C	CL 14:0	40°C		
PC 18:0	55°C	PG 18:0	55°C		
PC 18:1n-9	-20°C	PG 18:1n-9	-18°C	CL 18:1n-9	25°C
PC 18:2n-6	-53°C	CL 18:2n-6	20°C		

Cette température de transition de phase peut avoir une importance capitale dans le cas d'études comparatives. Comme on le verra dans le chapitre 2, elle est également impliquée dans les processus de formation de la monocouche déposée à la surface de l'électrode.

## L'IMPORTANCE DES ESPECES MOLECULAIRES DU CL

### LE CL 22:6N-3 CHEZ LES BIVALVES

Un point de départ des recherches menant à ce travail de thèse concerne l'étude des classes de lipides chez le bivalve *Pecten maximus* (coquille Saint Jacques). Initialement, une classe de lipide polaire inconnue avait été caractérisée par des méthodes chromatographiques. Appelée en première instance GLY car supposée comme étant un glycolipide (Soudant et al. 1995), cette classe de lipide présente un profil en acides gras peu

ordinaire avec plus de 80% de chaînes de type 22:6n-3 (Figure 1.32). Suite à des analyses de la structure de ce GLY, il a finalement été identifié comme un cardiolipide (Kraffe et al. 2002).

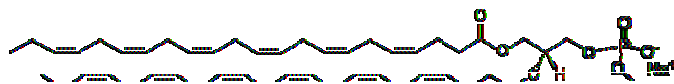


Figure 1.32 : Espèce moléculaire majoritaire du cardiolipide de *Pecten maximus* contenant quatre chaînes de type 22:6n-3.

Sa composition en acides gras est très homogène au sein des différents organes de *Pecten maximus* (Figure 1.33).

Figure 1.33 : Composition en acides gras du CL de *Pecten maximus* pour différents organes. D'après la thèse de E. Kraffe 2003.

L'étude de la composition en AG du CL pour d'autres espèces de bivalves révèle toutefois des différences. Si l'huître japonaise (*Crassostrea gigas*) présente le même profil en AG que *Pecten maximus*, la palourde (*Ruditapes philippinarum*) ou la mye (*Mya arenaria*) ont un profil en AG partagé entre le 22:6n-3 et le 20:5n-3 (Kraffe et al. 2005) (Figure 1.34).

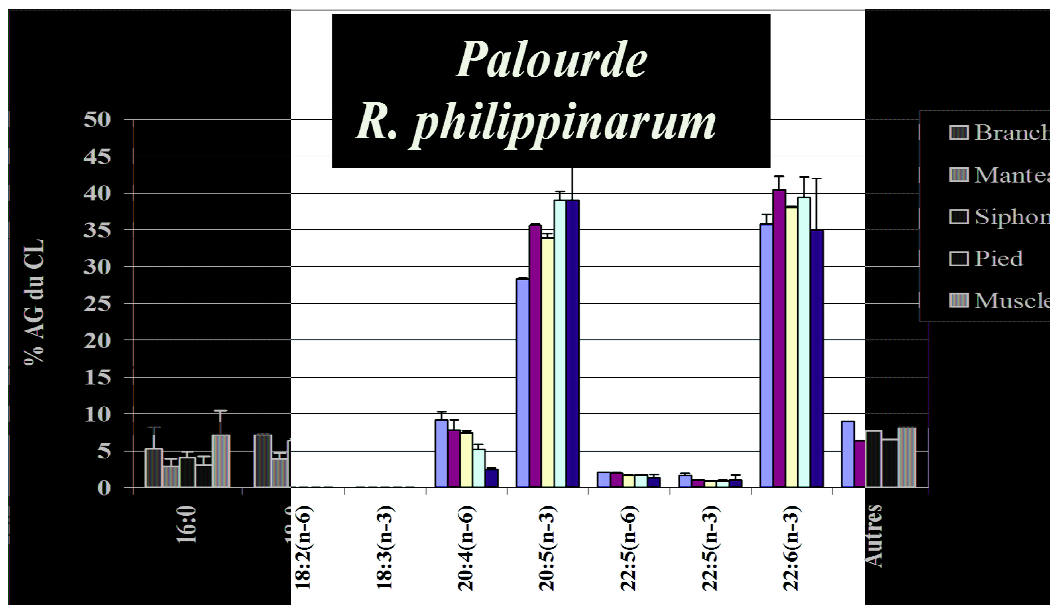


Figure 1.34 : Composition en acides gras du CL de *Ruditapes philippinarum* pour différents organes. D'après Kraffe 2005.

Afin de vérifier s'il existait d'autres compositions du CL chez les bivalves, une étude postérieure portant sur 37 espèces de bivalves a pu mettre en évidence que ces deux compositions sont uniques chez les bivalves marins. Ces compositions en AG ont ainsi été corrélées à la phylogénie des bivalves marins. En effet, le CL 22:6n-3 appelé type 1 est retrouvé dans les bivalves de la famille des Filibranches Eupteriomorphes, des bivalves épigés (vivant sur le sédiment). Le CL 20:5n-3/22:6n-3 (CL type 2) a été identifié comme marqueur des Eulamellibranches, des bivalves endogés vivant enfouis dans le sédiment (Kraffe et al. 2008).

La corrélation observée entre le type de CL et l'environnement naturel du bivalve suggère que le CL a une fonction bien précise liée à l'habitat de l'organisme. Des essais de nutrition contrôlée ont confirmé le rôle important de la chaîne 22:6n-3 dans le CL de bivalve. Des cultures de microalgues de deux espèces différentes, l'une riche en 20:5n-3 (*C. calcitrans*) et l'autre riche en 22:6n-3 (*T. isochoyris*) ont servi de base nutritionnelle pour des bivalves épigés (CL type 1) et des bivalves endogés (CL type 2). Les résultats montrent une stabilité de la composition en AG du CL pour les différents cas de figure sauf pour le bivalve endogé nourri avec *T. isochoyris* (Figure 1.35). Dans ce dernier cas, la proportion d'AG 20:5n-3 chute en faveur du 22:6n-3 pointant ainsi davantage son importance pour l'organisme (Thèse Kraffe 2003).

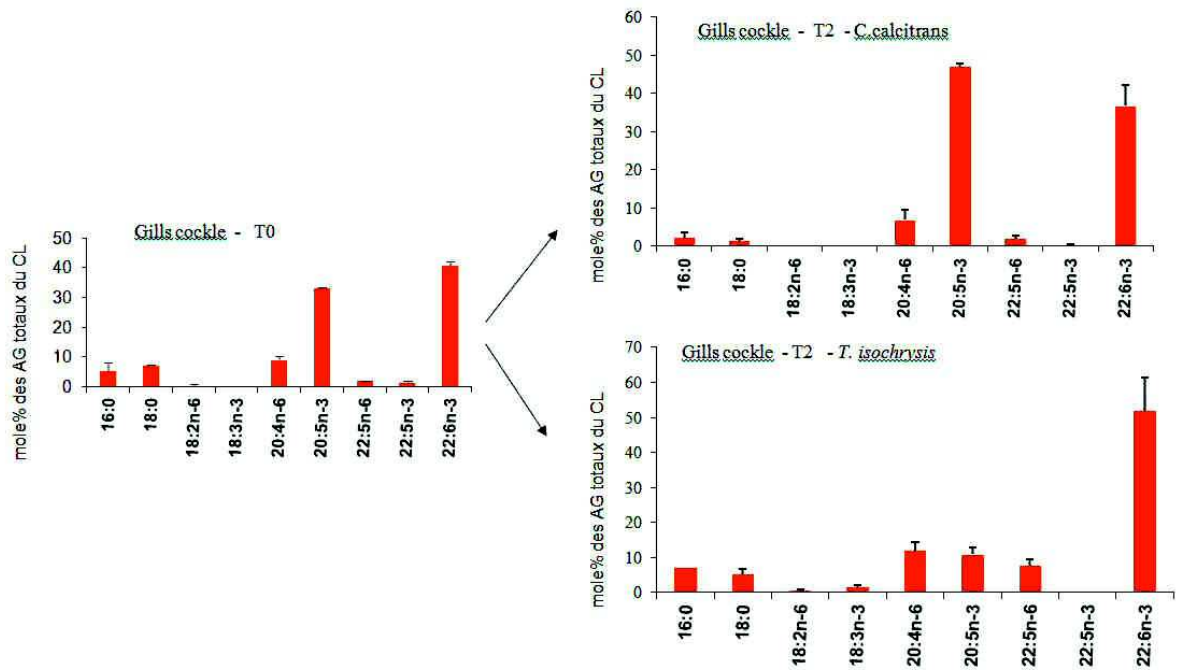


Figure 1.35 : Composition en AG du CL basale de la coque (T0) et modification après nutrition contrôlée (T2) avec *C. calcitrans* et *T. Isochrysis*. D'après la thèse de E. Kraffe 2003.

La nécessité pour l'organisme de conserver préférentiellement les AG 22:6n-3 est la question sous-jacente à ces études. L'idée d'une modification des activités enzymatiques de la chaîne respiratoire liée à l'AG 22:6n-3 a donc été supposé (Kraffe et al. 2008).

## FONCTIONS DE L'ESPECE MOLECULAIRE CL 22:6N-3

L'idée d'une fonction spécifique associée au CL possédant quatre chaînes 22:6n-3 existe déjà dans la littérature. L'exemple de l'impact du CL 22:6n-3 pour la fonction de transport transmembranaire d'ATP et d'ADP via le « ADP/ATP Carrier » (AAC) est particulièrement pertinent. L'AAC requiert 6 CLs liés de façon irréversible afin de stabiliser sa structure tridimensionnelle. 2 autres CLs peuvent être liés mais avec une interaction moindre et un échange dynamique avec des CL membranaires a été mis en évidence. Outre sa fonction de translocation régulée d'ATP et d'ADP, ce transporteur mitochondrial est aussi impliqué dans le MPT (Mitochondrial Permeability Transition), c'est à dire la phase de perméabilisation de la mitochondrie pendant l'apoptose (Klingenberg 2009). En effet, l'AAC adopte une conformation ouverte, non sélective, en présence d'une concentration physiologique anormalement élevée de  $Ca^{2+}$ . Le  $Ca^{2+}$  se lie aux 2 CLs de l'AAC qui se retrouve alors dans sa conformation ouverte (Figure 1.36).

M. Klingenberg / *Biochimica et Biophysica Acta* 1788 (2009) 2048–2058

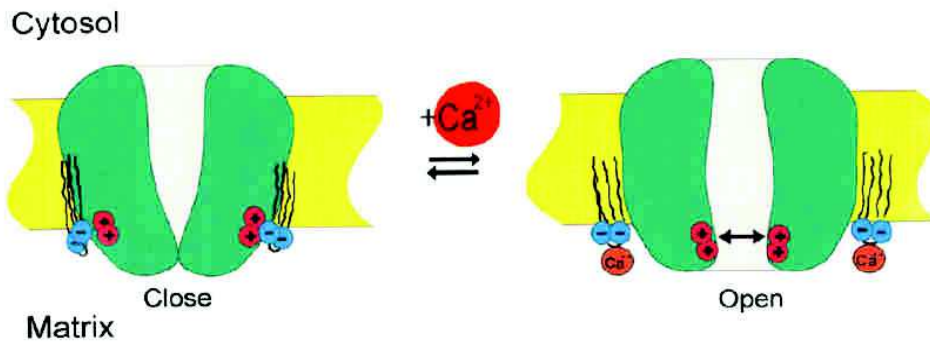


Figure 1.36 : Conformation fermée et ouverte de l'AAC pendant le MPT. D'après Klingenberg 2009.

Ce qui nous concerne directement, c'est la susceptibilité de l'AAC à adopter cette conformation en fonction de la composition lipidique de la membrane mitochondriale. Récemment, des études des fonctions mitochondriales incluant l'ouverture de l'AAC pendant la MPT ont été réalisées sur des mitochondries de cœur de rats nourris avec un régime normal, riche en EPA (20:5n-3) ou riche en DHA (22:6n-3) (Khairallah et al. 2010). Une nette inhibition de la MPT est observée dans le cas de mitochondries enrichies en DHA (Figure 1.37).

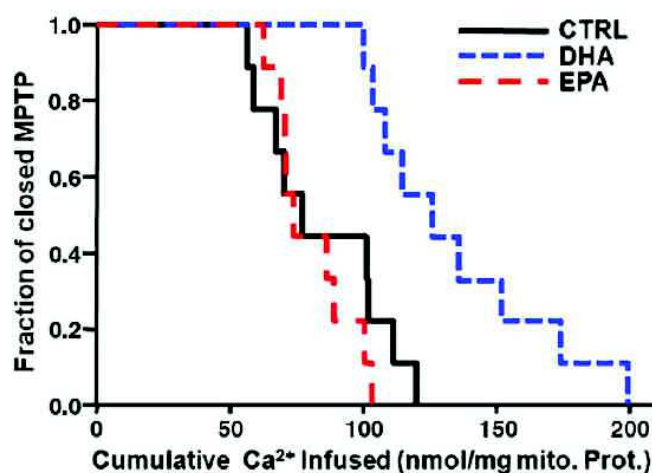


Figure 1.37 : Concentration de Ca<sup>2+</sup> nécessaire à la perméabilisation mitochondriale en fonction de l'enrichissement en AG EPA ou DHA, D'après Khairallah et al. 2010.

Dans le cas d'un régime contrôlé enrichi en DHA, L'assimilation des AG est supposée se reporter sur les phospholipides membranaires. L'assimilation de DHA dans la classe de CL a déjà été reportée (Berger et al.

1992; Watkins et al. 1998). Mais ce régime riche en DHA est aussi connu pour augmenter la proportion de CL dans les membranes mitochondriales ( Khairallah et al. 2010; Khairallah et al. 2012).

Si l'on suppose que l'apport en DHA est bien assimilé par la classe de CL, alors il existe une incertitude quand à l'explication des effets observés sur la MPT. Est-ce dû à l'action de l'enrichissement du CL en chaînes 22:6n-3 ou à la hausse de la quantité de CL mitochondrial ? On peut tout de même remarquer que malgré les faibles différences d'un point de vue structurel entre des chaînes EPA ou DHA, les effets in-vivo de l'enrichissement en AG de l'un ou de l'autre sont très différents. Cela suggère une reconnaissance et un mode d'action spécifique des chaînes DHA.

### CL 22:6N-3 ET METABOLISME ENERGETIQUE

L'étude de Watkins pointe également le rôle que pourrait jouer le CL 22:6n-3 dans le métabolisme énergétique de la mitochondrie (Figure 1.38).

Fatty Acid		Control	20:5	22:6
14:0	PL	4.5 ± 0.4	3.3 ± 0.5	5.1 ± 1.0
	CL	3.2 ± 0.5	6.0 ± 4.3	5.6 ± 4.1
16:0	PL	24.9 ± 0.3	22.3 ± 1.0	27.6 ± 0.4
	CL	18.6 ± 2.9	19.6 ± 4.5	6.4 ± 0.6
16:1	PL	14.1 ± 1.5	12.1 ± 4.0	9.1 ± 1.0
	CL	25.5 ± 1.4	14.9 ± 5.4	11.8 ± 3.9
18:0	PL	9.1 ± 0.3	10.5 ± 1.8	12.2 ± 0.7
	CL	6.0 ± 1.0	7.2 ± 2.0	2.7 ± 0.1
18:1	PL	28.1 ± 0.3	24.9 ± 2.1	17.9 ± 2.2
	CL	15.5 ± 0.6	13.0 ± 2.7	9.7 ± 2.3
18:1n-7	PL	3.2 ± 0.3	2.2 ± 0.8	2.4 ± 0.2
	CL	10.3 ± 1.0	7.7 ± 2.4	6.6 ± 1.7
18:2	PL	2.2 ± 0.2	1.6 ± 0.4	1.5 ± 0.1
	CL	8.3 ± 0.5	9.7 ± 3.7	4.0 ± 1.0
20:4	PL	5.9 ± 0.7	4.5 ± 0.9	4.1 ± 0.1
	CL	0.7 ± 0.2	2.0 ± 0.4	0.7 ± 0.0
20:5	PL	0.7 ± 0.6	13.0 ± 0.1	5.2 ± 0.8
	CL	0.0 ± 0.0	8.7 ± 0.4	0.5 ± 0.0
22:6	PL	2.3 ± 0.2	1.8 ± 0.4	11.6 ± 1.3
	CL	3.2 ± 0.5	2.3 ± 0.3	47.7 ± 5.0
Other	PL	5.0	3.8	3.3
	CL	8.7	8.9	4.3

Figure 1.38 : Composition en AG des phospholipides totaux (PL) et du cardiolipide (CL) pour différentes cultures cellulaires de cellules humaines HT-29 non modifiées (Control), enrichies en AG 20:5n et en AG 22:6. D'après Watkins et al. 1998.



Le potentiel transmembranaire mitochondrial a été mesuré pour des mitochondries dont les CL ont eu une modification de leur composition en AG (Watkins et al. 1998). Seul le CL enrichi en chaînes 22:6n-3 permet de maintenir et même d'augmenter ce potentiel par rapport aux mitochondries témoins (Figure 1.39). La production de ROS est elle aussi la plus élevée en présence de CL enrichi en chaînes 22:6n-3.

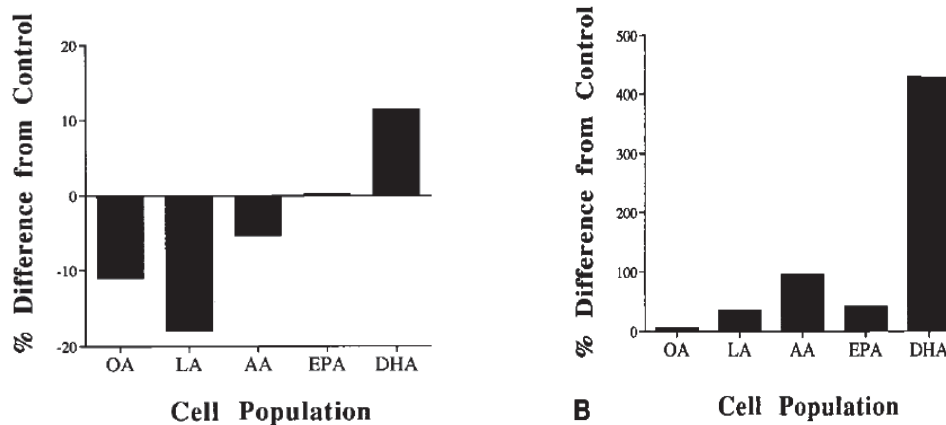


Figure 1.39 : Potentiel mitochondrial (à gauche) et production de ROS par la chaîne respiratoire (à droite) pour différents enrichissements du CL en AG. AG 18:1n-9 (OA), 18:2n-6 (LA), 20:4n-6 (AA), 20:5n-3 (EPA) et 22:6n-3 (DHA). D'après Watkins et al. 1998.

La production de ROS peut avoir plusieurs origines mais elle est principalement liée au fonctionnement de la chaîne respiratoire. Ainsi, une hausse des ROS pourrait être le signe d'une forte activité de la chaîne respiratoire.

Cette dernière possibilité gagne en crédibilité en prenant en compte les mesures d'activité CCO et  $F_1F_0$ -ATPase réalisé par Yamaoka (Yamaoka et al. 1988). Par des essais de nutrition contrôlée sur des rats, Yamaoka identifie une accumulation de chaînes 22:6n-3 dans la classe de CL. La mesure de l'activité CCO dans les mitochondries enrichies en DHA est plus faible que pour une cellule nourrie au 18:2n-6 (Figure 1.40).

Group	Specific activities	
	$F_1F_0$ -ATPase <sup>3</sup>	Cytochrome c oxidase <sup>4</sup>
	<i>P<sub>i</sub> nmol/(min · mg protein)</i>	<i>s<sup>-1</sup>/mg protein</i>
CO	1703 ± 113	1.06 ± 0.05
SO	2250 ± 195 <sup>b</sup>	0.51 ± 0.02 <sup>a</sup>

Figure 1.40 : Activités enzymatiques de la CCO et de la  $F_1F_0$ -ATPase de cellules soumises à un régime à base d'huile de maïs (CO) riche en AG 18:2n-6 ou d'huile de sardine (SO) riche en AG 20:5n-3 et 22:6n-3. D'après Yamaoka et al. 1988.

Plusieurs études laissent toutefois supposer que la présence de CLs à longues chaînes de type PUFA permettrait de compenser une baisse de CL à chaînes 18:2n-6 ou 18:1n-9 dans la mitochondrie et ainsi de maintenir une activité respiratoire à un niveau de base (Schlame et al. 2003; Minkler and Hoppel 2009; Khairallah et al. 2012). Khairallah conclut par cette phrase:

« High levels of tetralinoleoyl cardiolipin were not essential for normal mitochondrial function if replaced with very-long chain n3 or n6 PUFAs ».

Si les informations présentées ci-dessus laissent penser à un effet de la nature des chaînes du CL sur le fonctionnement de l'activité de la chaîne respiratoire de la mitochondrie, il existe également des arguments pour étayer la thèse inverse.

Une étude récente, portant sur l'utilisation de mutants de levure dont la composition en AG du CL a été modifiée, montre que le principal effet de la modification des chaînes grasses du CL s'observe pour le complexe alpha-cétoglutarate déshydrogénase qui, bien que faisant partie du métabolisme énergétique de la mitochondrie, n'est pas associé à la chaîne respiratoire mitochondriale (van Gestel et al. 2010).

Egalement, des études de nutrition contrôlées enrichies en AG de type n-3 sur des rats (Astorg and Chevalier 1991; Lemieux et al. 2008) ou des truites (Martin et al. 2012) ont confirmé l'incorporation des ces AGs (22:6n-3 principalement) dans le CL mais aucune ou peu de variations de l'activité des enzymes de la chaîne respiratoire n'ont été observées. Une hypothèse permettant d'expliquer ces observations serait que seule une espèce moléculaire minoritaire serait impliquée dans la régulation de certaines activités enzymatiques de la mitochondrie et que la plus grande partie de la variabilité de la composition en AG du CL n'est pas liée à cette régulation.

## SYNTHESE ET LIENS AVEC LES OBJECTIFS DE THESE

Mises bout à bout, les études discutées dans ce chapitre peuvent suggérer une fonction unique liée à une espèce moléculaire de CL et à sa composition en AG.

Plus généralement, toutes ces informations mènent à l'idée que seule une espèce moléculaire de phospholipide peut être impliquée dans un processus cellulaire spécifique. La très grande diversité de ces espèces moléculaires présentes dans les organismes vivants rend difficile voire impossible la mise en évidence de fonction liées à certains lipides. L'étude séparée de chaque espèce moléculaire est une solution pour identifier un mode d'action spécifique dépendant de la structure du lipide.

L'objectif majeur de ce travail de thèse a été de mettre au point et d'optimiser une méthode électrochimique utilisant une électrode modifiée avec du CL. Nous montrerons que ce montage est adéquat pour étudier les propriétés de différentes espèces moléculaires de CL. En mettant en évidence des propriétés spécifiques ou non à une espèce moléculaire de CL, nous pourrions franchir une étape importante pour la compréhension des modifications complexes de la composition lipidique des membranes.

## RÉFÉRENCES

- Abe, M., R. Niibayashi, S. Koubori, I. Moriyama and H. Miyoshi **2011**. "Molecular Mechanisms for the Induction of Peroxidase Activity of the Cytochrome c-Cardiolipin Complex." *Biochemistry* 50(39): 8383-8391.
- Allen, P. M., H. Allen, O. Hill and N. J. Walton **1984**. "Surface modifiers for the promotion of direct electrochemistry of cytochrome c." *Journal of Electroanalytical Chemistry* 178(1): 69-86.
- Arnarez, C., S. J. Marrink and X. Periole **2013**. "Identification of cardiolipin binding sites on cytochrome c oxidase at the entrance of proton channels." *Sci. Rep.* 3.
- Ascenzi, P., F. Polticelli, M. Marino, R. Santucci and M. Coletta **2011**. "Cardiolipin drives cytochrome c proapoptotic and antiapoptotic actions." *IUBMB Life* 63(3): 160-165.
- Astorg, P.-O. and J. I. Chevalier **1991**. "Phospholipid fatty acid composition and respiratory properties of heart and liver mitochondria from rats fed with or deprived of linolenic acid." *Nutrition Research* 11(1): 71-77.
- Bain, C. D., H. A. Biebuyck and G. M. Whitesides **1989**. "Comparison of self-assembled monolayers on gold: coadsorption of thiols and disulfides." *Langmuir* 5(3): 723-727.
- Basova, L. V., I. V. Kurnikov, L. Wang, V. B. Ritov, N. A. Belikova, Vlasova, I., A. A. Pacheco, D. E. Winnica, J. Peterson, H. Bayir, D. H. Waldeck and V. E. Kagan **2007**. "Cardiolipin switch in mitochondria: shutting off the reduction of cytochrome c and turning on the peroxidase activity." *Biochemistry* 46(11): 3423-34.
- Basu, S., N. A. Azarova, M. D. Font, S. B. King, N. Hogg, M. T. Gladwin, S. Shiva and D. B. Kim-Shapiro **2008**. "Nitrite Reductase Activity of Cytochrome c." *Journal of Biological Chemistry* 283(47): 32590-32597.
- Bazán, S., E. Mileykovskaya, V. K. P. S. Mallampalli, P. Heacock, G. C. Sparagna and W. Dowhan **2013**. "Cardiolipin-dependent Reconstitution of Respiratory Supercomplexes from Purified *Saccharomyces cerevisiae* Complexes III and IV." *Journal of Biological Chemistry* 288(1): 401-411.
- Belikova, N. A., Y. Y. Tyurina, G. Borisenko, V. Tyurin, A. K. Samhan Arias, N. Yanamala, P. G. Furtmüller, J. Klein-Seetharaman, C. Obinger and V. E. Kagan **2009**. "Heterolytic Reduction of Fatty Acid Hydroperoxides by Cytochrome c/Cardiolipin Complexes: Antioxidant Function in Mitochondria." *Journal of the American Chemical Society* 131(32): 11288-11289.
- Belikova, N. A., Y. A. Vladimirov, A. N. Osipov, A. A. Kapralov, V. A. Tyurin, M. V. Potapovich, L. V. Basova, J. Peterson, I. V. Kurnikov and V. E. Kagan **2006**. "Peroxidase Activity and Structural Transitions of Cytochrome c Bound to Cardiolipin-Containing Membranes." *Biochemistry* 45(15): 4998-5009.

- Berger, A., J. B. German and M. E. Gershwin **1992**. "Implications of modifying cardiolipin acyl composition by diet. 1. Cardiolipin acyl chain is an important determinant in the binding to antiphospholipid antibodies in SLE sera." Journal of Autoimmunity 5(2): 229-241.
- Betso, S. R., M. H. Klapper and L. B. Anderson **1972**. "Electrochemical studies of heme proteins. Coulometric, polarographic, and combined spectroelectrochemical methods for reduction of the heme prosthetic group in cytochrome c." Journal of the American Chemical Society 94(23): 8197-8204.
- Bianco, P. and J. Haladjian **1994**. "Control of the electron transfer reactions between c-type cytochromes and lipid-modified electrodes." Electrochimica Acta 39(7): 911-916.
- Borisenko, G. G., A. A. Kapralov, V. A. Tyurin, A. Maeda, D. A. Stoyanovsky and V. E. Kagan **2008**. "Molecular Design of New Inhibitors of Peroxidase Activity of Cytochrome c/Cardiolipin Complexes: Fluorescent Oxadiazole-Derivatized Cardiolipin" Biochemistry 47(51): 13699-13710.
- Bowden, E. F., F. M. Hawkridge and H. N. Blount **1984**. "Interfacial electrochemistry of cytochrome c at tin oxide, indium oxide, gold, and platinum electrodes." Journal of Electroanalytical Chemistry 161(2): 355-376.
- Brdička, R. **1933**. "Polarographic studies with the dropping mercury cathode. - Part XXXI. - A new test for Proteins in the presence of Cobalt salts in ammoniacal solutions of ammonium chloride." Collection of Czechoslovak Chemical Communications 5: 112-128.
- Brown, L. R. and K. Wuthrich **1977**. "NMR and ESR studies of the interactions of cytochrome c with mixed cardiolipin-phosphatidylcholine vesicles." Biochimica et Biophysica Acta 468(3): 389-410.
- Buratta, M., L. Piccotti, S. Giannini, P. Gresele, R. Roberti and L. Corazzi **2006**. "Selective Cytochrome c Displacement by Phosphate and Ca<sup>2+</sup> in Brain Mitochondria." Journal of Membrane Biology 212(3): 199-210.
- Burgess, J. D., M. C. Rhoten and F. M. Hawkridge **1998**. "Cytochrome c Oxidase Immobilized in Stable Supported Lipid Bilayer Membranes." Langmuir 14(9): 2467-2475.
- Bushnell, G. W., G. V. Louie and G. D. Brayer **1990**. "High-resolution three-dimensional structure of horse heart cytochrome c." Journal of Molecular Biology 214(2): 585-595.
- Casalini, S., G. Battistuzzi, M. Borsari, C. A. Bortolotti, G. Di Rocco, A. Ranieri and M. Sola **2010**. "Electron Transfer Properties and Hydrogen Peroxide Electrocatalysis of Cytochrome c Variants at Positions 67 and 80." The Journal of Physical Chemistry B 114(4): 1698-1706.
- Chen, X., R. Ferrigno, J. Yang and G. M. Whitesides **2002**. "Redox Properties of Cytochrome c Adsorbed on Self-Assembled Monolayers: A Probe for Protein Conformation and Orientation." Langmuir 18(18): 7009-7015.
- Choi, S. and J. M. Swanson **1995**. "Interaction of cytochrome c with cardiolipin: an infrared spectroscopic study." Biophysical Chemistry 54(3): 271-278.
- Claypool, S. M. **2009**. "Cardiolipin, a critical determinant of mitochondrial carrier protein assembly and function." Biochimica et Biophysica Acta 1788(10): 2059-68.
- Corcelli, A., S. Lobasso, L. L. Palese, M. S. Saponetti and S. Papa **2007**. "Cardiolipin is associated with the terminal oxidase of an extremely halophilic archaeon." Biochemical and Biophysical Research Communications 354(3): 795-801.
- Cortese, J. D., A. L. Voglino and C. R. Hackenbrock **1998**. "Multiple Conformations of Physiological Membrane-Bound Cytochrome c<sup>+</sup>." Biochemistry 37(18): 6402-6409.
- Daum, G. n. **1985**. "Lipids of mitochondria." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes 822(1): 1-42.

- de Kruijff, B. and P. R. Cullis **1980**. "Cytochrome c specifically induces non-bilayer structures in cardiolipin-containing model membranes." Biochimica et Biophysica Acta 602(3): 477-90.
- Dickerson, R. E., M. L. Kopka, C. L. Borders Jr, J. Varnum, J. E. Weinzierl and E. Margoliash **1967**. "A centrosymmetric projection at 4 Å of horse heart oxidized cytochrome c." Journal of Molecular Biology 29(1): 77-95.
- Domanov, Y. A., J. G. Molotkovsky and G. P. Gorbenko **2005**. "Coverage-dependent changes of cytochrome c transverse location in phospholipid membranes revealed by FRET." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes 1716(1): 49-58.
- Döpner, S., P. Hildebrandt, F. I. Rosell, A. G. Mauk, M. von Walter, G. Buse and T. Soulimane **1999**. "The structural and functional role of lysine residues in the binding domain of cytochrome c in the electron transfer to cytochrome c oxidase." European Journal of Biochemistry 261(2): 379-391.
- Durst, R., A. Baumner, R. Murray, R. Buck and C. Andrieux **1997**. "Chemically modified electrodes: Recommended terminology and definitions (IUPAC recommendations 1997)." Biosensors and Bioelectronics 12: iii-iii.
- Eddowes, M. J. and H. A. O. Hill **1977**. "Novel method for the investigation of the electrochemistry of metalloproteins: cytochrome c." Journal of the Chemical Society, Chemical Communications(21): 771b-772.
- Eddowes, M. J. and H. A. O. Hill **1979**. "Electrochemistry of horse heart cytochrome c." Journal of the American Chemical Society 101(16): 4461-4464.
- El Kasmi, A., M. C. Leopold, R. Galligan, R. T. Robertson, S. S. Saavedra, K. El Kacemi and E. F. Bowden **2002**. "Adsorptive immobilization of cytochrome c on indium/tin oxide (ITO): electrochemical evidence for electron transfer-induced conformational changes." Electrochemistry Communications 4(2): 177-181.
- El Kasmi, A., J. M. Wallace, E. F. Bowden, S. M. Binet and R. J. Linderman **1998**. "Controlling Interfacial Electron-Transfer Kinetics of Cytochrome c with Mixed Self-Assembled Monolayers." Journal of the American Chemical Society 120(1): 225-226.
- El Kirat, K. and S. Morandat **2009**. "Cytochrome c interaction with neutral lipid membranes: influence of lipid packing and protein charges." Chemistry and Physics of Lipids 162(1-2): 17-24.
- Esposti, M. D., J. T. Eler, J. A. Hickman and C. Dive **2001**. "Bid, a Widely Expressed Proapoptotic Protein of the Bcl-2 Family, Displays Lipid Transfer Activity." Molecular and Cellular Biology 21(21): 7268-7276.
- Fedurco, M. **2000**. "Redox reactions of heme-containing metalloproteins: dynamic effects of self-assembled monolayers on thermodynamics and kinetics of cytochrome c electron-transfer reactions." Coordination Chemistry Reviews 209(1): 263-331.
- Feissner, R. F., J. Skalska, W. E. Gaum and S. S. Sheu **2009**. "Crosstalk signaling between mitochondrial Ca<sup>2+</sup> and ROS." Frontiers in bioscience : a journal and virtual library 14: 1197-1218.
- Feng, Z. Q., S. Imabayashi, T. Kakiuchi and K. Niki **1995**. "Electroreflectance spectroscopic study of the electron transfer rate of cytochrome c electrostatically immobilized on the [omega]-carboxyl alkanethiol monolayer modified gold electrode." Journal of Electroanalytical Chemistry 394(1-2): 149-154.
- Finklea, H. O. and D. D. Hanshew **1992**. "Electron-transfer kinetics in organized thiol monolayers with attached pentaammine(pyridine)ruthenium redox centers." Journal of the American Chemical Society 114(9): 3173-3181.
- Fry, M. and D. E. Green **1981**. "Cardiolipin requirement for electron transfer in complex I and III of the mitochondrial respiratory chain." Journal of Biological Chemistry 256(4): 1874-1880.
- Gorbenko, G. P. and Y. A. Domanov **2003**. "Cytochrome c location in phosphatidylcholine/cardiolipin model membranes: resonance energy transfer study." Biophysical Chemistry 103(3): 239-49.

- Gorbenko, G. P., J. G. Molotkovsky and P. K. Kinnunen **2006**. "Cytochrome C interaction with cardiolipin/phosphatidylcholine model membranes: effect of cardiolipin protonation." Biophysical Journal 90(11): 4093-103.
- Green, D. E. and S. Fleischer **1963**. "The role of lipids in mitochondrial electron transfer and oxidative phosphorylation." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Specialized Section on Lipids and Related Subjects 70(0): 554-582.
- Haladjian, J., P. Bianco, F. d. r. Nunzi and M. Bruschi **1994**. "A permselective-membrane electrode for the electrochemical study of redox proteins. Application to cytochrome c552 from *Thiobacillus ferrooxidans*." Analytica Chimica Acta 289(1): 15-20.
- Haladjian, J., R. Pilard and P. Bianco **1985**. "Effet of methyl viologen on the electrochemical behaviour of denaturated cytochrome c at mercury and solid electrodes." Journal of Electroanalytical Chemistry 184(2): 391-400.
- Hanske, J., J. R. Toffey, A. M. Morenz, A. J. Bonilla, K. H. Schiavoni and E. V. Pletneva **2012**. "Conformational properties of cardiolipin-bound cytochrome c." Proceedings of the National Academy of Sciences 109(1): 125-130.
- Hanson, C. J., M. D. Bootman and H. L. Roderick **2004**. "Cell Signalling: IP3 Receptors Channel Calcium into Cell Death." 14: R933-R935.
- Heineman, W. R., T. Kuwana and C. R. Hartzell **1972**. "Indirect electrochemical titration of beef heart cytochrome oxidase." Biochemical and Biophysical Research Communications 49(1): 1-8.
- Hildebrandt, P. and M. Stockburger **1989**. "Cytochrome c at charged interfaces. 1. Conformational and redox equilibria at the electrode/electrolyte interface probed by surface-enhanced resonance Raman spectroscopy." Biochemistry 28(16): 6710-6721.
- Hildebrandt, P. and M. Stockburger **1989**. "Cytochrome c at charged interfaces. 2. Complexes with negatively charged macromolecular systems studied by resonance Raman spectroscopy." Biochemistry 28(16): 6722-6728.
- Hovius, R., J. Thijssen, P. van der Linden, K. Nicolay and B. de Kruijff **1993**. "Phospholipid asymmetry of the outer membrane of rat liver mitochondria: Evidence for the presence of cardiolipin on the outside of the outer membrane." FEBS Letters 330(1): 71-76.
- Hu, N. **2001**. "Direct electrochemistry of redox proteins or enzymes at various film electrodes and their possible applications in monitoring some pollutants." 73: 13.
- Huang, Y., L. Liu, C. Shi, J. Huang and G. Li **2006**. "Electrochemical analysis of the effect of Ca<sup>2+</sup> on cardiolipin-cytochrome c interaction." Biochimica et Biophysica Acta 1760(12): 1827-30.
- Huttemann, M., P. Pecina, M. Rainbolt, T. H. Sanderson, V. E. Kagan, L. Samavati, J. W. Doan and I. Lee **2011**. "The multiple functions of cytochrome c and their regulation in life and death decisions of the mammalian cell: From respiration to apoptosis." Mitochondrion 11(3): 369-381.
- Iverson, S. L. and S. Orrenius **2004**. "The cardiolipin-cytochrome c interaction and the mitochondrial regulation of apoptosis." Archives of Biochemistry and Biophysics 423(1): 37-46.
- Janmey, P. A. and P. K. J. Kinnunen **2006**. "Biophysical properties of lipids and dynamic membranes." Trends in Cell Biology 16(10): 538-546.
- Jemmerson, R., J. Liu, D. Hausauer, K.-P. Lam, A. Mondino and R. D. Nelson **1999**. "A Conformational Change in Cytochrome c of Apoptotic and Necrotic Cells Is Detected by Monoclonal Antibody Binding and Mimicked by Association of the Native Antigen with Synthetic Phospholipid Vesicles" Biochemistry 38(12): 3599-3609.

- Ju, H., S. Liu, B. Ge, F. Lisdat and F. W. Scheller **2002**. "Electrochemistry of Cytochrome c Immobilized on Colloidal Gold Modified Carbon Paste Electrodes and Its Electrocatalytic Activity." Electroanalysis 14(2): 141-147.
- Kagan, V. E., V. A. Tyurin, J. Jiang, Y. Y. Tyurina, V. B. Ritov, A. A. Amoscato, A. N. Osipov, N. A. Belikova, A. A. Kapralov, V. Kini, I. I. Vlasova, Q. Zhao, M. Zou, P. Di, D. A. Svistunenko, I. V. Kurnikov and G. G. Borisenko **2005**. "Cytochrome c acts as a cardiolipin oxygenase required for release of proapoptotic factors." Nature Chemical Biology 1(4): 223-232.
- Kalanxhi, E. and Carmichael J. A. Wallace **2007**. "Cytochrome c impaled: investigation of the extended lipid anchorage of a soluble protein to mitochondrial membrane models." Biochemical Journal 407(2): 179-179.
- Kapralov, A. A., I. V. Kurnikov, I. I. Vlasova, N. A. Belikova, V. A. Tyurin, L. V. Basova, Q. Zhao, Y. Y. Tyurina, J. Jiang, H. Bayir, Y. A. Vladimirov and V. E. Kagan **2007**. "The Hierarchy of Structural Transitions Induced in Cytochrome c by Anionic Phospholipids Determines Its Peroxidase Activation and Selective Peroxidation during Apoptosis in Cells" Biochemistry 46(49): 14232-14244.
- Kates, M., J.-Y. Syz, D. Gosser and T. Haines **1993**. "pH-dissociation characteristics of cardiolipin and its 2'-deoxy analogue." Lipids 28(10): 877-882.
- Kawai, C., F. M. Prado, G. L. C. Nunes, P. Di Mascio, A. M. Carmona-Ribeiro and I. L. Nantes **2005**. "pH-dependent Interaction of Cytochrome c with Mitochondrial Mimetic Membranes." Journal of Biological Chemistry 280(41): 34709-34717.
- Khairallah, R. J., J. Kim, K. M. O'Shea, K. A. O'Connell, B. H. Brown, T. Galvao, C. Daneault, C. D. Rosiers, B. M. Polster, C. L. Hoppel and W. C. Stanley **2012**. "Improved Mitochondrial Function with Diet-Induced Increase in Either Docosahexaenoic Acid or Arachidonic Acid in Membrane Phospholipids." PLoS ONE 7(3): e34402.
- Khairallah, R. J., G. C. Sparagna, N. Khanna, K. M. O'Shea, P. A. Hecker, T. Kristian, G. Fiskum, C. Des Rosiers, B. M. Polster and W. C. Stanley **2010**. "Dietary supplementation with docosahexaenoic acid, but not eicosapentaenoic acid, dramatically alters cardiac mitochondrial phospholipid fatty acid composition and prevents permeability transition." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics 1797(8): 1555-1562.
- Kim, T.-H., Y. Zhao, W.-X. Ding, J. N. Shin, X. He, Y.-W. Seo, J. Chen, H. Rabinowich, A. A. Amoscato and X.-M. Yin **2004**. "Bid-Cardiolipin Interaction at Mitochondrial Contact Site Contributes to Mitochondrial Cristae Reorganization and Cytochrome c Release." Molecular Biology of the Cell 15(7): 3061-3072.
- Kinnunen, P. K. J. **1996**. "On the molecular-level mechanisms of peripheral protein-membrane interactions induced by lipids forming inverted non-lamellar phases." Chemistry and Physics of Lipids 81(2): 151-166.
- Klingenberg, M. **2009**. "Cardiolipin and mitochondrial carriers." Biochimica et Biophysica Acta 1788(10): 2048-58.
- Kostrzewa, A., T. Pájlí, W. Froncisz and D. Marsh **2000**. "Membrane Location of Spin-Labeled Cytochrome c Determined by Paramagnetic Relaxation Agents." Biochemistry 39(20): 6066-6074.
- Kraffe, E., J. Grall, M. Le Duff, P. Soudant and Y. Marty **2008**. "A Striking Parallel Between Cardiolipin Fatty Acid Composition and Phylogenetic Belonging in Marine Bivalves: A Possible Adaptive Evolution?" Lipids 43(10): 961-970.
- Kraffe, E., P. Soudant and Y. Marty **2004**. "Fatty acids of serine, ethanolamine, and choline plasmalogens in some marine bivalves." Lipids 39(1): 59-66.
- Kraffe, E., P. Soudant, Y. Marty and N. Kervarec **2005**. "Docosahexaenoic acid-and eicosapentaenoic acid-enriched cardiolipin in the manila clam *Ruditapes philippinarum*." Lipids 40(6): 619-625.

- Kraffe, E., P. Soudant, Y. Marty, N. Kervarec and P. Jehan **2002**. "Evidence of a tetradocosahexaenoic cardiolipin in some marine bivalves." Lipids 37(5): 507-514.
- Lee, K.-S., M.-S. Won, H.-B. Noh and Y.-B. Shim **2010**. "Triggering the redox reaction of cytochrome c on a biomimetic layer and elimination of interferences for NADH detection." Biomaterials 31(30): 7827-7835.
- Lemieux, H., P. U. Blier and J. C. Tardif **2008**. "Does membrane fatty acid composition modulate mitochondrial functions and their thermal sensitivities?" Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology 149(1): 20-29.
- Letellier, L. and E. Shechter **1973**. "Correlations between Structure and Spectroscopic Properties in Membrane Model System." European Journal of Biochemistry 40(2): 507-512.
- Lewis, K. L., L. Y. Su, F. M. Hawkrige, K. R. Ward and M. C. Rhoten **2006**. "Immobilization of cytochrome c oxidase into electrode-supported lipid bilayer membranes for in vitro cytochrome c sensing." Ieee Sensors Journal 6(2): 420-427.
- Liu, X., C. N. Kim, J. Yang, R. Jemmerson and X. Wang **1996**. "Induction of Apoptotic Program in Cell-Free Extracts: Requirement for dATP and Cytochrome c." Cell 86(1): 147-157.
- Lojou and P. Bianco **2000**. "Membrane electrodes can modulate the electrochemical response of redox proteins - direct electrochemistry of cytochrome c." Journal of Electroanalytical Chemistry 485(1): 71-80.
- MacLennan, D. H., G. Lenaz and L. Szarkowska **1966**. "Studies on the Mechanism of Oxidative Phosphorylation." Journal of Biological Chemistry 241(22): 5251-5259.
- MacNaughtan, W., K. A. Snook, E. Caspi and N. P. Franks **1985**. "An X-ray diffraction analysis of oriented lipid multilayers containing basic proteins." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes 818(2): 132-148.
- Malhotra, A., Y. Xu, M. Ren and M. Schlame **2009**. "Formation of molecular species of mitochondrial cardiolipin. 1. A novel transacylation mechanism to shuttle fatty acids between sn-1 and sn-2 positions of multiple phospholipid species." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids 1791(4): 314-320.
- Margoliash, E. and N. Frohwirt **1959**. "Appendix - Spectrum of horse-heart cytochrome c."
- Martin, N., D. P. Bureau, Y. Marty, E. Kraffe and H. Guderley **2012**. "Dietary lipid quality and mitochondrial membrane composition in trout: responses of membrane enzymes and oxidative capacities." Journal of Comparative Physiology B: 1-16.
- McMillin, J. B. and W. Dowhan **2002**. "Cardiolipin and apoptosis." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids 1585(2-3): 97-107.
- Mechler, A., G. Nawaratna, M.-I. Aguilar and L. Martin **2006**. "A Study of Protein Electrochemistry on a Supported Membrane Electrode." International Journal of Peptide Research and Therapeutics 12(3): 217-224.
- Mileykovskaya, E., M. Zhang and W. Dowhan **2005**. "Cardiolipin in energy transducing membranes." Biochemistry (Moscow) 70(2): 154-158.
- Minkler, P. E. and C. L. Hoppel **2009**. "Separation and characterization of cardiolipin molecular species by reverse-phase ion pair high-performance liquid chromatography-mass spectrometry." Journal of Lipid Research 51(4): 856-865.
- Morrison, M., T. Hollocher, R. Murray, G. Marinetti and E. Stotz **1960**. "The isolation of cytochrome c by salt extraction." Biochimica Et Biophysica Acta 41(2): 334-337.



- Murgida, D. H. and P. Hildebrandt **2001**. "The heterogeneous electron transfer of cytochrome c adsorbed on Ag electrodes coated with [omega]-carboxyl alkanethiols. A surface enhanced resonance Raman spectroscopic study." Journal of Molecular Structure 565-566: 97-100.
- Musatov, A. **2006**. "Contribution of peroxidized cardiolipin to inactivation of bovine heart cytochrome c oxidase." Free Radical Biology and Medicine 41(2): 238-246.
- Mustonen, P., J. A. Virtanen, P. J. Somerharju and P. K. J. Kinnunen **1987**. "Binding of cytochrome c to liposomes as revealed by the quenching of fluorescence from pyrene-labeled phospholipids." Biochemistry 26(11): 2991-2997.
- Nuzzo, R. G. and D. L. Allara **1983**. "Adsorption of bifunctional organic disulfides on gold surfaces." Journal of the American Chemical Society 105(13): 4481-4483.
- Orrenius, S. and B. Zhivotovsky **2005**. "Cardiolipin oxidation sets cytochrome c free." Nature Chemical Biology 1(4): 188-9.
- Ott, M., J. D. Robertson, V. Gogvadze, B. Zhivotovsky and S. Orrenius **2002**. "Cytochrome c release from mitochondria proceeds by a two-step process." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 99(3): 1259-1263.
- Pangborn, M. C. **1942**. "ISOLATION AND PURIFICATION OF A SEROLOGICALLY ACTIVE PHOSPHOLIPID FROM BEEF HEART." Journal of Biological Chemistry 143(1): 247-256.
- Paradies, G., G. Petrosillo, V. Paradies and F. M. Ruggiero **2009**. "Role of cardiolipin peroxidation and Ca<sup>2+</sup> in mitochondrial dysfunction and disease." Cell Calcium 45(6): 643-50.
- Paradies, G., F. M. Ruggiero, P. Dinoi, G. Petrosillo and E. Quagliariello **1993**. "Decreased Cytochrome Oxidase Activity and Changes in Phospholipids in Heart Mitochondria from Hypothyroid Rats." Archives of Biochemistry and Biophysics 307(1): 91-95.
- Park, H., J.-S. Park and Y.-B. Shim **1997**. "Redox reaction of benzoquinone on a lipid coated glassy carbon electrode." Journal of Electroanalytical Chemistry 438(1-2): 113-119.
- Park, H., J.-S. Park and Y.-B. Shim **2001**. "Electrochemical and in situ UV-visible spectroscopic behavior of cytochrome c at a cardiolipin-modified electrode." Journal of Electroanalytical Chemistry 514(1-2): 67-74.
- Petrosillo, G., F. M. Ruggiero, M. Pistolesse and G. Paradies **2001**. "Reactive oxygen species generated from the mitochondrial electron transport chain induce cytochrome c dissociation from beef-heart submitochondrial particles via cardiolipin peroxidation. Possible role in the apoptosis." FEBS Letters 509(3): 435-8.
- Piccotti, L., M. Buratta, S. Giannini, P. Gresele, R. Roberti and L. Corazzi **2004**. "Binding and Release of Cytochrome c in Brain Mitochondria Is Influenced by Membrane Potential and Hydrophobic Interactions with Cardiolipin." Journal of Membrane Biology 198(1): 43-53.
- Pinheiro, T. J. T., P. J. Bratt, I. H. Davis, D. C. Doetschman and A. Watts **1993**. "Spin-lattice relaxation times of phospholipid aminoxyl spin labels in cardiolipin-cytochrome c bilayers: a pulse saturation-recovery EPR study." Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2 1993(11): 2113-2117-2113-2117.
- Pinheiro, T. J. T. and A. Watts **1994**. "Lipid Specificity in the Interaction of Cytochrome c with Anionic Phospholipid Bilayers Revealed by Solid-State 31P NMR." Biochemistry 33(9): 2451-2458.
- Plant, A. L. **1993**. "Self-assembled phospholipid/alkanethiol biomimetic bilayers on gold." Langmuir 9(11): 2764-2767.
- Plant, A. L. **1999**. "Supported Hybrid Bilayer Membranes as Rugged Cell Membrane Mimics." Langmuir 15(15): 5128-5135.

- Quinn, P. J. and R. M. C. Dawson **1969**. "Interactions of cytochrome c and [14C]-carboxymethylated cytochrome c with monolayers of phosphatidylcholine, phosphatidic acid and cardiolipin."
- Rajagopal, B. S., G. G. Silkstone, P. Nicholls, M. T. Wilson and J. A. R. Worrall **2012**. "An investigation into a cardiolipin acyl chain insertion site in cytochrome c." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics 1817(5): 780-791.
- Rand, R. P. and S. Sengupta **1972**. "Cardiolipin forms hexagonal structures with divalent cations." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes 255(2): 484-492.
- Rivas, L., D. H. Murgida and P. Hildebrandt **2002**. "Conformational and Redox Equilibria and Dynamics of Cytochrome c Immobilized on Electrodes via Hydrophobic Interactions." The Journal of Physical Chemistry B 106(18): 4823-4830.
- Robinson, N. C. **1993**. "Functional binding of cardiolipin to cytochrome c oxidase." Journal of Bioenergetics and Biomembranes 25(2): 153-63.
- Ruzgas, T., L. Wong, A. K. Gaigalas and V. L. Vilker **1998**. "Electron Transfer between Surface-Confined Cytochrome c and an N-Acetylcysteine-Modified Gold Electrode." Langmuir 14(25): 7298-7305.
- Rytömaa, M. and P. K. J. Kinnunen **1995**. "Reversibility of the Binding of Cytochrome c to Liposomes." Journal of Biological Chemistry 270(7): 3197-3202.
- Rytömaa, M., P. Mustonen and P. K. Kinnunen **1992**. "Reversible, nonionic, and pH-dependent association of cytochrome c with cardiolipin-phosphatidylcholine liposomes." Journal of Biological Chemistry 267(31): 22243-8.
- Sagara, T., H. Murakami, S. Igarashi, H. Sato and K. Niki **1991**. "Spectroelectrochemical study of the redox reaction mechanism of cytochrome c at a gold electrode in a neutral solution in the presence of 4,4'-bipyridyl as a surface modifier." Langmuir 7(12): 3190-3196.
- Sagara, T., K. Niwa, A. Sone, C. Hinnen and K. Niki **1990**. "Redox reaction mechanism of cytochrome c at modified gold electrodes." Langmuir 6(1): 254-262.
- Salamon, Z. and G. Tollin **1991**. "Interfacial electrochemistry of cytochrome c at a lipid bilayer modified electrode: Effect of incorporation of negative charges into the bilayer on cyclic voltammetric parameters." Bioelectrochemistry and Bioenergetics 26(2): 321-334.
- Salamon, Z. and G. Tollin **1991**. "Reduction of cytochrome c at a lipid bilayer modified electrode." Bioelectrochemistry and Bioenergetics 25(3): 447-454.
- Salamon, Z. and G. Tollin **1996**. "Surface plasmon resonance studies of complex formation between cytochrome c and bovine cytochrome c oxidase incorporated into a supported planar lipid bilayer. I. Binding of cytochrome c to cardiolipin/phosphatidylcholine membranes in the absence of oxidase." Biophysical Journal 71(2): 848-857.
- Salamon, Z. and G. Tollin **1997**. "Interaction of horse heart cytochrome c with lipid bilayer membranes: effects on redox potentials." Journal of Bioenergetics and Biomembranes 29(3): 211-221.
- Salemme, F. R. **1977**. "Structure and Function of Cytochromes C." Annual Review of Biochemistry 46(1): 299-330.
- Sankaram, M. B., G. L. Powell and D. Marsh **1989**. "Effect of acyl chain composition on salt-induced lamellar to inverted hexagonal phase transitions in cardiolipin." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes 980(3): 389-392.
- Santucci, R., A. Faraoni, L. Campanella, G. Tranchida and M. Brunori **1991**. "Use of 'solid-state' promoters in the electrochemistry of cytochrome c at a gold electrode." Biochemical Journal 273 ( Pt 3): 783-6.

- Schlame, M., S. Brody and K. Y. Hostetler **1993**. "Mitochondrial cardiolipin in diverse eukaryotes. Comparison of biosynthetic reactions and molecular acyl species." European Journal of Biochemistry 212(3): 727-733.
- Schlame, M., L. Horvath and L. Vigh **1990**. "Relationship between lipid saturation and lipid-protein interaction in liver mitochondria modified by catalytic hydrogenation with reference to cardiolipin molecular species." Biochemical Journal 265(1): 79-85.
- Schlame, M., R. I. Kelley, A. Feigenbaum, J. A. Towbin, P. M. Heerdt, T. Schieble, R. J. A. Wanders, S. DiMauro and T. J. J. Blanck **2003**. "Phospholipid abnormalities in children with Barth syndrome." 42: 1994-1999.
- Schlame, M. and M. Ren **2009**. "The role of cardiolipin in the structural organization of mitochondrial membranes." Biochimica et Biophysica Acta 1788(10): 2080-3.
- Schlereth, D. D. and W. Maentele **1993**. "Electrochemically induced conformational changes in cytochrome c monitored by Fourier transform infrared difference spectroscopy: Influence of temperature, pH, and electrode surfaces." Biochemistry 32(4): 1118-1126.
- Seddon, J. M., J. Robins, T. Gulik-Krzywicki and H. Delacroix **2000**. "Inverse micellar phases of phospholipids and glycolipids. Invited Lecture." Physical Chemistry Chemical Physics 2(20): 4485-4493.
- Sinibaldi, F., L. Fiorucci, A. Patriarca, R. Lauceri, T. Ferri, M. Coletta and R. Santucci **2008**. "Insights into cytochrome c-cardiolipin interaction. Role played by ionic strength." Biochemistry 47(26): 6928-35.
- Sinibaldi, F., B. Howes, M. Piro, F. Polticelli, C. Bombelli, T. Ferri, M. Coletta, G. Smulevich and R. Santucci **2010**. "Extended cardiolipin anchorage to cytochrome c: a model for protein-mitochondrial membrane binding." Journal of Biological Inorganic Chemistry.
- Sinibaldi, F., B. D. Howes, M. C. Piro, T. Ferri, G. Smulevich and R. Santucci **2010**. "The cytochrome c-cardiolipin interaction: looking for a model of protein binding to the mitochondrial membrane." Febs Journal 277: 242-242.
- Song, S., R. A. Clark, E. F. Bowden and M. J. Tarlov **1993**. "Characterization of cytochrome c/alkanethiolate structures prepared by self-assembly on gold." The Journal of Physical Chemistry 97(24): 6564-6572.
- Sorice, M., A. Circella, I. M. Cristea, T. Garofalo, L. D. Renzo, C. Alessandri, G. Valesini and M. D. Esposti **2004**. "Cardiolipin and its metabolites move from mitochondria to other cellular membranes during death receptor-mediated apoptosis." Cell Death Differ 11(10): 1133-1145.
- Soudant, P., Y. Marty, J. Moal and J. F. Samain **1995**. "Separation of major polar lipids in *Pecten maximus* by high-performance liquid chromatography and subsequent determination of their fatty acids using gas chromatography." Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications 673(1): 15-26.
- Spooner, P. J. and A. Watts **1991**. "Reversible unfolding of cytochrome c upon interaction with cardiolipin bilayers. 1. Evidence from deuterium NMR measurements." Biochemistry 30(16): 3871-9.
- Stepanov, G., O. Gnedenko, A. Mol'nar, A. Ivanov, Y. Vladimirov and A. Osipov **2009**. "Evaluation of cytochrome c affinity to anionic phospholipids by means of surface plasmon resonance." FEBS Letters 583(1): 97-100.
- Stewart, J. M., J. A. Blakely and M. D. Johnson **2000**. "The interaction of ferrocytochrome c with long-chain fatty acids and their CoA and carnitine esters." Biochemistry and Cell Biology-Biochimie Et Biologie Cellulaire 78(6): 675-681.
- Su, L., F. M. Hawkrige and M. C. Rhoten **2004**. "Electroreduction of Oxygen by Cytochrome c Oxidase Immobilized in Electrode-Supported Lipid Bilayer Membranes." 1: 1281-1288.
- Szebeni, J. and G. Tollin **1988**. "Interaction of cytochrome c with liposomes: covalent labeling of externally bound protein by the fluorescent probe, azidonaphthalenedisulfonic acid, enclosed in the inner aqueous compartment of unilamellar vesicles." Biochimica et Biophysica Acta 932(1): 153-159.

- Taniguchi, I., K. Toyosawa, H. Yamaguchi and K. Yasukouchi **1982**. "Reversible electrochemical reduction and oxidation of cytochrome c at a bis(4-pyridyl) disulphide-modified gold electrode." Journal of the Chemical Society, Chemical Communications(18): 1032-1033.
- Teissie, J. **1981**. "Interaction of cytochrome c with phospholipid monolayers. Orientation and penetration of protein as functions of the packing density of film, nature of the phospholipids, and ionic content of the aqueous phase." Biochemistry 20(6): 1554-1560.
- Tuominen, E. K. J., C. J. A. Wallace and P. K. J. Kinnunen **2002**. "Phospholipid-Cytochrome c Interaction." Journal of Biological Chemistry 277(11): 8822-8826.
- Tyurina, Y. Y., V. Kini, V. A. Tyurin, I. I. Vlasova, J. Jiang, A. A. Kapralov, N. A. Belikova, J. C. Yalowich, I. V. Kurnikov and V. E. Kagan **2006**. "Mechanisms of Cardiolipin Oxidation by Cytochrome c: Relevance to Pro- and Antiapoptotic Functions of Etoposide." Molecular Pharmacology 70(2): 706-717.
- Ulman **1996**. "Formation and Structure of Self-Assembled Monolayers." Chemical Reviews (Washington, D. C.) 96(1): 1533-1554.
- van Gestel, R. A., P. J. Rijken, S. Surinova, M. O'Flaherty, A. J. R. Heck, J. A. Killian, A. I. P. M. de Kroon and M. Slijper **2010**. "The influence of the acyl chain composition of cardiolipin on the stability of mitochondrial complexes; An unexpected effect of cardiolipin in [alpha]-ketoglutarate dehydrogenase and prohibitin complexes." Journal of Proteomics 73(4): 806-814.
- Vasilenko, I., B. De Kruijff and A. J. Verkleij **1982**. "Polymorphic phase behaviour of cardiolipin from bovine heart and from *Bacillus subtilis* as detected by <sup>31</sup>P-NMR and freeze-fracture techniques. Effects of Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Ba<sup>2+</sup> and temperature." Biochimica et Biophysica Acta 684(2): 282-286.
- Vik, S. B., G. Georgevich and R. A. Capaldi **1981**. "Diphosphatidylglycerol is required for optimal activity of beef heart cytochrome c oxidase." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 78(3): 1456-1460.
- Vincent, J. S. and I. W. Levin **1986**. "Interaction of ferricytochrome c with cardiolipin multilayers: a resonance Raman study." Journal of the American Chemical Society 108(13): 3551-3554.
- Vladimirov, Y., E. Proskurnina, D. Izmailov, A. Novikov, A. Brusnichkin, A. Osipov and V. Kagan **2006**. "Mechanism of activation of cytochrome c peroxidase activity by cardiolipin." Biochemistry (Moscow) 71(9): 989-997.
- Watkins, S. M., L. C. Carter and J. B. German **1998**. "Docosahexaenoic acid accumulates in cardiolipin and enhances HT-29 cell oxidant production." The Journal of Lipid Research 39(8): 1583-1588.
- Yamaoka, S., R. Urade and M. Kito **1988**. "Mitochondrial Function in Rats Is Affected by Modification of Membrane Phospholipids with Dietary Sardine Oil." Journal of Nutrition 118(3): 290-296.
- Yeh, P. and T. Kuwana **1977**. "Reversible electrode reaction of cytochrome c." Chemistry Letters 6(10): 1145-1148-1145-1148.



## CHAPITRE 2 : PROTOCOLES – MISES AU POINT

### INTRODUCTION

Si beaucoup des techniques présentées dans ce chapitre sont issues des techniques et du savoir-faire du laboratoire quelques unes ont été novatrices et ont dues être mises au point au cours de la thèse. De fait, ce chapitre ne peut pas s'apparenter à un chapitre de matériel et méthodes classique. Comme souvent en recherche fondamentale, le chercheur est une sorte de pionnier et lors de la lente mise au point de ses expériences, il entrevoit souvent des applications complémentaires ou bien l'apparition d'une variable supplémentaire qui n'était pas prévue initialement. Dès lors, toute cette mise au point doit être, à mon sens, vue comme un travail de recherche à part entière et non comme un travail préliminaire dont on ne retiendra, une fois les paramètres expérimentaux optimisés, que l'image finale. Ainsi, je tiens aussi à présenter dans ce chapitre des résultats obtenus dans le cadre de cette mise au point des techniques d'analyse. Cela concerne aussi des extensions possibles pour des études futures. Ces deux types d'informations n'ont pas toujours leur place dans les publications scientifiques.

### TECHNIQUES EN CHIMIE DES LIPIDES

#### SEPARATION DES LIPIDES SUR MICROCOLONNE

Si plusieurs échantillons de phospholipides utilisés proviennent de distributeurs tels que Sigma-aldrich ou Avanti Polar Lipids, certains ont été obtenus directement à partir de tissus biologiques. Les techniques de purification des lipides utilisés dans le cadre de cette thèse sont celles utilisées en routine dans le laboratoire d'analyse de « Lipides en Milieu Vivant ».

