



Modélisation de l'orientation d'enzymes adsorbées sur surface d'électrode pour la production d'énergie verte

Nicolas Bourassin

► To cite this version:

Nicolas Bourassin. Modélisation de l'orientation d'enzymes adsorbées sur surface d'électrode pour la production d'énergie verte. Chimie théorique et/ou physique. Université Paris Cité, 2021. Français. NNT : 2021UNIP7106 . tel-03703666

HAL Id: tel-03703666

<https://theses.hal.science/tel-03703666>

Submitted on 24 Jun 2022

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

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

Université de Paris

École doctorale Chimie Physique et Chimie Analytique de Paris-Centre
ED388

Laboratoire de Biochimie Théorique (LBT - UPR 9080)

Modélisation de l'orientation d'enzymes adsorbées sur surface d'électrode pour la production d'énergie verte

Par Nicolas Bourassin

Thèse de doctorat de Chimie théorique et modélisation

Dirigée par Sophie Sacquin-Mora (CR)
Et par Marc Baaden (DR)

Présentée et soutenue publiquement le 19 juillet 2021

Devant un jury composé de :

Pr Tâp Ha-Duong, Université Paris-Saclay (PU), rapporteur, président du jury
Pr Bernard Offmann, Université de Nantes (PU), rapporteur
Dr Christelle Yéronomahos, École Centrale de Lyon (MCU), examinatrice
Dr Florent Barbault, Université de Paris (MCU), membre invité

Jury et rapporteurs

Commission d'examen formée par :

Pr Tâp Ha-Duong	Rapporteur
Pr Bernard Offman	Rapporteur
Dr Christelle Yeromonahos	Examinatrice
Dr Sophie Sacquin-Mora	Directrice de thèse
Dr Marc Baaden	Codirecteur de thèse et directeur du laboratoire
Dr Florent Barbault	Examineur invité

Date de soutenance : 19 juillet 2021

Résumé

Version française

Le sujet principal de ce travail de thèse est la modélisation d'enzymes adsorbées sur une surface métallique fonctionnalisée par une monocouche auto-assemblée (ou SAM) afin d'améliorer des dispositifs de production d'énergie renouvelable, tels que les biopiles à combustibles. Dans le cadre du projet ANR ENZYMOR (en collaboration avec l'équipe Bioénergétique et Ingénierie des Protéines – UMR 7281 – Marseille dirigée par Elisabeth Lojou ; ainsi que l'équipe Chimie Biologie des Membranes et Nano-objets – UMR 5248 – Bordeaux dirigée par Sophie Lecomte), j'ai mené cette étude au sein de l'équipe du Laboratoire de Biochimie Théorique via des approches théoriques incluant dynamique moléculaire classique et dynamique brownienne.

Premièrement, les simulations effectuées visaient à établir un protocole afin d'identifier les orientations probables d'enzymes adsorbées de façon stable. Deuxièmement, l'analyse des trajectoires obtenues m'a permis de mettre en évidence la nécessité de trouver un compromis entre une stabilité d'adsorption élevée et l'impact sur la fonction catalytique de l'enzyme. La dynamique moléculaire tout-atome et la modélisation à l'échelle gros-grain par réseau de ressorts sont deux approches complémentaires. En effet, la dynamique moléculaire tout-atome permet de déterminer l'orientation d'adsorption d'une protéine sur une surface inorganique et donc quels sont ses acides aminés interagissant avec ladite surface. Cette information est nécessaire pour mettre en oeuvre la modélisation à l'échelle gros-grain par réseau de ressorts, qui quant à elle permet de vérifier si la configuration d'adsorption de la protéine est susceptible de perturber sa mécanique interne et ainsi de mettre en péril son activité catalytique.

Les informations obtenues à l'échelle de la protéine via cette méthodologie multi-échelle sont destinées à être complémentaires des données expérimentales afin de mieux connaître le système étudié, et de proposer des ajustements pour améliorer les dispositifs de production d'énergie renouvelable.

Mots-clés en français :

Modélisation ; chimie théorique ; énergies renouvelables ; étude multi-échelle ; enzyme ; surface inorganique ; SAM

English version

The primary subject of this thesis work is the modelling of enzymes adsorbed on a functionalized metallic surface in order to improve sustainable energy producing devices, such as biofuel cells. In the framework of ENZYMOR ANR ((in collaboration with the team Bioénergétique et Ingénierie des Protéines – UMR 7281 – Marseille directed by Elisabeth Lojou; and the team Chimie Biologie des Membranes et Nano-objets – UMR 5248 – Bordeaux) project, I conducted this study at the Laboratoire de Biochimie Théorique (Laboratory of Theoretical Biochemistry) using theoretical approaches including classical molecular dynamics and Brownian dynamics.

Firstly, the conducted simulations aimed to establish a protocol to identify the likely stable orientations of adsorbed enzymes. Secondly, the analysis of obtained trajectories allowed me to highlight the trade-off between a high stability of adsorption and the impact on enzyme's catalytic function. All-atom molecular dynamics and coarse-grain spring-network modeling are two complementary approaches. Indeed, all-atom molecular dynamics allows to determine the adsorption orientation of a protein on an inorganic surface and thus which amino acids interact with this surface. This information is necessary to implement the coarse-grain spring-network modeling, which in turn allows us to verify whether the adsorption configuration of the protein is likely to disrupt its internal mechanics and thus jeopardize its catalytic activity.

The data obtained at the protein scale via this multi-scale methodology are intended to be complementary to the experimental data in order to better understand the studied system, and to propose adjustments to improve the renewable energy production devices.

Keywords in English :

Modeling; theoretical chemistry; renewable energies; multi-scale study; enzyme; inorganic surface; SAM

Remerciements

Je tiens à remercier ma directrice de thèse Sophie Sacquin-Mora ainsi que mon co-directeur Marc Baaden pour leur encadrement et leurs précieux conseils tout au long de ma thèse.

Je remercie également les membres jury pour avoir accepté de consacrer du temps afin de juger ma thèse.

Je suis aussi reconnaissant envers mes collègues de travail pour leur bonne humeur et leurs discussions enrichissantes au cours de ces trois ans au laboratoire. Merci aussi à notre gestionnaire Victoria Terziyan pour sa disponibilité et son entrain à accueillir les nouveaux arrivants. Je n'oublie pas l'aide apportée sur divers aspects techniques par Florent Barbault, Yves Dapra, Jérôme Hénin, Geoffrey Letessier, Charles Robert, Hubert Santuz.

L'Agence Nationale de la Recherche (ENZYMO-ANR-16-CE05-0024) et par le programme d'Initiative d'Excellence (« DYNAMO », ANR-11-LABX-0011-01) ont contribué au financement de ma thèse.

Table des matières

Liste des abréviations employées.....	7
I. Introduction.....	9
I.1 Protéines et enzymes.....	9
I.2 Étude des interactions entre protéines et surfaces.....	12
I.3 Types de surfaces utilisées et type d'immobilisation.....	14
I.4 Apport des SAM.....	15
I.5 Enzymes adsorbées et biopiles.....	16
I.6 Projet ENZYMOR et conception de biopiles.....	18
I.7 Objectifs de la thèse.....	22
II. Matériel et méthodes.....	23
II.1 Dynamique moléculaire classique.....	23
II.2 Modèle gros-grain et dynamique brownienne.....	47
III. Étude multi-échelle de la β -glucosidase A de <i>Clostridium cellulosovorans</i>	57
III.1 Choix de la β -glu comme protéine modèle.....	57
III.2 Orientations initiales de la β -glu.....	60
III.3 Visualisation des trajectoires.....	64
III.4 Stabilité conformationnelle de la β -glu.....	68
III.5 Position de la β -glu au cours des trajectoires.....	73
III.6 Orientation de la β -glu au cours des trajectoires.....	83
III.7 Propriétés mécaniques de la β -glu confinée en présence d'une surface d'or fonctionnalisée par une SAM-OH.....	100
III.8 Discussion et conclusions préliminaires.....	106
IV. Modélisation Gros-Grain de l'adsorption de protéines sur des surfaces solides.....	109
V. Conclusion et perspectives.....	119
V.1 Étude multi-échelle de la β -glucosidase A de <i>Clostridium cellulosovorans</i>	119
V.2 Modélisation Gros-Grain de l'adsorption de protéines sur des surfaces solides.....	124
V.3 Contribution aux études expérimentales.....	125
VI. Annexes.....	127

Liste des abréviations employées

AFM : microscope à force atomique, permettant la visualisation du relief d'une surface.

Cryo-EM : Cryo-Microscopie Électronique, technique permettant la détermination de la structure tridimensionnelle de macromolécules.

ELISA : (ou Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) dosage d'immunoabsorption via enzyme liée, méthode immuno-enzymatique permettant le dosage d'une molécule antigénique présente dans un échantillon.

équipe BIP : équipe Bioénergétique et Ingénierie des Protéines – UMR 7281 – Marseille.

équipe CBMN : équipe Chimie Biologie des Membranes et Nano-objets – UMR 5248 – Bordeaux.

équipe LBT : équipe du Laboratoire de Biochimie Théorique – UPR 9080 – Paris.

MCO : (ou Multi-Copper Oxidases) oxydases dotées de plusieurs centres métalliques sous forme d'ions cuivre.

PM-IRRAS : (ou Polarization Modulation InfraRed Reflection Absorption Spectroscopy) technique expérimentale basée sur la réflexion de rayons infrarouges polarisés sur une surface d'or, le spectre réfléchi par la surface est ensuite étudié pour mesurer les orientations des molécules adsorbées.

QM/MM : (ou quantum mechanics/molecular mechanics), approche de simulation décrivant une partie du système au niveau quantique et le reste du système en représentation adaptée à une dynamique moléculaire classique.

SAM : (ou Self Assembled Monolayer) monocouche auto-assemblée, assemblage moléculaire spontané formé par adsorption de molécules organiques sur une surface.

RMN (spectroscopie) : Spectroscopie par Résonance Magnétique Nucléaire, technique permettant la détermination de la structure tridimensionnelle de macromolécules, notamment en solution.

RMSD : Root Mean Square Deviation, ou racine de l'écart quadratique à la moyenne. Une variation du RMSD d'une protéine lors d'une dynamique moléculaire indique un changement majeur de sa structure tridimensionnelle.

smFRET (imagerie) : « single molecule Förster Resonance Energy Transfer », ou transfert d'énergie entre fluorophores (décrit par Theodor Förster en 1946) appliqué à l'échelle de la molécule. Technique expérimentale permettant l'étude de la dynamique d'une protéine.

TED : Transfert Électronique Direct, les électrons sont transférés directement entre le site catalytique et la surface fonctionnalisée de l'électrode. Type supposé optimal de transfert électronique.

TEM : Transfert Électronique Médié, les électrons sont transférés indirectement entre le site catalytique et la surface fonctionnalisée de l'électrode et transitent via des molécules du solvant. Type supposé suboptimal de transfert électronique.

TNC : (ou TriNuclear Copper cluster) centre métallique formé par trois ions cuivres maintenus groupés par des histidines adjacentes.

I. Introduction

I.1 Protéines et enzymes

Les protéines sont des unités fonctionnelles biologiques partagées par tous les organismes vivants : archées, procaryotes, eucaryotes, unicellulaires ou pluricellulaires. Ces macromolécules sont formées par une séquence d'acides aminés reliés par des liaisons peptidiques (cf Figure 1). Cependant, les protéines et leurs fonctions ne sont pas réductibles à des séquences linéaires ; premièrement puisqu'il s'agit de molécules tridimensionnelles au repliement spécifique, et deuxièmement puisqu'il ne s'agit pas de molécules figées mais possédant au contraire une flexibilité. Cette flexibilité est présente à l'échelle de la chaîne latérale des résidus (par exemple conditionnant l'ouverture ou la fermeture d'un canal interne) ou encore à l'échelle de mouvements collectifs de grande ampleur concernant une grande portion de la protéine (par exemple des cas d'allostérie conditionnant l'accès au site actif par des ligands de grande taille, cf Figure 2). Dans ces deux cas, la flexibilité de la protéine lui permet donc d'assurer sa fonction.

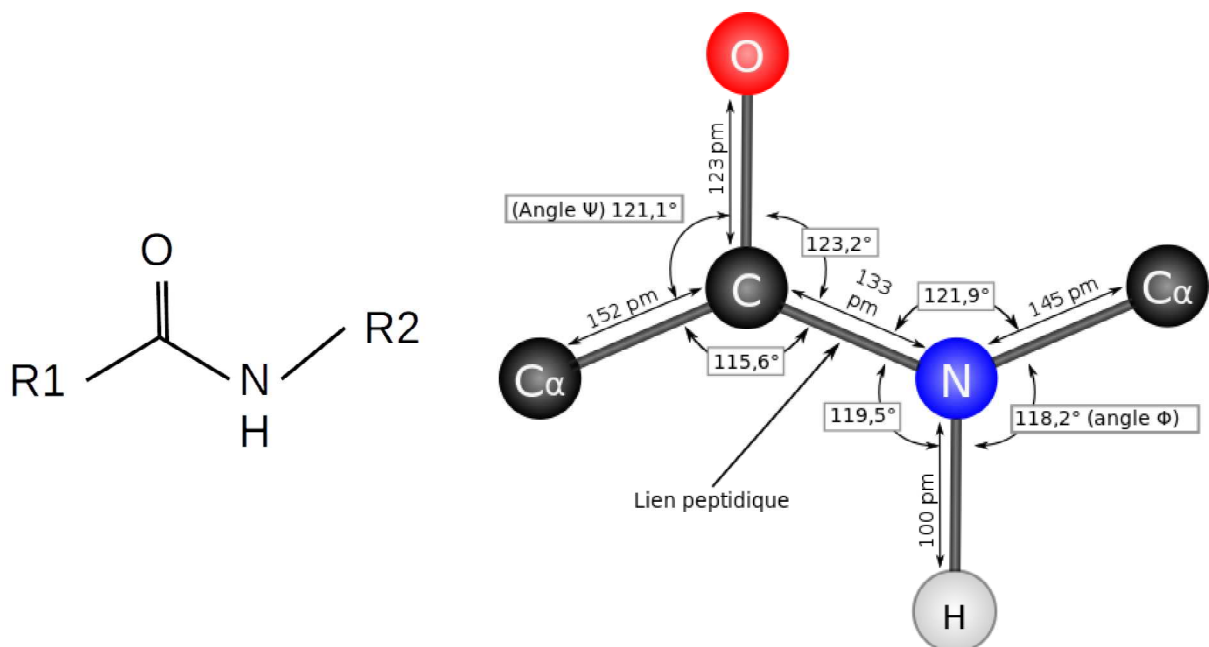


Figure 1 Liaison peptidique ; à gauche, vue simplifiée : R1 et R2 représentant les chaînes latérales d'acides aminés consécutifs, la liaison peptidique reliant leurs carbones α respectifs annotés à droite $C\alpha$ (source : cf [1]).

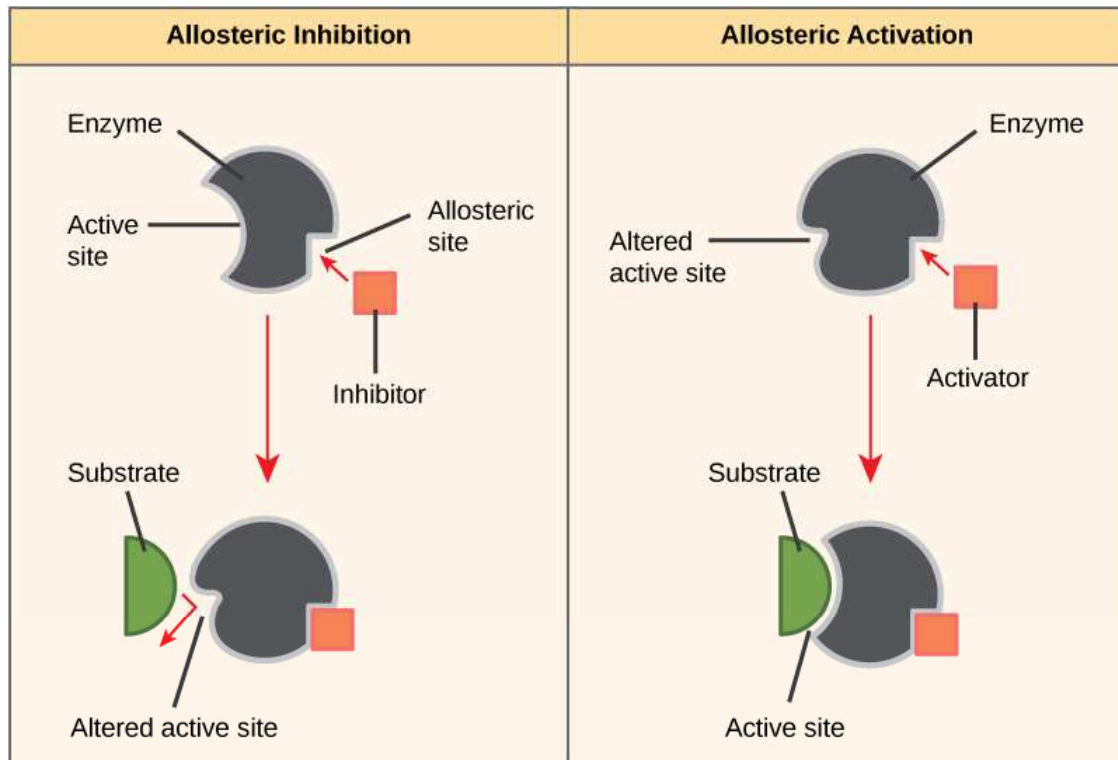


Figure 2 Mécanismes d’allostérie régulant l’accès du substrat au site actif :

Inhibition allostérique (à gauche) ; la géométrie initiale est propice à la fixation du substrat, la liaison d’un inhibiteur allostérique sur un site distant modifie la géométrie du site actif, entravant la fixation du ligand.

Activation allostérique (à droite) ; la géométrie initiale empêche la fixation du substrat, la liaison d’un activateur allostérique sur un site distant modifie la géométrie du site actif, permettant la fixation du ligand. (source : cf [2]).

Il est expérimentalement possible de purifier des protéines, de les détecter de façon spécifique (par exemple par technique ELISA [3][4][5][6][7][8][9][10][11]), et de déterminer leurs structures tridimensionnelles par cristallographie aux rayons X, par spectroscopie RMN ou encore par cryo-EM. Les théoriciens peuvent ensuite s’appuyer sur ces structures afin de modéliser par des simulations numériques la dynamique des protéines en solution. L’analyse des données issues de ces techniques de simulations numériques permet d’énoncer des hypothèses sur le comportement dynamique de macromolécules en solution (dans notre cas des protéines). Ces hypothèses permettent d’aiguiller les études expérimentales, qui valident ou non les hypothèses énoncées par modélisation. Ainsi la modélisation théorique des systèmes est une approche complémentaire aux études expérimentales dans le domaine de la biologie structurale.

Les enzymes sont un sous-ensemble de protéines possédant une fonction de biocatalyseurs. Si l’ensemble des enzymes connues sont capables de catalyser une grande variabilité de réactions dans

diverses conditions physiques [12], chaque enzyme n'est capable de fonctionner que dans une gamme spécifique de températures. C'est pour cette raison qu'une enzyme exposée à des températures trop élevées se dépliera et perdra alors sa structure et sa fonction [13]. Les analyses des données produites par des approches théoriques – qui seront présentées en détail plus loin dans ce manuscrit – peuvent apporter des éléments supplémentaires quant à la raison précise d'une perte d'activité de ces enzymes constatée lors d'expériences *in vitro*. Une augmentation considérable du RMSD, c'est-à-dire de l'écart quadratique moyen des différents atomes de l'enzyme par rapport à leur position initiale, par exemple permettra de supposer un dépliement (local ou global) de la protéine. Ceci mènerait à une perte de la structure d'ensemble de la protéine et donc de sa fonction. Cependant, une enzyme peut également voir sa fonction impactée sans qu'une perte majeure de sa structure soit constatée. Par exemple, une occupation du site catalytique par un inhibiteur, une déformation locale impactant directement le site catalytique ou empêchant la circulation des substrats et produits entre le milieu extérieur et le site catalytique sont des causes possibles impactant la fonction catalytique. Dans ce cas, des analyses plus approfondies sont nécessaires afin d'expliquer l'origine de cette perte d'activité catalytique.

1.2 Étude des interactions entre protéines et surfaces

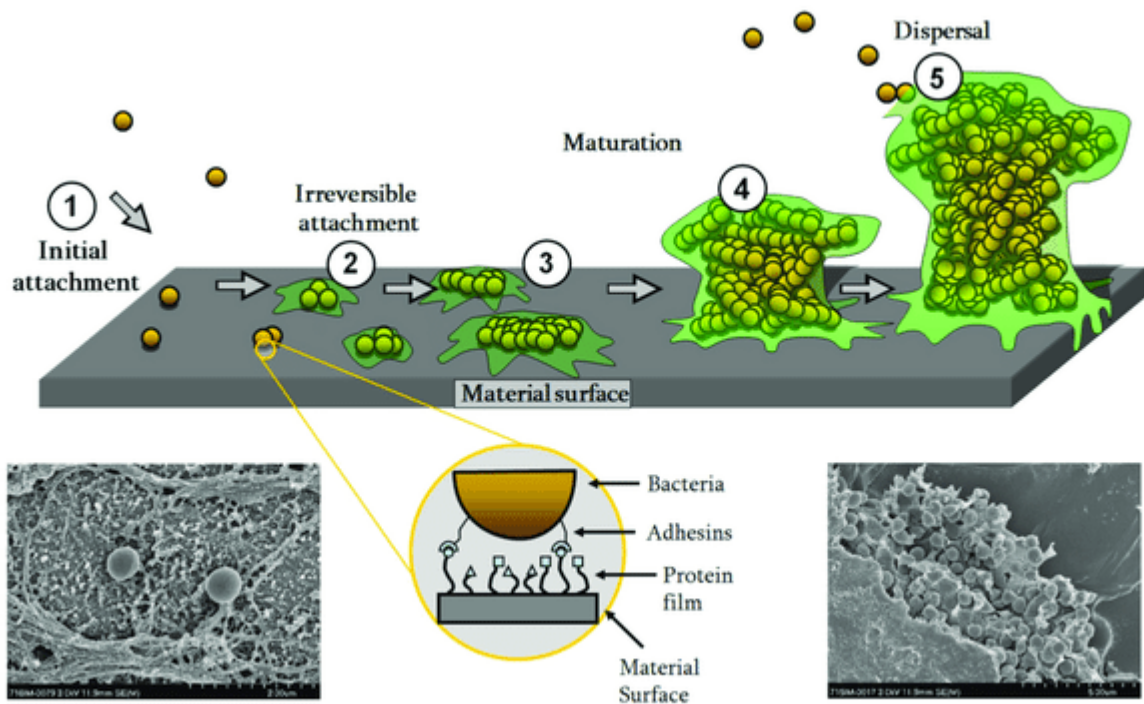


Figure 3 Formation d'un biofilm : le film initial de protéine permet l'ancrage initial des bactéries via leurs adhésines (protéines membranaires permettant l'adhésion) (source : cf [14]).

Il existe de nombreuses problématiques justifiant l'étude des interactions entre protéines et surfaces inorganiques. Certaines problématiques nécessitent de limiter autant que possible l'adsorption de protéines sur des surfaces ; certains organismes étant notamment capables de se fixer sur des surfaces métalliques (plateforme pétrolières, barrages, hydroliennes, coques de navires, mais aussi implants chirurgicaux tels que des prothèses, pacemakers etc.) [15]. Ces organismes sont capables de s'associer en communautés structurées, formant couche après couche un biofilm (cf Figure 3) extrêmement tenace, pouvant altérer le fonctionnement d'un dispositif (notamment en affectant l'hydrodynamisme dans le cas de barrages, hydroliennes ou coques de navires) [16]. Le biofilm protège non seulement les micro-organismes qui le composent des stress mécaniques, mais peut également leur conférer une résistance aux antibiotiques ou à une réponse immunitaire. Ceci peut sérieusement affecter la santé d'un patient dans le cas d'un biofilm se formant sur un implant chirurgical [17][18]. Dans ce cas de figure, il est nécessaire d'empêcher la fixation des protéines impliquées dans l'ancrage initial des organismes afin d'empêcher le développement du biofilm.

Mieux comprendre les mécanismes d'adsorption de ces protéines afin de pouvoir lutter contre cette adsorption est donc un enjeu économique, mais aussi médical afin de produire des surfaces « inertes » vis à vis de ces protéines.

D'autres problématiques concernent la compréhension et la facilitation de l'adsorption de protéines spécifiques sur des surfaces ; notamment lorsque l'objectif est de capturer des ligands spécifiques ayant une affinité avec ces protéines adsorbées. Par exemple, la méthode immuno-enzymatique ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*, ou « dosage d'immunoabsorption via enzyme liée ») [3] désigne plusieurs variantes d'une technique permettant la détection d'un antigène présent dans un échantillon. Ces différents protocoles ont pour point commun d'utiliser un ou plusieurs types d'anticorps se liant spécifiquement à l'antigène recherché. La présence de l'antigène est révélée par l'intermédiaire d'un signal mesurable généré par une enzyme produisant un chromophore ou fluorophore. Cette enzyme étant liée au complexe formé par l'antigène et un ou plusieurs types d'anticorps, l'intensité du signal permet également de déduire la quantité d'antigène présente dans le cas d'un protocole ELISA quantitatif [19]. Quelque soit le protocole ELISA utilisé, il est nécessaire de fixer sur un support rigide (plaque à puits multiples) l'antigène d'intérêt ou l'un des anticorps utilisés, et que cette adsorption résiste à de multiples étapes de rinçage au cours du protocole visant à éliminer les molécules n'interagissant pas. De plus, le support ne doit pas permettre l'adsorption de l'enzyme utilisée en fin de protocole pour générer le signal permettant le dosage de l'antigène ; dans le cas contraire un signal serait mesuré même en l'absence d'antigène. Le test ELISA est couramment appliqué dans le domaine médical, et est notamment utilisé dans certains tests sérologiques de dépistages du virus SARS-Cov2 [8][9][10][11], visant alors à détecter la présence d'une grande quantité d'anticorps ciblant les particules virales. Un test positif indique alors une réaction immunitaire du patient testé et permet de conclure à une contamination par le pathogène.

De façon plus générale, des protéines peuvent être utilisées en tant que bio-senseurs en étant fixées sur des surfaces métalliques afin de capturer et de révéler la présence d'un ligand spécifique [20][21][22].

1.3 Types de surfaces utilisées et type d'immobilisation

Comme exposé précédemment, l'étude de l'interaction entre protéines et surfaces débouche sur de nombreuses applications. Diverses surfaces peuvent être utilisées. Les surfaces de graphène par exemple ont été envisagées comme dispositifs biomédicaux (notamment dans l'administration ciblée de molécules thérapeutiques au sein du corps humain [23][24][25][26]), mais sa capacité à adsorber certaines protéines implique une cytotoxicité problématique liée à la perturbation de complexes protéiques [27][28]. Les surfaces de graphènes sont également employées dans la confection de biosenseurs, où les protéines de l'échantillon à étudier sont immobilisées de façon non-covalente via les interactions de van der Waals [29]. Il a aussi été démontré qu'il était possible de fixer de façon covalente des biomolécules sur des surfaces de graphène et d'oxyde de graphène dans le but de concevoir des dispositifs ayant une affinité sélective pour des protéines cibles prédéterminées [30][31]. Toutefois, les forces de van der Waals exercées sur les protéines adsorbées sur certaines surfaces inorganiques, telles que les surfaces de graphène, sont suffisamment importantes pour impacter la structure globale de certaines protéines adsorbées [32].

Plusieurs surfaces de silice ont également été envisagées pour l'immobilisation d'enzymes, notamment dans la conception de dispositifs biomédicaux [33]. L'adsorption d'une protéine globulaire sur une surface de quartz provoquait notamment le dépliement d'une partie des structures secondaires initialement organisées en feuillets- β , observé via l'étude de spectres infrarouges [34]. Encore une fois, l'interaction directe sur des surfaces artificielles rigides a donc des conséquences visibles sur la structure des protéines adsorbées.

L'immobilisation de protéines sur diverses surfaces ou nano-particules métalliques a également été envisagée, qu'il s'agisse de concevoir des biosenseurs [35], des dispositifs biomédicaux [36] ou encore d'utiliser les enzymes en tant que biocatalyseurs [37][38][39][40][41]. Les surfaces en questions pouvaient être constituées de chrome, titane, palladium ou d'or. Ici encore, certains exemples, tels que l'étude de l'adsorption de cytokines sur une surface de titane [36], montrent que s'il est possible d'obtenir une forte adhésion de protéines sur des surfaces artificielles, cette forte interaction avait souvent lieu au prix d'un impact négatif sur la fonction de l'enzyme [42].

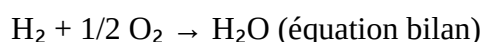
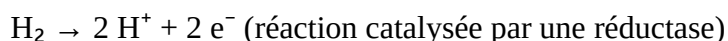
1.4 Apport des SAM

Les cas précédemment cités où l'adsorption de protéines sur une surface inorganique s'accompagnait d'un impact structural et par conséquent d'un impact fonctionnel [27][28][32][34][36] justifient la recherche d'interfaces permettant l'immobilisation des protéines tout en minimisant leur perte de fonction. Une approche possible est l'emploi d'une monocouche auto-assemblée (« Self Assembled Monolayer », abrégé SAM) formée de molécules tapissant la surface. L'usage de SAM permet ainsi non seulement de réduire l'impact sur la structure des protéines adsorbées [43], mais le choix de différentes SAMs permet également de moduler les propriétés physico-chimiques de la surface inorganique, et ainsi d'influer sur les orientations préférentielles de protéines adsorbées [44][45].

1.5 Enzymes adsorbées et biopiles

Il peut également s'agir d'utiliser l'activité d'enzymes afin de produire de l'énergie, que ce soit via la synthèse de biocarburant ou la production de courant électrique [17][46][47][48][49]. Nous nous intéressons ici à cette dernière problématique puisqu'elle est le point de départ de ma thèse.

Les oxydoréductases sont une famille d'enzymes catalysant des réactions d'oxydoréduction. Ces réactions impliquent des transferts d'électrons : les réductases catalysent l'oxydation du dihydrogène en tant que donneur d'électrons en protons, tandis que les oxydases catalysent la réduction du dioxygène comme accepteur d'électrons en eau. Ces réactions sont exprimables selon les équations suivantes :



En conditions physiologiques ce transfert d'électrons est inclus dans une chaîne réactionnelle du métabolisme des organismes utilisant ces enzymes. Les électrons produits par la réaction catalysée par la réductase, ou ceux nécessaires à la réaction catalysée par l'oxydase, sont transférés entre le site actif et le milieu extérieur de façon orientée grâce à des centres métalliques jouant le rôle de relais électroniques.

Les piles à combustible sont des dispositifs impliquant également la circulation d'électrons et la catalyse de réactions d'oxydoréduction ; les électrodes d'une telle pile étant des interfaces électrochimiques. Le fonctionnement des piles à combustible ne nécessite que des substrats communs ou productibles via la dégradation de déchets organiques (dihydrogène et dioxygène) et ne produit en fin de réaction que de l'eau. Les catalyseurs chimiques actuellement utilisés sont par contre composés de métaux rares, onéreux et difficilement recyclables (le plus fréquemment de platine [50][51][52]). Ces caractéristiques des catalyseurs composés de métaux rares entravent la conception d'un dispositif de stockage et production d'énergie « propre », et posent également des problèmes d'approvisionnement puisque la demande globale annuelle dépasse parfois

l'approvisionnement (cf Figure 4, la ligne brune représentant l'approvisionnement et l'histogramme la demande annuelle en platine).

Les oxydoréductases sont donc envisagées en tant que catalyseurs biologiques alternatifs, plus faciles à produire et à recycler. De tels dispositifs sont nommés biopiles à combustible, ou biopiles (cf Figure 5) [44][46][47][48][53].

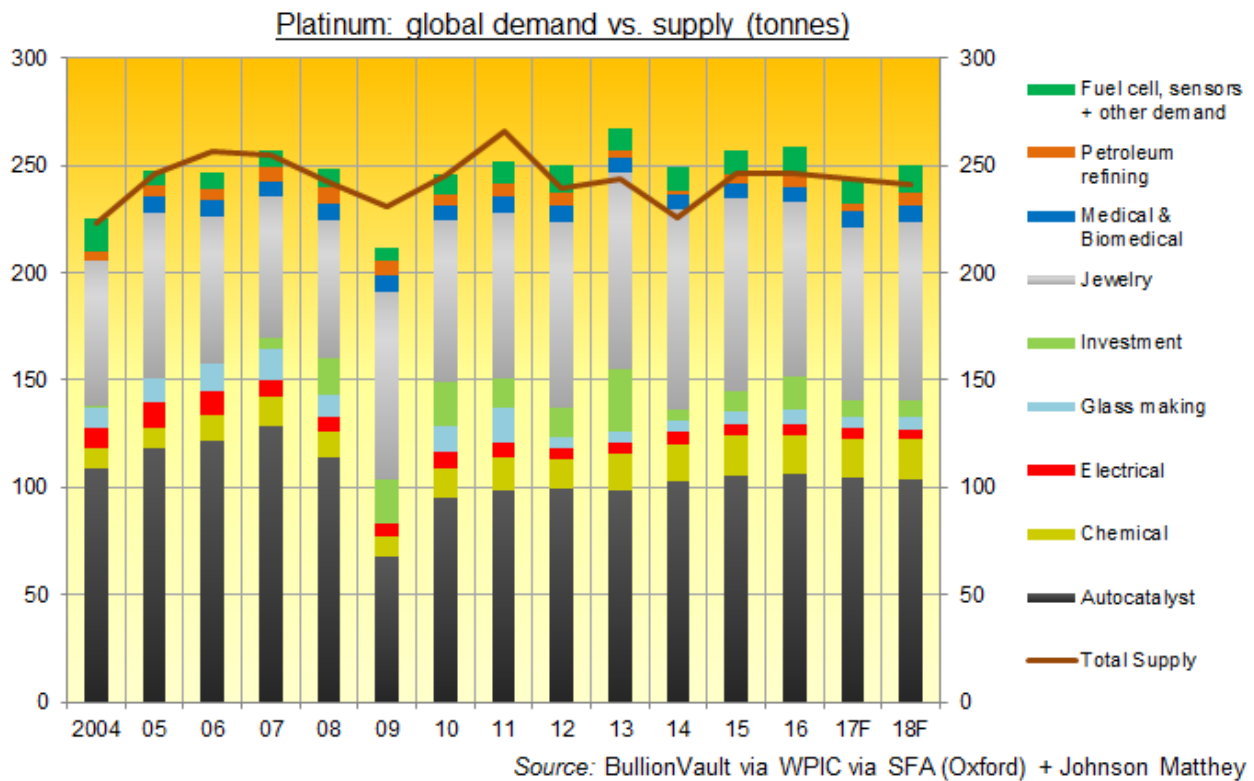


Figure 4 Histogramme des demandes mondiales en platine entre 2004 et 2018 (en tonnes), comparé avec l'approvisionnement mondial (ligne brune) (source : cf [54]).

I.6 Projet ENZYMOR et conception de biopiles

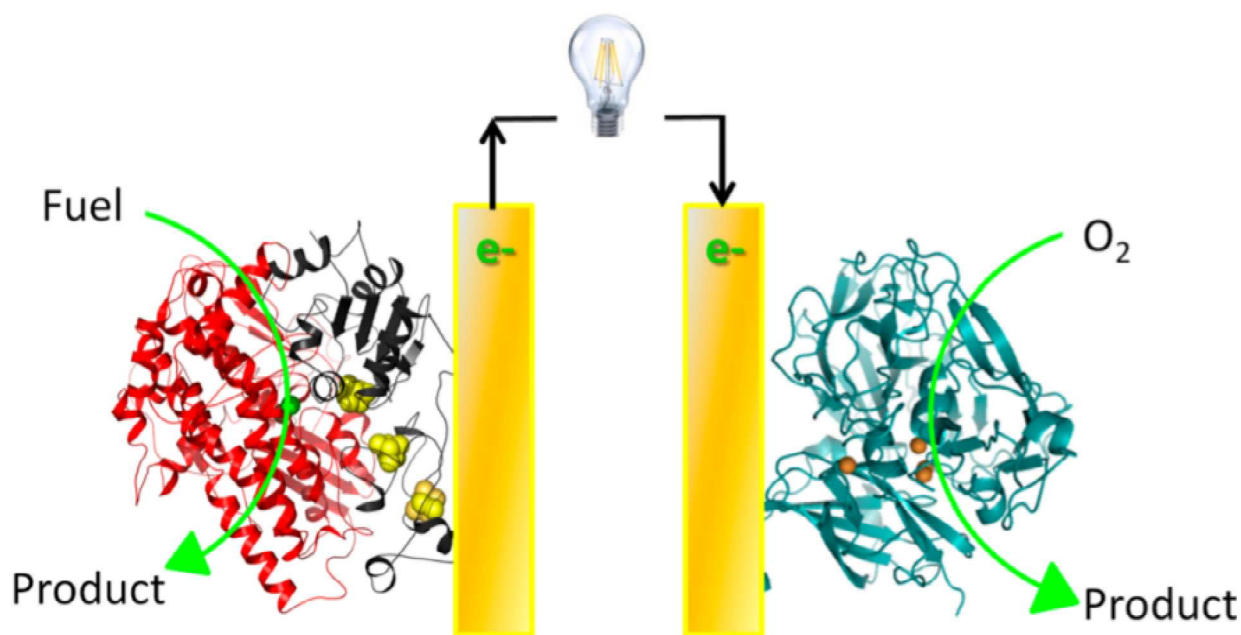


Figure 5 Schéma d'une biopile catalysant la réaction $2 \text{H}_2 + \text{O}_2 \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O}$ (source : cf [44]).

À gauche, l'anode où a lieu la réaction : $2 \text{H}_2 \rightarrow 4 \text{H}^+ + 4 \text{e}^-$ (catalysée par une réductase).

À droite, la cathode où a lieu la réaction : $\text{O}_2 + 4 \text{e}^- + 4 \text{H}^+ \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O}$ (catalysée par une oxydase).

Le projet ANR ENZYMOR vise à mieux comprendre les paramètres physiques d'orientation des enzymes adsorbées sur des surfaces d'électrodes en vue d'appliquer ces connaissances à la conception de biopiles H_2/O_2 . Trois équipes coopèrent à ce projet afin d'offrir des approches complémentaires via des techniques d'électrochimie, d'analyse de surfaces et de modélisation par dynamiques moléculaires. Ces trois équipes du CNRS appartiennent respectivement au BIP (Bioénergétique et Ingénierie des Protéines, UMR 7281, équipe dirigée par Élisabeth Lojou), au CBMN (Chimie et Biologie des Membranes et des Nano-objets, UMR 5248, dirigé par Sophie Lecomte), et au LBT (Laboratoire de Chimie Théorique, UPR9080, dirigé par Marc Baaden).

Une enzyme compatible avec la conception d'une biopile doit satisfaire divers critères. Premièrement, il est souhaitable que sa fonction ne soit pas inhibée de façon irréversible par une oxydation en présence de dioxygène. Ensuite, il faut également que l'enzyme soit suffisamment thermostable pour que sa structure tridimensionnelle soit à l'épreuve de l'échauffement lié au fonctionnement de la biopile. L'hydrogénase issue de la bactérie thermophile *Aquifex aeolicus*, et la

bilirubine oxydase issue de *Myrothecium verrucaria* qui satisfont ces deux critères [44][45][55] ont été sélectionnées par l'équipe BIP comme potentiels catalyseurs.

L'équipe BIP a conçu des prototypes de biopiles, mais leurs performances étaient bien en deçà de celles attendues. Plusieurs protocoles expérimentaux ont permis d'acquérir des connaissances sur les prototypes de biopiles. Le ratio entre transfert électronique direct (TED) et transfert électronique médié (TEM) (cf Figure 6) a pu être évalué par voltampérométrie cyclique (aussi nommée voltammétrie cyclique) et comparé dans le cas de l'hydrogénase d'*Aquifex aeolicus* adsorbée sur une SAM positive ou négative [56]. Ceci a permis de déterminer que dans ces deux cas des TED et TEM avaient lieu. Sur une SAM hydrophobe, théoriquement plus proche des conditions physiologiques de fonctionnement de l'enzyme, le TEM était pourtant largement majoritaire. Des images obtenues par microscope à force atomique (AFM) sur la SAM hydrophobe ont permis de vérifier que l'hydrogénase d'*Aquifex aeolicus* était bien adsorbée sur la SAM, donc que le TEM n'était pas attribuable à la désorption de l'enzyme [56].

L'équipe du CBMN étudie l'adsorption des enzymes sur les surfaces d'or fonctionnalisées par des protocoles de PM-IRRAS (« Polarization modulation-infrared reflection-adsorption spectroscopy ») [57][58][59][60][61]. Cette technique expérimentale consiste à faire se réfléchir des rayons infrarouges polarisés sur la surface d'or fonctionnalisée où sont adsorbées les protéines à étudier. Les perturbations du signal réfléchi par la surface sont ensuite étudiées pour mesurer les orientations des hélices α des protéines adsorbées. En supposant que la structure des protéines en question est globalement conservée, l'orientation des hélices α permet de déduire l'orientation des protéines elles-mêmes. Cette technique a permis de déduire que la prévalence du TEM était liée à une différence d'orientation sur la SAM hydrophobe par rapport aux orientations multiples sur les SAM chargées [56].

En effet, en augmentant la conductivité du solvant utilisé (par exemple en augmentant la concentration en ions), une légère augmentation des performances a été constatée. Ceci suggère que les oxydoréductases sont fonctionnelles, mais mal orientées vis à vis de la surface de l'électrode. La simple augmentation de conductivité du solvant ne suffit cependant pas à améliorer suffisamment les performances de la biopile pour obtenir un prototype exploitable. Cette orientation non-optimale entraîne a priori un TEM (cf Figure 6). Ce TEM implique que les électrons ne sont pas transférés directement vers la surface de l'électrode mais vers le solvant. La conductivité du solvant permet ensuite à quelques électrons d'être indirectement transférés à l'électrode (par l'intermédiaire de

molécules jouant le rôle de relais d'électron d'efficacité limitée). Une orientation optimale doit suffisamment rapprocher le relai d'électrons de la protéine de la surface métallique de l'électrode pour permettre un TED entre enzyme et électrode. Toutefois, aucun outil disponible ne permet actuellement de corréler différentes orientations possibles avec le taux de transfert interfacial des électrons. De plus, même en trouvant une interaction enzyme/surface a priori stable et favorable à un TED, il reste nécessaire de vérifier si une diminution de l'efficacité de la biopile n'est pas liée à une perte de fonction de l'enzyme.

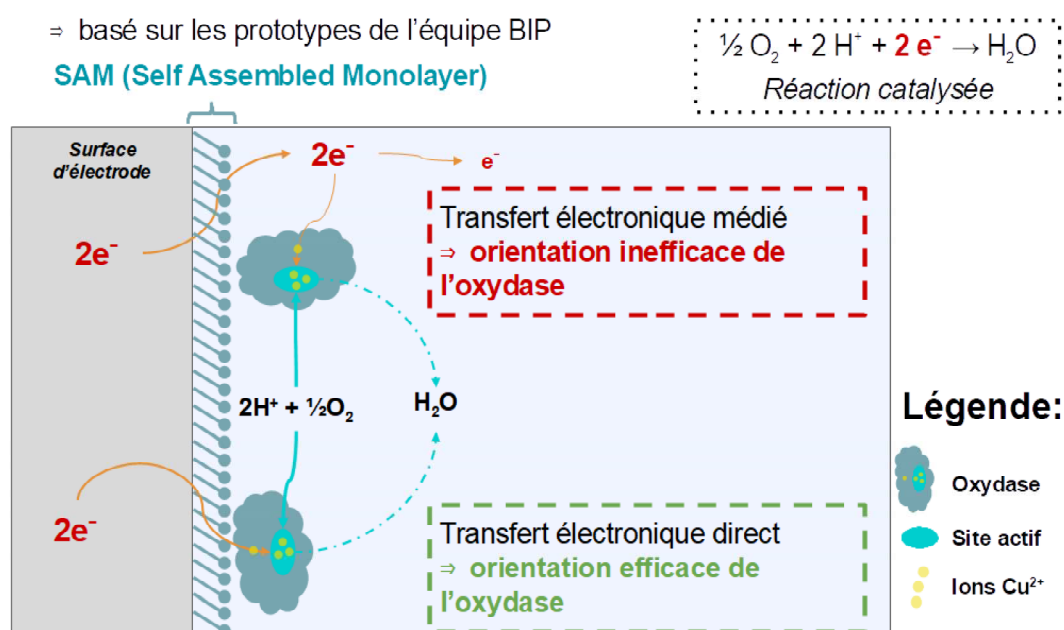


Figure 6 Influence de l'orientation de l'oxydase adsorbée sur le transferts des électrons vers l'électrode.

L'équipe du LBT souhaite étudier la dynamique interne des enzymes adsorbées par des approches in silico. Les travaux des équipes du LBT et du CBMN ont pour but d'apporter des informations complémentaires sur les conditions optimales d'adsorption des enzymes sur la surface d'électrode, afin que les enzymes restent fonctionnelles et permettent un transfert électronique direct. La finalité des travaux de ces deux équipes est de permettre à l'équipe BIP d'exploiter nos observations et hypothèses afin de concevoir un prototype plus performant.

L'adsorption d'enzymes sur différentes surfaces inorganiques est possible, notamment via la fonctionnalisation de telles surfaces par des SAM (Self Assembled Monolayer, ou monocouche auto-assemblée). La SAM joue alors le rôle d'interface entre la surface inorganique rigide et l'enzyme, afin d'éviter le contact direct de l'enzyme avec une surface rigide. En effet, ceci pourrait

engendrer une déformation et par conséquent une perte de fonction de l'enzyme [62][63][64][65], ce qui rendrait le dispositif de biopile inutilisable.

Cependant, même en l'absence de perturbation majeure de la structure de l'enzyme, son activité peut-être impactée. En effet, la dynamique interne d'une enzyme dépend de quelques résidus clés [66][67], et la perturbation des propriétés mécaniques (flexibilité, rigidité ou alternance entre des états plus ou moins rigides) de ces résidus clés est un indice fiable pour déterminer la perte de fonction de l'enzyme [68].

En complément des approches expérimentales menées par les équipes du CBMN et BIP, des approches théoriques sont envisageables. L'une de ces approches théoriques, la dynamique moléculaire classique, est un outil de choix puisqu'il permet de suivre à l'échelle moléculaire l'évolution d'un système d'intérêt. Il s'agit d'une méthodologie de simulation numérique notamment employée pour décrire des systèmes biologiques. Les simulations par dynamique moléculaire classique ont été initialement développées pour décrire des systèmes de taille réduite dans le vide, avant d'être appliquées à des protéines modélisées dans le vide, puis en solution. Cependant, de telles méthodologies ont déjà été employées pour décrire des interactions protéine-surface [69][70][71], mais cette application reste cependant relativement peu répandue. Par conséquent, les champs de force usuels n'incluent pas de paramètres concernant les interactions entre surfaces métalliques et protéines. J'ai participé à la rédaction d'une revue [44] publiée en 2018, faisant un état de l'art au sujet du contrôle de l'orientation d'enzymes redox sur la surface plane d'électrodes ainsi que la synthèse des moyens expérimentaux et de modélisation utilisables afin d'immobiliser les enzymes dans le but d'optimiser les performances de biopiles. Ladite revue est disponible en Annexe 6.

1.7 Objectifs de la thèse

Dans le cadre de ma thèse au sein du LBT, j'ai traité les problématiques suivantes :

Premièrement, le but est d'évaluer la ou les orientations que prennent les protéines à la surface d'une électrode d'or fonctionnalisée par une SAM, afin de mieux comprendre l'adsorption de ces protéines. Dans le cadre du projet ANR ENZYMOR, l'objectif est de favoriser le transfert électronique direct entre le site catalytique des oxydoréductases jouant le rôle de biocatalyseurs, et la surface de l'électrode. Ce transfert électronique direct devrait contribuer à améliorer les performances des prototypes de biopiles réalisés par l'équipe BIP à Marseille.

Dans un second temps, je souhaitais évaluer si certaines orientations ne sont pas associées à une perte de fonction des enzymes étudiées. En effet, des perturbations telles qu'une modification de la structure tridimensionnelle d'une enzyme, une conformation entravant l'accès à son site actif ou encore une perturbation de sa dynamique interne pourraient impacter négativement son activité catalytique, diminuant ainsi le bénéfice d'une orientation à priori optimale [65][72].

Ces hypothèses devront être confrontées à une validation expérimentale par l'équipe BIP, qui mesure les performances des prototypes de biopiles selon diverses conditions physiques, en évaluant la fraction d'enzymes dont l'orientation permet un courant électronique direct, afin de déterminer expérimentalement les conditions susceptibles d'optimiser ces prototypes.

Enfin, l'un des livrables que j'ai pu mettre en place est un protocole fiable de préparation de dynamiques moléculaire et transposable à d'autres systèmes de protéines adsorbées sur des surfaces inorganiques fonctionnalisées. Un tel protocole ouvre des perspectives pour le laboratoire puisque le LBT n'avait pas précédemment réalisé de dynamiques moléculaires sur de tels systèmes. Ce protocole pourra par la suite être adapté à d'autres systèmes d'intérêt, enrichissant ainsi les possibilités du laboratoire quant aux études ultérieures d'interactions entre des surfaces inorganiques et des molécules biologiques.

II. Matériel et méthodes

II.1 *Dynamique moléculaire classique*

II.1.1 **Modèle tout-atome et dynamique moléculaire classique**

La dynamique moléculaire classique est un outil de modélisation théorique relativement récent. L'invention de ce type de simulation est précédé par le développement d'applications de l'algorithme de Metropolis Monte Carlo pour modéliser le comportement de liquides en 1953 [73]. Les premières dynamiques moléculaires de solides et liquides représentés par des ensembles de sphères rigides ont été réalisées entre 1956 et 1957 [74][75][76], avant même l'obtention de la première structure de protéine par cristallographie aux rayons X [77]. Le développement des capacités de calculs des ordinateurs ainsi que le perfectionnement des algorithmes a permis de traiter des systèmes de plus en plus volumineux. Ainsi, la taille des systèmes étudiés a augmenté, passant successivement des premières simulations incluant autour d'une centaine de particules [75], suivis par la simulation de 216 molécules d'eau à pression et température ambiantes en 1971 [78], puis par la simulation du repliement tridimensionnel d'une protéine (réalisée avec une représentation gros-grain de la protéine) [79]. Encore aujourd'hui, l'étude de systèmes de plus en plus grands en terme de nombre de particules devient accessible par dynamique moléculaire.

Les simulations par dynamique moléculaire classique ne permettent pas de modéliser la réaction catalysée par une enzyme, mais permettent d'étudier la dynamique interne des enzymes. Leur coût en temps de calcul augmentant avec le nombre d'atomes représentés, les modélisateurs cherchent donc à limiter autant que possible le nombre de particules de leur système modèle. Pour cette raison, chacune de nos dynamiques moléculaires ne comprendra qu'une seule enzyme adsorbée sur une surface.

De plus, la réalisation d'un nombre adéquat de simulations numériques suffisamment longues pour observer l'adsorption d'une enzyme pour en tirer des conclusions significatives serait trop coûteuse en temps de calcul. C'est pour cette raison que notre approche consistera à étudier des

protéines déjà adsorbées selon plusieurs orientations sur une surface d'or fonctionnalisée, et à mesurer la stabilité de leur interaction avec cette surface fonctionnalisée. Les orientations initiales sélectionnées seront présentées lors de la partie III.2 du manuscrit.

II.1.1.1 Représentation tout-atome

La représentation tout-atome consiste à représenter chaque atome par une particule, c'est-à-dire une sphère avec une éventuelle charge ponctuelle. La représentation du solvant est explicite, ce qui signifie que toutes les molécules d'eau sont représentées. Cette représentation est donc coûteuse en temps de calcul puisqu'elle augmente grandement le nombre de particules du système. Cela permet néanmoins une modélisation des protéines plus fidèle vis-à-vis des résultats expérimentaux [80].

II.1.1.2 Champ de force pour le modèle tout-atome

Lors de l'étude de notre système par dynamique moléculaire classique, la représentation tout-atome sera employée pour modéliser le système.

Les champs de force classiques font usage de potentiels empiriques pour calculer les interactions entre particules. La force s'appliquant à une particule à chaque instant est la résultante des interactions à longue distance (interactions électrostatiques liées aux forces de Coulomb), à courte portée (potentiel de Lennard-Jones) et intramoléculaires (potentiels harmoniques représentant les elongations de liaison, et flexions d'angle ; et potentiel sinusoïdal représentant les torsions d'angle dièdre).

Le champ de force que nous avons employé pour les dynamiques moléculaires classiques réalisées selon une représentation tout-atome est GAFF2 (General Amber Force Field) [81][82][83].

L'énergie potentielle totale est calculée comme la résultante des énergies auxquelles est soumise chaque particule du système. Cette énergie potentielle peut-être exprimée comme :

$$E_{\text{totale}} = E_{\text{liaisons}} + E_{\text{angles}} + E_{\text{dièdres}} + E_{\text{vdW}} + E_{\text{Coulomb}}$$

$$E_{totale} = \sum_{liaisons} K_r (r - r_0)^2 + \sum_{angles} K_\theta (\theta - \theta_0)^2 + \sum_{dièdres} \sum_n V_n [1 + \cos(n\phi - \gamma)] \\ + \sum_{i < j} \left[\epsilon_{ij} \left(\frac{R_{ij}^*}{R_{ij}} \right)^{12} - 2 \epsilon_{ij} \left(\frac{R_{ij}^*}{R_{ij}} \right)^6 \right] + \sum_{i < j} \left(\frac{q_i q_j}{\epsilon r_{ij}} \right)$$

Avec d'une part les termes exprimant les interactions liées (décrivant liaisons covalentes, angles et dièdres), et d'autre part les termes exprimant les interactions non-liées (décrivant les interactions entre particules non-liées de façon covalente : encombrement stérique, interactions de van der Waals et interaction coulombienne).

L'interaction entre les paires de particules reliées via une liaison covalente est exprimée sous forme de potentiel harmonique, et tend donc à faire fluctuer la longueur des liaisons autour de leur longueur à l'équilibre :

$$E_{liaisons} = \sum_{liaisons} K_r (r - r_0)^2 \quad ; \text{ avec :}$$

- r la distance entre deux particules reliées via une liaison covalente,
- r_0 la longueur de référence de la liaison à l'équilibre,
- K_r la constante harmonique de force.

Le terme angulaire traduisant la variation d'énergie associée à une déformation de chaque angle de valence (cf Figure 7 A) est également exprimé sous forme de potentiel harmonique :

$$E_{angles} = \sum_{angles} K_\theta (\theta - \theta_0)^2 \quad ; \text{ avec :}$$

- θ l'angle formé par deux liaisons covalentes successives au sein de la même molécule,
- θ_0 la valeur de référence de l'angle à l'équilibre,
- K_θ la constante harmonique de force.

L'interaction de torsion traduisant la variation d'énergie associée à la modification des angles dièdres formés par quatre particules i, j, k et l consécutives d'une molécule (c'est-à-dire à la rotation autour de l'axe de la liaison JK, modifiant l'angle entre les liaisons IJ et KL, cf Figure 7), est exprimée par la somme de termes sinusoïdaux :

$$E_{\text{dièdres}} = \sum_{\text{dièdres}} \sum_n V_n [1 + \cos(n\phi - \gamma)] \quad ; \text{ avec :}$$

- ϕ l'angle dièdre,
- V_n la valeur de la barrière de rotation d'ordre n (souvent limitée à l'ordre 3),
- γ la phase.

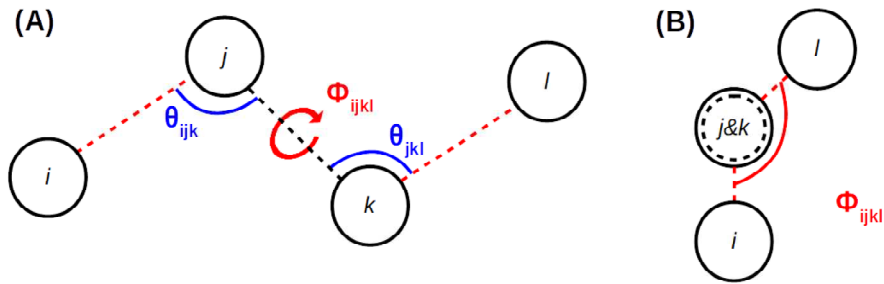


Figure 7 Définition des angles et angles dièdres entre quatre particules consécutives i, j, k et l.

(A) Visualisation des angles de valence θ_{ijk} , θ_{jkl} et de l'angle dièdre Φ_{ijkl} ,

(B) Visualisation de l'angle dièdre Φ_{ijkl} (ici la liaison JK est orthogonale au plan de l'observateur, la particule j éclipse donc la particule k).

L'énergie d'interaction intermoléculaire de van der Waals (de type dipôle induit) est approximée par un potentiel de Lennard-Jones en 6-12 :

$$E_{vdW} = \sum_{i < j} \left[\varepsilon_{ij} \left(\frac{R_{ij}^*}{R_{ij}} \right)^{12} - 2 \varepsilon_{ij} \left(\frac{R_{ij}^*}{R_{ij}} \right)^6 \right] \quad ; \text{ avec :}$$

- R_{ij}^* et ε_{ij} sont les paramètres empiriques de Lennard-Jones pour les interactions entre les atomes i et j, et correspondent respectivement à la distance à laquelle se trouve le minimum de la fonction d'énergie de van der Waals, et à la profondeur de ce puits énergétique,
- Le terme négatif en R_{ij}^6 décrit l'attraction entre les deux atomes due à la dispersion de London,
- Le terme en R_{ij}^{12} décrit la répulsion entre les deux atomes due à l'exclusion de Pauli.

Les interactions électrostatiques coulombiennes décrivent les attractions et répulsions liées aux charges des particules, décrites en tant que charges partielles ponctuelles. Cette approximation ne

tient pas compte des déformations du nuage électronique des atomes liées à leur polarisation. Ces interactions sont exprimées par l'équation :

$$E_{Coulomb} = \sum_{i < j} \left(\frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0\epsilon_r r_{ij}} \right) ; \text{ avec :}$$

- q_i et q_j les charges partielles de la paire d'atomes i et j,
- ϵ_0 la constante de permittivité du vide,
- ϵ_r la constante diélectrique dont le rôle est de simuler l'écrantage des charges par le solvant,
- r_{ij} la distance entre les charges.

II.1.1.3 Principe de la dynamique moléculaire classique

La dynamique moléculaire est une technique de simulation et non une simple illustration d'une hypothèse formulée sur le phénomène étudié. Le modélisateur détermine les paramètres initiaux du système et les conditions physiques qu'il cherche à simuler, cependant la trajectoire des molécules est calculée pas à pas, et non déterminée à l'avance. Ainsi une trajectoire de dynamique moléculaire est avant tout un ensemble de données expérimentales obtenues *in silico* et non une présentation animée illustrant un phénomène déjà connu.

La dynamique moléculaire classique permet ainsi la simulation du comportement du système au cours du temps grâce aux forces dérivées des énergies calculées à l'aide du champ de force. Le système modélisé est constitué d'un ensemble de particules soumises à la mécanique newtonienne. Concrètement, un protocole de dynamique moléculaire vise à simuler la trajectoire décrite par chaque particule en appliquant entre chaque intervalle de temps la deuxième loi de Newton, soit :

$$\sum \vec{f}_i(t) = m \cdot \vec{a}(t) ; \text{ avec :}$$

- $\sum \vec{f}_i(t)$ la somme des forces appliquées à la particule (qu'elles soient dues à des interactions avec les particules voisines, ou à d'autres contraintes)
- m la masse de la particule

- $\vec{a}(t)$ l'accélération de la particule au pas de temps t , dans un référentiel inertiel.

Simuler un système en solution par dynamique moléculaire pose plusieurs problèmes potentiels. Tout d'abord, dans le cas d'un solvant représenté explicitement, chaque molécule d'eau est représentée par trois particules ou plus selon le modèle de solvant choisi. Or, la taille des fichiers de trajectoire est liée au fait de garder une trace de la position de chaque particule du système au cours du temps ; tandis que le coût en temps de calcul est lié au fait de calculer les interactions de chaque particule avec toutes les particules avoisinantes. Cette représentation explicite augmente considérablement le nombre de particules représentées, et par conséquent le poids des trajectoires de simulation et leur coût en temps de calcul avec la quantité de molécules de solvant représentées.

D'autre part, que le solvant soit explicite ou non, fixer une limite rigide autour du système représenté poserait le problème d'une interaction anormale avec une surface rigide, imposant un comportement aberrant aux molécules proche de cette limite. Ne fixer aucune limite n'est pas non plus une solution, puisque le système s'éparpillerait potentiellement dans le vide ou s'agrégerait localement.

Sachant qu'il est souhaitable de limiter le nombre de molécules de solvant à représenter (dans le cas d'une représentation de solvant explicite) mais que le but est de représenter une molécule en solution ; la solution est de définir des conditions aux limites périodiques (cf Figure 8), représentant ainsi un cristal pseudo-infini. Ainsi, une molécule dépassant les coordonnées limites de la boîte de simulation sera réintroduite par la face opposée. Une molécule proche des limites interagira quant à elle avec des molécules proche de la face opposée. De cette façon, avec un nombre fini et fixe de particules, il est possible de représenter le comportement de molécules dans une solution de volume infini. Cependant, il reste nécessaire de définir une boîte périodique de simulation suffisamment volumineuse pour qu'aucune molécule ne puisse interagir périodiquement avec elle-même ce qui biaiserait la dynamique moléculaire.

La dynamique moléculaire classique ne prend pas en compte les phénomènes quantiques liés aux nuages électroniques des atomes, et donc ne permet pas de simuler la formation ou la rupture de liaisons lors de réactions chimiques. De même, les ions et autres molécules chargées ne sont modélisés que comme des particules et des charges ponctuelles, ce qui peut être limitant pour décrire certains phénomènes. Par exemple, pour conserver la géométrie coudée d'une molécule d'eau, plusieurs solutions sont envisageables. Les doublets non-liants d'électrons peuvent

notamment être représentés comme des particules chargées, il s'agit dans ce cas d'une légère approximation qui augmente le nombre de particules du système. Une autre solution est d'imposer une contrainte d'angle à la molécule, il s'agit d'une approximation plus importante mais plus économe en terme de mémoire et de temps de calcul.

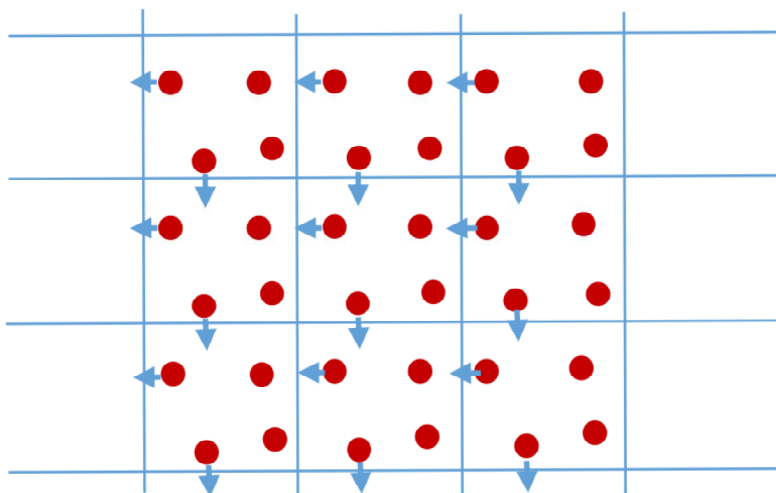


Figure 8 Conditions périodiques aux limites : 4 particules (en rouge) sont modélisées dans la boîte de simulation centrale qui est répétée périodiquement (source : cf [84]).

La représentation d'eau que nous utilisons est le modèle TIP3P [85], où l'eau est représentée par un modèle dit « à trois sites » (cf Figure 9). Dans le cas du modèle TIP3P, deux sites correspondent aux hydrogènes avec une charge partielle de $+0,417\text{ e}$ (charge élémentaire) pour chacun des atomes, et le troisième site correspond à l'oxygène avec une charge partielle associée de $-0,834\text{ e}$. La longueur de liaison est $0,9572\text{ \AA}$, et l'angle de valence formé par la molécule fait $104,52^\circ$. Les molécules d'eau sont considérées comme rigides, les longueurs de liaisons et l'angle de valence sont donc de valeurs constantes.

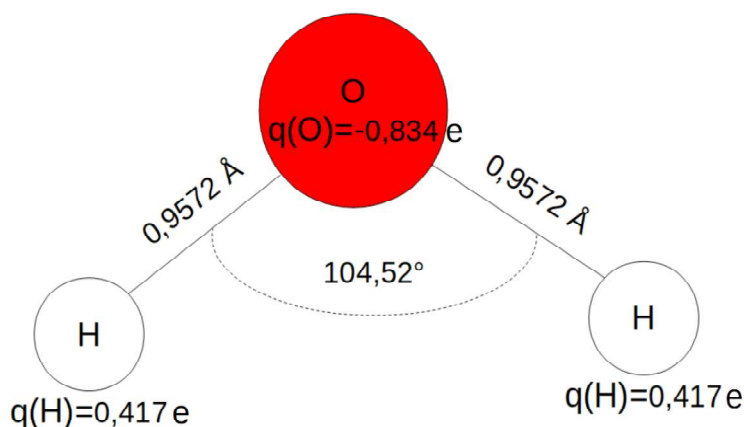


Figure 9 Modèle d'eau TIP3P.

II.1.2 Modélisation par dynamique moléculaire d'une protéine adsorbée sur surface plane

II.1.2.1 État de l'art de l'étude théorique de molécules organiques adsorbées sur surface inorganique

Des modélisations théoriques de systèmes biologiques adsorbés sur des surfaces inorganiques ont été effectuées dans le cadre d'autres projets de recherche portant sur des systèmes et des domaines d'application variés. Il a par exemple pu s'agir d'étudier les interactions d'une glycoprotéine trimérique du SARS-Cov-2 avec des surfaces de graphite (propice aux interactions hydrophobes) ou de cellulose (propice aux liaisons hydrogènes) [86]. Un autre projet a eu pour but de quantifier la force d'interaction et l'énergie libre d'adsorption de chaque acide aminé sur une surface d'or non-fonctionnalisée [87]. Une problématique différente a été de caractériser le mécanisme d'adsorption irréversible de protéine inhibitrice de la β -lactamase (mutée ou native) sur surface d'or nue [88]. Une autre étude a permis une meilleure compréhension de l'interaction de surfaces d'hydroxy-apatite (molécule constitutive des dents et des os) organisées selon différentes géométries (plane, nano-concave, nano-sillon, nano-particule) et d'une protéine impliquée dans la régénération osseuse et son peptide associé afin de guider la conception de matériaux bio-céramiques aux applications médicales [89]. Cette série d'exemples n'est pas exhaustive.

Les études suggèrent que l'adsorption de peptides ou de protéines en solution sur des surfaces rigides est régie par un certain nombre de propriétés déterminant la force et la spécificité des interactions. Certaines de ces propriétés sont inhérentes à la solution tandis que d'autres concernant la protéine ou la surface. Les propriétés dépendant de la solution sont le pH, la force ionique de la solution et la présence éventuelle de tensioactifs. Les propriétés dépendant de la surface et de la protéine sont leur niveau d'ionisation (et les charges en découlant), la polarité, la taille et la forme de la protéine (déterminant l'étendue des contacts qu'elle peut établir avec la surface), l'épaisseur de la SAM si la surface est fonctionnalisée ainsi que son hétérogénéité (dans le cas de SAM mixtes composées de différentes molécules), les éventuelles modifications chimiques et la structure moléculaire de la surface [90].

Les champs de force actuels utilisés pour les interactions de molécules biologiques ont été développés et optimisés spécifiquement pour la description de ces biomolécules en milieu aqueux.

Les champs de force les plus utilisés pour simuler les interactions entre biomolécules et surfaces inorganiques, en revanche, sont basés par nécessité sur des paramètres de champs de force utilisés pour des biomolécules et des surfaces inorganiques. Ces différents champs de forces sont paramétrés séparément, et il est donc nécessaire de combiner ces différents paramètres. Leur applicabilité aux interfaces inorganiques a été testée et validée dans une certaine mesure, cependant de nombreuses autres études sont nécessaires avant d'avoir un étalonnage complet des ensembles de paramètres. En effet, le nombre d'études expérimentales fournissant des informations structurales sur les interactions protéine-surface est actuellement limité. Néanmoins, les approches expérimentales applicables à ces interactions font d'encourageantes avancées, telles que l'estimation des structures 3D des peptides adsorbés sur des oxydes métalliques [91] ou encore l'identification par résonance magnétique nucléaire (RMN) de sites d'interaction entre nanoparticules d'or et protéine à l'échelle de l'acide aminé [92]. Ces avancées expérimentales permettront d'enrichir les informations sur lesquelles s'appuyer afin de valider les protocoles de simulations puis d'appliquer ces protocoles à d'autres systèmes.

L'un des critères limitants dans la simulation des interactions entre une protéine et une surface est l'échantillonnage. La dynamique moléculaire classique est la méthode de simulation la plus commune, bien qu'elle ne soit pas optimale en terme d'échantillonnage, notamment lorsqu'il s'agit d'étudier des événements sur une longue échelle de temps, tels que l'adsorption d'une protéine d'intérêt [92]. D'autres méthodes – tels que le replica exchange – permettent un meilleur échantillonnage et sont un atout précieux lorsqu'il s'agit d'obtenir une simulation d'événements peu fréquents sans multiplier les dynamiques moléculaires classiques. Toutefois, tandis que de telles méthodes ont été utilisées pour l'étude d'interaction entre des surfaces et des peptides de taille réduite, ces mêmes méthodes deviennent inapplicables à des systèmes protéine-surface de taille supérieure.

Les avancées générales des méthodes de simulations profitent aux simulations des interactions protéine-surface. Par exemple, nous avons évoqué précédemment que le pH, qui peut influencer les états d'ionisation de la protéine et de la surface, était un critère pouvant impacter les interactions protéine-surface. Or des problèmes de convergence sont fréquemment rencontrés lors de simulations de systèmes à pH constant, particulièrement lorsque le solvant est représenté de façon explicite [93]. Ceci montre que la résolution de problématiques liées aux méthodes de simulation générales profiterait également à la qualité des modélisations des interactions protéine-surface.

Cependant, le nombre d'équipes effectuant des recherches sur de tels systèmes est encore réduit, et par conséquent de tels protocoles ne sont pas encore standards et nécessitent souvent des ajustements *ad hoc* selon le système étudié.

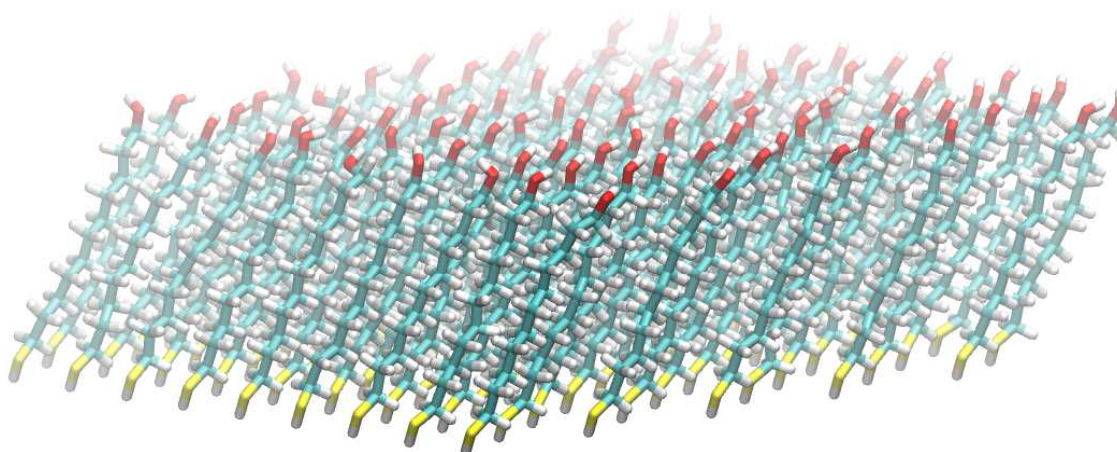
II.1.2.2 Préparation de la surface fonctionnalisée

Les simulations de systèmes comprenant à la fois des molécules biologiques et des surfaces inorganiques étant encore peu répandues, il est difficile de trouver des logiciels spécifiquement dédiés à ce type de systèmes. Il est donc nécessaire de mettre en place des protocoles *ad hoc* avec les outils existants. Le présent protocole a été développé avec l'aide de Florent Barbault, maître de conférence au laboratoire Interface, Traitement Organisation et Dynamique des Systèmes (ITODYS, UMR 7086), qui a effectué des travaux antérieurs sur la modélisation de l'adsorption de courts fragments d'ARN sur des surfaces métalliques fonctionnalisées [22].

Notre système étudié est composé d'une enzyme, la β -glucosidase A (abrégée β -glu) issue de *Clostridium cellulovorans*, adsorbée sur une surface plane d'or Au(111) fonctionnalisée par une SAM (monocouche auto-assemblée, cf Figure 10 A). Cette SAM est elle-même composée de molécules d'hexanol thiol $S(CH_2)_6OH$ (cf Figure 10 B), l'atome de soufre étant en interaction avec la surface d'or, tandis que la fonction alcool est dirigée vers le solvant.

La surface d'or est constituée par une cellule initiale composée de douze atomes d'or suivant le modèle $(2\sqrt{3} \times \sqrt{3})R30^\circ$ Au(111) organisés selon deux couches de six atomes. Cette cellule d'or initiale est dupliquée de façon périodique grâce au programme PropPDB inclus dans AMBER [81] jusqu'à atteindre une taille correspondant à la face XY de la future boîte de simulation périodique. Ensuite, la SAM, issue d'une cellule initiale constituée de deux molécules d'hexanol thiol $S(CH_2)_6OH$, est formée de même par duplication périodique afin d'obtenir une couverture homogène de la surface d'or avec une saturation de couverture $c(2 \times 2)$, c'est-à-dire une proportion d'une molécule de SAM pour trois atomes de la surface d'or. Les molécules d'hexanol thiol $S(CH_2)_6OH$ ne sont pas perpendiculaires à la surface, mais forment un angle de 49.6° avec le plan de la surface d'or. Ces cellules initiales d'or et de SAM ont été obtenues (de façon antérieure à ma thèse) par calculs quantiques réalisés dans le cadre de la Théorie de la fonctionnelle de la densité (ou DFT) en conditions périodiques [22].

(A)



(B)

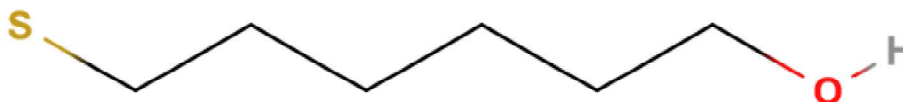


Figure 10 Surface auto-assemblée :

(A) Organisation des molécules de SAM,

(B) Formule d'une molécule d'hexanol thiol $S(CH_2)_6OH$.

Cette surface fonctionnalisée n'est initialement pas rectangulaire mais parallélépipédique. S'il est techniquement possible de définir une boîte périodique de simulation à base parallélépipédique, une boîte de taille suffisante pour éviter toute auto-interaction de la β -glu avec son image périodique nécessiterait un volume supérieur (donc un nombre supérieur de molécules de solvants). La surface parallélépipédique est donc ramenée à une surface rectangulaire (se rapprochant au plus près d'une surface carrée) en sélectionnant une surface rectangulaire de dimension adéquate dans la surface parallélépipédique. Un travail de vérification et de nettoyage de toute molécule de SAM incomplète (par suppression, ou bien par ajout d'atomes manquants) est nécessaire afin d'obtenir un fichier exploitable de structure d'une surface fonctionnalisée.

Le logiciel TLEAP inclus dans AMBER 20 [81][94] a été utilisé afin de préparer les systèmes.

Les paramètres des atomes d'or sont issus des travaux de l'équipe de Florent Barbault ayant étudié les interactions entre surface d'or et SAM-OH [22][95][96][97]. Les paramètres manquants pour les atomes de la SAM ont été générés via deux outils de gestion de paramètres d'AMBER : PARMCHK et ANTECHAMBER [81][94]. Ces paramètres sont disponibles en annexe (cf Annexe 1). Les atomes d'or et de la SAM (en dehors des contraintes de positions appliqués à certains) sont

soumis au même champ de force que les autres particules du système (protéine, ions d'équilibration et solvant).

II.1.3 Préparation de la dynamique moléculaire classique du système tout-atome

II.1.3.1 Minimisation

La structure initiale des protéines étudiées provenant de la PDB (Protein Data Bank) et ayant été obtenues par cristallographie, les protéines ne sont initialement pas dans un état natif. La minimisation a pour but d'éviter de débiter la simulation avec des énergies de répulsion trop élevées dues à l'ajout automatique de molécules d'eau et des atomes d'hydrogène, ce qui peut occasionner des chocs stériques. Notre système est actuellement non-homogène puisque la surface d'or fonctionnalisée par la SAM, parallèle au plan xOy (plan défini par l'origine et les axes définissant les coordonnées x et y) rend le système anisotrope. Les propriétés du système varient donc en fonction de son orientation, par opposition à un système où la protéine serait représentée uniquement en présence de solvant.

La minimisation se fait en trois phases successives : une première étape avec de fortes contraintes harmoniques ($10 \text{ kcal.mol}^{-1}.\text{\AA}^{-2}$) appliquées sur les atomes de la protéine, la surface d'or et la SAM, suivie d'une seconde étape avec des contraintes moins fortes ($1 \text{ kcal.mol}^{-1}.\text{\AA}^{-2}$), et enfin une troisième sans contraintes. Chacune de ces étapes consiste en 20 000 cycles de minimisation (5 000 cycles selon la méthode steepest descent, suivi de 15 000 selon la méthode du gradient conjugué). La minimisation est réalisée dans des conditions périodiques à volume constant, avec un critère de convergence de $10^{-5} \text{ kcal.mol}^{-1}.\text{\AA}^{-2}$ et un cut-off de $10 \text{ \AA}$.

Il existe plusieurs modules d'AMBER [81] permettant le lancement de minimisations d'énergie et de dynamiques moléculaires. Lors de notre protocole nous utiliserons alternativement SANDER (Simulated Annealing with NMR-Derived Energy Restraints, qui malgré son nom historique peut être utilisé pour nombre d'applications non liées aux données RMN) [81][94] et PMEMD (Particle Mesh Ewald Molecular Dynamics) [81][94][98][99][100]. Chacun de ces modules ont leurs spécificités respectives, mais leurs fichiers pris en entrée restent compatibles et permettent le passage de l'un à l'autre.

Lors de ces minimisations successives, le module SANDER d'AMBER est utilisé. Ce choix est justifié par le fait que notre système est éloigné des configurations les plus communes des systèmes généralement étudiés par dynamique moléculaire tout-atome (soit une ou plusieurs molécules biologiques en solution, avec éventuellement des surfaces lipidiques). Puisque notre système est anisotrope (à cause de la présence de la surface fonctionnalisée), l'homogénéité du système est considérée comme insuffisante par le module PMEMD qui interrompt l'exécution de la minimisation. Le module SANDER avertit également l'utilisateur que l'homogénéité du système est potentiellement problématique, mais s'exécute tout de même, permettant de passer aux étapes suivantes. Bien entendu, le fait que le système génère de tels avertissements nous pousse à surveiller l'état du système à l'issue de chacune des étapes ultérieures. Ces vérifications sont nécessaires lors de la conception du protocole afin d'éviter d'atteindre un comportement aberrant des molécules lors des étapes préparatoires, ce qui compromettrait la mise en œuvre de la simulation. Pour cela, il est nécessaire que l'énergie totale soit négative, et plus particulièrement que les énergies liées aux interactions électrostatiques et de van der Waals soient négatives.

La structure obtenue à l'issue de la troisième minimisation, réalisée sans contrainte, sera pour les étapes ultérieures la structure de référence pour les contraintes exercées afin de conserver la structure de la surface d'or et de la SAM. Il est donc nécessaire de vérifier que cette minimisation n'a pas occasionné de modifications majeures ni à la surface d'or, ni à la SAM avant de passer à l'étape de montée en température.

II.1.3.2 Montée en température

L'étape de montée en température correspond à une introduction de mouvement dans le système, passant d'une température initiale de 0 Kelvin (aucun mouvement) à une température de début de simulation à 300 Kelvin. Il est à noter que malgré l'analogie de la montée en température et la nécessité de cette étape, celle-ci ne correspond pas à une montée de température "physique" du système.

La montée en température a lieu en deux étapes. La première courte étape a lieu dans l'ensemble NVT (énergie et volume constants et température du système régulée par un thermostat de Langevin [101][102]) allant de 0 à 100 K pendant 50 ps. La seconde étape a lieu dans l'ensemble NPT (l'énergie est constante, la pression est régulée par un barostat de Berendsen [103] avec un pas de

temps de relaxation de la pression de 2 ps et la température est régulée par un thermostat de Langevin [101][102]) de 100 à 300 K pendant 100 ps. Le module SANDER d'AMBER est employé lors de ces deux étapes.

Le but de la montée en température est d'introduire du mouvement dans le système ainsi que d'ajuster le volume de la boîte périodique de simulation au nombre de molécules de solvant réellement modélisées. En effet, lors de la solvation du système, le solvant est ajouté en évitant les chocs stériques, et donc avec une marge par rapport aux molécules de soluté. Si la taille de la boîte périodique n'est pas ajustée via une étape de dynamique en NPT, le risque est d'avoir un volume trop important par rapport au nombre de molécules de solvant, donc une densité de solvant trop basse. Le champ de force traite généralement cette densité anormalement basse en agrégeant les molécules de solvant autour du soluté (si celui-ci est raisonnablement polaire) et en laissant des zones dépourvues de molécules, formant ainsi des « bulles vides » (dépourvues de molécules de solvant ou soluté, cf exemple Figure 11) dans la boîte de simulation. Ces zones lacunaires ne correspondent à aucune réalité physique et constituent donc une aberration ininterprétable qui doit être corrigée avant de pouvoir produire une simulation du système.

Cependant dans le cas de notre système, nous souhaitons produire une trajectoire modélisant aussi fidèlement que possible une surface d'or fonctionnalisée continue. Le volume global et plus particulièrement les coordonnées X et Y de la boîte de simulation doivent donc rester constants durant l'étape de production de la trajectoire. L'ajustement du volume de la boîte de simulation commence donc durant la seconde partie de l'étape de montée en température dans l'ensemble NPT. Par la suite, dès lors que l'ajustement du volume sera un succès, la production pourra avoir lieu à volume constant dans l'ensemble NVT. Les bulles vides évoquées précédemment commenceront à apparaître durant l'étape de montée en température en NVT (0 à 100 K), mais doivent avoir disparu avant la production de la trajectoire, sinon la stabilité du système risque d'être compromise.

L'étape de montée en température dans l'ensemble NPT permet d'éliminer ces comportements aberrants du solvant. Cependant, afin d'éviter que ces étapes préparatoires ne modifient la conformation globale de la β -glu, nous appliquons des contraintes harmoniques de $10 \text{ kcal.mol}^{-1}.\text{\AA}^{-2}$ sur les carbones α de l'enzyme, avec les coordonnées obtenues au terme des étapes de minimisation comme référence. Lors des étapes de montée en température comme lors des étapes ultérieures d'équilibration du système et de production de la trajectoire, le pas de temps utilisé est de 2 fs.

Avant de passer à l'étape d'équilibration, nous vérifions l'organisation du solvant, la conformation globale du système (surface métallique et SAM toujours en contact avec la β -glu) et l'évolution de la température du système au cours des 150 ps de montée en température (qui est censée passer de 0 à 300 K selon un profil linéaire).

II.1.3.3 Équilibration

Y compris lorsque la montée en température a eu lieu sans problème notable, l'anisotropie de notre système due à la surface d'or fonctionnalisée entraîne un problème de densité des molécules d'eau. La deuxième étape de montée en température dans l'ensemble NPT n'a pas suffi à réduire suffisamment le volume, et les molécules d'eau modélisées cherchent à s'agréger entre elles en formant des réseaux de liaisons hydrogènes ce qui crée des régions dépourvues de toute molécule, laissant ainsi des bulles vides (cf Figure 11).

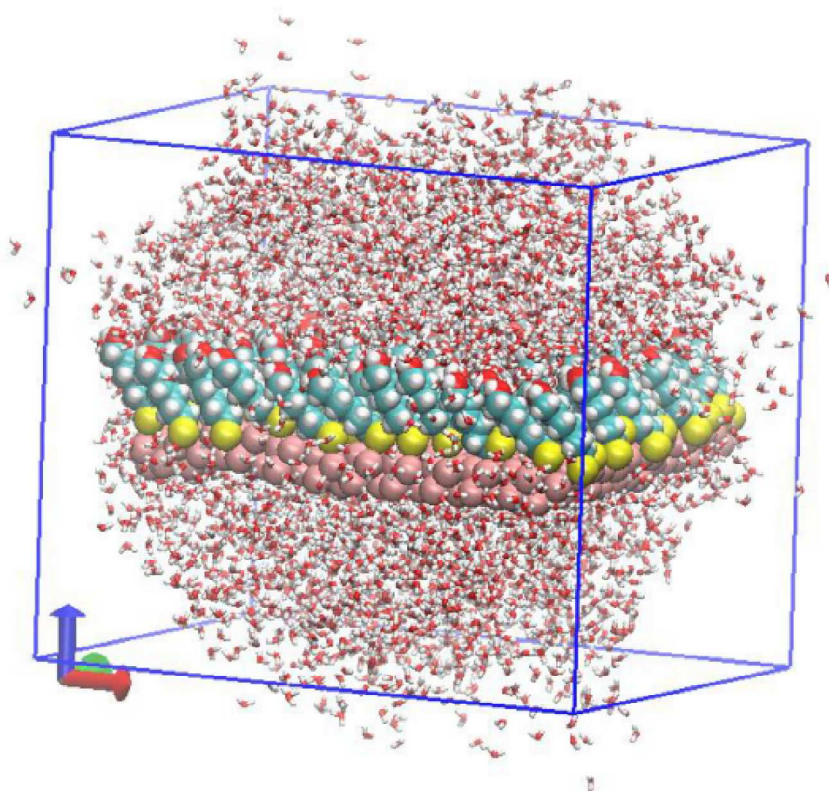


Figure 11 Exemple de volume trop important provoquant des problèmes de densité du solvant (note : la surface ici représentée est bien moins étendue que la surface sur laquelle la β -glu s'adsorbe dans notre système) (source : illustration réalisée par Florent Barbault).

Lors de l'étape précédente, cette réduction du volume de la boîte d'eau a été empêchée par les contraintes harmoniques appliquées à la surface d'or et à la SAM, cependant si nous décidons simplement de réaliser une étape de dynamique moléculaire d'équilibration dans l'ensemble NPT sans aucune contrainte, la réduction du volume de la boîte périodique aura lieu selon les axes X, Y et Z ce qui entraînera une compression et donc une courbure de la surface fonctionnalisée. Pour éviter cela nous choisissons comme compromis d'effectuer une étape d'équilibration en NPT en gelant la position des atomes d'or ainsi que des atomes constituant la SAM grâce à l'option « belly ». Cette option permet de spécifier qu'une partie des atomes du système pourront se déplacer tandis que les autres atomes seront gelés, c'est-à-dire que les termes d'énergie liés, les interactions de van der Waals et les interactions électrostatiques ne sont pas calculés pour les doublets d'atomes gelés (lors de cette étape aucune contrainte harmonique n'est définie). L'équilibration consiste donc en une dynamique moléculaire de 500 ps dans l'ensemble NPT où seul les atomes d'eau et les ions permettant d'équilibrer les charges du système sont libres tandis que les atomes constituant la β -glu, la surface d'or et la SAM sont gelés. Comme précédemment, la pression du système est régulée par un barostat de Berendsen [103] avec un pas de temps de relaxation de la pression de 2 ps et la température est régulée par un thermostat de Langevin [101] [102] et cette dynamique moléculaire est lancée via le module SANDER d'AMBER.

II.1.3.4 Dernière minimisation et dernière montée en température

L'intégrité structurale de la surface fonctionnalisée et de la protéine est censée être conservée et la densité de solvant corrigée via la diminution du volume de la boîte périodique de simulation. Toutefois, le fait d'avoir dû effectuer l'étape d'équilibration en gelant les positions de certains atomes via l'option belly doit nous inciter à la prudence. En effet, si le problème des bulles vides est résolu, les molécules libres de se déplacer (solvant et ions) ont interagi avec des molécules gelées (surface fonctionnalisée et protéine), ce qui pourrait causer des anomalies par la suite au voisinage des molécules gelées.

Par précaution, nous n'allons donc pas lancer directement l'étape de production de la trajectoire proprement dite, mais d'abord effectuer une dernière minimisation suivie d'une nouvelle étape de montée en température. L'aspect clé est ici de conserver les dimensions de la boîte périodique ajustées lors de l'étape d'équilibration (toute étape dans l'ensemble NPT, donc à volume non-constant, est donc proscrite après l'étape d'équilibration).

La dernière étape de minimisation peut éventuellement être répétée si nécessaire jusqu'à atteindre le critère de convergence avant de passer à l'étape de montée en température. Les coordonnées de la structure obtenue à l'issue de la minimisation précédente réalisée en trois étapes est utilisée comme référence (cf II.1.3.1) , cette dernière minimisation est effectuée avec les mêmes contraintes que lors de la toute première étape de minimisation effectuée, à savoir 20 000 cycles de minimisation (5 000 cycles selon la méthode steepest descent, suivi de 15 000 selon la méthode du gradient conjugué) réalisés dans des conditions périodiques à volume constant, avec un critère de convergence de 10^{-5} kcal.mol⁻¹.Å⁻² et un cut-off de 10 Å, avec des contraintes harmoniques de 10 kcal.mol⁻¹.Å⁻² appliquées sur toutes les molécules de soluté (protéine, surface et SAM).