La purification des phospholipides se fait en deux étapes. La première étape consiste à séparer les lipides totaux d'un broyat de tissus biologiques. Cette étape, qui est une extraction liquide-liquide est dérivée de la méthode d'extraction de Folch (Folch et al. 1957). Les lipides sont extraits des tissus par une solution de chloroforme/méthanol (2 :1 v/v). Après avoir récupéré la phase organique, 0.01% massique de butyl

hydroxytoluène (BHT) est ajouté comme antioxydant. La solution-mère de lipides totaux obtenue est conservée à -20°C.

La deuxième étape consiste à extraire des lipides totaux uniquement les lipides polaires et dans notre cas spécifiquement le cardiolipide. On utilise pour cela une extraction en phase solide sur une microcolonne de silice (Marty et al. 1992).

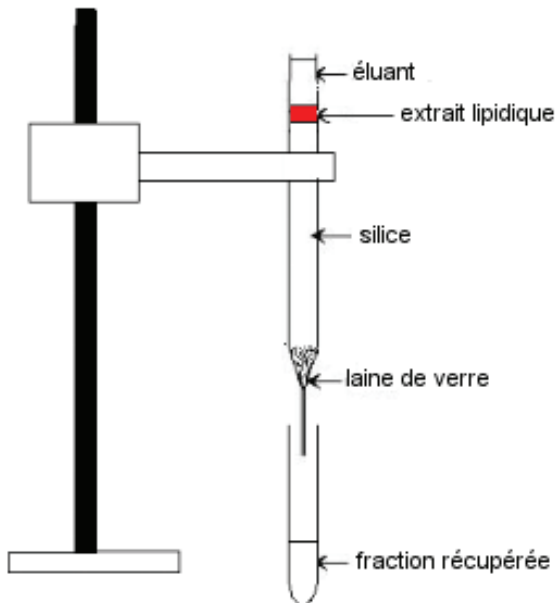


Figure 2.1 : Montage utilisé pour la purification des phospholipides.

La micro colonne (30x5mm) est composée de silice Kiesegel Merck 70-230 mesh, préalablement chauffée à 450°C et partiellement désactivée avec de l'eau en proportion de 6% massique (Figure 2.1). Un échantillon lipidique dissous dans du chloroforme est déposé en tête de colonne. Des éluations successives présentant un gradient de polarité du solvant permettent de « décrocher » les différentes classes de lipides de l'extrait. Les lipides neutres sont élués en premier avec un mélange 98:2  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  qui est très peu polaire. L'augmentation de la quantité de MeOH permet d'augmenter la polarité de l'éluant et de contrôler la migration des espèces lipidiques polaires. Parmi les différentes classes de phospholipides, qui sont tous des lipides polaires, la nature de la tête polaire détermine principalement la polarité de la molécule. La nature des chaînes grasses a un impact mineur. La fraction contenant du CL est récupérée par l'utilisation d'un mélange  $\text{CHCl}_3 : \text{MeOH}$  au ratio de 90:10.

---

## EXTRACTION DES PHOSPHOLIPIDES PAR LA TECHNIQUE DE « BLIGH AND DYER »

A l'origine cette méthode a été mise au point afin d'économiser la consommation de solvant par rapport à la méthode d'extraction de Folch. C'est un protocole d'extraction des lipides issus de tissus biologiques mais la méthode peut être appliquée pour l'extraction de lipides d'un milieu réactionnel ou d'une plaque de TLC comme on le verra plus loin dans ce chapitre. Cette méthode d'extraction des lipides est basée sur le coefficient de partage des molécules lipidiques entre une phase aqueuse et une phase organique composée de chloroforme et de méthanol (Bligh and Dyer 1959). Concrètement, deux volumes de méthanol et un volume de chloroforme sont ajoutés à un extrait lipidique contenant déjà de l'eau. Le milieu monophasique est homogénéisé par agitation mécanique. Puis un volume d'eau (pouvant contenir des sels comme NaCl ou KCl en cas d'extraction difficile) et un volume de chloroforme supplémentaire mènent à l'apparition d'un milieu biphasique. Après décantation, la phase organique inférieure contenant les phospholipides est récupérée. La phase aqueuse est lavée deux fois par un volume équivalent de chloroforme. Les phases organiques sont réunies en une seule qui est évaporée sous flux d'azote et reprise dans un volume défini de chloroforme/méthanol (98:2 v/v).

---

## TECHNIQUES EN TLC :

---

### CARACTERISATION DE PHOSPHOLIPIDES EN TLC

La TLC (Thin Layer Chromatography ou CCM Chromatographie sur couche mince) utilise une fine plaque d'aluminium recouvert d'environ 0.2 mm de silice. La migration d'un solvant (phase mobile) entraîne les composés à analyser. C'est tout d'abord une méthode d'analyse des classes de phospholipides dans notre cas. Les supports de TLC utilisés sont des feuilles d'aluminium de 12x12cm recouvertes de gel de silice 60 (Merk 5582) avec présence d'une zone de préconcentration. La migration des espèces est effectuée avec un mélange  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$  en proportion volumique 65/35/4.



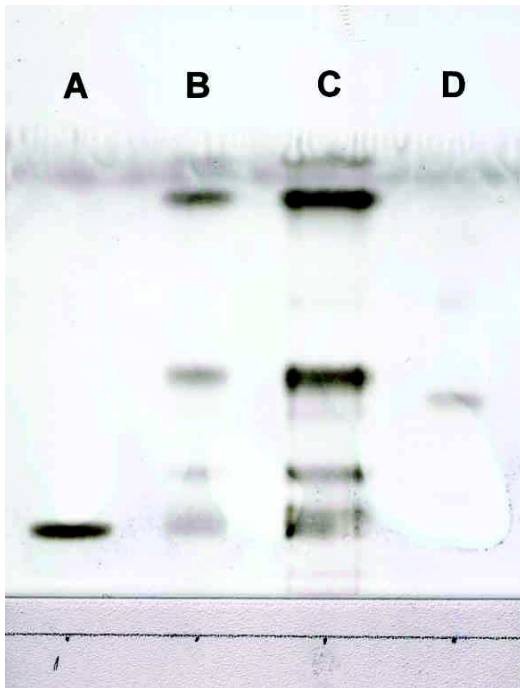


Figure 2.2 : TLC d'un standard PC Soy bean (A), Extrait de lipides totaux de bivalves (B et C) et d'un standard CL mammifère (D). Révélation au cuivre/acide phosphorique.

La plaque de TLC peut être révélée par différentes méthodes. La méthode la plus commune est celle au cuivre / acide phosphorique. La plaque est immergée 5 secondes dans une solution à 3% (w/v) de  $\text{CuSO}_4$  et 8%  $\text{H}_3\text{PO}_4$ . La plaque est ensuite chauffée à  $150^\circ\text{C}$  pendant 15mn. Des spots bruns révèlent la présence de carbone sur la silice. La présence d'insaturations sur les chaînes grasses des lipides augmente l'intensité de ces spots. Il faut savoir que cette technique est limitée dans le cas de l'utilisation de lipides possédant des AGs faiblement insaturés (14:0, 16:0, 18:1). . Cela est particulièrement gênant dans le cas de l'utilisation de phospholipides à chaînes uniquement saturés ou dans le cas de lysophospholipides car les positions sn1 des phospholipides sont généralement constituées de chaînes saturées (Vance et al. 1996).

Une autre technique moins connue consiste à vaporiser de l'eau sur la plaque. La nature hydrophobe de certains phospholipides va repousser l'eau et on peut alors nettement visualiser des spots de migration sous la forme de tâches blanches sur un fond translucide. Cette méthode de révélation peut être complémentaire à la révélation au cuivre. L'expérience présentée en Figure 2.3 est pertinente quand à la nécessité d'avoir des méthodes de révélation complémentaires. Un échantillon de PG de jaune d'œuf (Egg yolk) est bien visible avec une révélation au cuivre grâce à la présence de chaînes 18:2. La présence de la forme lyso (déacylée) n'est pas révélée par la méthode au cuivre. A contrario, la révélation à l'eau permet de distinguer la présence de la forme lyso pour cet échantillon.

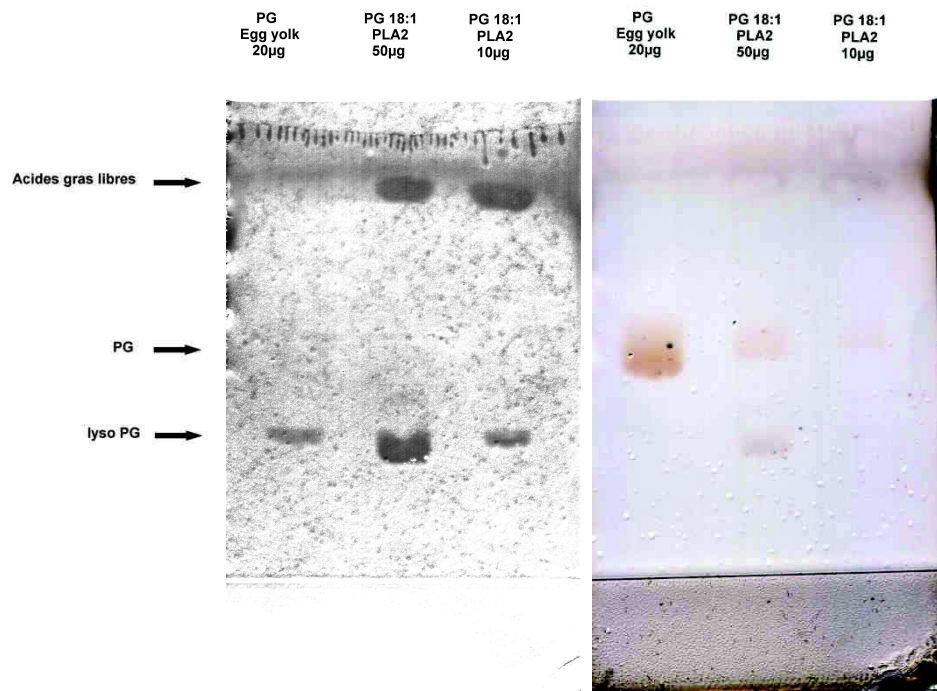


Figure 2.3 : TLC d'une PG Egg yolk (chaînes 30% 18:1, 30% 16:0 et 20% 18:2) et de PG 18 :1 traitée avec une Phospholipase A2. A gauche : Révélation à l'eau. A droite : Révélation au cuivre/acide phosphorique.

## DOSAGE DE PHOSPHOLIPIDES EN TLC

Dans le cas d'une révélation au cuivre, l'analyse densitométrique des spots permet une quantification des phospholipides révélés (Fuchs et al. 2011). Par le logiciel Image J, les bandes de migration sont intégrées pour obtenir un profil de migration (Figure 2.4). De ce profil, l'intégration sous les pics peut être directement corrélée à la quantité de lipides déposés sur la plaque.

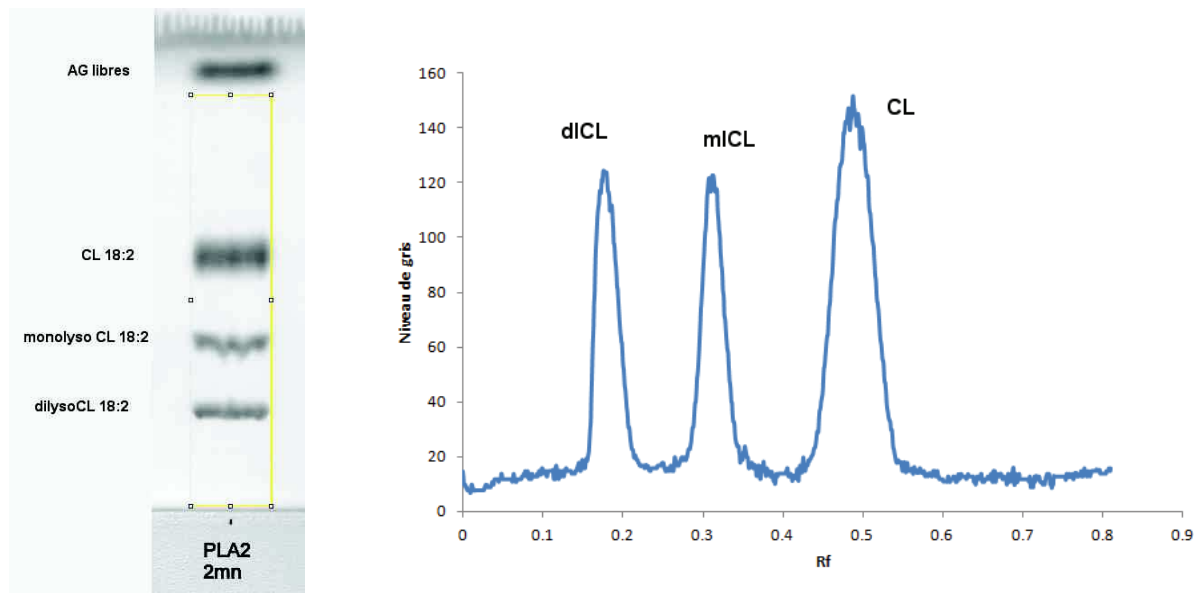


Figure 2.4 : Traitement d'image d'une série de bandes de migration sur TLC (à gauche). Le profil de migration résultant (à droite) permet d'identifier les pics densitométriques de dilysoCL (dICL), de monolysoCL (mICL) et le CL.

Le dosage par TLC requiert la réalisation d'un étalonnage pour chaque classe de phospholipide. Il faut également s'assurer de rester entre les quantités minimum (seuil de détection) et maximum (saturation de la révélation) de dépôt de phospholipides sur la plaque de TLC. Avec ces précautions, la linéarité de la réponse est généralement satisfaisante pour une estimation rapide de la concentration du lipide sans passer par la technique de la CPG (chromatographie gazeuse) présentée plus loin (Figure 2.5).

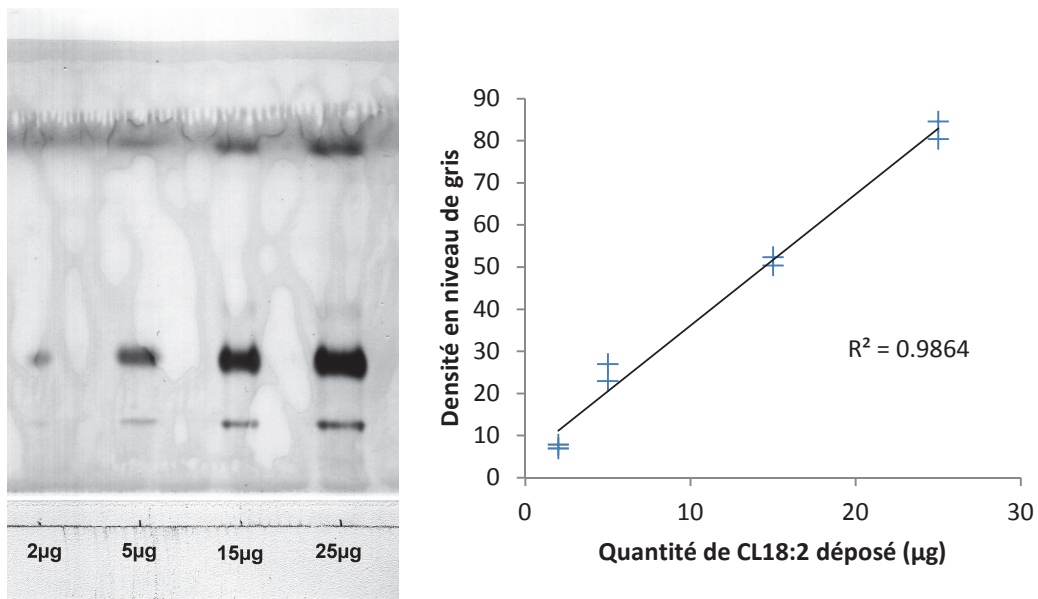


Figure 2.5 : Expérience de dosage du CL 18:2 par analyse densitométrique.

## PURIFICATION DE PHOSPHOLIPIDES EN TLC

La dernière utilité de la technique de TLC concerne la purification des phospholipides. Chaque bande de migration peut être découpée directement sur la plaque de TLC. Les fractions de TLC sont mises en présence d'eau afin de désactiver la silice. Une extraction classique de type « Bligh and Dyer » peut alors être réalisée afin d'extraire les phospholipides de la silice.

La TLC est une technique qui permet à la fois de caractériser, purifier et doser les phospholipides. Cette polyvalence s'obtient toutefois au prix de la précision de la mesure. La technique de purification par microcolonne est plus rapide et permet d'utiliser de plus grande quantité de lipides. De même, si la TLC permet d'estimer la concentration d'un échantillon, seule la CPG permet de doser de manière précise un contenu en AG.

## CPG (CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZ) :

La chromatographie gazeuse permet de doser et de caractériser les acides gras d'un échantillon lipidique en les convertissant en méthyl-esters d'acides gras (Figure 2.6). Le protocole complet est décrit par Marty et al. (Marty et al. 1992). Un échantillon comprenant idéalement entre 1 et 20 µg de phospholipides est évaporé à sec

dans un tube en verre de 7 mL. Les chaînes grasses sont transméthylées avec 0.8 mL de MeOH/BF<sub>3</sub> à 14% (w/w) pendant 10 mn au bain-marie à 100°C. Ce protocole de transméthylation est dérivé de la technique initialement décrite par Metcalfe (Metcalfe and Schmitz 1961).

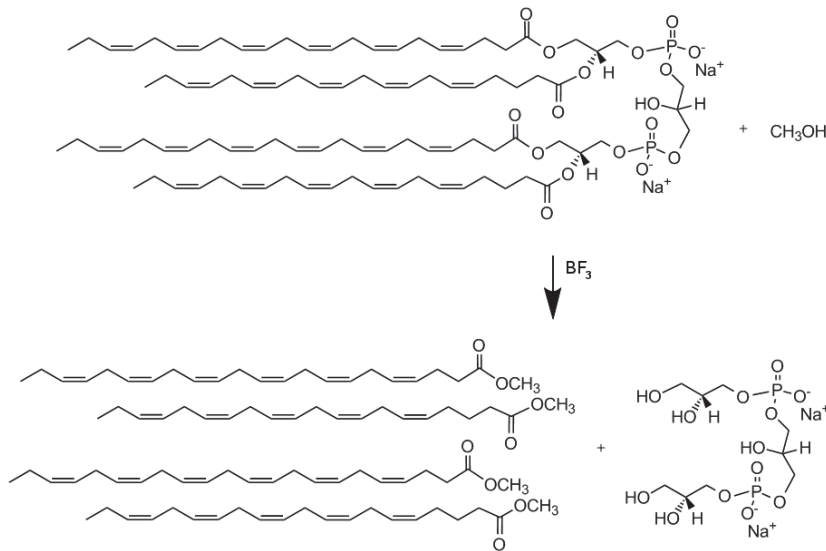


Figure 2.6 : Principe de réaction de la transméthylation avant l'injection en chromatographie gazeuse.

Après refroidissement, l'ajout de 1.5 mL d'eau et de 0.8 mL d'hexane forme deux phases dont la phase supérieure d'hexane contient les méthyl-esters d'acides gras produits. Cette phase organique est lavée deux fois à l'eau distillée. Lors du dernier lavage, l'échantillon est congelé à -20°C afin de pouvoir récupérer uniquement l'hexane qui reste sous forme liquide. Les échantillons sont ensuite évaporés sous flux d'azote et repris dans un volume prédéfini en vue de l'injection en CPG.

La CPG est une Agilent modèle 6965. Elle est composée d'un passeur d'échantillon thermostaté, de deux colonnes Chrompack de type polaire (CPSil 52) et apolaire (CPSil 8) avec le dihydrogène (H<sub>2</sub>) comme phase mobile. Deux détecteurs à ionisation de flamme (FID) permettent la détection des méthyl-esters d'acides gras.

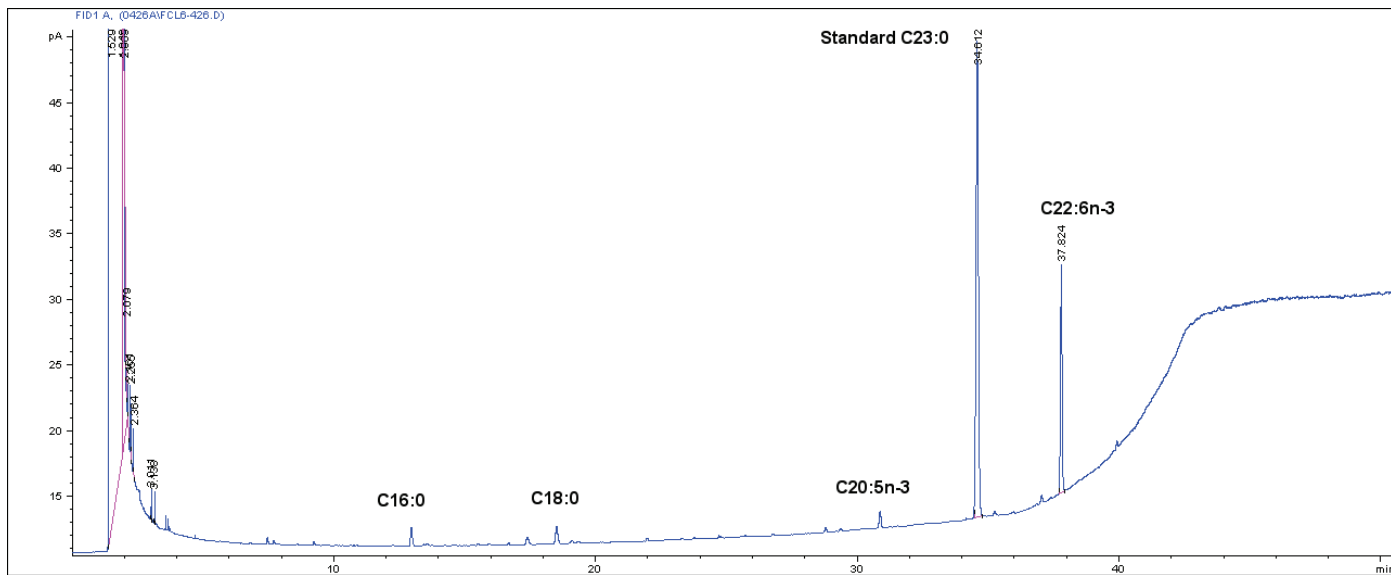


Figure 2.7 : Chromatogramme d'AG issu du cardiolipide de *Pecten maximus*.

Un étalon interne, le C23:0 est rajouté aux échantillons afin de quantifier les pics de méthyl-ester d'acides gras (Figure 2.7). L'identification des pics est obtenue par comparaison avec des standards dont la composition en acides gras est connue.

---

## SYNTHESE DE VARIANTS MOLECULAIRES

---

### SATURATION D'ACIDES GRAS

Afin de tester l'hypothèse de l'implication des insaturations des chaînes grasses du CL pour les interactions lipides – protéines, un protocole d'hydrogénation de ces insaturations a été mis au point. La réduction catalytique des doubles liaisons présentes sur les chaînes du CL a été réalisée en présence de dihydrogène et d'un catalyseur au Palladium (Figure 2.8).

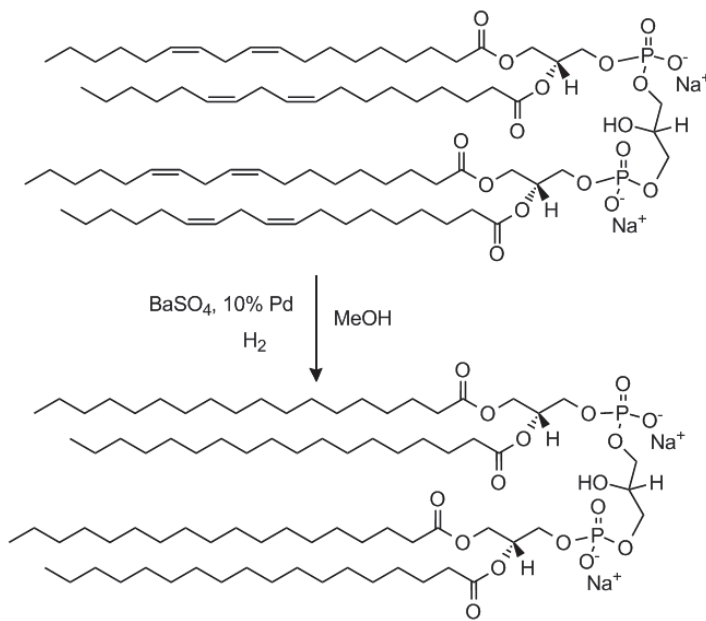


Figure 2.8 : Réaction d'hydrogénation sur le CL 18:2

Le montage expérimental est composé d'un réacteur en verre d'environ 3mL relié à un réseau pressurisé de dihydrogène et à une source de vide par l'intermédiaire d'un robinet trois voies. Un extrait (50 à 500µg) de CL 18:2 dissous dans 500µL de méthanol et un catalyseur type sulfate de Barium contenant 10% de palladium (Merk) sont introduits dans le réacteur. Trois cycles de purge / introduction de dihydrogène suffisent alors généralement à faire virer la couleur du catalyseur de brun à noir, signe que l'hydrogénation est complète.

L'extrait méthanolique est ensuite filtré et extrait selon la méthode de « Blish and Dyer » puis purifié par microcolonne. Pour vérifier la bonne hydrogénation des insaturations, un extrait de la solution de CL 18:0 obtenue est transméthylé et passé en CPG pour quantification de la quantité de CL 18:0 obtenu.

## OBTENTION DES FORMES LYSO DE PHOSPHOLIPIDES

Les phospholipides possèdent deux sites d'accroche pour leurs chaînes grasses selon leur position sur le squelette glycérol (positions sn1 et sn2). On appelle les phospholipides ayant perdu une chaîne grasse en sn1 ou sn2 les lysophospholipides.

L'obtention de formes déacylées de phospholipides est souvent compliquée. Outre le fait que certains fabricants proposent ces lipides à la vente environ 20 fois plus cher que le prix du lipide non modifié, seul un faible choix de types moléculaires de lyso-phospholipides est proposé. La mise au point d'une méthode a donc été

nécessaire afin d'obtenir ces variants moléculaires de type lysophospholipides. L'utilisation d'une enzyme qui catalyse naturellement cette réaction a été employée. La phospholipase A2 (PLA2) est une grande famille d'enzyme catalysant la coupure des chaînes grasses spécifiquement en position sn2 des phospholipides (Figure 2.9).

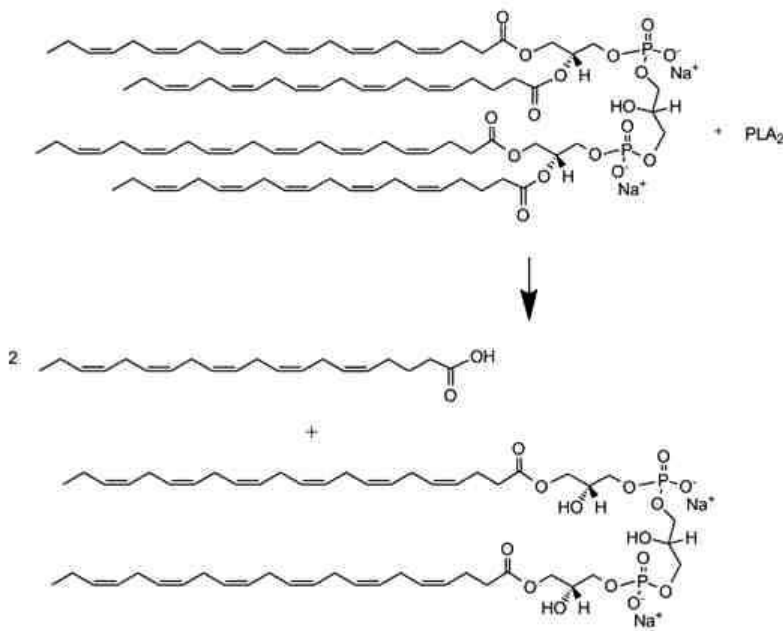


Figure 2.9 : Principe de la réaction de la PLA2 sur les positions sn2 du CL 22:6n-3/20:5n-3. Le produit de la réaction est deux AG 20:5n-3 et un diacylo CL 22:6n-3.

Sa réaction complète sur la classe de CL aboutit à la formation d'un diacylocardiolipide (Figure 2.9). Les travaux de Heo (Heo et al. 1997), Sedlak (Sedlak and Robinson 1999) et Tyurin (Tyurin et al. 2006) ont permis d'avoir un point de départ pour définir les conditions de réaction comme la nature du tampon, le pH, les activateurs/inhibiteurs utilisés.

Brièvement, 100 à 500µg de lipides sont évaporés à sec et mis en présence d'1mL d'une solution tampon 100 mM TRIS/TRIS-HCl, pH 8, avec 1 mM de  $\text{Ca}^{2+}$ . Le calcium est ici utilisé comme activateur de la PLA2. En effet, la modulation de l'activité de la famille de PLA2 intracellulaires cytosoliques est directement liée à la présence de calcium. Ici l'enzyme utilisée (P233 Sigma-aldrich – Phospholipase A2 from *Porcine pancreas*) est très dépendante du calcium. L'ajout de 1U (unité enzymatique permettant la catalyse de 1 µmol de réactif par minute) de PLA2 au milieu a été démontré comme suffisant pour la quantité de lipide donnée. Une agitation vigoureuse à température ambiante permettra à la fois d'obtenir une émulsion des lipides dans le solvant aqueux et ainsi permettre l'accès



de la PLA2 à son substrat. Il a été observé que la vitesse de réaction est dépendante du type de lipide utilisé (sa classe et ses chaînes). La réaction est stoppée en rajoutant 50  $\mu$ L d'EDTA 0.1 M (5 mM conc.finale) qui a pour effet de chélater les ions calcium et inhiber ainsi la PLA2. Les lipides sont ensuite extraits par la méthode de « Bligh and Dyer ». La caractérisation des phospholipides peut idéalement être réalisée par TLC. Ci-dessous, une TLC de l'action de la PLA2 pour différents temps de réaction sur un CL 18:2n-6 (Figure 2.10).

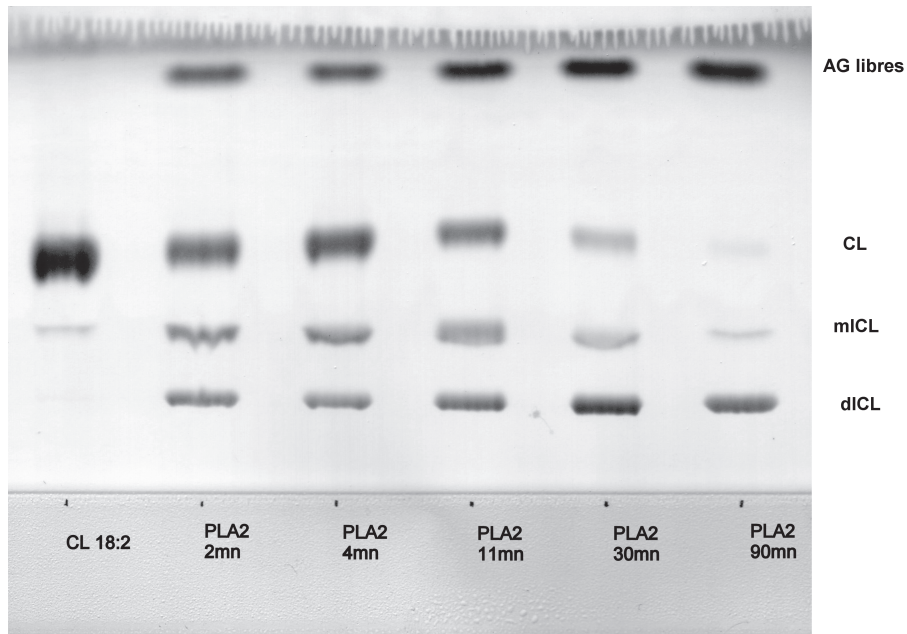


Figure 2.10 : TLC de réaction de la PLA2 sur du CL 18:2. mICL : monolysoCL, dICL : dilysocL.

On remarque pour le standard CL 18:2 une légère présence de monolysoCL. La bande de migration supérieure correspond aux acides gras libres générés lors de la réaction de la PLA2. Après 1h30 de réaction, la quasi-totalité des 100  $\mu$ g de CL ont donné du dilysocL.

## PREPARATION DE L'ÉLECTRODE MODIFIÉE

## EQUIPEMENT ELECTROCHIMIQUE

La cellule électrochimique utilisée repose sur un modèle à trois électrodes (Figure 2.11). Par rapport à un montage à deux électrodes, le rôle de la troisième électrode ou contre-électrode est de permettre l'établissement d'un courant électrochimique sans que celui-ci n'ait à traverser l'électrode de référence. Ainsi l'électrode de référence reste stable (absence de réactions internes). Ce type de montage permet également de limiter l'influence de la chute ohmique sur la réponse courant-potentiel.

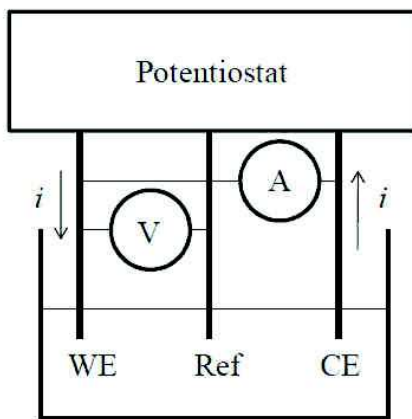


Figure 2.11 : Montage à trois électrodes. WE : électrode de travail, Ref : électrode de référence, CE : contre-électrode.

Deux cellules électrochimiques en verre et en quartz ont été utilisées pour les mesures. Elles sont toutes les deux thermostatées avec un Thermostat Lauda A103. L'électrode de travail utilisée est une électrode de carbone vitreux Metrohm de 0.071 cm<sup>2</sup> de surface. La contre électrode est un fil de platine (Radiometer) et l'électrode de référence est une électrode au calomel saturé Metrohm (SCE). Les mesures électrochimiques ont été effectuées sur trois potentiostats/galvanostats différents au cours de la thèse :

- Metrohm-Autolab PGSTAT12 avec option Scangen
- Metrohm-Autolab PGSTAT302N avec module d'impédance
- BioLogic SP-200

Le logiciel d'acquisition des données utilisé dépend du potentiostat utilisé. Il s'agit de GPES (PGSTAT 12), FRA (PGSTAT 12), Nova (PGSTAT 30) ou de EC-Labs (SP-200).

## DESCRIPTION DE LA TECHNIQUE

L'électrode de carbone vitreux est modifiée par spin-coating (cf Chapitre 1) d'une monocouche de phospholipides. Les phospholipides ont la particularité d'avoir à la fois un caractère hydrophobe (chaînes grasses) et hydrophile (tête polaire). En présence d'un solvant fortement polaire comme l'eau et de par la nature hydrophobe de la surface de carbone, les phospholipides ainsi déposés s'autoarrangent pour présenter leur tête polaire vers la solution aqueuse et leur queue apolaire vers la surface de carbone qui est hydrophobe.

Une électrode de carbone vitreux (GC) est polie avec de l'alumine de grain 0.3  $\mu\text{m}$  ou 0.04  $\mu\text{m}$  jusqu'à l'obtention d'une finition miroir. L'électrode est rincée à l'eau distillée. Puis, trois étapes de sonication de 2 mn chacune dans de l'eau distillée, de l'acétone (HPLC grade) et de l'eau distillée respectivement permettent d'obtenir une surface de carbone homogène et propre (voir [Figure 2.13](#)).

Plusieurs gouttes de lipides dissous dans du chloroforme (concentration entre 0.1 et 1  $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ ) contenant 0.05% de BHT (antioxydant) sont déposées à la surface de l'électrode. Puis l'électrode est placée sur un portoir tournant à une vitesse de 500-1000  $\text{tr mn}^{-1}$  afin d'assurer une évaporation complète et un recouvrement homogène du dépôt. Compte tenu des faibles volumes de  $\text{CHCl}_3$  déposés à la surface de l'électrode, l'évaporation totale de la solution de lipides déposée prend environ une minute. Pour les études comparatives où certains lipides à longues chaînes polyinsaturés sont utilisés (chaînes 20:5n-3 ou 22:6n-3), le dépôt de la solution de lipide est réalisé sous une cloche dégazée à l'Argon ou au diazote ( $\text{N}_2$ ) car ce type de chaîne grasse fortement polyinsaturée est connue pour sa susceptibilité à s'oxyder facilement en présence d'oxygène (Cho et al. 1987).

Ensuite, l'électrode subit un traitement thermique. Celui-ci consiste à plonger l'électrode en rotation (1000-2500  $\text{tr mn}^{-1}$ ) dans une solution tamponnée (tampon TRIS 20mM pH7, 20mM KCl et 1mM EDTA) portée à une température donnée (de 30 à 45°C selon la nature des lipides). Ce traitement thermique a plusieurs fonctions. L'environnement aqueux permet l'autoarrangement nécessaire des lipides déposés pour obtenir une monocouche stable et répétable ([Figure 2.12](#)). Egalement, ce traitement permet de s'assurer que toutes les préparations lipidiques sont dans un état « liquide cristalin » lors de cet auto-arrangement. Cet état physique des phospholipides est déterminant lors de la formation de la monocouche ou de la bicouche (Tamm and McConnell 1985). Les lipides ayant des températures de transition de phase très basses comme le CL 14:0, le CL 18:0 ou la PC 22:0 ne sont pas dans cette phase « gel-cristalin » lors du dépôt. Les études de Tamm sur différentes PC (PC 14:0, PC 16:0 et PC 18:1n-9) pointent une forte dépendance à la température sur la formation d'une bicouche sur une surface d'oxyde de silicium (Tamm and McConnell 1985). Cette étape de traitement thermique est détaillée dans les sections suivantes.

L'électrode modifiée ainsi créée est transférée dans une cellule électrochimique à trois électrodes contenant une solution de cyt *c* solubilisé dans un tampon TRIS 20mM à pH 7, 20mM de KCl et 1mM d'EDTA. Nous avons utilisé un tampon phosphate pour nos premiers essais. Cependant, de par un possible effet de médiation du transfert électronique du cyt *c* par des anions phosphates (Szucs and Novak 1995; Boussaad et al. 1997), nous avons préféré utiliser un tampon TRIS. Le KCl est ajouté afin d'augmenter la conductivité de la solution (diminution de la chute ohmique). La faible molarité du tampon et de l'électrolyte support est justifiée par le fait que la cinétique d'accroche du cyt *c* sur une électrode modifiée est fortement dépendante de la force ionique (Szucs and Novak 1995). L'EDTA est utilisé pour éviter les problèmes liés à la présence de trace de cations divalents. En effet, ces derniers interagissent fortement avec le CL (Iverson and Orrenius 2004; Huang et al. 2006).

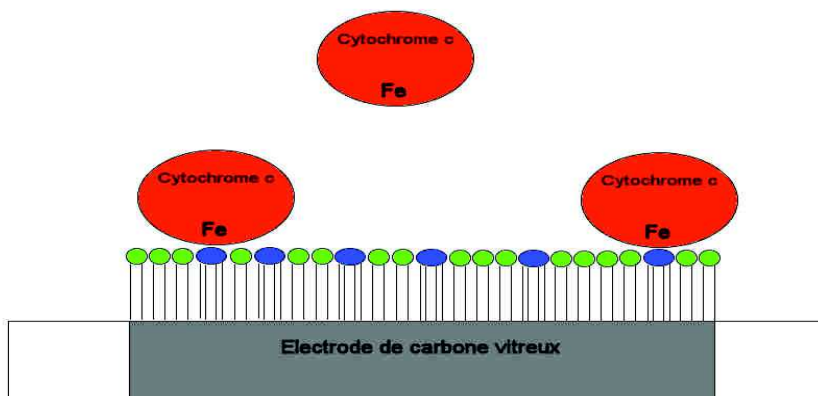


Figure 2.12 : Schéma de l'électrode modifiée. Mélange de PC (vert) et de CL (bleu) formant une monocouche sur une électrode de carbone.

Cette première cellule a pour fonction de pouvoir visualiser l'adsorption de cyt *c* à la surface de l'électrode. La cinétique d'adsorption peut être mesurée par des balayages successifs en voltamétrie cyclique (CV). Le signal (courant) observé a plusieurs origines : il a une composante liée au cyt *c* immobilisé directement sur l'électrode. Ce cyt *c* ne quitte pas la proximité de l'électrode. Il y a également une deuxième composante liée à une forme « libre » de cyt *c* en solution. Cette promotion électrochimique du cyt *c* « libre » est due à la modification de la surface de GC. L'électrode de GC modifiée ne dénature plus les protéines à sa surface. Le cyt *c* électroactif « libre » ne s'adsorbe pas sur l'électrode. Ces différentes formes de cyt *c* électroactifs sont détaillées dans le chapitre 3 et 4.

Après avoir atteint une adsorption maximale de cyt *c* visualisée par le courant de pic en CV, l'électrode est transférée dans une deuxième cellule électrochimique dont les propriétés physicochimiques (pH, force ionique, température) sont identiques mais qui est dépourvue de cyt *c* en solution.

Une perte du signal électrochimique (courant) du cyt *c* est observée lors de ce transfert. Il correspond d'une part au cyt *c* électroactif par médiation qui ne reste pas accroché à l'électrode lors du transfert. Il correspond également à une perte liée au lavage de l'électrode effectué lors du transfert de cellule électrochimique. Le cyt *c* électroactif analysé dans la deuxième cellule électrochimique provient donc uniquement de protéines adsorbées sur la surface de l'électrode modifiée.

La mise au point de cette technique a abouti à la rédaction d'un article présenté dans le chapitre 3.

---

#### CHOIX DE LA QUANTITE DE LIPIDES DEPOSES :

Calculer le nombre de lipides nécessaires au recouvrement total d'une surface de GC polie est difficile. En effet, une surface de GC comporte toujours un facteur de rugosité qui donne une surface réelle plus grande que sa surface géométrique. De plus, le réarrangement des lipides dépend de nombreux facteurs qui sont difficiles à contrôler.

Toutefois, un calcul théorique permet ici de se donner une idée de la quantité théorique de lipides nécessaires pour un recouvrement en monocouche d'une électrode de GC de 0.071 cm<sup>2</sup>.

Vu perpendiculairement au plan de l'électrode, les têtes polaires sont assimilées à des cercles organisés en réarrangement hexagonal compact. L'encombrement varie en fonction des classes de lipides utilisés et on peut associer des surfaces d'encombrement pour la PC et le CL de l'ordre de grandeur suivant (Aguayo et al. 2012; Hanske et al. 2012) :

- CL : 71 Å<sup>2</sup>
- PC : 70 Å<sup>2</sup>

Rapporté à la surface (géométrique) de l'électrode, cela donne un nombre de mole d'environ 10 picomoles de PC et 2.5 picomoles de CL pour un mélange PC-CL 80:20 en ratio mol:mol. Cela équivaut à une masse de lipides totale d'environ 14 ng théorique pour un recouvrement complet de l'électrode.

En pratique, la quantité de lipide déposée est plus importante (de l'ordre de 100-1000 ng). Plusieurs facteurs peuvent expliquer cette différence. Premièrement, certains lipides vont combler les imperfections de la surface de GC et par ailleurs, la surface réelle de l'électrode est supérieure à sa surface géométrique. Le dépôt d'un surplus de lipide permet de s'assurer du recouvrement complet de l'électrode. L'hypothèse avancée dans le cadre de ces travaux de mise au point est que le surplus lipidique est éliminé lors de la rotation de l'électrode au moment du dépôt et également lors du traitement thermique imposé à l'électrode lors de cette étape. Ce traitement thermique est supposé être impliqué dans la bonne réorganisation de la structure lamellaire du dépôt lipidique. Lors du traitement thermique, le passage à un état de transition dit « cristal – liquide » provoque un « étalement » des phospholipides dû à l'augmentation des forces latérales intramembranaires (Chapitre 1). On peut alors supposer que le surplus de lipide se localise sur la surface de téflon adjacente.

Le traitement thermique est également nécessaire dans le cas d'utilisation de lipides dont la température de transition de phase est basse comparée à la température ambiante.

---

## CARACTERISATION DE L'ELECTRODE MODIFIEE

---

### PAR AFM

L'AFM (Microscopie à force atomique) a été utilisée en vue de caractériser par microscopie à l'échelle nanométrique l'état de surface de notre électrode modifiée. L'élément principal est une pointe fine de forme pyramidale supporté par un levier, ou cantilever, que l'on nomme sonde AFM. Par l'intermédiaire d'un système piézoélectrique la sonde AFM peut être déplacée sur l'échantillon suivant les trois directions de l'espace. La pointe peut également être mise en régime d'oscillation forcée (à une fréquence proche de la fréquence de résonance du levier) par excitation du levier grâce à un système piézoélectrique. La détection par un système de photodiodes, de la réflexion d'un faisceau laser focalisé sur la face arrière du levier permet de suivre les mouvements du faisceau laser associés aux déflexions du levier.

L'image résultante donne la topographie de l'échantillon (Figure 2.13).

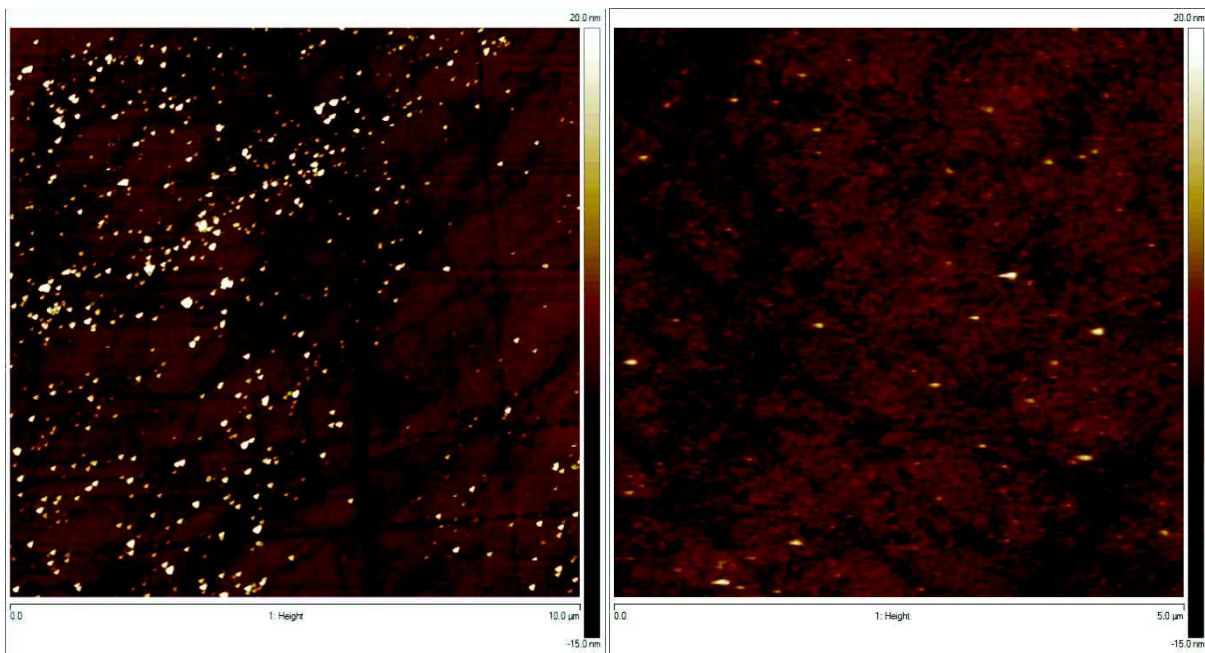


Figure 2.13 : Exemple d'AFM d'une surface de GC nue polie à 3 $\mu\text{m}$  et lavée une fois à l'eau distillée (gauche) et polie à 0.3 $\mu\text{m}$  avec 3 lavages successifs (droite).

L'appareillage utilisé est un Nanoscope Multimode V (Veeco Digital Instruments). L'acquisition des données est faite en mode "contact" avec des sondes AFM en silice (TAP150, Veeco). Les vitesses de balayage sont de l'ordre de 10-50  $\text{mm s}^{-1}$ . L'acquisition est réalisée à température ambiante. La pointe AFM est positionnée sur un cantilever MPP12100 (Nanodevices) dont la fréquence de résonance est d'environ 20 KHz. Le signal correspondant à l'erreur d'amplitude peut être considéré comme la dérivée de l'image topographique par rapport à la composante horizontale (vitesse de balayage). Les images résultantes appelées « Images d'amplitude » sont assimilables à une image topographique en fausses ombres (éclairage par la droite) et permettent généralement de mieux apprécier le relief d'une surface (Figure 2.14).

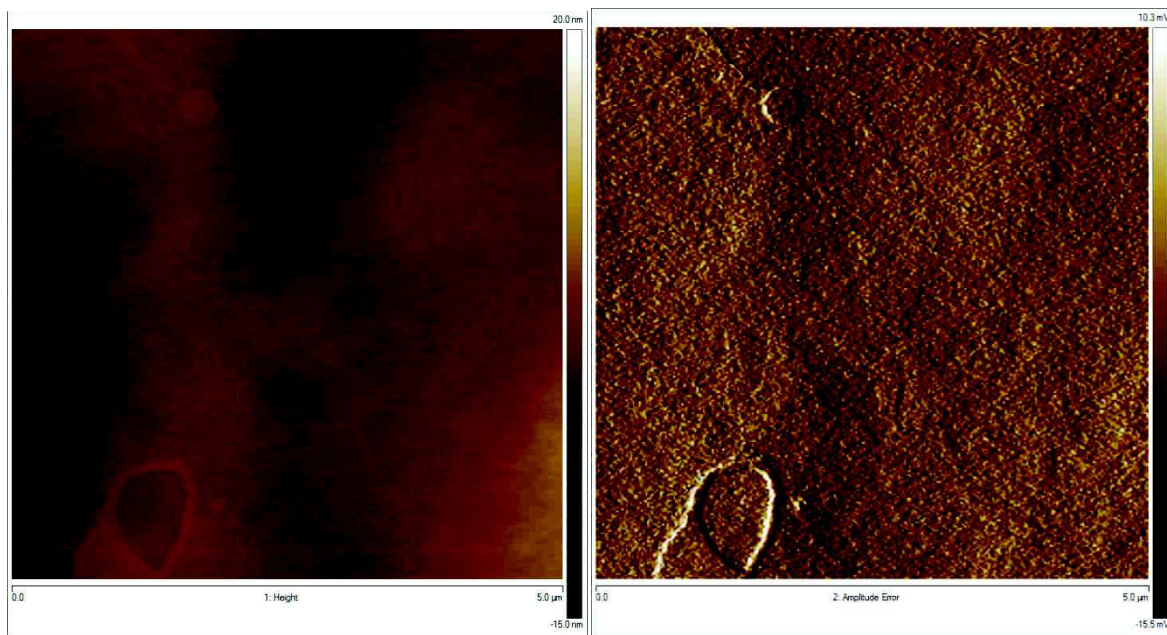


Figure 2.14 : Image topographique (gauche) et image d'amplitude (droite) d'une surface de carbone recouverte par une monocouche de lipides.

Il existe un paramètre autre que la topographie de la surface disponible par ces mesures AFM. Lors de l'approche de la pointe AFM sur la surface à étudier, la réponse plus ou moins élastique du milieu peut être mesurée. La nature dure ou molle du support va influencer sur la phase de l'oscillation de la sonde AFM. On peut visualiser ce paramètre avec l'image de phase (Figure 2.15).



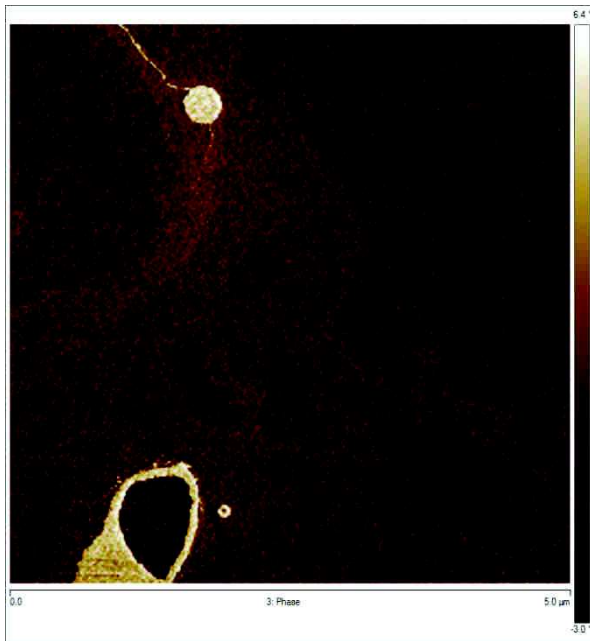


Figure 2.15 : Image de phase d'une surface de GC recouverte d'un film lipidique PC/CL 80/20.

Dans certaines conditions, l'image de phase permet de visualiser des zones dont les propriétés mécaniques sont différentes. Dans la Figure 2.15, les structures visualisées dans les zones claires sont caractérisées par une nature plus molle que le film lipidique adjacent. Nous pouvons supposer que l'on visualise ici une couche de phospholipide supplémentaire au film lipidique sous-jacent.

---

## PAR CV : VOLTAMETRIE CYCLIQUE

La voltamétrie cyclique est généralement la première technique utilisée en électrochimie pour visualiser rapidement le comportement électroactif d'un composé. Une rampe de potentiel est appliquée sur le système électrochimique. Elle est caractérisée par ses bornes minimum et maximum en potentiel ainsi que par sa vitesse de balayage (en  $V s^{-1}$ ). Le courant mesuré entre l'électrode de travail et la contre électrode peut être décomposé en deux parties : un courant capacitif lié à l'existence d'une double couche à l'interface électrode - électrolyte et un courant faradique dû à une réaction d'oxydoréduction (transfert d'électrons à l'interface).

L'aller et le retour de la rampe de potentiel permet de séparer le comportement du composé d'intérêt en réduction et en oxydation. L'aire sous les pics, le potentiel à demi-pic, l'écart entre les pics de réduction et

d'oxydation sont autant de paramètres révélateurs des propriétés thermodynamiques et cinétiques du système électrochimique étudié.

Dans l'exemple suivant, la voltamétrie cyclique permet d'évaluer la taux de recouvrement de l'électrode de carbone par les lipides en utilisant une solution de médiateur redox tel que le couple ferri/ferrocyanure  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$  (Figure 2.16).

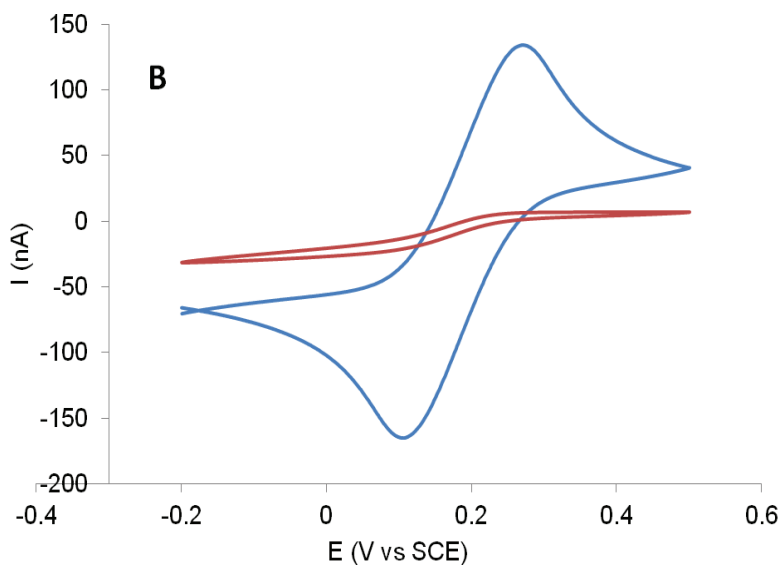


Figure 2.16 : Voltamétrie cyclique de 20mM de ferricyanure de potassium sur une électrode de GC nue (bleu) et une électrode de GC modifiée avec un dépôt de 1 µg de PC-CL (rouge).

Le passage de la forme en pic à une forme en vague dans le cas de l'électrode modifiée par les lipides correspond au passage d'un régime de diffusion plane à une diffusion hémisphérique. Ce type de diffusion correspond au passage localisé de médiateur redox au niveau d'imperfections, de trous dans la monocouche lipidique. Globalement, le signal est fortement inhibé par le recouvrement du carbone par les lipides. Le même type de signal électrochimique du ferri/ferro a été observé sur une électrode de GC recouverte de PC 14:0 (Wu et al. 2001) et également sur une électrode d'or recouverte d'une membrane hybride thiol/POPC (Plant 1993).

L'étude des composés électroactifs adsorbés sur des électrodes modifiées est un domaine particulier en électrochimie. Elle nécessite généralement des techniques plus spécifiques que la voltamétrie cyclique comme le

souligne la revue d'Eckermann (Eckermann et al. 2010) qui liste les différentes possibilités de ces techniques, leurs avantages et leurs défauts.

---

#### PAR EIS : SPECTROSCOPIE D'IMPEDANCE ELECTROCHIMIQUE

La principale méthode de caractérisation de l'état de surface d'une électrode est l'EIS (Spectroscopie d'impédance électrochimique). La méthode consiste à appliquer un potentiel sinusoïdal à l'électrode et de mesurer le courant induit par cette perturbation. Le signal obtenu permet d'avoir la magnitude de l'impédance et le déphasage des deux signaux en fonction de la fréquence du signal appliqué.

Ainsi il est possible de relier les résultats des mesures aux propriétés physiques et chimiques de l'électrode et cela à travers une modélisation de la réponse en fréquence du système électrochimique par des circuits linéaires composés de résistances, condensateurs et des inductances traduisant le caractère résistif, capacitif ou inductif du matériau.

Dans l'exemple choisi, l'EIS a été employé afin de tester deux quantités différentes de dépôts lipidiques sur l'électrode de GC (Figure 2.17).

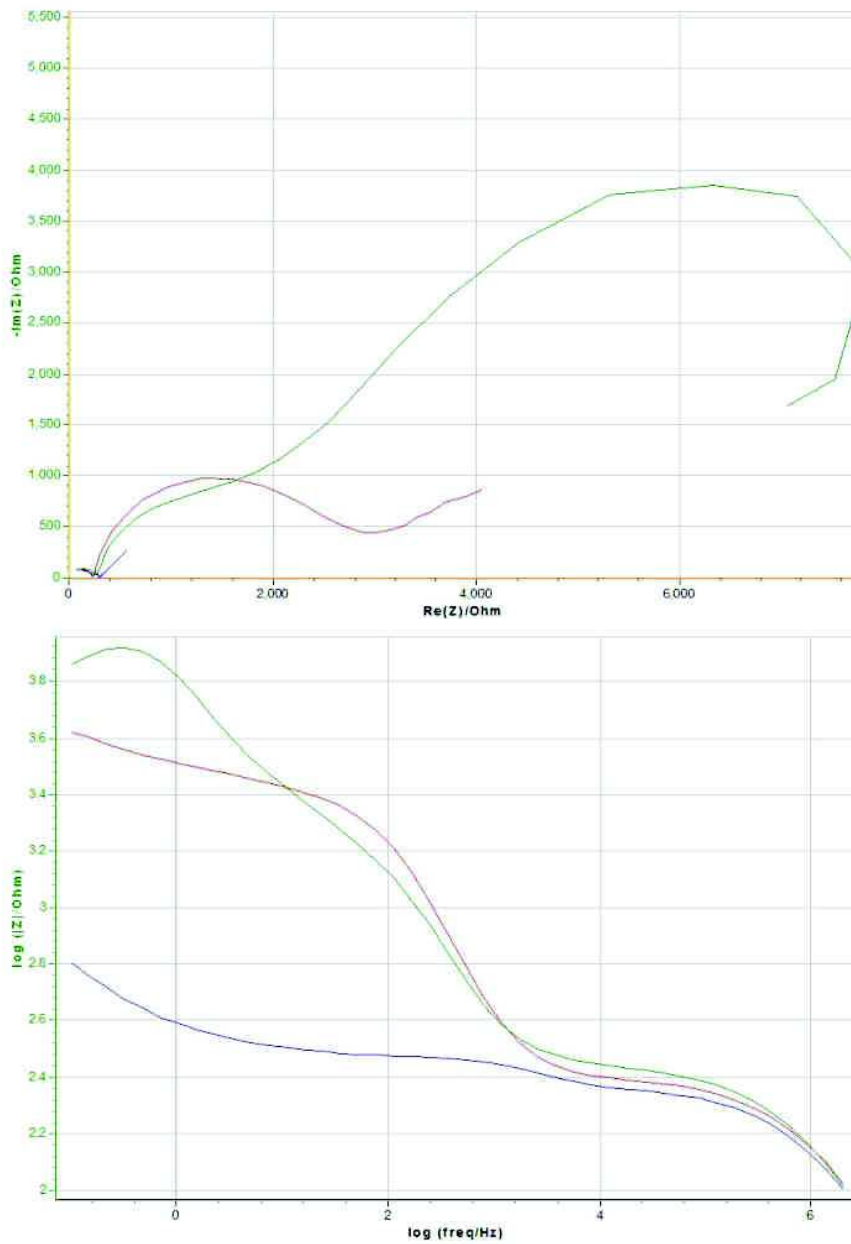


Figure 2.17 : Représentations de Nyquist (en haut) et de Bode (en bas) pour les mesures EIS d'une électrode de GC nue (courbes bleues), modifiée avec 0.5 µg de PC-CL (courbes rouges) ou 1 µg de PC-CL (courbes vertes) pour une solution de 25mM de ferricyanure de potassium.

Le signal sinusoïdal peut être décomposé en composantes réelles et imaginaires. Le graphe de Nyquist représente ces deux composantes pour toute la gamme de fréquence appliquée. Les courbes obtenues permettent d'apprécier l'état de surface et le comportement de transfert d'électrons. Les valeurs de la résistance en solution sont directement accessibles avec l'abscisse à l'origine. Les demi-cercles observés correspondent à un transfert

électronique. On peut calculer la résistance au transfert électronique et la capacité de double couche associés à ce phénomène par l'intermédiaire d'un circuit équivalent.

Les notions de composante réelles et imaginaires d'un signal sinusoïdal ainsi que l'utilisation d'un circuit équivalent pour modéliser un système redox sont décrits en détail dans la section qui suit (AC Voltamétrie).

Dans notre exemple d'EIS, plus la quantité de dépôt lipidique augmente, plus la résistance au transfert de charge est grande. La présence de deux demi-cercles laisse supposer un dépôt hétérogène composé de deux types distincts de modification de la surface.

Cette observation est confortée par le graphique de Bode qui représente le module de l'impédance (paramètre proportionnel au courant induit) en fonction de la fréquence appliquée. Pour une modification de la surface de 0.5  $\mu\text{g}$  de PC-CL, on n'observe qu'une seule vague correspondant à un système redox ayant des paramètres (de cinétique de transfert d'électrons en particulier) homogènes. Au contraire, le doublement de la quantité de lipidique provoque l'apparition d'une deuxième vague correspondant à un système redox plus « lent ».

L'EIS a permis dans notre cas de supposer la présence d'une couche lipidique multiple dans nos conditions expérimentales de dépôt de 1  $\mu\text{g}$  de PC-CL sur l'électrode de GC.