La dernière étape de montée en température s'effectue en utilisant le module PMEMD d'AMBER (et non SANDER comme lors des étapes précédentes) plus efficace, en effet les problèmes liés à l'anisotropie du système et à la densité du solvant ayant été résolus, le module PMEMD ne considérera pas que le système a un comportement aberrant et ne provoquera pas d'interruption intempestive de la dynamique moléculaire. Cette dernière étape de montée en température consiste en 500 ps de dynamique moléculaire dans l'ensemble NVT au cours de laquelle la température du système passe de 0 Kelvin à 300 Kelvin (la température étant régulée par un thermostat de Langevin [101][102]). Des contraintes harmoniques de 10 kcal.mol⁻¹.Å⁻² sont appliquées aux atomes d'or, aux atomes de la SAM et aux carbones α de la β -glu.

Après vérification que la température du système a bien atteint 300 Kelvin et que la structure de la surface est bien conservée (cf Figure 12), il est possible de passer à la production de la trajectoire proprement dite.

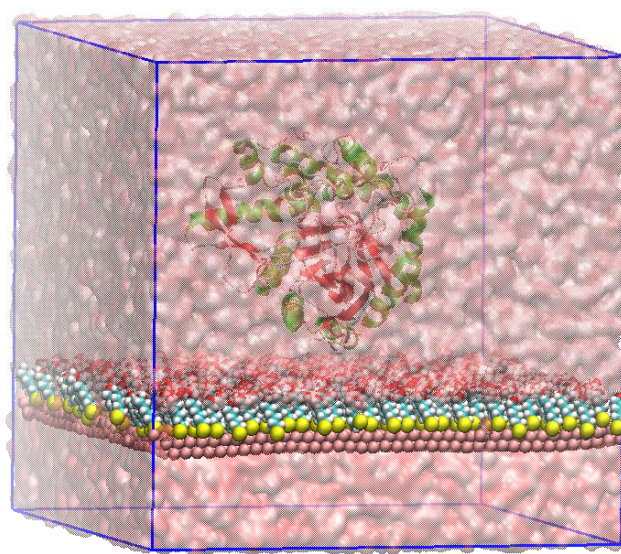


Figure 12 Aspect du système avant l'étape de production : l'intégrité structurale de la surface d'or, de la SAM et de la β -glu est préservée ; la densité du solvant est corrigée (pas de « bulles vides »).

II.1.3.5 Production de la trajectoire

L'étape de production de la trajectoire de la β -glu adsorbée sur la surface fonctionnalisée consiste en une dynamique moléculaire de 100 ns dans l'ensemble NVT (la température étant régulée par un thermostat de Langevin [101][102]).

Des contraintes harmoniques de $10 \text{ kcal.mol}^{-1}.\text{\AA}^{-2}$ sont appliquées à chaque atome de soufre et au second carbone (en partant du soufre, cf Figure 13) des molécules d'hexanol thiol $\text{S}(\text{CH}_2)_6\text{OH}$ constituant la SAM afin de conserver la cohérence de la monocouche et l'inclinaison des molécules de SAM vis à vis de la surface d'or (des contraintes uniquement exercées sur les atomes de soufre causeraient un redressement des molécules d'hexanol thiol à 90° de la surface, le champ de force ne permettant pas la conservation de cette inclinaison sans ces contraintes), mais les extrémités des molécules de SAM faisant face au solvant ou à la β -glu ne sont pas contraintes. Les mêmes contraintes sont appliquées aux atomes d'or ; les coordonnées de référence pour ces contraintes restent celles obtenues à l'issue de la première minimisation en trois étapes. Aucune contraintes ne sont exercées sur les atomes de la β -glu durant la trajectoire. Le module PMEMD d'AMBER est encore une fois utilisé pour des raisons d'optimisation du temps de calcul.

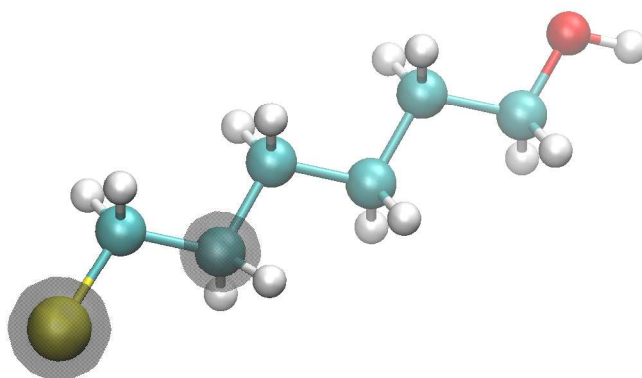


Figure 13 Contraintes appliquées aux molécules d'hexanol thiol $S(CH_2)_6OH$ constituant la monocouche auto-assemblée (les contraintes harmoniques de $10 \text{ kcal.mol}^{-1}.\text{\AA}^{-2}$ sont appliquées aux atomes de soufre et de carbone mis en évidence par un halo).

II.1.4 Modélisation par dynamique moléculaire d'une protéine en solution

La dynamique moléculaire de l'enzyme seule en solution est utilisée comme témoin, puisque l'enzyme est alors censée être dans son état natif et fonctionnel. Cette trajectoire suit un protocole plus usuel que celui de la protéine adsorbée. Toutes les étapes de préparation jusqu'à la production de la trajectoire sont lancées via le module PMEMD d'AMBER [81][94][98][99][100] puisque nous n'avons pas rencontré les problématiques liées à la préparation d'un système de dynamique moléculaire comprenant une surface fonctionnalisée.

Premièrement nous faisons une minimisation du système en deux étapes : une première étape de minimisation avec des contraintes harmoniques ($10 \text{ kcal.mol}^{-1}.\text{\AA}^{-2}$) sur la protéine, suivie d'une minimisation du système entier sans contraintes. Chacune de ces étapes consiste en de 20 000 cycles de minimisation (5 000 cycles selon la méthode steepest descent, suivi de 15 000 selon la méthode du gradient conjugué). La minimisation est réalisée dans des conditions périodiques à volume constant, avec un critère de convergence de $10^{-5} \text{ kcal.mol}^{-1}.\text{\AA}^{-2}$ et un cut-off de $10 \text{ \AA}$.

La montée en température est identique à celle utilisée pour la protéine adsorbée, hormis le fait que le module PMEMD soit utilisé. La première courte étape a lieu dans l'ensemble NVT (énergie et volume constants et température du système régulée par un thermostat de Langevin [101][102]) allant de 0 à 100 K pendant 50 ps. La seconde étape a lieu dans l'ensemble NPT (l'énergie est constante, la pression est régulée par un barostat de Berendsen [103] avec un pas de temps de

relaxation de la pression de 2 ps et la température est régulée par un thermostat de Langevin [101] [102]) de 100 à 300 K pendant 100 ps.

L'équilibration consiste en une dynamique moléculaire de 500 ps dans l'ensemble NPT sans contraintes. La pression du système est régulée par un barostat de Berendsen [103] avec un pas de temps de relaxation de la pression de 2 ps et la température est régulée par un thermostat de Langevin [101][102].

La production suit directement l'équilibration : il s'agit d'une dynamique moléculaire de 485 ns dans l'ensemble NPT puisqu'il n'y a pas ici d'impératif de conservation du volume comme cela a pu être le cas pour les dynamiques avec surface fonctionnalisée. La pression est régulée par un barostat de Berendsen [103] et la température est régulée par un thermostat de Langevin [101][102].

II.1.5 Méthodes d'analyses des trajectoires obtenues pour les simulations tout-atome

II.1.5.1 Trajectoires allégées

Afin de limiter les durées des calculs ultérieurs tout en ayant un échantillon de taille suffisante, les trajectoires des protéines adsorbées sont allégées en sélectionnant 1 000 étapes le long de ces trajectoires de 100 ns (soit un pas de 1 étape gardées sur 20 produites). Les calculs ultérieurs sont réalisés sur ces trajectoires allégées. De plus, pour les calculs effectués uniquement sur les atomes de la β -glu des versions encore plus allégées sont utilisées : sans solvant, ne comprenant que les atomes de la protéine (et pas la surface fonctionnalisée), ou uniquement les atomes lourds de la protéine (omettant donc les hydrogènes). Ces trajectoires allégées sont obtenues par sélection d'une partie seulement des atomes des trajectoires non-allégées : les atomes présents dans deux versions (allégée ou non) d'une même trajectoire conservent donc les mêmes coordonnées initiales les mêmes mouvements au cours de la trajectoire.

La Tableau 1 donne un ordre de grandeur des volumes des fichiers de trajectoire avant et après qu'elles n'aient été allégées.

Tableau 1 Ordre de grandeur des volumes de données correspondant aux fichiers de trajectoires plus ou moins allégées de la β -glu adsorbée selon six orientations initiales sur une surface d'or fonctionnalisée par une SAM.

État de traitement de la trajectoire	Poids du fichier
Trajectoires complètes (20 000 images représentant 100 ns)	38 Go
Trajectoires réduites à 1 000 images (représentant toujours 100 ns)	2 Go
Trajectoires réduites et sans solvant	277 Mo
Trajectoires réduites avec uniquement la β -glu	84 Mo
Trajectoires réduites avec uniquement les atomes lourds de la β -glu	43 Mo

II.1.5.2 Structure globale de la protéine

II.1.5.2.1 Suivi du RMSD

Le RMSD (Root Mean Square Deviation, ou racine de l'écart quadratique à la moyenne), correspond à la valeur moyenne de la distance entre atomes de structures alignées. Dans notre cas, la conformation initiale de la protéine en début de simulation est prise comme référence et le RMSD est calculé pour chacune des étapes des trajectoires sur les carbones α de la β -glu. Une variation significative du RMSD de la protéine lors d'une dynamique moléculaire indique un changement majeur de sa structure tridimensionnelle, mais cette mesure est peu sensible aux déformations locales de la protéine, qui peuvent pourtant avoir un impact sur sa fonction. Cette variable permet donc de détecter une éventuelle perte de structure de la protéine, mais n'est qu'une approche préliminaire dans l'analyse de trajectoires de dynamiques moléculaires.

II.1.5.2.2 Étude du rayon de giration de la protéine

L'étude du rayon de giration moyen peut nous donner des informations supplémentaires, en effet il permet d'évaluer le rayon de la β -glu, soit la distance moyenne entre le centre de masse de l'enzyme et ses atomes périphériques. En effet, une déformation locale à la surface de la protéine pourrait n'induire qu'une augmentation peu significative du RMSD ; tandis que le rayon de giration pourrait y être plus sensible.

Le rayon de giration est exprimé selon la formule :

$$r_{gyr}^2 = \left(\sum_i^n m_i (r_i - \bar{r})^2 \right) / \left(\sum_i^n m_i \right) , \text{ avec :}$$

- r_i est la position du $i^{\text{ème}}$ atome,
- $\bar{r}$ est le centre de masse calculé par la fonction « measure center » du logiciel VMD (Visual Molecular Dynamics) [104].

II.1.5.3 Suivi de la distance entre surface et centre de masse de la protéine

La diffusion de la protéine dans la boîte, et plus particulièrement de la distance de son centre de masse par rapport à la surface – du côté fonctionnalisé par la SAM d’une part, et du côté non-fonctionnalisé (l’or étant alors en contact direct avec le solvant) – permet d’évaluer les périodes de la trajectoire où la β -glu se retrouve en contact avec un côté ou l’autre de la surface. La surface étant un plan perpendiculaire à l’axe Z, cette distance entre protéine et surface peut être estimée par suivi de la coordonnée Z du centre de masse de la protéine. Cependant, ce suivi ne permet pas de caractériser l’orientation de la protéine adsorbée sur la SAM ou sur la surface d’or nu.

II.1.5.4 Étude du moment dipolaire

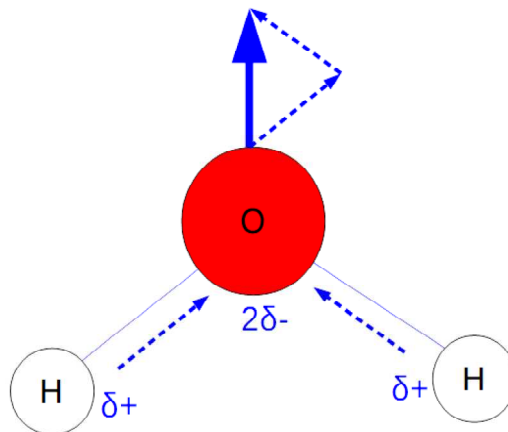


Figure 14 Exemple du moment dipolaire d’une molécule d’eau (en pointillé les moments dipolaires des liaisons OH, en trait plein le moment dipolaire de la molécule entière ; δ une charge partielle de 0,417 e).

Le moment dipolaire, exprimé en Debyes (D) ou coulombs mètres (C.m), résume la distribution hétéroclite des charges électriques à l’échelle de la molécule, en effet il s’agit d’un vecteur dirigé de

la charge négative vers la charge positive, calculé comme la somme vectorielle des moments dipolaires de chaque liaison de la molécule, selon la formule :

$$\vec{d} = \sum_i q_i \vec{r}_i$$

avec :

$\vec{d}$ le moment dipolaire,

q_i les charges électriques,

$\vec{r}_i$ les vecteurs position correspondant auxdites charges.

Généralement le moment dipolaire est calculé pour des molécules dont la charge totale est nulle (par exemple la molécule d'eau a une charge totale nulle, et pourtant un moment dipolaire non-nul, cf Figure 14) ce qui rend le moment dipolaire indépendant de l'origine du système de coordonnées choisi. Or ici ce n'est pas le cas (13 charges négatives, rééquilibrées par l'ajout de 13 ions Na^+). De tels cas sont commun puisqu'il est fréquent qu'une protéine ait une charge nette non-nulle. Pour palier à cette situation, une solution est de considérer le centre de masse des atomes lourds (excluant les hydrogènes) de la protéine comme origine du repère utilisé pour exprimer les vecteurs positions associés aux charges électriques [105].

Il s'agit d'une variable présentant plusieurs aspects intéressants. Tout d'abord, une protéine fortement polarisée présentera un moment dipolaire de grande amplitude qui pourrait influencer sur son orientation d'adsorption sur une surface chargée. Dans le cas d'une molécule polarisée, la variation de la direction du mouvement dipolaire lors de l'adsorption pourrait mener à une réorientation de la protéine selon les propriétés physico-chimiques de la SAM fonctionnalisant la surface. La variation de la direction du moment dipolaire au cours de la trajectoire peut-être évaluée à l'aide du programme PROPKA [106] et visualisée à l'aide du plugin Dipole Watcher de VMD (Visual Molecular Dynamics) [104]. Dans le cas d'une faible variation de la direction du moment dipolaire, ce vecteur peut ensuite être utilisé comme indicateur de l'orientation globale de la protéine dans le repère de la simulation, et donc pour suivre ses orientations d'adsorption.

II.1.5.5 Étude des contacts protéine-surface à l'échelle de l'acide aminé

Un résidu est défini comme en contact avec la SAM si au moins l'un de ses atomes lourds est à une distance inférieure à 5 Å de l'oxygène terminal d'une des molécules constituant la SAM. De même, un résidu est défini comme en contact avec la surface d'or nu si au moins l'un de ses atomes lourds est à une distance inférieure à 5 Å d'un atome d'or. De façon analogue au suivi de la distance entre le centre de masse de la β -glu et la surface, la surface étant un plan perpendiculaire à l'axe Z, les distances entre les atomes lourds de la protéine et la surface d'or ou la SAM peuvent être estimées par suivi de la coordonnée Z des atomes lourds de la protéine. Pour cela deux seuils sont définis : l'un à 5 Å au dessus de la coordonnée Z moyenne des oxygènes des molécules de la SAM (correspondant à un contact avec la SAM), l'autre étant situé à 5 Å sous la coordonnée Z moyenne des atomes d'or de la couche inférieure de la surface métallique (correspondant à un contact avec la face non-fonctionnalisée de la surface d'or).

Nous souhaitons détecter si certains résidus sont en contact durable avec la surface d'or ou la SAM, ce que nous évaluons en calculant la proportion de la trajectoire où chacun de ces résidus se retrouve en contact avec une de ces surfaces.

II.2 *Modèle gros-grain et dynamique brownienne*

Nous souhaitons déterminer quelles orientations l'enzyme est susceptible d'adopter sur l'électrode, mais également évaluer si certaines de ces orientations ne mènent pas à une perte de fonction de l'enzyme étudiée. Pour cela, nous nous baserons sur la comparaison entre le profil de rigidité de l'enzyme dans son état non adsorbée avec les profils de rigidités obtenus pour des structures issues des trajectoires où l'enzyme est adsorbée. L'état de l'enzyme non adsorbée est considéré comme son état fonctionnel. L'éventuelle perturbation de ces profils de rigidité indiquerait un impact sur les propriétés mécaniques des résidus clés dont dépend la dynamique interne de l'enzyme [66][67]. Ceci serait un indice d'une perturbation probable de la fonction de l'enzyme étudiée [68]. Dans le cas des enzymes redox utilisées comme biocatalyseurs, ceci aboutirait alors *in fine* à une perte de performance pour la biopile même dans le cas d'une orientation favorisant le transfert électronique direct.

II.2.1 Représentation gros-grain

Une représentation gros-grain permet réduire le nombre de particules qui serait nécessaire à la modélisation d'un système en tout-atome. En gros-grain, chaque particule simplifie un sous ensemble d'atomes et ses propriétés (encombrement, charge globale, polarité etc.). La réduction du nombre de particules du système permet de limiter le nombre de coordonnées et de degrés de liberté susceptible de varier à chaque pas de la simulation. Cette diminution du nombre de variables à considérer contribue à abaisser le temps de calcul et l'espace de stockage nécessaires pour obtenir et conserver les trajectoires des systèmes étudiés.

Ces gains d'efficacité se font au prix d'une perte de degrés de liberté au sein des molécules, et donc une plus grande approximation du comportement du système modélisé que dans la représentation tout-atome. De plus, pour réduire encore le nombre de particules à représenter, il est possible d'avoir recours à un solvant implicite : plutôt que de représenter chaque molécule de solvant par des particules, le solvant est alors considéré comme un milieu continu. Cette approximation permet d'augmenter grandement les performances de calculs de la simulation par rapport à l'utilisation d'une représentation explicite du solvant. En effet, les particules de solvant

représentent plus de la moitié du total des particules du système, et les interactions entre particules de solvant représentent la majorité du total des interactions calculées. Cependant, l'usage d'un solvant implicite ne permet pas de décrire aussi précisément plusieurs phénomènes, dont la viscosité de l'eau influant sur la diffusion des autres molécules dans le solvant, l'effet d'hydrophobicité crucial au repliement des protéines globulaires et la formation de liaisons hydrogène entre solvant et soluté. Ainsi, l'usage de solvant implicite est réservé aux cas où ces approximations ne risquent pas de biaiser les variables étudiées, ainsi qu'aux cas où le système étudié est trop volumineux pour produire une trajectoire de durée suffisante en un temps de calcul raisonnable.

Divers représentations gros-grain et champs de force associés ont été créés pour répondre à différents besoins en modélisation. Le champ de force MARTINI [107] par exemple est un champ de force de référence dans le domaine de la modélisation de biomolécules, initialement développé pour la modélisation de systèmes incluant des bicouches lipidiques, et notamment utilisé pour modéliser nombre de systèmes de grande taille, tels que l'adhésion entre l'endothélium et les leucocytes lors de la réponse inflammatoire [108], des parois cellulaires bactériennes [109], des canaux protéiques transmembranaires [110] ou même des organelles [111]. Il s'agit d'une représentation dite « quatre-pour-un », représentant en moyenne quatre atomes lourds (et leurs hydrogènes) par une particule représentant les propriétés des atomes la composant (cf Figure 15).

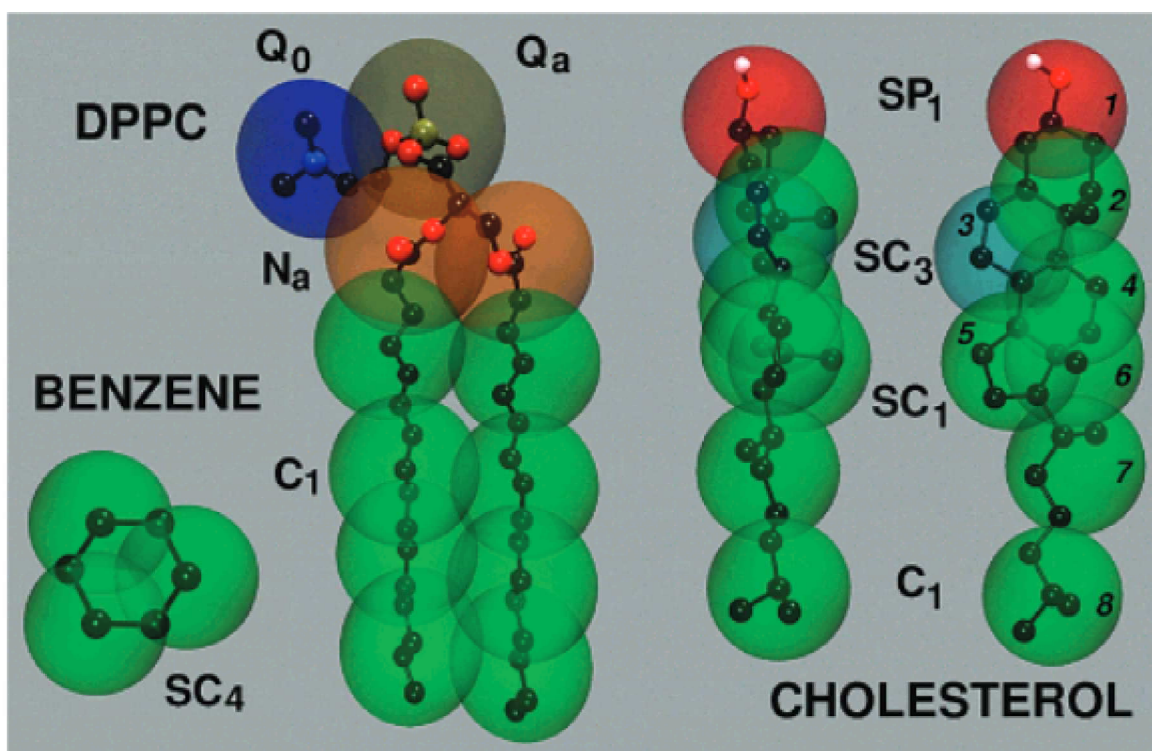


Figure 15 Exemple de conversion de molécules de benzène, phospholipide DPPC (dipalmitoyl-phosphatidylcholine) et cholestérol à partir de leur structure chimique (sphères et liaisons opaques) vers la représentation gros-grain MARTINI (sphères translucides) (source : cf [107]).

Si MARTINI est un champ de force utilisé par une large communauté de chercheurs, d'autres problématiques ont été rencontrées dans l'étude de systèmes de grande taille, et d'autres représentations et champs de force gros-grain ont donc été développés pour répondre à ces problématiques. Par exemple, SCORPION [112] est un champ de force gros-grain développé pour l'étude d'interactions spécifiques protéine-protéine avec introduction d'un modèle de solvant basé sur des particules gros-grain polarisables afin de reproduire les effets macroscopiques du comportement diélectrique de l'eau ainsi que de permettre le calcul d'énergie libre de solvation des systèmes.

Martin Zacharias quant à lui a développé un autre champ de force également avec pour objectif l'étude d'interactions protéine-protéine basé sur une minimisation de l'énergie du système avec une représentation gros-grain de chaque résidu comme un à trois pseudo-atomes, et une exploration des conformations potentielles des chaînes latérales des résidus par l'intermédiaire de rotamères [113]. La représentation gros-grain de la protéine développée par Martin Zacharias est celle utilisée pour étudier notre système de protéine par approche gros-grain, cependant cette représentation est utilisée indépendamment du champ de force avec lequel elle a été initialement développée. Ce

choix de représentation est motivé par le fait que dans la représentation de Martin Zacharias, la chaîne latérale de chaque résidu est représentée par plusieurs pseudo-atomes, contrairement à de nombreux modèles gros-grain où chaque résidu correspond à un seul pseudo-atome [114]. L'usage d'une représentation plus détaillée permet de distinguer les différents résidus. Ceci permet donc d'évaluer l'impact de ce changement de résidu, sans avoir recours à une représentation tout-atome plus coûteuse en ressources de calcul.

II.2.2 Réseau gaussien

Dans le cadre de l'étude de notre système d'intérêt, les simulations faisant intervenir la représentation gros-grain ne calculent pas les interactions entre particules via un champ de force de dynamique moléculaire classique, mais via un réseau de ressorts, ou réseau gaussien. En effet, les champs de force utilisés en dynamique moléculaire classique définissent un nombre considérable de constantes permettant de décrire les termes covalents d'une part – à savoir les énergies de déformations des liaisons, angles et dièdres entre particules – et les termes non-covalents – à savoir les termes électrostatiques et termes de van der Waals. La paramétrisation de chacun de ces termes énergétiques est un processus à la fois minutieux et crucial, puisqu'une erreur ou approximation peu judicieuse d'un seul de ces paramètres peut empêcher la transférabilité du champ de force à un autre système. Ceci explique notamment les mises à jour régulières des champs de force, les paramètres se raffinant afin de limiter les biais.

Le modèle en réseau de ressorts suit une approche différente. M. Tirion a proposé en 1996 d'exprimer l'énergie intramoléculaire d'une protéine [115] selon une forme quadratique. Cette énergie s'exprime alors selon l'équation :

$$E = \frac{1}{2} \sum_{r_{ij}^0 < R_{cut}} \gamma (r_{ij} - r_{ij}^0)^2$$

Avec :

- r_{ij} les distances entre particules i et j de la protéine,
- R_{cut} le rayon de coupure,
- γ la constante de force d'un ressort harmonique.

Ainsi, le potentiel appliqué sur une paire de particules du système ne dépend que de deux paramètres : le rayon de coupure (habituellement compris entre 8 et 16 Å [116][117]) en deçà duquel deux atomes i et j sont considérés comme interagissant via un ressort harmonique de constante de force γ (cf Figure 16). À noter : cette constante de force reste la même pour tous les doublets de particules situés à une distance inférieure au rayon de coupure. M. Tirion a montré comment ce modèle au nombre de paramètres extrêmement réduit pouvait néanmoins reproduire fidèlement les modes de vibration basse-fréquence des protéines et les fluctuations atomiques exprimées par les facteurs de température (ou facteurs de Debye-Waller) issus de données cristallographiques [115]. Par la suite, de nombreux travaux de recherche se sont appuyés sur cette méthodologie et ont démontré qu'elle est également applicable à l'étude de la dynamique fonctionnelle des protéines [118][119][120], de leur structuration en domaines [121][122][123], et de changements conformationnels de grande ampleur [116][124][125].

Les interactions entre pseudo-atomes voisins sont donc modélisées sous la forme de potentiels harmoniques afin de constituer un réseau élastique [114]. Tous les pseudo-atomes distants de moins de 9 Å dans la structure de départ interagissent via un ressort de raideur unique, $\gamma=0.6$ kcal mol⁻¹ Å⁻², et dont la longueur au repos est la distance initiale entre les pseudo-atomes. Par définition, la structure de départ du système (soit l'une des structures caractéristiques sélectionnées à l'étape précédente) correspond donc à son minimum d'énergie globale.

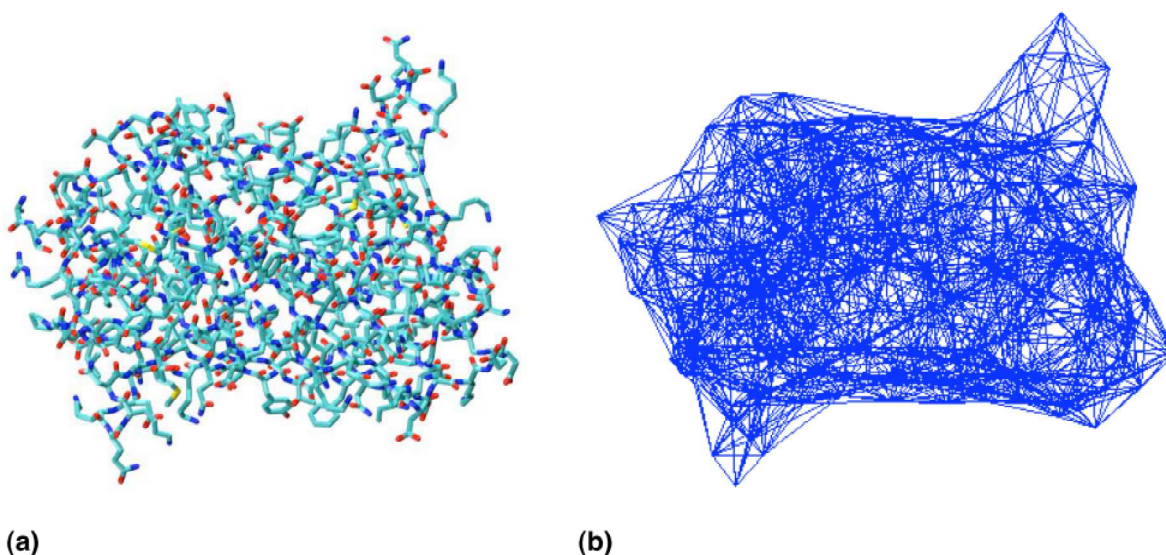


Figure 16 Exemple de réseau élastique appliqué à la Green Fluorescent Protein :

(a) Représentation tout-atome,

(b) Réseau élastique construit à partir des carbones α situés à moins de 10 Å (source : cf [126]).

II.2.3 Dynamique Brownienne

Nos simulations utilisant le réseau de ressort suivent un algorithme de dynamique Brownienne. Le solvant y est représenté de manière implicite, via les termes de diffusion et de déplacement aléatoire dans l'équation du mouvement [127] et les interactions hydrodynamiques sont intégrées via un tenseur de diffusion [128]. L'équation du mouvement dont dépend le déplacement de chaque particule du système suit l'équation d'Ermak et McCammon [127], à savoir :

$$r_i = r_i^0 + \frac{\sum_j D_{ij}^0 F_j^0}{kT} \Delta t + R_i(\Delta t)$$

Avec :

- r_i et r_i^0 correspondant respectivement aux vecteurs positions de la particule i avant et après un pas de temps Δt ,
- D_{ij} un tenseur de diffusion dépendant de la configuration du système,
- F_i correspondant aux forces appliquées sur la particule i ,
- $R_i(\Delta t)$ un déplacement aléatoire suivant une distribution gaussienne, ayant une valeur moyenne nulle, et dont la covariance est définie par :

$$\langle R_i(\Delta t) R_j(\Delta t) \rangle = 2 D_{ij}^0 \Delta t$$

Afin de décrire correctement la dynamique du système, les interactions hydrodynamiques entre particules sont intégrées à l'équation via le tenseur de diffusion D_{ij} reprenant la formule de Rotne-Prager [129]. L'usage d'un modèle de simulation combinant une représentation réduite des protéines et un modèle de solvant implicite nous permet d'utiliser un pas de temps $\Delta t = 10\text{fs}$, soit nettement supérieur à celui employé dans une dynamique moléculaire tout-atome (usuellement $\Delta t = 2\text{fs}$) [130].

II.2.4 Calculs des profils de rigidité des protéines représentées en gros-grain

Chaque simulation de dynamique Brownienne est implémentée pour 200 000 pas, avec un intervalle de temps de 10fs et pour une température de 300 K. La constante de force associée à chacun des pseudo-atomes est ensuite calculée selon l'équation suivante :

$$k_i = \frac{3 k_B T}{\langle (d_i - \langle d_i \rangle)^2 \rangle}$$

Avec :

- Les accolades signalant une valeur moyenne calculée sur l'ensemble de la simulation,
- k_B la constante de Boltzmann,
- d_i la distance moyenne de la particule i aux particules j de la protéine (en excluant les pseudo-atomes qui appartiennent au même résidu m que la particule i).

Les distances entre pseudo-atomes correspondant aux carbones α des résidus adjacents sont également exclues du calcul de cette distance moyenne. La constante de force associée à chaque résidu de la protéine correspond simplement à la constante de force moyenne calculée sur l'ensemble des constantes de forces des chacun des pseudo-atomes constituant le résidu. À partir de là, il est possible de décrire les propriétés mécaniques à l'échelle du résidu d'une protéine via un *profil de rigidité* (cf exemple Figure 17), qui représente les constantes de forces (exprimées en kcal mol⁻¹ Å⁻²) de chacun des résidus le long de la séquence protéique. Les pics de rigidités permettent la mise en évidence de résidus susceptibles d'être impliqués dans l'activité de l'enzyme. Ainsi, il a été montré que les résidus du site catalytique d'une enzyme présentent en moyenne une rigidité accrue par rapport au reste de la protéine (cf Figure 17 B). Une perturbation de la rigidité de ces résidus peut expliquer une perturbation de l'activité catalytique [126][131].

Dans la perspective des diverses applications biotechnologiques évoquées (synthèse biocatalytique, biosenseurs et biopiles) basées sur l'immobilisation d'enzymes sur surface, il est nécessaire d'évaluer l'impact qu'a l'adsorption de ces enzymes sur leur structure, dynamique interne et fonction. La compréhension de ces phénomènes à l'échelle moléculaire est cruciale pour optimiser ces applications technologiques.

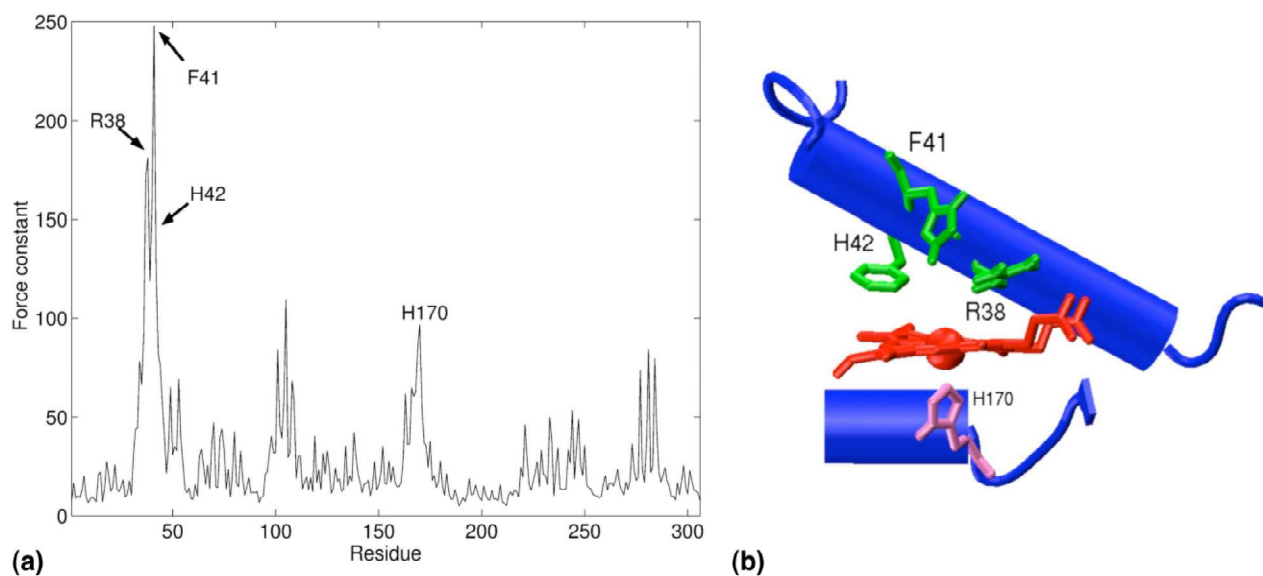


Figure 17 Exemple de profil de rigidité :

- (a)** Profil de rigidité de la peroxydase C du raifort (ou HRP, pour Horseradish Peroxidase C), les résidus annotés sont situés au niveau du site actif,
- (b)** Vue agrandie du site actif de HRP comprenant les résidus rigides identifiés sur la figure précédente et le cofacteur hème en rouge (source : cf [126]).

Afin d'acquiescer cette meilleure compréhension, nous avons étudié la flexibilité locale à l'échelle des acides aminés de la protéine, via une approche théorique combinant une représentation simplifiée « gros-grain » de la protéine, un réseau de ressorts et un algorithme de dynamique Brownienne. Afin de simuler l'impact de l'adsorption de la protéine sur une surface solide, des contraintes externes ont été ajoutées entre les résidus en contact avec la surface (cf Figure 18). Il s'agit ici de ressorts additionnels ajoutés au modèle de réseau de ressorts décrivant les interactions structurales entre particules proches [132].

Ainsi, les résidus d'ancrage – c'est-à-dire les résidus en contact avec la surface rigide – voient leurs distances respectives maintenues constantes au cours de la dynamique Brownienne par ces ressorts de contraintes. Ces ressorts de contraintes ont une constante de rigidité de $42,0 \text{ N.m}^{-1}$, égale à 100 fois la constante utilisée pour les ressorts représentant les interactions structurale.

Dans le cas de notre système, ces simulations sont réalisées grâce à une version modifiée du programme ProPHet (Probing Protein Heterogeneity [68][133][134], (la version non-modifiée est disponible en ligne : <https://bioserv.rpbs.univ-paris-diderot.fr/services/ProPHet/>) développé au LBT.

À l'issue des simulations, nous obtenons le profil de rigidité de la protéine sans contraintes additionnelles utilisé comme référentiel. Nous comparons ce profil de rigidité avec ceux de la protéine avec contraintes additionnelles afin d'obtenir les variations des constantes de force associées à chaque résidu pour différents résidus d'ancrage. L'étude de ces variations nous permet de repérer quels résidus sont susceptibles de subir une rigidification ou une flexibilisation lors d'une adsorption, et donc de caractériser à l'échelle de l'acide aminé les éventuelles perturbations de la dynamique interne de la protéine.

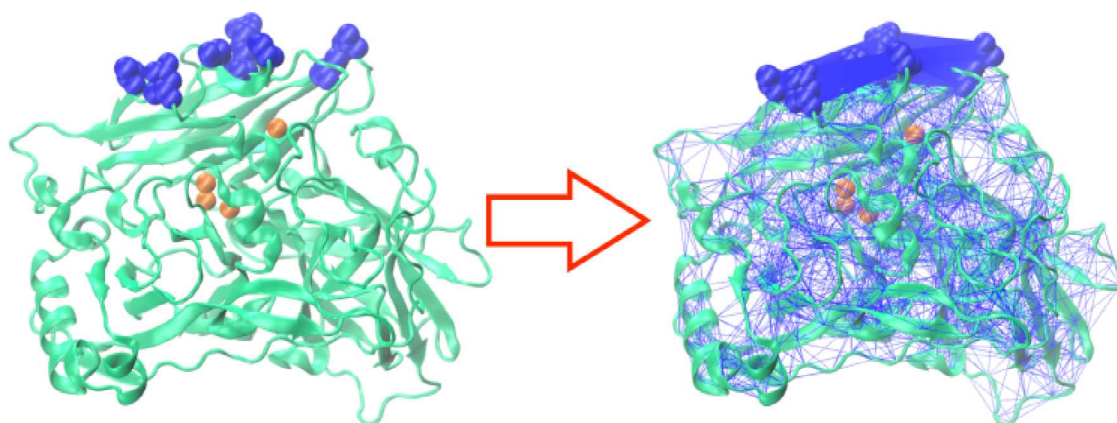


Figure 18 Exemple de réseau de ressorts appliqué à la BOD de *Myrothecium verrucaria* (source : cf [72]).

Les résidus d’ancrage (en contact avec la SAM) sont mis en évidence par des sphères de van der Waals bleues. Les lignes épaisses correspondent aux contraintes fortes exercées entre les résidus d’ancrage.

III. Étude multi-échelle de la β -glucosidase A de *Clostridium cellulovorans*

III.1 Choix de la β -glu comme protéine modèle

La β -glucosidase A (abrégée β -glu) que nous avons choisie comme modèle provient de *Clostridium cellulovorans* [135][136], une bactérie gram-négative mésophile, anaérobie, non-motile, en forme de bâtonnet et étudiée pour son activité cellulolytique. En effet *Clostridium cellulovorans* produit des complexes extra-cellulaires, nommés cellulosomes [137], afin de dégrader la cellulose composant la paroi cellulaire de cellules végétales, et d'exploiter les sucres ainsi produits comme substrat pour alimenter la bactérie. Les cellulosomes sont des complexes comprenant plusieurs enzymes ayant une activité cellulolytique ; dont la β -glu. Les enzymes de la famille des β -D-glucoside glucohydrolase 1 présentent une structure en tonneau TIM, c'est-à-dire un ensemble de feuillets β formant un tonneau β central bordé d'hélices α l'encerclant (cf Figure 19). Cette structure permet de garantir la stabilité du site catalytique situé au niveau du tonneau β (cf Figure 20 A).

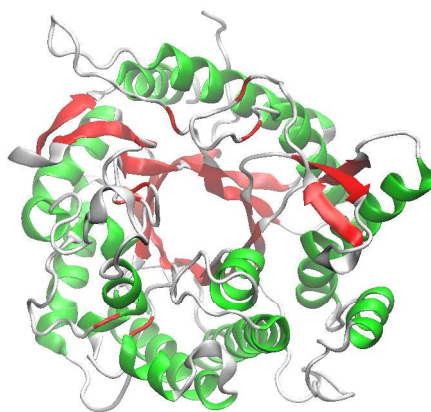


Figure 19 Structure de la β -glu de *Clostridium cellulovorans*, les feuillets β sont affichés en rouge, les hélices α en vert et les boucles en blanc. Sous cet angle, nous pouvons observer le tonneau β situé au cœur de la protéine entouré d'hélices α en périphérie.

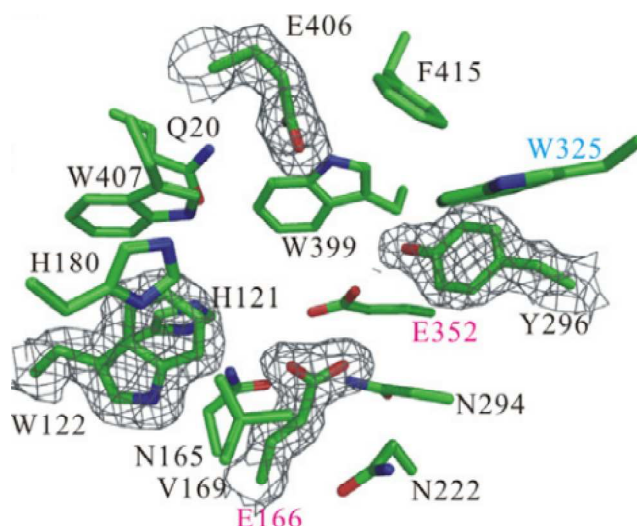
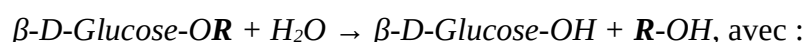


Figure 20 Détail du site catalytique de la β -glu de *Clostridium cellulovorans* (source : cf [138]).

La β -glu catalyse l'hydrolyse des liaisons β -glycosidiques des disaccharides et d'autres molécules dérivées du glucose, convertissant ainsi de courts oligosaccharides en monomères de glucose [138], via la réaction suivante :



- $\beta\text{-D-Glucose-OR}$: un oligosaccharide consistant en une chaîne de n $\beta\text{-D-Glucoses}$,
- R : n-1 $\beta\text{-D-Glucoses}$, l'hydrolyse résultant en la libération du $\beta\text{-D-Glucose}$ terminal.

Cette réaction est catalysée au niveau du site catalytique de l'enzyme, situé au centre du tonneau TIM stabilisant ledit site catalytique (cf Figure 19 et Figure 20 A).

Nous avons choisi cette enzyme comme protéine modèle car elle est notamment étudiée dans la perspective d'applications de production d'éthanol par dégradation de cellulose via des procédés de fermentation à l'état solide ; éthanol pouvant être employé dans l'élaboration de bio-carburants [139]. Or dans ce processus de production de bioéthanol à partir de matière organique lignocellulosique, la réaction catalysée par la β -glu est considérée comme l'étape cinétiquement limitante [139]. Ceci a motivé l'étude expérimentale de cette enzyme comme protéine modèle immobilisée de façon covalente (par formation d'une liaison via deux cystéines en positions 55 et 226) sur une surface fonctionnalisée par une SAM terminée par une fonction maléimide ($\text{H}_2\text{C}_2(\text{CO})_2\text{NH}$, cf Figure 20 B), l'étude de l'orientation ainsi que de l'activité de la β -glu est réalisée par un protocole couplant spectroscopie SFG (sum frequency generation) et microscopie à

fluorescence [140]. Cette étude a montré une diminution significative de l'activité de la β -glu fixée de façon covalente (l'activité étant évaluée à 53 % de l'activité de la β -glu en solution), émettant l'hypothèse que ceci était potentiellement dû à l'orientation de l'enzyme qui rendait moins accessible son site catalytique. Cette approche expérimentale apporte donc des informations sur l'orientation de l'enzyme sur la surface ainsi que sa baisse d'activité, mais n'a pas accès à des informations à l'échelle atomique et donc ne peut pas identifier avec certitude la cause exacte de cette diminution d'activité.