---

#### STABILITE DE LA MONOCOUCHE LIPIDIQUE :

La couche lipidique déposée à la surface de l'électrode est soumise à plusieurs facteurs provoquant sa désorganisation. La présence de molécules réactives vis-à-vis des insaturations présentes sur les chaînes grasses est un facteur de destruction. Des antioxydants sont couramment employés pour s'affranchir du risque d'oxydation des lipides. Le BHT (Butylhydroxytoluène) a été utilisé dans les solutions lipidiques dissoutes dans du chloroforme/méthanol comme antioxydant. Des tests ont été effectués pour voir si la présence de BHT ne perturbe pas le signal électrochimique mesuré. Aucune différence n'a pu être mise en évidence (Figure 2.18)

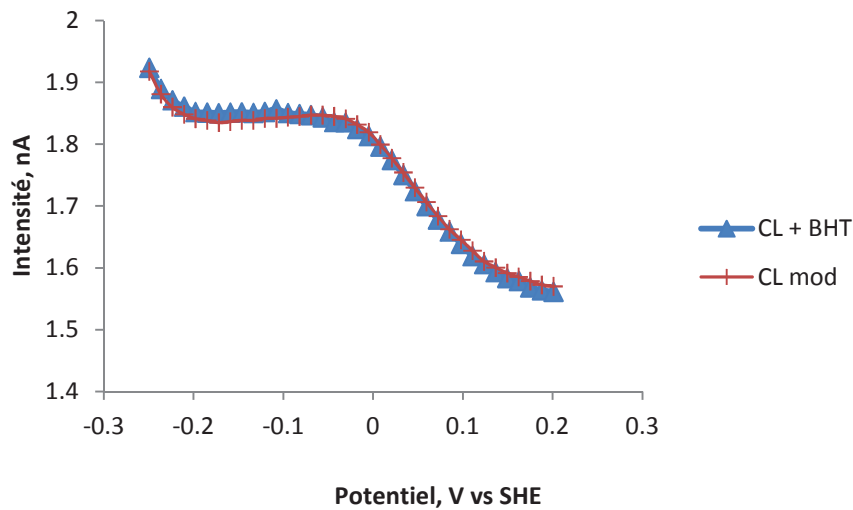


Figure 2.18 : ACV à 54Hz d'une électrode modifiée PC-CL 18:2 80/20 avec du cyt *c* Bovin Heart « immobilisé ».

Un autre facteur de dégradation de cette couche lipidique implique l'utilisation de l'électrode modifiée pour différentes techniques d'analyse en électrochimie. En effet, l'imposition d'un potentiel à travers la couche lipidique induit potentiellement une réorganisation des lipides déposés (Thuren et al. 1987). Nous avons pu le confirmer expérimentalement. Une électrode modifiée ayant du cyt *c* adsorbé et non utilisée pendant deux heures aura perdu moins de cyt *c* que la même électrode ayant subi des analyses électrochimiques durant une heure. Cependant la réorganisation lipidique évoquée doit nécessairement prendre un certain temps, de l'ordre de quelques secondes à quelques minutes. De fait, les techniques électrochimiques utilisant un potentiel alternatif (ACV, squarewave, EIS, SPEIS, ...) sont plus adaptées pour conserver l'intégrité de la monocouche lipidique car l'imposition d'un potentiel pouvant provoquer une désorganisation de la monocouche lipidique est limité dans le temps (de quelques ms à quelques s). Au contraire, une voltamétrie cyclique, en particulier aux faibles vitesses de balayage, aura davantage tendance à désorber rapidement le cyt *c*. Bien sûr, ces modifications pourraient être également dues à des répulsions électrostatiques provoquées par la migration de contre-ions à proximité de la membrane, on ne peut toutefois pas exclure un réarrangement des lipides aux potentiels utilisés.

Des essais de modifications d'électrode de mercure par une monocouche de lipides ont été également réalisés. Ce test avait pour but de s'affranchir des irrégularités d'une surface de carbone vitreux en profitant de la surface quasi-parfaite d'une goutte de mercure. Si un film lipidique constitué d'un mélange 80-20 PC-CL a bien été obtenu sur une goutte de mercure, sa stabilité aux potentiels utilisés n'a pas permis son utilisation. En effet, la PC se désorbe d'une électrode de mercure pour peu que le potentiel imposé dépasse 80mV vs NHE. Or le cyt *c* possède un potentiel redox d'environ 1 V dans ces conditions. Cela souligne la potentielle sensibilité de ces monocouches lipidiques soumises à un potentiel électrique.

Le dosage en retour d'une électrode de carbone vitreux modifiée avec 1 µg de mélange PC-CL a été réalisé afin d'apprécier sa composition après une série d'expérience en électrochimie. Brièvement, l'électrode est retirée de la cellule électrochimique et est rincée avec un mélange 98:2 CHCl<sub>3</sub>:MeOH. Après transméthylation au BF<sub>3</sub>-MeOH, l'analyse en acide gras est effectuée. Les résultats ont montré que nous récupérons 80% de la quantité de lipides déposés sur l'électrode. Si l'on considère qu'une partie des lipides est perdue lors des étapes d'extraction, on peut conclure que la majorité des lipides reste sur la surface de l'électrode pendant toute la durée de l'expérience.

---

### INFLUENCE DE LA TEMPERATURE SUR LE DEPOT LIPIDIQUE.

Un autre facteur de stabilité à prendre en compte pour la couche lipidique créée concerne la température à laquelle les analyses électrochimiques sont réalisées. Dans notre cas, les lipides testés sont en grande majorité des lipides dont la température de transition de phase est inférieure à la température des conditions expérimentales (20 ou 25°C). La PC soybean utilisée a une bonne mobilité au sein de la membrane créée (température de transition de phase de -53°C). Cependant certains CLs peuvent avoir des températures de transition de phase supérieures à celle de la cellule électrochimique (CL 14:0, CL 18:0). De plus, même si le point de fusion est déjà atteint, certains passages de la phase lamellaire à la phase hexagonale inverse peuvent apparaître suite à un changement de température. Par exemple, cette transition se fait vers 20°C pour le CL 18:2 (Ortiz et al. 1999). Même si la température de transition de phase est difficilement accessible pour des mélanges de lipides que l'on utilise (PC-CL 80/20 mol/mol généralement), nous avons testé la qualité du dépôt lipidique sur l'électrode en fonction de la température.

La première phase d'adsorption de cyt *c* a été réalisée à 15°C jusqu'à l'adsorption maximale de cyt *c* électroactif, c'est à dire environ une vingtaine de cycles voltamétriques (5 mn). Au bout de ce laps de temps, la température est graduellement augmentée pendant la poursuite des cycles voltamétriques. Alors que dans un premier temps, l'augmentation de température n'a aucun effet sur l'adsorption maximale de cyt *c*, le comportement électrochimique du cyt *c* se modifie profondément à partir de +35°C. Comme le montre la [Figure 2.19](#), la quantité de cyt *c* électroactif augmente et la largeur à mi-pic se resserre nettement. C'est le signe d'une réorganisation du cyt *c* adsorbé. Il y a manifestement plus de protéine adsorbée et surtout l'adsorption est plus homogène.

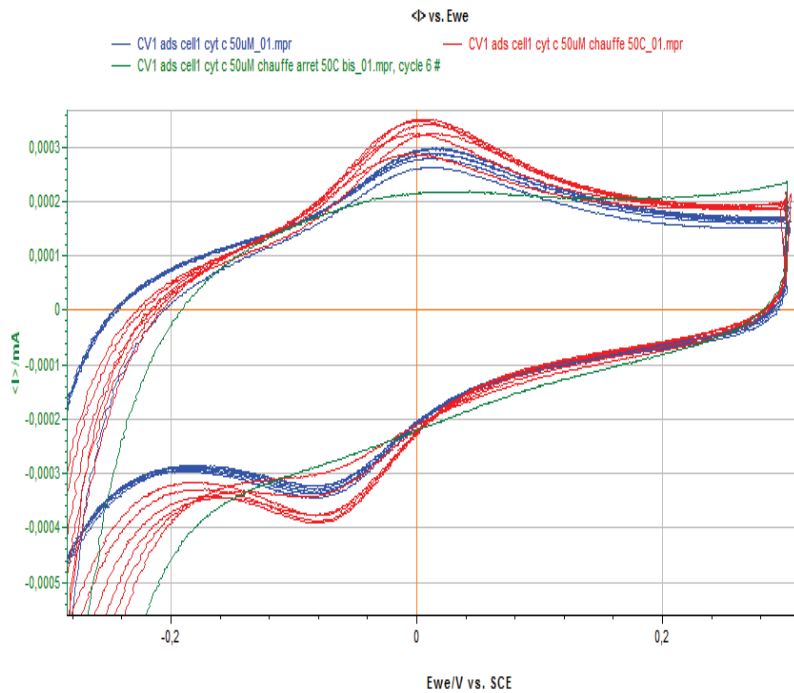


Figure 2.19 : CV de cyt c de cœur de bœuf adsorbé sur une électrode modifiée PC-CL sans traitement thermique (courbes bleues) et avec traitement thermique à 35°C (courbes rouges) et à 50°C (courbe verte).

Si l'on continue à faire monter la température du système, on finit par désorber irréversiblement le cyt c et les lipides (courbe verte dans la Figure 2.19). On peut supposer que nous avons alors atteint la température de fusion des lipides qui vont avoir tendance à passer en solution sous forme de suspension lipidique, de micelles et de film à la surface de l'électrolyte dans la cellule électrochimique.

L'état de « gel » de notre mélange lipidique déposé à la surface de GC à la température de 20 ou 25°C ne peut pas exactement être considéré comme un état figé et immuable. Des mesures réalisées en AFM sur une même surface de carbone modifiée ont montré qu'il y avait une évolution de l'arrangement de la membrane mais sur une échelle de temps de l'ordre d'heures voire de jours. A l'échelle de temps de nos analyses en électrochimie, on peut toutefois considérer que la réorganisation des lipides reste très limitée. L'intérêt d'un prétraitement du dépôt lipidique à une température supérieure à la température de transition de phase est d'atteindre plus rapidement une organisation de la monocouche lipidique homogène et répétable. De plus, nous observons que la durée d'utilisation de l'électrode modifiée est augmentée quand elle a subi ce traitement.



## INFLUENCE DE L'IMPOSITION D'UN POTENTIEL SUR LA MONOCOUCHE LIPIDIQUE.

La monocouche créée est sensée représenter la membrane interne de la mitochondrie. Cette membrane est naturellement soumise à des gradients électrochimiques (électrique en l'occurrence) parmi les plus élevés au sein d'une cellule. Les valeurs de gradients *in vivo* tournent autour de 100-200 mV (Wilson and Forman 1982; Andersson et al. 1987). L'influence de l'imposition d'un potentiel électrique à travers la monocouche créée se pose dans la mesure où l'organisation même des espèces lipidiques peut varier sous l'influence de ce potentiel. En effet, on peut citer les travaux de Thuren (Thuren et al. 1987) qui pointent un changement dans l'arrangement d'une monocouche lipidique contenant de la PG sous l'influence d'un champ électrique de l'ordre de 25-175 mV.

Nous ne pouvons pas mesurer directement quel est le gradient de potentiel subi par le dépôt lipidique sur notre électrode modifiée (qui dépend du PZC ?) mais la stabilité du dépôt lipidique a été vérifiée pour une gamme de potentiels plus étendue que celle utilisée dans nos expériences sans observer de modification du signal. Concrètement, des mesures d'EIS pour une électrode modifiée avec un dépôt de PC-CL ont démontré une bonne passivation de la surface avec une sonde au ferricyanure de potassium après une imposition du potentiel pendant deux minutes à -400 mV vs SCE et +600 mV vs SCE. Les gammes de potentiels couramment utilisées pour l'étude du cyt *c* sont de -300 mV à +400 mV.

## ETUDE DU TRANSFERT ELECTRONIQUE

### ACV : VOLTAMETRIE EN POTENTIEL ALTERNATIF

Il y a, à proprement parler, une "vraie" et une "fausse" AC voltamétrie (ACV). La "vraie" ACV est la superposition d'une rampe analogique ou numérique de potentiel, sur un intervalle donné, à une sinusoïde. La période est très largement supérieure au pas de la rampe de potentiel. Pour cette rampe de potentiel il y a, comme en voltamétrie cyclique classique, généralement un aller et un retour (Figure 2.20).

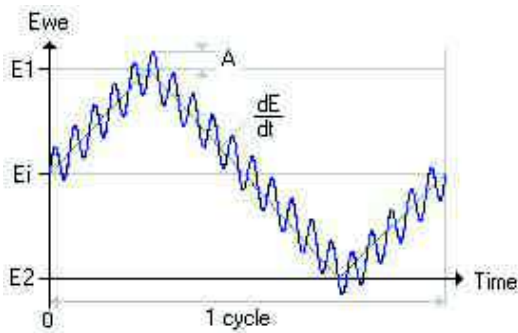


Figure 2.20 : Profil type de rampe de potentiel appliqué en ACV.

Cependant, la réduction et l'oxydation du centre redox se réalisant à l'échelle de temps d'une période de la sinusoïde, les deux pics observés à l'aller et au retour correspondent à la réduction et à l'oxydation graduelle du composé (un centre redox pouvant échanger des électrons plusieurs fois par cycle). Cette AC voltamétrie se fait pour une fréquence unique (Figure 2.21).

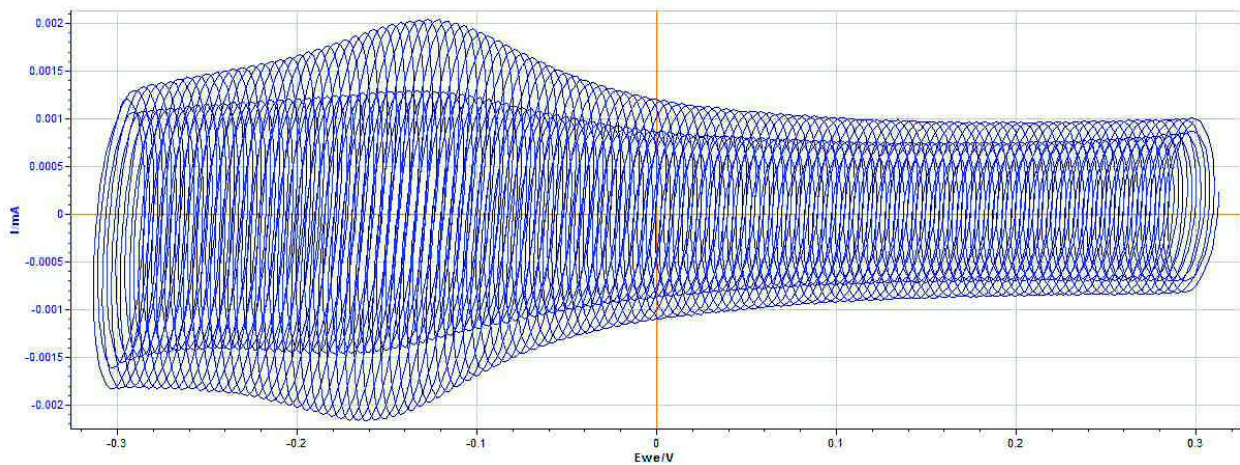


Figure 2.21 : Exemple d'ACV obtenue sur le potentiostat BioLogic SP-200 pour le couple ferri/ferro sur une électrode de carbone. Vitesse de balayage 50mV/s, fréquence 10Hz et amplitude 14.14 mV.

Pour obtenir des résultats pour 15 fréquences, il faut réaliser 15 AC voltamétries. Cela en fait une technique assez longue et lourde également du point de vue du traitement des résultats (Transformée de Fourier à réaliser pour chaque AC voltamétrie).

Plus appréciée et plus fréquemment rencontrée dans les publications scientifiques, la "fausse" AC voltamétrie est en réalité une spectroscopie d'impédance électrochimique (EIS) réalisée pour toute une gamme de potentiels. A ce titre, elle est parfois citée comme une SPEIS (Staircase Potentio Electrochemical Impedance Spectroscopy). Chaque potentiel est fixé durant le temps nécessaire à l'imposition de toute une gamme de fréquences de potentiels (de 100 mHz à 3 KHz dans notre cas) et à la mesure du courant sinusoïdal induit (Figure 2.22).

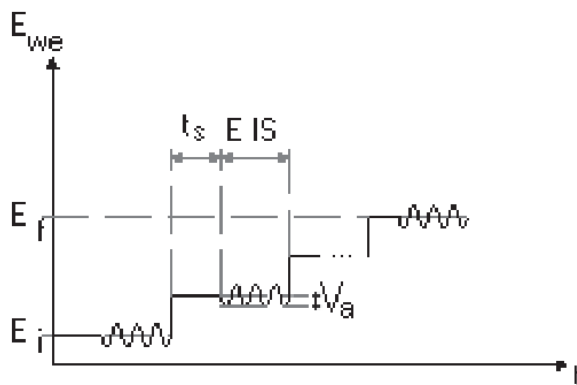


Figure 2.22 : Type de potentiel appliqué en SPEIS

Selon la gamme de fréquences souhaitée, chaque potentiel requiert entre 20 et 40 secondes d'analyse. Pour obtenir une résolution horizontale (en potentiel) suffisante, on répète la mesure pour au minimum 100 potentiels par volts balayés. Le choix des potentiels peut être optimisé de façon à serrer les potentiels d'intérêt au niveau des potentiels redox et aussi d'espacer les potentiels aux extrémités (Figure 2.23).

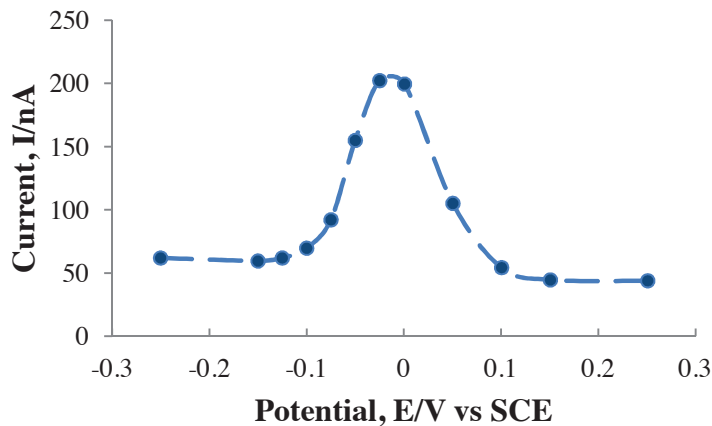


Figure 2.23 : ACV de cyt *c* de cœur de bœuf adsorbé sur une électrode modifiée avec un dépôt de PC-CL14:0.

Cette technique permet d'avoir accès à des jeux de données très complets. Elle permet aussi d'avoir accès à tous les graphes usuellement utilisés en EIS tel que les graphes Nyquist ou Bode mais aussi les graphes classiques de Tafel ou d'intensité-potentiel ( $I=f(E)$ ). Eckermann décrit cette technique comme avantageuse pour l'étude de protéines. En particulier, la faible quantité de centre redox dans les phénomènes d'adsorption protéique est suffisante pour l'utilisation de cette technique davantage sensible que la CV (Eckermann et al. 2010).

#### LES PARAMETRES DE SPEIS :

---

Outre le choix des fréquences et des potentiels, plusieurs paramètres permettent d'affiner la mesure SPEIS. Il s'agit de l'amplitude de la fréquence appliquée, du nombre de périodes de repos pour chaque fréquence avant le début de l'acquisition des données et enfin de la moyenne sur le nombre de mesures réalisées.

L'amplitude est un paramètre qui est intéressant dans le cas de couples redox dont les potentiels sont très proches ou bien dans le cas de très faible quantité d'espèce redox présente. En effet, l'ajustement de l'amplitude est un compromis entre la résolution horizontale (en potentiel donc) de l'ACV et sa sensibilité verticale (en courant induit). A amplitude forte, le courant induit est maximisé et on peut visualiser des pics qui pouvaient être invisibles à faibles intensités. Cependant, de part la forte amplitude de potentiel balayée ( $\pm 0.1$  V de l' $E^\circ$  par exemple), ces pics sont larges. Dans le cas de systèmes redox qui ont des cinétiques et des potentiels  $E^\circ$  proches, un seul pic peut apparaître. En faisant diminuer l'amplitude, la hauteur de pic diminue mais également sa largeur. On gagne ainsi

en résolution. A très faible amplitude (de l'ordre de 2-10 mV rms), l'étude de systèmes dont les potentiels redox sont séparés d'environ 50 mV est possible.

## SIMULATION DU COMPORTEMENT ELECTROCHIMIQUE DU CYT C ADSORBE

Le but est de simuler le comportement électrochimique d'une espèce redox adsorbée à la surface d'une électrode à laquelle on impose une variation de potentiel sinusoïdal. Cette variation est caractérisée par son amplitude efficace  $U_{\text{eff}}$  mesurée en volt rms (root mean square, cf vide infra), sa fréquence  $f$  mesurée en hertz et son potentiel médian  $U$  en volt vs référence. On récupère en sortie un courant sinusoïdal de même fréquence dont l'amplitude a pu être modifiée ainsi que sa phase  $\omega$  (décalage dans le temps du signal).

Le comportement de ces signaux sinusoïdaux peut être modélisé par des notations mathématiques différentes (Cosinus/sinus, exponentielle, nombres complexes, équation différentielle,...) La notation sous forme de nombres complexes est généralement favorisée en électrochimie. En effet, pour un nombre complexe de type  $y = a + b.j$ , elle donne accès directement à la partie réelle ( $a$ ) et imaginaire ( $b$ ) qui représentent respectivement la partie résistive et capacitive du courant.

Impédance :

Il revient facilement dans les mémoires la règle liant tension et courant dans un circuit fermé alimenté en courant continu (loi d'Ohm) :

$$U_{\text{dc}} = R.I$$

Avec  $U_{\text{dc}}$  (en volt) une tension continue non nulle,  $R$  (en ohm) la résistance du circuit et  $I$  (en Ampères) le courant induit.  $R$  peut être vu comme la résistance au passage d'électrons induit par une différence de potentiel ( $U_{\text{ac}}$ ). Le flux d'électrons est représenté par  $I$ .

Si on impose une tension de nature sinusoïdale pour ce même circuit, l'équation devient :

$$U_{\text{ac}} = Z.I$$

Avec  $U_{ac}$  (en volt) une tension sinusoïdale efficace,  $Z$  (en ohm) l'impédance du circuit et  $I$  (en Ampères) le courant sinusoïdal efficace induit. L'impédance  $Z$  peut donc être perçue comme la résistance d'un circuit alimenté par une tension alternative.

On définit aussi l'admittance  $Y$  (en Siemens) qui est l'inverse de l'impédance :

$$Y = 1/Z$$

Tout comme il est possible de calculer l'intensité de courant théorique dans un circuit en tension continu en connaissant la tension de départ et la résistance du circuit, il est également possible de connaître la nature du courant induit par un circuit alimenté en tension alternative dont on connaît tous les composants. En effet, chaque composant d'un circuit a une impédance donnée qui contribue à l'impédance totale du circuit.

Par exemple, une résistance  $R$  a une impédance  $Z_R=R$ ,  $R$  étant la valeur de la résistance (en ohm).  $Z_R$  est donc un nombre complexe réel pur. Une capacité  $C$  a une impédance  $Z_C= 1/\omega.C.j$ .  $C$  est donc un imaginaire pur ( $j$  est le nombre complexe).  $C$  est la valeur de la capacité en Farad et  $\omega$  est la valeur du déphasage en radians. Pour combiner des éléments entre eux, il faut respecter les règles suivantes :

Pour des composants du circuit en série, leurs impédances s'additionnent :

$$Z_{tot} = Z_1 + Z_2 + Z_3 + \dots$$

Et concernant leurs admittances :

$$\frac{1}{Y_{tot}} = \frac{1}{\frac{1}{Y_1} + \frac{1}{Y_2} + \frac{1}{Y_3} + \dots}$$

Pour des composants en parallèles, on additionne de préférence leurs admittances :

$$Y_{tot} = Y_1 + Y_2 + Y_3 + \dots$$

ou

$$\frac{1}{Z_{tot}} = \frac{1}{\frac{1}{Z_1} + \frac{1}{Z_2} + \frac{1}{Z_3} + \dots}$$

Pour étudier le comportement d'un circuit électrique dont la majorité des éléments sont en parallèles, le choix de travailler avec les admittances plutôt qu'avec les impédances est plus judicieux du fait de la simplicité des calculs qui en découle.

Le circuit équivalent choisi pour simuler le comportement électrochimique du *cyt c* adsorbé sur une électrode de GC modifiée est le suivant :

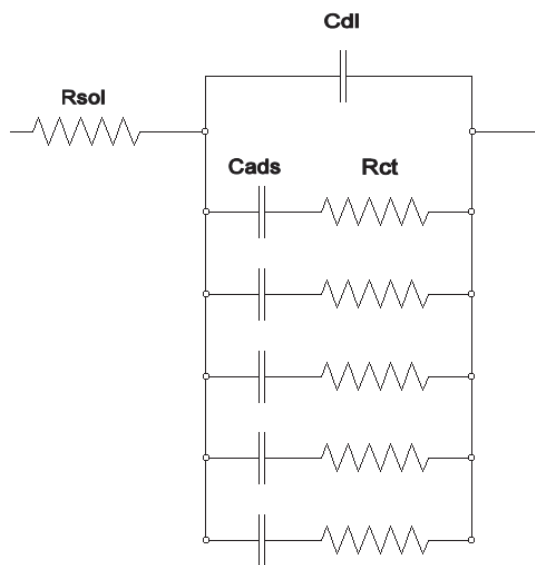


Figure 2.24 : Circuit électrique équivalent retenu à 5 centres redox.

C'est un circuit intermédiaire entre celui de Creager (Creager and Wooster 1998) qui comporte un seul centre redox et le circuit équivalent de Li (Li et al. 2000) qui simule 11 centres redox. Dans le principe, il s'apparente au circuit équivalent de Randles (Figure 2.25). Le modèle de Randles permet de décrire l'impédance électrochimique d'une interface et s'applique particulièrement aux phénomènes physicochimiques tels que l'adsorption et la formation de film à la surface d'une électrode.

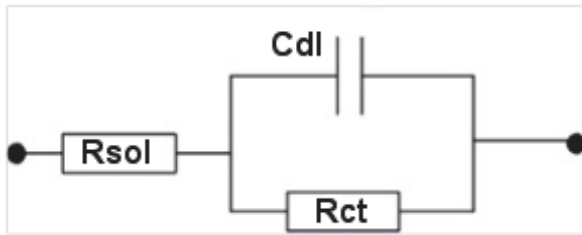


Figure 2.25 : Circuit électrique équivalent de Randles.

Dans ce circuit,  $R_{sol}$  est la résistance de la solution entre l'électrode de travail et l'électrode de référence,  $R_{ct}$  est la résistance de transfert de charge à l'interface électrode/solution, et  $C_{dl}$  est la capacité de la double couche à cette même l'interface. Pour le calcul de l'impédance complexe de notre modèle à cinq centres redox adsorbés, on va séparer notre circuit équivalent en 3 parties :

- La résistance de la solution  $R_{sol}$  dont l'impédance est définie par  $Z_{R_{sol}}$ .
- La capacité de double couche de l'électrode nue  $C_{dl}$  dont l'impédance est définie par  $Z_{C_{dl}}$
- Les 5 centres redox dont les impédances sont caractérisés par  $Z_{red}$  pour un centre redox et  $Z_{5red}$  pour les cinq centres redox.

Il est couramment admis que la paire d'éléments  $R + C$  en série représente au niveau électrique le comportement d'un centre redox adsorbé sur l'électrode. La résistance  $R$  représente le transfert de charge et la capacité  $C$  représente le phénomène de capacitance lié au chargement des espèces proches de l'électrode.

L'impédance  $Z_{red}$  d'un centre redox composé des éléments  $R + C$  en série se définit comme tel :

$$Z_{red} = R_{ct} + \frac{1}{C_{ads} \cdot \omega \cdot j}$$

Soit :

$$Z_{red} = R_{ct} - \frac{j}{C_{ads} \cdot \omega} \quad (\text{D'après note 3, rappels en fin de section})$$

Afin de combiner les 5 centres redox en parallèle, on passe en admittance :



$$Y_{red} = \frac{1}{Z_{red}}$$

$$Y_{red} = \frac{1}{R_{ct} - \frac{j}{C_{ads} \cdot \omega}}$$

D'après la note 3, on a :

$$Y_{red} = \frac{R_{ct} + \frac{j}{C_{ads} \cdot \omega}}{R_{ct}^2 + \left(\frac{1}{C_{ads} \cdot \omega}\right)^2}$$

On multiplie par  $(\omega \cdot C_{ads})^2$  au numérateur et au dénominateur :

$$Y_{red} = \frac{C_{ads}^2 \cdot \omega^2 \cdot R_{ct} + C_{ads} \cdot \omega \cdot j}{(C_{ads} \cdot \omega \cdot R_{ct})^2 + 1}$$

On a bien séparé les admittances réelles et imaginaires d'une unité redox. Cela correspond respectivement à la conductance (paramètre lié à l'induction d'un courant faradique) et à la susceptance (paramètre lié à l'induction d'un courant capacitif) d'un centre redox adsorbé (pas de diffusion).

$$Y = G + jB$$

G étant la conductance et B la susceptance.

Dans notre cas :

$$G = \frac{C_{ads}^2 \cdot \omega^2 \cdot R_{ct}}{(C_{ads} \cdot \omega \cdot R_{ct})^2 + 1}$$

Et

$$B = \frac{C_{ads} \cdot \omega}{(C_{ads} \cdot \omega \cdot R_{ct})^2 + 1}$$

Par extension, on peut donc formuler l'admittance complexe de 5 unités redox en parallèle (d'après la note 1 en rappels) :

$$Y_{5red} = \sum_{x=1}^5 G_x + \sum_{x=1}^5 B_x \cdot j$$

$$Y_{5red} = \sum_{x=1}^5 \left[ \frac{C_{adsx}^2 \cdot \omega^2 \cdot R_{ctx}}{(C_{adsx} \cdot \omega \cdot R_{ctx})^2 + 1} \right] + \sum_{x=1}^5 \left[ \frac{C_{adsx} \cdot \omega}{(C_{adsx} \cdot \omega \cdot R_{ctx})^2 + 1} \right] \cdot j$$

On additionne également l'admittance de la capacité de la double couche de l'électrode nue  $C_{dl}$  qui est purement imaginaire :

$$Z_{C_{dl}} = \frac{1}{\omega \cdot C_{dl} \cdot j}$$

D'où :

$$Y_{C_{dl}} = \omega \cdot C_{dl} \cdot j$$

Cela nous donne :

$$Y_{5red+C_{dl}} = \sum_{x=1}^5 \left[ \frac{C_{adsx}^2 \cdot \omega^2 \cdot R_{ctx}}{(C_{adsx} \cdot \omega \cdot R_{ctx})^2 + 1} \right] + \sum_{x=1}^5 \left[ \left( \frac{C_{adsx} \cdot \omega}{(C_{adsx} \cdot \omega \cdot R_{ctx})^2 + 1} \right) + \omega \cdot C_{dl} \right] \cdot j$$

Pour simplifier, posons A et B réels tel que :

$$Y_{5red+C_{dl}} = A + B \cdot j$$

Il nous reste uniquement la résistance de la solution  $R_{sol}$  à intégrer à l'impédance complexe du système. Bien que la résistance de la solution n'ait quasiment pas d'impact sur la cinétique des espèces redox adsorbés comme le montre Creager, il est préférable d'avoir l'équation complète décrivant le comportement du circuit préalablement décrit.  $R_{sol}$  étant en série du reste du circuit, il est judicieux de passer d'admittance à impédance afin d'ajouter simplement la résistance à la partie réelle de l'impédance obtenue :

$$Z_{5red+C_{dl}} = \frac{1}{Y_{5red+C_{dl}}}$$

$$Z_{5red+Cdl} = \frac{A - B \cdot j}{A^2 + B^2}$$

Avec donc :

$$A = \sum_{x=1}^5 \left[ \frac{C_{adsx}^2 \cdot \omega^2 \cdot R_{ctx}}{(C_{adsx} \cdot \omega \cdot R_{ctx})^2 + 1} \right]$$

$$B = \sum_{x=1}^5 \left[ \left( \frac{C_{adsx} \cdot \omega}{(C_{adsx} \cdot \omega \cdot R_{ctx})^2 + 1} \right) + \omega \cdot C_{dl} \right]$$

$$Z_{tot} = Z_{5red+Cdl} + Z_{Rsol}$$

$$Z_{tot} = \frac{A - B \cdot j}{A^2 + B^2} + R_{sol}$$

$$Z_{tot} = \frac{A + R_{sol}}{A^2 + B^2} + \frac{-B \cdot j}{A^2 + B^2}$$

L'impédance totale complexe du circuit a été résolue. Sa partie réelle  $Z'$  (résistance) vaut :

$$Z' = \frac{A + R_{sol}}{A^2 + B^2}$$

Sa partie imaginaire  $Z''$  (réactance) vaut :

$$Z'' = \frac{-B}{A^2 + B^2}$$

Pour calculer l'intensité efficace  $I_{eff}$  (en Ampère) dégagée par ce circuit alimenté par une tension efficace  $U_{eff}$  (en Volt rms), la formule est :

$$I_{eff} = \frac{U_{eff}}{|Z_{tot}|}$$

$U_{eff}$  étant ici assimilé à l'amplitude rms (root mean square) par opposition à l'amplitude de pic (appelé aussi amplitude maximale) :

$$U_{eff} = \frac{U_{max}}{\sqrt{2}}$$

Et  $|Z_{tot}|$  étant le module de  $Z_{tot}$  définit par :

$$|Z_{tot}| = \sqrt{Z'^2 + Z''^2}$$

Le courant peut ainsi être calculé pour les 5 centres redox avec comme paramètres d'entrée  $C_{ads}$  et  $R_{ct}$ . Ces paramètres peuvent être reliés à des paramètres utilisés en électrochimie tel que :

- La constante de vitesse de transfert des électrons  $k_{ET}$  ( $s^{-1}$ ):  $k_{ET} = 1/(2.C_{ads}.R_{ct})$
- Le nombre de charge électroactives Gamma (coulombs):  $\Gamma = (4.C_{ads}.R.T) / (A.F^2)$

On obtient alors une formule pour ces deux paramètres :

- $C_{ads} = (\Gamma.A.F^2) / (4.R.T)$
- $R_{ct} = (2.R.T) / (\Gamma.A.F^2.k_{ET})$

Les paramètres restants  $C_{ads}$  et  $R_{ct}$  sont ajustés indépendamment avec une macro dans une feuille de calcul Excel. Pour plus de commodité, les capacités des centres redox  $C_{ads}$  ne sont pas fixées directement pour chaque centre redox mais on joue sur sa mesure physique associée ( $\Gamma$ ). On fixe une quantité de centre redox total  $\Gamma$  qui est ensuite partagé entre les cinq centres redox modélisés ( $\Gamma_1, \Gamma_2, \Gamma_3, \dots$ ) via des coefficients  $X_n$  de partage propres :

$$\Gamma_1 = X_1.\Gamma_{tot}$$

De même,  $R_{ct}$  n'est pas ajusté directement mais on passe par la vitesse de transfert d'électrons  $k_{et}$  pour chaque centre redox après avoir fixé les différents  $C_{ads}$  :

$$k_{et1} = \frac{1}{2.C_{ads1}.R_{ct1}}$$

Pour effectuer une simulation complète du comportement électrochimique de notre électrode modifiée, il faut aussi rentrer au préalable la Résistance en solution  $R_{sol}$  ainsi que la capacité de double couche de l'électrode nue  $C_{dl}$ .

$R_{sol}$  est directement proportionnelle à la distance séparant l'électrode de travail et la contre-électrode. Elle dépend également de la conductivité de l'électrolyte utilisé dans la cellule. Elle change donc à chaque nouvelle expérience. Elle peut être calculée par la relation :

$$R_{sol} = \rho \cdot \frac{l}{A}$$

$R_{sol}$  est en ohm,  $\rho$  est la résistance spécifique de la solution en  $\text{ohm cm}^{-1}$ ,  $l$  est la longueur séparant les électrodes de travail et de référence en cm et  $A$  est la surface de l'électrode en  $\text{cm}^2$ .  $\rho$  peut être calculé à partir du type d'électrolyte et de sa concentration. Il est toutefois plus simple de reporter la valeur de  $R_{sol}$  qui est directement accessible à partir des données d'impédance. Ce paramètre est également le moins important concernant la simulation du comportement électrochimique du système. En effet, il n'influe ni sur la concentration surfacique des centres redox  $\Gamma$  ni sur la vitesse de transfert d'électrons  $k_{et}$ , les deux paramètres principalement visés.

$C_{dl}$  représente la tendance naturelle d'une surface conductrice chargée et immergée dans un électrolyte à former à proximité de sa surface un regroupement de contre charges locales (Figure 2.26).

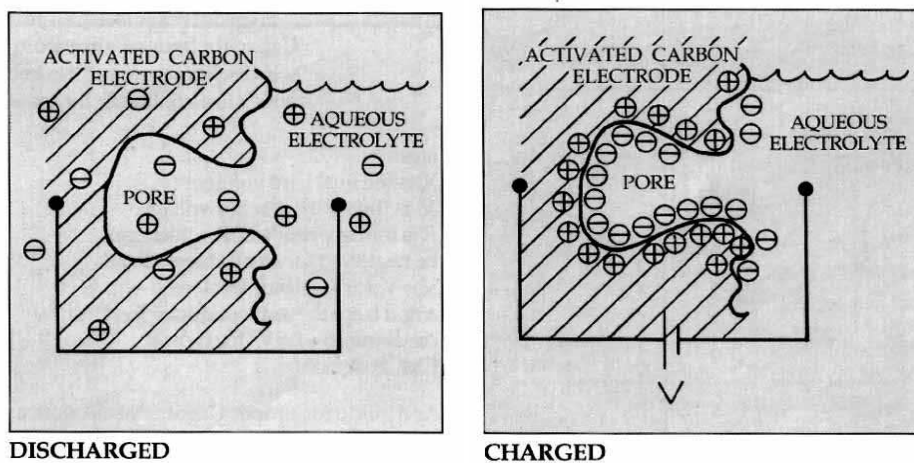


Figure 2.26 : Capacitance de double couche induite par des électrolytes en solution lors de la polarisation d'une électrode de carbone.

Dans le cas de notre électrode modifiée avec une monocouche de phospholipides,  $C_{dl}$  représente tous les phénomènes d'accumulation de charges situées à proximité directe de la surface de carbone vitreux ou des phospholipides, charges qui ne participent pas à un transfert d'électrons.

A ce titre, la capacitance issue du recouvrement des phospholipides peut se calculer suivant :

$$C_{lip} = \frac{\epsilon_0 \cdot \epsilon_r \cdot A}{d}$$

Avec  $\epsilon_0$  la permittivité électrique du vide,  $\epsilon_r$  la permittivité électrique des lipides déposés (environ 2.1 pour les phospholipides),  $A$  la surface modifiée et  $d$  l'épaisseur des lipides déposés.

La capacité de double couche totale  $C_{dl}$  s'obtient avec les données d'impédances d'une électrode nue. On peut également retrouver cette valeur à partir d'une simple voltamogramme cyclique. En effet, la capacité de double couche peut se formuler ainsi :

$$\frac{dQ}{dt} = C_{dl} \cdot \frac{dE}{dt}$$

Ou l'on peut identifier  $\frac{dQ}{dt}$  à  $i$  et  $\frac{dE}{dt}$  à  $v$ , la vitesse de balayage de la voltamétrie cyclique. Concrètement, il s'agit de faire la différence entre le courant capacitif de l'aller et du retour. Cette différence est proportionnelle à la vitesse de balayage au coefficient  $C$  près :

$$\frac{I_a - I_c}{2} = C_{dl} \cdot \frac{dE}{dt}$$

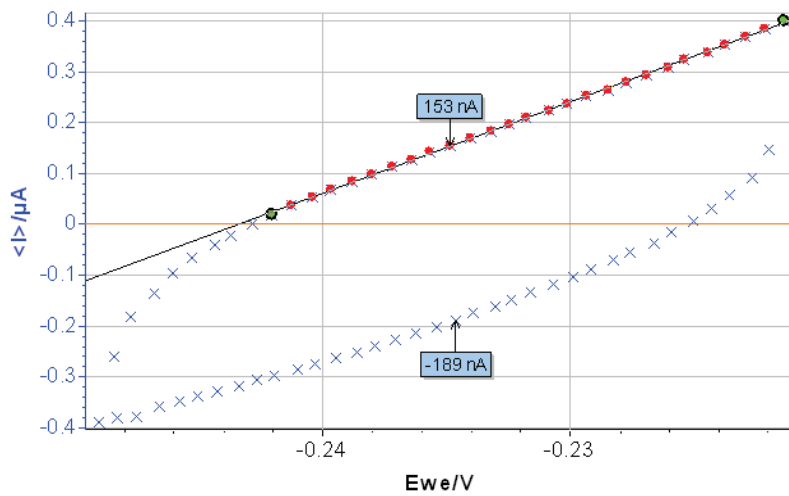


Figure 2.27 : Voltamétrie cyclique et calcul de la capacité de double couche

Dans cette voltamétrie à  $40 \text{ mV s}^{-1}$ , la différence entre le courant anodique et le courant cathodique donne une capacité de double couche de  $4.3 \mu\text{F}$  (Figure 2.27).

Les éventuels ajustements à effectuer pour la modélisation concerne la température à laquelle sont faite les expériences et la surface de l'électrode de travail. Une simulation achevée donne le profil du ratio  $I_p/I_b$  représentée en Figure 2.28.  $I_p$  représente le courant de pic mesuré en ACV et  $I_b$  représente le courant basal (b comme background). Pour les hautes fréquences,  $I_p/I_b = 1$  signifie que le pic n'est plus visible.

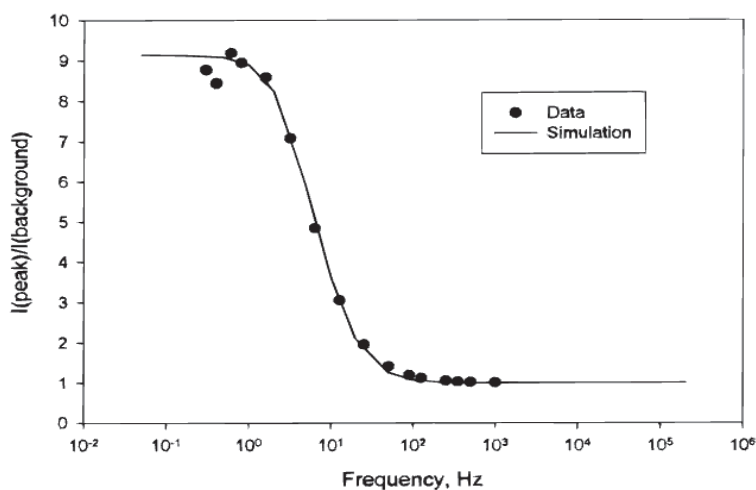


Figure 2.28 : Intensité de pic d'un système électrochimique de  $k_{ET}=13\text{s}^{-1}$ , Données expérimentales (points) et simulation par la méthode de Creager. D'après Creager and Wooster 1998.

Le modèle développé ici permet de sortir les paramètres de 5 systèmes redox. Une estimation de la dispersion des paramètres de cinétique de transfert d'électrons est donc faisable comme le démontre l'étude de Li (Li et al. 2000).

Notes / Rappels :

- 1)  $Z_1 + Z_2 = (a + ib) + (c + id)$   

$$= (a + c) + (b + d).i$$
- 2)  $Z_1.Z_2 = (a + ib).(c + id)$   

$$= (ac - bd) + (ad + bc).i$$
- 3)  $\frac{1}{Z} = \frac{1}{(a+ib)}$
- 4)  $\frac{1}{Z} = \frac{a-ib}{a^2+b^2}$
- 5)  $\frac{1}{\left(\frac{1}{Z_1} + \frac{1}{Z_2}\right)} = \frac{Z_1.Z_2}{Z_1+Z_2}$

---

## ANALYSES STATISTIQUES

Si les expériences ont été répétées, les réplicas de mesures sont présentés avec une valeur moyenne avec l'erreur standard associée. L'erreur standard est définie par l'écart-type divisé par la racine carrée du nombre de mesures effectués.

Si des réplicas ont été réalisés, des tests statistiques peuvent être effectués. Les différentes analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel Statgraphic 5.1+. Pour tester des différences entre des groupes de mesures, un test T ou une ANOVA (Analyse de variance) a été réalisé.

Les critères d'application de l'ANOVA que sont la normalité et l'homoscédasticité des variances ont été testés. Si ces critères sont remplis, l'ANOVA a été réalisée selon la méthode LSD (Least Significant Difference) de Fisher pour un seuil de 0.05% de marge d'erreur. Pour chaque groupe de valeur testé, la p-value résultante indique que les groupes sont différents pour des valeurs inférieures à 0.05.

Les mesures qui ne respectent pas les conditions de normalité et/ou d'homoscédasticité, un test non paramétrique de type Kruskal-Wallis a été réalisé.



## RÉFÉRENCES

- Aguayo, D., F. González-Nilo and C. Chipot **2012**. "Insight into the Properties of Cardiolipin Containing Bilayers from Molecular Dynamics Simulations, Using a Hybrid All-Atom/United-Atom Force Field." Journal of Chemical Theory and Computation 8(5): 1765-1773.
- Andersson, B. S., T. Y. Aw and D. P. Jones **1987**. "Mitochondrial transmembrane potential and pH gradient during anoxia." American Journal of Physiology - Cell Physiology 252(4): C349-C355.
- Bligh, E. G. and W. J. Dyer **1959**. "A rapid method of total lipid extraction and purification." Canadian Journal of Biochemistry and Physiology 37(8): 911-917.
- Boussaad, S., N. J. Tao and R. Arechabaleta **1997**. "Structural and electron transfer properties of cytochrome c adsorbed on graphite electrode studied by in situ tapping mode AFM." Chemical Physics Letters 280(4): 397-403.
- Cho, S.-Y., K. Miyashita, T. Miyazawa, K. Fujimoto and T. Kaneda **1987**. "Autoxidation of ethyl eicosapentaenoate and docosahexaenoate." Journal of the American Oil Chemists' Society 64(6): 876-879.
- Creager, S. E. and T. T. Wooster **1998**. "A New Way of Using ac Voltammetry To Study Redox Kinetics in Electroactive Monolayers." Analytical Chemistry 70(20): 4257-4263.
- Eckermann, A. L., D. J. Feld, J. A. Shaw and T. J. Meade **2010**. "Electrochemistry of redox-active self-assembled monolayers." Coordination Chemistry Reviews In Press, Corrected Proof.
- Folch, J., M. Lees and G. H. S. Stanley **1957**. "A Simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues." Journal of Biological Chemistry 226(1): 497-509.
- Fuchs, B., R. Söllner, K. Teuber, M. Eibisch and J. r. Schiller **2011**. "Lipid analysis by thin-layer chromatography – A review of the current state." Journal of Chromatography A 1218(19): 2754-2774.
- Hanske, J., J. R. Toffey, A. M. Morenz, A. J. Bonilla, K. H. Schiavoni and E. V. Pletneva **2012**. "Conformational properties of cardiolipin-bound cytochrome c." Proceedings of the National Academy of Sciences 109(1): 125-130.
- Heo, J., G. H. Kim, K. S. Lee, W. U. Go, H. J. Ju, S. K. Park, C. S. Song, G. A. Song, M. Cho, U. S. Yang, H. K. Moon and Y. K. Kim **1997**. "Effect of Ca<sup>2+</sup> channel blockers, external Ca<sup>2+</sup> and phospholipase A2 inhibitors on t-butylhydroperoxide-induced lipid peroxidation and toxicity in rat liver slices." Korean J Intern Med 12(2): 193-200.
- Huang, Y., L. Liu, C. Shi, J. Huang and G. Li **2006**. "Electrochemical analysis of the effect of Ca<sup>2+</sup> on cardiolipin-cytochrome c interaction." Biochimica et Biophysica Acta 1760(12): 1827-30.
- Iverson, S. L. and S. Orrenius **2004**. "The cardiolipin-cytochrome c interaction and the mitochondrial regulation of apoptosis." Archives of Biochemistry and Biophysics 423(1): 37-46.
- Li, J., K. Schuler and S. E. Creager **2000**. "A Generalized Equivalent-Circuit Model for Electroactive Monolayers Exhibiting a Fixed Redox Potential and a Distribution of Electron-Transfer Rate Constants I. Square Distributions." Journal of The Electrochemical Society 147(12): 4584-4588.
- Marty, Y., F. Delaunay, J. Moal and J. F. Samain **1992**. "Changes in the fatty acid composition of Pecten maximus (L.) during larval development." Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 163(2): 221-234.

- Metcalfe, L. D. and A. A. Schmitz **1961**. "The Rapid Preparation of Fatty Acid Esters for Gas Chromatographic Analysis." Analytical Chemistry 33(3): 363-364.
- Ortiz, A., J. A. Killian, A. J. Verkleij and J. Wilschut **1999**. "Membrane Fusion and the Lamellar-to-Inverted-Hexagonal Phase Transition in Cardiolipin Vesicle Systems Induced by Divalent Cations." Biophysical Journal 77(4): 2003-2014.
- Plant, A. L. **1993**. "Self-assembled phospholipid/alkanethiol biomimetic bilayers on gold." Langmuir 9(11): 2764-2767.
- Sedlak, E. and N. C. Robinson **1999**. "Phospholipase A2 Digestion of Cardiolipin Bound to Bovine Cytochrome c Oxidase Alters Both Activity and Quaternary Structure" Biochemistry 38(45): 14966-14972.
- Szucs and M. Novak **1995**. "Stable and reversible electrochemistry of cytochrome c on bare electrodes Part 1. Effect of ionic strength." Journal of Electroanalytical Chemistry 383(1-2): 75-84.
- Szucs and M. Novak **1995**. "Stable and reversible electrochemistry of cytochrome c on bare electrodes Part II: Effects of experimental conditions." Journal of Electroanalytical Chemistry 384(1-2): 47-55.
- Tamm, L. K. and H. M. McConnell **1985**. "Supported phospholipid bilayers." Biophysical Journal 47: 105-113.
- Thuren, T., A. P. Tulkki, J. A. Virtanen and P. K. J. Kinnunen **1987**. "Triggering of the activity of phospholipase A2 by an electric field." Biochemistry 26(16): 4907-4910.
- Tyurin, V. A., Y. Y. Tyurina, A. N. Osipov, N. A. Belikova, L. V. Basova, A. A. Kapralov, H. Bayir and V. E. Kagan **2006**. "Interactions of cardiolipin and lyso-cardiolipins with cytochrome c and tBid: conflict or assistance in apoptosis." Cell Death Differ 14(4): 872-875.
- Vance, D. E., E. V. Dennis and E. V. Jean (1996). Chapter 6 Glycerolipid biosynthesis in eukaryotes. New Comprehensive Biochemistry, Elsevier. **Volume 31**: 153-181.
- Wilson, D. F. and N. G. Forman **1982**. "Mitochondrial transmembrane pH and electrical gradients: evaluation of their energy relationships with respiratory rate and ATP synthesis." Biochemistry 21(6): 1438-1444.
- Wu, Z., B. Wang, Z. Cheng, X. Yang, S. Dong and E. Wang **2001**. "A facile approach to immobilize protein for biosensor: self-assembled supported bilayer lipid membranes on glassy carbon electrode." Biosensors and Bioelectronics 16(1-2): 47-52.



## CHAPITRE 3 : ETUDE PAR AC VOLTAMETRIE DE L'INTERACTION CL - CYT C

### INTRODUCTION

Les travaux présentés dans ce chapitre ont par ailleurs été exposés dans deux colloques traitant de bioélectrochimie (Lacanaou 2010) et des métalloprotéines et modèles (Aussois 2010). Le rapprochement entre électrochimistes et biologistes ne s'est fait que récemment et il y a encore une quinzaine d'année, il se limitait à l'étude de systèmes redox biologiques simples comme le cyt c. En effet, ce n'est qu'après avoir décrit correctement ces systèmes à un seul centre redox que ce domaine de recherche peut s'appliquer à décrypter les processus complexes de transfert électronique que l'on retrouve in-vivo (photosynthèse, chaîne respiratoire, par exemple).

Ce n'est également que récemment que les électrochimistes travaillant sur les transferts électroniques des protéines se sont intéressés à l'environnement de ces systèmes in-vivo. Dans le cas des protéines ayant une interaction avec les membranes biologiques, l'environnement lipidique est un facteur possible de régulation du processus de transfert électronique. Ainsi, le développement des modèles membranaires biomimétiques en électrochimie des protéines s'est développé avec la création d'électrodes modifiées avec des monocouches ou bicouches de lipides (Salamon and Tollin 1991; Plant 1993).

Les mécanismes de transfert électronique hétérogènes confinés à la surface de l'électrode font souvent appel à des techniques électrochimiques spécialisées qui ont été recensées dans une revue récente (Eckermann et al. 2010). Les techniques de choix pour la compréhension des phénomènes d'adsorption, de transfert électronique et de caractérisation de la surface de l'électrode sont les techniques dérivées des mesures d'impédance électrochimique. Les dernières études électrochimiques du cyt c sur des électrodes modifiées reproduisant un environnement biomimétique s'appuient généralement sur des analyses par spectroscopie d'impédance électrochimique (EIS) de leur système redox (Yang et al. 2009; Lee et al. 2010). Une décennie plus tôt, les travaux de Clark et Ruzgas (Clark and Bowden 1997; Ruzgas et al. 1998) attribuaient le comportement électrochimique non idéal du cyt c adsorbé sur une électrode modifiée (élargissement des pics, distribution des cinétiques de transfert électronique) à une hétérogénéité induite par l'adsorption des protéines.

La mise au point de nouvelles techniques d'analyses en électrochimie permet d'explorer de nouvelles voies pour la compréhension de ces systèmes atypiques. La méthode électrochimique développée par Creager (Creager and Wooster 1998) puis reprise par Li (Li et al. 2000) est basée sur le traitement d'un signal d'impédance

électrochimique appliqué à l'étude de centres redox adsorbés sur l'électrode. Elle est décrite comme sensible et adaptée à l'étude de la cinétique de transfert électronique de protéines adsorbées (Eckermann et al. 2010). Les travaux de Li (Li et al. 2000) ont montré que cette méthode est adaptée pour l'étude de systèmes redox qui possèdent une dispersion des vitesses de transfert électronique.

L'objectif que nous nous fixons ici est de simuler le comportement « non idéal » du cyt c adsorbé sur une électrode modifiée. La modification de l'électrode a pour but de reproduire l'environnement naturel du cyt c afin de coupler éventuellement la nature du modificateur de surface au comportement électrochimique complexe du cyt c. Dans un premier temps, nous allons décrire les problèmes posés par les techniques électrochimiques plus « classiques » pour l'étude du système puis nous présenterons et discuterons de la publication qui a émergé du travail réalisé avec l'utilisation de la technique de Creager.

#### CARACTERISATION DU SIGNAL ELECTROCHIMIQUE NON IDEAL DU CYT C ADSORBE

La première approche pour caractériser le cyt c adsorbé sur une électrode modifiée a été d'utiliser les méthodes classiques en électrochimie comme la voltamétrie cyclique (CV). La CV est constituée d'une rampe de potentiel entre deux bornes que l'on peut répéter pour différentes vitesses de balayage. La CV d'un système redox est caractérisée par un pic d'oxydation et de réduction lors de l'aller et du retour du scan de potentiel. Selon l'approche de Butler-Volmer, la variation de l'écart entre les pics en fonction de la vitesse de balayage permet également de renseigner sur la cinétique de transfert électronique (Figure 3.1).

$$k_{ET} = \frac{\alpha n F v_c}{RT} = (1 - \alpha) \frac{n F v_a}{RT}$$

Figure 3.1 : Equation de Butler-Volmer liant vitesse de transfert électronique ( $k_{ET}$ ) et vitesse de balayage ( $\mu$ )

Cette propriété a été mise en pratique par Laviron 1979 qui a proposé une méthode de traitement des résultats sous forme de graphiques en « trompette » (trumpet-plot), représentations bien connues des électrochimistes. Dans certaines conditions expérimentales, l'écart entre les pics ne suit pas le comportement

décrit par Laviron. Un exemple concret du comportement en CV d'une électrode modifiée au CL (100% CL) est présentée Figure 3.2. Le pic d'oxydation du cyt c adsorbé varie en fonction de la vitesse de balayage. Jusqu'à un balayage de  $1 \text{ V s}^{-1}$  le potentiel de pic diminue alors que la théorie de Butler-Volmer prédit qu'il doit augmenter en cas de limitation du transfert électronique par la vitesse de balayage.

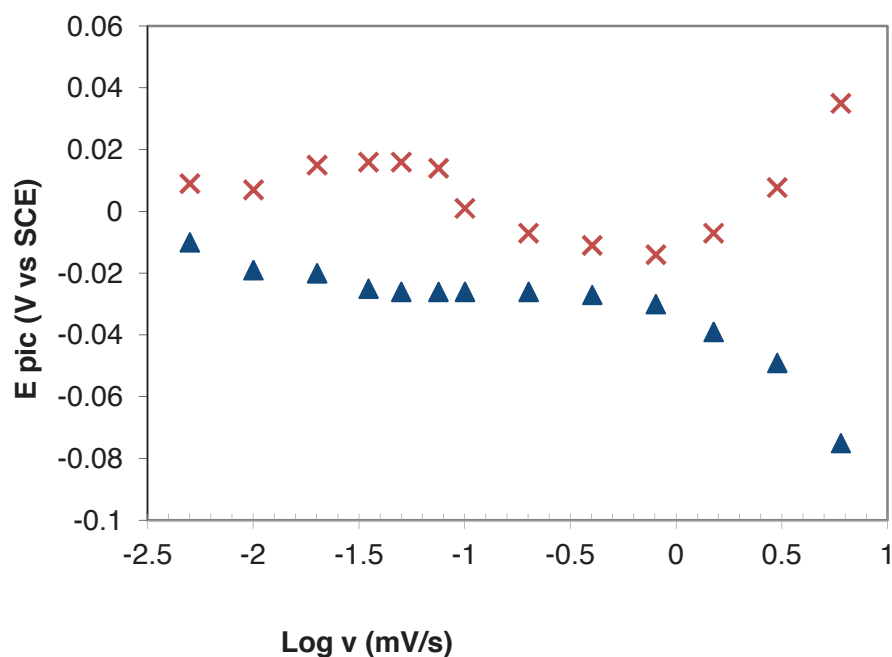


Figure 3.2 : Variation du potentiel de pic en réduction (triangle bleu) et en oxydation (croix rouge) en fonction du logarithme de la vitesse de balayage. Electrode modifiée avec  $3 \mu\text{g}$  de CL, tampon phosphate  $10 \text{ mM}$  pH 6.8, adsorption préliminaire dans  $50 \mu\text{M}$  de cyt c BH.

Cette observation est cohérente si l'on considère qu'il existe une interaction entre la charge du cyt c et une stabilisation de sa conformation. L'échelle temporelle de la cinétique de changement conformationnelle est comparable au temps d'une voltamétrie cyclique pour des vitesses de balayage de l'ordre de  $500 \text{ mV s}^{-1}$ . Aux faibles vitesses de balayage, le cyt c réduit tend à se mettre sous sa conformation la plus stable tandis qu'à haute vitesse, le cyt c n'a pas le temps de se réarranger. Ce modèle a été proposé par El Kasmi pour expliquer ce comportement quasi-réversible inhabituel (unusual quasi-reversibility – UQR) du cyt c adsorbé sur une électrode (El Kasmi et al. 2002).

L'hypothèse d'une réorganisation du cyt c réduit adsorbé sur l'électrode est cohérent avec les vitesses de transfert électroniques calculées par la méthode de Laviron (Figure 3.3).

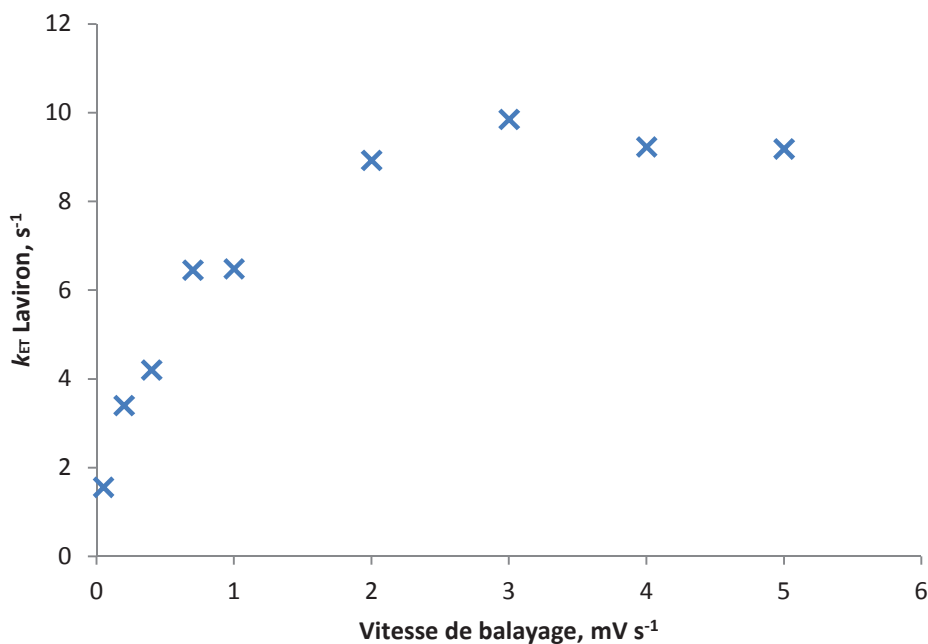


Figure 3.3 : Variation de la cinétique de transfert électronique calculée par la méthode de Laviron pour différentes vitesses de balayage. Calculs à partir de CVs d'une solution de 2.5 $\mu$ M de cyt c BH sur une électrode modifiée avec 3 $\mu$ g de PC-CL.

La vitesse de transfert électronique varie en fonction de la vitesse de balayage. Elle augmente jusqu'à atteindre une valeur seuil aux hautes vitesses de balayage. Le même profil de cinétiques de transfert électronique a également été identifié par El Kasmi et al. (El Kasmi et al. 2002).

L'explication apportée est qu'aux faibles vitesses de balayage (inférieures à 2 V s<sup>-1</sup> dans notre cas), la forme relaxée du cyt c réduit apparaît. Cette forme est caractérisée par une cinétique de transfert électronique plus faible que pour la conformation originelle du cyt c.

Ce comportement électrochimique non idéal se manifeste également par la largeur à mi-hauteur du pic voltamétrique qui n'a pas la valeur idéale théorique de 90 mV / électron échangé (Bard - Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications). L'élargissement des pics en CV du cyt c adsorbé a également été décrit par différents auteurs (Clark and Bowden 1997; Ruzgas et al. 1998; El Kasmi et al. 2002).

Il est dès lors difficile d'étudier la cinétique du cyt c adsorbé par l'analyse des « trumpet-plots ». L'objectif a alors été de se tourner vers le calcul des cinétiques de transfert électronique en se basant sur la théorie de Marcus. Cette théorie prévoit que la vitesse de transfert électronique entre un donneur et un accepteur d'électrons est dépendante de l'énergie libre ( $\Delta G$ ), de la réorganisation d'énergie ( $\lambda$ ), de la température ( $T$ ) et du couplage électronique entre les deux entités ( $H_{AB}$ ) (Marcus 1965).

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

Figure 3.4 : Equation de Marcus liant la vitesse de transfert électronique ( $k_{ET}$ ) et les différents paramètres de réorganisation de la sphère de solvation du centre redox.

La courbe suivante (Figure 3.5) permet de comparer les intensités de pics attendues aux différentes vitesses de balayage pour la théorie de Butler-Volmer et de Marcus. Les valeurs de cinétiques de transfert électronique calculées par la méthode de Marcus étaient toujours très dispersées. Toutefois, une information a pu être extraite de ces essais concernant la différence de comportement entre les espèces oxydées et réduites de cyt c adsorbées à l'électrode. En effet, les intensités de pic cathodiques suivent généralement la loi de Butler-Volmer alors que les intensités de pic anodiques correspondent davantage au modèle de Marcus (Figure 3.5).