La structure de la β -glu obtenue par cristallographie aux rayons X et que nous avons utilisée pour préparer nos simulations est issue de la Protein Data Bank (et correspond à l'identifiant PDB 3AHX : <https://www.rcsb.org/structure/3AHX>) [138].

III.2 Orientations initiales de la β -glu

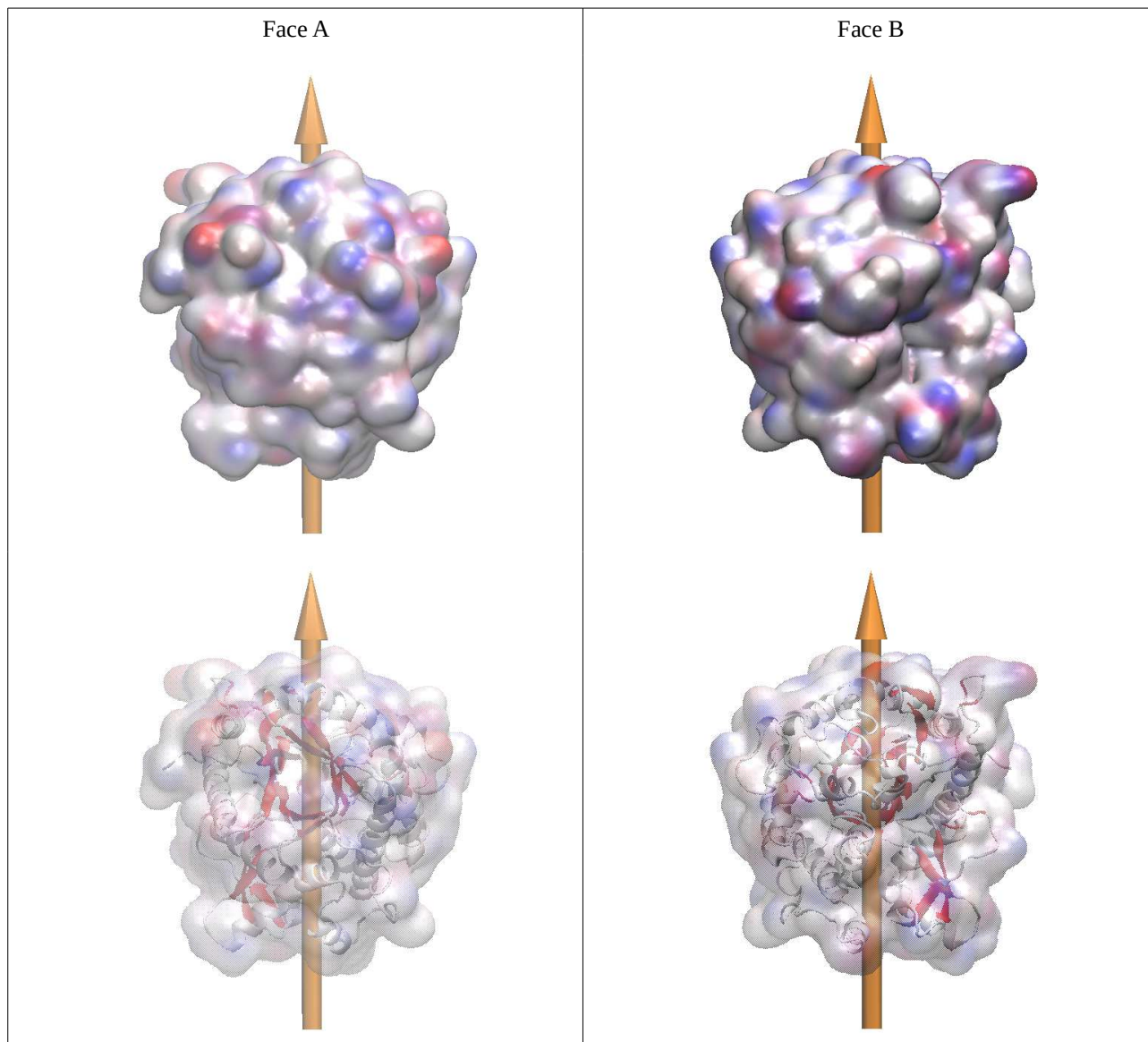


Figure 21 Surface électrostatique de la β -glu montrée selon deux orientations opposées (obtenues par une rotation de 180° autour de l'axe du moment dipolaire, montré en orange). Les régions chargées positivement sont affichées en bleu, celles chargées négativement sont affichées en rouge. Les charges ont été calculées via l'outil PDB2PQR [141].

Sachant que nous souhaitons étudier la protéine adsorbée sur la surface fonctionnalisée, et non le processus d'adsorption lui-même, nous ne souhaitons pas commencer la dynamique moléculaire avec la β -glu éloignée de la surface et espérer qu'elle finisse par s'y adsorber. La visualisation de la répartition des charges électrostatiques à la surface de la β -glu (cf Figure 21) ne met pas en

évidence de région étendue chargée positivement ou négativement, mais plutôt une répartition homogène des charges de surface. L'orientation de la β -glu sur une surface fonctionnalisée par une SAM ne peut donc pas être facilement prédite par la nature de la fonction terminale des molécules de SAM. Ainsi, nous avons fait le choix de débiter six dynamiques moléculaires en adsorbant la β -glu selon six orientations différentes (cf Figure 22). L'orientation du moment dipolaire d'une enzyme peut être un facteur déterminant dans l'orientation d'adsorption qu'elle adopte [45]. C'est pour cette raison que notre intention initiale était de nommer ces orientations selon l'angle que le moment dipolaire initial de l'enzyme fait avec la surface : une orientation (nommée z0) aurait eu le moment dipolaire dirigé à l'opposé de la surface, une autre orientation (nommée z180) aurait eu le moment dipolaire dirigé en direction de la surface ; et les quatre autres orientations respectivement nommées x0z90, x90z90, x180z90, x270z90 auraient eu un moment dipolaire parallèle à la surface, et seraient obtenues par quatre rotations successives selon un pas de 90° et autour de l'axe X (cet axe étant parallèle à la surface).

Cependant les six orientations résultant de ce choix initial auraient eu comme inconvénient de présenter un faible nombre de résidus de la β -glu en contact initial avec la surface, donc un risque de désorption instantanée. C'est pourquoi nous avons défini la première orientation z0 (cf Figure 22 A) afin de maximiser ces contacts, et défini les cinq autres orientations en fonction de l'orientation z0 : par une rotation de 180° selon l'axe X pour l'orientation z180 (cf Figure 22 B), et par une rotation de 90° selon l'axe Y pour l'orientation x0z90 (cf Figure 22 C) suivie d'une à trois rotations successives de 90° selon l'axe X pour les orientations x90z90, x180z90 et x270z90 (respectivement cf Figure 22 D, E et F).

Nous réaliserons également une dynamique moléculaire supplémentaire modélisant la β -glu uniquement dans le solvant, cette dernière dynamique ayant le rôle de témoin. Nous émettons comme hypothèse que la protéine est dans un état fonctionnel lorsqu'elle est en solution, et qu'une trajectoire montrant une modification de cet état (qu'elle soit détectée via une variation du RMSD ou de la dynamique interne de la protéine évaluée par le calcul de profils de rigidités, cf Figure 42 et Figure 43) serait un argument en faveur d'une perte de l'activité catalytique de la β -glu. Réciproquement, une trajectoire ne montrant aucune modification de l'état de la protéine adsorbée serait un argument en faveur d'une conservation de l'activité catalytique de la β -glu.

Le nombre d'atomes correspondant à ces sept trajectoires est consultable en Annexe 2.

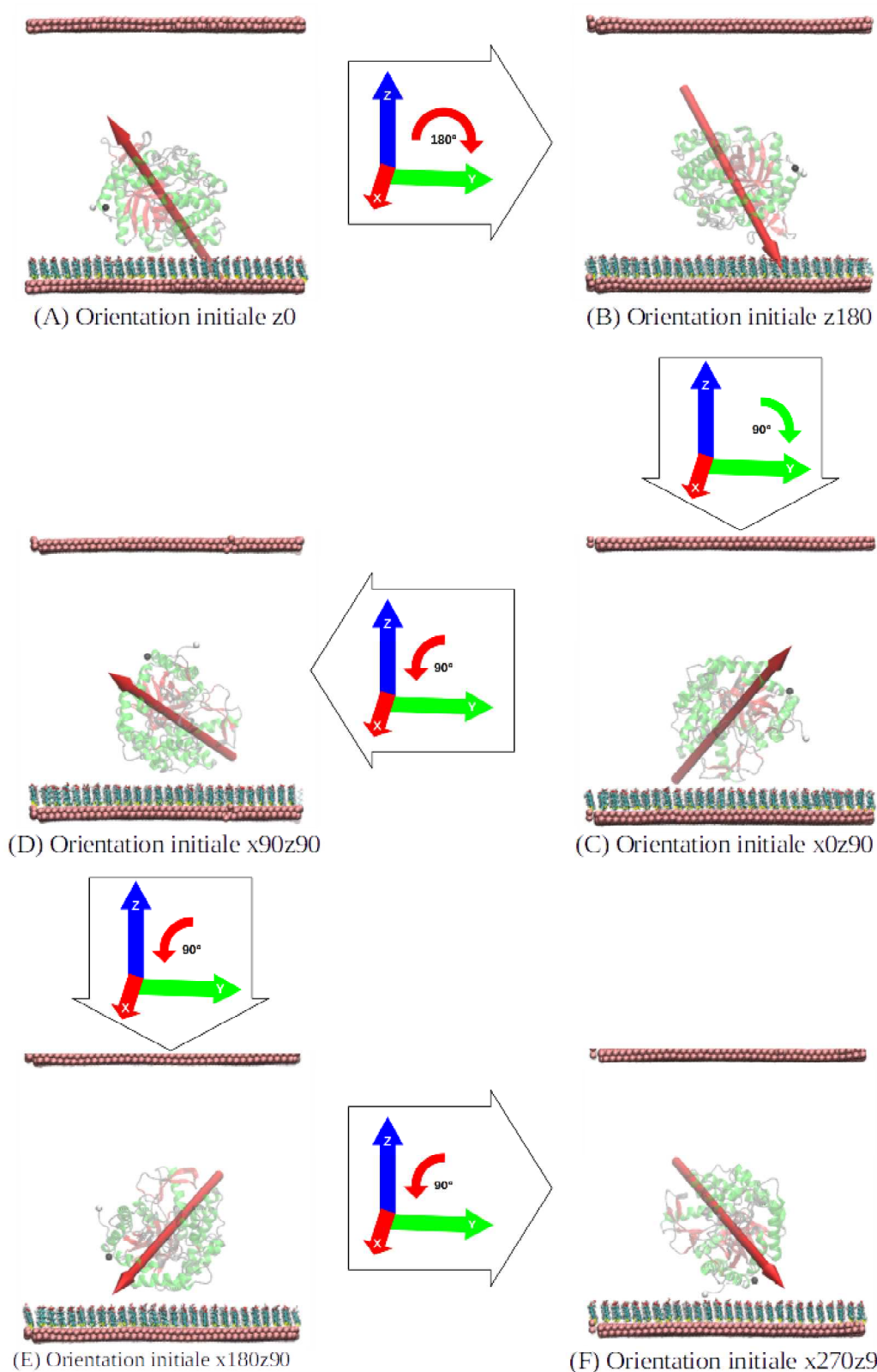


Figure 22 Série de rotations employées pour obtenir les orientations initiales de la β -glu adsorbée sur la SAM : les rotations sont représentées en rouge lorsqu'elles sont opérées autour de l'axe X et en vert autour de l'axe Y (l'azote de l'extrémité N-TER est affiché en blanc et le carbone de l'extrémité C-TER est affiché en noir comme repères visuels).

III.3 Visualisation des trajectoires

Notre première constatation, en visualisant les six trajectoires réalisées de la β -glu adsorbée selon six orientations sur une surface d'or fonctionnalisée par une SAM d'hexanol thiol ($\text{S}(\text{CH}_2)_6\text{OH}$), est que les adsorptions ne semblent pas stables.

Dans la trajectoire correspondant à l'orientation $z0$, la β -glu se réoriente légèrement sur la surface de la SAM après 10 ns de trajectoire, pour ensuite se désorber après 45 ns jusqu'à la fin de la trajectoire.

Dans la trajectoire correspondant à l'orientation $z180$, la β -glu se désorbe presque immédiatement pour s'adsorber à nouveau sur la SAM de 13 ns à 26 ns, puis se désorbe à nouveau. À partir de 45 ns de trajectoire, la β -glu se rapproche de l'extrémité la plus éloignée de la SAM de la boîte de simulation, donc de la surface d'or nu, et s'y adsorbe de façon stable après 61,5 ns jusqu'à la fin de la trajectoire.

Dans la trajectoire correspondant à l'orientation $x0z90$, la β -glu conserve plus ou moins son orientation initiale au contact de la SAM jusqu'à sa désorption après 76 ns de simulation. La β -glu s'adsorbe à nouveau sur la SAM selon une orientation différente après 95 ns et reste adsorbée jusqu'à la fin de la trajectoire. Nous remarquons que l'orientation finale de cette trajectoire semble proche de l'orientation initiale $z180$, cette similitude apparente demande à être confirmée, d'autant plus que lors de la trajectoire correspondant à l'orientation $z180$ l'adsorption sur la SAM ait été très court.

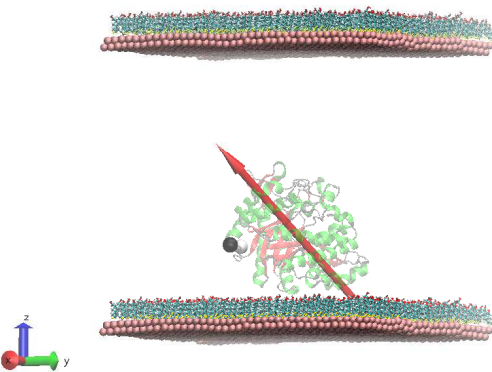
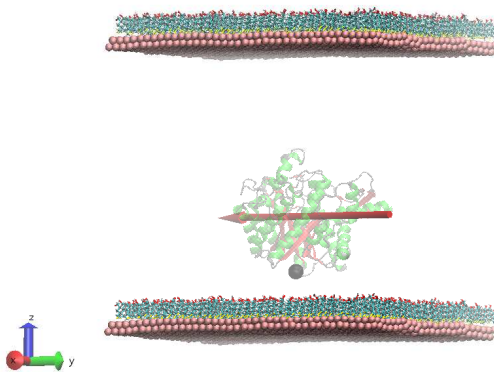
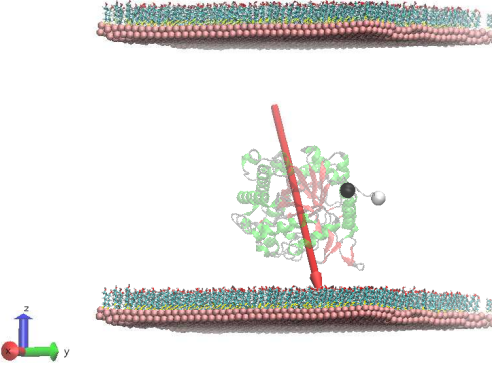
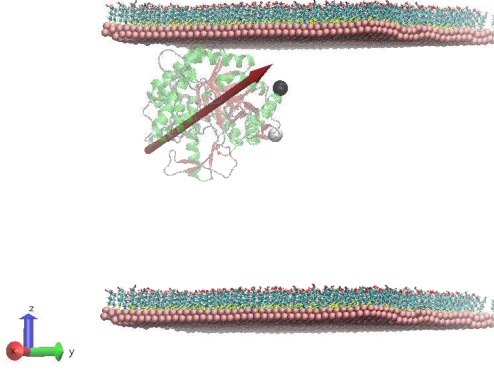
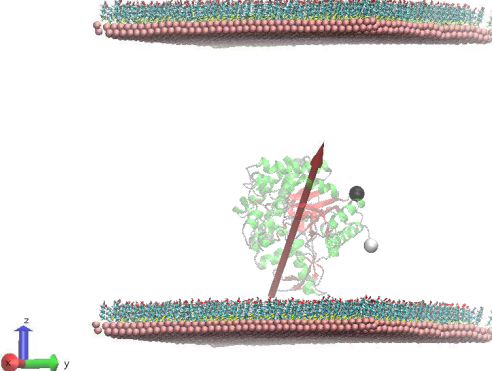
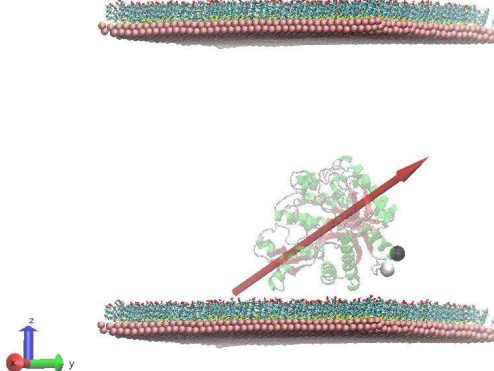
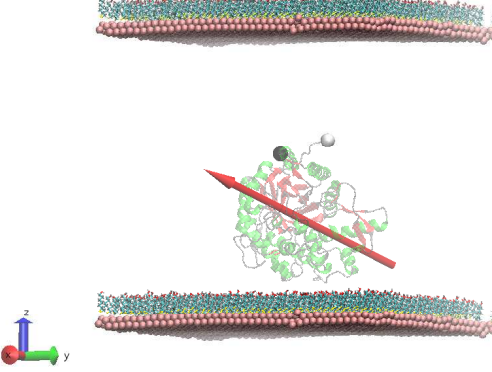
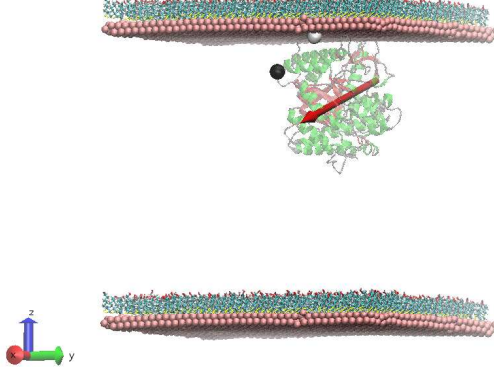
Dans la trajectoire correspondant à l'orientation $x90z90$, la β -glu se désorbe immédiatement, puis s'adsorbe à nouveau de façon transitoire selon une orientation différente de 10 ns à 17 ns de la trajectoire. Une approche de la surface d'or nu a lieu à 38 ns, puis de nouveaux contacts durables sont observés entre les résidus de la β -glu et la surface d'or. L'adsorption dure jusqu'à la fin de la trajectoire.

Dans la trajectoire correspondant à l'orientation $x180z90$, la β -glu se désorbe après 4 ns de trajectoire. La β -glu rentre en contact avec la surface d'or nu après 19 ns de trajectoire. Cette

nouvelle adsorption se stabilise jusqu'à 40 ns de trajectoire, puis perdure jusqu'à la fin de la simulation.

Dans la trajectoire correspondant à l'orientation $x270z90$, la β -glu se désorbe temporairement entre 13 ns et 18 ns de trajectoire, sans toutefois s'éloigner beaucoup de la SAM. Entre 18 ns et 46 ns l'adsorption selon l'orientation initiale se maintient mais semble instable, en effet l'adsorption de la protéine sur la SAM semble principalement maintenue par deux points de contacts éloignés à la surface de la β -glu entre lesquels elle bascule rapidement. Après 46 ns, la β -glu se désorbe et reste en solution jusqu'à la fin de la trajectoire, à l'exception d'un très bref contact avec la SAM à 96,2 ns.

À l'issue de cette visualisation qualitative des trajectoires, nous pouvons déjà définir deux ensembles de trajectoires : d'une part celles où la β -glu s'est adsorbée sur la face non-fonctionnalisée de la surface d'or (donc en contact direct avec les atomes d'or) et reste adsorbée jusqu'en fin de trajectoire, c'est-à-dire les trajectoires correspondant aux orientations initiales $z180$, $x90z90$ et $x180z90$ (cf orientations initiales et finales Figure 23 B, Figure 23 D et Figure 23 E) ; et d'autre part les trajectoires sans aucun contact direct avec l'or, où la β -glu est donc soit en contact avec la SAM, soit en solution, c'est-à-dire les trajectoires correspondant aux orientations initiales $z0$, $x0z90$ et $x270z90$ (cf orientations initiales et finales Figure 23 A, Figure 23 C et Figure 23 F).

	Orientations initiales	Orientations finales
(A) z0		
(B) z180		
(C) x0z90		
(D) x90z90		

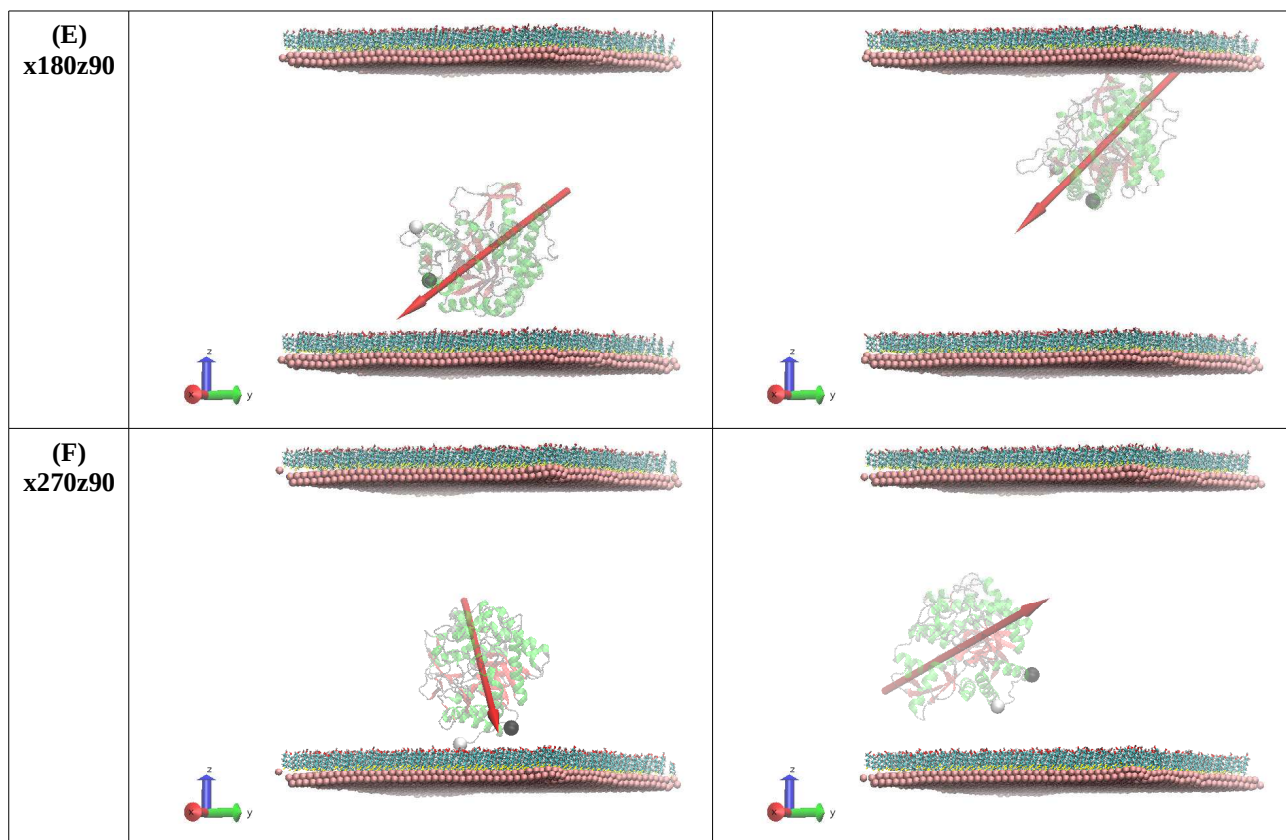


Figure 23 Orientations initiales et finales de la β -glu initialement adsorbée selon six orientations sur la surface d'or fonctionnalisée (afin de visualiser plus aisément les orientations le carbone α de l'extrémité C-TER de l'enzyme est mis en évidence en noir tandis que l'azote de l'extrémité N-TER est mis en évidence en blanc et le moment dipolaire est représenté sous forme d'un vecteur rouge)

III.4 Stabilité conformationnelle de la β -glu

III.4.1 Étude du RMSD

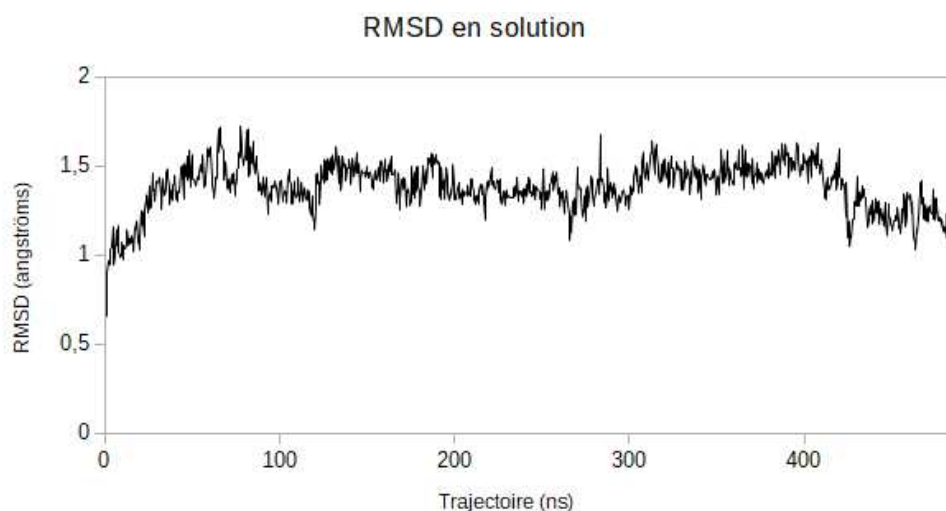


Figure 24 Suivi du RMSD au cours de la trajectoire de la β -glu seule en solution, calculé sur les carbones α de la protéine.

La trajectoire de la β -glu seule en solution (sans SAM ni surface métallique, cf Figure 24) sert de référence aux autres trajectoires. À noter, contrairement aux autres trajectoires incluant la surface fonctionnalisée durant 100 ns chacune, cette trajectoire dure 485 ns. En observant le RMSD de la trajectoire de la β -glu seule en solution (cf Figure 24) ou selon les six orientations (cf Figure 25 A), nous constatons tout d'abord que le RMSD ne dépasse pas 2 Å ce qui indique que la structure tridimensionnelle de la protéine ne subit pas de perturbation majeure.

Or, comme indiqué précédemment, la β -glu présente une structure de ses feuillets β en tonneau TIM, stabilisant le cœur protéique de l'enzyme et par là même stabilisant le site catalytique de la β -glucosidase (cf Figure 19 et Figure 20). Nous nous attendons donc à ce que le RMSD du tonneau β central varie particulièrement peu, ce qui est confirmé par la Figure 25 B, où nous pouvons constater que le RMSD est quasi-constant pour les six trajectoires (pour une valeur de 0,5 Å), tandis que le RMSD correspondant au reste de la protéine (cf Figure 25 C) suit les mêmes variations qu'observées pour le RMSD calculé sur l'ensemble de la β -glu. Ceci confirme que la structure du tonneau β central est très stable, tandis que les variations décelables par le RMSD proviennent de régions périphériques de la protéine.

Nous notons au passage que la trajectoire x180z90 présente nettement plus de variabilité dans son RMSD (cf Figure 25 A, courbe bordeaux et Figure 25 C), notamment après son adsorption précoce sur la surface d'or à partir de 19 ns de trajectoire.

La seule étude du RMSD global de la β -glu ne permet pas de distinguer les états de la protéine adsorbée sur la SAM, adsorbée sur la surface d'or nu ou bien désorbée. Cela nous a poussé à adopter des approches complémentaires : d'une part, se concentrer sur le RMSD de zones plus spécifiques (telles que le tonneau β constituant le noyau hydrophobe de la β -glu, ou a contrario les régions périphériques de la protéine potentiellement plus impactées par une potentielle déformation), d'autre part étudier les trajectoires selon des critères complémentaires.

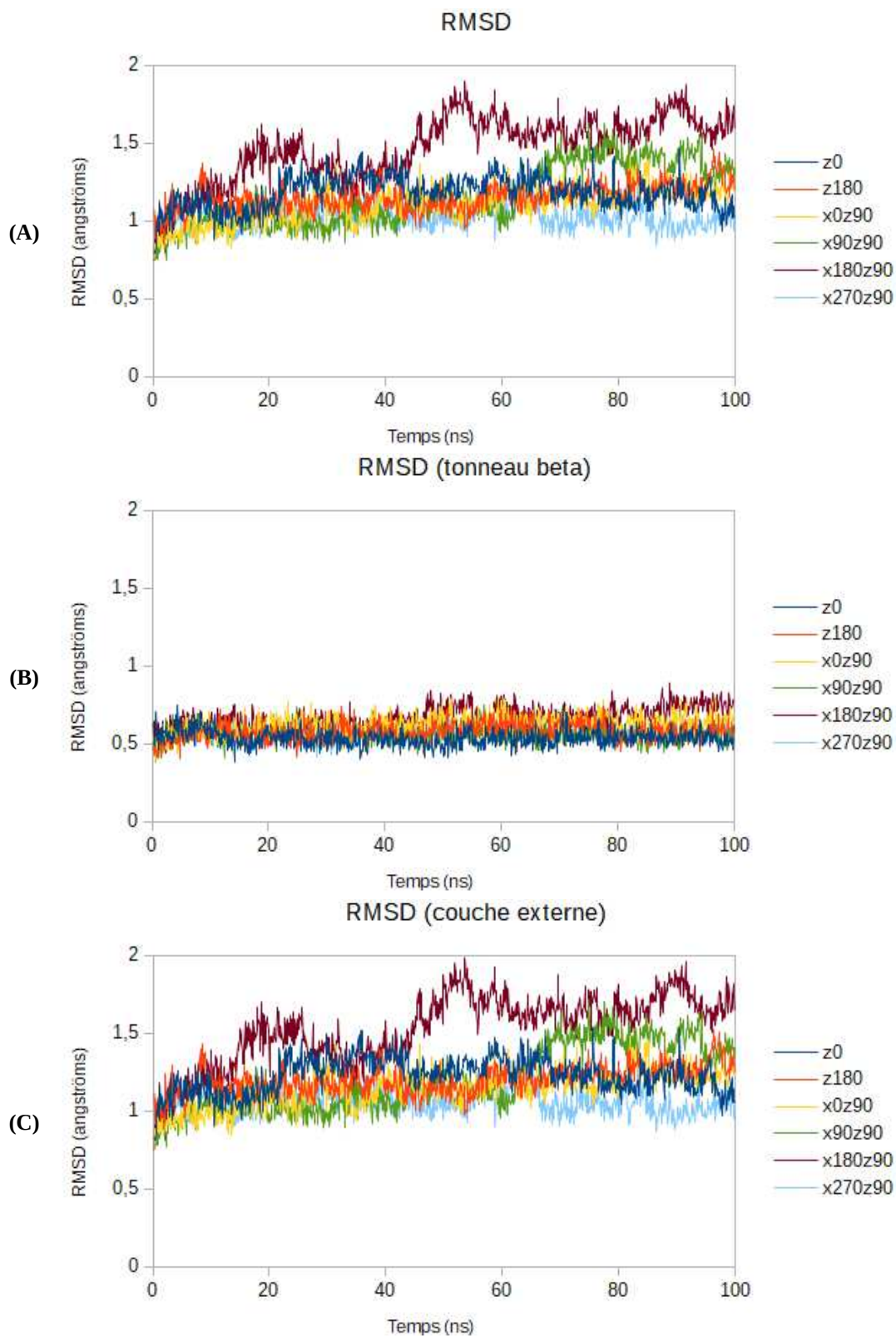


Figure 25 Suivi du RMSD au cours des trajectoires de la β -glu adsorbée selon les six orientations, calculé sur les carbones α de la protéine :
(A) de la protéine entière ; **(B)** du tonneau β central ; **(C)** de la couche externe de la protéine.
 (cf Annexe 3 pour consulter les courbes séparément pour la protéine entière)

III.4.2 Étude du rayon de giration

L'observation directe du rayon de giration de la β -glu en solution (cf Figure 26 A) et sa comparaison avec les rayons de giration de la protéine adsorbée selon six orientations (cf Figure 26 B) ne permet pas de dire si des changements significatifs ont eu lieu au cours des trajectoires. Les valeurs de rayon de giration varient peu, ce qui implique que la protéine ne subit pas de déformation majeure.

L'étude de la densité de répartition des rayons de giration – c'est-à-dire l'intégrale d'un histogramme montrant la proportion des valeurs d'un jeu de données comprises dans une série d'intervalles – nous permet de visualiser la concentration des valeurs le long de l'intervalle. Ici, pour l'ensemble des trajectoires l'ensemble des valeurs de rayons de giration sont comprises entre 21 et 21,6 Å, d'où la difficulté de discriminer les graphes (cf Figure 26).

Nous observons une concentration des rayons de giration des protéines adsorbées autour de valeurs légèrement inférieures par rapport à la protéine en solution, cependant la différence la plus notable est l'étalement de certaines distributions des rayons de giration pour les six trajectoires où la protéine commence à proximité de la surface.

Les valeurs de rayon de giration pour la trajectoire de la β -glu en solution sont centrées autour d'un pic à 21,4 Å (cf Figure 27).

Les trajectoires correspondant aux orientations initiales z180, x90z90 et x180z90 (qui finissent adsorbées sur la surface métallique jusqu'à la fin de la trajectoire ; cf Figure 27 ; respectivement courbes orange, verte et bordeaux) ont les valeurs de rayons de giration les plus faibles, et des distributions relativement étalées. La diminution du rayon de giration pourrait refléter une compaction de la protéine, notamment au niveau de sa face en contact avec la surface métallique, mais comme le montre le suivi des rayons de giration au cours du temps (cf Figure 26) cette diminution est très faible. Plus intéressant : l'étalement des courbes de densité de répartition correspondant aux trajectoires z180, x90z90 et x180z90 (cf Figure 27 ; respectivement courbes orange, verte et bordeaux) indique une plus grande variabilité des rayons de giration de la β -glu, et donc indirectement une plus grande diversité de conformations adoptées par la protéine.

Les trajectoires correspondant aux orientations initiales x0z90 et x270z90 (qui restent le plus longtemps adsorbées sur la SAM ; cf Figure 27 ; respectivement courbes jaune et bleu ciel) ont des

distributions similaires ; cependant la trajectoire x0z90 semble avoir un rayon de giration légèrement supérieur à la trajectoire x270z90.

Enfin, la trajectoire correspondant à l'orientation initiale z0 (qui se désorbe vers 45 ns et reste en solution jusqu'en fin de trajectoire ; cf Figure 27 ; cf courbe bleu marine) a la distribution de rayons de giration la plus semblable à celle de la protéine en solution.

Bien que les six trajectoires où la β -glu commence adsorbée sur la SAM présentent des distributions de rayon de giration différentes de celle de la trajectoire où la protéine est seule en solution, ces distributions seules ne permettent pas de discriminer les trajectoires où la protéine finit adsorbée sur l'or (z180, x90z90 et x180z90) des autres.

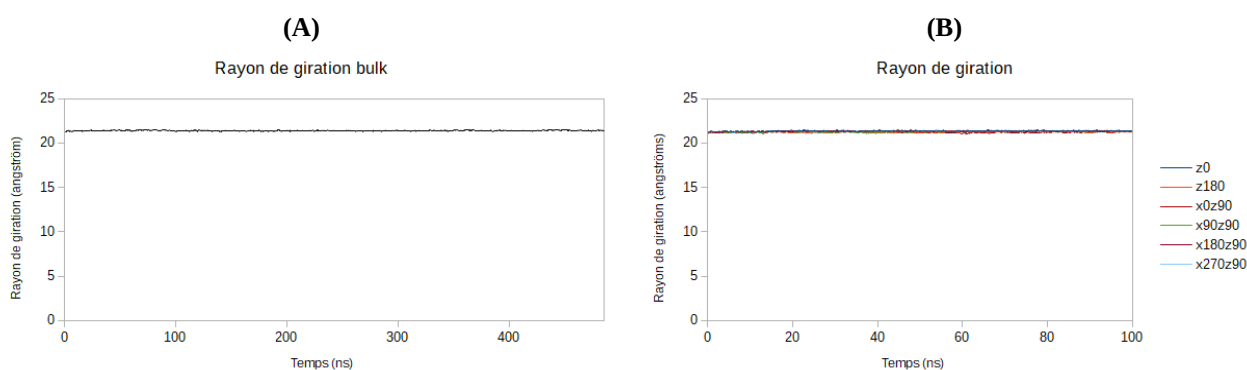


Figure 26 Suivi du rayon de giration :

(A) pour la trajectoire de la β -glu seule en solution,

(B) pour les trajectoires de la β -glu adsorbée sur la SAM selon les six orientations.

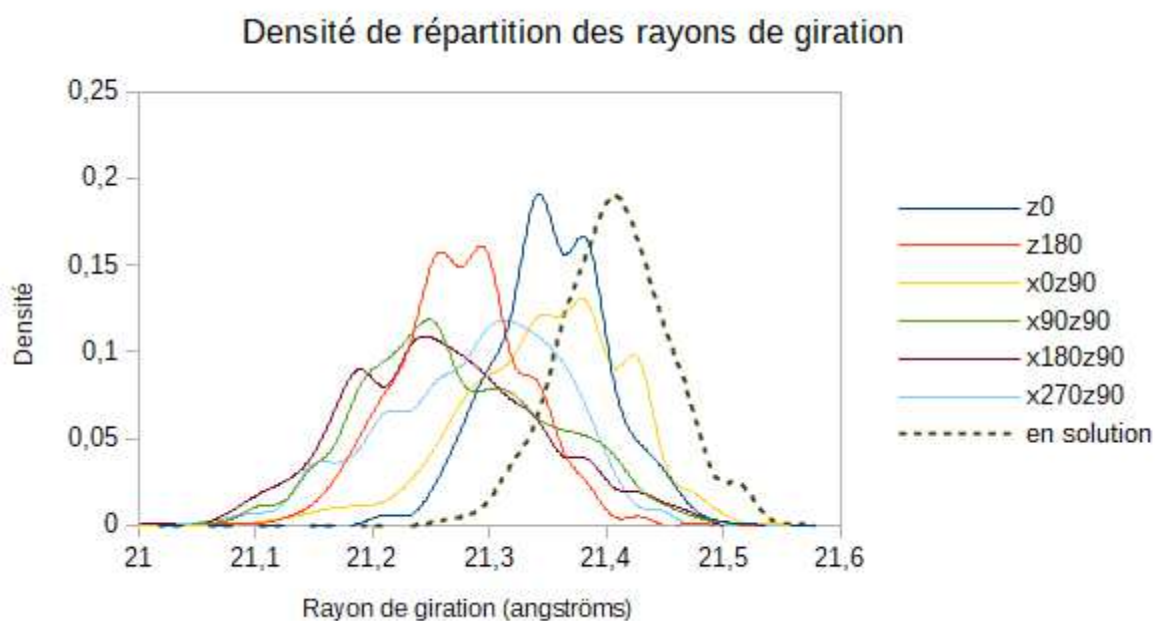


Figure 27 Suivi de la densité de répartition des rayons de giration pour les trajectoires de la β -glu adsorbée sur la surface d'or fonctionnalisée selon les six orientations.

III.5 Position de la β -glu au cours des trajectoires

III.5.1 Suivi de la distance entre le centre de masse de la β -glu et la SAM

En observant la distance entre la SAM et le centre de masse de la β -glu au cours de la trajectoire (cf Figure 28), il est possible d'estimer le temps passé à proximité de la SAM, le moment de désorption et l'éventuelle adsorption sur la face non-fonctionnalisée de la surface d'or.

III.5.1.1 Distance entre SAM et centre de masse de la protéine s'adsorbant sur l'or nu

Les profils des trajectoires correspondant aux orientations z180, x90z90 et x180z90 (cf Figure 28 ; respectivement courbes orange, verte et bordeaux) présentent chacun une étape proche de la surface d'or, repérable par une valeur plateau à grande distance vis à vis de la SAM (le calcul de la

distance ne prenant pas en compte la périodicité du système), correspondant aux étapes de chacune de ces trajectoires où la β -glu s'est adsorbée à la face nue de la surface d'or.

Nous remarquons tout d'abord une différence d'environ 5 Å entre la valeur de fin de simulation correspondant à la trajectoire z180 et les trajectoires x90z90 et x180z90, mais cette différence est imputable au fait que la coordonnée maximale atteignable dans la boîte de simulation de la trajectoire z180 (109,6 Å) est inférieure aux coordonnées maximales atteignables dans les boîtes de simulation des trajectoires x90z90 et x180z90 (respectivement 116,9 Å et 116,2 Å, cf tableau récapitulatif Tableau 2).

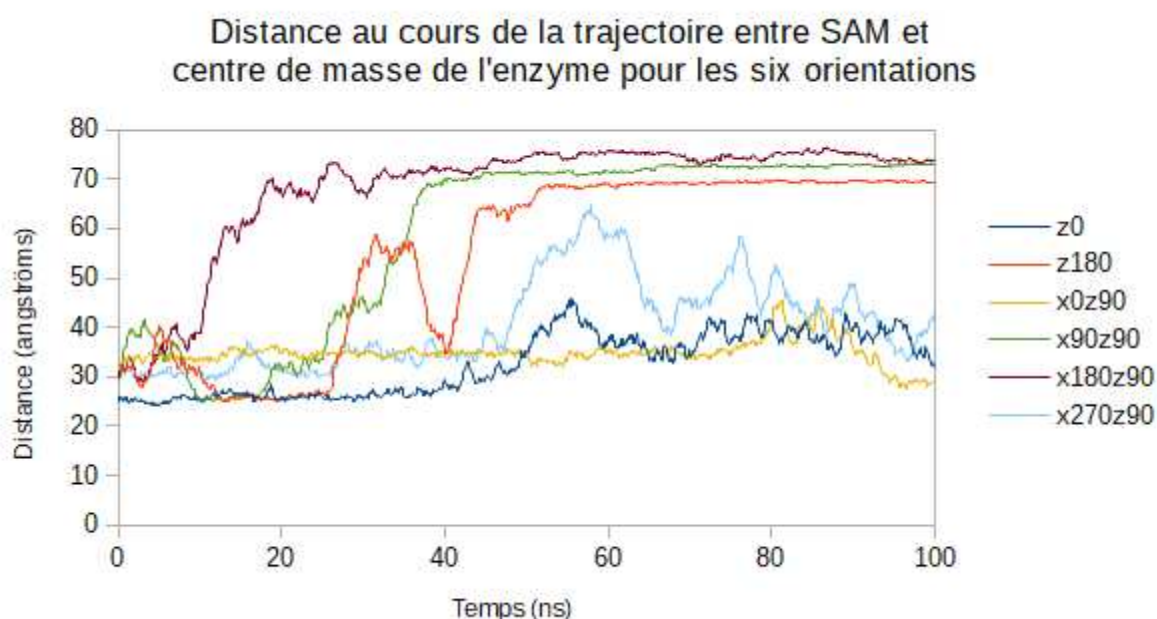


Figure 28 Suivi de la distance entre SAM et centre de masse de la β -glu au cours des six trajectoires.

Tableau 2 Dimension de la boîte périodique selon l'axe Z (en angströms) :

Trajectoire	z0	z180	x0z90	x90z90	x180z90	x270z90
Dimension Z de la boîte périodique (angströms)	110,3	109,6	115,8	116,9	116,2	109,6

Ensuite, nous remarquons que lors de la trajectoire x90z90 à partir de 38 ns où commence l'adsorption sur la surface d'or nue, la distance entre la SAM et le centre de masse de la β -glu reste quasi constante (autour de 73 Å les variations les plus importantes étant de l'ordre de 1 Å). Par contre, dans le cas de la trajectoire z180, nous observons un premier plateau entre 45 ns et 52 ns à

64 Å (avec des variations de l'ordre de 3 Å), avant de remonter vers un deuxième plateau de 52 ns à la fin de la trajectoire autour de 69 Å (quasi constante). Dans le cas de la trajectoire z180 l'adsorption semble donc se faire en deux étapes. Le premier contact résulte en une étape de transition durant 7 ns (correspondant au premier plateau entre 45 ns et 52 ns) avant d'atteindre une nouvelle conformation plus stable rapprochant le centre de masse de la β -glu de la surface métallique non-fonctionnalisée.

Enfin, dans le cas de la trajectoire correspondant à l'orientation x180z90, l'adsorption sur la surface d'or non-fonctionnalisée semble moins directe. En effet, si la distance entre le centre de masse de la β -glu et la SAM en fin de trajectoire est de 74 Å, la β -glu s'est approchée de la face non-fonctionnalisée de la surface d'or dès 19 ns (où la distance entre SAM et centre de masse atteint 70 Å), puis connaît d'importantes fluctuations (entre 66 Å et 73 Å) jusqu'à 45 ns. S'ensuit une relative stabilisation de cette distance (entre 73 Å et 75 Å), néanmoins la distance reste plus variable que les plateaux observés pour les trajectoires x90z90 et z180.

Cette fluctuation de distance entre SAM et centre de masse après adsorption durable sur la surface d'or nue est liée au fait que l'adsorption a lieu par une région d'aire réduite d'une extrémité la β -glu. Ceci laisse plus de liberté à la protéine de basculer et donc de faire varier la position du centre de masse tout en restant adsorbée. Ceci peut être constaté sur la Figure 29 où les structures sont superposées au niveau du point de contact avec la surface, puis divergent de façon visible, notamment au niveau de la boucle proche de l'extrémité N-TER de la protéine. Le RMSD entre ces deux états est de 4,7 Å.

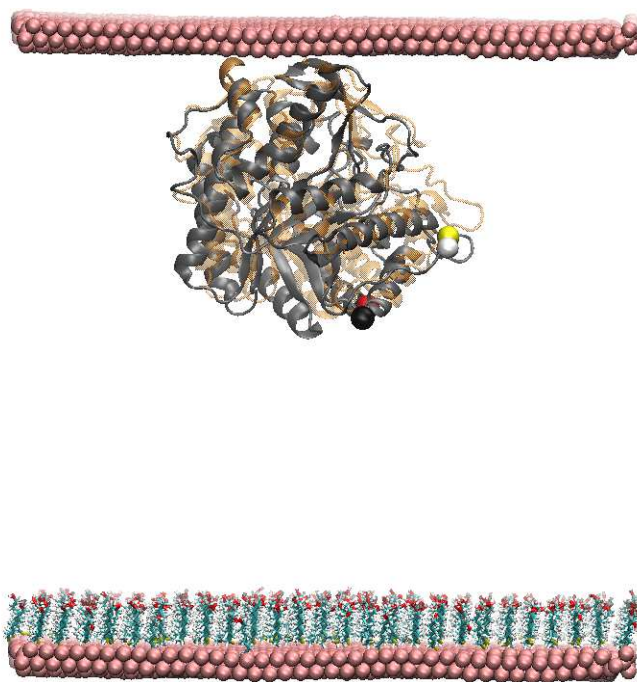


Figure 29 Exemple de déformation de la β -glu adsorbée sur la surface d'or nue lors de la trajectoire x180z90.

En orange et en transparence la structure après 84,5 ns de trajectoire (carbone α de l'extrémité C-TER en rouge et azote de l'extrémité N-TER en jaune).

En gris opaque la structure après 100 ns de trajectoire (carbone α de l'extrémité C-TER en noir et azote de l'extrémité N-TER en blanc).

III.5.1.2 Comportement de la protéine à proximité de la SAM

Chaque trajectoire débutant par la β -glu adsorbée sur la SAM, la valeur de la distance entre centre de masse et SAM est initialement faible (cf Figure 28). Cependant, très tôt dans la trajectoire les profils de distance entre centre de masse et SAM présentent des disparités. Dans la première moitié de la dynamique moléculaire, les trajectoires correspondant aux orientations z180, x90z90 et x180z90 présentent des distances proches de leurs valeurs initiales respectives. Par la suite, lors ces trajectoires la β -glu finit par se désorber de la SAM, puis s'adsorbe à terme sur la face non-fonctionnalisée de la surface d'or. Cependant, de même que l'adsorption sur l'or nu, la désorption de la SAM ne suit pas nécessairement les mêmes étapes pour ces trois trajectoires.

La trajectoire correspondant à l'orientation z180 (cf Figure 28 ; courbe orange) présente un profil de distance entre centre de masse de la β -glu et SAM qui suit tout d'abord pendant 5 ns celui de la trajectoire x180z90 (cf Figure 28 ; courbe bordeaux), bien qu'à partir de 5 ns de dynamique ces profils divergent. Dans la trajectoire x180z90 le centre de masse s'éloigne considérablement de la SAM. Dans la trajectoire z180, le centre de masse s'approche de la SAM et correspond même aux distances quasi-constantes constatées pour la trajectoire z0 entre 12 ns et 25 ns (26 Å de la SAM, correspondant à une ré-adsorption transitoire à la surface de la SAM). Après 25 ns, dans la trajectoire z180 le centre de masse s'éloigne grandement de la SAM (57 Å de la SAM), puis s'approche de nouveau de la SAM pour une très courte période à 40 ns (35 Å de la SAM), puis s'éloigne et amorce rapidement son adsorption sur l'or.

Dans la trajectoire correspondant à l'orientation x90z90 (cf Figure 28 ; courbe verte), l'enzyme connaît également une rapide désorption – le centre de masse de la β -glu s'éloignant quasi-immédiatement de la SAM en début de trajectoire – puis connaît une nouvelle adsorption entre 10 ns et 17 ns (le centre de masse est alors à 26 Å de la SAM). Cette adsorption temporaire est suivie d'une désorption et d'une période en solution (avec une évolution irrégulière de la distance entre le centre de masse et la SAM) avant que la β -glu ne s'adsorbe sur la surface d'or nu.

Enfin, la trajectoire correspondant à l'orientation x180z90 (cf Figure 28 ; courbe bordeaux) comme il a été dit précédemment présente un profil de distance entre le centre de masse de la β -glu et la SAM initialement semblable à celui de la trajectoire z180 (cf Figure 28 ; courbe orange), mais contrairement à cette dernière ne connaît pas de ré-adsorption sur la SAM.

Lorsque nous examinons les distances des trois autres trajectoires (z0, x0z90 et x270z90) où la β -glu ne finit pas adsorbée sur la face non-fonctionnalisée de la surface d'or, nous pouvons également nous rendre compte que toutes les trajectoires ne présentent pas la même évolution de cette distance.

La trajectoire correspondant à l'orientation z0 (cf Figure 28 ; courbe bleu marine) présente une distance entre le centre de masse de la β -glu et la SAM faible et quasi-constante (26 Å de la SAM) jusqu'à la désorption de la β -glu après 45 ns de dynamique moléculaire où la distance entre centre de masse et SAM devient plus irrégulière. Nous notons que la désorption à 45 ns semble précédée à partir de 42 ns par quelques irrégularités dans le profil de distance, probablement due à une réorientation de la protéine diminuant ses interactions avec la SAM et menant à cette désorption.

La trajectoire correspondant à l'orientation x0z90 (cf Figure 28 ; courbe jaune) présente une distance entre le centre de masse de la β -glu et la SAM plus ou moins constante (soit une distance autour de 34 Å de la SAM) jusqu'à 76 ns. La β -glu se désorbe alors de la SAM, mais la distance oscille en restant relativement faible (la distance maximale entre centre de masse et SAM étant de 45 Å). Entre 90 ns et 95 ns, la distance diminue ensuite pour atteindre 29 Å (soit une distance inférieure à celle de la première adsorption) tandis que la β -glu s'adsorbe à nouveau sur la SAM jusqu'à la fin de la trajectoire.

La trajectoire correspondant à l'orientation x270z90 (cf Figure 28 ; courbe bleu clair) présente une distance constante entre le centre de masse de la β -glu et la SAM (31 Å de la SAM) jusqu'à 13 ns. De 13 ns à 18 ns cette distance connaît une brève augmentation (culminant à 37 Å) avant de diminuer de nouveau, ce qui coïncide à une brève désorption suivi d'une légère réorientation de la β -glu avant qu'elle ne s'adsorbe à nouveau sur la SAM. De 18 ns à 46 ns, la distance entre le centre de masse de la β -glu et la SAM reste globalement faible mais est plus fluctuante (variant entre 30 Å et 37 Å durant cette période de la trajectoire). Cette distance augmente ensuite et connaît d'amples fluctuations entre 46 ns et la fin de la trajectoire tandis que la β -glu se désorbe et diffuse dans le solvant. Nous observons tout de même une très courte diminution à 97 ns (le centre de masse se rapprochant brièvement à 33 Å de la SAM). Cette diminution de la distance coïncide avec un bref contact de la β -glu, mais sans adsorption durable puisque cette courte distance augmente à nouveau jusqu'à la fin de la trajectoire (le centre de masse terminant à 42 Å de la SAM).

III.5.2 Contribution énergétique de la β -glu adsorbée

Les contributions énergétiques de la β -glu adsorbée sur la SAM ou sur l'or ont été estimées en calculant les termes énergétiques non-liés (combinant les effets de van der Waals et électrostatiques) grâce au module NAMD Energy (inclus dans VMD) [104][142].

Dans le cas de la β -glu adsorbée sur l'or, l'option PME a été utilisée afin de prendre en compte la périodicité du système. Dans le cas de la β -glu adsorbée sur la SAM, l'option PME a été testée, mais le fait que la surface d'or ne soit constituée que de deux couches d'atomes résultait en une énergie répulsive avec la SAM lorsque la β -glu était adsorbée sur l'or. Cette interaction avec la SAM détectée à travers la surface d'or constitue un bruit de fond (l'interaction attractive avec l'or étant d'un ordre de grandeur largement supérieur). Nous avons donc décidé de ne pas prendre en compte la périodicité dans l'estimation de l'interaction de la β -glu adsorbée sur la SAM.

Nous pouvons ensuite comparer les profils obtenus pour les contributions énergétiques de la β -glu adsorbée sur la SAM ou sur l'or d'une part, et la distance entre le centre de masse de la β -glu et la SAM d'autre part (cf Figure 30).

Tout d'abord dans le cas des trajectoires z0, x0z90 et x270z90 (cf Figure 30 A, C et F) où la β -glu ne s'adsorbe pas sur la surface d'or, l'énergie correspondant aux interactions entre la β -glu et l'or (courbe rouge) reste nulle. L'évolution des interactions entre la β -glu et la SAM (courbe verte) est très similaire à l'évolution de la distance entre le centre de masse de la β -glu et la SAM lorsque cette distance est faible. La trajectoire x0z90 (cf Figure 30 C) est un exemple flagrant : les deux courbes évoluent de façon simultanée pendant la plus grande partie de la dynamique. Les courbes des interactions entre la β -glu et la SAM pour les trajectoires z0 et x270z90 (cf Figure 30 A et F) se terminent toutes deux par une longue période d'énergie nulle après que la protéine se soit éloignée de la SAM. Quelques brèves périodes correspondant à des énergies non-nulles sont observées dans le cas de la trajectoire x270z90 vers 70 ns et 95 ns, simultanément à un rapprochement de la β -glu de la SAM.

Dans le cas des trajectoires z180, x90z90 et x180z90 (cf Figure 30 B, D et E), l'interaction avec la SAM s'annule aussi lorsque la β -glu s'en éloigne. Lors des trajectoires z180 et x90z90 les événements de ré-adsorption observés en début de trajectoire correspondent bien à des interactions avec la SAM (cf Figure 30 B et D, courbe verte). La β -glu finit ensuite par se rapprocher de l'or (ce

qui correspond à un plateau en terme de distance du centre de masse) et par établir une interaction beaucoup plus forte. En effet, les énergies d'interactions avec la SAM les plus importantes sont évaluées autour de -100 à -200 kcal/mol, tandis que les énergies d'interactions avec l'or vont jusqu'à -350 kcal/mol dans le cas de la trajectoire x180z90 (cf Figure 30 E, courbe rouge), et dépassent -400 kcal/mol dans le cas des trajectoires z180 et x90z90 (cf Figure 30 B et D, courbes rouges). Ces ordres de grandeurs sont cohérents avec ceux prédits *in silico* en utilisant la méthodologie et le logiciel I-TASSER. L'équipe de V. Lobaskin et al. ayant prédit ces interactions entre diverses protéines et une surface d'or insiste sur le fait que les interactions prédites tendent à être supérieures aux forces d'interactions mesurées expérimentales, mais que dans le cas d'interaction irréversibles (comme c'est le cas avec de tels ordres de grandeurs) les méthodologies expérimentales rencontraient des difficultés pour mesurer cette force d'interaction. Les ordres de grandeur des énergies calculées ici sont cohérents avec ceux obtenus par d'autres études de systèmes similaires avec des champs de force différents tels que CHARMM27 [143][144] ou OPLS [145] et GoIP [146].

Nous avons émis l'hypothèse que la différence d'énergie d'interaction avec l'or pourrait être due à une plus petite surface de contact entre l'or et la β -glu dans le cas de la trajectoire x180z90 par rapport aux trajectoires z180 et x90z90. Nous avons donc estimé la surface de contact en fin de trajectoire pour les trajectoires z180, x90z90 et x180z90, et les avons comparé avec les énergies d'interaction correspondantes (cf Tableau 3). Cette comparaison infirme notre hypothèse, en effet dans la trajectoire x180z90, la β -glu présente une surface de contact finale avec l'or de 605 Å²; soit presque égale à celle de la trajectoire x180z90 (609 Å²) et supérieure à celle de la trajectoire x90z90 (561 Å²). Or, c'est justement la trajectoire x90z90 qui présente l'énergie d'interaction avec l'or en fin de dynamique la plus élevée. La valeur de l'énergie d'interaction entre la β -glu et l'or ne dépend donc pas uniquement de cette surface de contact. Ceci est un argument permettant d'affirmer qu'il y a non seulement une variabilité d'orientations d'adsorption de la β -glu sur l'or, mais également une variation d'affinité selon ces différentes orientations. Cette affinité de la β -glu pour l'or n'est donc pas uniquement due au nombre de résidus interagissant avec la surface métallique. Ces valeurs sont également en adéquation avec d'autres travaux utilisant d'autres champs de force tels que GoIP [146][147][148] ou via une approche multi-échelle [149][43]. En particulier, l'étude par Jian Zhou et al. de l'adsorption du *cytochrome c* sur surface d'or nue ou fonctionnalisée par une SAM terminée par un groupe carboxyle [147] conclue d'une part à une contribution des interactions de van der Waals et électrostatique expliquant l'adhésion stable du *cytochrome c* sur l'or; et d'autre

part à une meilleure conservation de la structure native lors de l'adsorption du *cytochrome c* sur la SAM. Cette étude conclue également à une distribution des orientations d'adsorption du *cytochrome c* moins dispersée dans le cas d'une adsorption directe sur l'or, par rapport à une adsorption du *cytochrome c* sur une SAM terminée par une fonction carboxyle -COOH. Le *cytochrome c* ne s'adsorbe donc pas sur l'or selon des orientations plus variées, contrairement à ce que nous avons observé pour la β -glu. Ceci peut toutefois s'expliquer par le fait que si la norme du moment dipolaire du *cytochrome c* dépasse les 300 Debyes [150], dans le cas de la β -glu la norme moyenne du moment dipolaire est d'un ordre de grandeur plus faible (19,3 Debyes). Sachant que le *cytochrome c* est une protéine fortement polarisée (caractéristique commune aux *cytochromes c* de nombreuses espèces [150]), et que l'or est également une surface polaire, ceci explique que l'orientation d'adsorption soit dans ce cas-ci directement corrélée à l'orientation du moment dipolaire. À l'inverse, la β -glu ne présentant pas une forte polarité, ceci explique que son orientation d'adsorption sur l'or soit plus variable. Il est intéressant de noter que parmi les enzymes candidates envisagées comme biocatalyseurs pour les prototypes de biopiles, l'orientation d'adsorption de l'hydrogénase d'*Aquifex aeolicus* est déterminée par son moment dipolaire (pourtant de faible amplitude et d'orientation variable) [45], tandis que la bilirubine oxydase de *Myrothecium verrucaria* possède un moment dipolaire de norme supérieure à 1100 Debyes et cette forte polarité détermine son orientation selon qu'elle est en présence d'une surface fonctionnalisée chargée positivement ou négativement [151].

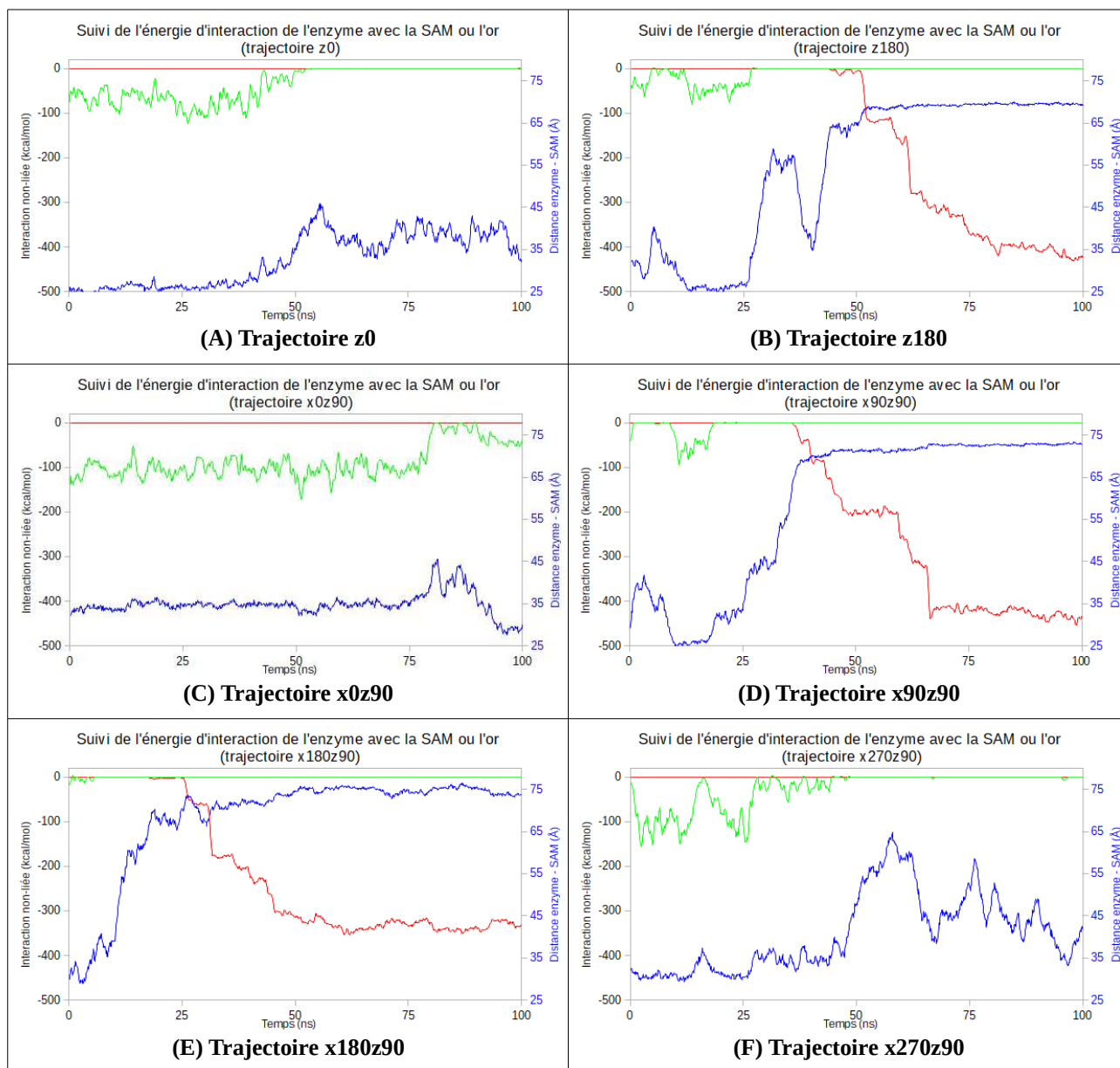


Figure 30 Suivi de l'énergie d'interaction entre la SAM et la β -glu (en vert) et entre l'or et la β -glu (en rouge) ; ainsi que de la distance entre le centre de masse de la β -glu et la SAM (en bleu). Les courbes d'énergies (en vert et en rouge) sont lissées par moyenne glissante sur 0,5 ns.

Tableau 3 Comparaison entre l'énergie d'interaction et la surface de contact entre la β -glu et l'or (valeurs à 100 ns)

Trajectoire	z180	x90z90	x180z90
Surface de contact avec l'or estimée ($\text{\AA}^2$)	609	561	605
Énergie d'interaction avec l'or (kcal/mol)	-417	-446	-334

III.6 Orientation de la β -glu au cours des trajectoires

III.6.1 Étude du moment dipolaire au cours des trajectoires

III.6.1.1 Variation de l'orientation du moment dipolaire due à la déformation de la β -glu

Les angles d'Euler de nutation, de précession et de rotation propre permettent de décrire l'orientation d'un solide (ici notre protéine) dans un référentiel. Dans le cas de notre système, les angles de nutation Θ (aussi nommé angle d'inclinaison, ou *tilt angle* en anglais) et de précession Ψ (cf Figure 31) nous permettent de suivre l'orientation du moment dipolaire de la β -glu par rapport à la surface d'or. L'angle Θ correspond à l'angle formé par le vecteur du moment dipolaire et l'axe Z, tandis que l'angle Ψ est calculé en projetant le moment dipolaire sur le plan XY (parallèle à la surface d'or) et en mesurant l'angle formé par le vecteur issu de cette projection et l'axe X (cf Figure 31).

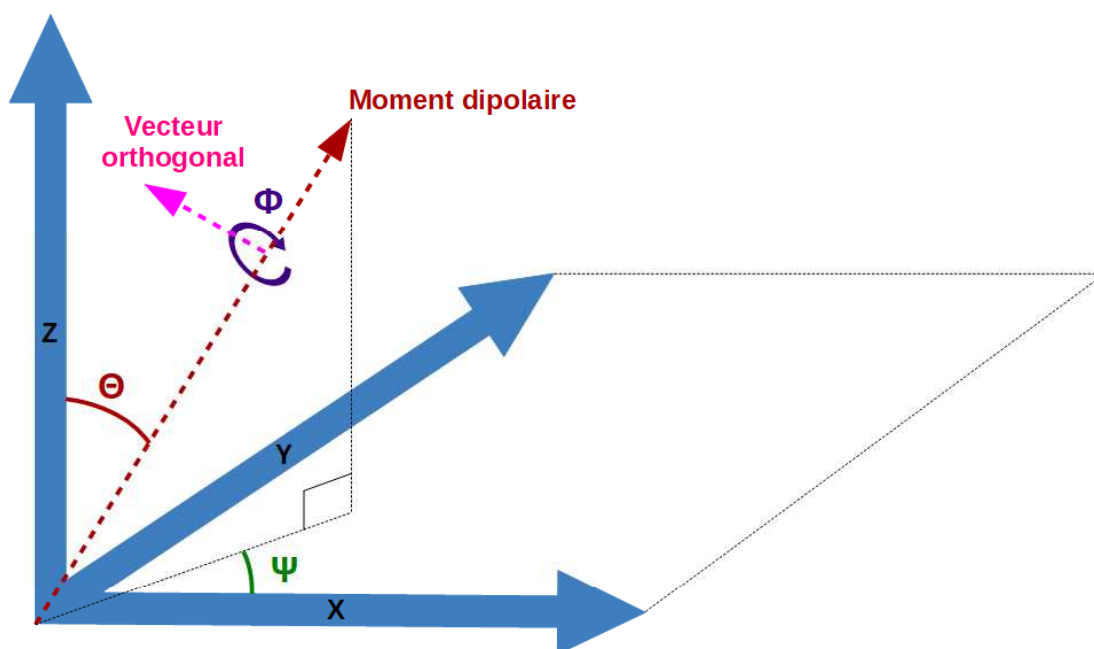


Figure 31 Schéma des angles d'Euler de nutation (Θ , en rouge), de précession (Ψ , en vert) et de rotation (Φ , en violet).

L'étude du moment dipolaire de la β -glu via les angles d'Euler se fait en deux étapes. Premièrement nous examinons la variation de l'orientation du moment dipolaire de la β -glu pour la protéine seule en solution (cf Figure 32 A) et pour les trajectoires correspondant aux six orientations (cf Figure 32 B). Les structures des 1 000 étapes de chaque trajectoire ont été superposées, les variations d'angles Ψ et Θ sont donc indépendantes de la diffusion de la β -glu au cours de la simulation.

Nous observons des variations très minimes de l'orientation du moment dipolaire dû à d'éventuelles déformations de la protéine, le moment dipolaire peut donc être utilisé pour estimer l'orientation globale de la β -glu tandis qu'elle diffuse dans la boîte de simulation ou s'adsorbe. En effet, l'orientation interne du moment dipolaire de certaines protéines (telles que l'hydrogénase d'*Aquifex aeolicus*, envisagée comme biocatalyseur dans la conception de biopiles) peut fluctuer de façon importante lors de déformations minimes de la structure tridimensionnelle de ces protéines lors de leur adsorption [45], d'où la nécessité de cette vérification.

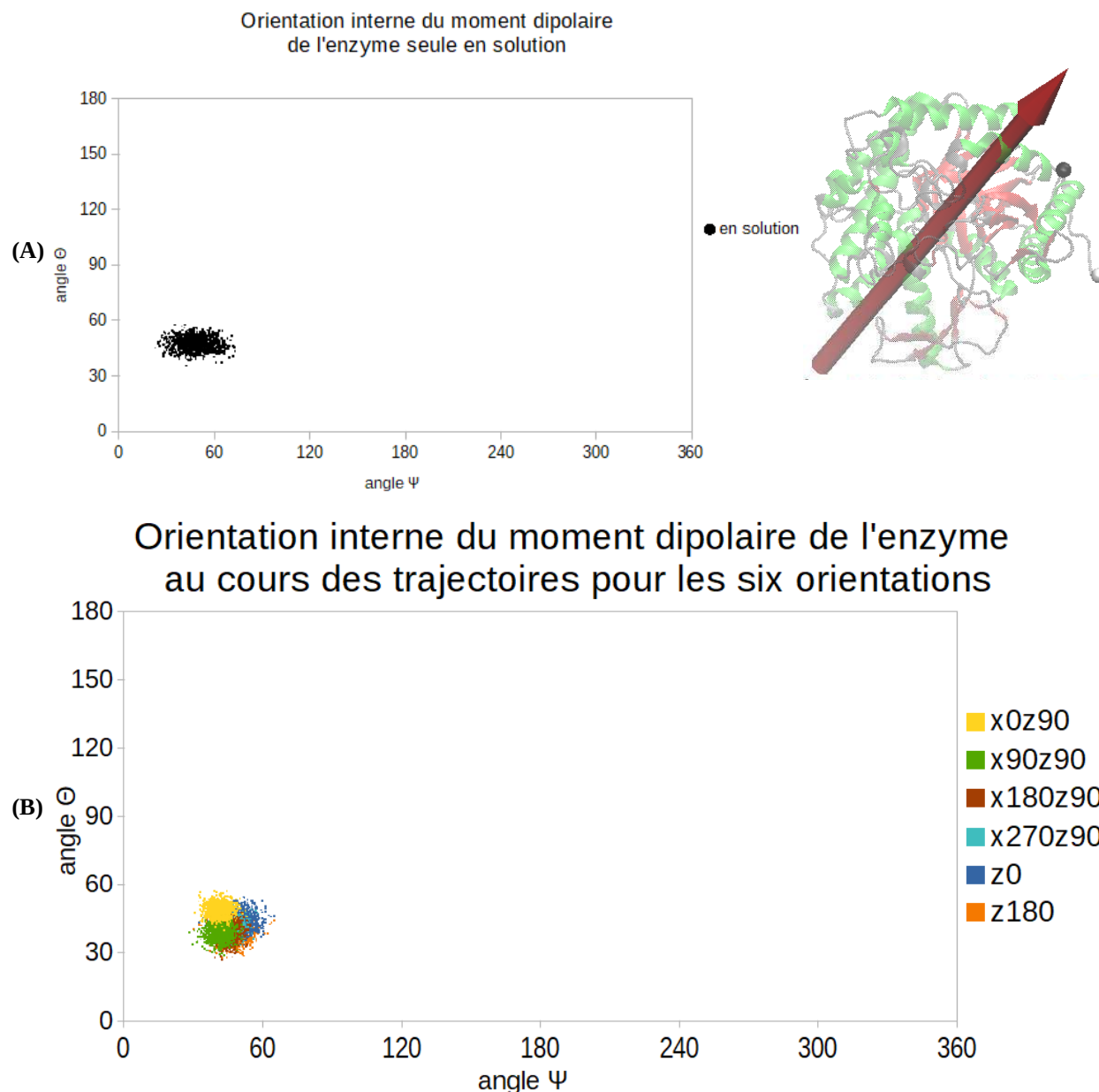


Figure 32 Variation de l'orientation du moment dipolaire interne de la β -glu. Les structures des 1 000 étapes de chaque trajectoire ayant été superposées, les variations d'angles Ψ et Θ sont indépendantes de la diffusion de la β -glu au cours de la simulation.

(A) Variation de l'orientation du moment dipolaire de la β -glu en solution,

(B) Variation de l'orientation du moment dipolaire de la β -glu pour les six orientations.

III.6.1.2 Variation de l'orientation du moment dipolaire due à la diffusion de la β -glu au cours de la simulation

Lors de la seconde étape nous étudions le moment dipolaire sans alignement préalable des structures. Ici nous ne pouvons pas simplement nous baser sur les angles de nutation (Ψ) et de

précession (Θ), puisque notre but est de pouvoir catégoriser les orientations de la β -glu selon la face de la protéine exposée à la SAM, considérée comme une surface homogène. En effet, les angles Ψ et Θ permettent de connaître l'orientation du vecteur représentant le moment dipolaire de l'enzyme ; mais pour une même orientation du moment dipolaire, la face de la protéine proche de la SAM peut changer. En effet, si la protéine opère une rotation autour de l'axe que forme le moment dipolaire, les valeurs des angles Ψ et Θ restent constantes (cf Figure 31). Or, une telle rotation peut faire une grande différence en terme d'orientation vis-à-vis de la SAM ou de la surface d'or, puisque plusieurs configurations d'adsorption protéine-surface sont alors possibles sans que l'examen des angles Ψ et Θ ne suffisent à les discriminer. Afin de décrire de façon plus exhaustive les interactions entre la β -glu et une surface (qu'il s'agisse de la SAM ou de l'or), il est nécessaire de définir quelle partie de la protéine est en contact avec la surface en question.

Si les angles de nutation et de précession ne suffisent pas à distinguer les orientations de la protéine en terme de résidus les plus proches de la SAM, nous pouvons nous intéresser au troisième angle d'Euler : l'angle de rotation propre Φ (aussi nommé *twist* en anglais ; cf Figure 31 et Annexe 4). Dans le cas de notre système, l'angle de rotation propre permet de mesurer un mouvement de rotation autour de l'axe du moment dipolaire.

Pour exprimer cet angle, il est nécessaire de définir un vecteur orthogonal au moment dipolaire. Nous définissons ce vecteur R grâce aux coordonnées des carbones α des résidus ILE119 et ASN353. Ces résidus faisant partie du tonneau β central de la β -glu, ils sont peu susceptibles de bouger durant la trajectoire. Ceci a été vérifié en mesurant l'angle formé entre le vecteur R et le moment dipolaire au cours des six trajectoires (cf Figure 33).

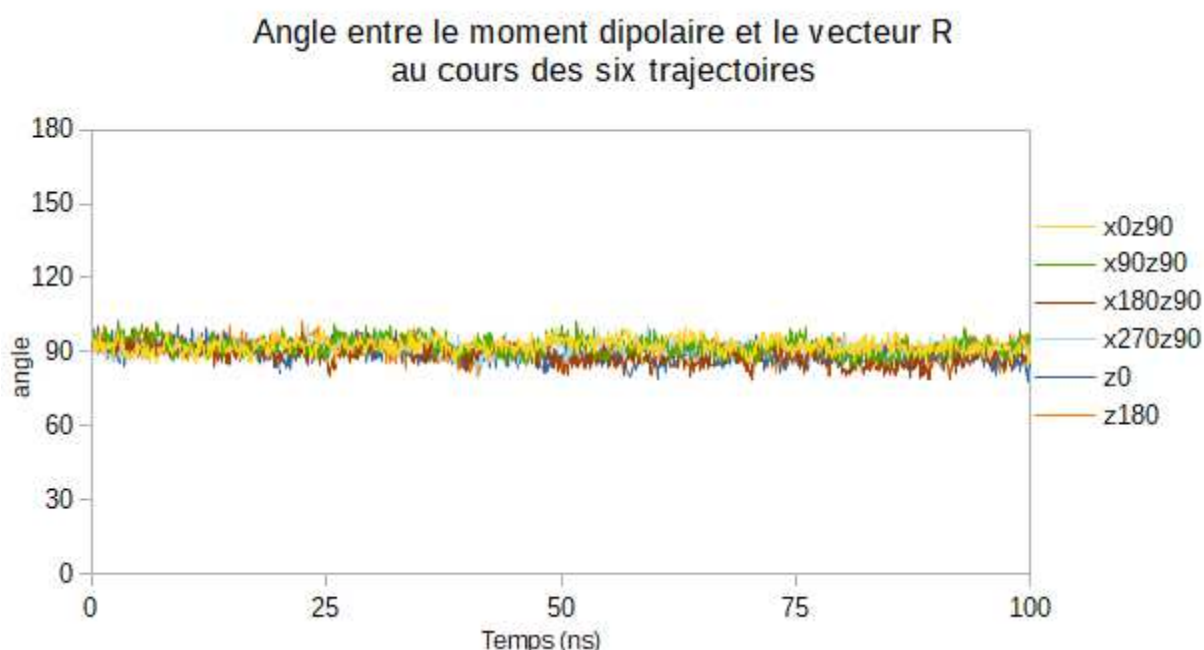


Figure 33 Suivi de l'angle entre le vecteur R (défini entre les carbones α des résidus ILE119 et ASN353) et le moment dipolaire.

L'angle Φ' est une approximation de l'angle de rotation Φ , cet angle est calculé pour chaque image de la trajectoire en plusieurs étapes (cf Figure 34). Premièrement, une rotation d'angle Ψ est effectuée autour de l'axe Z pour le vecteur R, le nouveau vecteur est nommé R' (cf Figure 34 B). Ensuite, l'angle Φ' est calculé en mesurant l'angle entre l'axe Z et la projection du vecteur R' sur le plan ZY' (avec Y' l'axe Y du nouveau référentiel obtenu par la rotation autour de l'axe Z, cf Figure 34 C).

Les angles Φ' et Θ permettent de caractériser l'orientation de la protéine vis-à-vis de la SAM : tandis que l'angle Θ permet de connaître l'inclinaison du moment dipolaire, l'angle Φ' permet d'estimer la rotation de la protéine autour de celui-ci. Les informations apportées par ces deux angles Φ' et Θ permettent donc de discriminer les différentes configurations de la protéine adsorbée sur la SAM, contrairement aux informations simplement obtenues en étudiant les angles Ψ et Θ .

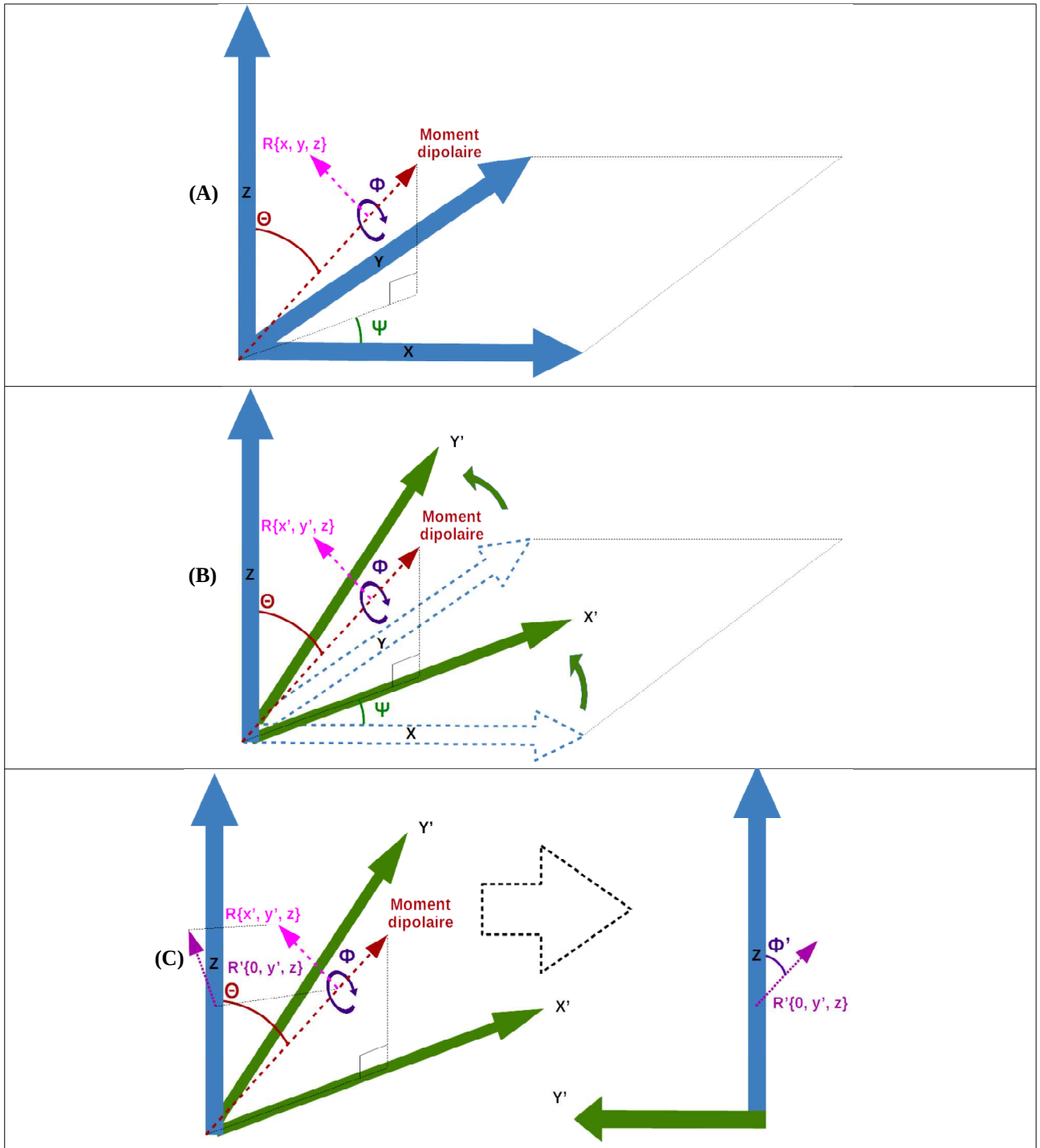


Figure 34 Étapes de construction de l'angle Φ' afin d'estimer l'angle de rotation propre de la protéine autour du moment dipolaire.

(A) État initial (vecteur R orthogonal au moment dipolaire),

(B) Rotation d'angle Ψ pour transformer le vecteur $R\{x_R, y_R, z_R\}$ en vecteur R de coordonnées $\{x_R', y_R', z_R\}$,

(C) À droite : projection du vecteur R sur le plan ZY' pour obtenir le vecteur $R'\{0, y_R', z_R\}$;
à gauche : mesure de l'angle Φ' entre R' et l'axe Z .

Les trajectoires z180, x90z90, et x180z90 (pour lesquelles la β -glu est adsorbée sur la surface d'or nu) ont chacune un groupe plus resserré d'orientations de la protéine correspondant à l'adsorption a priori irréversible sur la surface d'or, donc proche de l'orientation finale (cf Figure 35 A et B). Cette adsorption étant bien plus stable que l'adsorption sur la SAM, la β -glu se retrouve ancrée à la surface et donc ne se réoriente plus dès lors que l'interaction or-protéine devient durable. Nous pouvons remarquer que les orientations finales de la protéine correspondant à l'adsorption sur la surface d'or sont variables d'une trajectoire à l'autre, ceci nous indique que l'adsorption de la β -glu sur l'or peut avoir lieu selon au minimum trois orientations différentes.

Nous notons également que le recoupement entre l'orientation initiale de x0z90 et l'orientation finale de x270z90 (que semblait montrer la visualisation des orientations finales finale de ces deux trajectoires, cf Figure 23 B et C) semble moins flagrante qu'attendue. En effet, l'orientation finale de la protéine lors de la trajectoire x270z90 (avec des valeurs d'angles Φ' et Θ respectivement voisines de -160° et 70° , cf Figure 35 B en bleu pâle) ne semblent pas particulièrement se concentrer autour des valeurs initiales d'orientation du moment de la trajectoire x0z90 (avec des valeurs d'angles Φ' et Θ respectivement voisines de 50° et 145° , cf Figure 35 B en jaune).

Cependant, d'autres similarités d'orientations peuvent être détectées, telles que les orientations finales de x0z90 (avec des angles Φ' et Θ respectivement voisins de -130° et 60° , cf Figure 35 B en jaune) et de x270z90 (avec des angles Φ' et Θ respectivement voisins de -160° et 70° , cf Figure 35 B en bleu pâle).

La tendance globale qui semble ici se dégager est que les orientations finales observées pour les trajectoires où la β -glu finit adsorbée sur l'or sont plus diverses que celles observées pour les trajectoires où la β -glu reste à proximité de la SAM. L'adsorption de la β -glu sur la SAM semble donc plus spécifique en terme d'orientation que celle sur l'or, alors que la force d'interaction est bien plus élevée dans le cas de l'adsorption sur l'or.

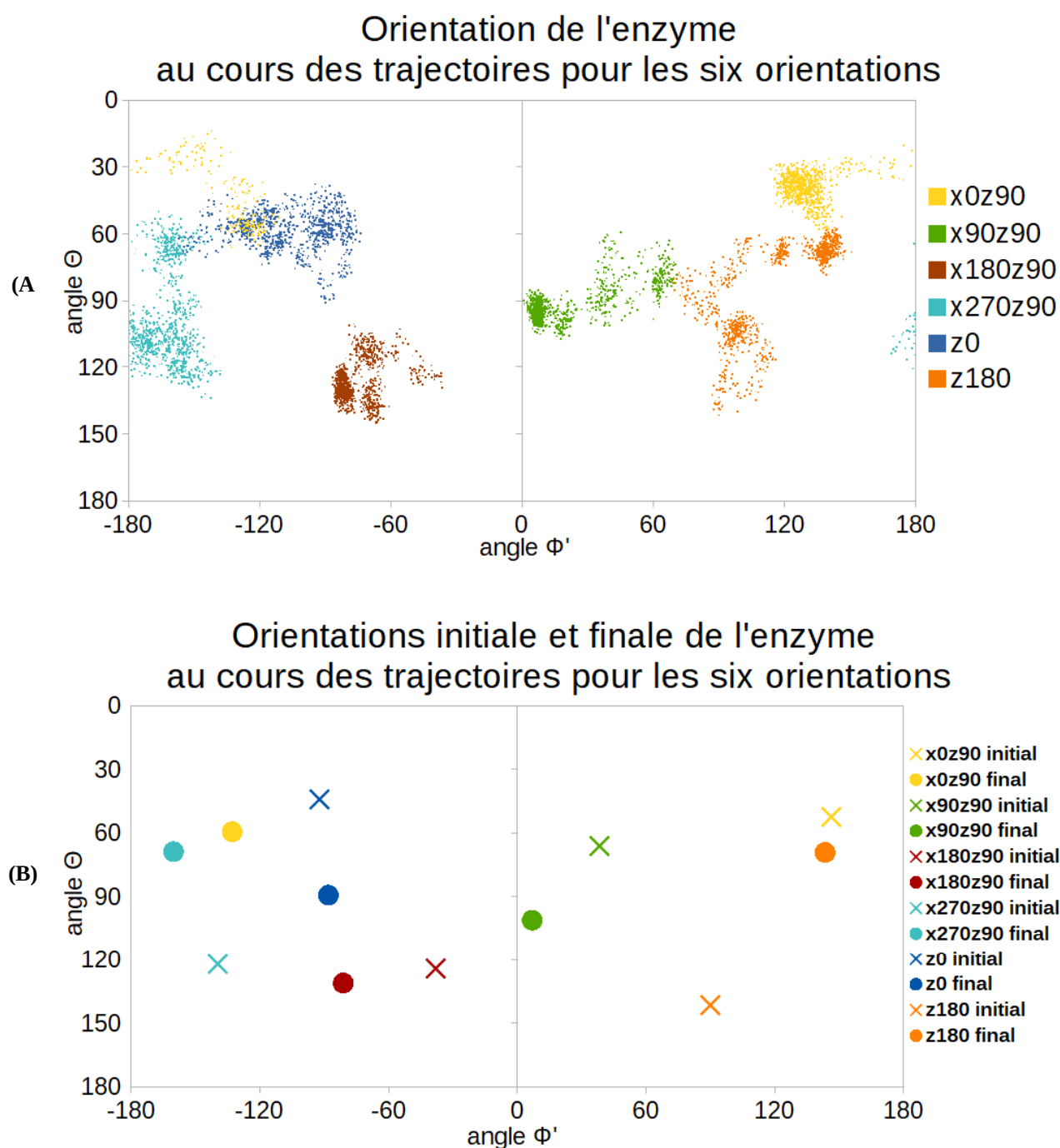


Figure 35 Suivi des orientations de l'enzyme vis-à-vis de la SAM via les angles Θ et Φ'

Note : l'ordonnée est inversée puisqu'un angle Θ de 180° correspond à un moment dipolaire dirigé vers la SAM, donc vers le bas de la boîte de simulation.

(A) Distribution de l'orientation de la β -glu diffusant dans la boîte de simulation,

(B) Mise en évidence des orientations initiale et finale du moment dipolaire.