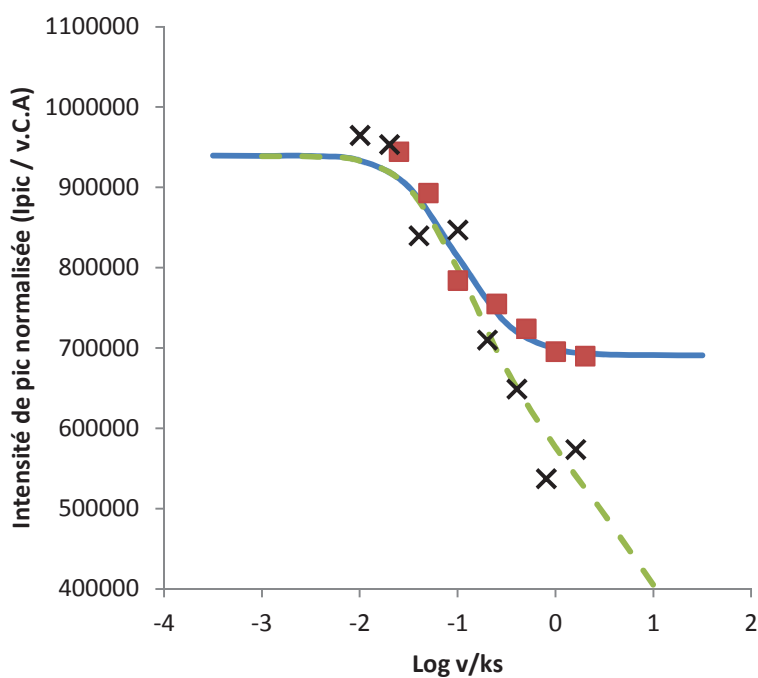


Figure 3.5 : Intensités de pic (issu des CVs) normalisées pour les pic de réduction (carré rouge) et d'oxydation (croix noire) comparées à la théorie de Butler-Volmer (courbe bleue) et de Marcus (courbe en pointillé verte - coefficient de partage utilisé pour la simulation de  $\alpha = 0.5$ ).



La loi de Marcus prend mieux en compte les effets d'un changement de l'environnement et de la distance entre le cyt c et l'électrode. Ces observations confirment le comportement électrochimique différent du cyt c selon la charge qu'il porte. Si les mesures de cinétiques semblaient si dispersées et de nature complexe, l'idée de l'adsorption différentielle de protéines à la surface de notre électrode modifiée est également apparue cohérente. Le choix d'utiliser des méthodes électrochimiques plus sensible comme la Square Wave voltamétrie puis l'AC voltamétrie et plus précisément la SPEIS s'est imposé dès l'obtention de ces résultats préliminaires.

La mise au point d'une méthode électrochimique basée sur l'AC voltamétrie adaptée à l'étude d'une électrode modifiée au CL ayant adsorbé du cyt c a fait l'objet d'un article accepté dans le journal « Biochimica et Biophysica Acta »

## PUBLICATION

## RESUME

Dans cet article, nous avons décrit le comportement électrochimique du cyt c adsorbé sur une électrode modifiée avec un dépôt de PC-CL. Il apparaît que seule la présence de CL permet l'électroactivité du cyt c car une électrode modifiée seulement à la PC ne permet pas l'immobilisation de cyt c. Une technique dérivée de l'AC voltamétrie a permis d'identifier deux sous-populations de cyt c adsorbé en présence de CL appelées sous-populations 1 et 2. Le traitement de cette électrode modifiée avec une solution à forte force ionique (0.5 M KCl) a permis de discriminer le type d'accroche de ces deux sous-populations de cyt c immobilisées. Le KCl a désorbé le cyt c de la sous-population 1 de cyt c au contraire de la sous-population 2 qui n'a pas été affectée par ce traitement. Nous avons donc supposé que la sous-population 1 est caractérisée par des interactions de type électrostatiques avec le CL tandis que la nature de la sous-population 2 est plus compliquée à caractériser. Toutefois, des différences de potentiel redox et de vitesse de transfert électronique de la sous-population 2 de cyt c ont été observées en testant deux type de CL différenciés par la nature de leur chaîne grasse (14:0 ou 18:2). Ce résultat nous suggère l'existence d'interactions de type hydrophobe pour la sous-population 2 de cyt c.

## Electrochemistry of cytochrome *c* immobilized on cardiolipin-modified electrodes: a probe for protein – lipid interactions

Antoine Perhirin<sup>a</sup>, Edouard Kraffe<sup>b\*</sup>, Yanic Marty<sup>a</sup>, François Quentel<sup>a</sup>, Philippe Elies<sup>c</sup>, Frederic Gloaguen<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>CEMCA, UMR 6521; <sup>b</sup>LEMAR, UMR 6539; <sup>c</sup>Plateforme d'Imagerie et de Mesure en Microscopie; CNRS; Université de Bretagne Occidentale; Brest, France

*E-mail:* kraffe@univ-brest.fr (EK) ; fgloague@univ-brest.fr (FG)

### Abstract

Electrochemistry of cytochrome *c* (cyt *c*) immobilized on a cardiolipin (CL) / phosphatidylcholine (PC) film supported on a glassy carbon electrode was investigated using variable-frequency AC voltammetry. At low ionic strength, we observed two redox-active subpopulations characterized by distinct values of potential ( $E_{1/2}$ ) and electron transfer rate constant ( $k_{ET}$ ). At high ionic strength, only one subpopulation was detected, consistent with the existence of very stable cyt *c* – CL adducts, most probably formed by hydrophobic interactions between the protein and the fatty acid (FA) chains carried by CL. This subpopulation exhibits a comparatively high  $k_{ET}$  value ( $> 300 \text{ s}^{-1}$ ) apparently changing with the structure of the FA chains of CL, *i.e.* 18:2(n-6) or 14:0. Our study suggests that electrochemistry can be a useful technique for probing protein – lipid interactions, and more particularly the role played by the specific structure of the FA chains of CL on cyt *c* binding.

**Keywords:** Cardiolipin; Cytochrome *c*; Electron transfer, Fatty acid chain; Lipid anchorage; Voltammetry

## 1. Introduction

Probing protein – lipid interactions is of considerable interest to gain basic understanding of structure – function relationships in biological membranes [1, 2], but also to control the construction of hybrid biological – inorganic objects [3, 4]. Cytochrome *c* (cyt *c*) is a water-soluble protein involved in the respiratory chain of mitochondria [5]. The heme group of cyt *c* shuttles electrons from cyt *c* reductase to cyt *c* oxidase. Cardiolipin (CL) is an essential component of the inner mitochondrial membrane [6]. This negatively charged phospholipid bears two phosphate moieties and four fatty acid (FA) chains of length ranging from 14 to 22 carbon atoms. CL plays a key role in maintaining optimal activity of numerous mitochondrial processes, such as electron transfer and ADP/ATP translocation [7], but also cell apoptosis [8]. The specific structure of FA chains seems to be an important requirement for biological functions of CL [9]. Interactions between cyt *c* and CL have been extensively investigated using liposomes [10, 11]. At neutral pH, cyt *c* holds a positive charge of *ca.* +7 (the actual charge depends on the organism from which it derives), whereas CL carries a negative charge of –1 [12] explaining the occurrence of electrostatic interaction between this two physiological partners. In addition, evidence for the formation of cyt *c* – CL adducts stabilized by hydrogen bonding and hydrophobic interactions at specific sites on the protein scaffold have been reported [13, 14]. According to the so-called lipid anchorage theory [13, 15-18], one or two FA chains of CL find a place into a large hydrophobic channel of cyt *c*, which extends from the surface of protein to the neighborhood of the heme group, while the other FA chains remains within the mitochondrial lipid layer to secure the binding.

The direct electrochemical reduction of cyt *c* is irreversible at most conventional electrodes [19]. Reversible electron transfer (ET) between the heme group of cyt *c* and the electrode has however been achieved using surface modifiers such as bipyridine adsorbed on gold [19] or self-assembled monolayers (SAMs) [3, 20]. In addition, the redox properties of cyt *c* immobilized on negatively charged SAMs has been used as a probe of the protein conformation and/or orientation [21-24]. Both the redox potential and the ET rate depend on the structure of the molecules composing the SAMs. Lipid films containing CL have also been used to mediate ET between cyt *c* and the electrode supporting the film [25-28]. As seen for negatively charged SAMs, electrostatic interaction between cyt *c* and a CL-modified electrode is believed to permit the binding of the protein in an orientation allowing ET [27]. Another possibility is the formation of cyt *c* – CL adducts stabilized by lipid anchorage, but this hypothesis remains to be tested.

The objective of the present study was to determine whether electrochemistry of cyt *c* immobilized on a lipid-modified electrode could provide insights on the interactions between cyt *c* and CL. This approach requires precise measurements of the redox properties of CL-bound cyt *c*. To this aim, instead of cyclic voltammetry (CV), we used the variable-frequency AC voltammetry (ACV) method developed by Creager and coworkers [29, 30]

allowing the study of small amounts of immobilized redox centers transferring electrons at different potentials and rates. Finally, the role played by hydrophobic interaction on electrochemistry of CL-bound cyt c was probed using electrodes modified by CL carrying either saturated or unsaturated FA chains, *i.e.* myristic acid (14:0) or linoleic acid (18:2(n-6)).

## 2. Materials and methods

### 2.1. Materials

Natural soybean phosphatidylcholine (PC) with FA of composition 18:2(n-6) (66.8%), 16:0 (14.7%) and 18:1(n-9) (7.1%), and 1,1',2,2'-tetramyristoyl cardiolipin (CL14:0) were obtained from Avanti Polar Lipids. 1,1',2,2'-tetralinoleoyl cardiolipin (CL18:2(n-6)) was purchased from Sigma. Lipids were purified using high performance liquid chromatography (HPLC), and then dissolved in chloroform/methanol mixture (98/2 v/v) to prepare ca.  $0.1 \mu\text{g} \mu\text{L}^{-1}$  solutions containing CL and PC in a 20/80 molar ratio. Exact lipid concentration was determined by quantitative analysis of FA using FA23:0 as an internal standard [31]. Briefly, after addition of  $\text{BF}_3$  in  $\text{CH}_3\text{OH}$  (0.8 mL, 14% w) and butylated hydroxytoluene (0.01% w/w) as antioxidant, the lipids were transesterified by heating at  $100^\circ\text{C}$  during 10 min. The amount of FA methyl esters was measured using a gas chromatograph equipped with an on-column injector and a flame-ionization detector. Cyt c from bovine heart provided by Sigma was used without additional purification. All other reagents were of the highest purity available. Solutions containing cyt c ( $50 \mu\text{M}$ ) and TRIS-HCl buffer (20 mM, pH 7.0) were prepared using deionized water coming from a MilliQ Millipore system. EDTA (1 mM) was added to prevent divalent cation substitution [28]. Protein solutions were stored at  $4^\circ\text{C}$  and discarded when older than one week.

### 2.2. Preparation of lipid-modified electrodes

The electrode supporting the lipid film was a glassy carbon (GC) rotating disk electrode of  $0.071 \text{ cm}^2$  (Metrohm) polished with alumina to a mirror finish, cleaned in water using an ultrasound bath, and rinsed with acetone. Several drops (*ca.*  $2 \mu\text{L}$ ) of lipid solution were deposited on the GC disk to obtain a total amount of  $1 \mu\text{g}$  of lipids. Solvents were then evaporated by rotation of the electrode at 500 rpm.

### 2.3. Electrochemical measurements

Electrochemical experiments were carried out in a standard three-electrode cell at the controlled temperature of  $25 \pm 0.1$  °C. The reference electrode was a saturated calomel electrode (SCE) and the counter electrode a platinum wire. Voltammetric data were recorded using a potentiostat (PGSTAT30A, Autolab) equipped with a FRA additional module. To immobilize cyt c on the lipid film, the electrode was immersed in an argon-purged cyt c solution and cycled between 0.3 and  $-0.3$  V vs. SCE at a scan rate of  $50 \text{ mV s}^{-1}$  (Fig. S1 in supplementary data). Then, the electrode was gently washed with argon-purged TRIS-HCl buffer solution (20 mM, pH 7) and transferred to a second cell containing the same buffer solution but no cyt c. Measurements of the redox potential ( $E_{1/2}$ ) and ET rate of cyt c immobilized on the lipid-modified electrode was carried out using the frequency-variable ACV method developed by Creager and coworkers [29, 30]. ACV experiments at high frequencies showed two redox peaks. As a result, for each peak potential, a plot of the background corrected peak current against the logarithm of the frequency was fitted using an equivalent circuit, which simulates an electrode modified by adsorbed redox species exhibiting a distribution of ET rate constants. This procedure gave us the value of the ET rate constant ( $k_{\text{ET}}$ ) and coverage ( $\Gamma$ ) of each cyt c subpopulation (see supplementary data for further details). Electrochemical measurements were repeated at least four times with each time a completely new lipid-modified electrode. The mean values of  $E_{1/2}$ ,  $k_{\text{ET}}$  and  $\Gamma$  thus obtained were statistically compared using Statgraphics 5.1+ software. Analysis of variance (ANOVA) was carried out using the post-hoc Fisher's least significant difference test. ANOVA was performed as long as criteria of normality and homogeneity of variances were respected. For data set not following criterion of normality, non parametric Kruskal-Wallis ANOVA was performed. For each group of means tested, differences were considered as significant when P-value < 0.05.

### 2.4. Atomic force microscopy images

Images of the GC electrode and the lipid film were obtained under ambient condition using a multimode AFM (Nanoscope V, Digital Instruments, Veeco). Tapping mode was used to reduce the potentially destructive lateral forces exerted on the lipid film. Topographic and error amplitude images were simultaneously recorded using commercial silicon probes of nominal radius < 10 nm (TAP150, Veeco) and cantilevers of spring constant of  $5 \text{ N m}^{-1}$  and resonant frequency of 20 kHz (MPP12100, Nanodevices).

### 3. Results and Discussion

#### 3.1. Characterization and stability of the supported lipid film

Unless otherwise noted, the lipid film was composed of PC and either CL 14:0 or CL18:2 in 80/20 molar ratio to mimic the mitochondrial membrane composition [6]. This choice is furthermore justified by the finding that cyt *c* interacts more favorably with CL when the latter is mixed with PC [32]. Besides, we verified that a GC electrode covered with a film of pure PC does not efficiently exchange electrons with cyt *c* (Fig. S2 in supplementary data) [26].

The good quality of the CL/PC film coating the GC electrode was confirmed by inspection of the AFM images recorded on the same spot before and after evaporation of a drop of lipid solution. As shown in Fig. 1, the surface is fully covered by lipids forming most certainly a monolayer. Small patches on the top of the lipid film can also be observed. Since the relative height of these patches is *ca.* 2 nm, they are ascribed to the formation of a bilayer.

The coating of the GC electrode by the lipid film was additionally checked using  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$  as a redox probe (Fig. S3 in supplementary data). As expected, the electrochemical signal of this anion in TRIS-HCl buffer solution (pH 7) is mostly suppressed after modification of the GC electrode with a negatively charged lipid film. This redox behavior points to the successful formation of a lipid film covering the entire electrode surface. We however note that the current – potential response is not flat but takes the shape of a wave, as would be observed in the case of an array of microelectrodes, suggesting the existence of pinholes [33]. Small defects in the lipid film are without consequences for the study of the electrochemistry of immobilized cyt *c*, since there is no direct ET between the protein and a bare GC electrode (*vide infra*).

The stability of the lipid film under electrochemical conditions was verified by re-dissolution of the lipids in chloroform at the end of a series of measurements. Quantitative analysis by gas chromatography indicated that less than 20% of the amount initially deposited was lost after a period of two hours, emphasizing the good stability of the lipid-modified electrode. In a previously reported study, CL was mixed with cholesterol to improve the stability of the lipid film during long-time electrochemical measurements [27]. This method was found unnecessary because of the stability of our lipid film, and was disregarded as the presence of cholesterol could alter the interactions between CL and cyt *c*.

### 3.2. Electrochemistry of cyt c at CL/PC-modified electrode

We first verified by CV that there is no ET between cyt *c* in solution and a bare GC electrode (Fig. 2) [27]. After modification of the GC electrode with a CL/PC film, CV shows reversible redox peaks ascribed to the reduction and the oxidation of the heme group of cyt *c*. In the course of potential cycling, the redox peaks develop in height, eventually reaching a maximum value after a period of 5–10 min (Fig. S1 in supplementary data). This electrochemical response indicates that saturation coverage of cyt *c* on the lipid film is achieved. During the cycling procedure, the half-peak potential is slightly shifted toward negative values, consistent with previous observations [22, 34]. As shown in Fig. 2, the half-peak potential of the heme group of cyt *c* is  $E_{1/2} = -11$  mV vs. SCE with a peak-to-peak separation  $\Delta E_p = 44$  mV at a scan rate of  $50 \text{ mV s}^{-1}$ , in good agreement with the voltammetric data measured under similar conditions at a CL-modified graphite electrode [28].

The voltammograms recorded after the transfer of the CL/PC-modified electrode saturated with surface-confined cyt *c* in a cell containing no protein clearly show a signal lost (Fig. 2), indicating that the amount of cyt *c* in the vicinity of the electrode has significantly decreased. The most possible explanation is that free-diffusing cyt *c* is able to exchange electrons with the electrode through the lipid film, hence the large signal in solution containing protein. In addition, removal of surface-confined protein loosely interacting with the lipid film is very likely during the transfer procedure. The methodology used here is therefore suitable to limit the electrochemical measurements to the fraction of cyt *c* that interacts either electrostatically or hydrophobically with the lipid film.

CV of immobilized cyt *c* shows redox peaks spanning over a large potential range (Fig. 2). In contrast, the ACV displays a sharp peak that can be easily discriminated from the background current (Fig. 3). The ACV measured at the frequency of 4 Hz shows a peak for immobilized cyt *c* centered at about  $-20$  mV vs. SCE. The formal potential of cyt *c* in solution is  $E_{1/2,\text{sol}} \approx +15$  mV vs. SCE. Although the measured redox potential for immobilized cyt *c* varies with the electrode material and the nature of the modifier, electrochemical and spectroscopic studies have shown that a large potential shift up to  $-0.4$  V relative to  $E_{1/2,\text{sol}}$  may be associated with large modification of the protein structure away of its native state [35]. Here the potential is only slightly downshifted by relative to that in solution, as in the case of gold electrodes coated with alkanethiols terminating in carboxylic acid groups [20], which indicates that cyt *c* immobilized on the lipid film is not denatured.

A full monolayer of cyt *c* would correspond to a surface concentration of about 15 pmol of protein per  $\text{cm}^2$  [23]. The surface concentrations measured by ACV were 5.2 and 8.1  $\text{pmol cm}^{-2}$  for CL14:0 and 18:2, corresponding to a theoretical surface coverage of 35% and 54%, respectively (Table 1). We however note that the actual surface coverage of immobilized protein should be significantly lower since the roughness factor of the glassy carbon electrode largely exceeds unity (see AFM images in Fig. 1).

### 3.3. Evidence for two subpopulations of immobilized cyt c

Five representative ACVs acquired at frequencies ranging from 4 to 692 Hz for cyt c immobilized on a CL/PC-modified electrode are shown in Fig. 3. At low frequencies, there is one redox peak centered at about -20 mV. The peak current rapidly decreases with increasing the frequency, indicating that the redox process under scrutiny cannot exchange electrons rapidly. At frequencies exceeding 30 Hz, a new redox peak centered at about -130 mV appears. The height of this second peak is much less responsive to frequency increase, indicating a fast ET process. This electrochemical behavior, which was observed at both CL14:0/PC- and CL18:2/PC-modified electrodes, can only be explained by the existence of two independent subpopulations of immobilized redox molecules exhibiting different redox potentials and ET rates. Additional support for this assumption was obtained from the plot of the background corrected ACV current at -50 mV against the logarithm of the frequency, on which two distinct sigmoids centered respectively below 1 Hz and above 100 Hz could be clearly observed (Fig. S4 in supplementary data) [29, 30].

The redox potential ( $E_{1/2}$ ), and corresponding ET rate constant ( $k_{ET}$ ) and protein coverage ( $\Gamma$ ), calculated from the ACV measurements for each subpopulation are listed in Table 1 (see also Figs. S5 and S6 in supplementary data). Cyt c of subpopulation 1, which represents the majority of immobilized protein, is characterized by a comparatively slow ET rate at a potential close to that of the protein in solution. In contrast, cyt c of subpopulation 2 exchanges electrons at high rate, but at a redox potential negatively shifted by more than 100 mV. Shift in reduction potentials appears thus to parallel the strength of interactions between cyt c and the lipid film. Numerous studies using liposomes have reported the existence of two subpopulations of cyt c bound to CL [14, 18, 25, 36, 37]. In most cases, it has been shown that about 90% of the total amount correspond to electrostatically-bound cyt c, while the remaining 10% correspond to hydrophobically-bound cyt c. In our work, subpopulation 2, which is the less abundant, was calculated to represent respectively 15% for CL14:0/PC and 5% for CL18:2/PC of the total coverage of immobilized cyt c. After extensive washing of the electrode with a high ionic strength solution (*i.e.* 0.5 M KCl), the signal corresponding to subpopulation 1 is almost suppressed, while that corresponding to subpopulation 2 remains mainly unchanged (Fig. 4). These observations strongly suggest that subpopulation 2 is composed of very stable cyt c – CL adducts formed by hydrophobic interactions, whereas subpopulation 1 corresponds to cyt c interacting mainly electrostatically with CL.

The ET rates measured for cyt c of subpopulation 2 are order of magnitudes larger to that measured with cyt c electrostatically immobilized on SAM formed by a thiol spacer comprising a similar number of carbon atoms [23]. Although insertion of cyt c into the lipid film might occur, 'simple' distance-dependent electron tunneling process cannot explain the magnitude of the ET rate measured for subpopulation 2 at the lipid-modified electrodes [38]. The most likely assumption is that formation of stable cyt c – CL adducts modifies the orientation of the protein relative to the electrode surface and/or the coordination sphere of the iron ion in the heme group, hence



accelerating the ET rate. Indeed, replacement of the amino acid axially coordinating the heme group of immobilized cyt c has been shown to have a pronounced effect on the ET rate [35].

#### 3.4. Dependence of the ET rate on the nature of CL

For subpopulation 1, it seems at first sight that the average rate constant is slower at CL18:2/PC- than CL14:0/PC-modified electrode ( $k_{ET} = 8 \pm 2 \text{ s}^{-1}$  and  $30 \pm 11 \text{ s}^{-1}$ , respectively) (Table 1). Nevertheless, statistical analysis of these mean values showed that the difference is not significant (P-value = 0.18), leading to the conclusion that there is no influence of the nature of the CL on the redox properties of cyt c composing subpopulation 1.

Cyt c composing subpopulation 2 behaves differently. Mean values of  $k_{ET}$  showed that there is for the subpopulation 2 an effect of the nature of the CL composing the lipid film (P-value = 0.002). The ET rate is twice faster at a CL18:2/PC- than at CL14:0/PC-modified electrode. This results points to an effect of the structure of the FA chains on the ET rate of cyt c composing subpopulation 2. Evidence for specific interactions between the double carbon bonds in the FA chains of CL and bound cyt c has been obtained by spectroscopic methods [36]. According to the lipid anchorage theory, one or two FA chains are brought in close vicinity to the heme group of cyt c. Our study tends to show that such interaction might provide a more favorable pathway for ET in the case of 18:2(n-6) FA chains holding double carbon bonds at specific locations. This assumption is yet speculative and additional electrochemical experiments using CL carrying 18:0 and 18:1 FA chains are needed to address more precisely this issue, and more broadly the question of the biological function of atypical FA chain composition in CL of eukaryotes.

## 4. Conclusions

Prior to our work, there have been several studies on the electrochemistry of cyt c at electrodes modified by phospholipids. However the main goal was to measure the rate of ET under various conditions of pH and ionic strength, without any particular interest to the biophysical properties and the biological functions of the phospholipids.

Herein, lipids were carefully analyzed and the lipid film was composed of CL and PC in a 20/80 molar ratio to mimic the mitochondrial membrane composition. Using ACV, we were able to characterize two subpopulations of cyt c bound to CL, a result that could not be obtained using classical CV techniques. At high ionic strength, only one subpopulation remained detected, consistent with the existence of very stable cyt c – CL adducts, most

probably formed by hydrophobic interactions. This assumption was further supported by the high  $k_{ET}$  values ( $> 300 \text{ s}^{-1}$ ) measured for this cyt *c* subpopulation. This finding allowed us to analyze more finely the influence of CL on the electrochemistry of cyt *c*. We found that the ET rate of hydrophobically-bound cyt *c* is twice faster at a CL18:2/PC- than at a CL14:0/PC-modified electrode. Our study suggests that electrochemistry might be a useful technique for probing protein – lipid interactions, and particularly the role played by the specific structure of FA chains on conformation and orientation of cyt *c* bound to CL.

### Acknowledgement

We thank Université de Bretagne Occidentale (UBO) and Centre National de Recherche Scientifique (CNRS) for their financial support and AP thanks UBO for a PhD thesis grant.

### References

- [1] D. Marsh, Lipid-protein interactions in membranes, *FEBS Lett.*, 268 (1990) 371-375.
- [2] O.S. Andersen, R.E. Koeppe, Bilayer Thickness and Membrane Protein Function: An Energetic Perspective, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 36 (2007) 107-130.
- [3] M. Mrksich, G.M. Whitesides, Using self-assembled monolayers to understand the interactions of man-made surfaces with proteins and cells, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 25 (1996) 55-78.
- [4] S. Mann, Self-assembly and transformation of hybrid nano-objects and nanostructures under equilibrium and non-equilibrium conditions, *Nat. Mater.*, 8 (2009) 781-792.
- [5] M. Fedurco, J. Augustynski, C. Indiani, G. Smulevich, M. Antalík, M. Bano, E. Sedlak, M.C. Glascock, J.H. Dawson, Electrochemistry of unfolded cytochrome *c* in neutral and acidic urea solutions, *J. Am. Chem. Soc.*, 127 (2005) 7638-7646.
- [6] G. Daum, Lipids of mitochondria, *Biochim. Biophys. Acta*, 822 (1985) 1-42.
- [7] M. Schlame, D. Rua, M.L. Greenberg, The biosynthesis and functional role of cardiolipin, *Prog. Lipid Res.*, 39 (2000) 257-288.

[8] X. Liu, C.N. Kim, J. Yang, R. Jemmerson, X. Wang, Induction of Apoptotic Program in Cell-Free Extracts: Requirement for dATP and Cytochrome c, *Cell*, 86 (1996) 147-157.

[9] M. Schlame, S. Brody, K.Y. Hostetler, Mitochondrial cardiolipin in diverse eukaryotes, *Eur. J. Biochem.*, 212 (2005) 727-733.

[10] T.J.T. Pinheiro, The interaction of horse heart cytochrome c with phospholipid bilayers. Structural and dynamic effects, *Biochimie*, 76 (1994) 489-500.

[11] J. Hanske, J.R. Toffey, A.M. Morenz, A.J. Bonilla, K.H. Schiavoni, E.V. Pletneva, Conformational properties of cardiolipin-bound cytochrome c, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 109 (2012) 125-130.

[12] M. Kates, J.-Y. Syz, D. Gosser, T. Haines, pH-dissociation characteristics of cardiolipin and its 2'-deoxy analogue, *Lipids*, 28 (1993) 877-882.

[13] M. Rytömaa, P. Mustonen, P.K. Kinnunen, Reversible, nonionic, and pH-dependent association of cytochrome c with cardiolipin-phosphatidylcholine liposomes, *J. Biol. Chem.*, 267 (1992) 22243-22248.

[14] J.D. Cortese, A.L. Voglino, C.R. Hackenbrock, Persistence of cytochrome c binding to membranes at physiological mitochondrial intermembrane space ionic strength, *Biochim. Biophys. Acta*, 1228 (1995) 216-228.

[15] M. Rytömaa, P.K. Kinnunen, Evidence for two distinct acidic phospholipid-binding sites in cytochrome c, *J. Biol. Chem.*, 269 (1994) 1770-1774.

[16] M. Rytömaa, P.K.J. Kinnunen, Reversibility of the Binding of Cytochrome c to Liposomes, *J. Biol. Chem.*, 270 (1995) 3197-3202.

[17] E.K.J. Tuominen, C.J.A. Wallace, P.K.J. Kinnunen, Phospholipid-Cytochrome c Interaction, *J. Biol. Chem.*, 277 (2002) 8822-8826.

[18] F. Sinibaldi, B. Howes, M. Piro, F. Polticelli, C. Bombelli, T. Ferri, M. Coletta, G. Smulevich, R. Santucci, Extended cardiolipin anchorage to cytochrome c: a model for protein-mitochondrial membrane binding, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 15 (2010) 689-700.

[19] M.J. Eddowes, H.A.O. Hill, Electrochemistry of horse heart cytochrome c, *J. Am. Chem. Soc.*, 101 (1979) 4461-4464.

[20] M.J. Tarlov, E.F. Bowden, Electron-transfer reaction of cytochrome c adsorbed on carboxylic acid terminated alkanethiol monolayer electrodes, *J. Am. Chem. Soc.*, 113 (1991) 1847-1849.

[21] X. Chen, R. Ferrigno, J. Yang, G.M. Whitesides, Redox Properties of Cytochrome c Adsorbed on Self-Assembled Monolayers: A Probe for Protein Conformation and Orientation, *Langmuir*, 18 (2002) 7009-7015.

[22] P. Hildebrandt, D.H. Murgida, Electron transfer dynamics of cytochrome c bound to self-assembled monolayers on silver electrodes, *Bioelectrochemistry*, 55 (2002) 139-143.

[23] M.T. de Groot, T.H. Evers, M. Merkx, M.T.M. Koper, Electron Transfer and Ligand Binding to Cytochrome c' Immobilized on Self-Assembled Monolayers, *Langmuir*, 23 (2007) 729-736.

[24] Y. Chen, X.J. Yang, L.R. Guo, B. Jin, X.H. Xia, L.M. Zheng, Direct electrochemistry of cytochrome c on a phosphonic acid terminated self-assembled monolayers, *Talanta*, 78 (2009) 248-252.

[25] Z. Salamon, G. Tollin, Interaction of horse heart cytochrome c with lipid bilayer membranes: effects on redox potentials, *J. Bioenerg. Biomembr.*, 29 (1997) 211-221.

[26] S. Boussaad, L. Dziri, R. Arechabaleta, N.J. Tao, R.M. Leblanc, Electron-Transfer Properties of Cytochrome c Langmuir-Blodgett Films and Interactions of Cytochrome c with Lipids, *Langmuir*, 14 (1998) 6215-6219.

[27] H. Park, J.-S. Park, Y.-B. Shim, Electrochemical and in situ UV-visible spectroscopic behavior of cytochrome c at a cardiolipin-modified electrode, *J. Electroanal. Chem.*, 514 (2001) 67-74.

[28] Y. Huang, L. Liu, C. Shi, J. Huang, G. Li, Electrochemical analysis of the effect of Ca<sup>2+</sup> on cardiolipin-cytochrome c interaction, *Biochim. Biophys. Acta*, 1760 (2006) 1827-1830.

[29] S.E. Creager, T.T. Wooster, A New Way of Using ac Voltammetry To Study Redox Kinetics in Electroactive Monolayers, *Anal. Chem.*, 70 (1998) 4257-4263.

[30] J. Li, K. Schuler, S.E. Creager, A Generalized Equivalent-Circuit Model for Electroactive Monolayers Exhibiting a Fixed Redox Potential and a Distribution of Electron-Transfer Rate Constants I. Square Distributions, *J. Electrochem. Soc.*, 147 (2000) 4584-4588.

[31] Y. Marty, F. Delaunay, J. Moal, J.F. Samain, Changes in the fatty acid composition of *Pecten maximus* (L.) during larval development, *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 163 (1992) 221-234.

[32] K. Shin, T. Fujiwara, H. Akutsu, Modulation of the specific interaction of cardiolipin with cytochrome c by zwitterionic phospholipids in binary mixed bilayers; a <sup>2</sup>H and <sup>31</sup>P NMR study, *J. Mol. Struct.*, 355 (1995) 47-53.

[33] H.O. Finklea, D.A. Snider, J. Fedyk, E. Sabatani, Y. Gafni, I. Rubinstein, Characterization of octadecanethiol-coated gold electrodes as microarray electrodes by cyclic voltammetry and ac impedance spectroscopy, *Langmuir*, 9 (1993) 3660-3667.

[34] S. Todorovic, C. Jung, P. Hildebrandt, D. Murgida, Conformational transitions and redox potential shifts of cytochrome P450 induced by immobilization, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 11 (2006) 119-127.

[35] S. Monari, D. Millo, A. Ranieri, G. Di Rocco, G. van der Zwan, C. Gooijer, S. Peressini, C. Tavagnacco, P. Hildebrandt, M. Borsari, The impact of urea-induced unfolding on the redox process of immobilised cytochrome c, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 15 (2010) 1233-1242.

[36] T.J.T. Pinheiro, P.J. Bratt, I.H. Davis, D.C. Doetschman, A. Watts, Spin-lattice relaxation times of phospholipid aminoxyl spin labels in cardiolipin–cytochrome c bilayers: a pulse saturation–recovery EPR study, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, 1993 (1993) 2113–2117.

[37] P.K.J. Kinnunen, On the molecular-level mechanisms of peripheral protein-membrane interactions induced by lipids forming inverted non-lamellar phases, *Chem. Phys. Lipids*, 81 (1996) 151-166.

[38] G. McLendon, Long-distance electron transfer in proteins and model systems, *Acc.Chem. Res.*, 21 (1988) 160-167.

## Tables

Table 1. Redox potential ( $E_{1/2}$ ), and the corresponding ET rate constant ( $k_{ET}$ ) and cyt *c* coverage ( $\Gamma$ ) calculated from ACV for the two different subpopulations of cyt *c* immobilized either on a CL14:0- or a CL 18:2-modified electrode. The mean values of  $E_{1/2}$ ,  $k_{ET}$  and  $\Gamma$  were extracted from four (CL14:0) and seven (CL18:2) independent measures (see text).

Lipid film	$E_{1/2}$ (V vs. SCE)	$k_{ET}$ ( $s^{-1}$ )	$\Gamma$ (pmol $cm^{-2}$ )
<b>CL14:0</b>			
Subpopulation 1	$-0.010 \pm 0.006$	$30 \pm 11$	$5.2 \pm 2.5$
Subpopulation 2	$-0.120 \pm 0.009$	$306 \pm 9$	$0.9 \pm 0.1$
<b>CL18:2</b>			
Subpopulation 1	$-0.020 \pm 0.004$	$8 \pm 2$	$8.1 \pm 3.1$
Subpopulation 2	$-0.141 \pm 0.008$	$689 \pm 64$	$0.4 \pm 0.1$

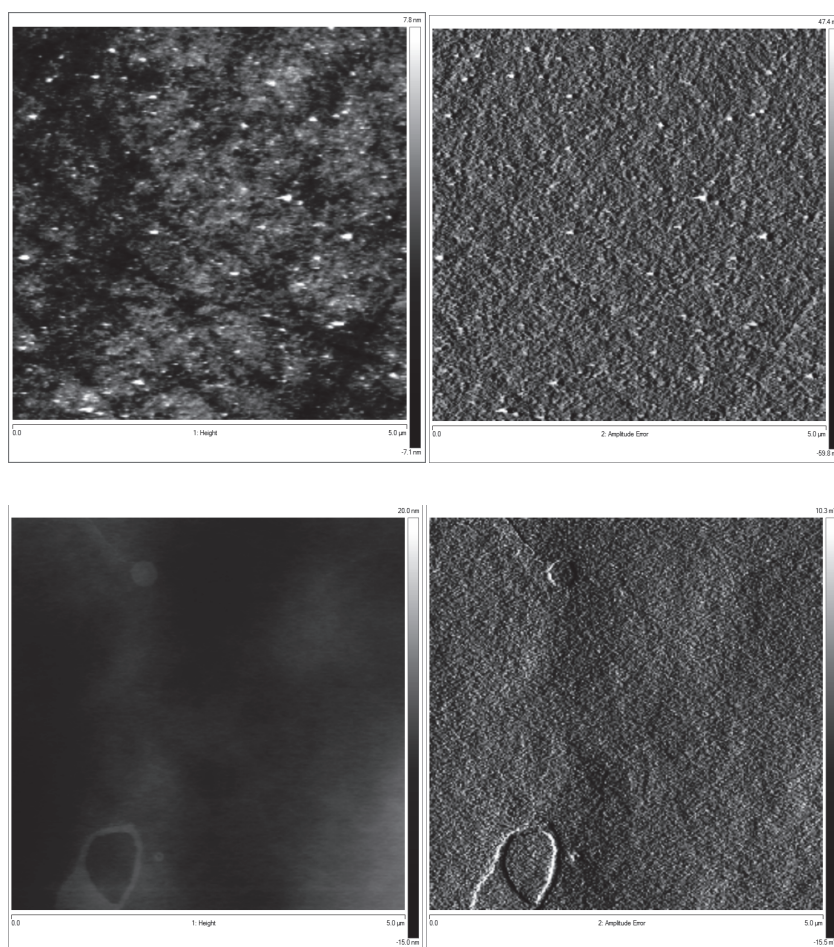


Fig. 1. Topographic (left) and error amplitude (right) AFM images. Same spot on the electrode before (A) and after (B) deposition of a CL/PC film. Small patches of bilayer characterized by a relative height of 2 nm can be observed at the bottom left.

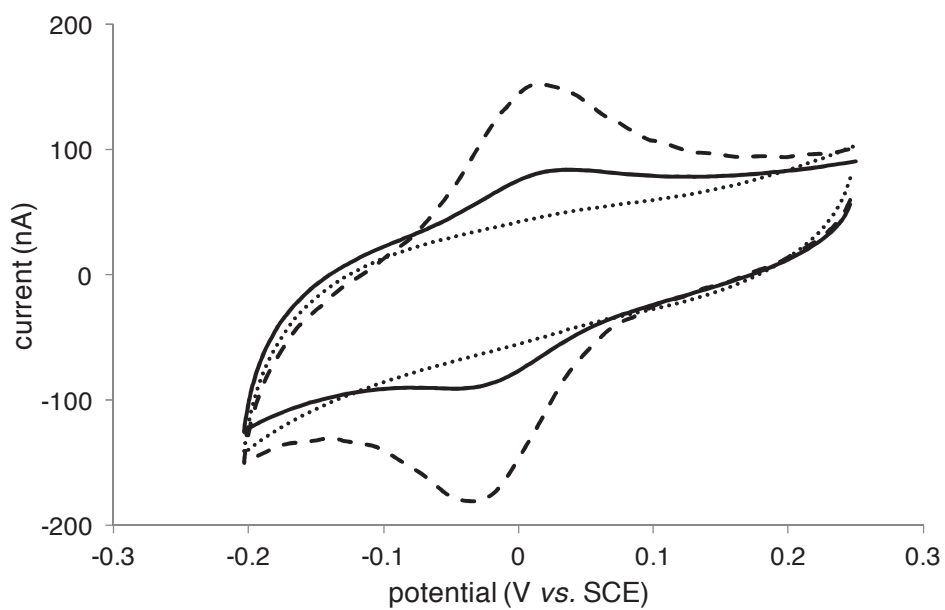


Fig. 2. Representative examples of voltammograms recorded at a bare GC electrode (dotted trace) and a CL/PC-modified GC electrode (dashed trace) in a solution containing 50  $\mu\text{M}$  cyt *c* and 20 mM TRIS-HCl (pH 7). The voltammogram recorded for the same lipid-modified GC electrode after transfer in a 20 mM TRIS-HCl buffer solution that does not contain cyt *c* is also shown (solid trace).



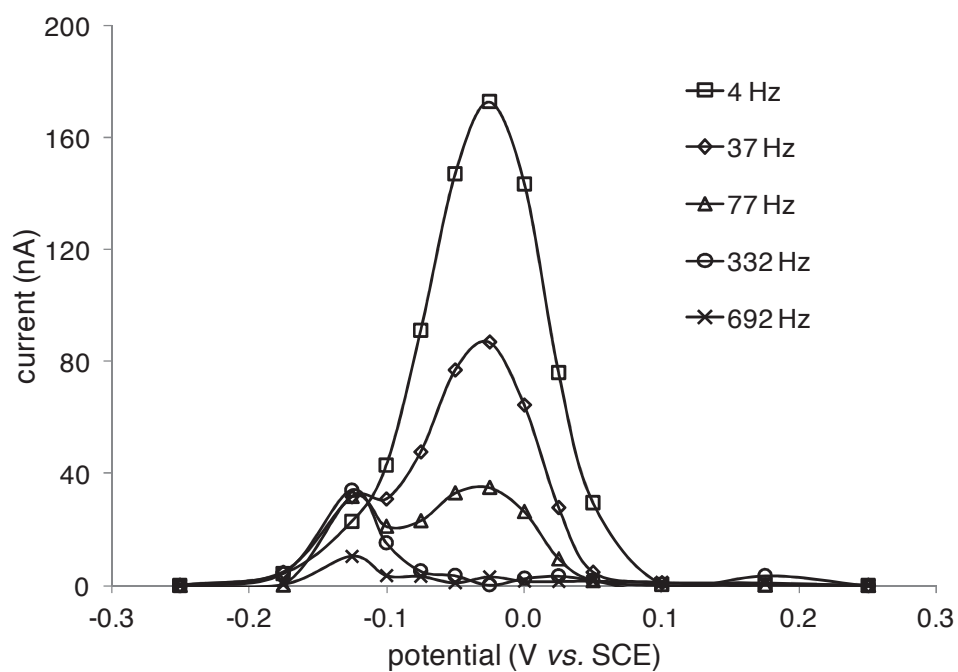


Fig. 3. Representative AC voltammograms recorded at frequencies ranging from 4 to 692 Hz for cyt c immobilized on a CL/PC-modified GC electrode in a 20 mM TRIS-HCl buffer solution (pH 7). Data are background corrected.

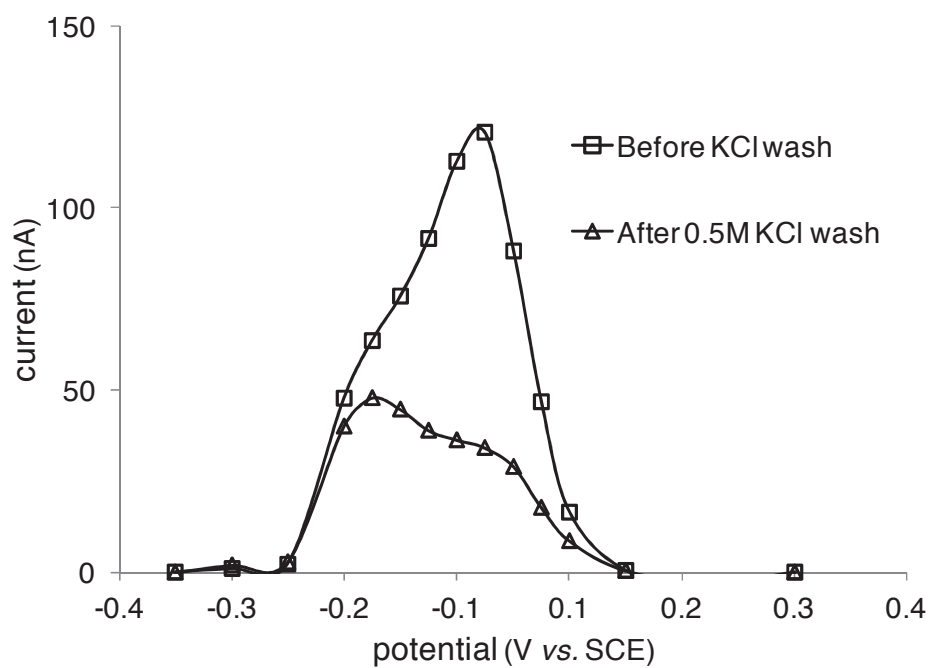


Fig. 4. AC voltammograms recorded at a frequency of 24 Hz for cyt c immobilized on a CL/PC-modified electrode before (open squares) and after (open triangles) washing with 0.5 M KCl solution.

## DISCUSSION

Ces premiers résultats ont permis d'affiner les conditions de fabrication du film lipidique modifiant l'électrode. Par exemple, les premières électrodes étaient modifiées avec l'ajout de 3 à 10  $\mu\text{g}$  de CL (100% CL) par spin coating sans précautions particulières. Le tampon de mesure était un tampon phosphate 10 mM. Les conditions expérimentales présentées dans l'article ci-dessus ont permis d'améliorer sensiblement la qualité et la répétabilité des mesures. Par la suite, les conditions et précautions finales de dépôt lipidique retenues à la fin de nos travaux ont encore été affinées pour tendre vers les paramètres suivants :

0.5  $\mu\text{g}$  de PC/CL (80/20) déposés sur l'électrode

Traitement thermique sur électrode tournante (2500 tr  $\text{mn}^{-1}$ ) pour l'obtention d'une monocouche répétable

Dépôt sous cloche d'Argon ou de diazote et/ou ajout de BHT pour éviter la peroxydation des lipides polyinsaturés

Tampon de mesure TRIS 20 mM pH 7.4 avec 20 mM KCl comme électrolyte support et 1 mM d'EDTA pour s'affranchir de l'effet de la présence inopportune de cations divalents.

Globalement, les paramètres ont également évolué pour tendre vers les conditions physicochimiques présentes naturellement dans la mitochondrie dans le but de s'approcher d'un système électrochimique biomimétique (Gorbenko et al. 2006) :

pH 7.4

Force ionique : 0.15 M

%mol CL dans la membrane interne : 16-20 %

Pour étudier le phénomène d'accroche, les précédentes publications jouent plutôt sur la concentration de cyt c, la force ionique ou bien la présence de molécules provoquant la désorption du cyt c (urée, calcium, ...).

Ainsi, certaines études soulignent l'importance capitale de la force ionique sur l'accroche de cyt c sur une électrode modifiée (Salamon and Tollin 1997; Ruzgas et al. 1998). A force ionique forte voire modérée (0.2 M pour Ruzgas 1998), le cyt c en solution ne s'adsorbe plus sur une électrode d'or modifiée avec des SAMs.

Dans le cadre de nos travaux, la phase d'adsorption du cyt c dans la première cellule électrochimique a été testée pour différentes forces ioniques. Le voltamogramme suivant représente l'accroche de cyt c sur une électrode modifiée dans une cellule électrochimique contenant 15  $\mu\text{M}$  de cyt c de cœur de bœuf (Bovin Heart –BH) avec ou sans ajout de 50 mM de KCl.

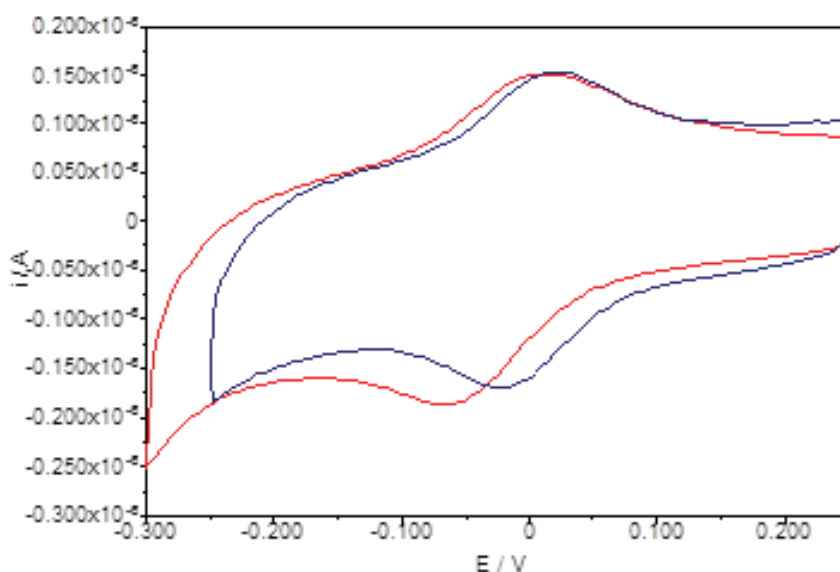


Figure 3.6 : Voltamétrie cyclique de cyt c BH adsorbé sur une électrode de GC modifiée avec 1.5 $\mu\text{g}$  de PC-CL 18:2 80-20, conditions de mesure : Tampon phosphate 10mM pH 6.8 à 25°C avec (courbe en bleu) ou sans (courbe en rouge) KCl 50mM

En présence de KCl, le système électrochimique a un potentiel redox décalé de +25 mV et la vitesse de transfert d'électrons est plus de deux fois plus rapide que celle en absence de KCl ( $k_{\text{ET}}$  calculée par la méthode de Laviron). La quantité de cyt c électroactif est similaire. Toutefois, on peut supposer que la forme de cyt c électroactif dit « libre », issu de protéines non immobilisées, est davantage présent en présence de 50mM de KCl. Pour étayer cette hypothèse, on peut noter que le potentiel redox en présence de KCl (-2 mV vs SCE) est plus proche du potentiel natif du cyt c (+20 mV vs SCE) que celui en absence de 50 mM KCl (-27 mV). Une telle tendance a déjà été observée sur une électrode de GC activé (Hagen 1989). La différence de potentiel du cyt c est de +27 mV en passant d'une force ionique de 1.76 mM à 176 mM.

Deuxièmement, si l'on transfère ces électrodes dans une cellule dépourvue de cyt c, l'électrode préparée en présence de 50 mM de KCl possède une quantité plus faible de cyt c immobilisé. Cela atteste d'une plus grande proportion de cyt c « libre » transférant des électrons à l'électrode en présence de KCl.

D'autre part, la modification de la vitesse de transfert d'électrons est une indication qu'en présence de KCl, le cyt *c* n'est pas « arrangé » de la même façon lors du transfert électronique. Cela peut être dû au rapprochement de la protéine du plan de surface de l'électrode carbone ou bien à une orientation de la protéine par rapport au plan de l'électrode qui favoriserait le transfert d'électrons.

Ces paramètres (décalage du potentiel, perte de cyt *c* lors du transfert de cellule électrochimique et vitesse de transfert électronique), même s'ils ne permettent pas de caractériser la sous-population 2 de cyt *c* immobilisé, permettent tout de même d'avoir une information sur le phénomène d'immobilisation de cyt *c* sur l'électrode modifiée et pourront être utilisés pour tester le « lipid anchorage » sur d'autres classes de lipides.

L'un des principaux résultats apportés par ces travaux est donc l'identification d'une deuxième sous-population de cyt *c* adsorbée sur l'électrode et caractérisée par un recouvrement plus faible, un potentiel décalé vers des valeurs négatives et une vitesse de transfert électronique plus élevée comparativement à la première population de cyt *c*.

L'utilisation de sels a permis d'identifier que les forces qui lient la sous-population 2 de cyt *c* ne sont pas de même nature que celles qui entrent en jeu pour la sous-population 1. D'après les nombreuses publications sur le « lipid anchorage » qui prévoit l'insertion d'une chaîne grasse du CL dans le cyt *c*, nous pouvons supposer que cette population 2 est liée de façon hydrophobe au cyt *c*. Mais les mesures par électrochimie ne permettent pas de confirmer définitivement cette hypothèse. Il est également possible que cette interaction plus forte identifiée pour la sous-population 2 soit de différente nature.

Une autre hypothèse consiste à dire que la sous-population 2 de cyt *c* est liée à la présence de microdomaines enrichis en CL sur la surface de l'électrode. Le CL est un phospholipide qui est connu pour composer ces microdomaines, appelés aussi radeaux lipidiques, dans les membranes mitochondriales (Sorice et al. 2009). Nous pouvons supposer qu'un regroupement local de CL sur une membrane composée de PC/CL permettrait une adsorption plus forte de cyt *c*. Au niveau des surfaces occupées perpendiculairement au plan de l'électrode, un cyt *c* a une empreinte quasi circulaire d'environ 9 nm<sup>2</sup> tandis que le CL a une empreinte de 0.7 nm<sup>2</sup> (Caffrey and Wang 1995; Hanske et al. 2012). La surface occupée par un cyt *c* est équivalente à celle occupée par 11-12 CL. La densité de charges négatives portée par ces microdomaines enrichis en CL serait plus élevée que celle d'un mélange homogène PC/CL car la PC porte une charge globale neutre. En présence de tel microdomaines, on peut également supposer que le cyt *c*, dont la charge nette est de +7/+8 à pH physiologique, s'adsorberait préférentiellement sur ces microdomaines. Cette hypothèse est confortée par l'étude de Kim (Kim et al. 1998) qui étudie l'accroche de cyt *c* sur des mélanges lipidiques PC-CL par RMN et qui émet l'hypothèse d'une interaction forte du cyt *c* sur des microdomaines composés de CL.

L'hypothèse de l'explication du cyt *c* accroché fortement sur des microdomaines enrichis en CL serait confortée par certaines de nos observations :

Voici des images d'AFM d'une électrode de GC recouverte d'un film lipidique de PC/CL 80/20 (PC soybean et CL 18:2) après un traitement thermique à 37°C qui a permis un réarrangement des lipides sur la surface de carbone (Figure 3.7). Nous avons observé un réarrangement du recouvrement lipidique pour former des îlots de lipides plus « durs » (zones sombres) par rapport à la matrice lipidique plus « molle ».

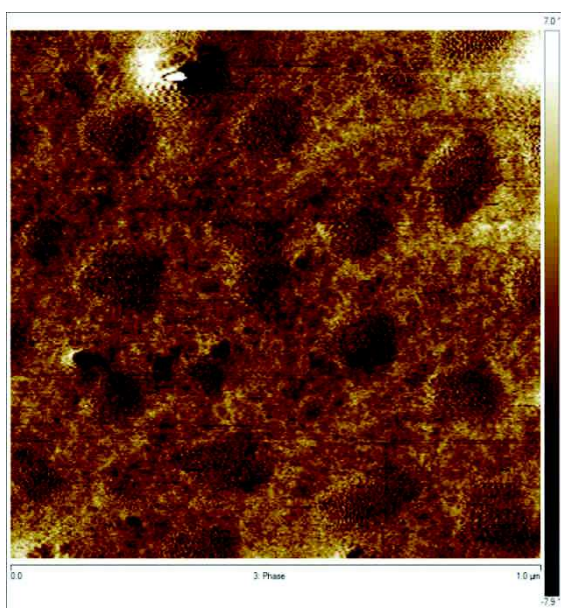


Figure 3.7 : Image de phase en AFM d'une surface de GC modifiée avec un mélange PC-CL et après un traitement thermique à 37°C (80/20 PC soybean / CL 18:2n-6).

Des essais en EFM (Electrostatic Force Microscopy) pour essayer de visualiser des variations locales de champ électrostatique sur un dépôt de PC-CL ont eu lieu mais n'ont donné aucun résultat satisfaisant pour l'instant.

Une autre hypothèse pour expliquer la nature des forces liant la sous-population 2 du cyt *c* sur l'électrode modifiée PC-CL serait de postuler qu'il existe une population de CL entièrement déprotonée (charge globale de -2) en parallèle des autres CL chargés -1. De cette population de CL chargés -2 résulterait une accroche plus forte de cyt *c*.

Il existe en effet une incertitude quand à la charge portée par le CL. Si les deux phosphates portés par le CL laissent penser qu'il serait chargé -2 à pH physiologique, en réalité le comportement acido-basique du CL est assez complexe. Comme présenté dans le chapitre 1, la forme semi-protonée du CL pourrait se stabiliser sous une

forme bicyclique impliquant le motif glycérol terminal (Kates et al. 1993). Ainsi, le  $pK_{a2}$  se situe dans une fourchette de 7.5 à 9.5.

Nous avons réalisé un titrage acide-base de CL 18:1 (Figure 3.8). Un profil de titrage similaire a été réalisé par Kates (Kates et al. 1993).

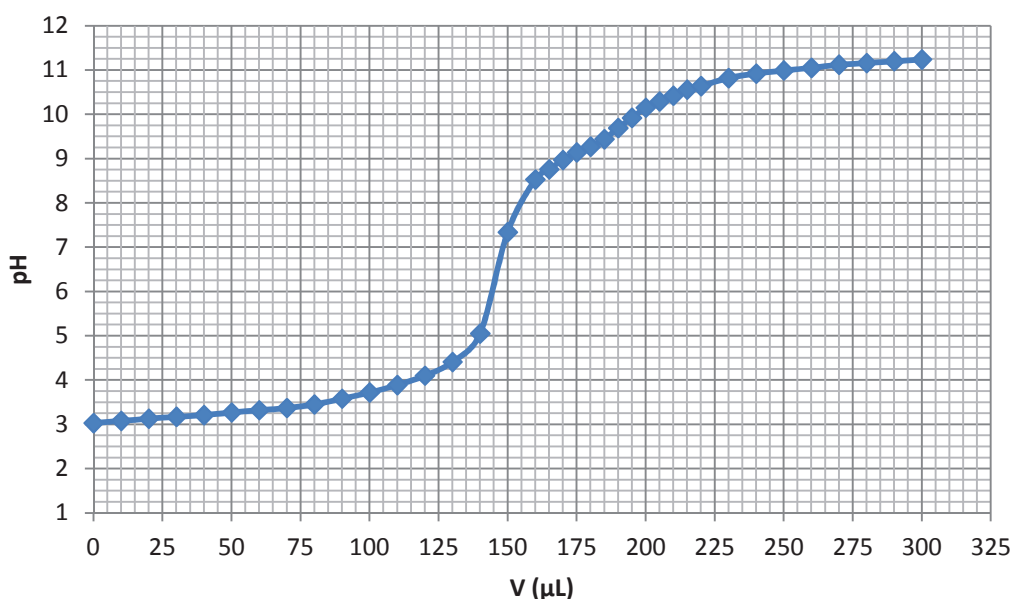


Figure 3.8 : Dosage acide/base de CL 18:1 par du KOH, volume équivalent théorique à  $V=133\mu\text{L}$ .

Par rapport à un comportement classique de diacide, on remarque que la première équivalence est décalée (1.11 au lieu de 1) et aussi la deuxième équivalence (1.47 au lieu de 2). S'il est difficile de conclure sur le comportement acidobasique du CL en particulier car des phénomènes de protection des groupes phosphates liés à une réorganisation sous forme de micelles du CL lors du titrage peuvent survenir, on peut néanmoins supposer qu'il doit exister à pH 7.4 une fraction de CL déprotoné.

Une étude de 2006 s'est par ailleurs intéressée à l'état de protonation du CL en lien avec son interaction avec le cyt c (Figure 3.9). Une simulation numérique aboutit à la même conclusion, c'est-à-dire qu'il existerait une part minoritaire de CL chargé -2 à pH physiologique qui serait à la base d'un deuxième type interaction entre cyt c et CL (Gorbenko et al. 2006).

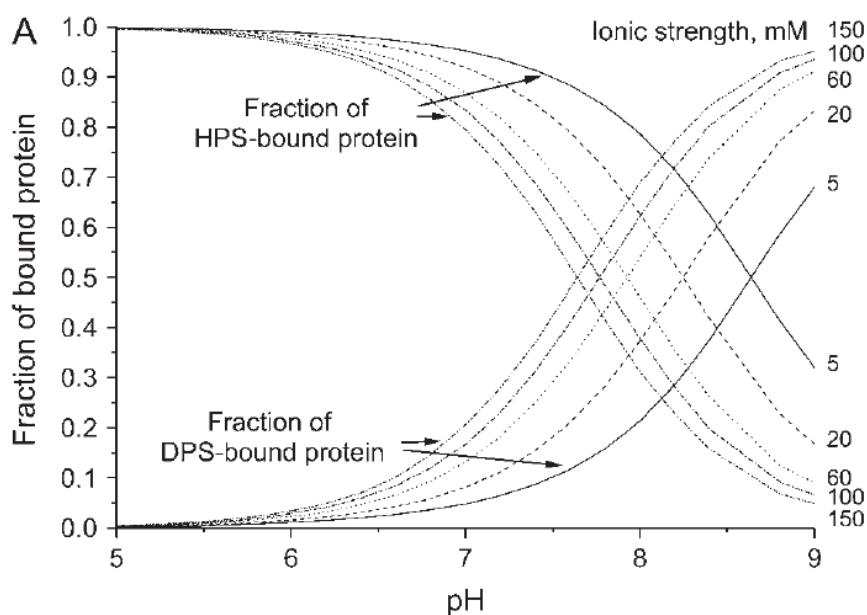


Figure 3.9 : Calculs de la distribution d'une solution 4 mM de cyt *c* lié à des liposomes (100 mM) de type PC-CL en fonction de la force ionique et de l'état de protonation du CL. Le CL peut être sous une forme déprotoné (DPS) ou semiprotoné (HPS). D'après Gorbenko et al. 2006.

Les études électrochimiques apportent peu de réponses par rapport à ces hypothèses sur la nature de l'interaction cyt *c* – CL pour la sous-population 2. Toutefois, ces hypothèses alternatives à celles de l'«extended lipid anchorage» et de l'insertion d'une chaîne grasse dans un patch hydrophobe du cyt *c* ont en commun le fait d'avoir à proximité du cyt *c* un environnement dont la densité de charges négatives est plus importante (microdomaines de CL ou CL chargé  $-2$ ). Ceci est en accord avec le décalage du potentiel de la sous-population 2 du cyt *c* vers les potentiels négatifs qui peut être corrélé à une augmentation de la présence de charges négatives à la proximité de l'ion fer (Salamon and Tollin 1991). Ces deux phénomènes peuvent également coexister.



## CONCLUSION - PERSPECTIVES

### ELECTROCHIMIE SUR LA FORME ADSORBEE DU CYT C

Le protocole expérimental présenté dans ce chapitre fait intervenir un changement de cellule électrochimique afin d'étudier uniquement le cyt c immobilisé sur l'électrode. Cette approche est intéressante dans le sens où elle permet de discriminer plusieurs états électroactifs du cyt c. Lors du transfert de cellule, l'électrode est lavée à l'eau distillée ou avec un tampon similaire à celui présent dans la cellule. Le signal électrochimique observé dans la deuxième cellule exclut donc totalement le cyt c « libre ». De même, dans la deuxième cellule électrochimique, le signal correspondant au cyt c « immobilisé » diminue dans un premier temps et se stabilise finalement pour atteindre une valeur du recouvrement surfacique constante. Cela induit la présence de protéines faiblement liées à l'électrode modifiée même après le lavage lors du transfert de cellule. La quantité et la proportion relative de ces différentes populations de cyt c sera étudiée dans le chapitre suivant traitant de la théorie du « lipid anchorage ».

### INFLUENCE DE LA NATURE DU LIPIDE

Comme présenté dans le premier chapitre, des électrodes modifiées par des phospholipides ont déjà été utilisées pour des études portant sur l'électrochimie du cyt c. Cependant, ces études ont toutes un objectif convergent : promouvoir l'électrochimie du cyt c pour mesurer les paramètres de cinétiques de transfert électronique principalement. Ainsi, ces études prennent peu en considération les propriétés physicochimiques de phospholipides car leur sujet d'étude est focalisé sur la relation entre l'état de coordination de l'ion fer du cyt c et la vitesse ou le potentiel du transfert électronique observé.

Les travaux effectués par Salamon (Salamon and Tollin 1997), Park (Park et al. 2001) et Wu (Wu et al. 2001) ont été pris comme référence pour la mise au point des techniques utilisées dans cette thèse. Ces deux études ont en commun l'utilisation d'une électrode modifiée avec un dépôt de PC-CL en proportion molaire 80/20 pour l'étude électrochimique du cyt c. Le but n'a pas été de reproduire ces expériences mais de les prolonger afin de mettre en évidence le rôle des phospholipides sur ce système.

Salamon et Tollin identifient plusieurs sous-populations de cyt c sur une électrode d'ITO modifiée avec un mélange PC-CL 80/20 pour des concentrations variables de cyt c. Cette étude est assez révélatrice de l'approche

traditionnelle en électrochimie de ces systèmes. Si la surface de l'ITO est idéale pour un recouvrement lipidique en monocouche/bicouche, le choix de ce matériau est peu judicieux pour étudier l'interaction du cyt c avec les phospholipides. En effet, l'ITO est une des seules électrodes qui permettent l'électrochimie du cyt c sans modification de sa surface (Yeh and Kuwana 1977). Cela se vérifie dans cette étude par l'électroactivité du cyt c sur une électrode d'ITO modifiée par de la PC (Egg yolk) uniquement. Le signal électrochimique observé dans ce cas correspond vraisemblablement à un transfert électronique direct du cyt c à l'électrode d'ITO. Les travaux de Salamon et Tollin sont uniquement fait avec du cyt c présent en solution et ne permettent pas de distinguer les phénomènes d'accroche du cyt c sur une électrode modifiée. Enfin, le CL est vu ici comme une molécule organique modifiant la surface de l'électrode. Aucune information sur ses propriétés biophysiques ni même sa nature (pas d'information sur le type de chaînes du CL) n'est discutée dans cette étude.