Rappel : les trajectoires finissant adsorbées sur l'or sont x90z90 (en vert), x180z90 (en bordeaux) et z180 (en orange).

Ce suivi de l'orientation globale de la β -glu via les angles Φ' et Θ permet donc de discriminer les différentes orientations de la β -glu vis-à-vis de la surface, ce qui n'était pas possible via le seul suivi de la distance entre la SAM et le centre de masse de la β -glu. L'étude du moment dipolaire de l'enzyme via les angles Φ' et Θ nous a permis de détecter des orientations divergentes ou se recoupant d'une trajectoire à l'autre, mais ne nous permet pas de connaître exactement les résidus impliqués dans les contacts avec la SAM et la surface d'or.

III.6.2 Étude des contacts protéine-surface à l'échelle de l'acide aminé

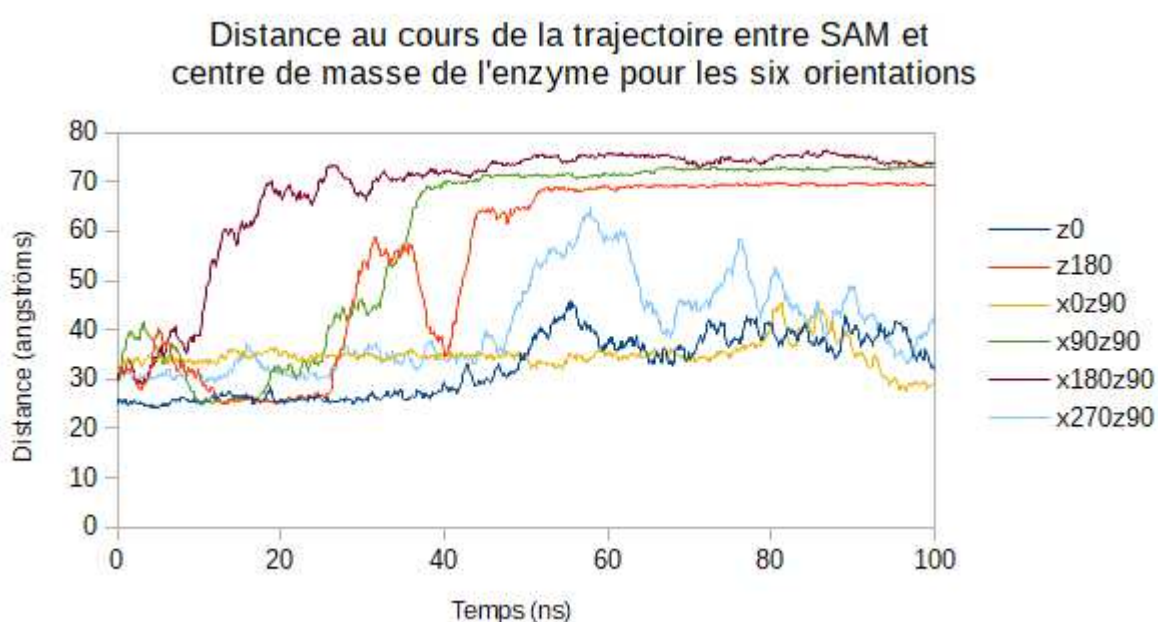


Figure 36 Suivi de la distance entre SAM et centre de masse de la β -glu au cours des six trajectoires (*rappel de la Figure 28 pour référence*).

III.6.2.1 Contacts avec la SAM

En observant la fréquence à laquelle chaque résidu de la β -glu entre en contact avec la SAM, nous constatons des profils d'histogrammes variés (cf Figure 37). Intéressons-nous d'abord aux trajectoires où la β -glu se désorbe au cours de la dynamique et finit par s'adsorber sur la surface d'or :

Premièrement, la trajectoire correspondant à l'orientation x180z90 (cf Figure 37 E) montre des fréquences très basses (1,4 % pour le résidu resté le plus longtemps en contact au cours de la

trajectoire, soit une durée totale de contact de 1,4 ns), ce qui est cohérent avec le profil observé pour la distance entre centre de masse et SAM, qui montre une désorption très rapide pour cette trajectoire (cf Figure 36 courbe bordeaux).

Ensuite les trajectoires correspondant aux orientations z180 et x90z90 (cf Figure 37 B et Figure 37 D) présentent des fréquences de contact basses, mais nettement plus élevées (respectivement de l'ordre de 10 % pour la trajectoire x90z90 et 20 % pour la trajectoire z180), ce qui s'explique par l'adsorption temporaire sur la SAM observée pour ces deux trajectoires ; entre 10 ns et 17 ns pour la trajectoire correspondant à l'orientation x90z90 (cf Figure 36 courbe verte), et entre 12 ns et 25 ns pour la trajectoire correspondant à l'orientation z180 (cf Figure 36 courbe orange). Ces adsorptions correspondent d'ailleurs à une orientation semblable puisque les fréquences de contacts notables décrites correspondent à des résidus communs (notamment HIS40, ILE41, PRO42, GLY43 et MET48, qui ne correspondent pourtant dans aucune de ces deux trajectoires à des contacts initiaux, mis en évidence en rouge sur l'axe des abscisses de la Figure 37).

Les trois autres trajectoires (z0, x0z90 et x270z90, cf Figure 37 A, C et F) présentent des résidus aux fréquences de contact plus élevées puisque lors de ces trajectoires, la β -glu ne s'adsorbe pas à la surface d'or nu, et *a fortiori* a donc plus d'occasions d'entrer en contact avec la SAM.

La trajectoire x270z90 (cf Figure 37 F) présente des fréquences de contacts représentant jusqu'à 35 % de la trajectoire, donc moins élevées que celles des trajectoires z0 et x0z90. Les résidus faisant les contacts les plus fréquents sont ceux initialement en contact avec la SAM.

Les trajectoires z0 et x0z90 (cf Figure 37 A et C) présentent également des fréquences de contact élevées pour certains de leurs résidus initialement en contact avec la SAM (avec des contacts représentant 50 % de la trajectoire z0 et 90 % de la trajectoire x0z90) ; fait intéressant, nous remarquons que les résidus entre SER230, ALA231, ASP232 et GLU233 sont tous concernés par ces hautes fréquences de contacts. Dans le cas de la trajectoire x0z90, ces quatre résidus faisaient partie des contacts initiaux, tandis que dans le cas de la trajectoire z0 seul GLU233 était en contact avec la SAM lors du début de la trajectoire. En revenant à la trajectoire x270z90 (cf Figure 37 F), les quatre mêmes résidus (dont aucun n'est impliqué dans un contact initial avec la SAM) présentent des fréquences de contacts entre 1 et 2 %, correspondant à la brève ré-adsorption de la β -glu à 97 ns (cf Figure 36 courbe bleu clair). Cette ré-adsorption n'a pas duré, mais ces exemples laissent à penser que ces quatre résidus sont prédisposés à interagir avec la SAM.

Parmi les fonctions latérales de ces quatre acides aminés, trois sont polaires (ASP, GLU et SER), dont deux chargées négativement (ASP et GLU) ; nous pouvons donc émettre l'hypothèse que la polarité serait un facteur favorisant l'interaction de résidus de surface avec une SAM d'hexanol thiol ($S(CH_2)_6OH$), bien que la β -glu ne présente pas une surface électrostatique fortement polarisée (cf Figure 21).

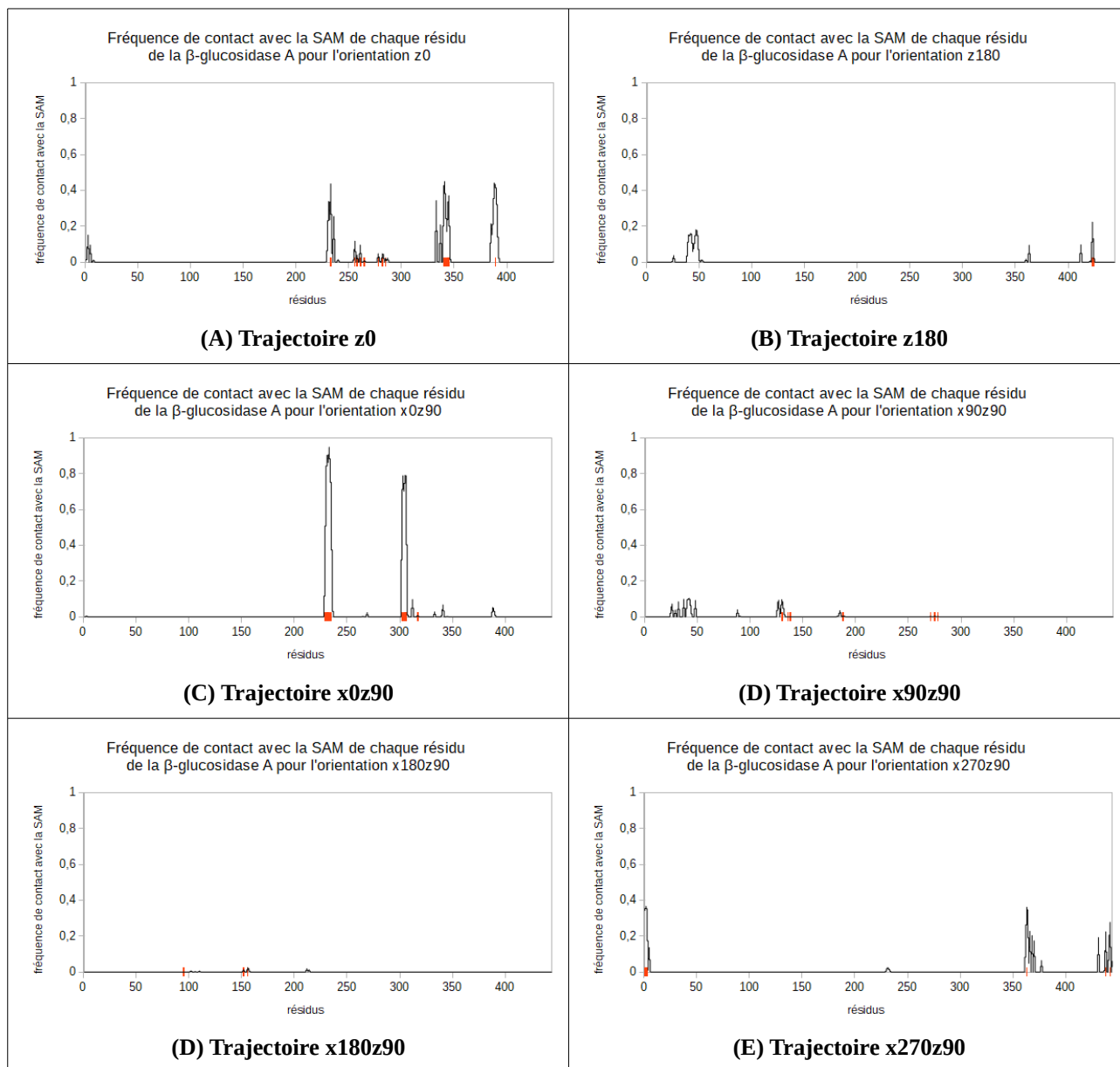


Figure 37 Fréquence de contact de chaque résidu de la β -glu avec la SAM au cours des trajectoires selon les six orientations (les contacts initiaux sont indiqués par des repères rouges sur l'abscisse).

Avant de tirer des conclusions sur les résidus les plus susceptibles d'entrer en contact avec la SAM, il nous faut garder à l'esprit que ces contacts sont biaisés par l'orientation initiale choisie pour chaque trajectoire (cf Figure 23) puisque les résidus initialement en contact avec la SAM ont par défaut une fréquence de contact non-nulle. La trajectoire x0z90 par exemple (cf Figure 37 C) illustre très bien ceci, en effet les fréquences de contact les plus élevées observées pour cette trajectoire correspondent à la plupart des résidus initialement en contact avec la SAM. Pour pallier à ce biais et avoir un aperçu d'ensemble des résidus impliqués dans des contacts avec la SAM lors des six trajectoires, nous avons moyenné les fréquences de contact obtenues pour les six trajectoires (cf Figure 38). Sachant que trois trajectoires (z180, x90z90 et x180z90, cf Figure 37 B, D et E) présentent des désorptions précoces de la SAM, l'ordre de grandeur des fréquences moyennes des résidus est moindre, c'est pourquoi sur la Figure 38 l'axe des ordonnées se limite aux fréquences de 0 à 50 % pour des raisons de lisibilité.

Nous retrouvons des fréquences moyennes de contact avec la SAM élevées pour les résidus SER230, ALA231, ASP232 et GLU233 (respectivement 18%, 25 %, 22 % et 28 %, cf Figure 38) ; ce qui est un argument supplémentaire indiquant que ces résidus sont bel et bien les plus susceptibles d'être impliqués dans un contact avec la SAM.

D'autres résidus présentent des fréquences moyennes moins élevées mais notables, tels que LYS302, ASN303, ASN304, SER305 et GLU306 (respectivement 13 %, 16 %, 14 %, 16 % et 16 %, cf Figure 38), cependant des contacts n'ont été observés avec la SAM et ces résidus que lors de la trajectoire x0z90 (cf Figure 37 C), et ces résidus correspondaient à des contacts initiaux avec la SAM. Ces résidus sont donc restés en contact prolongé avec la SAM, mais il est plus difficile d'être catégorique quant à leur probabilité de s'adsorber spontanément sur la SAM.

Le résidu LYS3 a également une fréquence de contact notable (10 %, cf Figure 38), ce résidu est en contact avec la SAM lors des trajectoires z0 (15 %, cf Figure 37 A) et x270z90 (34 %, cf Figure 37 F). Les autres résidus présentant des fréquences moyennes remarquables (entre 5 % et 10 %) correspondent également à des résidus en contact avec la SAM lors d'une seule trajectoire (ou parfois à une seconde trajectoire mais avec une fréquence de contact de l'ordre de 5 % lors des trajectoires en question).

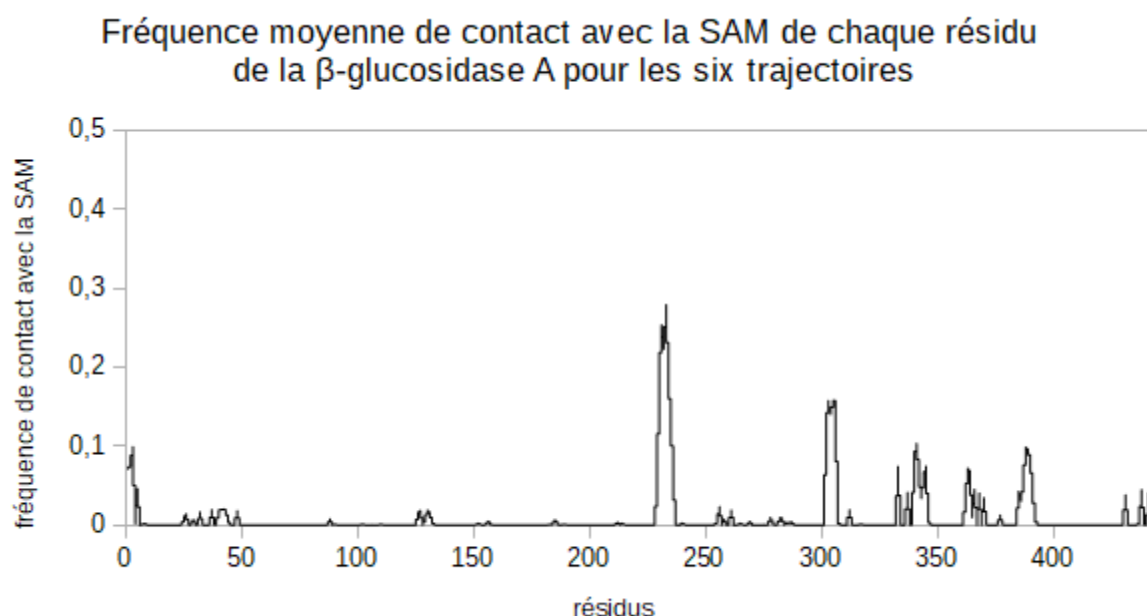


Figure 38 Fréquence moyenne de contact de chaque résidu de la β -glu avec la SAM au cours des trajectoires selon les six orientations (ordonnée allant de 0 à 0,5).

III.6.2.2 Contacts avec la surface d'or

Comme évoqué précédemment, seules trois des trajectoires réalisées selon les six orientations présentent des contacts directs avec la surface d'or : z180, x90z90 et x180z90.

Les fréquences élevées de contacts avec l'or pour la trajectoire z180 (cf Figure 39 A) concernent des résidus qui ne sont impliqués dans des contacts avec la surface d'or ni dans la trajectoire x90z90, ni dans la trajectoire x180z90. Ces fréquences élevées constituent deux groupes : l'un avoisinant 50 % (a priori constitué des premiers résidus à entrer en contact avec la surface, formant un premier « palier » de distance du centre de masse de l'enzyme par rapport à la surface à partir de 45 ns de trajectoire, cf Figure 36 courbe orange), l'autre avoisinant 40 % (a priori constitué des résidus rentrant en contact avec l'or à partir de 52 ns où le centre de masse l'enzyme se rapproche à nouveau de la surface d'or nu, cf Figure 36 courbe orange).

Nous pouvons remarquer que les fréquences de contacts avec l'or des résidus ASN229, SER230, ALA231 et ASP232 sont élevées dans deux ces trois trajectoires : entre 30 % et 60 % pour la trajectoire x90z90 (cf Figure 39 B) et 70 % pour la trajectoire x180z90 (cf Figure 39 C).

Cependant, d'autres résidus ont des fréquences élevées de contacts mais les résidus en question varient fortement d'une trajectoire à l'autre.

Nous pouvons remarquer que, si la trajectoire x180z90 présente plusieurs groupes de résidus aux fréquences de contact avec l'or élevées (autour de 70 %, cf Figure 39 C), le résidu GLU306 a une fréquence de contact nettement supérieure (82 %), ce qui correspond à l'adsorption sur l'or lors de cette trajectoire évoquée précédemment (Figure 29) : l'adsorption a lieu par une extrémité de l'enzyme (incluant GLU306) qui autorise un certain degré de liberté de l'enzyme qui se déforme tout en gardant son point de contact initial avec l'or, établissant ainsi des contacts temporaires et donc avec une fréquence moindre (ce comportement est également visible via la fluctuation de la distance du centre de masse après adsorption sur l'or, cf Figure 36 courbe bordeaux).

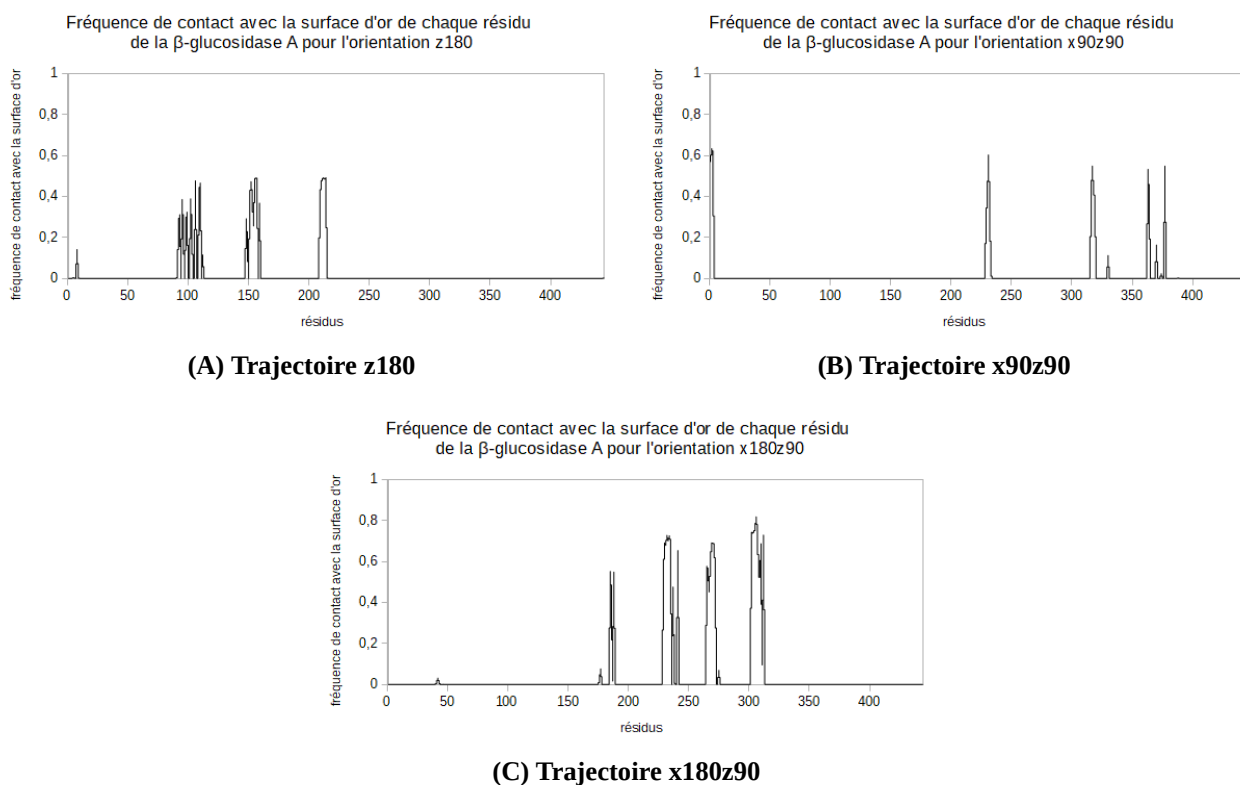


Figure 39 Fréquence de contact de chaque résidu de la β -glu avec la surface d'or au cours des trois trajectoires présentant une adsorption sur la surface d'or nu.

De même que pour l'étude des contacts avec la SAM, nous avons moyenné les fréquences de contact avec la surface d'or obtenues pour les trois trajectoires z180, x90z90 et x180z90 (cf Figure 40) afin d'avoir une vue d'ensemble des résidus établissant plus fréquemment des contacts avec l'or. . Là encore, l'axe des ordonnées de la Figure 40 se limite aux fréquences de 0 à 50 % pour des raisons de lisibilité. Point à noter : les fréquences étant la moyenne de trois trajectoires non de six ; les valeurs de fréquences moyennes de contacts avec la SAM et avec l'or ne sont donc pas directement comparables (par exemple une fréquence moyenne de contact de 40 % signifie que dans 40 % des cas où la β -glu s'est adsorbée sur l'or, le résidu en question était impliqué).

Nous retrouvons de fortes fréquences moyennes de contact avec l'or pour les résidus ASN229, SER230, ALA231 et ASP232 (respectivement 29 %, 35 %, 43 % et 36 %, cf Figure 40), ces résidus étant en contact avec l'or lors des trajectoires x90z90 (cf Figure 39 B) et x180z90 (cf Figure 39 C).

Les autres fréquences moyennes de contact non-nulles (entre 15 % et 25 %) ne correspondent pas à des résidus entrant en contact avec l'or lors de plusieurs trajectoires, ce qui tend à confirmer que l'adsorption sur l'or ne semble pas se faire selon une orientation spécifique.

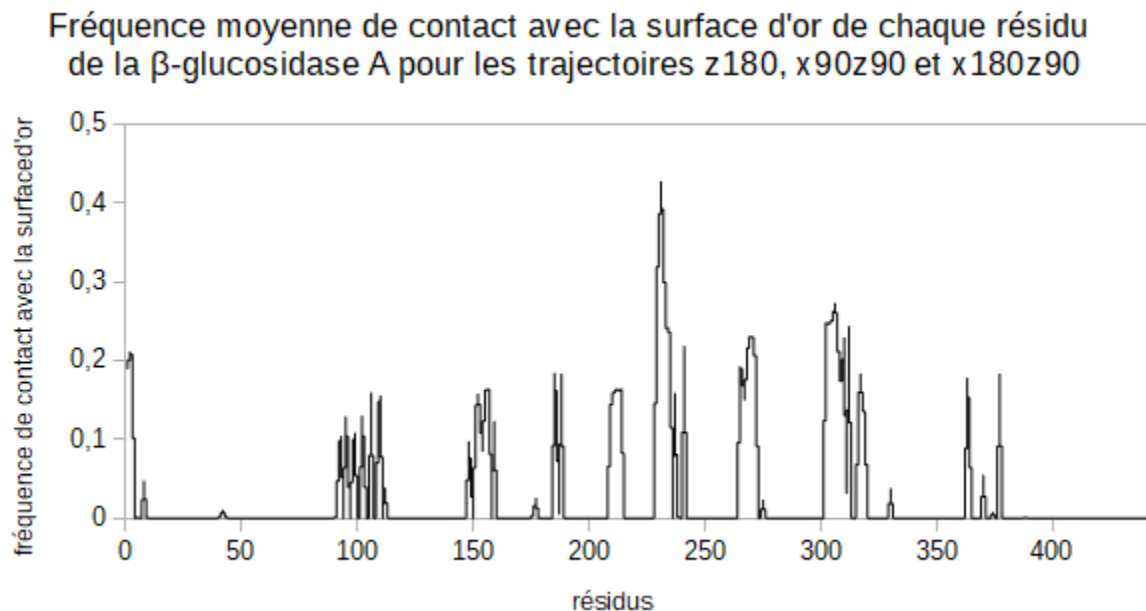


Figure 40 Fréquence moyenne de contact de chaque résidu de la β -glu avec la surface d'or au cours des trajectoires selon les orientations z180, x90z90 et x180z90 (ordonnée allant de 0 à 0,5).

III.6.2.3 Synthèse de l'étude des contacts protéine-surface

Afin de tester l'hypothèse selon laquelle l'adsorption de la β -glu sur la surface d'or se ferait selon des orientations plus variables que l'adsorption sur la SAM, nous avons affiché les fréquences de contacts moyens de la β -glu avec la SAM et avec l'or calculés pour chaque acide aminé (cf respectivement Figure 38 et Figure 40) sur une visualisation tridimensionnelle de la β -glu (cf Figure 41). Les zones rouges correspondent aux régions où la fréquence de contact des acides aminés est nulle ou très faible, les zones blanches correspondent à des fréquences intermédiaires et les zones bleues correspondent aux régions de contact les plus fréquents.

Nous observons bien que les contacts avec la SAM sont bien regroupés sur une face de la β -glu (cf Figure 41 B) tandis que des contacts avec l'or sont observés sur des régions communes aux contacts avec la SAM, mais également sur des régions bien plus éloignées à la surface de la protéine (cf Figure 41 C). De façon intéressante, nous notons qu'une région (correspondant aux résidus proches de SER230, ALA231 et ASP232) correspond à des fréquences élevées de contacts à la fois avec la SAM et avec l'or. Cette région correspondant à une excroissance au niveau de la structure de la protéine (due à une hélice α), ces fréquences élevées de contact avec des surfaces pourraient être dues à la géométrie de la β -glu.

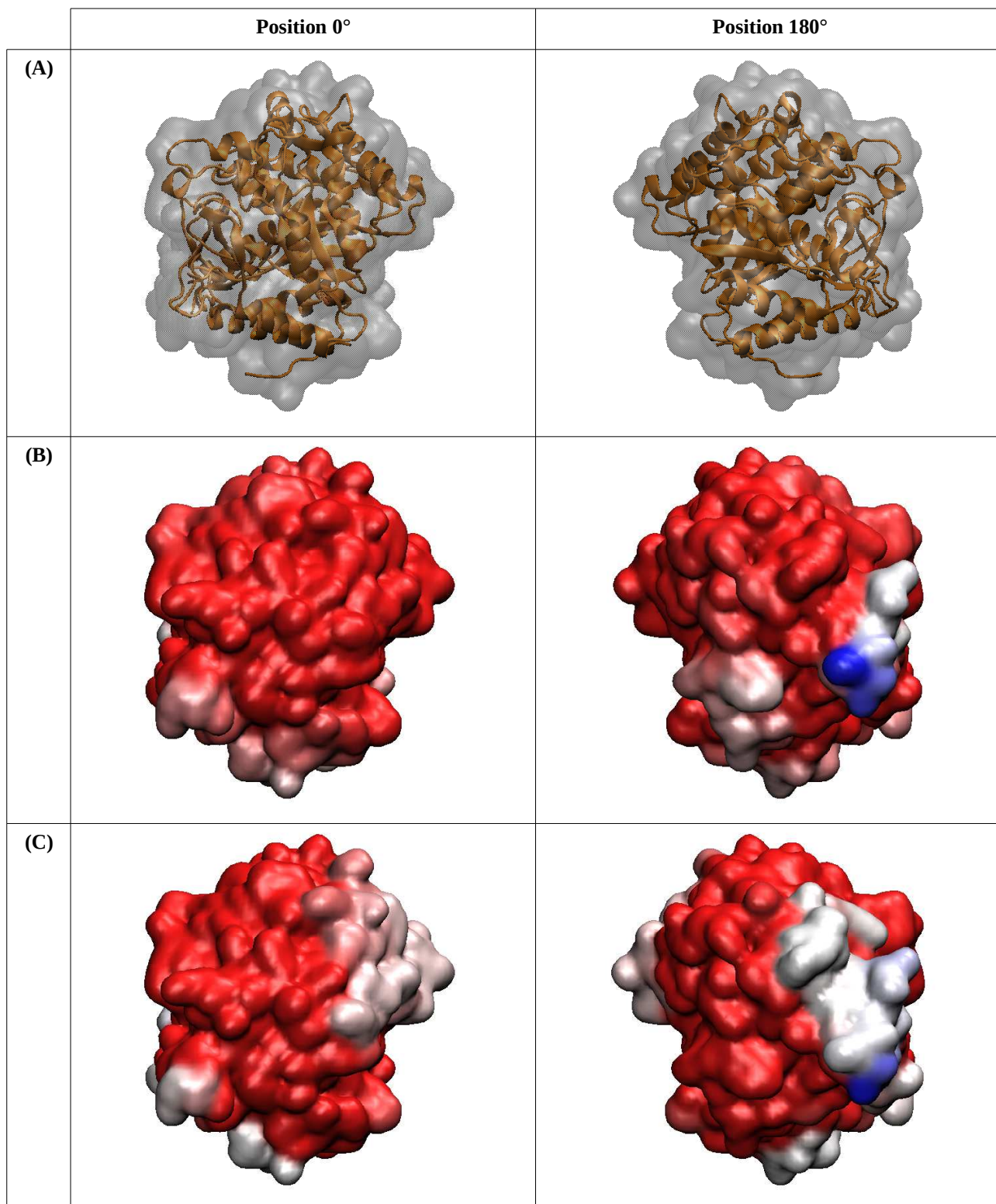


Figure 41 Comparaison de la répartition spatiale des contacts de la β -glu avec la SAM ou avec l'or (en rouge si aucun contact, en blanc si quelques contacts, en bleu si contacts fréquents).
(A) Structure de la protéine selon deux poses, obtenues par une rotation de 180° autour de l'axe vertical ; **(B)** Contacts moyens avec la SAM ; **(C)** Contacts moyens avec l'or.

III.7 Propriétés mécaniques de la β -glu confinée en présence d'une surface d'or fonctionnalisée par une SAM-OH

III.7.1 Détermination des structures caractéristiques des trajectoires issues de dynamiques moléculaires tout-atome

Un ensemble de sept trajectoires de la β -glu ont été produites par dynamique moléculaire tout-atome : une avec la β -glu en solution, et six avec la β -glu adsorbée sur la surface d'or fonctionnalisée. Pour chacune de ces trajectoires, l'outil `gmx_cluster` de la suite GROMACS (version 2018.8 [152][153][154][155][156][157][158][159]) a été utilisé afin de définir des groupes (ou “clusters”) de conformations structurellement proches adoptées par la β -glu au cours de sa trajectoire. Ces groupes de structures caractéristiques sont définis par un critère seuil de RMSD sur les atomes des liaisons peptidiques de la protéine. Ce critère seuil de RMSD a été modulé selon l'amplitude des variations structurales de la protéine, afin d'extraire entre une et trois structures par trajectoire. Chaque structure sélectionnée doit caractériser un groupe d'au moins 10 structures (soit 1% de la trajectoire totale) et l'ensemble des structures sélectionnées pour une trajectoire doit représenter au moins 90% de cette dernière (soit au minimum 900 conformations). Ces conditions sont fixées afin de s'assurer que les structures sélectionnées caractérisent bien l'essentiel des conformations adoptées par la protéine au cours de la trajectoire.

Suite à cette procédure, 14 conformations ont été sélectionnées (cf Tableau 4) restant structurellement très semblables puisque leur RMSD par rapport à la structure de référence est compris entre 1 et 2 Å.

Tableau 4 Tableau récapitulatif des groupes conformationnels caractérisant les trajectoires obtenues par dynamique moléculaire tout-atome pour la β -glucosidase :

Trajectoire	Seuil de RMSD (en Å)	Numéro des structures sélectionnées (trajectoire de 1 000 images)	% de représentativité de la trajectoire
En solution	0.85	360	99.7 %
Orientation x0z90	0.73	270	97.6 %
Orientation x90z90	0.73	265	61.6 %
		913	37.9 %
Orientation x180z90	0.73	62	7.4 %
		171	34.7 %
		797	54.9 %
Orientation x270z90	0.73	771	97.3 %
Orientation z0	0.73	118	19.8 %
		461	43.4 %
		814	29.8 %
Orientation z180	0.73	19	2.4 %
		186	93.0 %
		990	1.8 %

III.7.2 Propriétés mécaniques de la β -glucosidase en solution

La β -glu présente un repliement en tonneau TIM, comportant un tonneau β central (représenté en rouge sur la Figure 42 A) entouré d'hélices α (représentées en vert sur la Figure 42 A). Le site actif situé à l'entrée du tonneau β comprend notamment deux résidus glutamates catalytiques, Glu166 et Glu352 (représentés en violet sur la Figure 42 A) [138]. Le profil de rigidité obtenu pour la β -glucosidase en solution (Figure 42 B) reflète cette structure régulière, avec des pics de rigidité périodiques, qui correspondent aux feuillets β situés au cœur de la protéine, tandis que les constantes de forces associées aux résidus des hélices α externes oscillent et restent de faible amplitude.

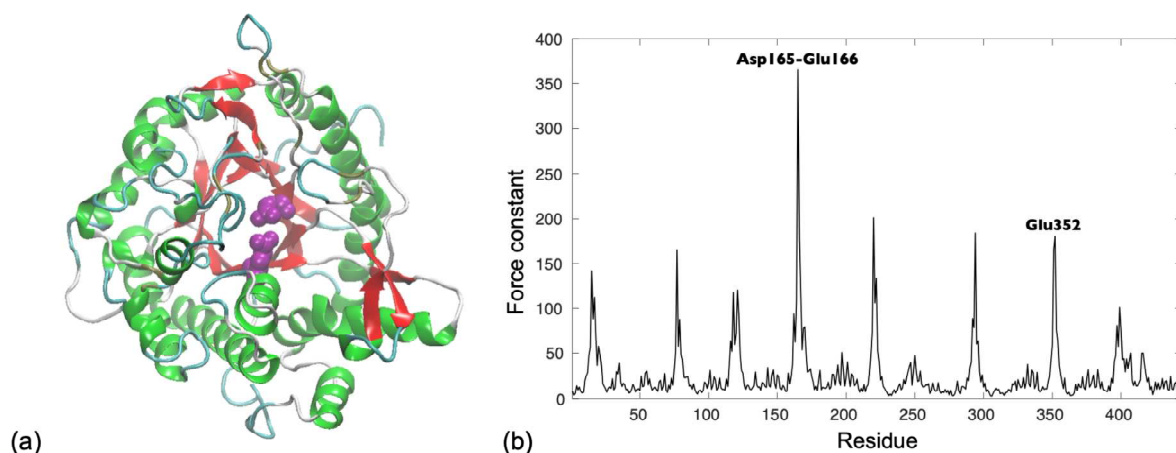


Figure 42 Propriétés mécaniques de la β -glucosidase en solution.

- (a) Structure de la β -glucosidase en solution : les feuillets- β centraux sont représentés en rouge, les hélices α externes en vert et les deux glutamates catalytiques en violet.
- (b) Profil de rigidité de la β -glucosidase en solution.

III.7.3 Impact mécanique de l'adsorption sur la surface côté or ou côté SAM

Les constantes de force obtenues pour les 13 structures (cf Figure 44) extraites des trajectoires comportant la β -glucosidase en interaction avec la surface d'or fonctionnalisée ont été systématiquement comparées au profil de rigidité obtenue pour l'enzyme en solution, et les variations résultantes sont présentées sur la Figure 43 pour chacune des six orientations. La comparaison de ces profils fait apparaître des variations importantes dans les constantes de force, et distribuées de manière très hétérogène le long de la séquence protéique. Nous pouvons néanmoins constater que les résidus les plus impactés au niveau de leur constante de force sont les résidus rigides des feuillets β internes, et notamment les deux glutamates catalytiques mentionnés plus haut (Glu166 et Glu352), ainsi que deux résidus (Asn294 et Tyr296) qui sont également impliqués dans le site catalytique. Ces variations mécaniques ont lieu alors même que le tonneau β central de la protéine ne subit que de très faibles variations structurales durant les simulations, contrairement aux hélices externes.

Les variations observées dans les profils de rigidité peuvent également être reliées au comportement d'adsorption de l'enzyme durant les trajectoires de dynamique moléculaire. Par exemple lors de la trajectoire x270z90, la β -glu se détache rapidement de la surface fonctionnalisée

et passe la majorité de la simulation en solution sans former de contact avec l'une des surfaces. Ainsi, nous constatons sur la Figure 43 que la structure caractéristique sélectionnée pour cette trajectoire présente les plus faibles variations mécaniques par rapport à la structure de référence en solution. Inversement, les structures caractéristiques correspondant à l'enzyme adsorbée – sur la SAM ou la surface d'or nu – vont présenter des variations mécaniques de fortes amplitudes. Il semble également que l'impact mécanique soit dépendant du type de surface sur laquelle la protéine est adsorbée.

Ainsi, les structures z0-F814 et z180-F19, qui correspondent à un positionnement de la β -glu près de la SAM, présentent une augmentation de la rigidité des résidus catalytiques (cf Figure 43 A et Figure 43 B). À l'inverse, les structures x90z90-F913 et z180-F990 (cf Figure 43 D et Figure 43 B) correspondent à des états de l'enzyme adsorbée sur la face nue de la surface d'or, ce qui semble induire une forte flexibilisation du résidu catalytique Glu166. Or cette perte de rigidité de Glu166 est susceptible d'entraver le bon fonctionnement de l'enzyme.

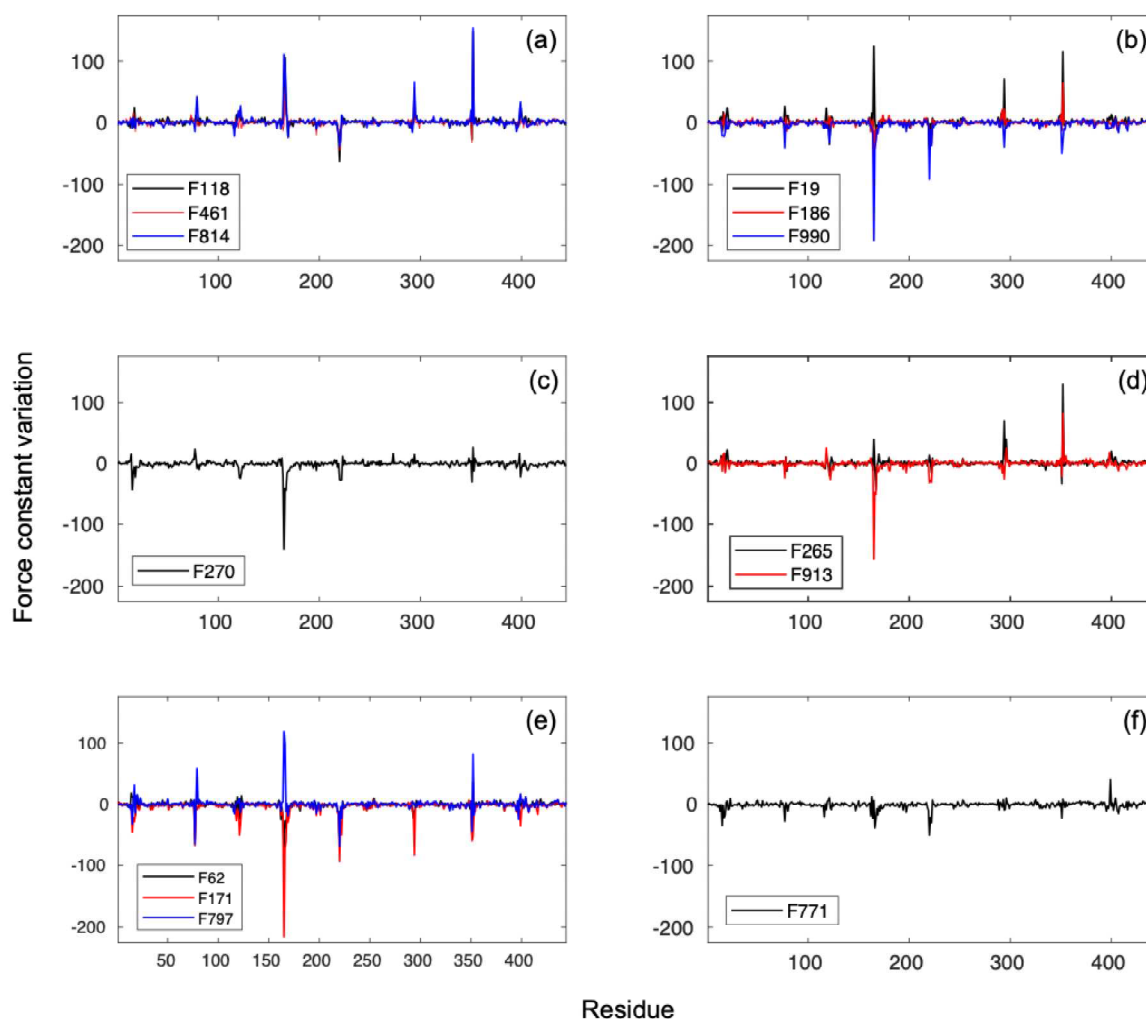


Figure 43 Variation des constantes de forces des résidus par rapport à la structure de référence issue de la trajectoire en solution (la numérotation des courbes correspondant à l'image de la structure caractéristique). Les trajectoires avec une surface d'or fonctionnalisée sont listées en fonction de l'orientation initiale de l'enzyme, dans l'ordre suivant :

- (a) Trajectoire z0 ; (b) Trajectoire z180 ; (c) Trajectoire x0z90 ;
 (d) Trajectoire x90z90 ; (e) Trajectoire x180z90 ; (f) Trajectoire x270z90.
 (cf Annexe 5 pour consulter les 13 courbes séparément)

Les 13 structures représentatives utilisées pour étudier les propriétés mécaniques de la β -glu peuvent être réparties en trois groupes selon leur position par rapport aux deux surfaces d'or (cf Figure 44) : non lié (structures z0F118, x90F265, x180F62 et x270F771), en contact avec la SAM (structures z0F118, z0F461, z180F19, z180F186 et x0F270) ou en contact avec l'or nu (structures z180F990, x90F913, x180F171 et x180F797). Tandis que la constante de force moyenne des structures non liées ou liées à la SAM reste très proche des valeurs obtenue pour la structure de référence de la simulation en solutions (avec respectivement, $25.5 \text{ kcal.mol}^{-1}.\text{\AA}^{-2}$, $25.6 \text{ kcal.mol}^{-1}.\text{\AA}^{-2}$

et $25.7 \text{ kcal.mol}^{-1}.\text{\AA}^{-2}$), dans le cas des structures de l'enzyme adsorbée sur l'or nu, nous observons une baisse de la rigidité moyenne à $23.5 \text{ kcal.mol}^{-1}.\text{\AA}^{-2}$. Là aussi, cette perte globale de rigidité dans l'enzyme peut être à l'origine d'une moindre activité catalytique pour l'enzyme adsorbée sur l'or par rapport à une adsorption sur la SAM.

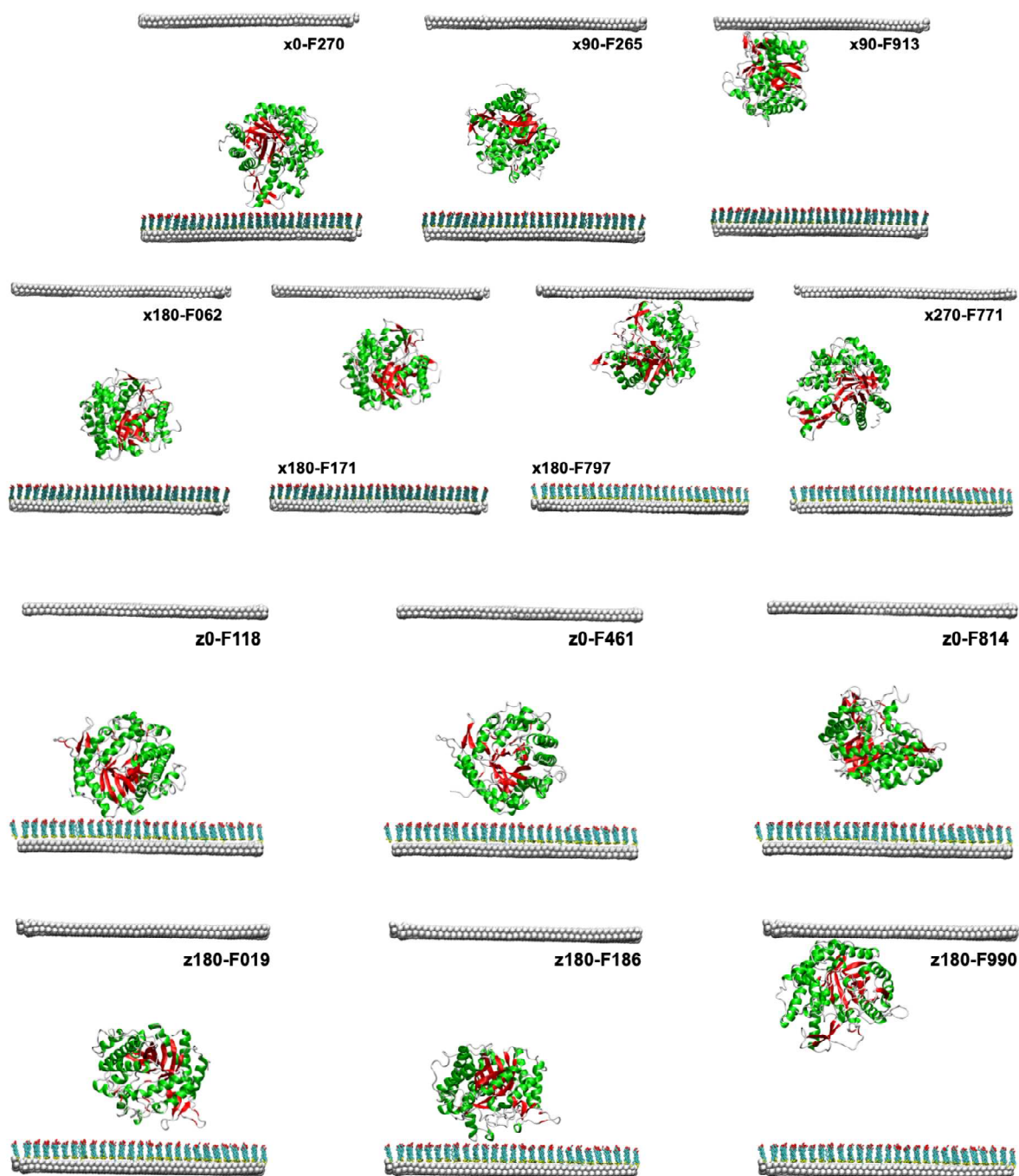


Figure 44 Position de l'enzyme pour les 13 structures représentations sélectionnées pour les calculs mécaniques.

III.8 Discussion et conclusions préliminaires

L'étude de la β -glu adsorbée selon différentes orientations (cf Figure 22 et Figure 23) sur une surface d'or fonctionnalisée que nous avons menée via l'analyse de trajectoires de dynamiques moléculaires nous a déjà apporté plusieurs informations dignes d'intérêts.

Tout d'abord, l'examen du RMSD (quasi-constant et à valeur faible) révèle une structure très stable pour les feuillets- β organisés en tonneau TIM au cœur de la protéine (cf Figure 19 B), tandis que les variations observées pour le reste de la protéine ne sont pas significativement différentes entre la protéine adsorbée sur la SAM, sur l'or ou bien désorbée (cf Figure 24 et Figure 25 C).

L'étude de la densité de répartition des rayons de giration nous a permis d'obtenir des profils différents entre la trajectoire témoin (sans surface fonctionnalisée) et les six autres trajectoires. Cependant, bien que nous ayons obtenus des profils de formes diverses (cf Figure 27), ceux-ci ne permettent pas de discriminer les trajectoires où la β -glu finit adsorbée sur l'or de celles où la β -glu reste à proximité de la SAM. De plus, l'étude directe pour chaque trajectoire de l'évolution au cours du temps du rayon de giration de la β -glu ne permet pas non plus un suivi des événements de désorption et d'adsorption, puisque la variation du rayon de giration est extrêmement faible (cf Figure 26 A et B). Cette quasi-constance du rayon de giration de la protéine ainsi que la stabilité de son RMSD nous permettent d'affirmer que la structure de la β -glu ne subit pas de modification de grande ampleur lors de son adsorption sur la SAM ou sur l'or.

Afin de pouvoir mieux suivre les événements de désorption et d'adsorption au cours des différentes trajectoires, nous nous sommes intéressés à la distance entre la SAM et le centre de masse de la protéine au cours des trajectoires (cf Figure 28). Le suivi de cette distance nous a permis de mettre en évidence un plateau stable correspondant la β -glu s'adsorbant sur la surface d'or jusqu'à la fin des trajectoires où cette adsorption a eu lieu. De plus, cette distance nous a aussi permis d'observer des événements de désorption et ré-adsorption à la surface de la SAM.

Ces profils de distance entre la SAM et le centre de masse de la β -glu suggèrent une adsorption plus stable à la surface de l'or qu'à la surface de la SAM, ce que nous avons souhaité tester. L'estimation des énergies d'adsorption (cf Figure 30) confirme que la contribution énergétique de

l'adsorption de la β -glu sur la SAM est effectivement inférieure à celle calculée pour une adsorption sur l'or.

Puisqu'il a été déterminé que les variations de l'orientation du moment dipolaire dues à des déformations internes de la β -glu sont suffisamment faibles (cf Figure 32 A) et que l'adsorption sur l'or ou la SAM ne provoque pas non plus de telles variations (cf Figure 32 B), nous avons utilisé l'orientation du moment dipolaire pour estimer les changements d'orientation de la β -glu vis-à-vis de la surface au cours de la simulation. Ce suivi des orientations nous a permis de déterminer que l'adsorption de la β -glu sur la SAM est plus spécifique en terme d'orientation que celle sur l'or, bien que la force d'interaction soit bien plus élevée dans le cas de l'adsorption sur l'or.

Nous avons également observé que la surface de contact entre la β -glu et l'or et la contribution énergétique de cette adsorption en fin de trajectoires ne sont a priori pas corrélées (cf Tableau 3). Ceci nous suggère que la force d'adsorption de la β -glu sur l'or n'est pas strictement corrélée au nombre de résidus en contact avec la surface métallique. Il pourrait être intéressant de vérifier quels types de résidus favorisent une interaction forte, et donc s'il est possible de prédire les orientations préférentielles d'adsorption de la β -glu sur l'or.

L'étude des fréquences de contacts avec la SAM (cf Figure 37) associées à chaque résidu, a permis de mettre en évidence des réorientations pour certaines trajectoires, puisque des fréquences de contacts non-nulles sont observées pour des résidus n'étant pas initialement en contact avec la SAM. Les fréquences de contacts avec l'or (cf Figure 39), ainsi que ces mêmes fréquences, moyennées sur l'ensemble des trajectoires (cf profils Figure 38 et Figure 40 ; ainsi que la visualisation Figure 41) confirment la plus grande variété d'orientations lors d'adsorptions sur l'or que sur la SAM.

Enfin, l'analyse de l'impact de l'adsorption de la β -glu sur ses propriétés mécaniques met en évidence une rigidité moyenne après adsorption sur la SAM selon diverses orientations proche de la rigidité obtenue pour la β -glu en solution. Après adsorption sur la surface d'or, une diminution de la rigidité moyenne est observée. Ceci suggère que l'adsorption sur une surface d'or est plus susceptible de perturber la dynamique interne de la β -glu et ainsi de diminuer son activité catalytique. En particulier, la flexibilisation du résidu catalytique Glu166 (cf Figure 43 D et Figure 43 B) est susceptible d'entraver la fonction de la β -glu. Toutefois, l'adsorption de la β -glu sur la SAM a également un impact sur son profil de rigidité. En effet, si la rigidité moyenne est semblable

à celle de la β -glu en solution, à l'échelle de l'acide aminé les résidus catalytiques subissent une rigidification (cf Figure 43 A et Figure 43 B) ce qui peut également impacter la dynamique interne et donc l'activité de l'enzyme.

Nous concluons donc que, dans le cas de la β -glu, l'adsorption sur l'or est plus stable que sur la SAM, mais au prix d'un impact plus conséquent sur sa dynamique interne ainsi qu'une spécificité moindre en terme d'orientations de l'enzyme vis-à-vis de la surface. Ce compromis entre stabilité d'adsorption et spécificité d'orientation est en accord avec les travaux menés par Weltz et al. qui ont mis en évidence un compromis semblable entre stabilité de fixation (covalente dans le cas de leur système) et impact sur l'activité d'une enzyme par imagerie FRET mono-moléculaire (ou smFRET « single-molecule Förster Resonance Energy Transfer », en français « transfert d'énergie par résonance de Förster mono-moléculaire ») [160][161][162].

IV. Modélisation Gros-Grain de l'adsorption de protéines sur des surfaces solides

La bilirubine oxydase issue de *Myrothecium verrucaria* [44][55] fait partie des enzymes sélectionnées par l'équipe BIP en tant que candidats biocatalyseurs. En effet il s'agit d'une oxydoréductase présentant une thermostabilité élevée (lui permettant ainsi de conserver sa fonction en cas d'échauffement du dispositif de biopile), et surtout une tolérance au dioxygène. En effet nombre d'oxydases voient leur activité bloquée de façon irréversible lorsque leur site catalytique, dépendant d'un complexe comprenant plusieurs ions cuivres, est oxydé en présence d'oxygène. Or, si la fonction de la bilirubine oxydase est bel et bien impactée par la présence d'oxygène, cette diminution d'activité est réversible ; ce qui permet d'éviter les considérables contraintes techniques qu'impliquerait l'usage d'une enzyme devant être produite puis adsorbée sur la surface de l'électrode sans jamais être mise en présence de dioxygène.

L'étude des profils de rigidité des résidus de la bilirubine oxydase sans contraintes additionnelles (simulation témoin) et avec contraintes additionnelles simulant l'adsorption sur SAM positive ou négative montre en premier lieu que les perturbations mécaniques dépendent de l'orientation de l'enzyme sur la surface fonctionnalisée, et donc des résidus d'ancrages caractéristiques de cette orientation. Afin de sélectionner ces résidus d'ancrage, nous nous sommes basés sur les estimations réalisées dans les travaux de Yang et al. [151] où les auteurs ont prédit l'orientation de la bilirubine oxydase adsorbée sur une surface fonctionnalisée par une SAM par une approche combinant simulations par dynamiques moléculaires tout-atome et par méthode replica exchange de Monte Carlo. Des SAM aux groupes terminaux amine ($-NH_2$) et carboxylique ($-COOH$) ont été respectivement utilisées pour représenter des surface chargées positivement et négativement, influençant ainsi l'orientation de l'enzyme adsorbée et donc les résidus en contact avec la surface. Les résidus ayant une distance inférieure à 0,35 nm par rapport à la surface ont été définis comme résidus d'ancrage. De plus, l'augmentation de rigidité observée suite à l'adsorption de la protéine sur une surface chargée positivement ne se limite pas aux résidus d'ancrages mais concerne également les constantes de force de résidus clés situés au niveau du site actif de l'enzyme. Cet effet est fortement susceptible d'impacter négativement l'activité catalytique de

l'enzyme, ce qui rejoint les observations expérimentales faites par Hitaishi et al. [163] par comparaison des taux de transferts électroniques et des conformations de la bilirubine oxydase adsorbée sur des surfaces chargées positivement ou négativement. Des calculs ultérieurs réalisés sur les enzymes ribonucléase A [42] et nitro-réductase [164], pour lesquelles l'impact sur la fonction associé à l'adsorption a déjà été étudié expérimentalement. Ces calculs nous mènent à des conclusions convergentes ; à savoir que la perte d'activité lors de l'adsorption à une surface et les perturbations mécaniques touchant les résidus catalytiques peuvent être associées.

Plus généralement, nos résultats mettent en évidence que la conservation de l'intégrité structurale des enzymes immobilisées ne garantit pas la conservation de son activité catalytique ; ce qui montre l'intérêt d'étudier systématiquement la dynamique interne des systèmes avant d'émettre des suppositions sur la conservation de la fonction de l'enzyme. Les perturbations mécaniques observées lorsque la ribonucléase A est greffée sur diverses surfaces (résultant en diverses orientations) concordent avec le compromis entre stabilité d'adsorption et activité enzymatique observé récemment par Weltz et al. par imagerie FRET mono-moléculaire [160][161][162].

En résumé, notre approche permet une modélisation simple à mettre en œuvre afin de comprendre l'impact de l'adsorption de protéines sur leur dynamique interne et fonction, en particulier lorsqu'il est nécessaire d'atteindre un équilibre subtil entre la stabilité de l'interaction protéine-surface et la conservation de l'activité catalytique. De plus une telle approche peut également être employée pour étudier les propriétés mécaniques d'une enzyme à partir des conformations qu'elle adopte au cours d'une trajectoire, comme montré lors du chapitre précédent (cf III.7).

Implicit Modeling of the Impact of Adsorption on Solid Surfaces for Protein Mechanics and Activity with a Coarse-Grained Representation

Nicolas Bourassin, Marc Baaden, Elisabeth Lojou, and Sophie Sacquin-Mora*

Cite This: *J. Phys. Chem. B* 2020, 124, 8516–8523

Read Online

ACCESS |

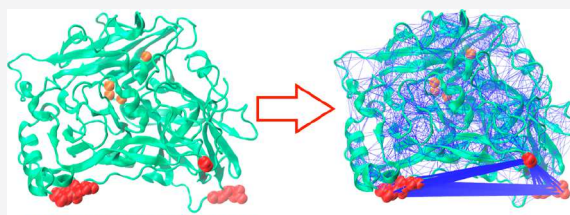


Metrics & More



Article Recommendations

ABSTRACT: Surface immobilized enzymes play a key role in numerous biotechnological applications such as biosensors, biofuel cells, or biocatalytic synthesis. As a consequence, the impact of adsorption on the enzyme structure, dynamics, and function needs to be understood on the molecular level as it is critical for the improvement of these technologies. With this perspective in mind, we used a theoretical approach for investigating local protein flexibility on the residue scale that couples a simplified protein representation with an elastic network and Brownian dynamics simulations. The impact of protein adsorption on a solid surface is implicitly modeled via additional external constraints between the residues in contact with the surface. We first performed calculations on a redox enzyme, bilirubin oxidase (BOD) from *M. verrucaria*, to study the impact of adsorption on its mechanical properties. The resulting rigidity profiles show that, in agreement with the available experimental data, the mechanical variations observed in the adsorbed BOD will depend on its orientation and its anchor residues (i.e., residues that are in contact with the functionalized surface). Additional calculations on ribonuclease A and nitroreductase shed light on how seemingly stable adsorbed enzymes can nonetheless display an important decrease in their catalytic activity resulting from a perturbation of their mechanics and internal dynamics.



1. INTRODUCTION

The interaction of proteins with solid surfaces is of crucial importance in the field of biomaterials,¹ since it plays a key role in numerous applications, such as tissue engineering and regenerative medicine (where we need to know the cellular response to implanted materials), the optimization of surfaces for biosensors, and the development of bioactive nanoparticles, biocatalysts, or bioanalytical systems.

One of the main issues that are addressed when investigating protein/surface interaction is the matter of protein orientation. Controlled adsorption with ordered proteins is essential for devices such as biosensors, where antibodies should be immobilized with a specific orientation favoring the following antibody–antigen binding,² or for bioelectrocatalysis devices (biofuel cells or bioreactors for electrosynthesis), where a correct enzyme orientation is essential for direct electron transfer between the adsorbed protein and the electrode.^{3,4} The adsorbed proteins' orientation depends on many factors, such as their charge, size, or shape, the support properties, or external conditions like the temperature and pH.^{5–7} Hence, these devices require a specific functionalization of the surface, in order to fine-tune its charge and physicochemical properties, that can be achieved with self-assembled monolayers (SAMs), for example. For both cases, the conservation of the adsorbed proteins' native conformation (and hence their biological function) is another key aspect that has to be taken into consideration. On the

opposite end of the applications spectrum, the development of materials resisting protein adsorption has also drawn much attention, since it has practical uses, such as marine antifouling or antimicrobial coating for medical devices. In that case the challenge will be to design biomaterials where proteins will not adsorb.^{8–10}

All these phenomena have now been under scrutiny for several decades, but reaching a detailed understanding of the molecular mechanisms associated with biomolecular adsorption on functionalized surfaces is far from being achieved. In particular, considerable experimental works have been conducted until now, such as atomic force microscopy, mass spectrometry, and various spectroscopies.^{11,12} However, the resolution of current experimental techniques is still insufficient to quantitatively determine the range of potential orientations and conformations of adsorbed proteins on the atomistic level. In that perspective, molecular simulations play an increasingly important role in revealing the mechanisms of chemical and biological processes taking place on the bio-nano interface and

Received: June 12, 2020

Revised: September 11, 2020

Published: September 14, 2020



designing new products. For over ten years, molecular simulation techniques have been developed to address these issues using multiscale approaches combining all-atom and coarse-grained models^{13–15} and represent a promising tool for the biomaterials field.^{16–18}

Numerous studies focus on the prediction of the adsorbed protein orientation and binding modes on the surface, which have to be controlled for example to ensure that an enzyme's catalytic site will remain accessible after adsorption, and on the impact of adsorption on protein structure, since conformational changes are indeed likely to perturb an enzyme's catalytic activity.^{19–22} However, proteins are known for being flexible objects, and their internal dynamics play a central role for their biological function.^{23,24} As a consequence, one also has to consider how surface binding will affect an enzyme's motions to determine whether it will remain functional in its adsorbed state. In that perspective, we used a coarse-grained, elastic network representation to implicitly model the impact of surface adsorption on protein mechanics. We first performed calculations on the redox enzyme bilirubin oxidase (BOD) from the fungus *Myrothecium verrucaria* to study the impact of adsorption on its mechanical properties. The resulting rigidity profiles show that, in agreement with the available experimental data, the mechanical variations observed in the adsorbed BOD will depend on its orientation and its anchor residues (that are in contact with the solid surface). Additional calculations on ribonuclease A and nitroreductase shed light on how seemingly stable adsorbed enzymes can nonetheless display an important decrease in their catalytic activity resulting from a perturbation of their mechanics.

2. MATERIALS AND METHODS

Brownian Dynamics Simulations. Rigidity Profile of a Protein. Coarse-grained Brownian dynamics (BD) simulations were run by using a modified version of the ProPHet (Probing Protein Heterogeneity, available online at <https://bioserv.rpbs.univ-paris-diderot.fr/services/ProPHet/>) program,^{25–27} where additional external mechanical constraints can be applied between a set of residues defined by the user. In this approach, the protein is represented by using an elastic network model (ENM).^{28,29} Unlike most common coarse-grained models where each residue is described by a single pseudoatom,³⁰ ProPHet uses a more detailed representation³¹ that involves up to three pseudoatoms per residue and enables different amino acids to be distinguished. Pseudoatoms closer than the cutoff parameter $R_c = 9 \text{ \AA}$ are joined by Gaussian springs which all have identical spring constants of $\gamma^{\text{struct}} = 0.42 \text{ N m}^{-1}$ ($0.6 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$). The springs are taken to be relaxed for the experimentally observed conformation of the protein. Note that the ENM used in this work is a two-parameters model, comprising the cutoff distance and the spring constant, which does not explicitly model electrostatic interactions. However, the elastic network is built from the protein folded crystallographic structure and therefore takes into account, in an implicit manner, all the interactions (electrostatic or hydrogen bonds) which contribute to shape the protein in its final fold. Despite their apparent simplicity, ENMs have turned out over the years to be a remarkably efficient tool for linking a protein structure to its mechanic and dynamic properties.^{32–38}

Following earlier studies which showed that ligands as large as a heme group actually had little influence on calculated force constants,^{39,40} we chose not to include the prosthetic groups (such as metallic clusters) in the protein representation. The

simulations use an implicit solvent representation via the diffusion and random displacement terms in the equation of motion,⁴¹ and hydrodynamic interactions are included through the diffusion tensor.⁴²

Mechanical properties are obtained from 200000 BD steps at an interval of 10 fs and a temperature of 300 K. The simulations lead to deformations of roughly $1.5 \text{ \AA}$ root-mean-square deviation with respect to the protein starting conformation (which corresponds to the system's equilibrium state). The trajectories are analyzed in terms of the fluctuations of the mean distance between each pseudoatom belonging to a given amino acid and the pseudoatoms belonging to the remaining residues of the protein. The inverse of these fluctuations yields an effective force constant k_i describing the ease of moving a pseudoatom with respect to the overall protein structure:

$$k_i = \frac{3k_B T}{\langle (d_i - \langle d_i \rangle)^2 \rangle}$$

where $\langle \rangle$ denotes an average taken over the whole simulation and $d_i = \langle d_{ij} \rangle_{j^*}$ is the average distance from particle i to the other particles j in the protein (the sum over j^* implies the exclusion of the pseudoatoms belonging to residue i). The distance between the C_α pseudoatom of residue i and the C_α pseudoatoms of the adjacent residues $i - 1$ and $i + 1$ are excluded since the corresponding distances are virtually constant. The force constant for each residue k is the average of the force constants for all its constituent pseudoatoms i . We will use the term *rigidity profile* to describe the ordered set of force constants for all the residues of the protein.

Applying External Constraints on the Protein. While in early work on the green fluorescent protein⁴³ the external mechanical stress was modeled by applying a constant force between the C_α pseudoatoms of the residues under constraint, in this study we apply the methodology developed in ref 44, where an external constraint is modeled by adding supplementary springs to the ENM representations. These are termed as *constraint springs*, in opposition to the structural springs resulting from the original conformation of the protein. This way we model the protein adsorption on a solid surface as a set of additional constraints that will lock the distance between protein residues which are in contact with the surface and are termed *anchor residues* for the rest of the article. All constraint springs have the same constant $\gamma^{\text{const}} = 100\gamma^{\text{struct}} = 42.0 \text{ N m}^{-1}$, and as for the structural springs, their equilibrium length corresponds to the original distance observed for the anchor residues in the protein experimental conformation.

Principal Component Analysis of the Coarse-Grained Trajectories. Another useful way to investigate a protein's internal dynamics is to look at its collective modes of motions. The BD trajectories for the proteins with and without the application of an external constraint were analyzed by using principal component analysis (PCA)^{45–47} with tools from the Gromacs software package^{48–50} in order to obtain a full set of eigenvectors and eigenvalues. However, for the three proteins under study in this work, the internal dynamics are widely distributed with no dominating eigenvectors, since for all cases the 30 first eigenvectors only account for roughly 50–60% of the protein's total variance. Subsequently, our calculations showed no clear impact of the external constraints on the protein dynamics and this approach will not be further discussed in the article.

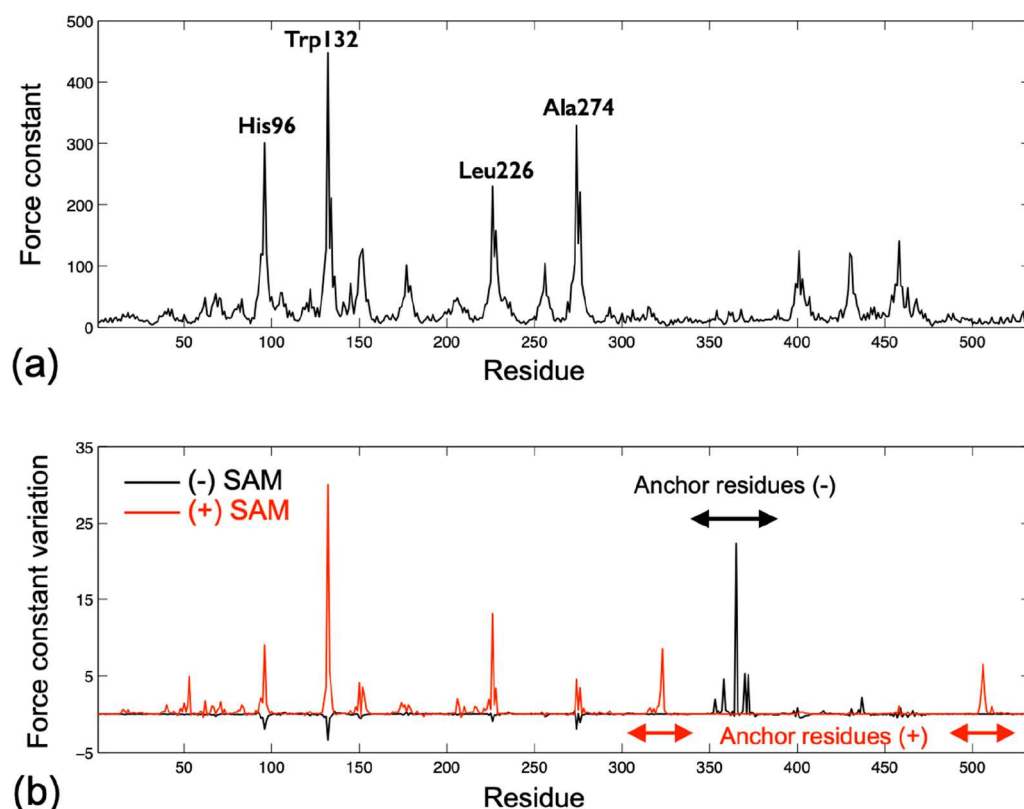


Figure 1. Rigidity profiles (in kcal mol⁻¹ Å⁻²) for the BOD from *M. verrucaria*. (a) Protein with no external constraint. (b) Force constant variations when applying external constraints modeling the protein adsorption on negatively charged SAMs (black line) or on positively charged SAMs (red line). The arrows highlight the position of the anchor residues (where the external constraints are applied) along the sequence.

3. RESULTS AND DISCUSSION

Mechanical Variations in the Adsorbed Bilirubin Oxidase. Bilirubin oxidase is a multicopper oxidase which catalyzes the reduction of O₂ to water and is considered as a promising alternative to platinum-based catalysts in enzymatic fuel cells.^{51,52} Figure 1a shows the rigidity profile for the BOD from *M. verrucaria* (PDB entry 2xll) when no external constraint is applied. In agreement with earlier work on protein mechanics,⁴⁰ the most rigid residues (shown in purple in Figure 2) are located in the protein core and lie in the vicinity of the enzyme catalytic site. Residues His96, Trp132, Leu226, and Ala274 in particular are involved in the binding site of the trinuclear copper cluster (TNC) and the channels leading from the TNC to the enzyme surface.^{53,54}

To model the impact of protein adsorption on the rigidity profile, we selected as anchor residues the residues that were predicted to lie within 0.35 nm from the solid surface in the simulation work of Yang et al.⁵⁵ In this study, the authors used a combination of parallel tempering Monte Carlo and all-atom molecular dynamics simulations to predict the orientation of BOD adsorbed on a SAM functionalized surface. Amino (–NH₂)– and carboxyl (–COOH)–terminated SAMs were used to represent positively and negatively charged surfaces, respectively, and led to different orientations of the enzyme with the following residues lying close to the surface (see Figure 3):

- Arg353, Gly358, Gly365, Asp370, Gln372, and Arg437 for the negatively charged surface (note that the negatively charged residue Asp370 generates a repulsion on the negatively charged SAM that is characterized and quantified in ref 55).

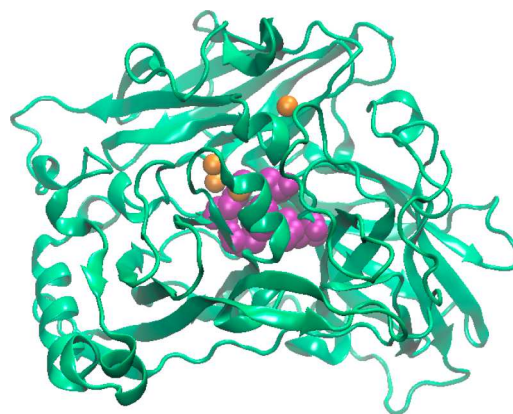


Figure 2. Cartoon representation for the BOD from *M. verrucaria* with the copper atoms in orange and the most rigid residues (annotated in Figure 1a) shown as purple van der Waals spheres. The trinuclear copper cluster lies next to the rigid core, while the T1 copper site is closer to the protein surface. Figures 2, 3, 4a, and 5a were prepared by using Visual Molecular Dynamics.⁶⁰

- Asp53, Asp322, Asp323, Gln505, Ala506, and Gln507 for the positively charged surface.

The force constant variations resulting from the application of additional constraints on the anchor residues are shown in Figure 1b. For BOD oriented on the negatively charged surface (black curve in Figure 1b), the only residues that are impacted by the enzyme adsorption are the anchor residues themselves, which present an increase in their force constant, while the rest of the protein mechanics remains unchanged. In the case of a

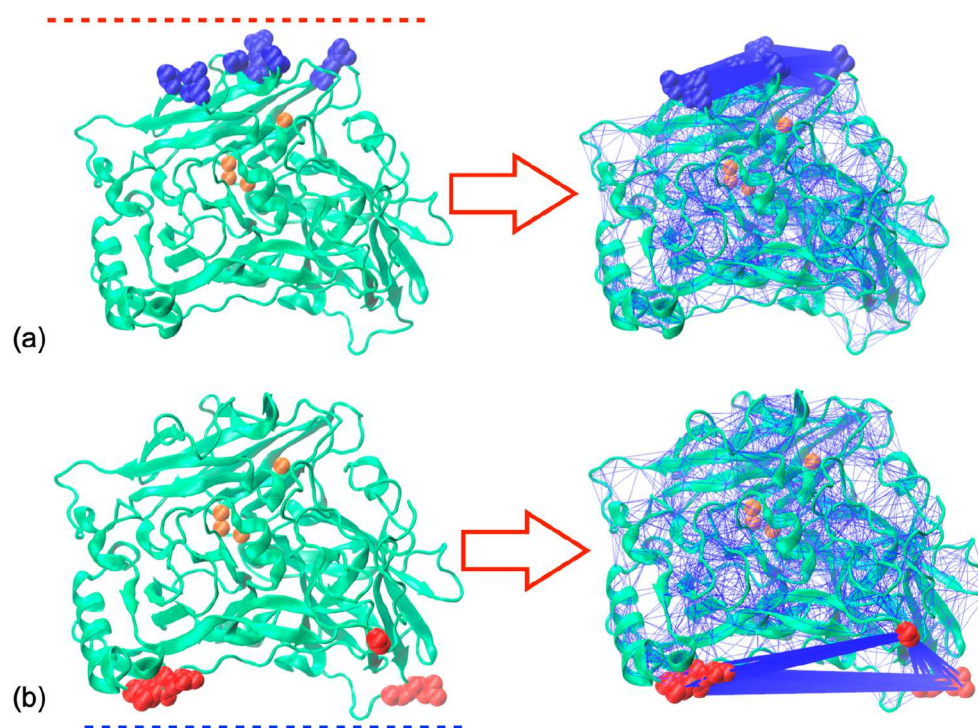


Figure 3. Elastic network in our BOD CG model with the anchor residues (where additional constraint springs are added) highlighted as blue or red van der Waals spheres. (a) Anchor residues for the negatively charged SAMs. (b) Anchor residues for the positively charged SAMs. The dashed lines in (a) and (b) highlight the position of the negatively and positively, respectively, charged surface on which the protein is adsorbed.

positively charged surface (red curve in Figure 1b), the protein adsorption will impact not only the anchor residues but also residues from the central rigid core, which undergo an increase in their force constant.

In their work modeling BOD adsorption on SAMs,⁵⁵ Yang et al. focused their analyses on the interaction sites between the enzyme and the surface and on the conformational changes undergone by the protein upon adsorption. They show that the average rmsd observed for the adsorbed BOD trajectories, 3.7 Å for COOH–SAMs and 3.0 Å for NH₂–SAMs, are only slightly larger than the average rmsd observed for BOD in bulk water (2.9 Å). The observed BOD orientations on the surface are prone to favor direct electron transfer (DET) between the enzyme and negatively charged surfaces, since the T1 copper site lies closer to the electrode surface than when the enzyme is adsorbed on positively charged surfaces. However, their study concludes that the overall enzyme structure is well conserved and does not comment on the impact of adsorption on the protein catalytic activity, including the impact on the mediated electron transfer (MET) that can be additionally or alternatively observed between BOD and the electrode. Meanwhile, Hitaishi et al. investigated the activity of the same BOD from *M. verrucaria* adsorbed on similar surfaces; that is, gold electrodes functionalized with –COOH- or –NH₂-terminated SAMs, using cyclic voltammetry and spectrometric approaches (SPR, PMIRRAS, and ellipsometry).⁵⁶ In agreement with the BOD orientations predicted by Yang et al., no DET could be observed when BOD was adsorbed on the positively charged SAMs. In the case of negatively charged SAMs, DET could be observed, with a decrease of the electron transfer rate for BOD adsorbed on 6-mercaptohexanoic acid (6-MHA) compared to BOD on 11-mercaptopundecanoic acid (11-MUA), as a consequence of the decrease of the electron tunneling rate with the length of the alkane chain.⁵⁷ At pH = 6, the enzyme

coverage was found to be similar on the negatively and positively charged surfaces, and the PMIRRAS spectra suggested that the protein general secondary structure is well conserved on both surfaces. However, the global ET rate (including both MET and DET currents) was much lower (by a factor of 4) for BOD adsorbed on the positively charged 4-aminothiophenol (4-ATP) surface. This reduced catalytic activity for the enzyme concurs with the perturbations that we observed in the mechanical properties of the BOD adsorbed on positively charged surfaces and which are likely to disrupt the protein function since they impact residues binding the central catalytic copper cluster. While leaving the global structure intact, the external constraints applied on anchor residues upon adsorption increase the rigidity of functional residues that lie between 20 and 25 Å away from them. Note that this long-range effect of mechanical perturbations has already been observed in earlier studies on bacterial reaction centers.^{58,59}

Adsorbed Ribonuclease A. Ribonuclease A (RNase A) is a small (120 residues) enzyme that catalyzes the breakdown of the phosphodiester backbone in RNA. Its immobilization on solid surfaces is of interest for applications such as the purification of biopharmaceutical plasmid DNA,⁶⁰ and it is also currently investigated as a potential anti tumoral agent that could be coupled to material surfaces in various drug delivery platforms.⁶¹ In their experimental work,⁶² Wei et al. investigated the enzymatic activity of RNase A adsorbed on three different surfaces, namely silica glass, high-density polyethylene (HDPE), and poly(methyl methacrylate) (PMMA). Adsorption caused RNase A to undergo a substantial degree of unfolding and to lose about 60% of its native-state catalytic activity, independently of the material it was adsorbed on. In their theoretical study using MD simulations, Liu et al. investigated the behavior of RNase A adsorbed on SAM-functionalized surfaces with opposite charges

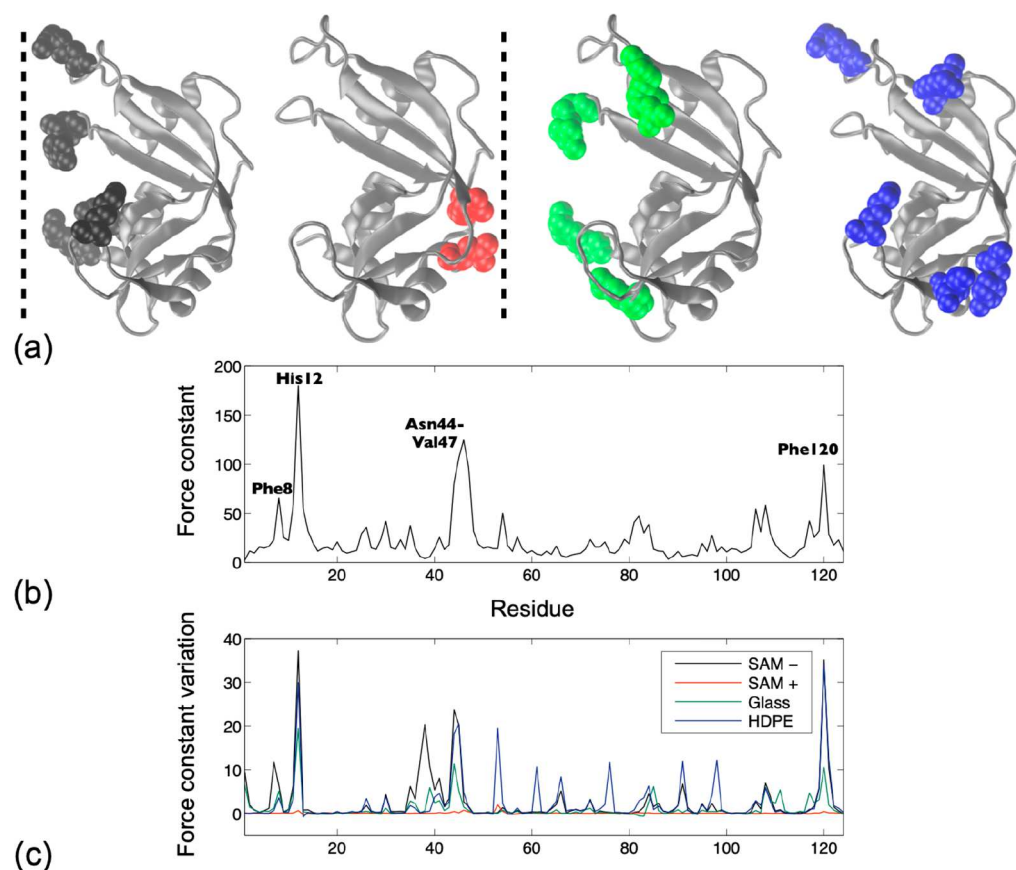


Figure 4. (a) Cartoon representation for RNase A (PDB id 7rsa) with the anchor residues shown as van der Waals spheres for different surfaces: negatively charged SAMs (black), positively charged SAMs (red), glass (green), and HDPE (blue). (b) Rigidity profile (in $\text{kcal mol}^{-1} \text{\AA}^{-2}$) for the RNase A from *B. taurus* with no external constraints. (c) Force constant variation when applying external constraints modeling the protein adsorption with the anchor residues shown in (a) and with the same color code. The dashed lines in (a) highlight the position of the negatively and positively charged SAMs on which the protein is adsorbed.

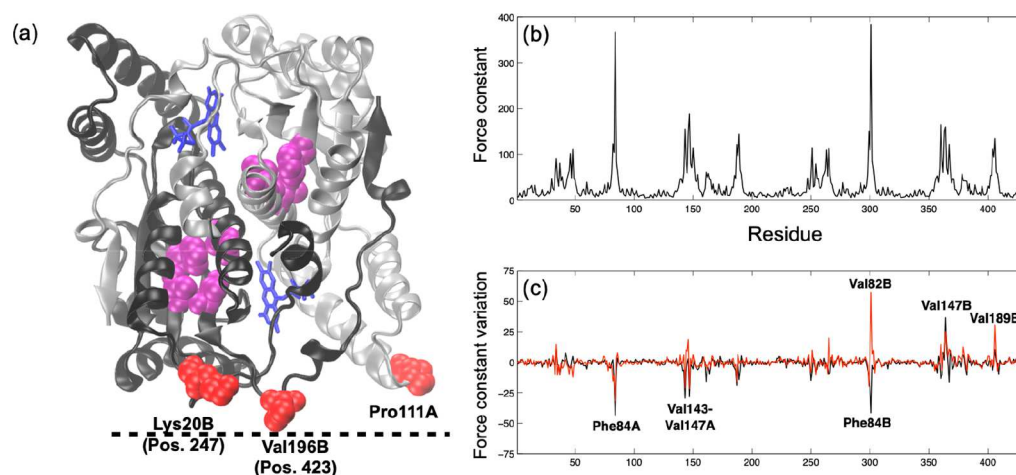


Figure 5. (a) Cartoon representation for the homodimeric NfsB (PDB id 1ds7) with FMN cofactors in blue. The anchor residues are shown as red van der Waals spheres, and the residues undergoing the largest force constant variations upon surface adsorption are in purple. (b) Rigidity profile (in $\text{kcal mol}^{-1} \text{\AA}^{-2}$) for the homodimeric NfsB with no external constraints. (c) Force constant variation when applying external constraint between anchors positions (423,111), black line, or (423,247), red line. The dashed line in (a) highlights the position of the surface on which the protein is adsorbed.

(thus leading to opposite enzyme orientations).⁶³ In both cases, they observed that the enzyme native conformation is preserved.

Here we modeled the impact of adsorption on RNase A mechanical properties for four different materials, using as starting point the high-resolution crystal structure with the PDB

id 7rsa and as anchor residues those mentioned in the aforementioned studies (see Figure 4a):

- Negatively charged SAMs (SAM[−]),⁶³ Lys1, Lys7, Lys37, Asp38, Arg39, Lys66, Lys91 (one can note the only negatively charge residue, Asp38, which is pulled close to

the surface by the two surrounding positively charged neighbors, Lys37 and Arg39⁶³).

- Positively charged SAMs (SAM+),⁶³ Glu49, Asp53.
- Glass,⁶² Lys1, Arg39, Arg85, Glu111 (leading to the same enzyme orientation as the SAM− surface).
- HDPE (and also PMMA),⁶² Asp53, Lys61, Lys66, Tyr76, Lys91, Lys98.

For the SAM+ orientation, where there are only two anchor residues which lie very close to each other, the adsorption has little to no impact on the enzyme rigidity profile (see the red line in Figure 4c). For all the other materials, adsorption induces a strong increase in the force constant of a limited set of residues. This set includes the anchor residues, as could be expected, but also residues from the enzyme catalytic site (His12 and Lys41)⁶⁴ and residues forming the protein folding nucleus (Phe8, Phe46, Val47, and Phe120).⁶⁵ Disrupting the dynamic properties of these groups of residues is indeed likely to impact the catalytic activity of RNase A.

Adsorbed Nitroreductase. Nitroreductase (NfsB) is a FMN-dependent homodimeric enzyme which catalyzes the reduction of a wide range of substrates containing nitro groups. It is well characterized both structurally and functionally and often serves as a model system to study how surface interactions will affect enzyme stability and activity.^{66–69} Recently, Zou et al. investigated the impact of two-point surface attachment on protein function by producing NfsB mutants with neighboring tethering sites and using spectroscopic approaches to deduce their orientation and stability.⁶⁹ Interestingly, two mutants, with the anchor residue positions (111, 423) and (247, 423), display better structural stability than any single-site immobilized enzyme. However, these mutants are also less active than the single-site ones, thus suggesting that there is a trade-off between activity and stability.

These experimental results concur with our coarse-grained simulations on NfsB from *E. coli* (PDB: 1ds7), where both two-site constraints induce changes of the residues force constants in the protein rigid core (see Figure 5). In Figure 5c, we can see how applying an external constraint between anchor positions (111, 423) or (247, 423) disturbs the original periodicity observed in the rigidity profile of the unconstrained enzyme in Figure 5b (which reflects the protein homodimeric structure). Unlike the previous cases for BOD and RNase A where the additional constraints modeling protein adsorption would only induce an increase in the protein rigidity, the constraint between the anchor residues in NfsB leads to a mixed mechanical response, with residues from the central rigid core undergoing either a decrease or an increase of their force constant. The disruption of the initial pattern observed in Figure 5b may be related to the decrease in activity observed experimentally in ref 69.

4. CONCLUSION

Enzymes immobilized on solid surfaces appear in numerous devices that are currently developed for a wide range of applications, such as biocatalysis, biosensing, or healthcare. However, the efficient integration of enzymes in nanomaterials is a complicated issue since it requires the simultaneous preservation of the enzyme structure, dynamics, and catalytic site accessibility, a goal that remains difficult to achieve. In this study, we use a modified version of the ProPHet program, which combines a coarse-grained protein representation and Brownian dynamics simulations to investigate the impact of surface

immobilization on protein mechanics. Using already available data from the literature (produced by both theoretical and experimental approaches) regarding the orientation of proteins adsorbed on solid surfaces and their anchor residues, protein adsorption is modeled in an implicit manner by adding supplementary constraints between the anchor residues, i.e., residues in contact with the solid surface, to the global elastic network. This permits to observe the mechanical impact of adsorption even though the protein structure remains intact during the process. The first calculations were done on a bilirubin oxidase, an enzyme involved in the development of biofuel cells, and they show that the mechanical perturbations resulting from these additional constraints depend on the enzyme's orientation on the surface and the resulting set of anchor residues. Furthermore, the rigidity increase observed in the protein following its adsorption on a positively charged surface not only concerns the anchor residues (as could be expected), but it can also be a long-range effect and impact the force constants of residues located in the enzyme active site. This, in turn, is likely to be detrimental for the catalytic function, and our results concur with the experimental observations made by Hitaishi et al.,⁵⁶ who compared the electron transfer rates and conformation of BOD adsorbed on positively and negatively charged surfaces.

Further calculations on the enzymes RNase A and nitroreductase, for which experimental data regarding the impact of adsorption on function are available, lead to similar conclusions; that is, the experimentally observed activity loss upon surface binding can be associated with mechanical perturbations of the catalytic residues.

Globally, our results highlight the fact that the structural integrity of surface immobilized enzymes is no guarantee that the enzyme will remain functional and that the systems' internal dynamics should be specifically investigated before drawing any conclusions regarding the conservation of the catalytic activity. The mechanical perturbations obtained for RNase A grafted on various surfaces (and with various orientations) illustrate the stability–activity trade-off that was recently observed by Weltz et al.⁷⁰ using single-molecule FRET imaging. Altogether our modeling approach provides a simple tool to help understand how protein adsorption might impact their dynamics and function, especially when one needs to achieve a delicate balance between an enzyme stability and its catalytic activity.