La méconnaissance des propriétés et de la diversité extrêmement importante d'espèces moléculaires de phospholipides retrouvés dans les systèmes biologiques est souvent flagrante dans ces études électrochimiques. Par exemple, pour modifier une électrode de GC, Wu utilise de la PC 14:0 qu'il nomme à tort dans son résumé « DMPG, a kind of lipid » (Wu et al. 2001).

Si la technique présentée dans ce chapitre devait se rapporter à une étude existante, ce serait sans nul doute aux travaux de Park et al. (Park et al. 2001). Son modèle expérimental est également l'étude électrochimique du cyt c grâce à une électrode de GC modifiée par spin-coating avec un dépôt lipidique contenant du CL. Notre protocole s'est d'ailleurs inspiré initialement de ces conditions expérimentales. Toutefois, comme pointé précédemment, c'est surtout la déconnexion qui existe entre le modèle expérimental utilisé et le fonctionnement de ces systèmes in-vivo qui peut poser problème. Comment comprendre que la couche de phospholipides déposée (qui n'est pas exactement une monocouche selon les auteurs) de 30 nm d'épaisseur puisse être comparée à une membrane biologique (environ 5nm d'épaisseur). Le choix du type de CL (issu de *E. coli*) semblent également peu judicieux pour étudier son interaction avec un cyt c de cœur de cheval.

## REFERENCES

Caffrey, M. and J. Wang **1995**. "Membrane-Structure Studies Using X-Ray Standing Waves." Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure 24(1): 351-377.

Clark, R. A. and E. F. Bowden **1997**. "Voltammetric Peak Broadening for Cytochrome c/Alkanethiolate Monolayer Structures: Dispersion of Formal Potentials." Langmuir 13(3): 559-565.

Creager, S. E. and T. T. Wooster **1998**. "A New Way of Using ac Voltammetry To Study Redox Kinetics in Electroactive Monolayers." Analytical Chemistry 70(20): 4257-4263.

Eckermann, A. L., D. J. Feld, J. A. Shaw and T. J. Meade **2010**. "Electrochemistry of redox-active self-assembled monolayers." Coordination Chemistry Reviews In Press, Corrected Proof.

El Kasmi, A., M. C. Leopold, R. Galligan, R. T. Robertson, S. S. Saavedra, K. El Kacemi and E. F. Bowden **2002**. "Adsorptive immobilization of cytochrome c on indium/tin oxide (ITO): electrochemical evidence for electron transfer-induced conformational changes." Electrochemistry Communications 4(2): 177-181.

Gorbenko, G. P., J. G. Molotkovsky and P. K. Kinnunen **2006**. "Cytochrome C interaction with cardiolipin/phosphatidylcholine model membranes: effect of cardiolipin protonation." Biophysical Journal 90(11): 4093-103.

Hanske, J., J. R. Toffey, A. M. Morenz, A. J. Bonilla, K. H. Schiavoni and E. V. Pletneva **2012**. "Conformational properties of cardiolipin-bound cytochrome c." Proceedings of the National Academy of Sciences 109(1): 125-130.

Kates, M., J.-Y. Syz, D. Gosser and T. Haines **1993**. "pH-dissociation characteristics of cardiolipin and its 2'-deoxy analogue." Lipids 28(10): 877-882.

Kim, S.-m., K.-h. Shin, T. Fujiwara and H. Akutsu **1998**. "The interactions of ferric and ferrous cytochrome c with cardiolipin in phospholipid membranes studied by solid-state <sup>2</sup>H and <sup>31</sup>P NMR." Journal of Molecular Structure 441(2-3): 183-188.

Laviron, E. **1979**. "General expression of the linear potential sweep voltammogram in the case of diffusionless electrochemical systems." Journal of Electroanalytical Chemistry 101(1): 19-28.

Lee, K.-S., M.-S. Won, H.-B. Noh and Y.-B. Shim **2010**. "Triggering the redox reaction of cytochrome c on a biomimetic layer and elimination of interferences for NADH detection." Biomaterials 31(30): 7827-7835.

Li, J., K. Schuler and S. E. Creager **2000**. "A Generalized Equivalent-Circuit Model for Electroactive Monolayers Exhibiting a Fixed Redox Potential and a Distribution of Electron-Transfer Rate Constants I. Square Distributions." Journal of The Electrochemical Society 147(12): 4584-4588.

Marcus, R. A. **1965**. "Theory of Electron-Transfer Reaction Rates of Solvated Electrons." The Journal of Chemical Physics 43(10): 3477-3489.

Park, H., J.-S. Park and Y.-B. Shim **2001**. "Electrochemical and in situ UV-visible spectroscopic behavior of cytochrome c at a cardiolipin-modified electrode." Journal of Electroanalytical Chemistry 514(1-2): 67-74.

Plant, A. L. **1993**. "Self-assembled phospholipid/alkanethiol biomimetic bilayers on gold." Langmuir 9(11): 2764-2767.

Ruzgas, T., L. Wong, A. K. Gaigalas and V. L. Vilker **1998**. "Electron Transfer between Surface-Confined Cytochrome c and an N-Acetylcysteine-Modified Gold Electrode." Langmuir 14(25): 7298-7305.

Salamon, Z. and G. Tollin **1991**. "Interfacial electrochemistry of cytochrome c at a lipid bilayer modified electrode: Effect of incorporation of negative charges into the bilayer on cyclic voltammetric parameters." Bioelectrochemistry and Bioenergetics 26(2): 321-334.

Salamon, Z. and G. Tollin **1997**. "Interaction of horse heart cytochrome c with lipid bilayer membranes: effects on redox potentials." J Bioenerg Biomembr 29(3): 211-221.

Sorice, M., V. Manganelli, P. Matarrese, A. Tinari, R. Misasi, W. Malorni and T. Garofalo **2009**. "Cardiolipin-enriched raft-like microdomains are essential activating platforms for apoptotic signals on mitochondria." FEBS Letters 583(15): 2447-50.

Wu, Z., B. Wang, Z. Cheng, X. Yang, S. Dong and E. Wang **2001**. "A facile approach to immobilize protein for biosensor: self-assembled supported bilayer lipid membranes on glassy carbon electrode." Biosensors and Bioelectronics 16(1-2): 47-52.

Yang, Z.-S., X. Chen and L.-P. Liu **2009**. "Direct electrochemical behavior of cytochrome c , and its determination on phytic acid modified electrode." Microchimica Acta 165(1): 59-64.

Yeh, P. and T. Kuwana **1977**. "Reversible electrode reaction of cytochrome c." Chemistry Letters 6(10): 1145-1148.



## CHAPITRE 4 - PARTIE 1 : ETUDE DE LA SOUS-POPULATION 2 DU CYT C

### INTRODUCTION

Le chapitre 4 a pour objectif d'aller plus loin dans les aspects des spécificités de structures des phospholipides par rapport à l'interaction et aux transferts électroniques avec le cyt *c*. Certaines questions quant aux effets des différentes formes moléculaires de phospholipides et différentes sources de cyt *c* présentent un intérêt particulier.

Des études récentes montrent que le complexe cyt *c* – CL (insertion de la chaîne grasse dans la partie hydrophobe du cyt *c*) ne serait plus impliqué dans le processus de transfert électronique de la chaîne respiratoire mais dans d'autres fonctions comme l'activité peroxydase du complexe (Basova et al. 2007; Hanske et al. 2012), son implication dans l'apoptose ou son affinité pour le CO et le NO (Rajagopal et al. 2012) entre autres. La nature des interactions qui entrent en jeu pour la sous-population 2 du cyt *c* identifiée dans le chapitre précédent acquiert alors un certain intérêt. Nous avons testé par électrochimie différents paramètres liés à l'environnement de la membrane interne de la mitochondrie comme l'effet du pH ou du  $\text{Ca}^{2+}$  sur le complexe cyt *c* – CL. L'objectif principal consiste à comprendre quel pourrait être le rôle de la sous-population 2 de cyt *c* en fonction de paramètres liés au fonctionnement de la mitochondrie.

Ces expériences sont également utiles pour mieux comprendre la nature des interactions existant entre le cyt *c* et le CL pour les deux sous-populations de cyt *c* identifiées dans le chapitre précédent. Nous apportons donc une extension de l'utilisation du modèle électrochimique décrit précédemment pour l'étude de l'effet du pH et du  $\text{Ca}^{2+}$ .

## EFFET DU PH

Le CL présente une sensibilité toute particulière envers les variations de pH. C'est le seul phospholipide connu qui a un comportement atypique face aux variations de pH. Sa structure, plus particulièrement son motif glycérol central, est impliqué dans le deuxième  $pK_a$  (Kates et al. 1993) qui peut varier selon les conditions expérimentales et selon la nature des chaînes grasses portées (Haines et al. 2008 et communications personnelles Pr. Em. Richard Epanand). L'équipe de Khalifat travaille depuis peu sur l'effet d'un microenvironnement acide (pH 4-5) induit par une injection de HCl à proximité d'un liposome (GUV) dont la membrane contient du CL. Leurs travaux (Khalifat et al. 2008; Khalifat et al. 2011) a permis d'identifier que seul la présence de CL provoque des modifications drastiques des propriétés biophysique de la membrane en milieu acide (Figure 4.1).

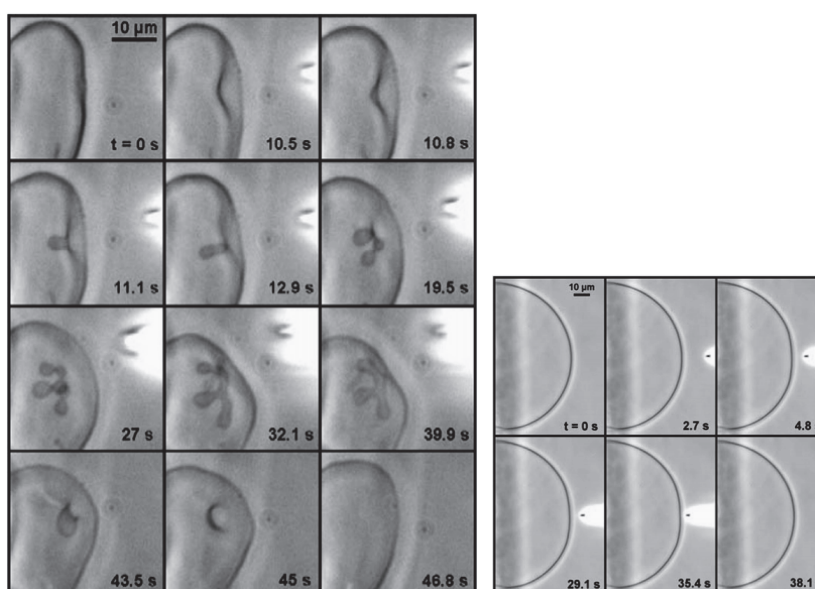


Figure 4.1 : Application d'un microenvironnement acide (pH~4) sur des GUV (Giant Unilamellar Liposome) composé de PC/PE (%mol 66/34, image de droite) ou de PC/CL (%mol 90/10 image de gauche, résultats identiques avec un mélange PC/PE/CL 60/30/10). D'après Khalifat et al. 2008; Khalifat et al. 2011.

Seule la présence de CL permet de créer des invaginations mimant les crêtes que l'on retrouve dans les mitochondries (Khalifat 2008 – 2011).

Concernant le cyt c, il existe une riche bibliographie concernant l'impact du pH sur sa structure et ses propriétés (Koller and Hawkrige 1988; Rytömaa et al. 1992; Kawai et al. 2005; Zhou et al. 2007). En effet, le pH est l'un des premiers paramètres utilisés afin d'identifier des conformations différentes de la protéine. Dès 1939, Theorell identifie cinq conformations de cyt c en fonction du pH (Theorell and Akesson 1941). Plus tard, les études électrochimiques en milieu acide (Ikeshoji et al. 1989) et en milieu basique (Barker and Mauk 1992)

permettront d'identifier des formes non natives de cyt c induites par un changement de pH. Cependant ces études portent sur des pH relativement éloignés des conditions que l'on retrouve in-vivo (pH de 2.5 pour Ikeshoji et 10.4 pour Barker) et seul deux formes conformationnelles de ferricytochrome c (cyt c oxydé) ont été identifiées à pH physiologique (Greenwood and Palmer 1965).

Nous avons étudié l'influence du pH sur les deux sous-populations de cyt c immobilisé. Il faut noter ici que la phase d'adsorption du cyt c est réalisée à pH physiologique (pH 7.2) dans la première cellule électrochimique tandis que dans la deuxième cellule électrochimique différents pH ont été fixés. Le protocole pour modifier l'électrode est similaire à celui du chapitre 3 mais avec les variantes suivantes :

- 0.2 µg de PC-CL est déposé sur l'électrode.
- La première cellule électrochimique contient 10 µM du cyt c.
- Un traitement thermique est appliqué à l'électrode au sein de la première cellule électrochimique (+34°C).

Le pH de la deuxième cellule est fixé par un tampon 20 mM choisi en fonction de la gamme de pH utilisée :

- pH 4 et 5.5 : Tampon acide acétique/acétate
- pH 6.5, 7.5 et 8.5 : Tampon TRIS-HCl/TRIS
- pH 10 : Tampon Bicarbonate/Carbonate

---

## RESULTATS -DISCUSSION

On constate d'emblée que la quantité maximale de cyt c immobilisé sur l'électrode modifiée est dépendante du pH. Les valeurs de quantité de cyt c adsorbé sont les plus importantes à des pH de l'ordre de 7-8 (Figure 4.2). Quand le pH décroît, la quantité de cyt c adsorbée diminue. A pH 4, la quantité de cyt c adsorbée représente 14% de la quantité adsorbée à pH 7.5.



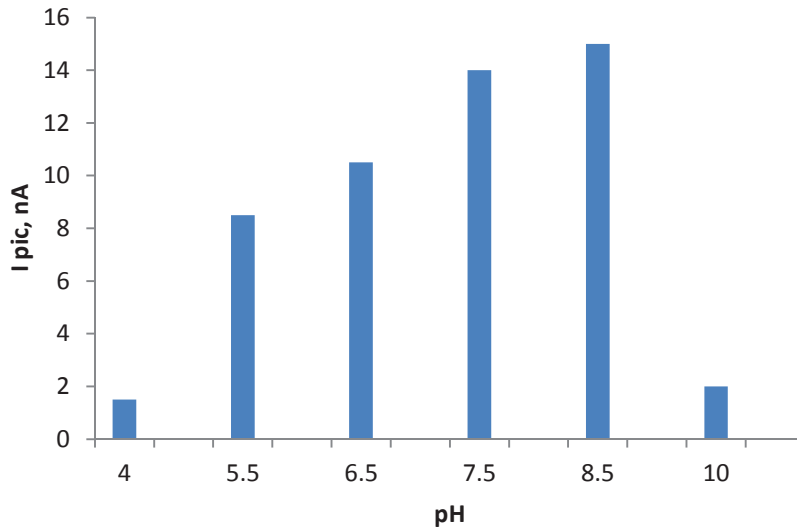


Figure 4.2 : Variation de l'intensité du pic de la sous-population 1 de cyt c en ACV à 0.2 Hz sur une électrode modifiée PC-CL 18:1.

Globalement l'évolution de l'accroche du cyt c en fonction du pH observé est cohérente avec les mesures d'Eddowes (Figure 4.3) même si l'électrode modifiée utilisée dans cette étude ne contient pas de CL.

La raison de la décroissance de la quantité de cyt c adsorbé aux faibles pH peut être expliquée par la densité de charge positive plus élevée de la membrane PC-CL. Aux faibles pH, le CL aura une proportion de forme biprotonnée plus élevée. Ce CL biprotonné porte une charge globale neutre. La charge globale de la membrane tendant vers la neutralité à des faibles valeurs de pH peut être l'explication du départ du cyt c qui est lui-même fortement chargé positivement.

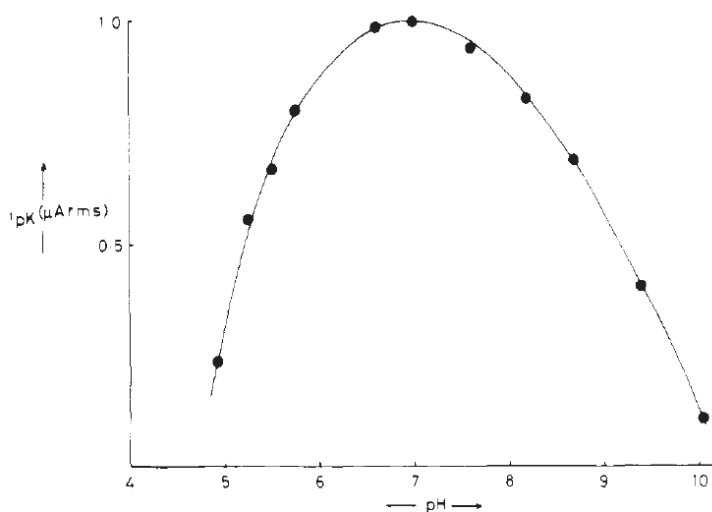


Figure 4.3 : Variation de l'intensité du pic de cytochrome c de cœur de cheval 5mg/L sur une électrode d'ITO modifiée avec du 4-4'-bipyridyl. D'après Eddowes and Hill 1979.

En milieu basique, le cyt *c* perd ses charges positives (les groupements amines des résidus lysine principalement). Le point isoélectronique (charge globale neutre) du cyt *c* est d'environ 10. Ceci peut expliquer la baisse de l'adsorption de cyt *c* pour les pH basiques.

A pH 11, nous n'observons que de très faibles adsorptions concernant les sous-population 1 et 2 identifiées à pH physiologique. Parallèlement un pic principal apparaît à +164 mV (Figure 4.4). Aux pH fortement basique, diverses études observent une dénaturation du cyt *c*. Nous supposons que nous observons cette forme pour un pH de 11.

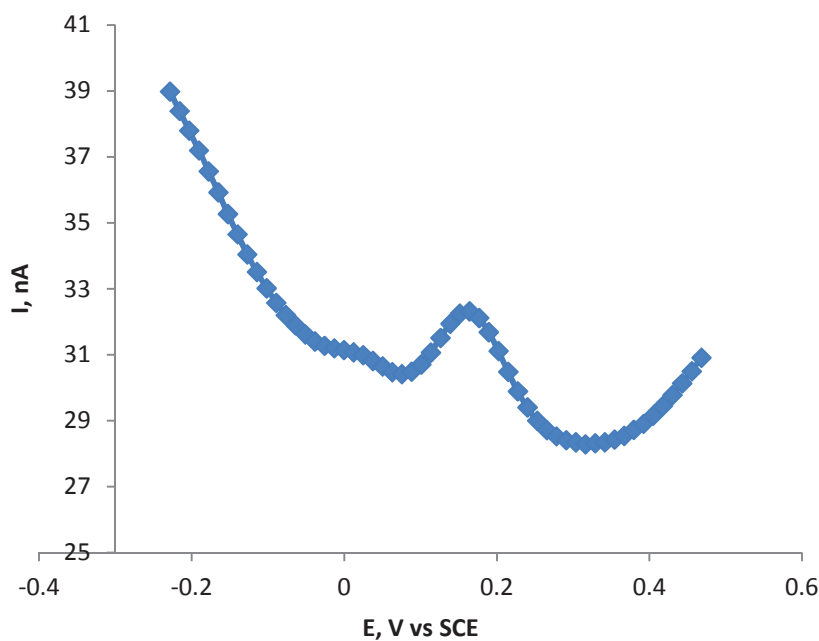


Figure 4.4 : ACV à 0.2 Hz de cyt *c* adsorbé sur une électrode PC-CL 18:1 à pH 11

La présence de la sous-population 2 de cyt *c* a pu être identifiée sur la gamme de pH 4-10. On observe pour les deux sous-populations de cyt *c* des décalages en potentiels en milieu acide. A pH 4, la sous-population 2 identifiée dans le dernier chapitre a un potentiel redox plus élevé que le cyt *c* lié de façon électrostatique au CL (Figure 4.5) ce qui est la tendance inverse par rapport à celle rencontrée à pH physiologique.

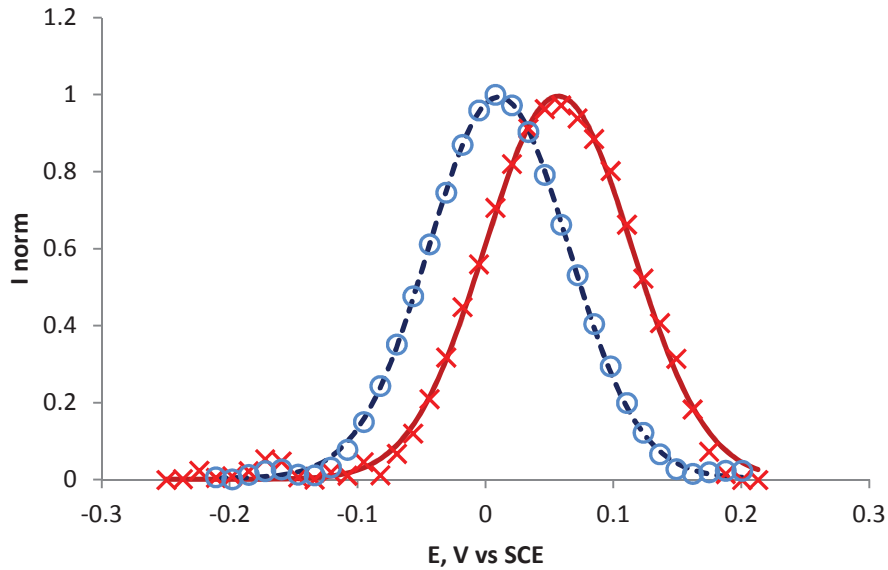


Figure 4.5 : Intensités normalisées de l'ACV à 0.2 Hz de la sous-population 1 du cyt c (ronds bleus) et de l'ACV à 258 Hz de la sous-population 2 du cyt c (croix rouges) sur une électrode modifiée type PC-CL à pH 4. Les courbes associées représentent le meilleur « fit » par rapport au jeu de données.

Les potentiels redox des deux sous-populations de cyt c se décalent vers les valeurs positives avec l'augmentation du pH (Figure 4.5). La sous-population 2 apparaît cependant davantage sensible aux variations de pH (Figure 4.6). Alors qu'en milieu basique le potentiel de cette sous-population de cyt c n'est pas ou peu sensible aux variations de pH, on observe une relation linéaire entre pH et potentiel redox quand on se situe dans la zone de pH en dessous de la neutralité.

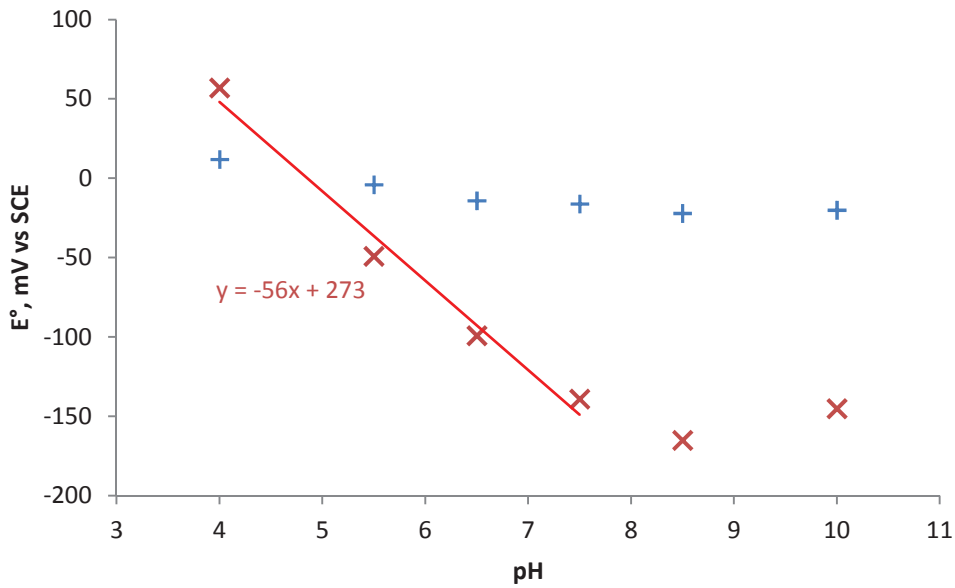


Figure 4.6 : Effet du pH sur les potentiels redox des sous-populations 1 (Croix bleues) et sous-populations 2 (Croix rouges) du cyt c adsorbé. Pour chaque valeur de pH, deux mesures ont été réalisées.

Un tel comportement a déjà été reporté dans le cas de cyt c immobilisé sur une électrode modifiée par des SAMs (Murgida and Hildebrandt 2001; Jin et al. 2012). Ces différentes études ne font pas de distinctions entre différentes sous-populations de cyt c adsorbés mais observent une variation du potentiel de cyt c similaire en milieu acide (Figure 4.7). Les auteurs expliquent la variation du potentiel redox dans la zone acide de pH par une réaction couplée entre un proton et un électron, phénomène connu sous le nom de PCET (Proton Coupled Electron Transfer).

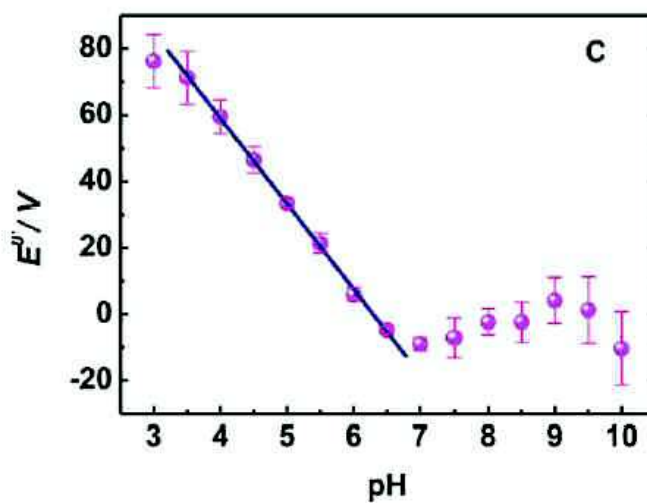


Figure 4.7 : Dépendance au pH du potentiel redox du cyt c immobilisé sur une électrode d'or modifiée par des SAMs C11 acides. D'après Jin 2012.

La pente du potentiel formel de la sous-population 2 du cyt c immobilisé est de 56 mV par unité de pH (Figure 4.6) ce qui est très proche de la valeur théorique de 59 mV par unité de pH calculée pour 1 proton/électron échangé (Figure 4.8).

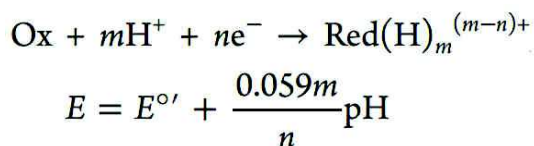


Figure 4.8 : Variation du potentiel formel d'un composé lors d'un PCET.  $0.059 = 2.3R.T/F$  avec  $T=25^\circ\text{C}$ . D'après Weinberg 2012.

Les valeurs de cinétiques calculées pour la sous-population 2 sont plus élevées à pH 4 qu'à pH 7.5 (Figure 4.9) ce qui est donc cohérent avec un transfert électronique couplé avec un transfert de proton. A pH acide, la disponibilité en proton est très forte et on tend vers une limitation de la vitesse de réaction par la vitesse de transfert des électrons.

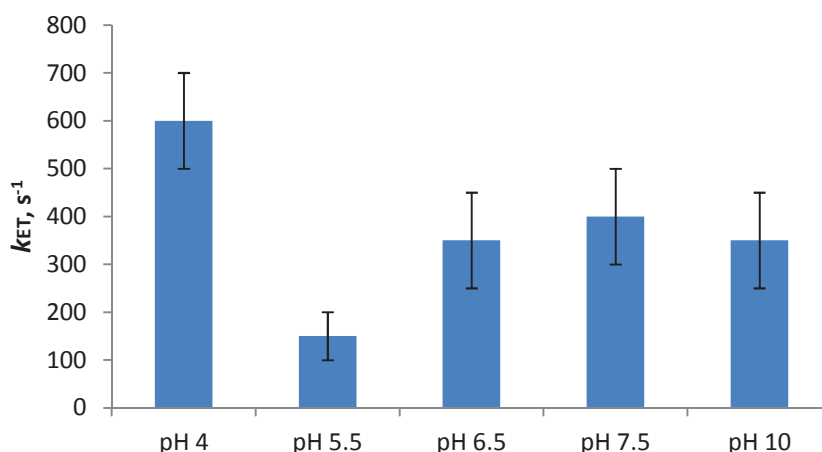


Figure 4.9 : Vitesse de transfert électronique de la sous-population 2 de cyt c en fonction du pH. Les barres d'erreurs représentent l'erreur-type lié à la méthode de calcul du  $k_{ET}$ .

En milieu alcalin, nous n'observons pas de variation de la vitesse de transfert électronique. Cela est dû à la faible disponibilité du milieu en proton. La vitesse globale de réaction est limitée par la vitesse de transfert des protons dans ces conditions.

Grace à l'utilisation d'eau deutérée, les travaux de Murgida ont été les premiers à prouver l'existence d'un PCET pour le cyt c (Murgida and Hildebrandt 2001). Le PCET serait relié au réarrangement des liaisons hydrogènes à l'intérieur du cyt c lors du changement d'état d'oxydation (Murgida and Hildebrandt 2001; Jin et al. 2012).

D'une manière générale, la variation du potentiel redox d'une métalloprotéine est liée au changement de l'environnement de l'ion métallique central. Il est possible que le cyt c se dénature dans les gammes de pH acides. Cela a déjà été supposé dans les études électrochimiques de Park (Park et al. 2001) et Lojou (Lojou and Bianco 2000) qui notent la présence de formes dénaturées du cyt c à faible pH (2.3-4.6) ou à pH 6.3, respectivement. Toutefois, cette hypothèse est peu probable car si le cyt c adopte différentes conformations préférentielles à des pH extrêmes, il peut généralement retrouver sa forme native après le retour au pH neutre. Jin a montré que si le cyt c change de conformation à pH acide (pH de 4.5), il peut retrouver sa conformation à pH neutre mais ce retour à la forme native est plutôt lent (de l'ordre de 30 mn). Dans nos expériences, nous avons observé qu'une électrode modifiée PC/CL avec du cyt c adsorbé mis en présence d'une solution acide (pH 4) pouvait être réutilisée à pH 7.4 et donnent des résultats similaires à des mesures réalisées sans ce traitement acide. Cela suggère que les modifications de potentiel observées ne sont pas associées à une dénaturation du cyt c.

Un autre paramètre intéressant concerne la quantité de sous-population 2 de cyt c adsorbé en fonction du pH. En effet, il est possible que ce paramètre varie si l'on considère les hypothèses formulées en fin de chapitre 3 sur la nature de la sous-population 2 (cyt c accroché à du CL chargé -2 ou sur des microdomaines de CL). Toutefois, les valeurs de potentiels formels de la sous-population 2 de cyt c se sont rapprochées de celle de la sous-population 1 ce qui rend plus difficile le calcul de la quantité de la sous-population 2 de cyt c. Les intensités de pics à hautes fréquences (ou la sous-population 1 n'est plus visible) peuvent donner une indication de la quantité de la sous-population 2 de cyt c adsorbé. Cette quantité semble augmenter pour les pH acides (Figure 4.10).

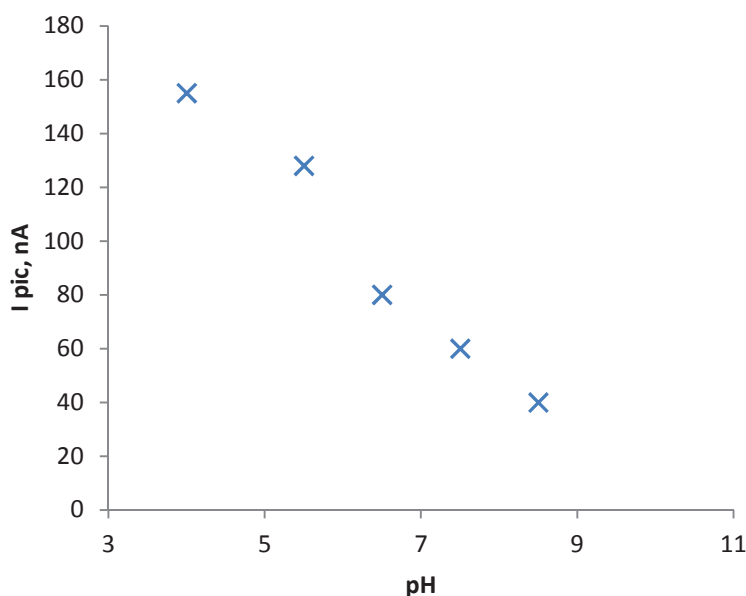


Figure 4.10 : Variation de l'intensité du pic de la sous-population 2 de cyt c en fonction du pH en ACV à hautes fréquences (258 Hz à pH 4, 98 Hz à pH 5.5 -6.5 et 230 Hz à pH 7.5 -8.5).

On peut supposer que les hauteurs de pics à 230 Hz et 258 Hz sont très comparables et les différences observées (1 pic de l'ordre de 40-60 nA à pH 7.5-8.5 contre des 1 pic de l'ordre de 120-150 nA aux pH acides) reflètent qu'il existe une plus grande proportion de sous-population 2 par rapport à la sous-population 1 à pH 4 qu'à pH 7.5. Ces intensités de pics reportées sont issues de fréquences différentes et ne sont théoriquement pas comparables car plus la fréquence appliquée augmente, plus on a potentiellement d'échanges électroniques possibles.

Dans l'hypothèse d'un lien entre une fraction de CL chargé -2 et la sous-population 2 de cyt c adsorbé, la proportion de sous-population 2 de cyt c devrait diminuer avec la baisse de pH. Or c'est l'inverse qui est observé. Cela est cependant cohérent avec les premiers travaux réalisés sur le « lipid anchorage » qui identifient à l'origine les deux sites d'accroche du cyt c (A-site et C-site) en fonction du pH (Rytömaa et al. 1992). Rytömaa décrit le site d'accroche de type C-site à un pH de 4 (Figure 4.11).

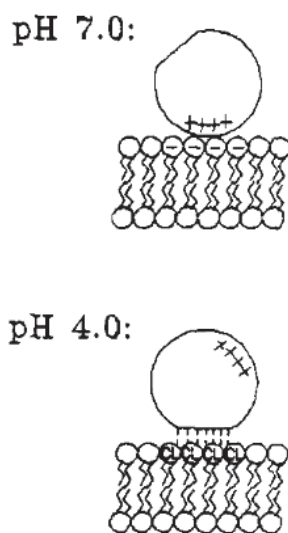


Figure 4.11 : Les deux sites d'accroche du cyt c sur une membrane contenant du CL : A-site à pH 7 (sensible aux anions) et C-site à pH 4 (sensible au cardiolipide). D'après Rytömaa et al. 1992.

On pourrait alors faire un parallèle entre les formes A et C de Rytömaa et les sous-populations 1 et 2 identifiées précédemment. La théorie initiale du « lipid anchorage » définit que le site d'accroche C nécessite un CL protoné (charge globale neutre) ce qui est donc à l'opposé de l'hypothèse formulée précédemment qui consiste à voir la sous-population 2 comme une association entre cyt c et CL chargé -2.

EFFET DU  $Ca^{2+}$  SUR L'ANCHORAGE

Le lien entre l'accroche de cyt *c* dans la mitochondrie et calcium a été ensuite pointé par les études de Hanson (Hanson et al. 2004). Lors d'un faible relargage de cyt *c* dans le cytoplasme qui ne suffit pas à induire l'apoptose, il existe un mécanisme d'amplification de ce relargage de cyt *c*. Hanson et al. montre que le cyt *c* peut se lier à des récepteurs cytoplasmiques spécifiques nommés IP3 dont la fonction est de réguler le transport d'ion calcium du réticulum endoplasmique. Le cyt *c* lié à IP3 provoque le relargage de  $Ca^{2+}$  dans le cytoplasme (Hanson et al. 2004). Ce  $Ca^{2+}$  provoque alors une rétroaction positive de par son action dans la mitochondrie qui provoque un relargage plus important de cyt *c*. Ce phénomène s'emballe jusqu'à former les apoptosomes, et donc l'induction de l'apoptose (Figure 4.12).

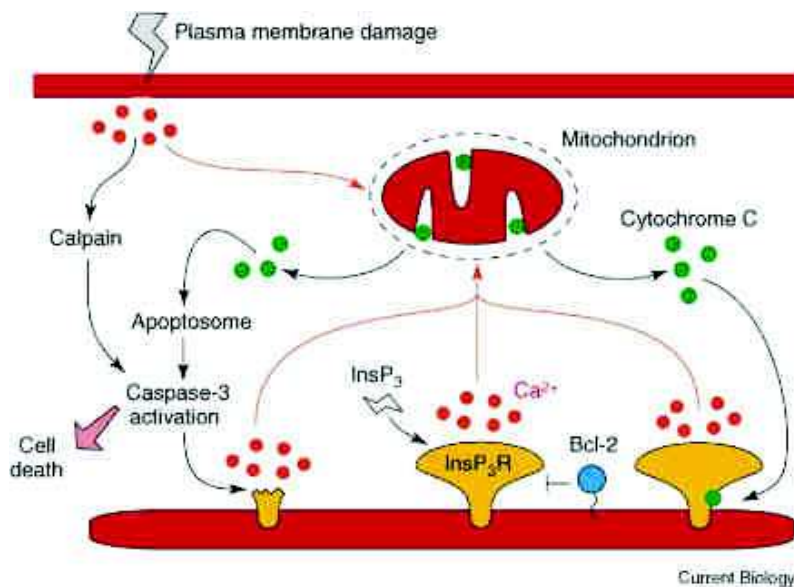


Figure 4.12 : Effet amplificateur de la rétroaction du calcium sur le relargage du cyt *c* dans le cytosol. D'après Hanson et al. 2004.

Le fait que le  $Ca^{2+}$  puisse décrocher du cyt *c* des mitochondries est bien documenté (Petrosillo et al. 2004; Petrosillo et al. 2006; Paradies et al. 2009). L'étude de Huang a même permis de démontrer in vitro que le cyt *c* en solution ne s'adsorbe pas sur une électrode modifiée avec du CL en présence de 200  $\mu M$  de  $Ca^{2+}$  (Huang et al. 2006) (Figure 4.13).



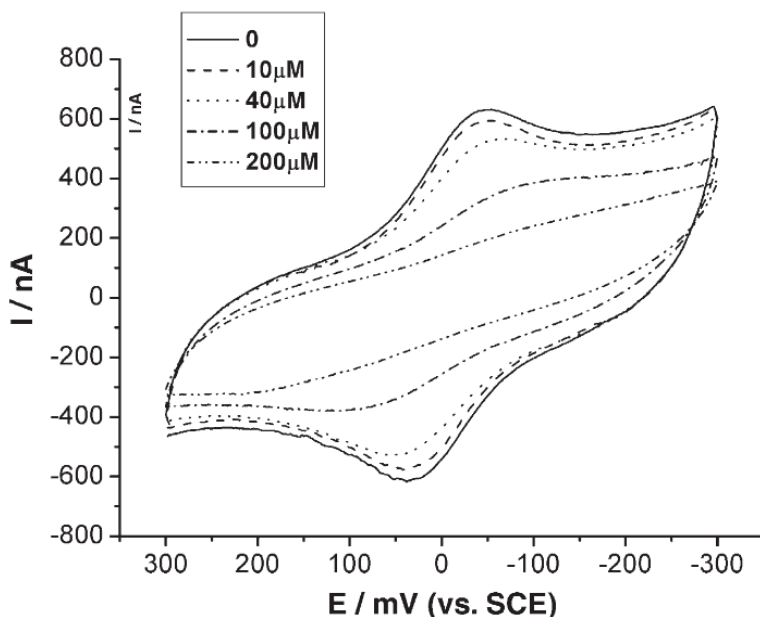


Figure 4.13 : CV d'une solution de 1  $\mu\text{M}$  de cyt c après addition de 10, 40, 100 et 200  $\mu\text{M}$  de  $\text{Ca}^{2+}$ . Modifié d'après Huang et al. 2006.

Il s'est donc avéré intéressant de comprendre comment peuvent évoluer nos deux sous-populations de cyt c adsorbé sur une électrode modifiée PC-CL face au  $\text{Ca}^{2+}$ . Le protocole mis en place à cette fin est très similaire à celui utilisé pour l'étude de l'effet du pH. Les conditions de mesures sont les suivantes :

- 0.25 $\mu\text{g}$  de PC-CL est déposé
- Le tampon de contient plus d'EDTA
- Un traitement thermique est appliqué à l'électrode au sein de la première cellule électrochimique (+35°C)
- Une injection de 50 $\mu\text{L}$  de  $\text{CaCl}_2$  0.1M est faite dans la deuxième cellule électrochimique pour obtenir une concentration en ions  $\text{Ca}^{2+}$  d'environ 1mM. Cette étape a été répétée pour tester des concentrations en  $\text{Ca}^{2+}$  finales de 100 et 10 $\mu\text{M}$ .

Avant l'ajout de  $\text{Ca}^{2+}$ , le profil retrouvé en AC voltamétrie est très similaire à celui décrit au chapitre 3. Pour une concentration de 1 mM de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la deuxième cellule, la sous-population 2 de cyt c disparaît et seule reste une fraction du cyt c adsorbé (Figure 4.14). Ce protocole a été réitéré avec une concentration de calcium passant de 1 mM à 10  $\mu\text{M}$  avec les mêmes observations. Étonnamment, la fraction du cyt c restante en présence de cation calcium présente une vitesse de transfert électronique très élevée par rapport aux vitesses habituellement observées pour la sous-population 1 de cyt c à ce potentiel. La question d'une troisième sous-population de cyt c immobilisé dans ces conditions se pose.

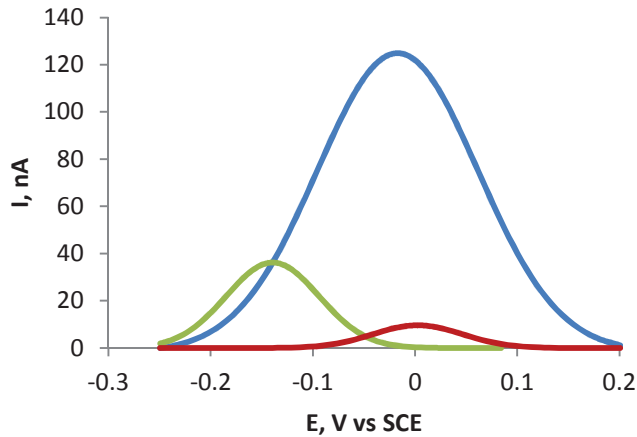


Figure 4.14 : Représentation des deux sous-populations de cyt c sans  $\text{Ca}^{2+}$  et comparaison avec le signal électrochimique observé après l'addition de 1 mM de  $\text{Ca}^{2+}$  (courbe rouge).

Le transfert d'électrons pour ce cyt c résiduel est toujours observé pour des fréquences en potentiel de l'ordre de 1500-2000 Hz. La Figure 4.15 représente une ACV du cyt c résiduel après exposition au  $\text{Ca}^{2+}$  et pour une fréquence de 600 Hz, fréquence pour laquelle les deux sous-populations de cyt c ne transfèrent plus d'électrons dans les conditions expérimentales classiques. Cette observation peut avoir plus d'explications.

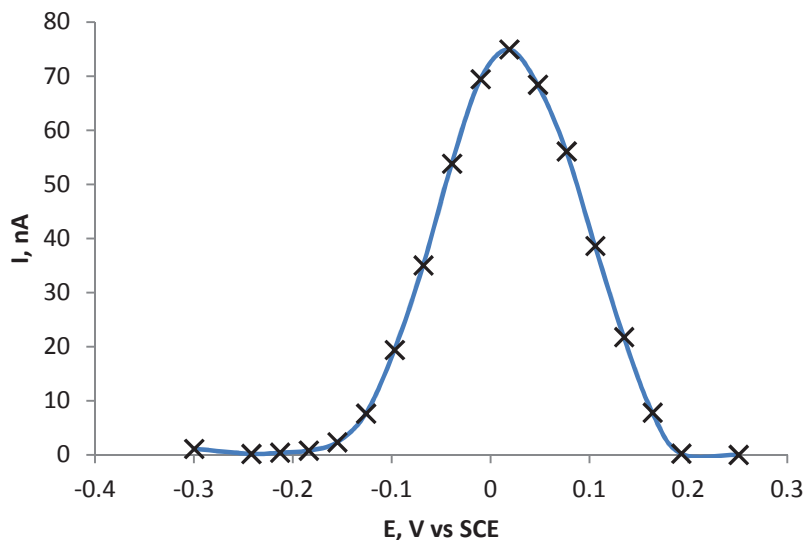


Figure 4.15 : ACV à 600Hz de cyt c adsorbé sur une électrode PC-CL en présence de  $10 \mu\text{M}$  de  $\text{Ca}^{2+}$ .  $E^\circ$  mesuré  $+20.5 \text{ mV}$ ,  $k_{\text{ET}}$  d'environ  $2000 \text{ s}^{-1}$ .

Le potentiel redox de la sous-population de cyt c lié de façon hydrophobe a pu se décaler. Pour appuyer cette hypothèse, on peut remarquer que le potentiel de  $+20.5 \text{ mV}$  du cyt c en présence de  $\text{Ca}^{2+}$  est

sensiblement différent du potentiel de la sous-population de cyt *c* électrostatique en condition normale (-18.7 mV mesuré pour cette expérience). De plus, la gamme de vitesse de transfert d'électrons est davantage comparable avec celle de la sous-population 2 de cyt *c* (qui est de l'ordre de 300 – 800 s<sup>-1</sup> pour la sous-population 2, 1-50 s<sup>-1</sup> pour la sous-population 1).

Le cyt *c* résiduel peut également provenir de certains cyt *c* qui seraient « enfouis » partiellement ou totalement dans le dépôt lipidique et qui auraient échappé à l'influence du calcium présent en solution. Les fortes vitesses de transfert électronique peuvent suggérer qu'il existe une faible distance entre ces cyt *c* et la surface de l'électrode.

Les cations divalents et plus particulièrement le calcium sont connus pour perturber l'interaction entre le CL et le cyt *c*. Une étude électrochimique de 2006 a démontré que la présence de faibles concentration de calcium dissous (~0.2 mM) peuvent annihiler la médiation du cyt *c* sur une électrode modifiée au CL (Huang et al. 2006). Nos expériences diffèrent de cette étude car seul le cyt *c* adsorbé sur l'électrode modifiée est étudié. Nos résultats confirment l'effet du Ca<sup>2+</sup> comme perturbateur de l'interaction CL - cyt *c* pour nos deux sous-populations de cyt *c* et ce pour des concentrations plus faibles que celles mentionnées dans la littérature (10 μM). Les mesures d'ACV montrent également que l'interaction cyt *c* – CL pour la sous-population 2 du cyt *c* est rompue par la présence de Ca<sup>2+</sup> au contraire d'une solution saline concentrée (KCl) comme ce la avait été démontré dans le chapitre 3.

Tout d'abord, on peut émettre l'hypothèse que c'est la forte affinité du Ca<sup>2+</sup> pour le CL qui provoque la perturbation de l'interaction cyt *c* – CL. Cela induit que l'interaction supposée hydrophobe entre le cyt *c* et le CL de la sous-population 2 possède également des interactions de nature électrostatiques en parallèle car le Ca<sup>2+</sup> ne devrait pas perturber une interaction purement hydrophobe.

Cette vision n'est pas incohérente avec le modèle du « lipid anchorage » proposé par l'équipe de Kinnunen (chapitre 1). En effet, le site A, de nature électrostatique est sensible aux anions et plus généralement aux sels, il n'est pas étonnant de voir un effet du Ca<sup>2+</sup> pour ce type d'interaction. Mais le second site d'accroche C du cyt *c* sur des liposomes contenant du CL est décrit par une interaction de type liaison hydrogène entre le résidu Asn52 et un groupe phosphate du CL (Figure 4.16).

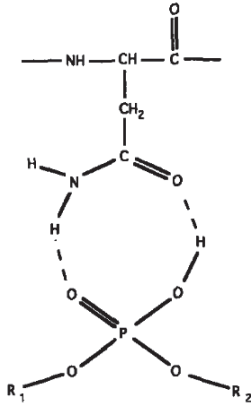


Figure 4.16 : Liaisons hydrogène entre le résidu Asn52 du cyt c et le groupement phosphate du phospholipide. D'après Rytömaa and Kinnunen 1995

Là aussi, on peut comprendre que l'affinité du  $\text{Ca}^{2+}$  pour le groupement phosphate du CL puisse perturber cette interaction. La présence dans le CL de deux groupements phosphates proches a été suggérée comme étant le motif structural responsable de la forte affinité du  $\text{Ca}^{2+}$  pour le CL (de Kruijff et al. 1982).

L'association  $\text{Ca}^{2+}$ -CL va nécessairement diminuer la densité de charge négative des groupements phosphates. Or, c'est cette densité de charges négatives qui est à la base de la formation de liaisons hydrogène entre phosphates et le résidu Asn52 du cyt c.

Une autre possibilité consiste à dire que le changement des propriétés biophysiques du CL en présence de  $\text{Ca}^{2+}$  est responsable de la perte de cyt c. En effet, en présence de  $\text{Ca}^{2+}$ , le CL subit une « rétractation » de ses chaînes grasses (Hegner et al. 1973) et adopte préférentiellement une phase hexagonale inverse même en mélange avec de la PC (Macdonald and Seelig 1987). Une des possibilités de l'origine de ce mécanisme serait la déstabilisation de la forme bicyclique du CL en présence de  $\text{Ca}^{2+}$ . La perte de cette structure modifie l'encombrement stérique de la tête polaire du CL, donc sa courbure et potentiellement son comportement de préférence d'état de phase (Haines 2009). Cela suggère que l'intégrité même du dépôt lipidique serait touchée en présence de  $\text{Ca}^{2+}$ .

## EFFET DU A L'ETAT REDUIT DU CYT C

Le cyt *c* sous sa forme fortement liée à une membrane contenant du CL peut exister sous une conformation spécifique (Cortese et al. 1998). La question est de savoir si l'état d'oxydation de la protéine a une influence sur l'induction de cette modification structurale ou bien si l'interaction avec la membrane peut à elle seule l'induire (Letellier and Shechter 1973; Cortese et al. 1995; Cortese et al. 1998).

Concrètement, la question s'est posée pour nos expériences de savoir si la deuxième sous-population de cyt *c* pouvait être induite par les potentiels réducteurs imposés lors des voltamétries cycliques faites dans la première cellule. En effet, le suivi de l'adsorption lors de cette phase d'accroche du cyt *c* suppose une réduction et une oxydation de la protéine toutes les 20-25 secondes que dure un cycle voltamétrique. Pour vérifier l'hypothèse que seul le cyt *c* réduit pourrait interagir de façon hydrophobe avec le CL, deux manipulations ont été réalisées :

1. La phase d'adsorption a été réalisée sans porter l'électrode à des potentiels réducteurs. L'électrode modifiée a été immergée dans une solution 100  $\mu\text{M}$  de cyt *c* de cœur de bœuf pendant 15 minutes.
2. Une solution de cyt *c* a été réduite à 95% avec de la dithionite (hydrosulfite de sodium) selon un protocole détaillé en Annexes. Ce cyt *c* réduit a remplacé la solution de cyt *c* qui est sous la forme oxydée par défaut.

La première expérience a démontré qu'il n'y avait pas d'impact apparent de l'utilisation ou non d'un potentiel réducteur sur la formation des deux sous-populations de cyt *c* adsorbé respectives (Figure 4.17).

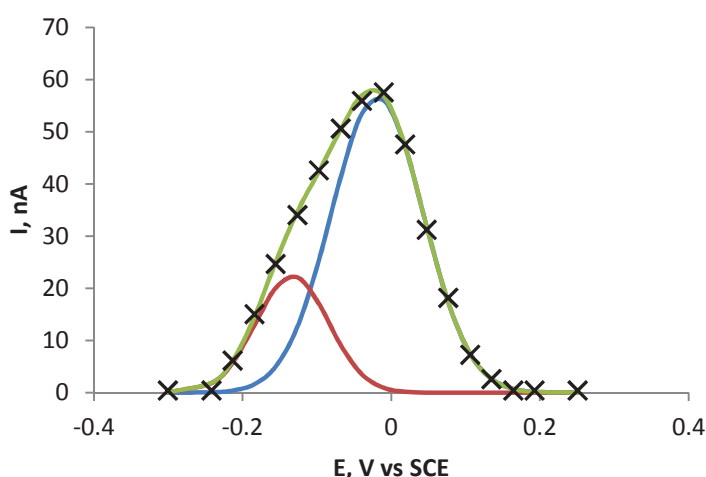


Figure 4.17 : ACV à 14Hz d'une électrode PC-CL préimmergée dans une solution 100 $\mu\text{M}$  de cyt *c* sans imposition d'un potentiel réducteur lors de l'adsorption. Croix noires : Données corrigées de la ligne de base, Courbes rouges et bleues : Déconvolution du signal en deux gaussiens représentant les sous-population 1 et 2, Courbe verte : Courbe résultante des deux déconvolutions.

Ce résultat tend à montrer que le cyt c réduit n'est pas un prérequis à la formation d'un lien plus fort entre cyt c et CL. L'utilisation d'un cyt c réduit en solution dans la première cellule conduit cependant à des résultats fort différents par rapport au schéma classique. Le cyt c réduit ne présente aucune cinétique d'adsorption sur une électrode modifiée PC-CL et ce même pour de faibles (5  $\mu\text{M}$ ) ou fortes (100  $\mu\text{M}$ ) concentrations en protéines.

Tout d'abord, ce résultat peut être le fait d'une espèce chimique issue du processus de réduction du cyt c par la dithionite. Toutefois, les résidus sulfates et sulfites issus de l'oxydation de l'hydrosulfite ne sont probablement pas un frein à l'électroactivité du cyt c. Les ions nitrates (Hagen 1989), phosphates (Szucs and Novak 1995) ou sulfates (Sun et al. 1988) ont la propriété de médiation du cyt c sur une électrode métallique nue. Hormis ce possible biais expérimental, cela peut démontrer que la charge portée par le Fer du cyt c est impliquée dans le processus d'accroche sur une membrane biologique contenant du CL. Les travaux de Kim (Kim et al. 1998) ont déjà montré que le cyt c oxydé s'adsorbe deux fois plus que le cyt c réduit sur des liposomes contenant du CL. Aucune des deux sous-populations n'ayant été observées appuie le fait que le cyt c réduit n'est pas une condition à la formation de la sous-population 2 sur l'électrode.

## CONCLUSION

Ces expériences ont permis d'apporter quelques informations sur notre système électrochimique cyt c – CL sur l'électrode modifiée. Tout d'abord, à pH acide, on peut identifier un mécanisme de transfert électronique couplé à un transfert de proton pour la sous-population 2 de cyt c. Murgida émet deux hypothèses pouvant expliquer la présence d'un PCET pour le cyt c adsorbé (Murgida and Hildebrandt 2001). Il s'agirait d'une réorganisation structurale de la protéine ou bien de la formation d'une conformation intermédiaire de cyt c. De manière générale, on peut donc avancer, par ces observations faites à différents pH, que la sous-population 2 de cyt c n'est pas dans la même conformation que la protéine native qui serait davantage associée à la sous-population 1 de cyt c.

La présence de la sous-population 2 à un pH 4 donne aussi une indication que le CL déprotoné (CL chargé -2) n'est probablement pas impliqué dans l'interaction cyt c – CL de la sous-population 2. Toutefois, les interactions entrant en jeu pour la sous-population 2 pourraient être liées aux groupements phosphates du CL car le  $\text{Ca}^{2+}$  peut les perturber.

Enfin, l'absence totale d'adsorption de cyt c réduit sur une électrode modifiée PC-CL est intéressante. Elle montre que la structure du cyt c, davantage que sa charge, est déterminante pour son accroche sur une membrane PC-CL. Le cyt c réduit en solution adopte une conformation préférentielle caractérisée par un état de spin différent. Cette conformation ne permettrait pas de s'adsorber sur une membrane PC-CL. La forme conformationnelle oxydée du cyt c serait un prérequis à l'adsorption sur une membrane contenant du CL. Une reconnaissance spécifique entre un site d'accroche sur du cyt c oxydé et le phospholipide doit exister. Dans la partie suivante, plusieurs classes de phospholipides anioniques caractérisées par la structure de têtes polaires ont été testées afin de mieux cerner cette spécificité.

## RÉFÉRENCES

- Barker, P. D. and A. G. Mauk **1992**. "pH-Linked conformational regulation of a metalloprotein oxidation-reduction equilibrium: electrochemical analysis of the alkaline form of cytochrome c." Journal of the American Chemical Society 114(10): 3619-3624.
- Basova, L. V., I. V. Kurnikov, L. Wang, V. B. Ritov, N. A. Belikova, Vlasova, I., A. A. Pacheco, D. E. Winnica, J. Peterson, H. Bayir, D. H. Waldeck and V. E. Kagan **2007**. "Cardiolipin switch in mitochondria: shutting off the reduction of cytochrome c and turning on the peroxidase activity." Biochemistry 46(11): 3423-34.
- Cortese, J. D., A. L. Voglino and C. R. Hackenbrock **1995**. "Persistence of cytochrome c binding to membranes at physiological mitochondrial intermembrane space ionic strength." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics 1228(2-3): 216-228.
- Cortese, J. D., A. L. Voglino and C. R. Hackenbrock **1998**. "Multiple Conformations of Physiological Membrane-Bound Cytochrome c<sup>+</sup>." Biochemistry 37(18): 6402-6409.
- de Kruijff, B., A. J. Verkleij, J. Leunissen-Bijvelt, C. J. A. van Echteld, J. Hille and H. Rijnbout **1982**. "Further aspects of the Ca<sup>2+</sup>-dependent polymorphism of bovine heart cardiolipin." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes 693(1): 1-12.
- Eddowes, M. J. and H. A. O. Hill **1979**. "Electrochemistry of horse heart cytochrome c." Journal of the American Chemical Society 101(16): 4461-4464.
- Greenwood, C. and G. Palmer **1965**. "Evidence for the Existence of Two Functionally Distinct Forms of Cytochrome c Monomer at Alkaline pH." Journal of Biological Chemistry 240(9): 3660-3663.
- Hagen, W. R. **1989**. "Direct electron transfer of redox proteins at the bare glassy carbon electrode." European Journal of Biochemistry 182(3): 523-530.
- Haines, T. H. **2009**. "A new look at Cardiolipin." Biochimica et Biophysica Acta 1788(10): 1997-2002.
- Haines, T. H., R. Epand and R. Epand **2008**. "The pK's of Cardiolipins Are Altered by the Number and Position of their Specific Fatty Acid Esters." The FASEB Journal 22(1\_MeetingAbstracts): 632.1.

- Hanske, J., J. R. Toffey, A. M. Morenz, A. J. Bonilla, K. H. Schiavoni and E. V. Pletneva **2012**. "Conformational properties of cardiolipin-bound cytochrome c." Proceedings of the National Academy of Sciences 109(1): 125-130.
- Hanson, C. J., M. D. Bootman and H. L. Roderick **2004**. "Cell Signalling: IP3 Receptors Channel Calcium into Cell Death." 14: R933-R935.
- Hegner, D., U. Schummer and G. H. Schnepel **1973**. "The effect of calcium on temperature-induced phase changes in liquid-crystalline cardiolipin structure." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes 307(3): 452-458.
- Huang, Y., L. Liu, C. Shi, J. Huang and G. Li **2006**. "Electrochemical analysis of the effect of Ca<sup>2+</sup> on cardiolipin-cytochrome c interaction." Biochimica et Biophysica Acta 1760(12): 1827-30.
- Ikeshoji, T., I. Taniguchi and F. M. Hawkrige **1989**. "Electrochemically distinguishable states of ferricytochrome c and their transition with changes in temperature and pH." Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry 270(1&2): 297-308.
- Jin, B., G.-X. Wang, D. Millo, P. Hildebrandt and X.-H. Xia **2012**. "Electric-Field Control of the pH-Dependent Redox Process of Cytochrome c Immobilized on a Gold Electrode." The Journal of Physical Chemistry C 116(24): 13038-13044.
- Kates, M., J.-Y. Syz, D. Gosser and T. Haines **1993**. "pH-dissociation characteristics of cardiolipin and its 2'-deoxy analogue." Lipids 28(10): 877-882.
- Kawai, C., F. M. Prado, G. L. C. Nunes, P. Di Mascio, A. M. Carmona-Ribeiro and I. L. Nantes **2005**. "pH-dependent Interaction of Cytochrome c with Mitochondrial Mimetic Membranes." Journal of Biological Chemistry 280(41): 34709-34717.
- Khalifat, N., J.-B. Fournier, M. I. Angelova and N. Puff **2011**. "Lipid packing variations induced by pH in cardiolipin-containing bilayers: The driving force for the cristae-like shape instability." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes 1808(11): 2724-2733.
- Khalifat, N., N. Puff, S. p. Bonneau, J.-B. Fournier and M. I. Angelova **2008**. "Membrane Deformation under Local pH Gradient: Mimicking Mitochondrial Cristae Dynamics." Biophysical Journal 95(10): 4924-4933.
- Kim, S.-m., K.-h. Shin, T. Fujiwara and H. Akutsu **1998**. "The interactions of ferric and ferrous cytochrome c with cardiolipin in phospholipid membranes studied by solid-state <sup>2</sup>H and <sup>31</sup>P NMR." Journal of Molecular Structure 441(2-3): 183-188.
- Koller, K. B. and F. M. Hawkrige **1988**. "The effects of temperature and electrolyte at acidic and alkaline pH on the electron transfer reactions of cytochrome c at In<sub>2</sub>O<sub>3</sub> electrodes." Journal of Electroanalytical Chemistry 239(1-2): 291-306.
- Letellier, L. and E. Shechter **1973**. "Correlations between Structure and Spectroscopic Properties in Membrane Model System." European Journal of Biochemistry 40(2): 507-512.
- Lojou and P. Bianco **2000**. "Membrane electrodes can modulate the electrochemical response of redox proteins - direct electrochemistry of cytochrome c." Journal of Electroanalytical Chemistry 485(1): 71-80.
- Macdonald, P. M. and J. Seelig **1987**. "Calcium binding to mixed cardiolipin-phosphatidylcholine bilayers as studied by deuterium nuclear magnetic resonance." Biochemistry 26(19): 6292-6298.
- Murgida, D. H. and P. Hildebrandt **2001**. "Proton-Coupled Electron Transfer of Cytochrome c." Journal of the American Chemical Society 123(17): 4062-4068.
- Paradies, G., G. Petrosillo, V. Paradies and F. M. Ruggiero **2009**. "Role of cardiolipin peroxidation and Ca<sup>2+</sup> in mitochondrial dysfunction and disease." Cell Calcium 45(6): 643-50.



- Park, H., J.-S. Park and Y.-B. Shim **2001**. "Electrochemical and in situ UV-visible spectroscopic behavior of cytochrome c at a cardiolipin-modified electrode." Journal of Electroanalytical Chemistry 514(1-2): 67-74.
- Petrosillo, G., G. Casanova, M. Matera, F. M. Ruggiero and G. Paradies **2006**. "Interaction of peroxidized cardiolipin with rat-heart mitochondrial membranes: induction of permeability transition and cytochrome c release." FEBS Letters 580(27): 6311-6.
- Petrosillo, G., F. M. Ruggiero, M. Pistolesse and G. Paradies **2004**. "Ca<sup>2+</sup>-induced reactive oxygen species production promotes cytochrome c release from rat liver mitochondria via mitochondrial permeability transition (MPT)-dependent and MPT-independent mechanisms: role of cardiolipin." Journal of Biological Chemistry 279(51): 53103-8.
- Rajagopal, B. S., G. G. Silkstone, P. Nicholls, M. T. Wilson and J. A. R. Worrall **2012**. "An investigation into a cardiolipin acyl chain insertion site in cytochrome c." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics 1817(5): 780-791.
- Rytömaa, M. and P. K. J. Kinnunen **1995**. "Reversibility of the Binding of Cytochrome c to Liposomes." Journal of Biological Chemistry 270(7): 3197-3202.
- Rytömaa, M., P. Mustonen and P. K. Kinnunen **1992**. "Reversible, nonionic, and pH-dependent association of cytochrome c with cardiolipin-phosphatidylcholine liposomes." Journal of Biological Chemistry 267(31): 22243-8.
- Sun, S. C., D. E. Reed, J. K. Cullison, L. H. Rickard and F. M. Hawkridge **1988**. "Electron transfer reactions of cytochrome c at metal electrodes." Microchimica Acta 96(1): 97-104.
- Szucs and M. Novak **1995**. "Stable and reversible electrochemistry of cytochrome c on bare electrodes Part II: Effects of experimental conditions." Journal of Electroanalytical Chemistry 384(1-2): 47-55.
- Theorell, H. and A. Akesson **1941**. "Studies on Cytochrome c. II. The Optical Properties of Pure Cytochrome c and Some of Its Derivatives." Journal of the American Chemical Society 63(7): 1812-1818.
- Zhou, J., X. Lu, J. Hu and J. Li **2007**. "Reversible immobilization and direct electron transfer of cytochrome c on a pH-sensitive polymer interface." Chemistry 13(10): 2847-53.





## CHAPITRE 4 - PARTIE 2 : MEDIATION ELECTROCHIMIQUE DU CYT C, LIPID ANCHORAGE

### INTRODUCTION

Etablie pour la première fois par l'équipe de Kinnunen dans les années 90, la théorie du « lipid anchorage » du cyt *c* et les interactions lipides membranaires – cyt *c* étaient déjà pressenti par différentes études antérieures. En 1969, Quinn réalise des études sur le cyt *c* radiomarqué adsorbé sur des bicouches lipidiques de différentes natures (PC, PA et CL), identifie des interactions électrostatiques entre CL, PA et cyt *c* (Quinn and Dawson 1969). Toutefois, le CL devient à partir de ce moment le meilleur candidat pour expliquer le phénomène d'immobilisation de cyt *c* sur les membranes mitochondriales. Quinn ajoute d'ailleurs : « It is perhaps not a coincidence that the cytochrome *c* content of mammalian tissues appears to be related to the cardiolipin content (Getz et al. 1968) ». Par la suite, l'adsorption du cyt *c* sur des membranes contenant des phospholipides anioniques a été identifiée, confirmant l'existence d'une interaction de type électrostatique avec le cyt *c*. L'équipe de Kinnunen qui est à la base de la théorie du « lipid anchorage » a décrit ce phénomène pour des liposomes contenant du CL mais aussi de la PG. Dans ce chapitre, l'électrode modifiée décrite précédemment a été utilisée pour tester une majorité de classes de phospholipides anioniques (CL, PG, PI, PS, PA) ainsi que des variantes de ces classes amputées de certains acides gras les composant dans le but de mieux comprendre le phénomène du « lipid anchorage » et le lien avec les deux sous-populations de cyt *c* adsorbé.

## LES DIFFERENTES ESPECES ELECTROACTIVES DU CYT C

Comme expliqué dans le premier chapitre, le cyt c n'est pas électroactif sur une électrode métallique ou de carbone vitreux nue. Cela est lié au phénomène de dénaturation de la structure protéique du cyt c sur une surface d'électrode « dure ». La solution d'utiliser des phospholipides comme modifieur de surface a plusieurs avantages dans notre cas. L'un de ces avantages est que nous observons deux propriétés de ce modifieur qui sont la fixation et la promotion électrochimique du cyt c. Le chapitre 3 a démontré qu'une électrode modifiée avec des phospholipides permet d'observer un comportement électrochimique réversible du cyt c. Toutefois, le signal électrochimique retrouvé peut avoir deux origines.

1. La promotion électrochimique du cyt c en solution (forme de cyt c que l'on appellera cyt c « libre »)
2. L'immobilisation du cyt c à la surface de l'électrode modifiée (forme de cyt c que l'on appellera cyt c « immobilisé »).

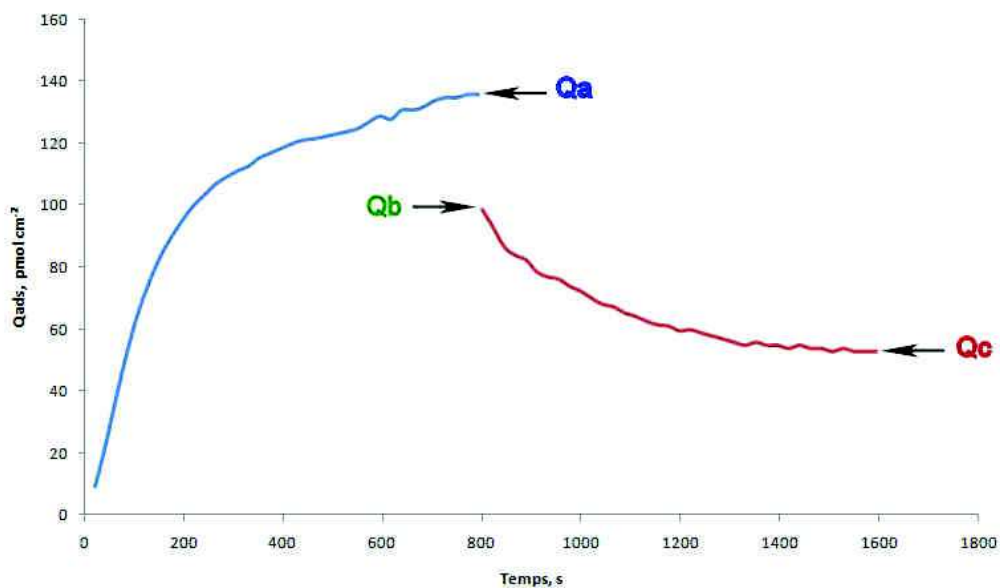


Figure 4.20 : Variation de la quantité de cyt c électroactif au cours de l'expérience. Courbe bleue : phase d'adsorption du cyt c dans la première cellule. Courbe rouge : phase de désorption du cyt c dans la deuxième cellule. Qa : Charge surfacique issue de l'immobilisation et de la médiation du cyt c, Qb : Charge surfacique issue de l'immobilisation du cyt c après le transfert de cellule, Qc : cyt c résiduel après stabilisation.

Ces deux formes de cyt c électroactifs ont pu être séparées grâce au transfert, après lavage, de l'électrode modifiée dans une deuxième cellule électrochimique dépourvue de cyt c en solution, ce qui exclu la présence de cyt c « promotion ».

La variation de la quantité de cyt c électroactif sur l'électrode modifiée est présentée Figure 4.20. La première courbe représente l'adsorption de cyt c dans la première cellule électrochimique en présence de cyt c dissous. On observe une augmentation du cyt c électroactif jusqu'à une valeur seuil appelée Qa. Qa représente le cyt c total, c'est-à-dire, le cyt c « libre » + cyt c « immobilisé ». Qb représente la quantité initiale de cyt c après le lavage de l'électrode et son transfert dans la deuxième cellule électrochimique. On observe à ce stade une perte de cyt c qui se stabilise jusqu'à une quantité limite représentée par Qc.

Nous définissons les différentes populations de cyt c électroactifs comme suit :

cyt c « libre » :  $Q_a - Q_b$

cyt c « immobilisé faible » :  $Q_b - Q_c$

cyt c « immobilisé fort » :  $Q_c$

Le cyt c « libre » n'est pas véritablement  $Q_a - Q_b$  car nous devons vraisemblablement perdre une partie du cyt c adsorbé lors du lavage de l'électrode. Toutefois, l'existence de l'effet de médiation s'est vérifiée par les observations faites sur le potentiel redox du cyt c (vide infra).

## VARIATION DE L'ADSORPTION DE CYT C EN FONCTION DE LA CLASSE DE PHOSPHOLIPIDES

Le cardiolipide n'est pas le seul phospholipide anionique à pH physiologique (pH 7.4). Pour ne citer que les principaux, il existe aussi l'acide phosphatidique (PA), la phosphatidylinositol (PI), la phosphatidylsérine (PS), la phosphatidylglycérol (PG). Il nous est apparu intéressant de tester d'autres modificateurs de surface que notre mélange PC-CL 80/20 afin de vérifier et mieux comprendre la spécificité supposée du cyt c pour le CL. L'objectif est d'identifier si les différentes formes de cyt c électroactifs définis précédemment (« libre » ou « immobilisée ») sur une électrode modifiée existent pour différentes classes de phospholipides. Une comparaison avec deux phospholipides neutres que sont la phosphatidyléthanolamine (PE), et la phosphatidylcholine (PC) a aussi été réalisée. Les abréviations utilisées pour les sources de phospholipides (par exemple PE BB = Phosphatidylethanolamine bovine brain) ainsi que leurs compositions en AG sont détaillées en Annexes. Les classes de phospholipide suivantes ont été testées :

- PE : Phosphatidyléthanolamine BB (bovine brain)
- PC : Phosphatidylcholine SB (soybean)
- PG : Phosphatidylglycérol 18:1
- CL : Cardiolipide 18:1
- PA : Acide phosphatidique 18:1
- PS : Phosphatidylsérine BB
- PI : Phosphatidylinositol SB

Les mélanges lipidiques ont été réalisés afin d'obtenir une proportion massique de 67/33 PC-phospholipide équivalente pour chaque mélange (hormis pour la PC qui a été utilisée pure). Cela permet de fixer la quantité du phospholipide d'intérêt afin de s'affranchir du biais lié à des masses molaires différentes entre phospholipides. Par exemple, un mélange molaire 80/20 PC-PG a environ deux fois plus de phospholipide anionique (la PG ici) qu'un mélange PC-CL 80/20 (mol/mol).

Les quantités de cyt c électroactifs définies en Figure 4.20 ont été reportés dans la Figure 4.21 pour les différentes classes de phospholipides testées. Nous avons testé deux phospholipides zwitterioniques (charge globale neutre au pH utilisé de 7.4) que sont la PC et la PE. La PC n'est pas représentée dans le tableau car aucune forme de cyt c électroactif n'a pu être identifiée lors de ces expériences. Nous discuterons de l'observation de cette électroinactivité du cyt c avec la PC plus en détail dans la partie suivante.

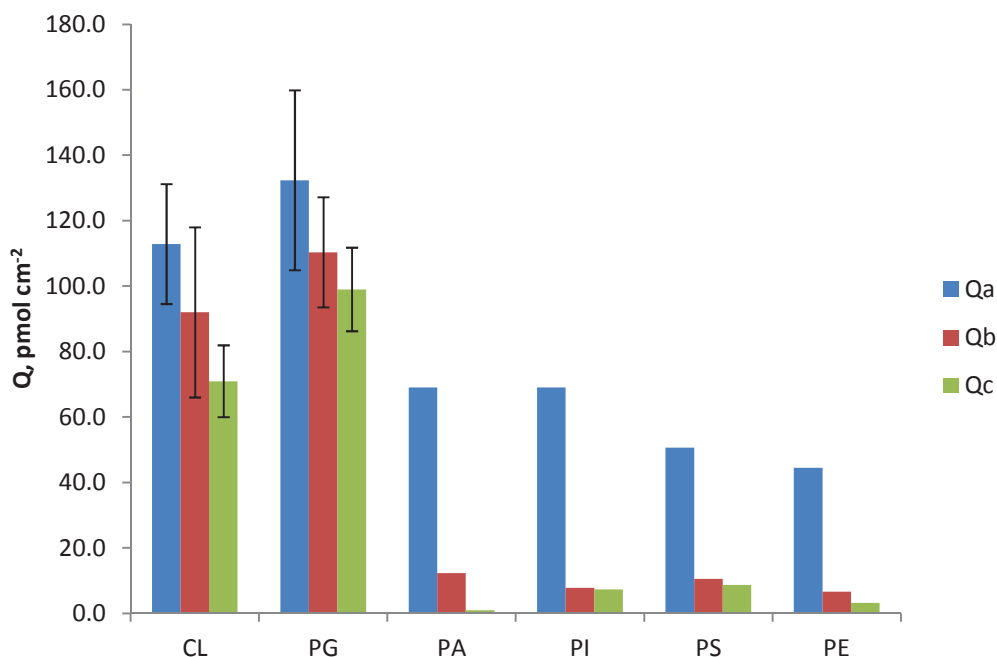


Figure 4.21 : Quantité de cyt c électroactif à différentes étapes de l'expérience pour les classes de phospholipide CL, PG, PA, PI, PS et PE (n=3 pour CL, n=4 pour PG, n=1 pour PA, PI, PS et PE).

Contrairement à la PC, la PE permet la promotion de cyt c « libre » (c'est-à-dire Qa-Qc) et dans une moindre mesure que le CL, une accroche du cyt c.

Ce résultat peut paraître surprenant car il existe peu de différences de structure entre une tête polaire de type choline (PC) et une tête polaire de type éthanolamine (PE) (Figure 4.22).

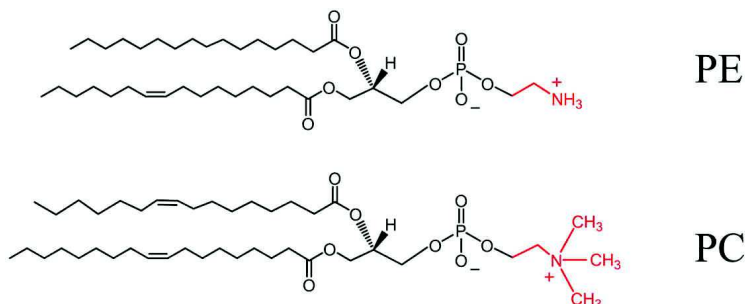


Figure 4.22 : Structures semi-développées de la PE et de la PC

Le  $pK_a$  du groupement amine de la PE a une valeur supérieure à 11 (Figure 4.23). Il peut en résulter une valeur légèrement plus faible de la charge globale de la PE par rapport à la PC. Toutefois, il est peu plausible que ce facteur explique à lui seul la différence de comportement observée. Le fait que, dans le cas de la PC, le groupement amine soit quaternaire et donc que la charge positive portée par ce groupement soit moins accessible est probablement un facteur plus important.

Il faut également noter que la composition en AGs de cette PE « bovine brain » est très différente de la PC « soy bean » même si ce facteur ne permet pas d'expliquer une absence de cyt c électroactif « libre » ou « immobilisé ». La PC a une majorité de chaînes en 18:2 tandis que la PE possède des AGs majoritaires composés de 18:1, 20:4, 18:0 et 22:6 (détails des compositions en Annexes).



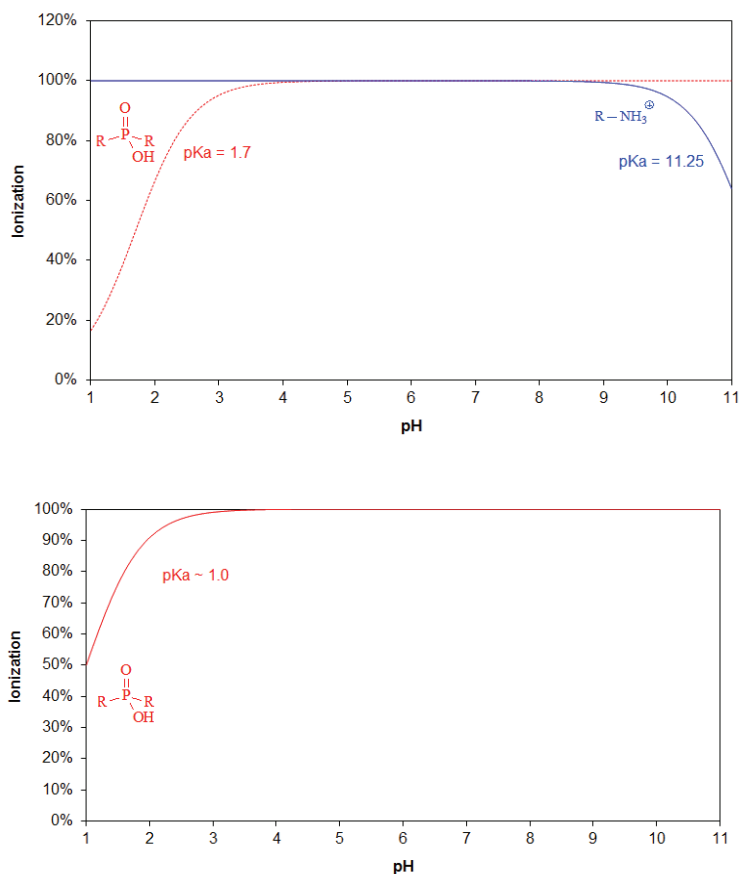


Figure 4.23 : Polarisation de la PE (graphique supérieur) et de la PC (graphique inférieur) en fonction de la charge des différentes fonctions portées par le phospholipide en fonction du pH. D'après Avanti Polar Lipid.

Nous pouvons tout de même observer que cette différence de comportement électrochimique du cyt c en présence de PC ou de PE renforce l'idée que la structure de la tête polaire du phospholipide est très importante pour observer un effet « d'accroche » du cyt c sur notre électrode.

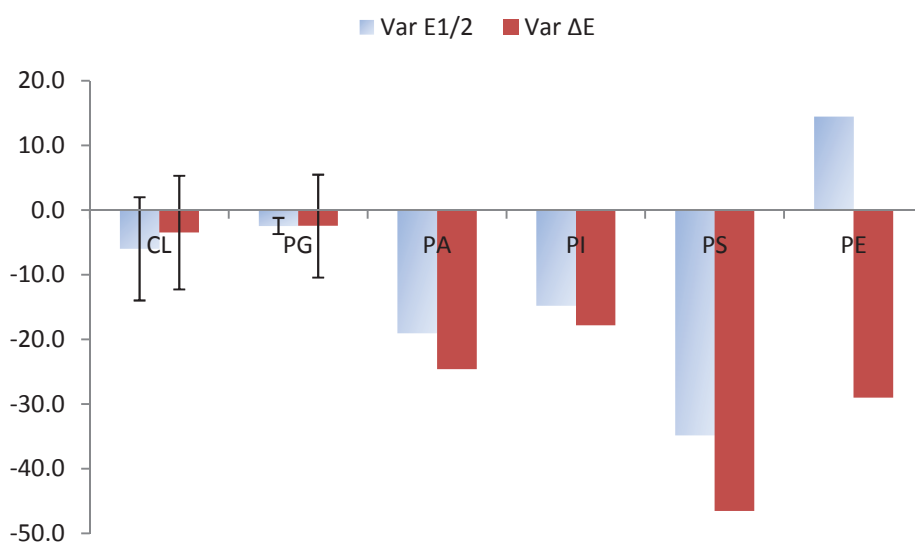
Toutes les électrodes modifiées par les phospholipides anioniques (PI, PS, PA, PG, et CL) ont la capacité de transférer des électrons avec le cyt c « libre » en solution. Toutes ces électrodes ont également la capacité d'immobiliser du cyt c dans un premier temps (Qb). Toutefois, durant la phase de désorption qui suit le transfert de l'électrode dans la deuxième cellule électrochimique, nous observons une stabilisation du cyt c à des valeurs significativement plus hautes uniquement pour le CL et la PG. PS, PI et PA montrent une désorption progressive de cyt c pour atteindre un seuil autour de 2-8 pmol cm<sup>-2</sup>.

Les potentiels redox ainsi que les vitesses de transfert électronique de la sous-population 1 de cyt c pour les différentes classes de phospholipides testées sont présentés en [Tableau 4.1](#). Mise à part la PE qui est le seul phospholipide neutre du groupe, les valeurs de potentiels et de cinétiques sont similaires.

	CL	PG	PA	PI	PS	PE
$E^\circ$	$-14.7 \pm 6.5$	$-14.3 \pm 2$	-15.3	-10	-17.8	15.5
$k_{ET}$	$55 \pm 34$	$64 \pm 44$	n.d.	22	65	n.d.

**Tableau 4.1 : Potentiel et vitesse de transfert électronique de la sous-population 1 de cyt c pour différentes modification d'électrodes (n=3 pour CL, n=4 pour PG, n=1 pour PA, PI, PS et PE). Les données sont présentées  $\pm$  erreur standard si possible.**

Pour la PA, la PS et la PI, les plus faibles valeurs d'adsorption de cyt c mesurées montrent que ces paramètres ont été mesurés sur des traces résiduelles de cyt c (en particulier pour la PA) et ne sont pas représentatifs d'un processus d'accroche comparable à celui observé avec la PG et le CL. On a pu observer que les valeurs de potentiels sont plus élevées pour la PI, PA et PS par rapport à la PG et au CL dans la première cellule électrochimique qui contient du cyt c en solution. Cet aspect est bien représenté par la différence de valeurs de potentiels de demi-pic et d'écart entre les pics qui a été calculé lors du transfert de cellule électrochimique (Figure 4.24).



**Figure 4.24 : Variation des valeurs d' $E_{1/2}$  et de  $\Delta E$  des sous-population 1 de cyt c immobilisé lors du transfert entre les deux cellules électrochimiques.**

Le potentiel redox du cyt c « libre » est probablement très proche du potentiel du cyt c natif qui est d'environ +20 mV vs SCE. Après transfert dans la deuxième cellule, le potentiel redox du cyt c est déplacé négativement. Cela est principalement dû à la perte du signal du cyt c « libre » qui possède un potentiel formel plus élevé que le cyt c « immobilisé » qui doit se situer vers -20 mV vs SCE. Ces variations sont d'autant plus importantes que la part de cyt c « libre » dans la première cellule électrochimique est importante comme cela est le cas pour la PA, la PI et la PS. A la fois les valeurs quantité de cyt c électroactifs entre les différentes cellules (Figure 4.21) et les variations présentées en Figure 4.24 démontrent que la majorité du cyt c électroactif pour les électrodes modifiées de type PA, PI et PS est le cyt c « libre » dans la première cellule.

Pour les électrodes modifiées de type CL et PG, nous retrouvons la sous-population 2 de cyt c adsorbé qui a été identifiée dans le chapitre 3 comme la sous-population « hydrophobe ». Le cyt c adsorbé sur une électrode modifiée avec de la PG possède également une sous-population 2 décalée dans les potentiels négatifs par rapport à la première (Tableau 4.2). Les électrodes modifiées par la PA, la PS et la PI n'ont pas de trace d'une deuxième sous-population.

	CL	PG
$E^{\circ}$	$-125 \pm 0.5$	$-131 \pm 4$
$k_{ET}$	$335 \pm 65$	$487 \pm 117$

**Tableau 4.2 : Potentiel et vitesse de transfert électronique de la sous-population 2 de cyt c pour différentes modification d'électrodes (n=3 pour CL, n=4 pour PG).**

Globalement, les valeurs des paramètres électrochimiques, c'est-à-dire des quantités de cyt c électroactifs (Figure 4.21) ou des valeurs de potentiel redox et de cinétique de transfert électronique des sous-populations 1 (Tableau 4.1) et des sous-populations 2 (Tableau 4.2) de cyt c sont comparables pour les électrodes modifiées de type PG et CL. Les données présentées pour les autres phospholipides anioniques se séparent nettement des valeurs obtenues pour le CL et la PG. Cela renvoie aux premiers travaux de Rytömaa qui démontrent qu'en condition de faible force ionique (comme dans nos conditions expérimentales), le cyt c possède la même affinité pour des liposomes composés de PG ou bien de CL (Rytömaa and Kinnunen 1994).

Ces résultats sont cohérents avec une hypothèse basée sur un effet de promotion électrochimique du cyt c « libre » pour les phospholipides anioniques. Si la charge négative portée par le phospholipide permet la promotion électrochimique de cyt c « libre », il faut un phospholipide présentant un motif glycérol dans la structure de sa tête polaire afin de retenir le cyt c sur une électrode de GC modifiée.

EFFET DU  $\text{Ca}^{2+}$  SUR LE SYSTEME CYT C - PG

Nous avons testé l'effet de l'ajout de 2 mM de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la deuxième cellule électrochimique sur du cyt c « immobilisé » sur une électrode modifiée avec un dépôt PC-PG. L'expérience a été réalisée avec un tampon de mesure classique contenant 1 mM d'EDTA. Nous avons donc doublé la quantité de  $\text{Ca}^{2+}$  afin de palier à la perte de  $\text{Ca}^{2+}$  par l'EDTA.

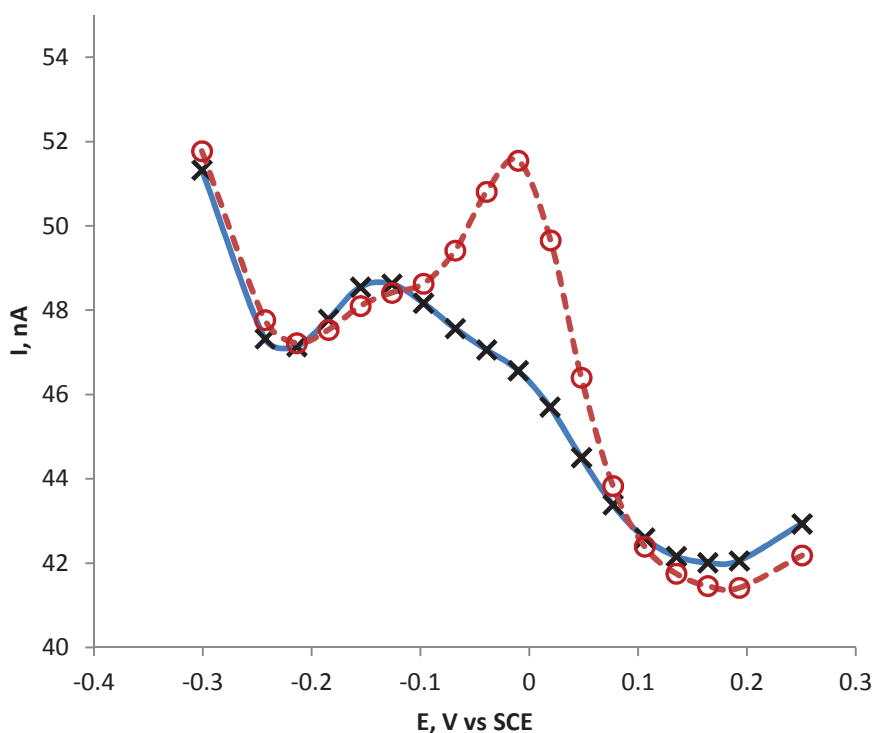


Figure 4.25 : ACV (ligne de base non corrigée) à 1 Hz de cyt c adsorbé sur une électrode modifiée PC-PG 18:1 avec (croix noires) ou sans (ronds rouges) addition de 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$ .

Deux ACV ont été réalisées, à la suite, avec ou sans injection de 2 mM de  $\text{Ca}^{2+}$  (Figure 4.25). Nous observons une réduction de la quantité de la sous-population 1 de cyt c en présence de  $\text{Ca}^{2+}$ . La sous-population 2 de cyt c préalablement identifiée n'est pas modifiée par le traitement au  $\text{Ca}^{2+}$ . Pour rappel, l'effet du  $\text{Ca}^{2+}$  sur une électrode de type PC-CL a provoqué une désorption quasi-totale des deux sous-populations de cyt c. Pour la PG, on retrouve la même réponse que pour l'électrode de type PC-CL traitée au KCl (chapitre 3). La réponse de la sous-population 2 au  $\text{Ca}^{2+}$  entre une électrode modifiée PC-CL et PC-PG pourrait apporter des indications importantes aux interactions spécifiques  $\text{Ca}^{2+}$ /CL. La présence de deux groupes phosphates dans le cas du CL pourrait en être l'origine de l'affinité particulière du  $\text{Ca}^{2+}$  pour le CL (de Kruijff et al. 1982).

## CINETIQUES D'ADSORPTION DE CYT C

Le protocole expérimental de modification de l'électrode de GC par un mélange PC-CL fait intervenir une étape d'adsorption de cyt c dans la première cellule électrochimique. On observe une adsorption de cyt c (Figure 4.21) jusqu'à une limite que l'on peut calculer par une des lois mathématiques d'adsorption. Cette cinétique d'adsorption peut être d'ordre 0, 1 ou 2. Un profil typique d'adsorption de cyt c sur une électrode modifiée PC-CL est présenté en Figure 4.26.

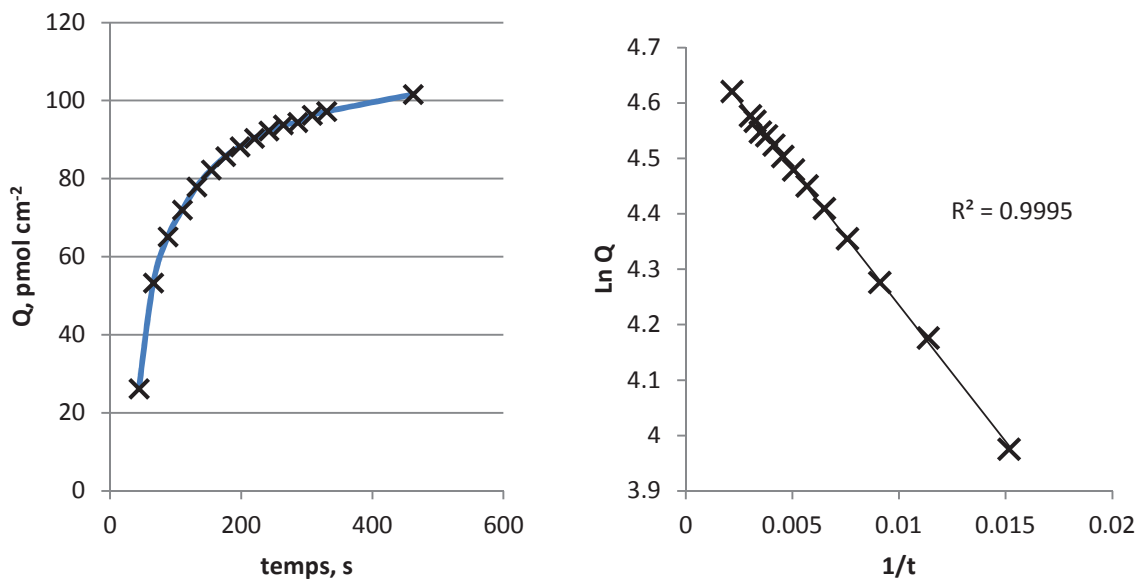


Figure 4.26 : Suivi de l'évolution en voltamétrie cyclique de la quantité de cyt c en fonction du temps d'immersion dans la première cellule électrochimique. Modification de l'électrode 0.25µg PC-CL 18:1.

Soit  $Q$  la quantité de cyt c électroactif en coulombs,  $t$  le temps en secondes,  $\theta$  la constante de désorption du cyt c et donc  $Q_{max}$  la quantité maximale de cyt c adsorbé, les cinétiques d'adsorption s'écrivent :

$$\text{Ordre 0 : } Q = \theta \cdot t$$

$$\text{Ordre 1 : } Q = Q_{max} \cdot e^{-\left(\frac{\theta}{Q_{max} \cdot t}\right)}$$

$$\text{Ordre 2 : } Q = Q_{max} \cdot \left(\frac{t}{\theta + t}\right)$$

On utilise généralement des formulations adaptées qui permettent de trouver graphiquement les paramètres d'adsorption maximale  $Q_{max}$  et le facteur d'adsorption  $\theta$  comme la linéarisation de Lineweaver et Burke pour l'ordre 2 par exemple :

$$\text{Ordre 2 : } \frac{1}{Q} = \frac{\theta}{Q_{max}} \cdot \frac{1}{t} + \frac{1}{Q_{max}}$$

$$\text{Et pour l'ordre 1 : } \ln(Q) = \ln(Q_{max}) - \frac{\theta}{Q_{max}} \cdot \frac{1}{t}$$

Les cinétiques d'adsorption ont été calculées pour tous les phospholipides anioniques testés (Figure 4.27). Ce sont toutes des cinétiques d'ordre 1 hormis le cas de la PA qui se situe entre une cinétique d'ordre 0 et 1. Le coefficient de corrélation pour une cinétique d'ordre 1 est de 0.96 pour la PG et 0.91 pour la PA, tandis qu'il est de 0.83 pour la PG et 0.94 pour la PA si l'on considère une cinétique d'ordre 0. Ce résultat suggère que le mécanisme d'adsorption entre la PA et les autres phospholipides anioniques est différent. Ce comportement est aussi observé lors de la phase de désorption de cyt c sur une électrode modifiée avec de la PA (cinétique de désorption intermédiaire entre un ordre 1 et 0). La valeur négative de la cinétique d'adsorption pour la PS correspond en réalité au fait que l'adsorption maximale est atteinte dès les premiers balayages en CV et que les balayages suivants montrent une perte graduelle de cyt c électroactif.

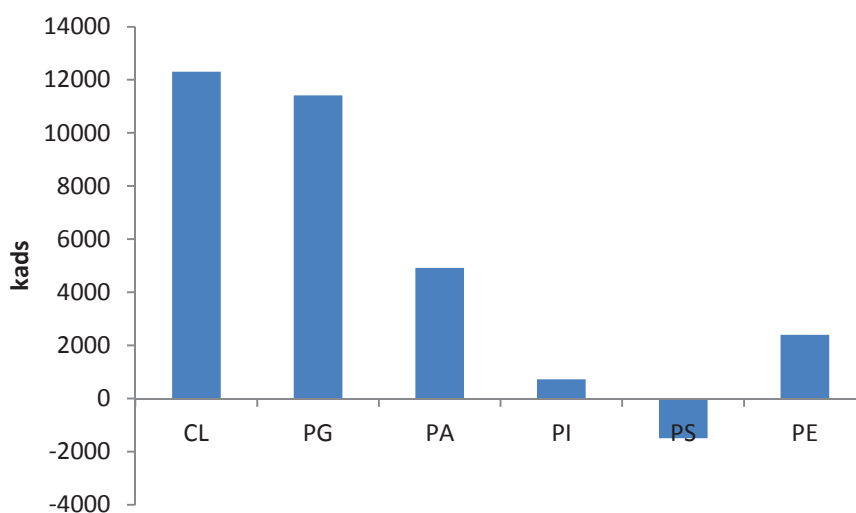


Figure 4.27 : Cinétiques d'adsorption du cyt c sur différentes électrodes modifiées. Une constante d'adsorption plus grande témoigne d'une adsorption plus lente par rapport à une constante plus faible.

La PG et le CL ont des cinétiques d'adsorption similaires et plus lentes que la PA, PI, PS et PE. Comme on le verra dans la dernière partie de ce chapitre traitant de l'effet des chaînes du CL, la nature des chaînes grasses portées par les phospholipides peuvent avoir un effet sur la vitesse d'adsorption du cyt c. Ainsi, les différences de cinétique d'adsorption observées entre les classes de phospholipides étudiées pourraient être en partie influencées par les différences de composition en AG. La PI, la PS et la PE portent en effet des AG polyinsaturés au contraire de la PA, la PG et le CL qui ont uniquement des AG en 18:1.

On peut néanmoins penser que la cinétique d'adsorption lente observée pour le CL et la PG correspond à un mécanisme d'adsorption différent à ceux des autres phospholipides et en particulier la PA qui comporte les mêmes chaînes grasses. Ce processus se produit sur une échelle temporelle de l'ordre de 10 minutes pour la PG et le CL alors qu'il est quasi-instantané pour la PS, ou de l'ordre de quelques dizaines de secondes pour la PI, la PE ou la PA.

### RETENTION DE CYT C SUR UNE ELECTRODE MODIFIEE PC-PA

Si l'immobilisation de cyt c sur une électrode modifiée PC-PA n'est pas observée pour les résultats présentés précédemment, des modifications des conditions de préparation de l'électrode ont permis d'obtenir une accroche durable de cyt c en présence de PA. Une augmentation de la rugosité locale en polissant l'électrode de GC avec de l'alumine dont les grains font 3  $\mu\text{m}$  (taille habituellement utilisée 0.04  $\mu\text{m}$ ) a été réalisée. Nous avons également porté la proportion de PA à 45% (%mol).

Dans ces conditions, le cyt c « immobilisé » atteint des valeurs similaires à celle pour des électrodes modifiées de type PG ou CL. Dans l'exemple suivant (Figure 4.28), nous obtenons une adsorption stable de 125  $\text{pmol cm}^{-2}$  de cyt c sur une électrode modifiée PC-PA.

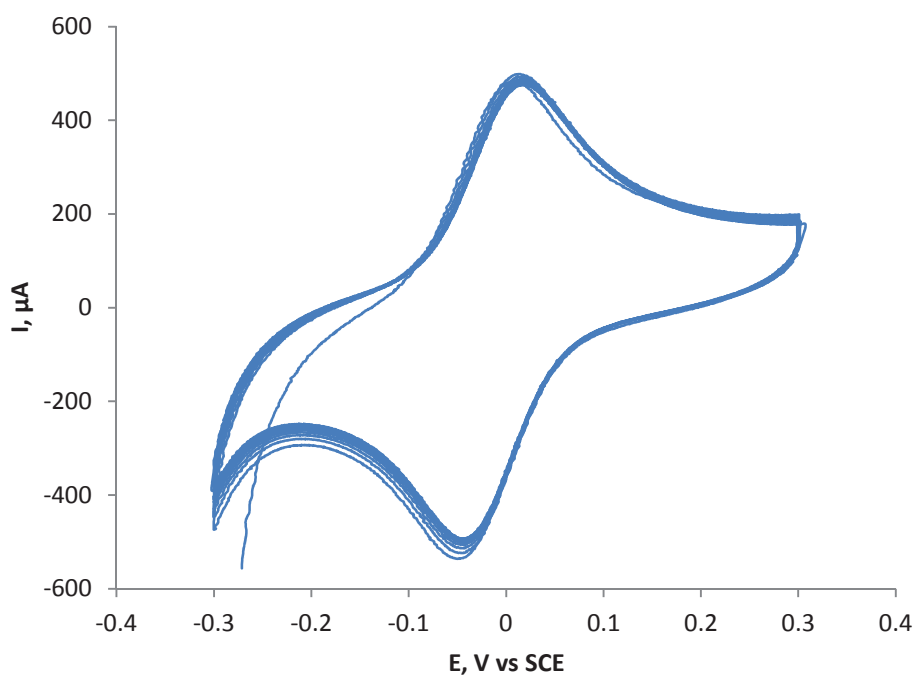


Figure 4.28 : 15 cycles stables en CV dans la deuxième cellule électrochimique de cyt c adsorbé sur une électrode de GC « rugueuse » et modifiée avec un dépôt de PC-PA

On peut supposer que ces conditions expérimentales permettent l'établissement d'interactions multiples entre la PA et le cyt c. La protéine pourrait être stabilisée grâce à la rugosité de la surface de carbone (Figure 4.29). Une adsorption de cyt c sur des liposomes composés d'un mélange PC-PA a déjà été reportée par Mustonen (Mustonen et al. 1987). Toutefois, les auteurs montrent que c'est davantage la formation de microdomaines de PA qui permet cette adsorption alors qu'une membrane dont les PC et PA sont distribués de façon homogène ne permet pas d'adsorption de cyt c.

Cela démontre qu'indépendamment de la nature du phospholipide anionique utilisé sur une électrode modifiée, la quantité et l'accessibilité des charges négatives peuvent suffire à une immobilisation conséquente de cyt c.

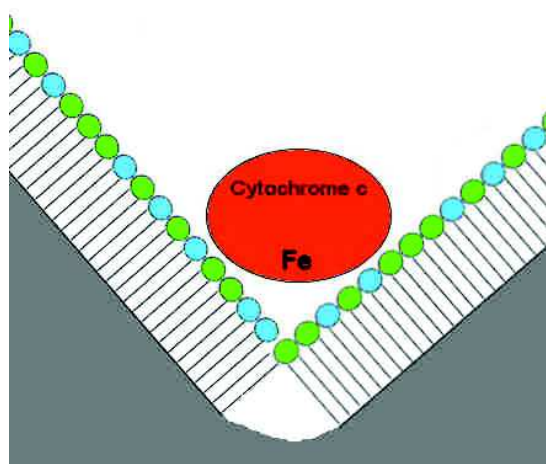


Figure 4.29 : Modèle conceptuel de l'accroche de cyt c sur une électrode de GC recouverte d'un dépôt de PC-PA 60-40 (mol/mol).

Plus généralement, cela démontre l'importance cruciale de la bonne préparation de l'état de surface de l'électrode pour obtenir un modèle expérimental fiable et répétable. Les conditions expérimentales ont évolué au cours de ces travaux afin d'essayer de s'affranchir de ce type de biais qui n'est pas représentatif du modèle biomimétique que l'on souhaite obtenir. Toutefois, si l'obtention d'un poli miroir sur une électrode de GC avec un processus d'au moins 15 mn de polissage avec de l'alumine de grain 0.04  $\mu\text{m}$  a permis d'obtenir un état de surface plus adéquat, cela a provoqué un resserrement des paramètres électrochimiques mesurés autour de valeurs communes, notamment pour les dernières expériences réalisées sur les spécificités de composition en AG du CL (partie 3 de ce chapitre).



## IMMOBILISATION DE CYT C AVEC DU DILYSO CARDIOLIPIDE

Un CL 18:2 dont deux chaînes grasses ont été lysés a été utilisé. Ce lipide est identifié sous le nom de dilyso CL (dLCL). Il a été utilisé en mélange 72/28 (mol/mol) afin d'avoir le même rapport massique qu'un mélange PC-CL 80/20. Dans ces conditions, le cyt c « immobilisé » (dans la deuxième cellule électrochimique) est identifié sur l'électrode modifiée (Figure 4.30). Ce cyt c est caractérisé par une quantité adsorbée de 20 pmol cm<sup>-2</sup> et un potentiel de demi-pic de +6 mV vs SCE. La quantité de cyt c « immobilisé » est donc apparue plus légèrement faible que dans le cas d'un CL ayant quatre chaînes grasses du même type (18:2). Le potentiel formel mesuré avec une électrode de type dLCL se rapproche davantage du potentiel du cyt c « libre » que du cyt c « immobilisé » avec un CL à quatre chaînes ce qui est une indication que le processus d'immobilisation du cyt c n'est pas tout à fait identique.

Comme on le verra plus loin dans ce chapitre, une des hypothèses permettant d'expliquer un décalage vers les potentiels négatifs de la sous-population 1 de cyt c adsorbé est de considérer que le cyt c réduit subit une réorganisation conformationnelle en présence de CL.

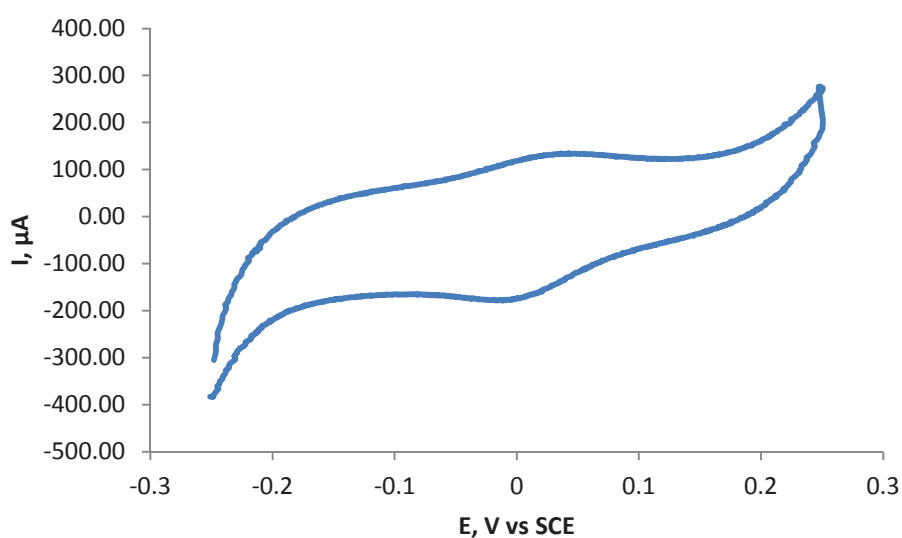


Figure 4.30 : CV à 50 mV s<sup>-1</sup> de cyt c « immobilisé » (deuxième cellule) sur une électrode modifiée avec un dépôt de PC-dLCL 18:2 en proportion molaire 72/28.

Pour aller plus loin, nous pouvons remarquer que la voltamétrie cyclique (Figure 4.30) laisse apparaître un comportement non idéal caractérisé par une dissymétrie entre les pics d'oxydation et de réduction du cyt c immobilisé avec du dLCL. La charge calculée lors de l'oxydation est environ de 2/3 celle calculée lors de la

réduction du cyt c. Ces paramètres attestent d'un état d'adsorption différent du cyt c en présence de dLCL par rapport au CL.

Malheureusement, les mesures en ACV ne sont pas exploitables et la présence de la sous-population 2 en présence de ce phospholipide n'a pas pu être vérifiée. Toutefois, la présence d'une sous-population 1 fixée sur l'électrode suggère que l'intégralité de la structure hydrophobe n'est pas si déterminante pour une immobilisation de cyt c.

La théorie du « lipid anchorage » prévoit l'insertion d'une seule chaîne grasse dans un patch hydrophobe du cyt c. Mais récemment, l'équipe de Sinibaldi (Sinibaldi et al. 2010) suppose l'insertion simultanée de deux chaînes grasses du CL dans le cyt c (Figure 1.18 – chapitre 1). Le fait d'avoir une adsorption plus faible avec un CL ne possédant que deux chaînes ne signifie pas forcément que les chaînes sont primordiales pour l'immobilisation de cyt c. En effet, la nature de la partie hydrophobe du CL pourrait potentiellement influencer les propriétés de la tête polaire du CL. Par exemple, la nature et la position des chaînes grasses portées par le CL auraient un impact sur le pKa du CL (communications personnelles avec le Pr. Richard Emand, Haines et al. 2008). Ces résultats préliminaires ne permettent pas de rejeter l'hypothèse de Sinibaldi.

## PHOSPHOLIPIDES NEUTRES, CAS DE LA PC

Ces essais ont permis de confirmer l'absence de médiation électrochimique du cyt *c* avec une électrode de GC modifiée à la PC. Pourtant, il y aurait matière à débattre quant à la possibilité par une électrode modifiée avec de la PC de permettre la promotion du cyt *c* « libre ». La partie suivante apporte quelques précisions sur le phénomène d'électroinactivité du cyt *c* sur une électrode modifiée avec de la PC.

La PC a globalement la même structure que les autres phospholipides testés ici (PA, PS, PI, PG ou CL), c'est-à-dire une queue hydrophobe et une partie hydrophile constituée par la tête polaire. Mais contrairement aux autres phospholipides dont la tête polaire est chargée négativement, celle de la PC est considérée comme neutre. L'absence de promotion électrochimique dans le cas de la PC sous-entendrait que la partie hydrophile est déterminante pour la promotion électrochimique du cyt *c* « libre ».

Il existe un débat sur l'importance de la partie hydrophile ou hydrophobe d'un phospholipide pour la médiation d'une métalloprotéine. Lors de la médiation d'une protéine rendue possible par une modification de la surface par des phospholipides, qui des chaînes grasses, de la tête polaire ou de la structure globale permet le transfert électronique? Les différentes réponses ne font pas toujours consensus.

Allen (Allen et al. 1984) ont étudié une cinquantaine de composés organiques utilisés comme modificateurs d'une électrode d'or pour permettre la médiation du cyt *c*. La nature de ces composés est très variable avec la présence de cycles aromatiques ou encore de thiols à courtes chaînes à terminaison acide ou non. Une de ses conclusions est que la partie polaire est déterminante pour assurer une médiation du cyt *c* tandis que la partie hydrophobe n'a que peu d'impact sur la médiation du cyt *c*.

D'un autre côté, une étude concernant la médiation des métalloprotéines sur les électrodes de GC par différents « surfactants » (détergents comme le Triton X-100 ou le SDS) pointent le rôle crucial de la nature hydrophobe de ces modificateurs de surface (Chattopadhyay and Mazumdar 2001). Dans cette étude, il est constaté que la charge portée par les modificateurs n'a que peu d'impact sur leur capacité de médiation électrochimique des protéines. Les auteurs arrivent à la conclusion que c'est la nature hydrophobe des modificateurs de surface qui permettent une bonne médiation électrochimique des métalloprotéines.

Dans notre cas, nous comprenons bien pourquoi le cyt *c* qui est chargé +7/+8 à pH physiologique a une attirance pour les lipides chargés négativement comme la PG ou le CL. Concernant la PC, une charge négative portée par un groupement phosphate et une charge positive portée par la tête choline lui confère sa nature zwitterionique. La charge globale neutre de la PC devrait éviter le problème de répulsion électrostatique à proximité de l'électrode. Tout comme le rôle des détergents décrits plus haut, La PC devrait à minima pouvoir agir comme un agent de surface en adoucissant la surface de GC et permettre une médiation de cyt *c* en solution.

Hors, comme présenté dans le chapitre 3, une électrode modifiée uniquement avec de la PC ne permet ni la médiation, ni l'accroche de cyt c (Figure 4.31). Ce comportement a déjà été signalé par plusieurs études électrochimiques (Bianco and Haladjian 1994; Boussaad et al. 1998; El Kasmi et al. 2002).

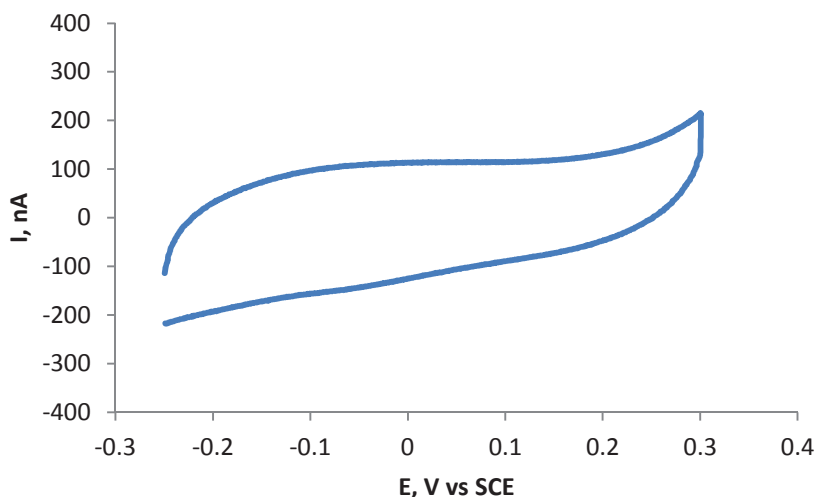


Figure 4.31 : Voltamétrie cyclique d'une électrode modifiée avec 100% de PC Soy bean dans une solution 50µM de cyt c.

Une hypothèse pour expliquer l'absence de promotion électrochimique de cyt c avec de la PC serait que le cyt c pourrait s'insérer dans la couche lipidique déposée sur l'électrode et finirait par se dénaturer directement au contact du carbone vitreux.

Un test réalisé avec de la PC comportant des chaînes en 22:0 a permis de clarifier cette absence de promotion. La PC 22:0 a une température de transition de phase très élevée (75°C). C'est le seul des phospholipides utilisés dans le cadre de cette thèse qui se présente sous forme de gel lors de son stockage dans une solution de chloroforme/méthanol 98:2 à -20°C. Les chaînes en 22:0 confèrent à cette PC une grande rigidité à température ambiante.

Une électrode modifiée avec de la PC 22:0 ne donne pas davantage de signal électrochimique en présence de cyt c en solution. Toutefois, en chauffant progressivement la cellule électrochimique, on observe un signal qui évolue et passe par plusieurs étapes transitoires présentées en figure 4.32.

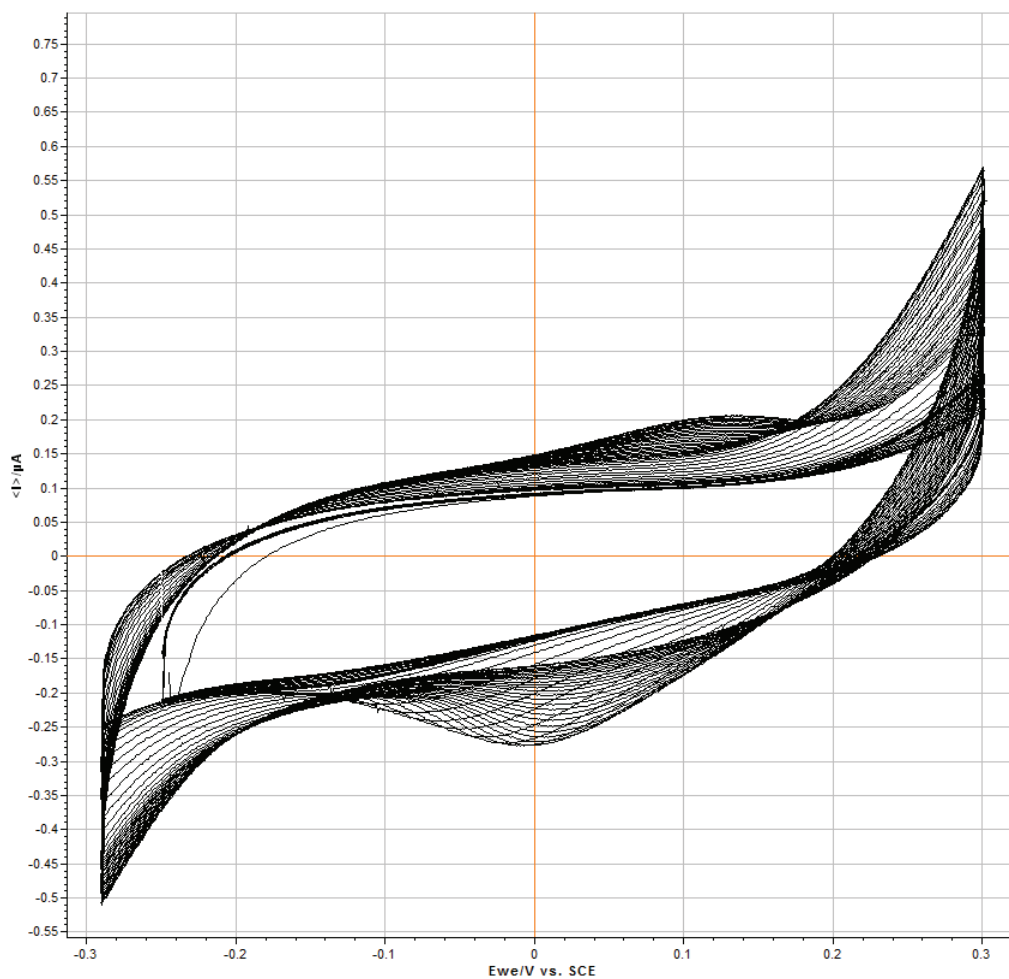


Figure 4.32 : 50 cycles voltamétriques d'une électrode de GC recouverte de 3 $\mu$ g de PC 22:0 dans une solution de cyt c BH 50 $\mu$ M. Chauffage de 20°C à 40°C par pas de 0.5°C par cycle.

Les différentes étapes sont détaillées dans la figure 4.33. La première phase est un voltamogramme (courbe orange) qui ne montre pas la présence d'espèces électroactives. Cet état peut être provoqué par l'action passivante du recouvrement de PC 22:0 sur la surface de l'électrode. La faible fluidité de ce recouvrement à 20°C pourrait empêcher le cyt c de s'y insérer et les charges positives superficielles ne permettraient pas son adsorption électrostatique.

Une rampe de température est appliquée dès le quinzième cycle. L'évolution de la température est d'un degré Celsius toutes les 50 secondes soit 0.5°C par cycle voltamétrique. On voit alors apparaître un pic de réduction seul vers -100 mV vs SCE (courbe rouge). Ce pic grandit et se décale vers les valeurs de potentiel positives au fur et à mesure de l'élévation de la température (courbe violette). Enfin, ce pic en réduction se résorbe parallèlement à l'apparition d'un pic en oxydation vers +110 – 120 mV vs SCE (courbe bleue). Enfin, la fin du cycle de chauffage (température finale de 40°C) correspond à la stabilisation du pic d'oxydation vers +120 mV et à la disparition du pic de réduction. La température finale de 40°C n'est pas une température

dénaturante pour le cyt c. En effet, des adsorptions de cyt c à 50°C dans des conditions classiques (modification avec 80-20 de PC-CL) ont déjà été réalisées sans noter de dénaturation du signal électrochimique du cyt c.

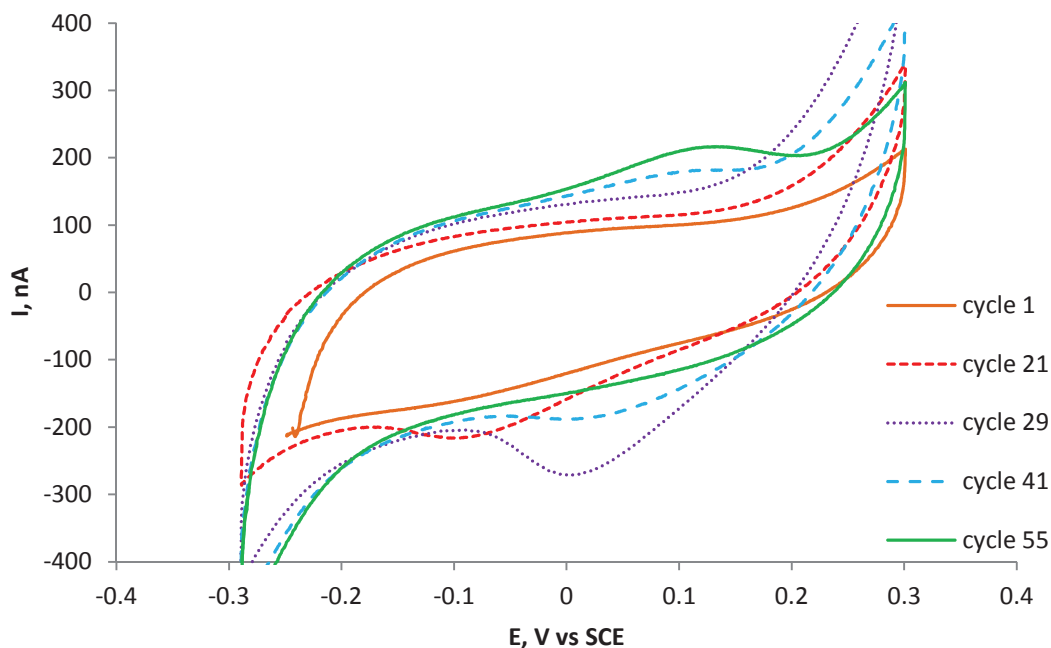


Figure 4.33 : Phases transitoires du comportement électrochimique présenté en Figure 4.2.10 décrivant la dénaturation du cyt c sur une électrode modifiée par une matrice de PC 22:0.

Ce comportement électrochimique n'est pas observé pour la PC soy bean utilisée habituellement. La PC soy bean a une composition majoritairement composée de chaînes 18:2n-6 (voir Annexes).

L'hypothèse avancée pour expliquer ce comportement électrochimique pour une électrode modifiée par la PC 22:0 est de considérer ces différentes phases comme la décomposition du phénomène de dénaturation du cyt c sur une surface de GC « ralenti » par une matrice de PC 22:0. Ce dépôt de PC freinerait la pénétration de la protéine de la solution jusqu'à la surface de carbone. Le fait de pouvoir maintenir le cyt c à une certaine distance de l'électrode permet de visualiser un ET sans dénaturation du cyt c.

Par extension de cette hypothèse, une conséquence directe serait que la PC soy bean aurait le même type de comportement que la PC 22:0 face au cyt c mais dont le phénomène de pénétration du cyt c dans la couche de lipide serait plus rapide. La nature plus « fluide » d'un dépôt de PC soy bean conférée par ses chaînes majoritairement composées d'AG 18:2n-6 provoquerait la dénaturation immédiate du cyt c sur la surface de GC. Cette vision d'une PC « transparente » à la diffusion de cyt c peut aussi être supposée par des études faites sur des électrodes d'oxyde d'indium dopé à l'étain (ITO). Une électroactivité du cyt c sur une électrode d'ITO recouverte d'une bicouche de PC Egg yolk a été mise en évidence par l'étude de Salamon (Salamon and Tollin 1997). L'ITO est un des seuls matériaux à promouvoir le transfert électronique du cyt c sans avoir recours à un modifieur de surface (Yeh and Kuwana 1977).

Egalement, les chaînes grasses portées par un phospholipide qui présentent une ou plusieurs insaturations sont plus mobiles et ne participent pas seulement à changer la fluidité d'une membrane mais également sa stabilité et sa perméabilité (Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes, 4th edition - D.E. Vance, J.E. Vance, p182).

A la suite du dernier cycle à 40°C, cette électrode a ensuite été transférée dans la deuxième cellule électrochimique dépourvue de cyt c en solution. Un pic unique en oxydation est observé cette fois-ci à +190 mV et uniquement pour le premier scan. Aucun processus faradique n'est observé par la suite (Figure 4.34). Nous supposons que ce signal correspond à la dénaturation finale des espèces de cyt c préadsorbées dans la matrice de PC 22:0 et à proximité directe de la surface de GC.

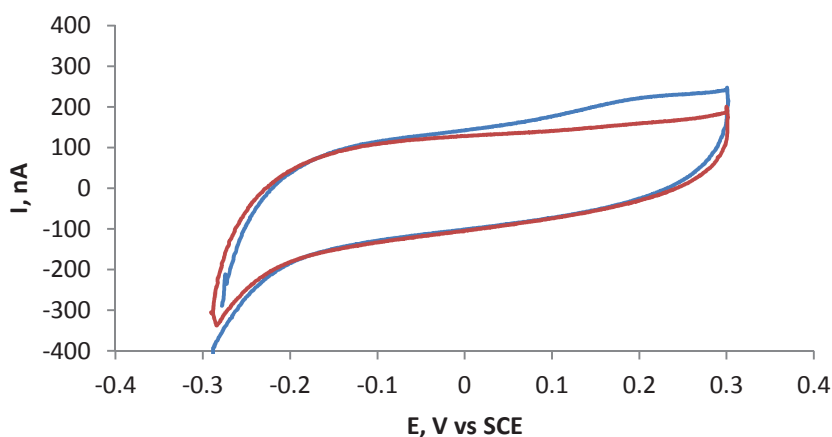


Figure 4.34 : Première voltamétrie cyclique (bleu) et voltamétries cycliques suivantes (rouge) d'une électrode modifiée PC 22:0 avec cyt c préadsorbé.

De ces résultats, on peut considérer qu'une modification de la surface de GC par une couche constituée de PC peut être considérée comme une phase liquide intermédiaire entre le cyt c en solution et la surface de GC.

L'utilisation de PC 22:0 est un exemple très parlant de la modulation du comportement électrochimique d'une protéine par les propriétés biophysiques d'une espèce moléculaire de phospholipide.

## REFLEXION SUR LA VARIATION DU POTENTIEL D'OXYDATION DU CYT C LORS DE LA PHASE D'ADSORPTION

Nous avons déjà discuté d'un premier phénomène de décalage de potentiel du cyt c vers les potentiels négatifs lié au transfert de l'électrode dans la deuxième cellule électrochimique (Figure 4.24). L'explication avancée est de dire que le cyt c « immobilisé » possède un potentiel redox plus faible que le potentiel du cyt c « libre ».

Comme le montre les travaux de Salamon (Salamon and Tollin 1991), plus on incorpore des charges négatives sur une électrode modifiée avec un dépôt de PC, plus le potentiel formel du cyt c baisse. L'explication la plus probable pour expliquer ce décalage de potentiel serait que l'augmentation du champ électrostatique local modifie directement le potentiel formel (Todorovic et al. 2006). L'augmentation du champ électrostatique local peut également avoir un effet de stabilisation de la forme oxydée du cyt c.

Il existe cependant un autre effet de décalage en potentiel que nous observons lors de la phase d'adsorption du cyt c dans la première cellule électrochimique. Le potentiel d'oxydation du cyt c visualisé par des balayages en CV successifs évolue vers les potentiels positifs. En réalité, l'augmentation de la quantité de cyt c électroactif va provoquer mécaniquement l'augmentation de l'écart entre les pics d'oxydation et de réduction ce qui participe au décalage vers les potentiels positifs du pic d'oxydation du cyt c.

Or, nous n'observons pas de symétrie dans l'évolution des valeurs de potentiels de réduction et d'oxydation du cyt c au cours de cette étape d'adsorption. Cela revient à dire que le potentiel d'oxydation se décale plus vite que le potentiel de réduction qui ne varie même pas dans certains cas (Figure 4.35). Dans l'exemple présenté ci-dessous, la différence de potentiel du pic d'oxydation entre le premier et le dernier balayage est de 26 mV alors qu'il est de 6 mV en réduction.



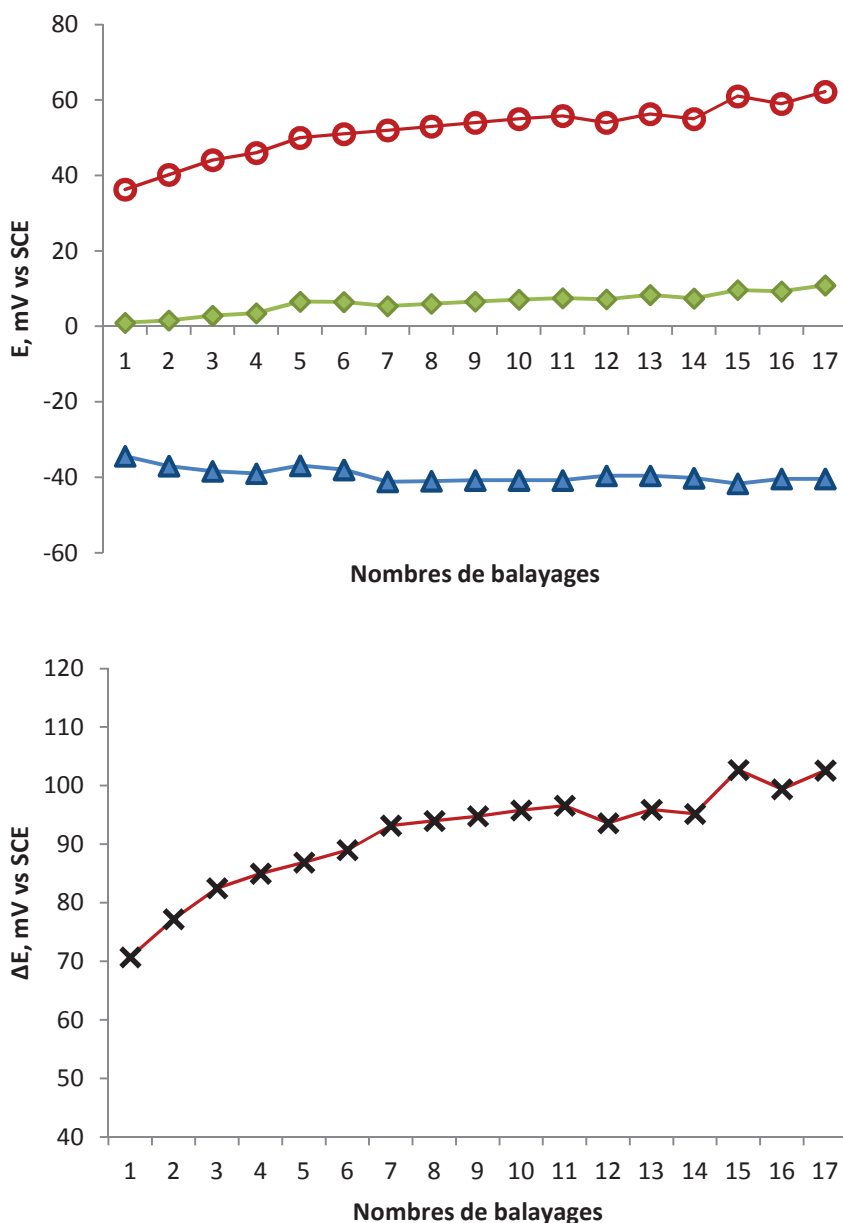


Figure 4.35 : Evolution des potentiels à mi-pic (losange vert) et des potentiels de pics de réduction (triangle bleu), d'oxydation (rond rouge) ainsi que de l'écart entre les pics  $\Delta E$  du cyt c lors de la phase d'adsorption de cyt c dans la première cellule électrochimique sur une électrode modifiée PC-CL.

Ce décalage vers les potentiels positifs du pic d'oxydation du cyt c dans la première cellule peut s'expliquer par la modification de l'environnement de l'hème du cyt c. Todorovic explique que l'augmentation du caractère hydrophobe de l'hème lié à la présence de chaînes grasses à proximité décale le potentiel formel du fer vers les potentiels positifs (Todorovic et al. 2006). Cet effet est probablement dû à la stabilisation de la forme  $Fe^{II}$ .

Un argument de plus pour supposer la présence d'un environnement plus hydrophobe à proximité de l'hème est que le cyt c lié à un CL ou le cyt c réduit subissent une réorganisation conformationnelle dont le résultat est une augmentation de l'accessibilité de l'hème au milieu extérieur. Si le milieu extérieur est

composé d'un solvant protique comme l'eau, un décalage du potentiel redox vers des valeurs négatives est observé (Song et al. 1993). Au contraire, Kassner (Kassner 1972; Kassner 1973) a démontré qu'en plaçant l'hème dans un environnement caractérisé par une constante diélectrique faible (cas des phospholipides), le potentiel redox est décalé vers des valeurs positives.

Si l'on observe un décalage du pic d'oxydation du cyt c lors de sa phase d'adsorption, nous pouvons supposer qu'il existe une forme conformationnelle du cyt c réduit plus stable que celle du cyt c oxydée.

L'évolution du potentiel des pics pendant l'adsorption ne peut pas être expliquée uniquement par un décalage du  $E_{1/2}$  du cyt c qui devrait aussi théoriquement décaler le potentiel de réduction du cyt c. Cet effet de stabilisation de la forme réduite du cyt c adsorbé a été étudié sur une électrode ITO par El Kasmi (El Kasmi et al. 2002) qui a proposé un schéma à 4 formes de cyt c (Figure 4.36).

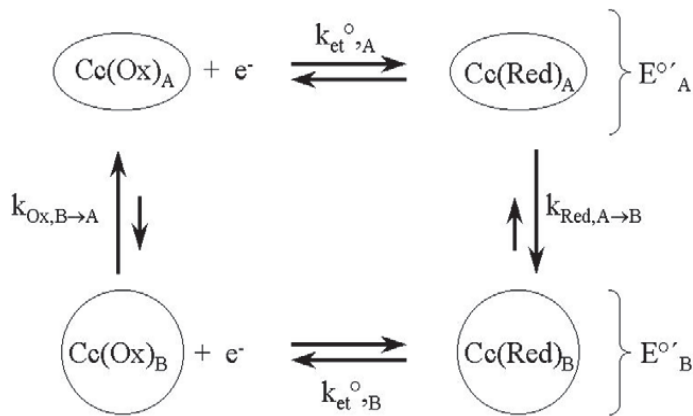


Figure 4.36 : Modèle décrivant le comportement électrochimique du cyt c adsorbé sous deux formes conformationnelles différentes A et B. D'après El Kasmi et al. 2002.

Le comportement du cyt c que l'on observe s'explique alors parfaitement si l'on pose les potentiels formels suivants :

Cyt c A :  $E^{\circ} = 15 \text{ mV vs SCE}$

Cyt c B :  $E^{\circ} = -5 \text{ mV vs SCE}$

En l'absence de potentiel imposé à l'électrode, le cyt c est sous forme oxydée. Lors du premier passage en voltamétrie cyclique, le cyt c A réduit change au fur et à mesure en la conformation B juste avant l'oxydation des protéines lors du passage retour du balayage. A chaque passage, la population de cyt c B augmente par rapport à celle de cyt c A d'où le potentiel plus élevé observé.

L'explication de l'absence de décalage du pic de réduction du cyt c lors de la phase d'adsorption du cyt c pourrait se justifier par une relaxation rapide de la forme cyt c(Ox)B à cyt c(Ox)A. Toutefois, il est plus probable que la relaxation de la forme oxydée de B à A n'est pas suffisamment rapide mais que la forme B possède un  $k_{\text{ET}}$  plus faible, ce qui induit un  $\Delta E$  plus élevé. A la vitesse de balayage choisie pour visualiser

l'adsorption de cyt c ( $50 \text{ mV s}^{-1}$ ), l'augmentation du  $\Delta E$  (donc la baisse du potentiel du pic de réduction) compense exactement la variation du  $E_{1/2}$ . Les calculs de  $k_{ET}$  aux différentes vitesses de balayage présentés en [Figure 3.3](#) (chapitre 3) confortent cette possibilité.

## CONCLUSION

Le chapitre 3 a déjà démontré que l'électrochimie du cyt c est dépendante de la modification de la surface d'une électrode de GC par des phospholipides. La nature de ces phospholipide est déterminante car une PC ne permet ni l'accroche, ni la médiation de cyt c en solution, au contraire du CL (Chapitre 3, Park et al. 2001). La différence de charge nette entre la PC (+1) et le CL(-1) a tout d'abord été retenue pour expliquer ce comportement.

D'autres phospholipides anioniques ont été testés et la PG a donné des résultats très similaires à ceux obtenus avec le CL avec, entre autres, la présence d'une sous-population 2 de cyt c « immobilisé ». La médiation électrochimique avec la PG a déjà été observée. Melcher montre que l'ajout de DMPG sur une électrode d'or modifiée par des SAMs permet d'améliorer considérablement la médiation électrochimique du cyt c (Mechler et al. 2006). Les premiers travaux sur le « lipid anchorage » par l'équipe de Kinnunen utilisaient des liposomes contenant du CL mais la PG fut testée par la suite et donne des résultats similaires (Rytömaa et al. 1992; Rytömaa and Kinnunen 1994; Rytömaa and Kinnunen 1995).

Si les autres phospholipides anioniques ont aussi la capacité de médiation du cyt c en solution, en revanche, ils ne permettent pas la fixation de cyt c. Ces résultats démontrent que la structure de la tête polaire du phospholipide est impliquée dans le phénomène d'accroche du cyt c sur une surface membranaire. La similarité de structure entre les deux phospholipides que sont la PG et le CL est probablement liée à ce phénomène ([Figure 4.37](#)). En particulier, on peut observer que la PG est composé d'une PA auquel on a greffé un motif glycérol. Or, la PA ne permet pas, dans les conditions expérimentales adéquates, d'immobiliser du cyt c. L'hypothèse principale repose sur le fait que le motif glycérol central du CL ou de la PG serait impliqué dans l'interaction avec le cyt c que ce soit pour les sous-populations 1 ou 2 de cyt c. L'existence, pour ce glycérol, d'une forme cyclique stabilisée par des liaisons hydrogènes proposé initialement par Kates (Kates et al. 1993) pourrait également avoir un lien avec cette interaction.

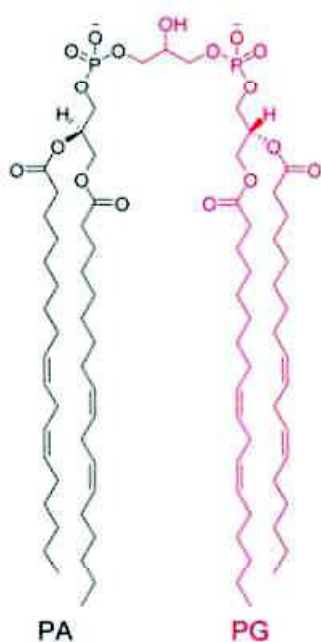


Figure 4.37 : Comparaison des structures de la PA et de la PG. Le CL peut être considéré comme l'assemblage d'une PG et d'une PA. D'après Gonzalvez and Gottlieb 2007.

Le comportement des autres phospholipides anionique est également intéressant. Il montre que la charge négative portée par le phospholipide a certainement une importance pour une première approche de cyt *c* à la surface d'une membrane. En particulier, l'expérience que nous avons réalisé avec l'augmentation de la proportion de PA sur une électrode modifiée ainsi que la modification de la rugosité de l'électrode permet d'améliorer sensiblement l'accroche de cyt *c*.

Les expériences faites avec le  $\text{Ca}^{2+}$  laissent supposer un lien nécessaire entre les phosphates du CL et les résidus chargés positivement du cyt *c* pour l'établissement de la sous-population 2 du cyt *c* lié au CL. L'effet du  $\text{Ca}^{2+}$  est sensiblement différent entre le CL et la PG avec la disparition du signal électrochimique de la sous-population 2 dans le cas du CL. La différence de structure entre ces deux phospholipides est très probablement la cause de cette différence de comportement.

Dans les travaux de de Kruijff (de Kruijff et al. 1982) portant sur l'étude de l'interaction entre  $\text{Ca}^{2+}$  et CL par RMN du phosphore et diffraction X, les auteurs supposaient que les groupements étaient perturbés lors de l'interaction entre  $\text{Ca}^{2+}$  et CL. Dans la forme bicyclique du CL (Figure 4.38) on pourrait suggérer que le  $\text{Ca}^{2+}$  se substitue au groupement OH central (en bleu dans la Figure 4.38) ce qui provoquerait la déstabilisation de cette forme bicyclique.

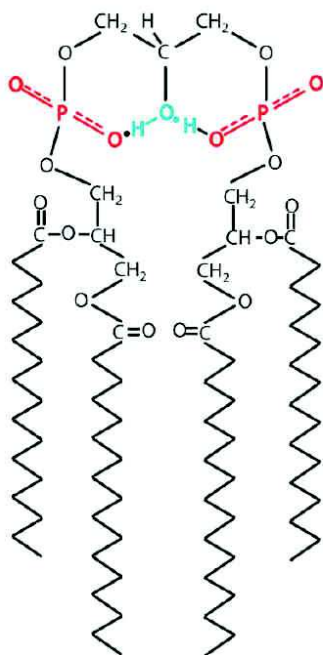


Figure 4.38 : Forme bicyclique du CL vue par Haines (Haines 2009).

La nécessité d'avoir deux groupes phosphates proches renforce l'affinité forte  $\text{Ca}^{2+}$  - CL et pourrait expliquer la différence de résultats obtenus avec la PG. Ainsi, une forme de résonance entre le groupement OH du glycérol terminal et un ou deux phosphates serait déterminante pour observer le phénomène de « lipid anchorage ». A ce titre, nous pouvons noter que la perte d'une chaîne grasse du CL pourrait également déstabiliser cette forme bicyclique (Haines 2009). L'acquisition des données en ACV pour le dLCL fait ici particulièrement défaut. Néanmoins, nous pouvons noter que l'immobilisation du cyt *c* sur une électrode modifiée avec du dLCL est plus importante qu'avec de la PA (qui comporte également deux chaînes grasses) ce qui montre que la présence d'un motif glycérol dans la tête polaire semble plus importante que la structure à quatre chaînes grasses du CL.

Toutes ces observations pointent le rôle majeur joué par la tête polaire pour l'interaction entre CL et cyt *c*. On ne peut toutefois pas exclure une interaction hydrophobe telle qu'elle est supposée dans la théorie du « lipid anchorage ». Le décalage du pic d'oxydation du cyt *c* lors de la phase d'adsorption pourrait trouver une explication dans la variation de l'environnement de l'hème vers un milieu plus hydrophobe. La présence d'interaction à la fois de type électrostatique et hydrophobe pour la sous-population 2 du cyt *c* lié à une électrode modifiée contenant de la PG ou du CL est possible et avait été suggérée dans le chapitre 3 par l'utilisation de deux types de CL à chaînes 14:0 et 18:2 montrant des  $k_{\text{ET}}$  différents.

La partie suivante tente d'aller plus loin dans cette étude des chaînes sur les propriétés électrochimiques du cyt *c* sur une électrode modifiée.

## RÉFÉRENCES

- Allen, P. M., H. Allen, O. Hill and N. J. Walton **1984**. "Surface modifiers for the promotion of direct electrochemistry of cytochrome c." Journal of Electroanalytical Chemistry 178(1): 69-86.
- Bianco, P. and J. Haladjian **1994**. "Control of the electron transfer reactions between c-type cytochromes and lipid-modified electrodes." Electrochimica Acta 39(7): 911-916.
- Boussaad, S., L. Dziri, R. Arechabaleta, N. J. Tao and R. M. Leblanc **1998**. "Electron-Transfer Properties of Cytochrome c Langmuir-Blodgett Films and Interactions of Cytochrome c with Lipids." Langmuir 14(21): 6215-6219.
- Chattopadhyay, K. and S. Mazumdar **2001**. "Direct electrochemistry of heme proteins: effect of electrode surface modification by neutral surfactants." Bioelectrochemistry 53(1): 17-24.
- de Kruijff, B., A. J. Verkleij, J. Leunissen-Bijvelt, C. J. A. van Echteld, J. Hille and H. Rijnbout **1982**. "Further aspects of the Ca<sup>2+</sup>-dependent polymorphism of bovine heart cardiolipin." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes 693(1): 1-12.
- El Kasmi, A., M. C. Leopold, R. Galligan, R. T. Robertson, S. S. Saavedra, K. El Kacemi and E. F. Bowden **2002**. "Adsorptive immobilization of cytochrome c on indium/tin oxide (ITO): electrochemical evidence for electron transfer-induced conformational changes." Electrochemistry Communications 4(2): 177-181.
- Getz, G. S., W. Bartley, D. Lurie and B. M. Notton **1968**. "The phospholipids of various sheep organs, rat liver and of their subcellular fractions." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism 152(2): 325-339.
- Gonzalvez, F. and E. Gottlieb **2007**. "Cardiolipin: Setting the beat of apoptosis." Apoptosis 12(5): 877-885.
- Haines, T. H. **2009**. "A new look at Cardiolipin." Biochimica et Biophysica Acta 1788(10): 1997-2002.
- Haines, T. H., R. Epanand and R. Epanand **2008**. "The pK's of Cardiolipins Are Altered by the Number and Position of their Specific Fatty Acid Esters." The FASEB Journal 22(1\_MeetingAbstracts): 632.1.
- Kassner, R. J. **1972**. "Effects of Nonpolar Environments on the Redox Potentials of Heme Complexes." Proceedings of the National Academy of Sciences 69(8): 2263-2267.
- Kassner, R. J. **1973**. "Theoretical model for the effects of local nonpolar heme environments on the redox potentials in cytochromes." Journal of the American Chemical Society 95(8): 2674-2677.
- Kates, M., J.-Y. Syz, D. Gosser and T. Haines **1993**. "pH-dissociation characteristics of cardiolipin and its 2'-deoxy analogue." Lipids 28(10): 877-882.
- Mechler, A., G. Nawaratna, M.-I. Aguilar and L. Martin **2006**. "A Study of Protein Electrochemistry on a Supported Membrane Electrode." International Journal of Peptide Research and Therapeutics 12(3): 217-224.

- Mustonen, P., J. A. Virtanen, P. J. Somerharju and P. K. J. Kinnunen **1987**. "Binding of cytochrome c to liposomes as revealed by the quenching of fluorescence from pyrene-labeled phospholipids." Biochemistry 26(11): 2991-2997.
- Park, H., J.-S. Park and Y.-B. Shim **2001**. "Electrochemical and in situ UV-visible spectroscopic behavior of cytochrome c at a cardiolipin-modified electrode." Journal of Electroanalytical Chemistry 514(1-2): 67-74.
- Quinn, P. J. and R. M. Dawson **1969**. "Interactions of cytochrome c and [14C]-carboxymethylated cytochrome c with monolayers of phosphatidylcholine, phosphatidic acid and cardiolipin." The Biochemical journal 115(1): 65-75.
- Rytömaa, M. and P. K. Kinnunen **1994**. "Evidence for two distinct acidic phospholipid-binding sites in cytochrome c." Journal of Biological Chemistry 269(3): 1770-1774.
- Rytömaa, M. and P. K. J. Kinnunen **1995**. "Reversibility of the Binding of Cytochrome c to Liposomes." Journal of Biological Chemistry 270(7): 3197-3202.
- Rytömaa, M., P. Mustonen and P. K. Kinnunen **1992**. "Reversible, nonionic, and pH-dependent association of cytochrome c with cardiolipin-phosphatidylcholine liposomes." Journal of Biological Chemistry 267(31): 22243-8.
- Salamon, Z. and G. Tollin **1991**. "Interfacial electrochemistry of cytochrome c at a lipid bilayer modified electrode: Effect of incorporation of negative charges into the bilayer on cyclic voltammetric parameters." Bioelectrochemistry and Bioenergetics 26(2): 321-334.
- Salamon, Z. and G. Tollin **1997**. "Interaction of horse heart cytochrome c with lipid bilayer membranes: effects on redox potentials." Journal of Bioenergetics and Biomembranes 29(3): 211-221.
- Sinibaldi, F., B. Howes, M. Piro, F. Polticelli, C. Bombelli, T. Ferri, M. Coletta, G. Smulevich and R. Santucci **2010**. "Extended cardiolipin anchorage to cytochrome c: a model for protein-mitochondrial membrane binding." Journal of Biological Inorganic Chemistry.
- Song, S., R. A. Clark, E. F. Bowden and M. J. Tarlov **1993**. "Characterization of cytochrome c/alkanethiolate structures prepared by self-assembly on gold." The Journal of Physical Chemistry 97(24): 6564-6572.
- Todorovic, S., C. Jung, P. Hildebrandt and D. Murgida **2006**. "Conformational transitions and redox potential shifts of cytochrome P450 induced by immobilization." Journal of Biological Inorganic Chemistry 11(1): 119-127.
- Yeh, P. and T. Kuwana **1977**. "Reversible electrode reaction of cytochrome c." Chemistry Letters 6(10): 1145-1148-1145-1148.







**CHAPITRE 4 - PARTIE 3 : EFFET DES CHAINES DU CL ET DE LA NATURE DU CYT C****INTRODUCTION**

La mise en évidence du « lipid anchorage » par l'équipe de Kinnunen a apporté un regain d'intérêt concernant les interactions entre lipides et protéines solubles. Si l'influence de l'environnement lipidique sur les protéines transmembranaires était alors bien établie, le fait qu'une interaction spécifique soit identifiée entre une protéine soluble et certains lipides de la mitochondrie était plutôt novateur. Pour aller plus loin qu'un modèle basé sur une adsorption de cyt *c* de nature électrostatique à la surface de la membrane, c'est une interaction de type hydrophobe entre le CL et le cyt *c* qui est alors proposée (Rytömaa et al. 1992; Rytömaa and Kinnunen 1994; Rytömaa and Kinnunen 1995). Peu de temps après les premiers papiers sur le « lipid anchorage » (Rytömaa et al. 1992), l'équipe de Pinheiro démontre par RMN qu'il existe une interaction entre les chaînes grasses du CL et le cyt *c* (Pinheiro et al. 1993).

A partir de là, plusieurs nouvelles voies de recherche ont pu apparaître comme par exemple quelle serait l'influence d'un changement de la composition en AG du CL sur les différentes fonctions du cyt *c* dans la mitochondrie. Une modification des AG du CL, que ce soit par des tests en nutrition contrôlée (McMillin and Dowhan 2002) ou bien à cause d'une pathologie comme le syndrome de Bart (Schlame et al. 2003) est associé à une perte des fonctions mitochondriales comme la chaîne respiratoire ou l'induction de l'apoptose. Est-ce que l'interaction CL - cyt *c* serait liée à ce phénomène ?

Egalement, la composition en AG du CL semble étroitement régulée. Schlame pointe, dans ses premières études sur le CL, la distribution très homogène des AG du CL pour un organisme donné (Schlame et al. 1993). Il suppose alors qu'une telle composition en AG uniquement pour cette classe de phospholipide doit être issue d'un mécanisme de régulation des AG du CL et qu'il doit exister un lien entre la nature des ces AG et la fonction du CL dans la mitochondrie. Par la suite, la biosynthèse du CL a été identifiée et a permis de mieux comprendre l'origine de la régulation de la composition en AG du CL (Schlame et al. 2000). L'étude de la composition en AG du CL chez les bivalves marins pose également les mêmes questions. En effet, on retrouve chez les bivalves épigés (coquille saint Jacques, palourde,...) un profil en acides gras très homogène composé de plus de 80% de chaînes de type 22:6n-3.

Les questions qui se posent sont:

- Existe-t-il une spécificité entre cyt c et CL entre différents organismes ?
- Quel est l'impact de la nature des chaînes du CL sur l'interaction cyt c – CL ?

Les études dans cette dernière partie ont pour but d'aller plus loin dans les aspects des spécificités de structure du CL par rapport à l'interaction et aux transferts électroniques avec le cyt c. L'hypothèse avancée est que la longueur de chaîne spécifique retrouvée dans les différents organismes (voir chapitre 1) pourrait être liée avec l'interaction hydrophobe entre CL et cyt c. Il s'agit aussi de vérifier l'hypothèse avancée dans le chapitre 3 où la comparaison d'un CL 14:0 et d'un CL 18:2 avait permis de suggérer qu'il pouvait exister des cinétiques de transfert d'électrons différentes entre ces deux CL pour la sous-population 2 de cyt c.

## ETUDE DE LA COMPOSITION EN AG DU CL

### LES DIFFERENTES FORMES MOLECULAIRES DE CL

Les lipides choisis pour cette étude sont :

- **CL 14:0** : Standard provenant d'Avanti Polar Lipid composé de 100% de chaînes en 14:0.
- **CL 16:0** : CL de *Escherichia coli* provenant d'Avanti Polar Lipids. La composition en AGs de ce CL, caractérisée par CPG, est de 16:0 (52%), du 16:1n-7 (18%), et du 18:1n-7 (14%). La composition détaillée est disponible en Annexes. On le nommera par commodité CL 16:0.
- **CL 18:0** : CL provenant de l'hydrogénation du CL 18:2 (Standard Sigma détaillé ci-dessous).
- **CL 18:1n-9** : CL synthétique produit par Avanti Polar Lipid.
- **CL 18:2n-6** : Standard produit par Sigma Aldrich.
- **CL 22:6n-3** : CL extrait de tissus de *Pecten maximus* (Coquille Saint Jacques) échantillonnés dans le cadre de la Thèse de Kraffe 2003 dont la composition en AG est à plus de 80% en 22:6n-3.

### PRECAUTIONS PRISES PAR RAPPORT A CES FORMES MOLECULAIRES.

Comme reporté dans les chapitres 1 et 2, la nature des chaînes grasses influe sur plusieurs propriétés biophysiques des lipides membranaires. D'une part la température de fusion de ces lipides va fortement dépendre des chaînes grasses qu'il porte (Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes, 4th edition - D.E. Vance, J.E. Vance). D'autre part, la sensibilité à l'oxydation et la dégradation des chaînes grasses est extrêmement variable avec la nature des chaînes grasses et particulièrement selon le nombre d'insaturations présentes (Cho et al. 1987).

Malheureusement, nous ne pouvons pas nous affranchir de certaines propriétés liées au type de chaînes du CL qui pourraient influencer sur la qualité du dépôt lipidique sur la surface de l'électrode. Par exemple, le type de chaînes portées par le CL est un facteur important pour déterminer sa préférence de phase. Une étude par RMN de Vasilenko (Vasilenko et al. 1982) a montré qu'un CL de mammifère (CL 18:2) et qu'un CL de bactérie (CL 15:0) ont des comportements lamellaires différents.

### INFLUENCE DE LA TEMPERATURE DE TRANSITION DE PHASE.

Les CL utilisés ont des températures de transition de phase bien distinctes (Sankaram et al. 1989). Les deux cas extrêmes concernent le CL 18:0 et le CL 22:6. Si le dernier se présente naturellement sous un état liquide cristallin à température ambiante (20°C), le CL 18:0 est par contre sous une forme gel compact à cette température. Dès lors, les études comparatives doivent essayer au maximum de s'affranchir de ce biais. Le principal problème concerne la méthode de préparation de l'électrode. L'établissement d'une monocouche de phospholipides sur une surface de carbone implique un auto-réarrangement des lipides. Comme pour tous les processus moléculaires (réaction, adsorption, mouvements intramoléculaires, ...), il est légitime de supposer que l'agitation moléculaire est le moteur de ce réarrangement.

La température est le moyen de jouer sur l'agitation moléculaire des chaînes grasses. Le traitement thermique mis au point permet d'essayer de s'affranchir de biais qui pourrait apparaître par rapport à l'organisation de la monocouche lipidique lors du dépôt de lipides ayant des températures de phase différentes.

- CL 12:0 : 25°C (Rainer 1979)
- CL 14:0 : 40°C (Rainer 1979)

- CL 16:0 : 56°C (Hubner 1991)
- CL 18:0 : 61°C (Hubner 1991)
- CL 18:1 : 25°C (Sankaram 1989)
- CL 18:2 : 20°C (Sankaram 1989)

## OXYDATION DES CHAINES GRASSES POLYINSATUREES

Dès que l'AG comporte plus d'une insaturation, on note une propension à l'oxydation de la chaîne grasse (Cho et al. 1987). Cette tendance à l'oxydation croît alors exponentiellement avec le nombre d'insaturations. La multiplication des insaturations sur la chaîne carbonée provoque alors une certaine instabilité de ces AGs dans des conditions oxydantes.

Dans nos conditions expérimentales, l'utilisation d'un CL 22:6 sur une électrode modifiée PC-CL 80/20 (mol/mol) sans précaution particulière ne permet qu'environ une heure de manipulation. A contrario, si un CL de type 18:1 est utilisé, l'électrode peut être maintenue fonctionnelle à température ambiante pendant plusieurs jours. Ces différences pourraient donc être associées à cette instabilité des chaînes 22:6 par rapport aux chaînes 18:1 face à la peroxydation.

Si la caractérisation de produit de peroxydation lipidique n'a pas été entreprise, plusieurs précautions ont permis de prolonger la durée de vie d'une électrode modifiée contenant des CL polyinsaturés.

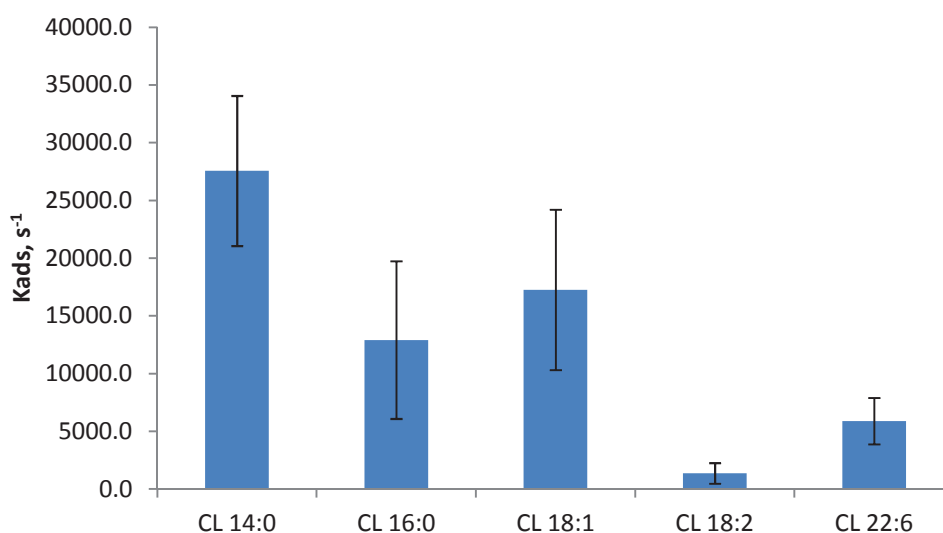
- Le dépôt sur l'électrode est effectué sous une cloche remplie d'Ar ou de N<sub>2</sub>.
- Les solutions lipidiques ont 0.05% de BHT comme antioxydant.

## PARAMETRES LIES A L'ADSORPTION DE CYT C

Les cinétiques d'adsorption de cyt c ont toutes été identifiées comme des cinétiques du premier ordre. Les constantes d'adsorption associées pour chaque espèce moléculaire de CL sont présentées en [Figure 4.39](#).

Les CL possédant des chaînes saturées (CL 14:0) et majoritairement saturées comme le CL d'*E. coli* (CL 16:0) ont des cinétiques d'adsorption très lentes par rapport aux CL qui possèdent des chaînes polyinsaturées comme le CL 18:2 ou le CL 22:6 (Un kads élevé indique une cinétique d'adsorption lente).

Le cas du CL 18:0 est un peu à part car l'adsorption de cyt c n'est pas visible à 20-25°C et nécessite un chauffage de la cellule électrochimique vers 40°C pour obtenir une adsorption de cyt c. La valeur du  $K_{ads}$  (de l'ordre de  $1500\text{ s}^{-1}$ ) dans le cas de l'utilisation de CL 18:0 est donc biaisée par rapport aux autres CL dont l'adsorption s'est faite à 20°C. Elle n'est donc pas présentée sur la [Figure 4.39](#).



**Figure 4.39 : Cinétiques d'adsorption de cyt c sur une électrode modifiée composée de différentes espèces moléculaires de CL (barres d'erreur standard pour n=3).**

Mise à part ce cas, les cinétiques d'adsorptions semblent corrélées à la température de transition de phase du CL composant le dépôt lipidique. Il faut noter ici que le CL 16:0 est une abréviation utilisée pour le CL d'*Escherichia coli* qui comporte, outre une majorité de chaînes en 16:0, des chaînes en 16:1 et 18:1 ce qui peut expliquer la cinétique d'adsorption plus rapide observée par rapport au CL 14:0.

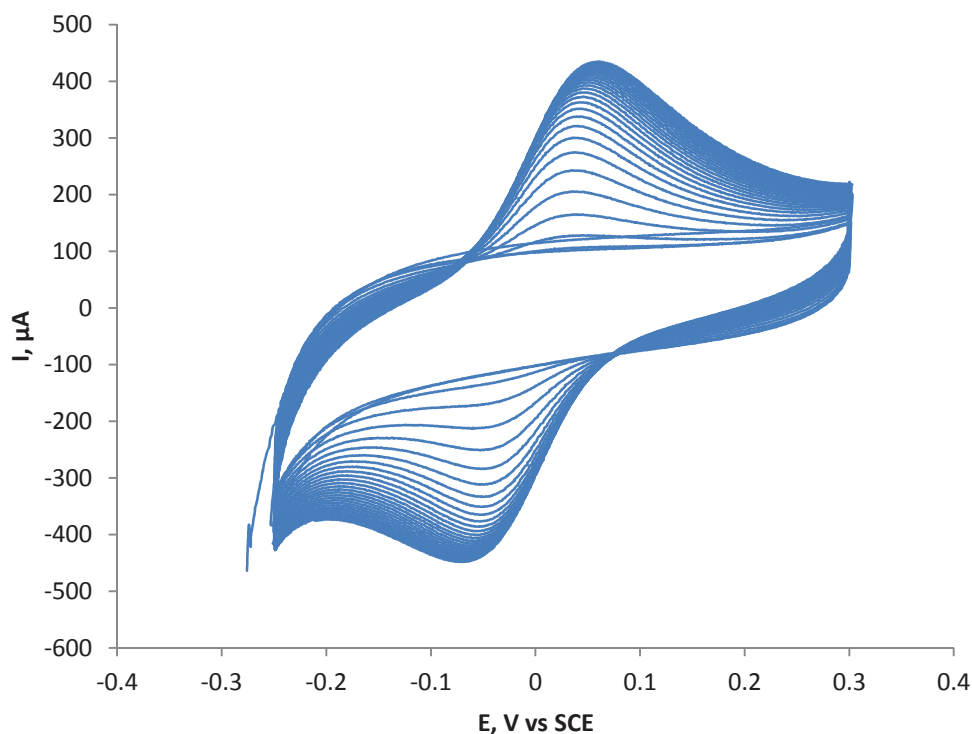


Figure 4.40 : Exemple de cinétique d'adsorption lente de cyt c sur une électrode PC-CL 14:0.

La comparaison entre les deux CL 18:1 et 18:2 révèle toutefois des différences de cinétique d'adsorption qui sont difficilement explicables par un effet lié aux températures de transition de phase qui sont de 20°C et 25°C pour les CL 18:1 et 18:2, respectivement. Le CL correspondant à l'animal dont le cyt c est issu (bœuf) est composé de chaînes principalement en 18:2 (Figure 1.5 – chapitre 1). Les cinétiques particulièrement rapides pourraient suggérer l'existence d'une adaptation spécifique entre la structure du CL 18:2 et du cyt c « bovine heart ».

Un exemple d'adsorption de cyt c BH sur une électrode PC-CL14:0 est présentée en Figure 4.40. C'est avec le CL18 :0 les seuls cas d'adsorption suffisamment lente où l'on peut observer une quantité de cyt c adsorbé quasiment nulle aux premiers balayages en CV.

Les valeurs de quantités de cyt c électroactif dans la première et dans la deuxième cellule (respectivement  $Q_a$  et  $Q_c$ ) pour les différents CL utilisés sont présentées dans le Tableau 1. Les valeurs de quantités de cyt c électroactifs ( $Q_a$  et  $Q_c$ ) sont très dispersées comme le témoigne les erreurs standards relevées.

Type d'électrode modifiée	Kads	Erreur Standard	Qa, pmol cm <sup>-2</sup>	Erreur Standard	Qc, pmol cm <sup>-2</sup>	Erreur Standard
CL 14:0	27555.0	6501.0	96.5	33.0	60.7	n.d.
CL 16:0	12904.7	6827.8	170.5	29.5	101.0	11.0
CL 18:0	1574.0	838.6	12.0	4.7	8.5	6.0
CL 18:1	17255.3	6942.1	141.2	46.7	87.4	13.6
CL 18:2	1362.7	894.0	87.1	20.1	32.2	5.5
CL 22:6	5887.3	2004.1	102.8	30.4	42.6	15.6

**Tableau 1 : Paramètres liés à l'adsorption du cyt c pour différentes électrodes modifiées. L'erreur standard associée est l'écart-type divisé par la racine carrée du nombre de mesures.**

Pour les CL ayant un faible degré d'insaturation (CL 14:0, CL 16:0, CL 18:0 et CL 18:1), la perte de cyt c lors du transfert de cellule est de l'ordre de 40% tandis que pour les CL de type PUFA (PolyUnsaturated Fatty Acid), la perte de cyt c est de l'ordre de 60%. Une explication plausible consiste à considérer qu'une partie du cyt c adsorbé est maintenue par la rigidité des chaînes du CL alors qu'une plus grande fraction de cyt c peut se désorber du fait de la grande agitation moléculaire des CL PUFA (CL 18:2 et CL 22:6). Cela pourrait expliquer pourquoi les valeurs plus faibles de Qc (cyt c « immobilisé ») semblent plus faibles pour les CL PUFA.

Toutefois, la variabilité des mesures ne permet pas de conclure à un effet des chaînes. A cet égard, on peut noter qu'il n'y a pas de consensus si l'on regarde des travaux équivalents portant sur l'étude de l'affinité entre des espèces moléculaires de CL équivalentes et le cyt c. Pour Belikova, le CL 18:2 aurait la meilleure affinité pour le cyt c (Belikova et al. 2006) tandis que ce serait le CL 14:0 selon Stepanov (Stepanov et al. 2009) et le CL 18:0 selon Abe (Abe et al. 2011).

## PARAMETRES ELECTROCHIMIQUES DES SOUS-POPULATIONS DE CYT C

Nous avons observé pour toutes les espèces moléculaires de CL composant le dépôt lipidique sur l'électrode, l'existence des deux sous-populations de cyt c identifiées dans le chapitre 3. Les valeurs des paramètres calculées par le modèle de Creager (Potentiel E°, cinétique de transfert électronique  $k_{ET}$  et quantité électroactive  $\Gamma$ ) pour les deux sous-populations de cyt c « immobilisé » (dans la deuxième cellule électrochimique) sont présentées dans le [Tableau 2](#).



Type d'électrode modifiée	Sous population 1 de cyt c					
	$E^\circ$ , mV vs SCE	Erreur Standard	$k_{ET}$ , $s^{-1}$	Erreur Standard	$\Gamma$ , $\mu\text{mol cm}^{-2}$	Erreur Standard
CL 14:0	-9.0	5.7	27.0	17.0	41.5	25.2
CL 16:0	-9.5	3.5	16.0	n.d.	96.0	n.d.
CL 18:0	-20.0	8.0	12.0	2.0	8.7	4.1
CL 18:1	-14.3	6.2	27.2	15.8	82.0	48.7
CL 18:2	-21.2	4.6	17.7	9.6	30.6	5.3
CL 22:6	-16.9	1.5	14.6	4.7	27.7	13.8

Type d'électrode modifiée	Sous population 2 de cyt c					
	$E^\circ$ , mV vs SCE	Erreur Standard	$k_{ET}$ , $s^{-1}$	Erreur Standard	$\Gamma$ , $\mu\text{mol cm}^{-2}$	Erreur Standard
CL 14:0	-126.3	1.3	312.8	9.2	1.8	0.4
CL 16:0	-202.0	n.d.	50.0	n.d.	0.9	n.d.
CL 18:0	-169.0	20.0	350.0	70.0	1.1	0.4
CL 18:1	-125.5	0.5	233.3	108.4	1.1	0.4
CL 18:2	-146.0	15.3	550.5	119.8	0.6	0.2
CL 22:6	-136.0	6.1	424.0	36.5	1.3	0.4

Tableau 2 : Caractéristiques électrochimiques (Potentiel  $E^\circ$ , cinétique de transfert électronique  $k_{ET}$  et quantité électroactive  $\Gamma$ ) des deux sous-populations de cyt c « immobilisé » sur une électrode modifiée de différents types.

Le croisement des données des potentiels et des cinétiques de transfert électroniques des deux sous-population de cyt c immobilisé sur une électrode modifiée par les sept CL testés ne donnent pas de différences statistiques significatives comme nous avons pu le voir dans le chapitre 3 entre le CL 14:0 et le CL 18:2. Cela peut être dû à plusieurs facteurs.

Tout d'abord, d'un point de vue purement statistique, comparer sept groupes est assez différent par rapport à une comparaison deux à deux comme effectué dans le chapitre 3. Deux groupes statistiquement différents quand ils sont testés deux à deux peuvent finalement ne pas être différenciés si l'on incorpore au test d'autres groupes et en particulier quand les groupes ajoutés ont des valeurs intermédiaires aux deux groupes de départ. C'est en effet le cas ici.

Les conditions de mesure ont également évolué pour aboutir à davantage de répétabilité mais cela a provoqué également un resserrement des paramètres électrochimiques issus des différents groupes de lipides autour de valeurs similaires. Comme nous avons pu le constater avec l'expérience consistant à augmenter la rugosité de l'électrode pour immobiliser du cyt c sur une électrode modifiée avec de la PA, la préparation de l'électrode est un facteur très important vis-à-vis du signal électrochimique obtenu. La préparation minutieuse

de la surface de carbone pour ces expériences sur l'effet des chaînes du CL a peut être permis de s'affranchir de biais qui nous laissaient précédemment entrevoir des différences de comportement électrochimique entre les différentes électrodes modifiées par le CL 14:0 et le CL 18:2.

Il est clair que la grande sensibilité de la préparation de l'électrode modifiée joue sur la variabilité des valeurs calculées par la technique de traitement de l'ACV de Creager. Dans l'hypothèse où il existerait un effet des chaînes du CL sur le potentiel ou la cinétique de transfert électronique du cyt c, il est possible que la différence entre les différents CL soit masquée par cette variabilité.

Enfin, il est également possible qu'il n'y ait pas d'effet des chaînes sur les paramètres électrochimiques étudiés ( $k_{ET}$ ,  $\Gamma$  des sous-populations 1 et 2 du cyt c « immobilisé »). Les derniers travaux pointant l'effet d'espèces moléculaires différentes du CL portent presque toutes sur l'induction de l'activité peroxidase du cyt c. Il est possible que cette propriété du cyt c lié au CL soit indépendante des paramètres que nous avons mesurés.

#### VARIATIONS DES POTENTIELS LORS DU TRANSFERT DE CELLULE

Les paramètres tels que potentiels de demi-pic et l'écart entre les pics issus des CV utilisées pour visualiser les phases d'adsorption et de désorption du cyt c, avant les études en ACV, sont reportés dans le **Tableau 3**.

Type d'électrode modifiée	$E_{1/2}$ cell1	Erreur Standard	$\Delta E$ cell1	Erreur Standard	$E_{1/2}$ cell2	Erreur Standard	$\Delta E$ cell2	Erreur Standard
CL 14:0	15.6	7.7	70.7	10.2	-12.0	n.d.	115.6	n.d.
CL 16:0	0.4	6.2	66.7	27.2	-19.5	6.5	71.7	15.7
CL 18:0	-7.6	7.6	59.2	12.9	-20.3	6.8	75.5	1.5
CL 18:1	-4.3	3.2	55.7	14.9	-12.4	7.1	56.3	9.5
CL 18:2	4.5	1.8	46.8	17.7	-10.0	7.9	22.9	5.4
CL 22:6	-3.0	1.7	70.8	6.0	-8.6	3.9	60.6	5.4

**Tableau 3 : Potentiel de demi-pic ( $E_{1/2}$ ) et écart entre les pic ( $\Delta E$ ) de cyt c électroactif dans la première et dans la deuxième cellule électrochimique.**

Nous retrouvons pour tous les CL testés les variations de potentiels formels déjà observés dans la partie précédente, c'est-à-dire un décalage vers les potentiels négatifs lors du transfert dans la deuxième cellule ( $E_{1/2}$  cell1  $\rightarrow$   $E_{1/2}$  cell2). En nous focalisant sur l'écart entre les pics ( $\Delta E$  cell1 et  $\Delta E$  cell2), nous observons une augmentation de cet écart lors du transfert de cellule pour les CL à courte chaîne et/ou présentant un

faible nombre d'insaturations. Pour les autres CL, et particulièrement pour le CL 18:2, cet écart entre les pics diminue lors du transfert de cellule. Cet effet est particulièrement marqué et même si l'erreur standard associée à ces mesures paraît élevée, on retrouve toujours cette tendance pour les CL 22:6 et 18:2 si l'on prend les données une à une (expérience par expérience).

La raison de cette variation d'écart entre les pics lors du transfert de cellule n'est pas encore connue. L'écart entre les pics est associé à la cinétique de transfert électronique si l'on se base sur le modèle classique de Laviron. Or, nous n'observons pas de corrélation entre l'écart entre les pics dans la deuxième cellule et les cinétiques calculées avec le modèle de Creager (Tableau 2). La revue d'Armstrong sur la voltamétrie des films protéiques peut donner une explication par rapport aux comportements électrochimique non idéaux des protéines adsorbées sur une électrode (Armstrong et al. 1997). Un décalage des pics peut être associé à un changement de conformation d'une forme (oxydée ou réduite) de la protéine.

## ESPECE MOLECULAIRE DU CL ET LIENS AVEC LA NATURE DU CYT C

Dans un second temps, nous avons voulu tester l'hypothèse qu'il pouvait exister une interaction spécifique entre les chaînes du CL retrouvées chez une espèce et la structure du cyt c de cette espèce. Trois cyt c ont été testés. Il s'agit du cyt c de cœur de bœuf (identifié comme cyt c BH – « Bovin Heart »), de cœur de cheval (cyt c HH – « Horse Heart ») et de levure de boulanger *Saccharomyces cerevisiae* (cyt c YE – « Yeast »). Cependant, pour des raisons de clarté, nous avons seulement présenté les résultats des cyt c YE et BH. En effet, aucune différence n'a été observée entre le cyt c HH et le cyt c BH pour tous les paramètres électrochimiques mesurés. Dans le texte, nous dénommerons les cyt c HH et BH sont le même terme de cyt c de mammifère.

Les CL naturellement présents dans ces organismes sont composés d'AG majoritairement en 18:2 pour le cœur de cheval ou de bœuf (Schlame et al. 1993) et d'AG de type 18:1/16:1 pour la levure (Schlame et al. 1993; Rijken et al. 2009; van Gestel et al. 2010).

### AFFINITE CL – CYT C

Une étude comparative de l'affinité du cyt c de mammifère et de levure sur une électrode modifiée PC-CL 18:1 a été réalisée. La valeur de charge du cyt c dans la première cellule électrochimique a été reportée

pour des concentrations en cyt c variant entre 1.25 et 44  $\mu\text{M}$ . Les phénomènes d'adsorption, c'est-à-dire de transfert de composés dissous sur une surface solide sont décrits par les isothermes d'adsorption de Langmuir.

$$Q = \frac{Q_m \cdot k_l \cdot C}{1 + k_l \cdot C}$$

Q est la quantité de protéine adsorbée,  $Q_m$  est la quantité maximum de protéine adsorbée,  $k_l$  est la constante d'affinité de Langmuir et C est la concentration de la protéine. Cette équation décrit l'affinité d'un composé qui comble des sites vacants sur la surface d'une électrode en fonction de la concentration de ce composé en solution.

Tout comme les équations de cinétiques d'adsorption et de désorption, on utilise davantage la forme linéaire de cette équation qui permet de retrouver graphiquement les valeurs des constantes d'affinité et d'adsorption maximale :

$$\frac{1}{Q} = \frac{1}{Q_m} + \frac{1}{Q_m \cdot k_l \cdot C}$$

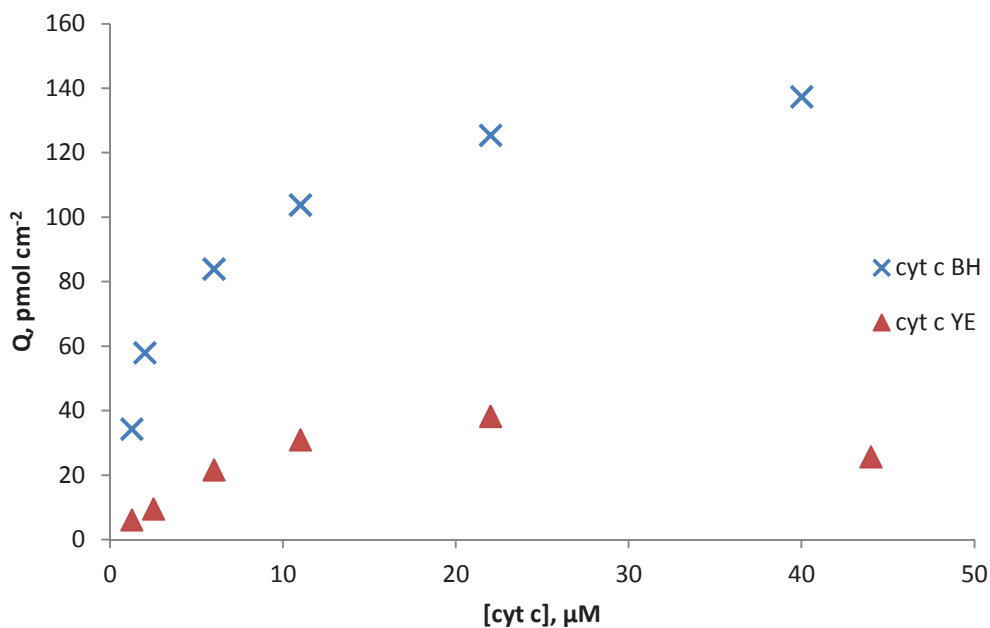


Figure 4.41 : Variation de la quantité de cyt c électroactif pour différentes concentrations

Les isothermes obtenus pour les deux cyt c utilisés sont cohérents avec le modèle d'adsorption de Langmuir (Figure 4.41). L'étude d'Heimburg (Heimburg and Marsh 1995) étudie en détail les isothermes d'adsorption de cyt c de mammifère sur une bicouche lipidique comprenant de la PG 18:2 et obtient des résultats similaires. Dans le cas du cyt c de levure, on a pu observer lors de la phase d'adsorption du cyt c, une perte de signal graduelle du cyt c en solution à partir d'une concentration en cyt c de 20  $\mu\text{M}$  qui aboutit à une

quantité de cyt c électroactif presque nulle. Ainsi, seule la valeur de charge initiale (premiers balayages en CV) a été retenue pour obtenir le graphique en [Figure 4.41](#).

Les valeurs des constantes d'affinité calculées sont de  $k_1 = 257 \text{ mM}^{-1}$  et  $k_1 = 130 \text{ mM}^{-1}$  pour le cyt c BH et YE, respectivement. Le cyt c BH a une affinité environ deux fois plus élevée pour s'adsorber sur un dépôt lipidique constitué d'un mélange PC-CL 18:1 en proportion 80/20 que le cyt c YE. Les valeurs d'adsorption maximale sont de  $Q_m = 148 \text{ pmol cm}^{-2}$  et  $Q_m = 43 \text{ pmol cm}^{-2}$  pour le cyt c BH et YE respectivement. On peut supposer à partir de ces isothermes que le CL 18:1 est plus adapté pour un accrochage du cyt c de mammifère que du cyt c de levure.

Ces mesures d'affinité pour toute une gamme de concentration en cyt c n'ont pas pu être réalisées en présence du CL 16:0 provenant d'*Escherichia coli* dont la composition en AG doit être proche de la composition en AG d'un CL de levure. Toutefois, le croisement entre les différentes espèces moléculaires de CL et les cyt c a été réalisé pour le protocole « classique », c'est-à-dire avec une concentration en cyt c dans la première cellule électrochimique de  $50 \text{ }\mu\text{M}$ . Dans ces conditions, la perte de signal électrochimique d'une solution  $50 \text{ }\mu\text{M}$  de cyt c YE sur une électrode modifiée de type PC-CL est observée quelque soit la nature du CL. Cela démontre également que, de manière générale, l'affinité du cyt c YE est inférieure au cyt c BH.

Les travaux de Salomon portant sur l'étude de l'électrochimie du cyt c sur une électrode modifiée avec un mélange PC-CL accordent une large part à l'importance de la force ionique et à celle de la concentration de cyt c sur le phénomène d'adsorption du cyt c. En particulier, Salomon observe plusieurs formes d'adsorptions du cyt c sur son électrode modifiée dans des conditions de faibles concentrations en cyt c dissous (de l'ordre de  $1 \text{ }\mu\text{M}$  – Salomon 1997).

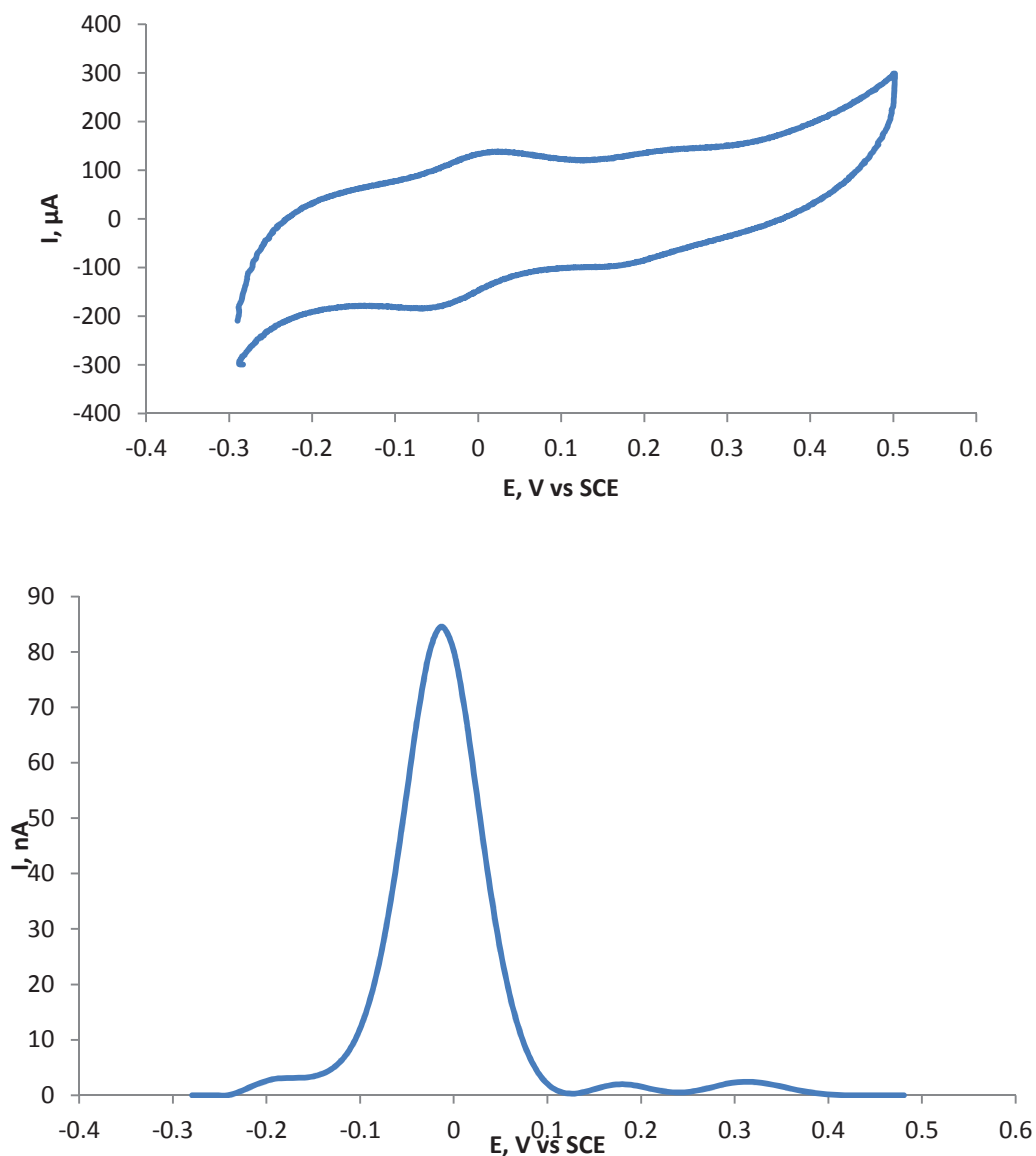


Figure 4.42 : CV et ACV de cyt c BH 1.25 $\mu\text{M}$  sur une électrode PC-CL 18:1. 4 formes électroactives de cyt c sont identifiées aux potentiels de -190 mV, -13 mV, +176 mV et +316 mV vs SCE.

Nos essais réalisés dans ces conditions de faible concentration (1.25 $\mu\text{M}$ ) révèlent en effet plusieurs autres formes de cyt c électroactifs (Figure 4.42). Quatre formes de cyt c BH électroactifs ont été identifiées aux potentiels de -190 mV, -13 mV, +176 mV et +316 mV. Si l'on compare avec le cyt c YE, seules deux formes électroactives sont identifiées aux potentiels de -15 mV et +202 mV. Les formes adsorbées qui ont un potentiel formel positif par rapport à notre référence (SCE) sont caractérisées par des valeurs de  $k_{\text{ET}}$  très faibles, inférieures à  $1 \text{ s}^{-1}$ . A des concentrations plus élevées en cyt c, seules les autres espèces de cyt c dont le potentiel formel est négatif par rapport à notre référence subsistent. S'il était besoin de montrer la précision de la mesure apporté par l'ACV, les quatre sous-populations de cyt c identifiées en Figure 4.42 n'ont pu être identifiées qu'avec l'utilisation de la technique d'ACV.

Une information intéressante apportée par cette expérience concerne le fait que le cyt c de levure n'est que faiblement immobilisé sur une électrode modifiée PC-CL 18:1 en proportion 80/20 comparativement au cyt c mammifère.

Toutefois, un essai d'immobilisation de cyt c YE sur une électrode modifiée avec un dépôt lipidique de type PC-PG 18:1 ou PC-PG 14:0 a abouti à une stabilisation de la quantité de cyt c YE dans la deuxième cellule électrochimique à des valeurs de 5 – 10 pmol cm<sup>-2</sup>. Ces quantités de cyt c YE « immobilisé » par la PG sont toutefois inférieures à celles que l'on retrouve pour le cyt c mammifère immobilisé par le CL qui sont de l'ordre de 50 - 150 pmol cm<sup>-2</sup>.

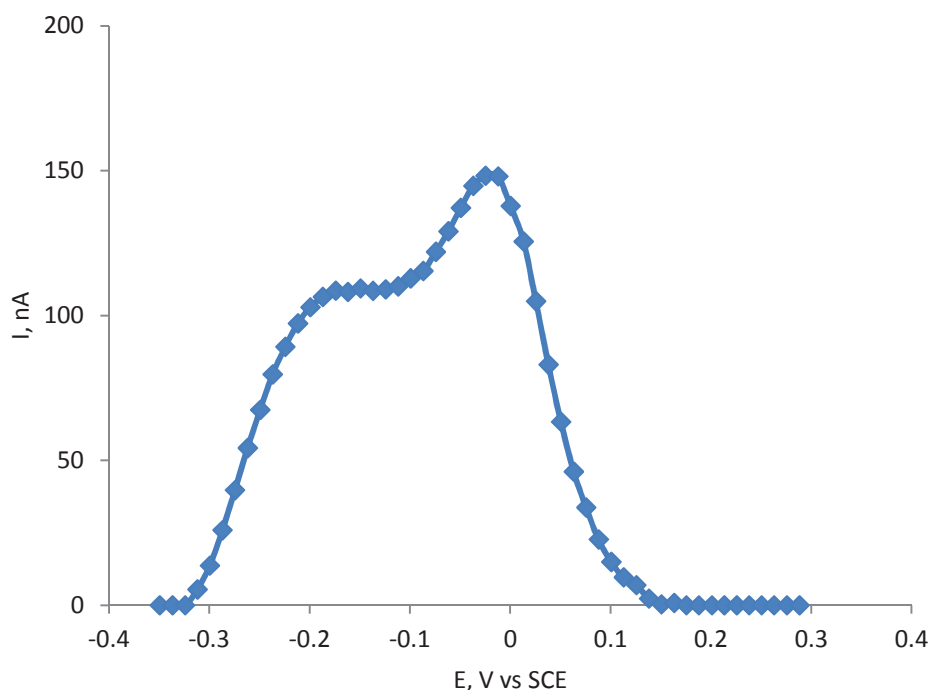


Figure 4.43 : ACV à 8Hz de cyt c YE immobilisé sur une électrode modifiée avec un dépôt de PC-PG 14:0 (deuxième cellule électrochimique). Deux sous-population de cyt c sont présentes à -24.8 mV et -174 mV vs SCE.

Sur une électrode modifiée PC-PG, deux sous-populations de cyt c ont été identifiées avec des valeurs de potentiels proches des sous-populations identifiées pour un système CL - cyt c BH (Figure 4.43). Dans le cas de la PG 14:0 présentée en Figure 4.43, la sous-population 1 est caractérisée par un E° de -24.8 mV et un  $k_{ET}$  de 22 s<sup>-1</sup> tandis que la sous-population 2 est caractérisée par un E° de -174 mV et un  $k_{ET}$  de 60 s<sup>-1</sup>. Les résultats sont très similaires dans le cas d'une PG 18:1. Par rapport à un système CL – cyt c BH décrit dans le chapitre 3, la sous-population 2 du système PG – cyt c YE a une cinétique de transfert électronique d'un ordre de grandeur plus lent (300-900 s<sup>-1</sup> et 40-80 s<sup>-1</sup> respectivement).

Cela suggère que le cyt c de levure a une interaction plus spécifique avec la PG. Une étude portant sur des mutants de levure de bière dont le contenu en CL a été altéré montre qu'il n'existe pas de lien entre le

contenu en cyt c et en CL dans les mitochondries de levure (Zhang et al. 2005). De plus, Jiang a démontré que des cultures de mutants de levure de bière similaires qui sont dépourvus de CL, ont une croissance et une division normale (Jiang et al. 1997). Les auteurs émettent l'hypothèse que pour les organismes dit plus « primitifs », la PG pourrait se substituer au CL pour maintenir le bon fonctionnement de la mitochondrie.

### COMPORTEMENT ELECTROCHIMIQUE EN CV DES DIFFERENTS CYT C

En particulier lors de la phase d'adsorption du cyt c, les voltamétries montrent des différences bien marquées de comportement électrochimique. L'allure et la position des pics de réduction et d'oxydation de cyt c YE sont très différents du schéma classique (Figure 4.44).

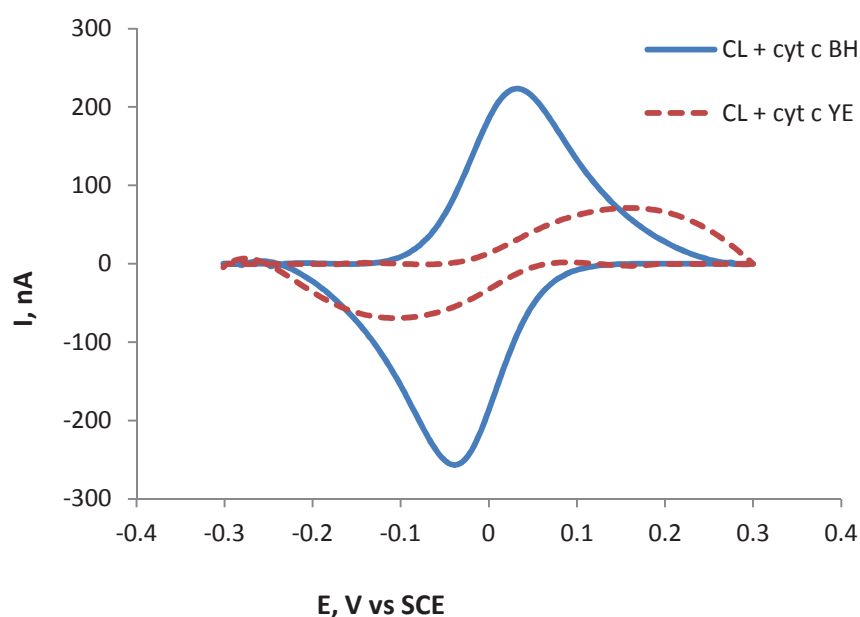


Figure 4.44 : CV à  $50\text{mV s}^{-1}$  corrigée du signal capacitif de cyt c de bœuf (courbe bleue) et de levure (courbe rouge) sur une électrode modifiée de type PC-CL dans la première cellule électrochimique (solution de cyt c  $50\ \mu\text{M}$ ).

Un décalage des potentiels formels vers des valeurs plus positives que celles observées pour le cyt c BH est commun à tous les CL testés (moyenne des  $E^\circ$  tous CL confondus :  $+4\ \text{mV vs SCE}$ ).

L'écart entre les pics est élevé, supérieur à  $100\ \text{mV}$ , et ce pour tous les types de CL utilisés. Cette différence est moins marquée quand on passe dans la deuxième cellule électrochimique (Figure 4.45). On observe pour le cyt c « immobilisé », une différence plus marquée de  $\Delta E$  entre les cyt c YE et BH pour les CL 14:0 et CL 18:2. Pour ces deux espèces moléculaires de CL, la tendance est toutefois inverse pour les deux



sources de cyt c. Pour le CL 18:2, l'écart entre les pics est plus élevé avec du cyt c YE tandis que pour le CL 14:0, l'écart entre les pics est plus élevé avec du cyt c BH.

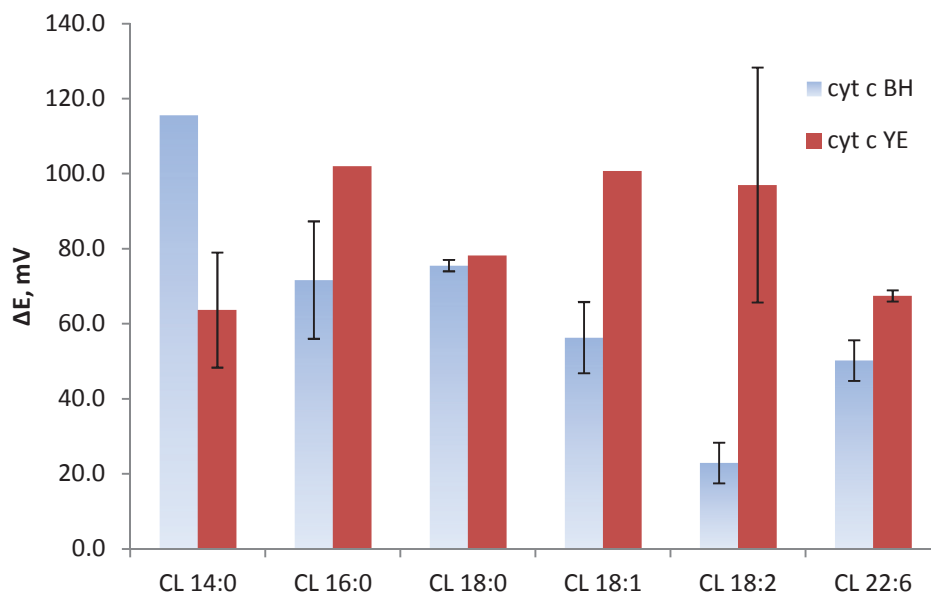


Figure 4.45 : Récapitulatif pour l'ensemble des CL testés de l'écart entre les pics  $\Delta E$  des premières CV à une vitesse de balayage de  $50 \text{ mV s}^{-1}$  dans la deuxième cellule électrochimique.

Comme décrit précédemment, l'écart entre les pics est un paramètre qui peut être compliqué à interpréter dans le cas de protéines adsorbées sur une électrode (Armstrong et al. 1997). Dans notre cas,  $\Delta E$  peut être lié à la vitesse de transfert électronique, la diffusion de la protéine au sein du dépôt lipidique et l'orientation de la protéine. Or il ne devrait pas y avoir de différences de diffusion pour un même dépôt lipidique.

L'étude des vitesses de transfert électronique du cyt c YE immobilisé n'a pas pu être réalisée du fait de la désorption de cyt c YE dans la deuxième cellule électrochimique. Toutefois, un comparatif des vitesses de transfert électronique entre ces deux types de cyt c a déjà été réalisé par El Kasmi (El Kasmi et al. 1998). Cette étude portant sur des électrodes modifiées par des SAMs montre que la longueur mais surtout la nature de la tête polaire n'influence pas de la même manière l'électrochimie du cyt c YE par rapport au cyt c HH (Figure 4.46). Globalement, la vitesse de transfert électronique du cyt c YE est plus faible que celle du cyt c mammifère.

SAM structure <sup>d</sup>	horse cytochrome <i>c</i>	yeast cytochrome <i>c</i>
C <sub>7</sub> COOH	1000	18
C <sub>10</sub> COOH	60	0.21
C <sub>10</sub> COOH/C <sub>7</sub> OH		500
C <sub>10</sub> COOH/C <sub>8</sub> OH	300	400
C <sub>10</sub> COOH/C <sub>13</sub> OH		2.0

Figure 4.46 : Cinétiques de transfert électronique ( $k_{ET}$  en  $s^{-1}$ ) de cyt *c* YE ou HH sur une électrode modifiée par différents types de SAMs. D'après El Kasmi 1998.

Une étude ultérieure toujours réalisée par El Kasmi (El Kasmi et al. 2002) démontre que le cyt *c* de levure a une cinétique de transfert électronique deux fois plus faible qu'un cyt *c* HH sur une électrode d'ITO nue.

Dans la partie précédente, nous avons observé que les cinétiques calculées par la méthode de Creager ne semblaient pas corrélées avec l'écart entre les pics observés en CV. Ici, l'écart entre les pics relativement faible pour l'association CL 18:2 – cyt *c* BH pourrait provenir d'une association spécifique qui modifierait l'orientation de la protéine ou sa distance par rapport au plan de l'électrode. Ces deux facteurs peuvent augmenter ou baisser la vitesse de transfert électronique indépendamment.

A titre de comparaison avec l'interaction de type PG – cyt *c* YE évoquée précédemment, le  $\Delta E$  observé du cyt *c* YE sur une électrode modifiée PC-PG 14:0 est de l'ordre de 20 – 30 mV ce qui va également dans le sens de l'existence de certaines associations spécifiques entre un type de cyt *c* et un type de phospholipide.

## CONCLUSION

On peut tout d'abord rapidement commenter l'absence de différences observées entre les deux cyt *c* BH et HH (issus du bœuf et du cheval) La figure 4.47 provient de la base de donnée Uniprot et fait un comparatif des séquences peptidiques des trois cyt *c* utilisés pour ces travaux. On retrouve une structure très similaire entre ces trois protéines mais la similarité est presque parfaite entre les cyt *c* HH et BH. Il n'est donc pas si étonnant d'obtenir des résultats comparables pour ces deux cyt *c* de mammifère.

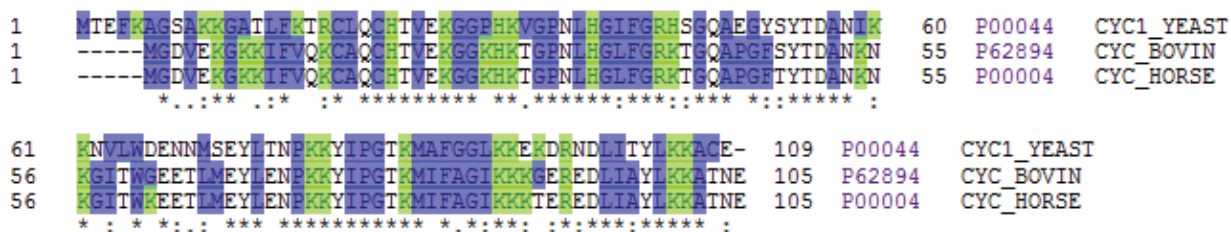


Figure 4.47 : Comparaison des séquences de cyt c BH, HH et YE d'après la basse de donnée HHH. Les résidus surlignés en bleu représentent les AAs hydrophobes et en vert les AAs chargés positivement à pH physiologique.

Au regard des résultats observés pour le cyt c YE, il est clair que ce dernier n'a pas le même type de relation avec le CL que le cyt c de mammifère. Le cyt c de levure s'adsorbe peu sur une électrode type PC-CL décrite dans le chapitre 3. Par contre, les essais avec la PG laissent supposer que l'association PG – cyt c YE a un comportement similaire à l'association CL – cyt c BH. Il est possible que le lien entre CL et cyt c se soit imposé plus tard dans l'évolution du fonctionnement mitochondrial. En effet, plus l'on remonte dans la phylogénie, moins le CL possède un rôle primordial pour la survie de l'organisme. A ce titre, on peut citer les expériences impliquant des mutants d'*Escherichia coli* déplétés à la fois en PG et en CL et dont la croissance et la division cellulaire sont normales (Mileykovskaya et al. 2009). Les auteurs observent pour cette lignée une production accrue de PA dont la présence est supposée compenser la perte de PG et de CL.

Nous n'avons pas observé d'effet des chaînes du CL sur les paramètres électrochimiques calculés par la simulation en ACV. Les différences observées concernent les cinétiques d'adsorption lors de la première phase d'adsorption du cyt c ainsi que les variations d'écart entre les pics voltamétriques lors du transfert de cellule. Les cinétiques d'adsorption de cyt c pour différents types de CL sont probablement liées aux caractéristiques biophysiques des CL. Ces caractéristiques (température de transition de phase, mobilité des chaînes) sont dépendantes de la nature des chaînes grasses portées par le CL.

Il est possible qu'il n'y ait pas d'effet des chaînes sur l'électrochimie du système cyt c BH – CL. Il est également intéressant de voir que malgré les grandes différences de propriétés biophysiques des différentes espèces moléculaires de CL testés, les paramètres cinétiques ne montrent pas de différences. Le fait d'avoir un mélange de CL avec de la PC majoritaire peut contribuer à l'homogénéité des résultats.

Il est aussi possible que l'effet des chaînes du CL pour l'interaction cyt c – CL n'existe pas pour nos conditions expérimentales. Comme pourrait le suggérer la synthèse des revues de Schlame et al. 2000, Kinnunen 1996 et Haines 2009, la structure bicyclique du CL pourrait provenir de l'homogénéité de sa composition en AG. En effet, L'encombrement stérique équivalent des chaînes positionnées en sn1 et sn2 privilégierait la conformation « chaise » du motif glycérol commun à tous les glycérophospholipides (Haines 2009) (Figure 4.48).

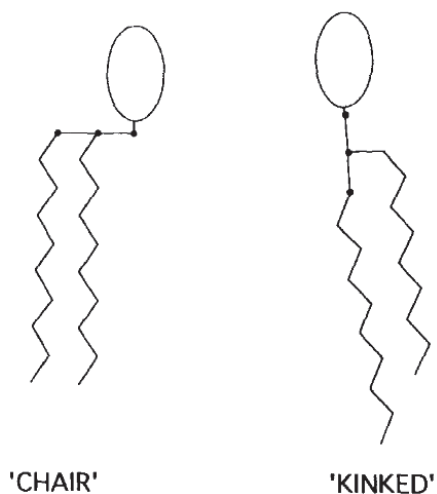


Figure 4.48 : conformations « chair » et « kinked » du motif glycérol de base des glycérophospholipides. D'après Kinnunen 1996.

Une dissymétrie de la structure des chaînes en sn1 et sn2 provoque la perte de la structure bicyclique du CL et modifie également drastiquement ses propriétés chimiques ( $pK_{a2}$ ) et biophysiques (préférence de phase) (Haines 2009). Cela pourrait expliquer la grande homogénéité de composition en AG observée in-vivo (Schlame et al. 2000) mais également pourquoi l'effet des chaîne serait peu visible pour nos résultats.

## RÉFÉRENCES

- Abe, M., R. Niibayashi, S. Koubori, I. Moriyama and H. Miyoshi **2011**. "Molecular Mechanisms for the Induction of Peroxidase Activity of the Cytochrome c-Cardiolipin Complex." Biochemistry 50(39): 8383-8391.
- Armstrong, F. A., H. A. Heering and J. Hirst **1997**. "Reaction of complex metalloproteins studied by protein-film voltammetry." Chemical Society Reviews 26(3): 169-179.
- Belikova, N. A., Y. A. Vladimirov, A. N. Osipov, A. A. Kapralov, V. A. Tyurin, M. V. Potapovich, L. V. Basova, J. Peterson, I. V. Kurnikov and V. E. Kagan **2006**. "Peroxidase Activity and Structural Transitions of Cytochrome c Bound to Cardiolipin-Containing Membranes." Biochemistry 45(15): 4998-5009.
- Cho, S.-Y., K. Miyashita, T. Miyazawa, K. Fujimoto and T. Kaneda **1987**. "Autoxidation of ethyl eicosapentaenoate and docosahexaenoate." Journal of the American Oil Chemists' Society 64(6): 876-879.
- El Kasmi, A., M. C. Leopold, R. Galligan, R. T. Robertson, S. S. Saavedra, K. El Kacemi and E. F. Bowden **2002**. "Adsorptive immobilization of cytochrome c on indium/tin oxide (ITO): electrochemical evidence for electron transfer-induced conformational changes." Electrochemistry Communications 4(2): 177-181.
- El Kasmi, A., J. M. Wallace, E. F. Bowden, S. M. Binet and R. J. Linderman **1998**. "Controlling Interfacial Electron-Transfer Kinetics of Cytochrome c with Mixed Self-Assembled Monolayers." Journal of the American Chemical Society 120(1): 225-226.
- Haines, T. H. **2009**. "A new look at Cardiolipin." Biochimica et Biophysica Acta 1788(10): 1997-2002.
- Heimburg, T. and D. Marsh **1995**. "Protein surface-distribution and protein-protein interactions in the binding of peripheral proteins to charged lipid membranes." Biophysical Journal 68(2): 536-546.
- Jiang, F., H. S. Rizavi and M. L. Greenberg **1997**. "Cardiolipin is not essential for the growth of *Saccharomyces cerevisiae* on fermentable or non-fermentable carbon sources." Molecular Microbiology 26(3): 481-491.
- Kinnunen, P. K. J. **1996**. "On the molecular-level mechanisms of peripheral protein-membrane interactions induced by lipids forming inverted non-lamellar phases." Chemistry and Physics of Lipids 81(2): 151-166.
- McMillin, J. B. and W. Dowhan **2002**. "Cardiolipin and apoptosis." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids 1585(2-3): 97-107.
- Mileykovskaya, E., A. C. Ryan, X. Mo, C.-C. Lin, K. I. Khalaf, W. Dowhan and T. A. Garrett **2009**. "Phosphatidic Acid and N-Acylphosphatidylethanolamine Form Membrane Domains in *Escherichia coli* Mutant Lacking Cardiolipin and Phosphatidylglycerol." Journal of Biological Chemistry 284(5): 2990-3000.

- Pinheiro, T. J. T., P. J. Bratt, I. H. Davis, D. C. Doetschman and A. Watts **1993**. "Spin-lattice relaxation times of phospholipid aminoxyl spin labels in cardiolipin–cytochrome c bilayers: a pulse saturation–recovery EPR study." Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2 1993(11): 2113–2117.
- Rijken, P. J., R. H. Houtkooper, H. Akbari, J. F. Brouwers, M. C. Koorengel, B. de Kruijff, M. Frentzen, F. d. r. M. Vaz and A. I. P. M. de Kroon **2009**. "Cardiolipin Molecular Species with Shorter Acyl Chains Accumulate in *Saccharomyces cerevisiae* Mutants Lacking the Acyl Coenzyme A-binding Protein Acb1p." Journal of Biological Chemistry 284(40): 27609-27619.
- Rytömaa, M. and P. K. Kinnunen **1994**. "Evidence for two distinct acidic phospholipid-binding sites in cytochrome c." Journal of Biological Chemistry 269(3): 1770-1774.
- Rytömaa, M. and P. K. J. Kinnunen **1995**. "Reversibility of the Binding of Cytochrome c to Liposomes." Journal of Biological Chemistry 270(7): 3197-3202.
- Rytömaa, M., P. Mustonen and P. K. Kinnunen **1992**. "Reversible, nonionic, and pH-dependent association of cytochrome c with cardiolipin-phosphatidylcholine liposomes." Journal of Biological Chemistry 267(31): 22243-8.
- Sankaram, M. B., G. L. Powell and D. Marsh **1989**. "Effect of acyl chain composition on salt-induced lamellar to inverted hexagonal phase transitions in cardiolipin." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes 980(3): 389-392.
- Schlame, M., S. Brody and K. Y. Hostetler **1993**. "Mitochondrial cardiolipin in diverse eukaryotes. Comparison of biosynthetic reactions and molecular acyl species." European Journal of Biochemistry 212(3): 727-733.
- Schlame, M., R. I. Kelley, A. Feigenbaum, J. A. Towbin, P. M. Heerdt, T. Schieble, R. J. A. Wanders, S. DiMauro and T. J. J. Blanck **2003**. "Phospholipid abnormalities in children with Barth syndrome." 42: 1994-1999.
- Schlame, M., D. Rua and M. L. Greenberg **2000**. "The biosynthesis and functional role of cardiolipin." Progress in Lipid Research 39(3): 257-288.
- Stepanov, G., O. Gnedenko, A. Mol'nar, A. Ivanov, Y. Vladimirov and A. Osipov **2009**. "Evaluation of cytochrome c affinity to anionic phospholipids by means of surface plasmon resonance." FEBS Letters 583(1): 97-100.
- van Gestel, R. A., P. J. Rijken, S. Surinova, M. O'Flaherty, A. J. R. Heck, J. A. Killian, A. I. P. M. de Kroon and M. Slijper **2010**. "The influence of the acyl chain composition of cardiolipin on the stability of mitochondrial complexes; An unexpected effect of cardiolipin in [alpha]-ketoglutarate dehydrogenase and prohibitin complexes." Journal of Proteomics 73(4): 806-814.
- Vasilenko, I., B. De Kruijff and A. J. Verkleij **1982**. "Polymorphic phase behaviour of cardiolipin from bovine heart and from *Bacillus subtilis* as detected by <sup>31</sup>P-NMR and freeze-fracture techniques. Effects of Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Ba<sup>2+</sup> and temperature." Biochimica et Biophysica Acta 684(2): 282-286.
- Zhang, M., E. Mileyskaya and W. Dowhan **2005**. "Cardiolipin Is Essential for Organization of Complexes III and IV into a Supercomplex in Intact Yeast Mitochondria." Journal of Biological Chemistry 280(33): 29403-29408.



## CONCLUSION GENERALE

### RAPPEL DE LA PROBLEMATIQUE

Cette thèse avait pour but de mettre au point et d'optimiser une méthode électrochimique utilisant une électrode modifiée avec des phospholipides. Cet ouvrage présente les protocoles utilisés et mise au point de cette électrode de carbone vitreux (GC) modifiée dont le but était de créer une interface électrochimique biomimétique pour modéliser *in vitro* des interactions entre des lipides membranaires et une protéine soluble mitochondriale, le *cyt c*.

En particulier, les conditions de molarité ou de pH de la mitochondrie et la composition de la membrane interne de la mitochondrie (proportion de CL de 20% molaire) ont été utilisées pour se rapprocher le plus possible des conditions *in-vivo*.

Cette électrode modifiée devait permettre d'apporter de nouveaux éléments par rapport aux interactions protéines solubles – lipides membranaires et en particulier la théorie du « lipid anchorage » développée par Kinnunen sur les interactions entre *cyt c* et le CL. Enfin, elle est à la base d'une étude comparative sur l'interaction *cyt c* – CL pour différentes sources de CL et de *cyt c*. Les chaînes grasses du CL chez les bivalves ont une composition spécifique qui n'a jamais été retrouvée dans d'autres organismes. La question de la relation entre la structure particulière de ce lipide et sa fonction s'est naturellement posée.

### ORIGINALITE DE L'ETUDE REALISEE

Le *cyt c* est la protéine soluble la plus étudiée en électrochimie. Son comportement électrochimique non idéal, voire même sa dénaturation sur des électrodes nues a guidé les recherches dans ce domaine vers l'étude de la modification de la surface des électrodes afin de permettre et de moduler l'électrochimie du *cyt c*. Ainsi, les SAM ou des électrodes modifiées par des lipides sont majoritaires pour les études du *cyt c* par électrochimie.

Une des particularités de ce travail de thèse réside dans le fait d'utiliser des techniques d'AC voltamétrie afin d'étudier et de modéliser le comportement électrochimique du *cyt c* immobilisé sur une



électrode modifiée par des phospholipides. Cette technique peu utilisée, développée par Creager, nous a permis d'identifier différentes sous-populations de cyt *c* adsorbés sur une électrode modifiée par un dépôt de PC-CL ou de PC-PG. Ces sous-population de cyt *c* électroactifs ne sont pas visibles par les techniques électrochimiques classiques comme la voltamétrie cyclique.

Une autre originalité de cette étude réside dans le fait que nous avons été très attentifs à recréer dans la cellule électrochimique les conditions physicochimiques que l'on retrouve dans la mitochondrie. De même, le phénomène d'immobilisation de cyt *c* sur une électrode modifiée n'a jamais été réalisé dans une cellule électrochimique qui ne contient pas de cyt *c* en solution. Ainsi, l'électrode que nous avons mis au point a servi à mieux comprendre le phénomène d'accroche du cyt *c* sur les lipides mitochondriaux.

## RESULTATS PRINCIPAUX SUR LE LIPID ANCHORAGE ET LA SPECIFICITE CYT CL

Le chapitre 3 a permis de décrire le comportement électrochimique du cyt *c* adsorbé sur une électrode modifiée avec un dépôt de PC-CL. Il apparaît que seul la présence de CL permet l'électroactivité du cyt *c* car une électrode modifiée seulement à la PC ne permet pas l'immobilisation de cyt *c*. Une technique dérivée de l'AC voltamétrie a permis d'identifier deux sous-populations de cyt *c* adsorbé en présence de CL appelées sous-population 1 et 2. Le traitement de cette électrode modifiée avec une solution à forte force ionique (0.5 M KCl) a permis de discriminer le type d'accroche de ces deux sous-population de cyt *c* immobilisé. Le KCl a désorbé le cyt *c* de la sous-population 1 de cyt *c* au contraire de la sous-population 2 qui n'a pas été affectée par ce traitement. Nous avons donc supposé que la sous-population 1 est caractérisé par des interactions de type électrostatique avec le CL tandis que la nature de la sous-population 2 est plus compliquée à caractériser. Toutefois, des différences de potentiels redox et de vitesse de transfert électroniques de la sous-population 2 de cyt *c* ont été observées en testant deux type de CL différenciés par la nature de leur chaîne grasse (14:0 ou 18:2). Ce résultat a suggéré l'existence d'interactions de type hydrophobe pour la sous-population 2 de cyt *c*.

La nature de la sous-population 2 s'est précisée avec des expériences complémentaires portant sur l'effet du pH et de la présence de  $\text{Ca}^{2+}$ . Nous avons identifié, pour la sous-population 2 de cyt *c*, un mécanisme de type PCET, c'est-à-dire un transfert électronique couplé à un transfert de proton. S'il est difficile de juger de la relation de ce processus avec la fonction du cyt *c* in-vivo, nous pouvons toutefois supposer que l'hème de la sous-population 2 du cyt *c* est davantage en contact avec le solvant. Ainsi, la sous-population 2 de cyt *c* pourrait correspondre à une forme « ouverte » de la protéine liée au CL. L'ajout de faibles quantités de  $\text{Ca}^{2+}$  désorbe quasiment intégralement le cyt *c* des deux sous-populations. Le  $\text{Ca}^{2+}$  se liant probablement aux deux groupements phosphates du CL, cette observation nous laisse penser que les phosphates du CL sont impliqués dans les deux types d'interactions des sous-populations 1 et 2.

Afin de mieux comprendre quelle est l'origine de l'électroactivité du *cyt c* en présence de CL, nous sommes intéressés à la structure des phospholipides. Plusieurs classes de phospholipides ont été testées afin d'étudier l'influence de la nature de la tête polaire du lipide sur l'électrochimie du *cyt c*. Les principaux résultats établissent que seuls la PG et le CL permettent d'immobiliser et de promouvoir le transfert électronique de *cyt c* sur une électrode modifiée. Les autres phospholipides anioniques (PS, PI et PA) peuvent promouvoir le transfert électronique du *cyt c* « libre » en solution mais sont incapables de retenir le *cyt c* sur l'électrode modifiée. La PG et le CL ont en commun dans leur structure un motif glycérol terminal. Nous supposons que ce glycérol est important pour observer l'effet de « lipid anchorage » du *cyt c*. Un essai avec du dLCL, c'est-à-dire un CL dont deux chaînes grasses sur quatre ont été ôtées a été réalisé. Si la présence des deux sous-populations n'a pas pu être mise en évidence, on peut toutefois noter que l'adsorption et le comportement électrochimique de l'association dLCL – *cyt c* est davantage comparable à une interaction de type CL – *cyt c* ou PG – *cyt c* qu'à une interaction de type PA – *cyt c*. Cela va également dans le sens d'une plus grande importance de disposer d'une structure spécifique de la tête polaire du phospholipide plutôt qu'à une spécificité de la partie hydrophobe pour permettre le processus du « lipid anchorage ».

La dernière partie s'est focalisée sur les aspects de spécificité entre espèce moléculaire de phospholipide et source de *cyt c*. On observe peu d'effet de la nature des chaînes du CL sur l'électrochimie du système *cyt c* – CL. Ces effets sont probablement liés aux propriétés biophysiques des espèces moléculaires de CL induites par la nature de la chaîne grasse portée. Un résultat intéressant concerne les essais réalisés avec du *cyt c* issu de levure de boulanger. L'affinité de ce *cyt c* est plus faible que celle du *cyt c* de mammifère pour un dépôt de type PC-CL sur notre électrode. Or nous observons également un phénomène d'adsorption du *cyt c* de levure davantage adapté à une électrode de type PC-PG par rapport à une électrode de type PC-CL. Cette observation suggère une interaction préférentielle entre *cyt c* de levure et PG et pointe ainsi une spécificité entre la structure du *cyt c* et l'interaction avec une classe de phospholipide déterminée.

Ces résultats ont apportés une meilleure compréhension des interactions entre le *cyt c* et les phospholipides, particulièrement au niveau des éléments structurels nécessaires au phospholipide pour permettre l'accroche et le transfert d'électrons du *cyt c* sur une électrode modifiée. De plus, la mise au point de cette électrode modifiée peut servir de point de départ à d'autres types d'études sur l'interaction *cyt c* – CL. Certaines expériences préliminaires réalisées pendant cette thèse sont présentées dans la partie suivante traitant des perspectives et des applications potentielles du système électrochimique mis au point dans le cadre de mes travaux.



## PERSPECTIVES

### INTRODUCTION

La mise au point d'une électrode modifiée avec un dépôt de PC-CL ayant adsorbé du *cyt c* peut être le point de départ de diverses applications ou d'extension des travaux de recherche présentés dans cette thèse. L'électrode peut être par exemple utilisée comme un biocapteur (exemple de la CCO ou de l' $H_2O_2$ ) ou bien de servir de base à l'étude de la spécificité entre CL de bivalve et *cyt c* de bivalve ou encore à l'étude de l'effet de la peroxydation des chaînes du CL, ou plus généralement des mécanismes impliquant l'interaction *cyt c* – CL pour le processus de mort cellulaire programmée, l'apoptose.

### CYTOCHROME C OXIDASE

Des applications pour l'étude électrochimique du *cyt c* ou de la CCO devraient permettre de mettre en place des études permettant de mieux comprendre le lien entre CL et la chaîne respiratoire. La réalisation d'un tel biocapteur permet de simuler une étape de transfert électronique présente in-vivo. Elle ouvre aussi la voie à des études comparatives pour la compréhension des spécificités structurelles *cyt c* – CCO en lien avec la structure du CL.

La CCO est une enzyme transmembranaire complexe. Elle est couramment constituée de deux monomères composés de 26 sous-unités chacun. Le *cyt c* est le partenaire redox naturel de la CCO dans la chaîne de phosphorylation oxydative de la mitochondrie. De plus, le CL est un phospholipide essentiel pour le maintien de la structure tridimensionnelle de la CCO (Figure 1.8 – chapitre 1) et donc le maintien de l'activité CCO. Le lien fort existant entre le *cyt c*, le CL et la CCO a été le point de départ d'un essai d'utilisation de l'électrode modifiée décrit dans ce chapitre.

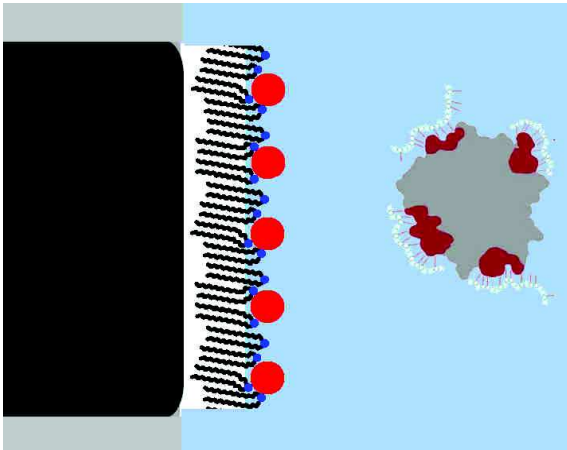


Figure P.1 : Schéma conceptuel de l'utilisation de l'électrode modifiée PC-CL à cyt *c* adsorbé pour l'étude de CCO en solution.

La CCO est électroinactive sur une électrode métallique nue comme le cyt *c*. Pour pallier à cette électroinactivité, on peut, comme pour le cyt *c*, utiliser un médiateur redox en solution (Heineman et al. 1972) ou bien immobiliser la CCO sur une électrode modifiée avec des modifieurs de surface de nature lipidique (Burgess et al. 1998; Ataka et al. 2004; Lewis et al. 2006).

Le modèle expérimental proposé est intermédiaire entre ces deux solutions et consiste à utiliser du cyt *c* adsorbé sur notre électrode modifiée PC-CL pour transférer des électrons à la CCO présente dans la solution de la cellule électrochimique (Figure P.1). Les paramètres retenus pour la mise en solution de la CCO sont inspirés de la publication de Heineman et al. 1972. La méthode d'analyse retenue est la chronoampérométrie. L'électrode modifiée est portée à un potentiel de réduction de la CCO (-0.1 V vs SCE) pendant 1 mn puis le potentiel en circuit ouvert ( $E_{oc}$ ) est mesuré pendant un laps de temps donné. Le maintien à un potentiel réducteur pour le cyt *c* permet de faire passer toutes les protéines adsorbées sous leur état Fer(II). Le cyt *c* ainsi réduit est le partenaire redox naturel de la CCO dans la mitochondrie. Le maintien à un potentiel réducteur est arrêté quand le courant mesuré sur l'électrode de travail passe sous un seuil préétabli.

Le retour à l'équilibre, c'est-à-dire l'oxydation du cyt *c* adsorbé, peut se faire de différentes façon. D'une part la nature oxydante du milieu (présence de dioxygène par exemple) tend naturellement à oxyder le cyt *c* réduit, mais à cela peut s'ajouter le transfert électronique d'un électron du cyt *c* à la CCO présente en solution (Figure P.2).

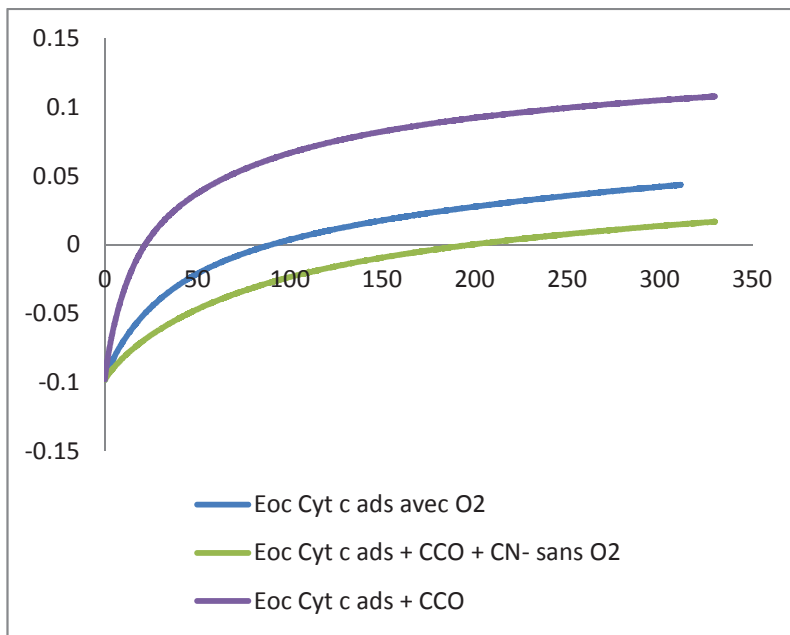


Figure P.2 : Chronoampérométrie d'une électrode modifiée PC-CL avec cyt c réduit adsorbé en absence de CCO (courbe bleue), en présence de CCO (courbe violette) et en présence de CCO et de  $\text{CN}^-$ , un inhibiteur de la CCO (courbe verte).

L'équation de Nernst permet de définir le potentiel mesuré à l'électrode d'un couple redox en fonction du potentiel standard de ce couple et du rapport entre la présence d'espèces réduites et oxydées du couple.

$$E = E^{\circ} - \frac{0.0591}{n} \log \frac{[Red]}{[Ox]}$$

On peut ainsi accéder aux paramètres cinétiques du transfert électronique de cyt c à CCO ainsi qu'au nombre d'électrons échangés par mole de CCO. Les résultats préliminaires présentés ici semblent prometteur pour une utilisation de l'électrode modifiée PC-CL comme biocapteur à CCO.

## ACTIVITE PEROXYDASE DU CYT C – BIOCAPTEUR

Comme nous l'avons vu dans le chapitre 3, nous avons pu distinguer deux sous-populations et en particulier une population de cyt c ayant des interactions hydrophobes. L'étude des interactions hydrophobes entre cyt c et CL s'est particulièrement focalisée dans la dernière décennie sur la modulation de l'activité

peroxydase du cyt *c* induite par le CL. Or, il semblerait que l'induction de l'apoptose soit liée à l'activité peroxydase (Ascenzi et al. 2011).

La caractérisation par notre électrode modifiée d'une sous-population de cyt *c* ayant des interactions hydrophobes pourrait se révéler un outil analytique puissant pour des études des mécanismes de l'apoptose. L'électrode modifiée PC-CL permettrait d'étudier à la fois le phénomène de relargage de cyt *c* observé pendant l'induction de l'apoptose et également la fonction peroxydase du cyt *c*. Ainsi, l'électrode modifiée pourrait être utilisée comme biocapteur au peroxyde d'hydrogène.

Le cyt *c*, dans sa configuration non native possède une activité peroxydase qui peut être utilisée pour la mesure de faibles concentrations de peroxyde d'hydrogène dans un milieu. La création d'un tel biocapteur à partir de cyt *c* adsorbé a été récemment décrite par plusieurs études (Wang et al. 2012; Wang et al. 2012b). Dans l'étude de Wang (2012a), le cyt *c* adsorbé sur une électrode d'ITO modifiée aux sphères de carbone permet de détecter des concentrations supérieures à 1 $\mu$ M en peroxyde d'hydrogène.

#### ETUDE DE LA PEROXYDATION DES CHAINES DU CL SUR L'INTERACTION CYT C – CL

Une des conséquences de l'activité peroxydase de l'association cyt *c*-CL serait la peroxydation des chaînes grasses insaturées portées par le CL (Tyurina et al. 2006; Kagan et al. 2009).

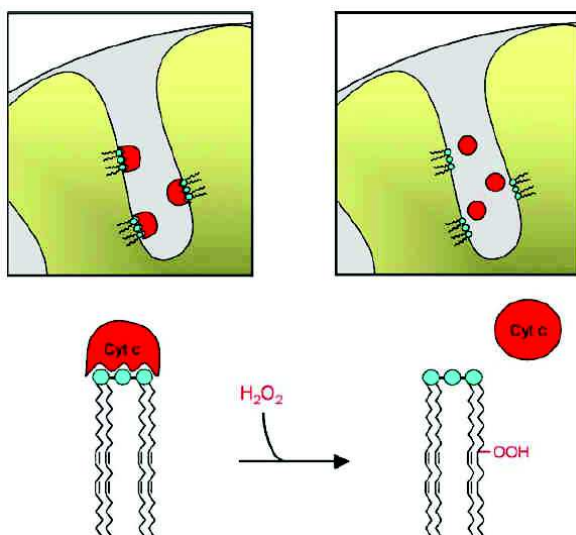


Figure P.3 : Modèle expliquant le relargage de cyt *c* des membranes mitochondriales dû à la peroxydation des chaînes du CL.

Le test de phospholipides peroxydés déposés sur une électrode de GC par la technique mise au point dans le cadre de mes travaux serait un élément intéressant pour mieux comprendre les mécanismes de relargage du cyt *c* suite à une peroxydation des chaînes du cyt *c*. Récemment, les études autour de la peroxydation des chaînes du CL ont acquis un certain intérêt suite à l'implication de ce processus de peroxydation dans le phénomène de vieillissement ou de la signalisation mitochondriale par les ROS (Paradies et al. 2011).

## UTILISATION DU CL COMME GREFFAGE DE SILICE

Le cyt *c* de bivalve aurait dû être purifié en vue de ces essais. La composition unique en AG 22:6 chez les bivalves épigés aurait apporté une pierre de plus à l'hypothèse d'une spécificité de structure entre cyt *c* et CL.

Une collaboration avec Fabienne Guérard, professeur au laboratoire des sciences de l'environnement marin de l'IUEM (Institut Universitaire de l'Environnement Marin) à Plouzané a permis d'initier un protocole de purification de cyt *c* à partir de tissus d'huître. Ce protocole n'a malheureusement pas abouti au terme de la thèse.

Toutefois, ces essais de purification de cyt *c* de bivalve ont permis d'entrevoir une application potentielle de l'interaction spécifique cyt *c* – CL pour un nouveau type de purification de cyt *c*. En effet, la purification de cyt *c* par des techniques classiques est bien documentée et fait intervenir des étapes successives de purification par colonne de silice et de précipitation fractionnée des protéines par des sels de sulfate d'ammonium. Les premières étapes de cette purification sont rapides à effectuer et permettent de séparer d'un homogénat de tissus toutes les protéines solubles chargés positivement. Les étapes suivantes sont plus longues et plus le cyt *c* est purifié lors de ces étapes, plus le rendement chute.

Il nous est alors apparu qu'une des applications potentielles de l'utilisation de l'interaction entre cyt *c* et CL pourrait concerner la création d'une microcolonne de purification de cyt *c* composée de silice greffée au CL. L'expérience consiste à déposer du CL sur une microcolonne de silice (6% massique d'eau) dans un solvant de type 98:2 CHCl<sub>3</sub>:MeOH. La silice fixe alors les molécules de CL. La silice est ensuite séchée. Enfin, une solution aqueuse de cyt *c* a été éluée sur cette microcolonne.

Comparée à une microcolonne non modifiée au CL, seule celle greffée avec du CL 18:2 a permis d'immobiliser le cyt *c*. Ces résultats préliminaires sont encourageants et mériteraient une étude à part entière afin de valider la spécificité d'une microcolonne greffée au CL pour le cyt *c* dans un homogénat de protéines solubles chargées positivement.



## RÉFÉRENCES

- Ascenzi, P., F. Polticelli, M. Marino, R. Santucci and M. Coletta **2011**. "Cardiolipin drives cytochrome c proapoptotic and antiapoptotic actions." *IUBMB Life* 63(3): 160-165.
- Ataka, K., F. Giess, W. Knoll, R. Naumann, S. Haber-Pohlmeier, B. r. Richter and J. Heberle **2004**. "Oriented Attachment and Membrane Reconstitution of His-Tagged Cytochrome c Oxidase to a Gold Electrode: In Situ Monitoring by Surface-Enhanced Infrared Absorption Spectroscopy." *Journal of the American Chemical Society* 126(49): 16199-16206.
- Burgess, J. D., M. C. Rhoten and F. M. Hawkridge **1998**. "Cytochrome c Oxidase Immobilized in Stable Supported Lipid Bilayer Membranes." *Langmuir* 14(9): 2467-2475.
- Heineman, W. R., T. Kuwana and C. R. Hartzell **1972**. "Indirect electrochemical titration of beef heart cytochrome oxidase." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 49(1): 1-8.
- Kagan, V. E., H. I. A. Baylr, N. A. Belikova, O. Kapralov, Y. Y. Tyurina, V. A. Tyurin, J. Jiang, D. A. Stoyanovsky, P. Wipf, P. M. Kochanek, J. S. Greenberger, B. Pitt, A. A. Shvedova and G. Borisenko **2009**. "Cytochrome c/cardiolipin relations in mitochondria: a kiss of death." *Free Radical Biology and Medicine* 46(11): 1439-1453.
- Lewis, K. L., L. Y. Su, F. M. Hawkridge, K. R. Ward and M. C. Rhoten **2006**. "Immobilization of cytochrome c oxidase into electrode-supported lipid bilayer membranes for in vitro cytochrome c sensing." *Ieee Sensors Journal* 6(2): 420-427.
- Paradies, G., G. Petrosillo, V. Paradies and F. M. Ruggiero **2011**. "Mitochondrial dysfunction in brain aging: Role of oxidative stress and cardiolipin." *Neurochemistry International* 58(4): 447-457.
- Tyurina, Y. Y., V. Kini, V. A. Tyurin, I. I. Vlasova, J. Jiang, A. A. Kapralov, N. A. Belikova, J. C. Yalowich, I. V. Kurnikov and V. E. Kagan **2006**. "Mechanisms of Cardiolipin Oxidation by Cytochrome c: Relevance to Pro- and Antiapoptotic Functions of Etoposide." *Molecular Pharmacology* 70(2): 706-717.
- Wang, G.-X., Y. Qian, X.-X. Cao and X.-H. Xia **2012**. "Direct electrochemistry of cytochrome c on a graphene/poly (3,4-ethylenedioxythiophene) nanocomposite modified electrode." *Electrochemistry Communications* 20(0): 1-3.
- Wang, Y., X. Bian, L. Liao, J. Zhu, K. Guo, J. Kong and B. Liu **2012**. "Electrochemistry and biosensing activity of cytochrome c immobilized on a mesoporous interface assembled from carbon nanospheres." *Microchimica Acta* 178(3): 277-283.

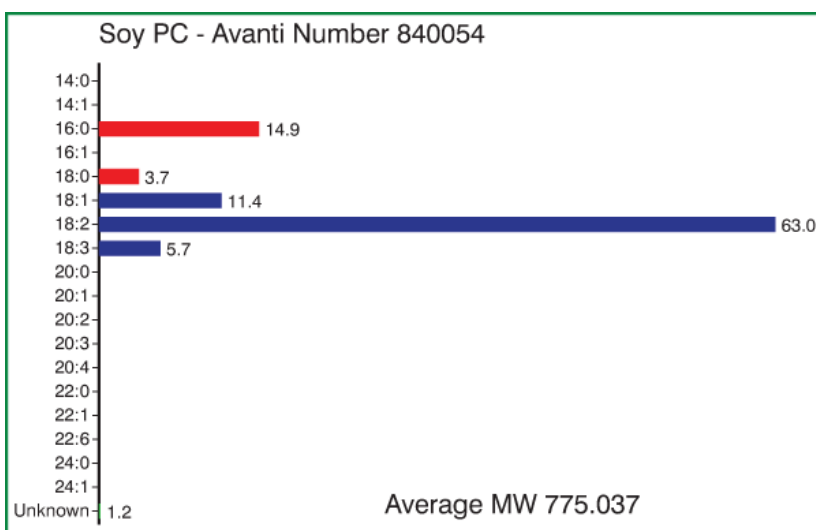
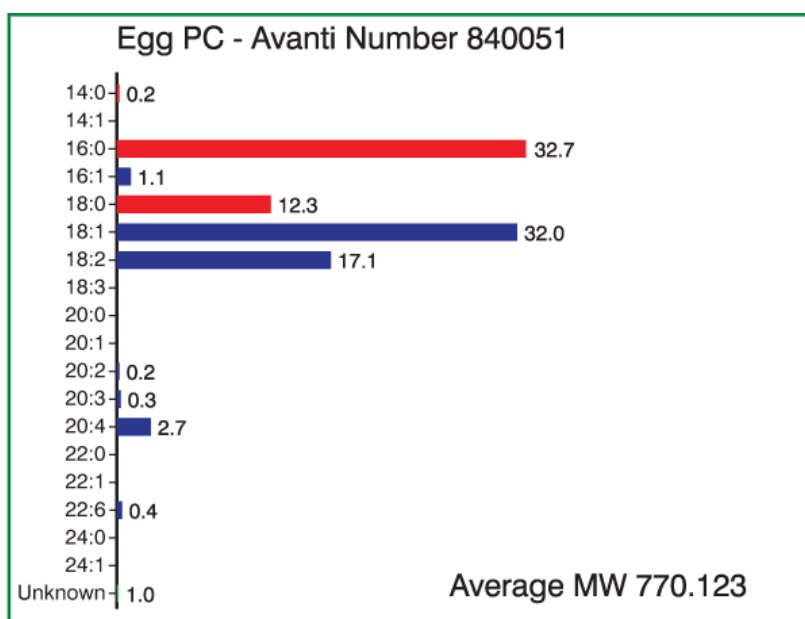


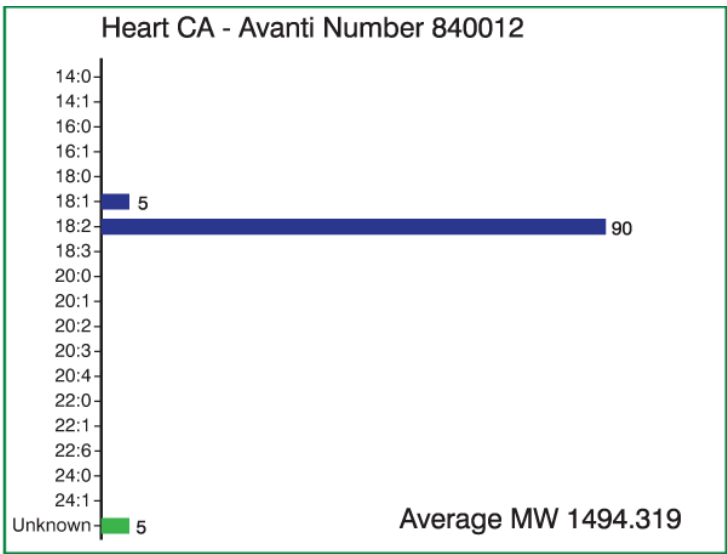
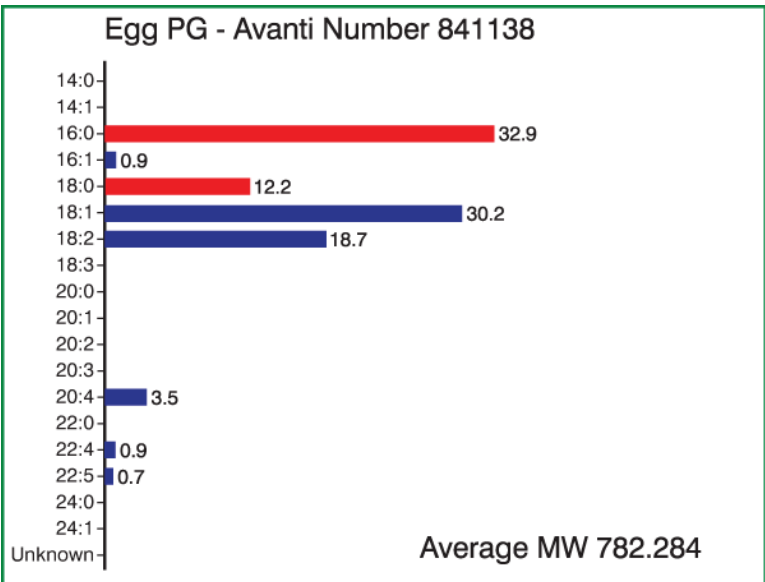
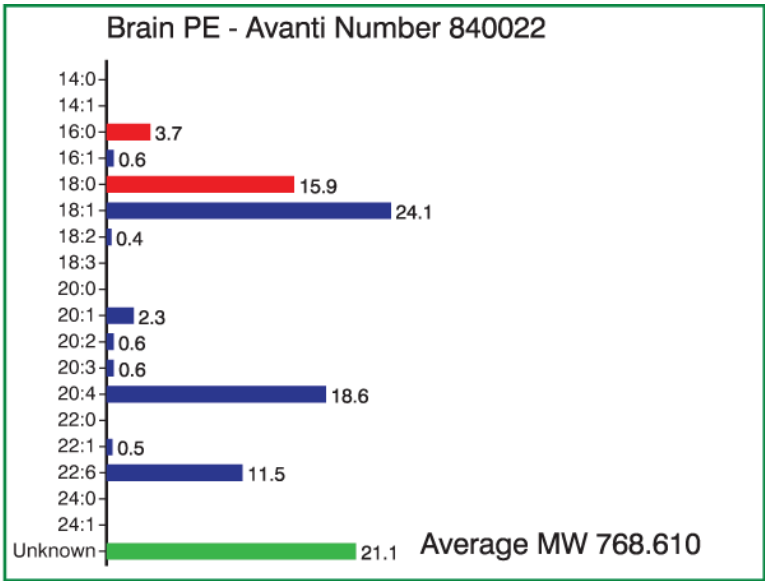


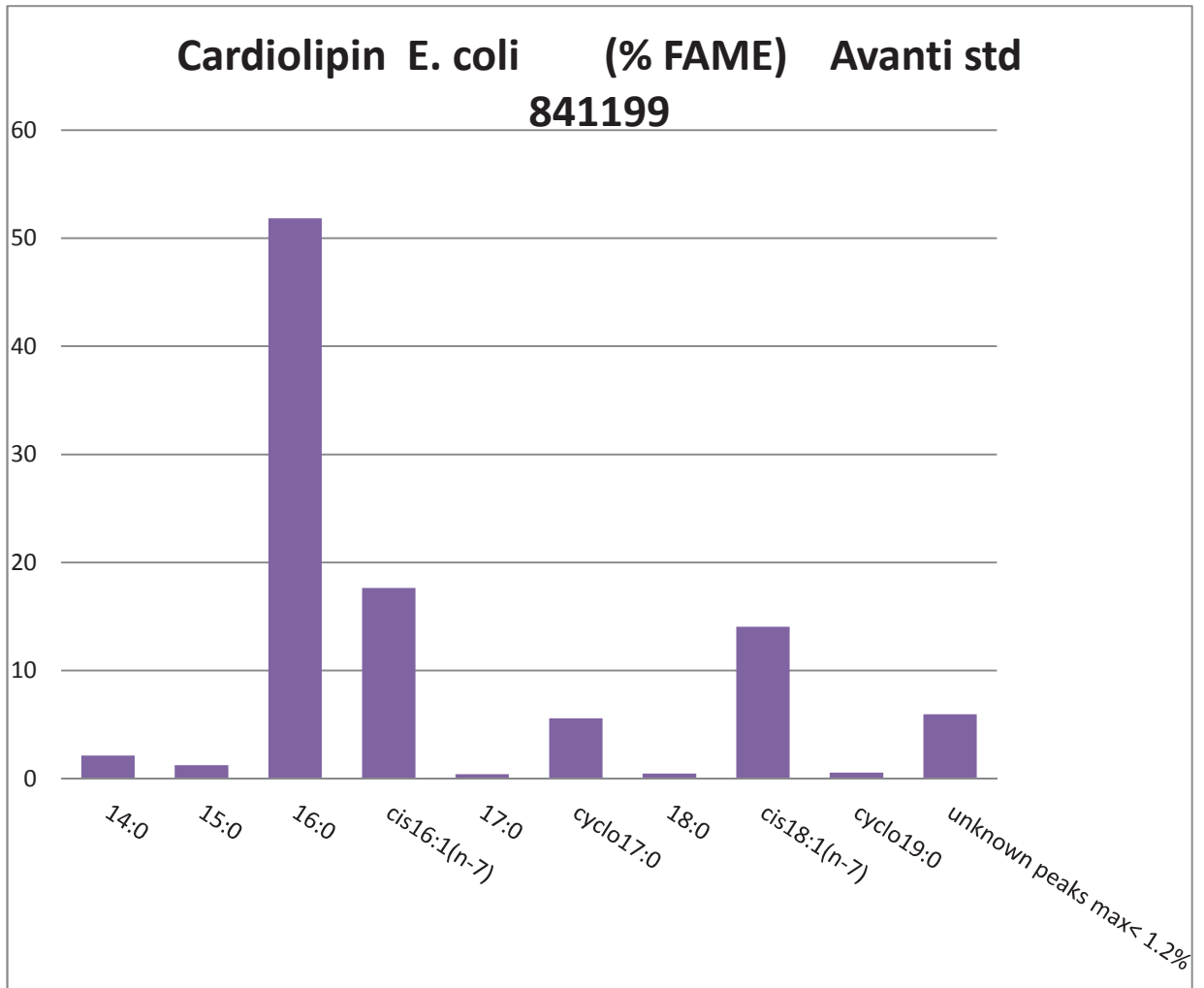
## ANNEXES

## COMPOSITION EN AG DES DIFFERENTES SOURCES DE PHOSPHOLIPIDES

Les classes de phospholipides issus d'extraction de tissu biologiques présentent généralement une forte diversité en AG. La composition en AG de phospholipides naturels utilisés pour ces travaux est détaillée ci-dessous.







Composition en AG du CL E.coli d'Avanti Polar Lipids caractérisé au laboratoire.

## PARAMETRES DE DOSAGE DES PHOSPHOLIPIDES PAR CPG

La CPG est une technique d'analyse puissante pour caractériser et doser les méthylester d'acides gras. Ces méthylesters sont produits par la transmétylation des phospholipides (Chapitre 2). Le dosage des AG seul implique le fait de calculer la masse initiale de phospholipides en y rajoutant celle de la tête polaire. On utilise pour cela un ratio masse totale de phospholipides / masses des AG qui est propre à chaque espèce moléculaire et chaque mélange « naturel » en AG.

AG	R-C=O	R-COO-
14:0	211.4	227.4
16:0	239.4	255.4
18:0	267.5	283.5
18:1	265.5	281.5
18:2	263.4	279.4
18:3	261.4	277.4
20:5	286.5	302.5
22:0	323.6	339.6
22:6	311.5	327.5
Soybean	259.9	275.9
Egg yolk	257.1	273.1

	sel sodique	forme acide
CL	440.14	396.18
PG	266.12	244.14
PC	277.21	255.21
PE	235.13	213.13
PA	192.04	170.05

Masse moyenne des AG de différentes compositions (tableau à gauche) et masse molaire de têtes polaires de différentes classes de phospholipides (tableau à droite).

## PROTOCOLE DE REDUCTION DU CYTOCHROME C

Prélever 600 $\mu$ L dans un tube eppendorf à partir de 10 mL de la solution-mère de cyt c 600 $\mu$ M. Y rajouter quelques cristaux de dithionite (hydrosulfite de sodium) pour en faire une solution 100% réduite (la solution passe du brun-orange au rose saumon). Lire la densité optique de 180 $\mu$ L de tampon et 20 $\mu$ L de cyt c 600 $\mu$ M (solution-mère) à 550nm et noter la valeur d'absorbance. Ensuite lire de la même façon la DO de la solution 100% réduite. Puis rajouter de petits volumes (50 $\mu$ L par exemple) de la solution 100% réduite à la solution mère de cyt c. Suivre la réduction du cyt c en lisant la DO à 550nm. Il faut obtenir entre 90 et 95% de l'absorbance de la solution 100% réduite pour avoir une bonne réduction sans excès d'agent réducteur. Après réduction, le cyt c peut être stocké à  $-80^{\circ}\text{C}$  pendant plusieurs mois.

# Interfaces électrochimiques pour l'étude de composés d'intérêt biologique: étude de l'interaction entre le cytochrome c et le cardiolipide

## Résumé

L'objectif de cette thèse était de mettre au point une interface électrochimique afin de caractériser les interactions entre le cytochrome c (cyt c), une protéine mitochondriale, et le cardiolipide (CL), un phospholipide présent dans les membranes des mitochondries. Le cyt c, dont la fonction est le transport d'électrons dans la chaîne respiratoire, est connu pour interagir avec le CL. Précédemment, un mécanisme d'accroche du cyt c sur une membrane contenant du CL a été mis en évidence par la théorie de l'« extended lipid anchorage ». Cette théorie prévoit, outre des interactions électrostatiques entre le CL (chargé négativement) et le cyt c (chargé positivement), des interactions hydrophobes issues de l'insertion d'une chaîne grasse du CL dans le cyt c. La nature particulière de la partie hydrophobe du CL, quatre chaînes grasses dont la composition est très homogène, nous a amené à émettre des hypothèses sur la présence d'interactions spécifiques entre le cyt c et différents types de chaînes du CL.

Dans le cadre de mes travaux, des techniques électrochimiques ont été utilisées pour étudier ces interactions. Une électrode de carbone vitreux a été modifiée par un dépôt de phosphatidylcholine (PC) et de CL en proportion 80/20 (mol/mol). Cette électrode modifiée au CL permet l'étude de l'électrochimie du cyt c. Nous avons montré que l'électroactivité du cyt c nécessite la présence de CL sur l'électrode modifiée, le cyt c étant électroinactif sur une électrode modifiée uniquement avec de la PC. De plus, le CL permet de retenir le cyt c à la surface de l'électrode. C'est la première fois que l'effet de « lipid anchorage » a été identifié sur une électrode modifiée.

Une méthode électrochimique plus adaptée à l'étude des protéines adsorbées (AC voltamétrie) a été utilisée afin de caractériser les cinétiques de transfert électronique du cyt c. Par cette méthode, deux sous-populations de cyt c adsorbés ont été caractérisées. La sous-population 1 de cyt c, qui est majoritaire, possède un potentiel redox proche du potentiel du cyt c en solution (0V vs SCE). Sa vitesse de transfert électronique est de l'ordre de  $20\text{s}^{-1}$ . La sous-population 2, qui compte pour environ 10% du cyt c adsorbé total, possède un potentiel décalé vers les valeurs négatives (-0.15V vs SCE) et une vitesse de transfert électronique supérieure à la sous-population 1 (environ  $500\text{s}^{-1}$ ).

Afin de mieux cerner le type d'interaction dans ces deux sous-populations, l'effet d'une solution de forte force ionique (0.5M KCl), du pH, du calcium, de la classe de phospholipide ou de l'origine du cyt c a été testé. Ces expériences ont démontré que la sous-population 1 comporte des interactions de type électrostatiques et nécessite la présence d'un phospholipide ayant un motif glycérol terminal (comme le CL ou la PG). La nature de l'interaction protéine-lipide pour la sous-population 2 est plus complexe. Elle est sensible aux cations divalents ou au pH mais insensible aux fortes forces ioniques, laissant supposer la présence d'interactions de type hydrophobe.

Les essais réalisés avec du cyt c de levure laissent entrevoir qu'il existe des spécificités entre cette protéine et les phospholipides d'un même organisme. La purification de cyt c de bivalve permettra d'avancer pour valider cette hypothèse.

**Mots clés :** *Cardiolipide, Electrochimie, Biocapteur, Electrode modifiée, Interactions protéine-lipide, Chimie des lipides, AC voltamétrie, Cytochrome c, Apoptose.*



# Electrochemical interface for studying compounds of biological interest: application to the interaction between cytochrome c and cardiolipin

## Abstract

The main goal of this thesis was to set up an electrochemical interface in order to characterize interactions between cytochrome c (cyt c), a mitochondrial protein, and cardiolipin (CL), a phospholipid localized to the mitochondrial membrane. The cyt c, whereas the main function is to carrying electrons along the respiratory chain, is known to interact with CL. Previously, a mechanism of cyt c retention onto a CL containing membrane was highlighted by the « extended lipid anchorage » theory. This theory imply, with electrostatic interactions between CL (negatively charged) and cyt c (positively charged), the presence of hydrophobic interaction likely emanating from the insertion of an acyl chain of CL into the cyt c interior. The specificity of the hydrophobic moiety of CL, constituted of four similar chains lead us to make hypothesis about specific interactions between cyt c and acyl chains of CL. Attention have been made to the bivalves CL acyl chains carrying unique composition of 80% DHA chains.

Electrochemicals techniques have been used to study these interactions. A glassy carbon has been modified with a deposit by spin-coating of phosphatidylcholine (PC) and CL in 80/20 ratio (mol/mol). This CL modified electrode allows the study of the cyt c electrochemistry. Firstly, we showed that electroactivity of cyt c require the presence of CL onto the modified electrode meaning cyt c isn't electroactive on a modified electrode with PC only.

In add, CL allows retaining cyt c onto the electrode surface. It is the first time that this lipid anchorage has been identified on a modified electrode.

Electrochemical methods adapted to the study of adsorbed protein (AC voltametry) have been used in order to characterize the electrode transfer kinetics of cyt c. With these methods, two sub-populations of adsorbed cyt c have been characterized. The major part of cyt c, called sub-population 1, has a redox potential close to the formal potential of the native protein (around 0V vs SCE). Electron transfer rate is in the range of 20s<sup>-1</sup>. The subpopulation 2, counting for ~10% of the total adsorbed cyt c, hold a negative shifted potential around -0.15V vs SCE and a faster electron transfer rate (~500s<sup>-1</sup>). To understand the nature of the interaction for the two subpopulations, the effect of an high ionic strength solution (0.5M KCl), pH, calcium, phospholipids classes or cyt c sources have been assayed. These tests shows that subpopulation 1 have electrostatics interactions and require the presence of a phospholipid holding a terminal glycerol pattern like PG or CL.

The nature of the protein-lipid interaction in the case of the subpopulation 2 is more complex. It is more sensitive to the presence of divalent cation or pH but high ionic strength solution doesn't affect it. This could be explained by hydrophobic interactions between lipid and the cyt c.

The assays realized with cyt c from yeast let foresee specificity between these protein and the phospholipids carried by the same organism. The purification of bivalve cyt c could be a progress in order to validate this hypothesis.

**Key-words** : Cardiolipin, Electrochemistry, Biocaptor, Modified electrod, protein-lipid interactions, lipid Chemistry, AC voltammetry, Cytochrome c, Apoptosis.