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

Sophie Sacquin-Mora — CNRS, Laboratoire de Biochimie Théorique, UPR 9080, Université de Paris, 75005 Paris, France; Institut de Biologie Physico-Chimique-Fondation Edmond de Rothschild, PSL Research University, 75006 Paris, France; orcid.org/0000-0002-2781-4333; Email: sacquin@ibpc.fr

Authors

Nicolas Bourassin — CNRS, Laboratoire de Biochimie Théorique, UPR 9080, Université de Paris, 75005 Paris, France; Institut de Biologie Physico-Chimique-Fondation Edmond de Rothschild, PSL Research University, 75006 Paris, France

Marc Baaden — CNRS, Laboratoire de Biochimie Théorique, UPR 9080, Université de Paris, 75005 Paris, France; Institut de Biologie Physico-Chimique-Fondation Edmond de Rothschild, PSL Research University, 75006 Paris, France; orcid.org/0000-0001-6472-0486

Elisabeth Lojou – CNRS, Bioénergétique et Ingénierie des Protéines, UMR 7281, Aix Marseille Univ, 13402 Cedex 09 Marseille, France; orcid.org/0000-0003-2593-4670

Complete contact information is available at:
<https://pubs.acs.org/10.1021/acs.jpcb.0c05347>

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the ANR (ENZYMOR-ANR-16-CE05-0024) and by the “Initiative d’Excellence” program from the French State (Grant “DYNAMO”, ANR-11-LABX-0011-01).

REFERENCES

- (1) Brancolini, G.; Bellucci, L.; Maschio, M. C.; Di Felice, R.; Corni, S. The interaction of peptides and proteins with nanostructures surfaces: a challenge for nanoscience. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2019**, *41*, 86–94.
- (2) Bhakta, S. A.; Evans, E.; Benavidez, T. E.; Garcia, C. D. Protein adsorption onto nanomaterials for the development of biosensors and analytical devices: a review. *Anal. Chim. Acta* **2015**, *872*, 7–25.
- (3) Oteri, F.; Ciaccafava, A.; de Poulpiquet, A.; Baaden, M.; Lojou, E.; Sacquin-Mora, S. The weak, fluctuating, dipole moment of membrane-bound hydrogenase from *Aquifex aeolicus* accounts for its adaptability to charged electrodes. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2014**, *16* (23), 11318–22.
- (4) Hitaishi, V.; Clement, R.; Bourassin, N.; Baaden, M.; de Poulpiquet, A.; Sacquin-Mora, S.; Ciaccafava, A.; Lojou, E. Controlling Redox Enzyme Orientation at Planar Electrodes. *Catalysts* **2018**, *8* (5), 192.
- (5) Rabe, M.; Verdes, D.; Seeger, S. Understanding protein adsorption phenomena at solid surfaces. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2011**, *162* (1–2), 87–106.
- (6) Mulheran, P. A.; Connell, D. J.; Kubiak-Ossowska, K. Steering protein adsorption at charged surfaces: electric fields and ionic screening. *RSC Adv.* **2016**, *6* (77), 73709–73716.
- (7) Kubiak-Ossowska, K.; Jachimska, B.; Al Qaraghuli, M.; Mulheran, P. A. Protein interactions with negatively charged inorganic surfaces. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2019**, *41*, 104–117.
- (8) Jiang, S. Y.; Cao, Z. Q. Ultralow-Fouling, Functionalizable, and Hydrolyzable Zwitterionic Materials and Their Derivatives for Biological Applications. *Adv. Mater.* **2010**, *22* (9), 920–932.
- (9) Su, L.; Li, Y.; Liu, Y.; An, Y.; Shi, L. Recent Advances and Future Prospects on Adaptive Biomaterials for Antimicrobial Applications. *Macromol. Biosci.* **2019**, *19* (12), e1900289.
- (10) Wei, T.; Yu, Q.; Chen, H. Responsive and Synergistic Antibacterial Coatings: Fighting against Bacteria in a Smart and Effective Way. *Adv. Healthcare Mater.* **2019**, *8* (3), 1801381.
- (11) Zhang, A. J.; Xie, Y.; Zhou, J. Experimental Control and Characterization of Protein Orientation on Surfaces. *Prog. Chem.* **2009**, *21* (7–8), 1408–1417.
- (12) Rodriguez-Quijada, C.; Sanchez-Purra, M.; de Puig, H.; Hamad-Schifferli, K. Physical Properties of Biomolecules at the Nanomaterial Interface. *J. Phys. Chem. B* **2018**, *122* (11), 2827–2840.
- (13) Oteri, F.; Baaden, M.; Lojou, E.; Sacquin-Mora, S. Multiscale simulations give insight into the hydrogen in and out pathways of [NiFe]-hydrogenases from *Aquifex aeolicus* and *Desulfovibrio fructosovorans*. *J. Phys. Chem. B* **2014**, *118* (48), 13800–11.
- (14) Brancolini, G.; Tozzini, V. Multiscale modeling of proteins interaction with functionalized nanoparticles. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2019**, *41*, 66–73.
- (15) Malaspina, D. C.; Perez-Fuentes, L.; Drummond, C.; Bastos-Gonzalez, D.; Faraudo, J. Protein-surface interactions at the nanoscale: Atomistic simulations with implicit solvent models. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2019**, *41*, 40–49.
- (16) Latour, R. A. Molecular simulation of protein-surface interactions: benefits, problems, solutions, and future directions. *Biointerphases* **2008**, *3* (3), FC2–12.
- (17) Ozboyaci, M.; Kokh, D. B.; Corni, S.; Wade, R. C. Modeling and simulation of protein-surface interactions: achievements and challenges. *Q. Rev. Biophys.* **2016**, *49*, e4.
- (18) Quan, X. B.; Liu, J.; Zhou, J. Multiscale modeling and simulations of protein adsorption: progresses and perspectives. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2019**, *41*, 74–85.
- (19) Bellion, M.; Santen, L.; Mantz, H.; Haehl, H.; Quinn, A.; Nagel, A.; Gilow, C.; Weitenberg, C.; Schmitt, Y.; Jacobs, K. Protein adsorption on tailored substrates: long-range forces and conformational changes. *J. Phys.: Condens. Matter* **2008**, *20* (40), 404226.
- (20) Secundo, F. Conformational changes of enzymes upon immobilisation. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42* (15), 6250–61.
- (21) Marruecos, D. F.; Schwartz, D. K.; Kaar, J. L. Impact of surface interactions on protein conformation. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2018**, *38*, 45–55.
- (22) Bolivar, J. M.; Nidetzky, B. On the relationship between structure and catalytic effectiveness in solid surface-immobilized enzymes: Advances in methodology and the quest for a single-molecule perspective. *Biochim. Biophys. Acta, Proteins Proteomics* **2020**, *1868* (2), 140333.
- (23) Micheletti, C. Comparing proteins by their internal dynamics: exploring structure-function relationships beyond static structural alignments. *Phys. Life Rev.* **2013**, *10* (1), 1–26.
- (24) Orozco, M. A theoretical view of protein dynamics. *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43* (14), 5051–66.
- (25) Sacquin-Mora, S. Motions and mechanics: investigating conformational transitions in multi-domain proteins with coarse-grain simulations. *Mol. Simul.* **2014**, *40* (1–3), 229–236.
- (26) Sacquin-Mora, S. Bridging Enzymatic Structure Function via Mechanics: A Coarse-Grain Approach. *Methods Enzymol.* **2016**, *578*, 227–48.
- (27) Sacquin-Mora, S. Mechanical variations in proteins with large-scale motions highlight the formation of structural locks. *J. Struct. Biol.* **2018**, *203* (3), 195–204.
- (28) Tirion, M. M. Large Amplitude Elastic Motions in Proteins from a Single-Parameter, Atomic Analysis. *Phys. Rev. Lett.* **1996**, *77* (9), 1905–1908.
- (29) Bahar, I.; Atilgan, A. R.; Erman, B. Direct evaluation of thermal fluctuations in proteins using a single-parameter harmonic potential. *Folding Des.* **1997**, *2* (3), 173–81.
- (30) Tozzini, V. Coarse-grained models for proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2005**, *15* (2), 144–50.
- (31) Zacharias, M. Protein-protein docking with a reduced protein model accounting for side-chain flexibility. *Protein Sci.* **2003**, *12* (6), 1271–82.
- (32) Hinsen, K.; Thomas, A.; Field, M. J. Analysis of domain motions in large proteins. *Proteins: Struct., Funct., Genet.* **1999**, *34* (3), 369–82.
- (33) Atilgan, A. R.; Durell, S. R.; Jernigan, R. L.; Demirel, M. C.; Keskin, O.; Bahar, I. Anisotropy of fluctuation dynamics of proteins with an elastic network model. *Biophys. J.* **2001**, *80* (1), 505–15.
- (34) Tama, F.; Wrighers, W.; Brooks, C. L., 3rd Exploring global distortions of biological macromolecules and assemblies from low-resolution structural information and elastic network theory. *J. Mol. Biol.* **2002**, *321* (2), 297–305.
- (35) Yang, L.; Song, G.; Carriquiry, A.; Jernigan, R. L. Close correspondence between the motions from principal component analysis of multiple HIV-1 protease structures and elastic network modes. *Structure* **2008**, *16* (2), 321–330.
- (36) Yang, L.; Song, G.; Jernigan, R. L. Protein elastic network models and the ranges of cooperativity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2009**, *106* (30), 12347–12352.
- (37) Fuglebakk, E.; Tiwari, S. P.; Reuter, N. Comparing the intrinsic dynamics of multiple protein structures using elastic network models. *Biochim. Biophys. Acta, Gen. Subj.* **2015**, *1850* (5), 911–922.
- (38) Lopez-Blanco, J. R.; Chacon, P. New generation of elastic network models. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2016**, *37*, 46–53.

- (39) Sacquin-Mora, S.; Lavery, R. Investigating the local flexibility of functional residues in hemoproteins. *Biophys. J.* **2006**, *90* (8), 2706–17.
- (40) Sacquin-Mora, S.; Laforet, E.; Lavery, R. Locating the active sites of enzymes using mechanical properties. *Proteins: Struct., Funct., Genet.* **2007**, *67* (2), 350–9.
- (41) Ermak, D. L.; McCammon, J. A. Brownian dynamics with hydrodynamic interactions. *J. Chem. Phys.* **1978**, *69*, 1352–1360.
- (42) Pastor, R. W.; Venable, R.; Karplus, M. Brownian dynamics simulation of a lipid chain in a membrane bilayer. *J. Chem. Phys.* **1988**, *89*, 1112–1127.
- (43) Sacquin-Mora, S.; Lavery, R. Modeling the mechanical response of proteins to anisotropic deformation. *ChemPhysChem* **2009**, *10* (1), 115–8.
- (44) Sacquin-Mora, S.; Delalande, O.; Baaden, M. Functional modes and residue flexibility control the anisotropic response of guanylate kinase to mechanical stress. *Biophys. J.* **2010**, *99* (10), 3412–9.
- (45) Garcia, A. E. Large-amplitude nonlinear motions in proteins. *Phys. Rev. Lett.* **1992**, *68* (17), 2696–2699.
- (46) Amadei, A.; Linssen, A. B. M.; Berendsen, H. J. C. Essential dynamics of proteins. *Proteins: Struct., Funct., Genet.* **1993**, *17* (4), 412–425.
- (47) Amadei, A.; Linssen, A. B. M.; deGroot, B. L.; vanAalten, D. M. F.; Berendsen, H. J. C. An efficient method for sampling the essential subspace of proteins. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **1996**, *13* (4), 615–625.
- (48) Berendsen, H. J. C.; Vanderspoel, D.; Vandrunen, R. GROMACS - A message-passing parallel molecular-dynamics implementation. *Comput. Phys. Commun.* **1995**, *91* (1–3), 43–56.
- (49) Lindahl, E.; Hess, B.; van der Spoel, D. GROMACS 3.0: a package for molecular simulation and trajectory analysis. *J. Mol. Model.* **2001**, *7* (8), 306–317.
- (50) Pronk, S.; Pall, S.; Schulz, R.; Larsson, P.; Bjelkmar, P.; Apostolov, R.; Shirts, M. R.; Smith, J. C.; Kasson, P. M.; van der Spoel, D.; Hess, B.; Lindahl, E. GROMACS 4.5: a high-throughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit. *Bioinformatics* **2013**, *29* (7), 845–54.
- (51) Tsujimura, S.; Tatsumi, B.; Ogawa, J.; Shimizu, S.; Kano, K.; Ikeda, T. Bioelectrocatalytic reduction of dioxygen to water at neutral pH using bilirubin oxidase as an enzyme and 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonate) as an electron transfer mediator. *J. Electroanal. Chem.* **2001**, *496* (1–2), 69–75.
- (52) Mazurenko, I.; Wang, X.; de Poulpique, A.; Lojou, E. H-2/O-2 enzymatic fuel cells: from proof-of-concept to powerful devices. *Sustainable Energy & Fuels* **2017**, *1* (7), 1475–1501.
- (53) Mizutani, K.; Toyoda, M.; Sagara, K.; Takahashi, N.; Sato, A.; Kamitaka, Y.; Tsujimura, S.; Nakanishi, Y.; Sugiura, T.; Yamaguchi, S.; Kano, K.; Mikami, B. X-ray analysis of bilirubin oxidase from *Myrothecium verrucaria* at 2.3 Å resolution using a twinned crystal. *Acta Crystallogr., Sect. F: Struct. Biol. Cryst. Commun.* **2010**, *66* (Pt 7), 765–70.
- (54) Cracknell, J. A.; McNamara, T. P.; Lowe, E. D.; Blanford, C. F. Bilirubin oxidase from *Myrothecium verrucaria*: X-ray determination of the complete crystal structure and a rational surface modification for enhanced electrocatalytic O₂ reduction. *Dalton Trans* **2011**, *40* (25), 6668–75.
- (55) Yang, S.; Liu, J.; Quan, X.; Zhou, J. Bilirubin Oxidase Adsorption onto Charged Self-Assembled Monolayers: Insights from Multiscale Simulations. *Langmuir* **2018**, *34* (33), 9818–9828.
- (56) Hitaishi, V. P.; Mazurenko, I.; Harb, M.; Clement, R.; Taris, M.; Castano, S.; Duche, D.; Lecomte, S.; Ilbert, M.; de Poulpique, A.; Lojou, E. Electrostatic-Driven Activity, Loading, Dynamics, and Stability of a Redox Enzyme on Functionalized-Gold Electrodes for Bioelectrocatalysis. *ACS Catal.* **2018**, *8* (12), 12004–12014.
- (57) Smalley, J. F.; Feldberg, S. W.; Chidsey, C. E. D.; Linford, M. R.; Newton, M. D.; Liu, Y. P. the Kinetics of Electron-Transfer through Ferrocene-Terminated Alkanethiol Monolayers on Gold. *J. Phys. Chem.* **1995**, *99* (35), 13141–13149.
- (58) Sacquin-Mora, S.; Sebban, P.; Derrien, V.; Frick, B.; Lavery, R.; Alba-Simionesco, C. Probing the flexibility of the bacterial reaction center: the wild-type protein is more rigid than two site-specific mutants. *Biochemistry* **2007**, *46* (51), 14960–8.
- (59) Francia, F.; Malferrari, M.; Sacquin-Mora, S.; Venturoli, G. Charge recombination kinetics and protein dynamics in wild type and carotenoid-less bacterial reaction centers: studies in trehalose glasses. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113* (30), 10389–98.
- (60) Cullen, S. P.; Liu, X.; Mandel, I. C.; Himpel, F. J.; Gopalan, P. Polymeric brushes as functional templates for immobilizing ribonuclease A: study of binding kinetics and activity. *Langmuir* **2008**, *24* (3), 913–20.
- (61) Jordaan, S.; Akinrinmade, O. A.; Nachreiner, T.; Cremer, C.; Naran, K.; Chetty, S.; Barth, S. Updates in the Development of ImmunoRNases for the Selective Killing of Tumor Cells. *Biomedicines* **2018**, *6* (1), 28.
- (62) Wei, Y.; Thyparambil, A. A.; Wu, Y.; Latour, R. A. Adsorption-induced changes in ribonuclease A structure and enzymatic activity on solid surfaces. *Langmuir* **2014**, *30* (49), 14849–58.
- (63) Liu, J.; Yu, G.; Zhou, J. Ribonuclease A adsorption onto charged self-assembled monolayers: A multiscale simulation study. *Chem. Eng. Sci.* **2015**, *121*, 331–339.
- (64) Camilloni, C.; Robustelli, P.; De Simone, A.; Cavalli, A.; Vendruscolo, M. Characterization of the conformational equilibrium between the two major substates of RNase A using NMR chemical shifts. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134* (9), 3968–71.
- (65) Sacquin-Mora, S. Fold and flexibility: what can proteins' mechanical properties tell us about their folding nucleus? *J. R. Soc., Interface* **2015**, *12* (112), 20150876.
- (66) Shen, L.; Schroeder, M.; Ogorzalek, T. L.; Yang, P.; Wu, F. G.; Marsh, E. N.; Chen, Z. Surface orientation control of site-specifically immobilized nitro-reductase (NfsB). *Langmuir* **2014**, *30* (20), 5930–8.
- (67) Schroeder, M. M.; Wang, Q.; Badieyan, S.; Chen, Z.; Marsh, E. N. G. Effect of Surface Crowding and Surface Hydrophilicity on the Activity, Stability and Molecular Orientation of a Covalently Tethered Enzyme. *Langmuir* **2017**, *33* (28), 7152–7159.
- (68) Kienle, D. F.; Falatach, R. M.; Kaar, J. L.; Schwartz, D. K. Correlating Structural and Functional Heterogeneity of Immobilized Enzymes. *ACS Nano* **2018**, *12* (8), 8091–8103.
- (69) Zou, X.; Wei, S.; Badieyan, S.; Schroeder, M.; Jasensky, J.; Brooks, C. L., 3rd; Marsh, E. N. G.; Chen, Z. Investigating the Effect of Two-Point Surface Attachment on Enzyme Stability and Activity. *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140* (48), 16560–16569.
- (70) Weltz, J. S.; Kienle, D. F.; Schwartz, D. K.; Kaar, J. L. Reduced Enzyme Dynamics upon Multipoint Covalent Immobilization Leads to Stability-Activity Trade-off. *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *142* (7), 3463–3471.
- (71) Humphrey, W.; Dalke, A.; Schulten, K. VMD: visual molecular dynamics. *J. Mol. Graphics* **1996**, *14* (1), 33–8.

V. Conclusion et perspectives

Le travail présenté ici s'est fondé sur deux axes. Premièrement, nous avons mis en œuvre des simulations tout-atome du système modèle composé de la β -glucosidase A (ou β -glu) issue de la bactérie *Clostridium cellulovorans* et d'une surface d'or Au(111) fonctionnalisée par une SAM composée de molécules d'hexanol thiol $S(CH_2)_6OH$. Deuxièmement, nous avons réalisé la modélisation gros-grain de l'adsorption sur des surfaces solides de la bilirubine oxydase (ou BOD) issue du champignon *Myrothecium verrucaria* ; puis sur la ribonucléase A de *Bos taurus* et la nitro-réductase d'*Escherichia coli*.

V.1 Étude multi-échelle de la β -glucosidase A de *Clostridium cellulovorans*

V.1.1 Conclusions

L'utilisation de la β -glu comme système modèle pour nos dynamiques moléculaires tout-atome nous a permis de mettre en évidence un contraste entre l'adsorption sur la surface d'or – stable mais aboutissant à des orientations plus diverses et des perturbations considérables de la dynamique interne de la β -glu – et l'adsorption sur la SAM – moins stable, mais plus spécifique en terme d'orientation et avec de moindres perturbations de la dynamique interne de la β -glu. Ceci nous permet d'affirmer que dans un dispositif nécessitant l'immobilisation de la β -glu (par exemple pour la production de bioéthanol via la catalyse de l'hydrolyse de la cellulose [139]), il serait judicieux de trouver une combinaison de surface et de SAM assurant un compromis acceptable en terme de stabilité d'adsorption et de conservation de l'activité catalytique. Les critères permettant de réduire l'impact de l'adsorption sur l'activité catalytique de la β -glu étant d'une part la préservation la dynamique interne de l'enzyme, et d'autre part une orientation n'entravant l'accès au site actif comme suggéré par l'étude expérimentale de Jasensky et al. [140].

V.1.2 Perspectives

V.1.2.1 Application à d'autres surfaces métalliques et SAMs

Il serait maintenant intéressant de réaliser selon le même protocole des simulations de la β -glu en changeant de surface ou de molécules de SAM utilisées. Le choix de la surface d'or a été fait pour être en accord avec les expériences de PM-IRRAS réalisées par le CBMN, mais d'autres types de surfaces conductrices sont envisagées dans la conception de biopiles. En ce qui concerne la fonctionnalisation de la surface, nous souhaiterions paramétrer de nouvelles SAMs respectivement chargées positivement (terminées par une fonction amine $-\text{NH}_2$) ou négativement (terminées par une fonction acide carboxylique $-\text{COOH}$). L'utilisation de ces SAMs nécessiterait non seulement de déterminer les paramètres adaptés au champ de force GAFF2, mais également de choisir la fraction des molécules de SAM sous leur forme ionisée (respectivement $-\text{COO}^-$ et $-\text{NH}_3^+$).

Notons au passage que lors de la préparation de nos simulations tout-atome, la monocouche est construite par répétition périodique, et qu'il n'y a aucun transfert de charge ni rupture ou formation de liaisons au cours d'une dynamique moléculaire classique. Ceci signifie que la répartition des molécules de SAM chargées sera périodique et restera uniforme au long de la simulation. Expérimentalement, il est au contraire fort probable que les molécules chargées échangent des protons avec le solvant, et il est également possible que la répartition des charges sur la SAM évolue au voisinage d'une protéine chargée. Nous devons donc garder à l'esprit qu'une telle évolution de la répartition des charges n'est pas observable lors d'une trajectoire de dynamique moléculaire classique.

Nous envisageons également l'application de notre protocole à des systèmes d'enzyme adsorbées sur des SAMs mixtes, c'est à dire des monocouches composées de plusieurs types de molécules. Les travaux de l'équipe du CBMN montrent notamment que des SAMs mixtes composées de différents ratios de thiols aux fonctions terminales hydrophiles (par exemple $-\text{COOH}$) ou hydrophobes (par exemple $-\text{CH}_3$) pouvaient influencer les orientations d'adsorption des enzymes, mais également moduler les propriétés redox permettant ou non le transfert d'électrons vers la surface [165].

V.1.2.2 Application aux métallo-enzymes

L'élaboration d'un protocole de préparation de dynamiques moléculaires pour un système tout-atome adsorbé à la surface d'une SAM nous permet d'envisager son application à d'autres systèmes que la β -glu. Dans le cadre du projet ENZYMOR, nous nous intéressons particulièrement aux enzymes envisagées comme biocatalyseurs dans un prototype de biopile. Deux métallo-enzymes sont privilégiées par l'équipe BIP comme enzymes candidates : l'hydrogénase issue d'*Aquifex aeolicus*, et la bilirubine oxydase issue de *Myrothecium verrucaria* [44][45][55]. Toutefois, avant d'envisager de mettre en œuvre de telles simulations pour ces métallo-enzymes, il conviendra de choisir comment adresser plusieurs problématiques.

En raison de la représentation des ions par une particule dotée d'une charge ponctuelle, les propriétés des nuages électroniques des ions métalliques divalents sont représentées de façon imparfaite par les champs de force de dynamique classique. Cette représentation approximative rend complexe l'étude de protéines dont la fonction dépend de tels ions. Par exemple, les métallo-enzymes cuivre oxydases possèdent un site actif comprenant un centre métallique de plusieurs ions cuivres divalents (Cu^{2+}). Ce centre métallique est censé être stable, mais lors des dynamiques classiques, le fait que ces ions soient proches les soumet à une forte répulsion mutuelle à cause de leurs charges de même polarité. Ceci conduit donc à leur dissociation (lors des étapes de préparations du système, avant même l'étape de production de la dynamique moléculaire elle-même), or cette dissociation irréversible ne correspond pas au comportement physique des métallo-enzymes lorsqu'elles sont étudiées expérimentalement.

V.1.2.3 Apports des méthodes de simulation QM/MM

Une solution potentielle serait d'appliquer des contraintes artificielles en forçant la cohésion du centre métallique d'ions cuivres et des chaînes latérales des résidus voisins avec lesquelles il interagit. Ces contraintes contribueraient cependant à une rigidification des résidus concernés et perturberaient potentiellement la flexibilité des résidus voisins. Si une telle approximation ne provoquerait pas de modification majeure de la géométrie globale de la protéine, elle aurait tout de même deux inconvénients. D'une part, elle perturberait la dynamique interne de la protéine que nous souhaitons étudier. D'autre part, dans le cas d'une conformation obtenue par cristallographie aux rayons X, les positions des atomes correspondent à un état cristallisé, souvent différent de l'état

à l'équilibre des molécules en solution. La structure initiale du centre métallique serait donc biaisée par la conformation initiale des résidus et des ions cuivres issue de la PDB (Protein Data Bank), et ce biais serait maintenu par les contraintes exercées pour maintenir la cohésion du centre métallique.

Une autre approche consisterait à déterminer préalablement des paramètres ajustés pour les ions métalliques. En effet, les propriétés des résidus au voisinage des ions métalliques peut expliquer qu'il n'y ait pas de dissociation de ces centres métalliques, malgré la proximité de plusieurs ions divalents, donc une forte concentration locale de charges de même signe. Quelques tests avaient été effectués sur les centres métalliques de la BOD en remplaçant les ions cuivres Cu^{2+} par des ions monovalents Cu^+ , pour explorer l'hypothèse où certains de ces ions auraient subi cette transition au voisinage des histidines stabilisant le complexe, mais ces essais avaient tout de même mené à des dissociations. Des calculs quantiques seraient nécessaires pour déterminer les paramètres *ad hoc* des ions (notamment leur charge partielle), en espérant que ces nouveaux paramètres suffisent à maintenir la cohésion des centres métalliques lors des dynamiques moléculaires tout-atome sans ajout de contraintes supplémentaires.

Une troisième option serait de décrire les centres métalliques au niveau quantique, en prenant donc en compte de façon plus précise les nuages électroniques des ions divalents et des autres atomes. Puisque la taille de notre système rend inenvisageable la réalisation d'une dynamique quantique du système entier de durée suffisante, nous envisageons une approche hybride dite méthode de simulation QM/MM (quantum mechanics/molecular mechanics) [166][167][168]. Lors d'une telle simulation, les centres métalliques et quelques résidus avoisinants seraient décrits au niveau quantique (QM), tandis que le reste du système serait traité en dynamique moléculaire classique (MM) tout-atome. Ainsi, le coût en temps de calcul de ces simulations reste relativement proche de celui d'une dynamique moléculaire classique. Cependant, une problématique inhérente aux approches QM/MM est la délimitation des régions du système traités en QM. Non seulement le nombre d'atomes décrits de façon quantique augmente le coût de calcul de la simulation, mais différents choix de limite entre les sous-parties du système décrites en QM ou en MM peuvent aboutir à des résultats divergents à l'échelle du système. Pour limiter ces effets, il est généralement préconisé de situer ces limites au niveau de liaisons carbone-carbone éloignées de groupes chargés. En effet, le traitement des interactions électrostatiques entre particules décrites en QM ou en MM est un paramètre déterminant pour assurer la qualité de la simulation [168].

L'usage de méthodes de simulation QM/MM ouvre également des perspectives vis à vis de l'étude de la réactivité des centres métalliques, notamment ceux directement impliqués dans l'activité catalytique des oxydoréductases. De telles approches ont déjà été menées pour étudier le mécanisme réactionnel de MCOs (« multi-copper oxidases », oxydases dotées de plusieurs centres métalliques sous forme d'ions cuivre), en particulier les différents états par lesquels passe le centre métallique TNC (« trinuclear copper cluster ») formé par trois ions cuivres et les histidines adjacentes [169][170][171]. Une approche similaire pourrait être employée afin de vérifier si une MCO (telle que la BOD) peut toujours catalyser sa réaction de réduction du dioxygène en eau après adsorption sur une SAM ou une surface nue.

V.1.2.4 Changement d'échelle du système

Si notre système permet d'évaluer l'orientation d'adsorption d'une enzyme et l'impact fonctionnel associé, nos dynamiques moléculaires ne simulaient qu'une seule protéine adsorbée par simulation. Il serait intéressant de pouvoir évaluer le comportement d'un groupe de protéine et leur manière de se répartir sur les surfaces étudiées : les protéines s'agrègent-elles ou se répartissent-elles de façon homogène ? Dans le cas de la formation de complexes protéiques, ceci a-t-il un impact mécanique sur les résidus catalytiques ?

Pour des raisons de coût de calculs, de tels systèmes ne peuvent être traités par dynamiques tout-atome. Si nous souhaitons répondre à ces questions, nous devons donc envisager la mise en œuvre de méthodes moins coûteuses, telles que des dynamiques moléculaires s'appuyant sur des représentation gros-grain et une représentation implicite du solvant.

De plus, si l'usage de méthodes de simulations plus rapides se révèle pertinent sans compromettre les résultats ; de telles simulations pourraient être mises en œuvre pour notre système afin d'atteindre un meilleur échantillonnage (notamment permettre de tester plus d'orientations initiales) et une meilleure convergence de la simulation (en augmentant la durée des trajectoires).

V.2 Modélisation Gros-Grain de l'adsorption de protéines sur des surfaces solides

La modélisation gros-grain de l'adsorption de la BOD, de la ribonucléase A et de la nitro-réductase sur des surfaces solides s'est révélée une méthode de modélisation simple à mettre en œuvre afin de comprendre l'impact de l'adsorption de protéines sur leur dynamique interne et fonction. L'adsorption a été simulée en appliquant des contraintes supplémentaires au réseau de ressort représentant la protéine. Ces contraintes s'appliquent aux résidus étant en contact avec la surface, plusieurs orientations ont donc été simulées en impliquant différents résidus. Ces calculs nous ont permis d'aboutir à la conclusion que la perturbation mécanique des résidus catalytiques était associée avec la perte d'activité observée lors de l'adsorption à une surface ; y compris dans des cas où les résidus catalytiques ne sont pas eux-mêmes en contact avec la surface.

La simplicité du modèle que nous avons utilisé ici nous permet d'envisager son application à d'autres orientations (en changeant simplement les contraintes modélisant le contact avec une surface), ainsi qu'à d'autres enzymes envisagées comme biocatalyseurs, telles que l'hydrogénase A d'*Aquifex aeolicus*. Cependant, cette méthode de simulation doit se baser sur la connaissance préalable des points d'ancrage de la protéine d'intérêt, cette information étant acquise via des données expérimentales ou de dynamique moléculaire.

V.3 Contribution aux études expérimentales

La dynamique moléculaire tout-atome et l'approche gros-grain par réseau de ressorts sont donc deux méthodes complémentaires. Tandis que la dynamique moléculaire permet de déterminer l'orientation d'adsorption d'une protéine ainsi que ses résidus en contact avec une surface, l'approche gros-grain que nous avons employée permet de vérifier si un certain ensemble de résidus d'ancrages est susceptible d'être lié à un impact mécanique et donc à une perturbation de la fonction de la protéine.

De plus, l'information globale tirée de cette étude est que lorsque l'immobilisation durable d'une enzyme est réalisable, il est également nécessaire d'estimer les conséquences sur l'activité de cette enzyme. Plus généralement, l'intérêt de ces approches de modélisation est qu'elles nous permettent d'acquérir des informations à l'échelle atomique sur le comportement des protéines adsorbées. Ces informations ont pour but d'être comparées avec les données expérimentales ainsi que de proposer des ajustements de protocole aux collègues expérimentateurs. Dans le cas de prototypes de biopiles, il peut s'agir de modifications au niveau de la surface, pour améliorer l'immobilisation et contrôler l'orientation protéique, ou éventuellement au niveau de l'enzyme même, pour améliorer son activité après immobilisation.

VI. Annexes

Annexe 1 Paramètres des atomes constituant la couche d'or et de la SAM utilisés pour les dynamiques moléculaires tout-atome

Atome	Type d'atome	Numéro atomique	Charge partielle (e)
Au	"a1"	79	0,0
S1	"s"	16	-0,077153
O1	"oh"	8	-0,396377
C1	"c3"	6	-0,009791
C2	"c3"	6	-0,044401
C3	"c3"	6	-0,052446
C4	"c3"	6	-0,051095
C5	"c3"	6	-0,029877
C6	"c3"	6	0,043052
H1	"h1"	1	0,037755
H2	"h1"	1	0,037755
H3	"hc"	1	0,027485
H4	"hc"	1	0,027485
H5	"hc"	1	0,026684
H6	"hc"	1	0,026684
H7	"hc"	1	0,026738
H8	"hc"	1	0,026738
H9	"hc"	1	0,028999
H10	"hc"	1	0,028999
H11	"h1"	1	0,056363
H12	"h1"	1	0,056363
H13	"ho"	1	0,210037

Annexe 2 Nombre d'atomes par simulation

Nombres constants d'atomes :

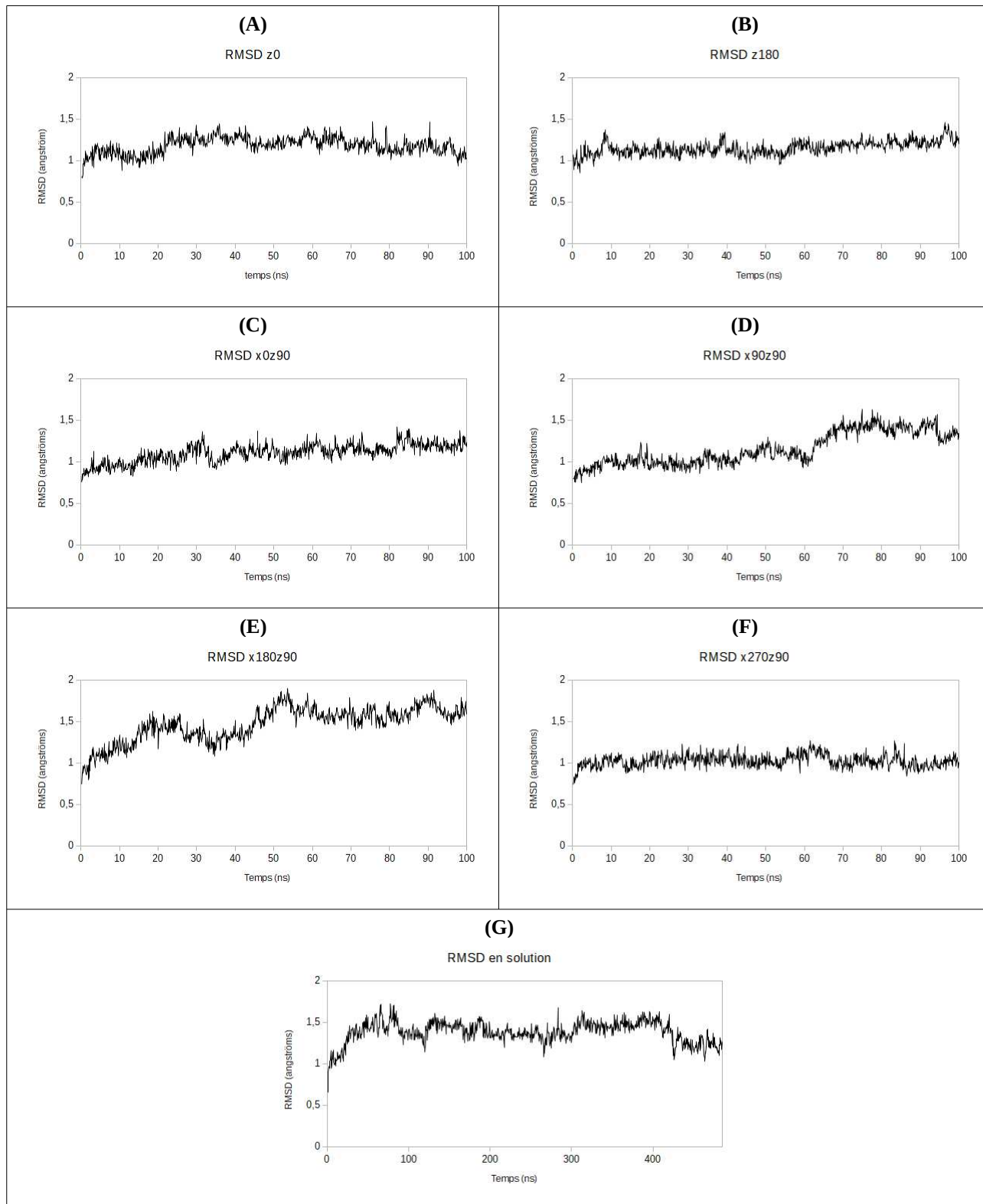
(note : la trajectoire témoin est dépourvue des atomes de SAM et d'or)

- Ions d'équilibration (Na^+) : 13
 - Atomes de l'enzyme β -glu : 7 134
- Atomes de la SAM : 12 831
- Atomes d'or : 3 666

Trajectoire	Atomes de solvant	Total
z0	130 464	154 108
z180	132 030	155 674
x0z90	139 743	163 387
x90z90	137 850	161 494
x180z90	141 243	164 887
x270z90	140 064	163 708
Témoin en solution	90 048	97 195

Annexe 3 Suivi du RMSD pour les trajectoires de la β -glu adsorbée sur la surface d'or fonctionnalisée selon les six orientations et pour la protéine seule en solution. Le RMSD est calculé sur les carbones α .

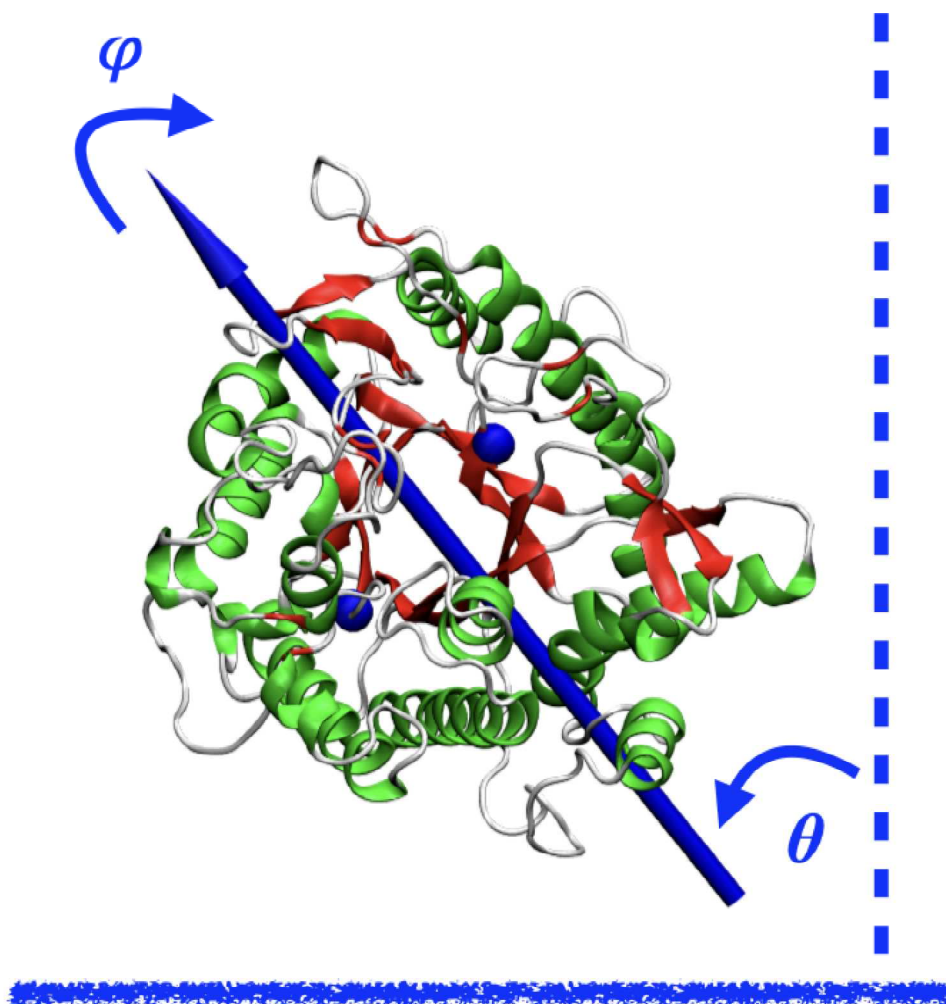
(A) Trajectoire z0 ; **(B)** Trajectoire z180 ; **(C)** Trajectoire x0z90 ; **(D)** Trajectoire x90z90 ; **(E)** Trajectoire x180z90 ; **(F)** Trajectoire x270z90 ; **(G)** Trajectoire de la protéine seule en solution.



Annexe 4 Schéma des angles d'Euler de nutation (θ) et de rotation (φ) du moment dipolaire

NOTE : sur cette figure l'angle de nutation θ est défini comme l'angle entre le moment dipolaire et la surface, tandis que dans ce manuscrit l'angle de nutation Θ est défini comme l'angle entre le moment dipolaire et l'axe Z.

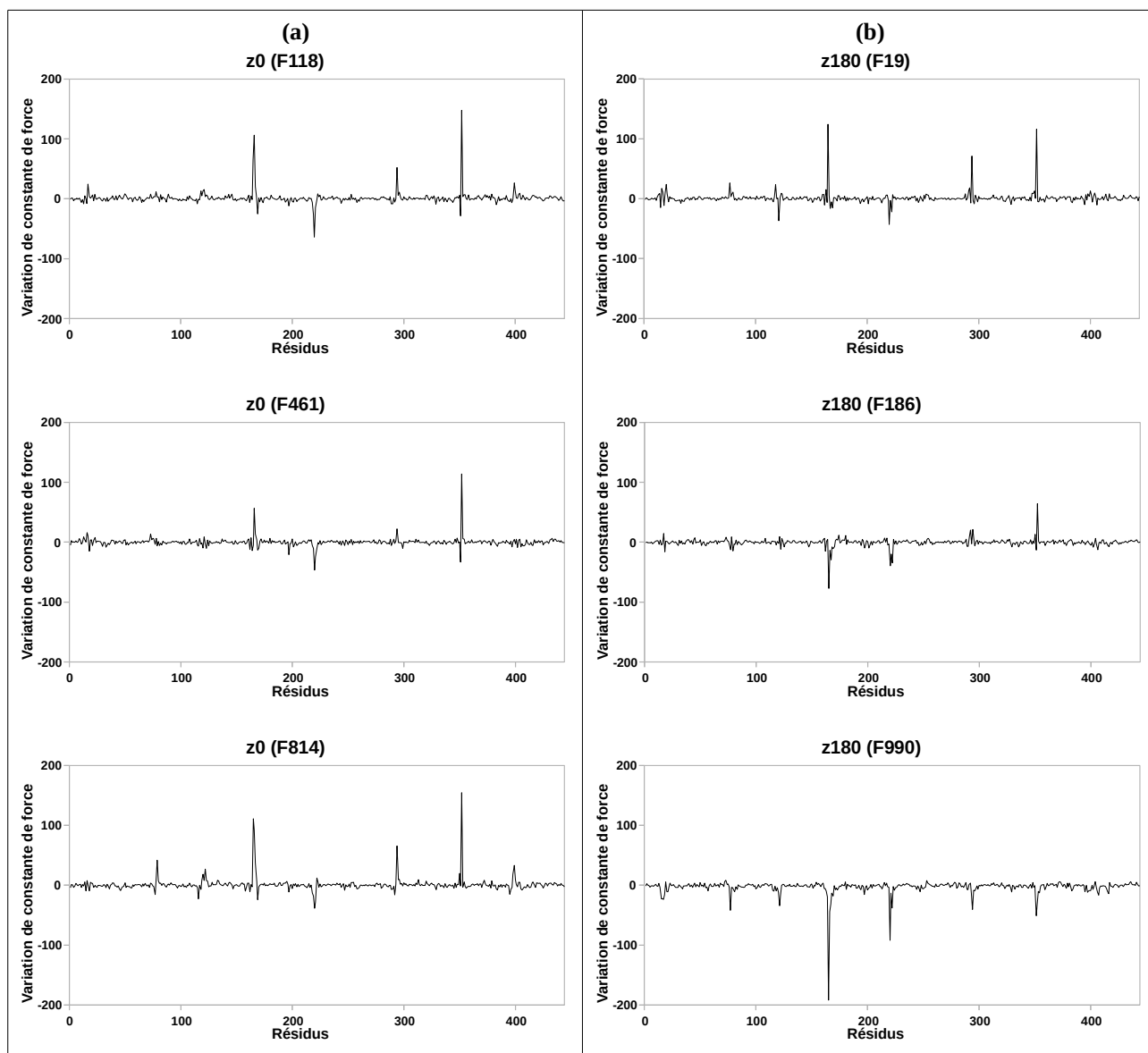
L'angle θ présenté ci-dessous est donc égal à $90^\circ - \Theta$.

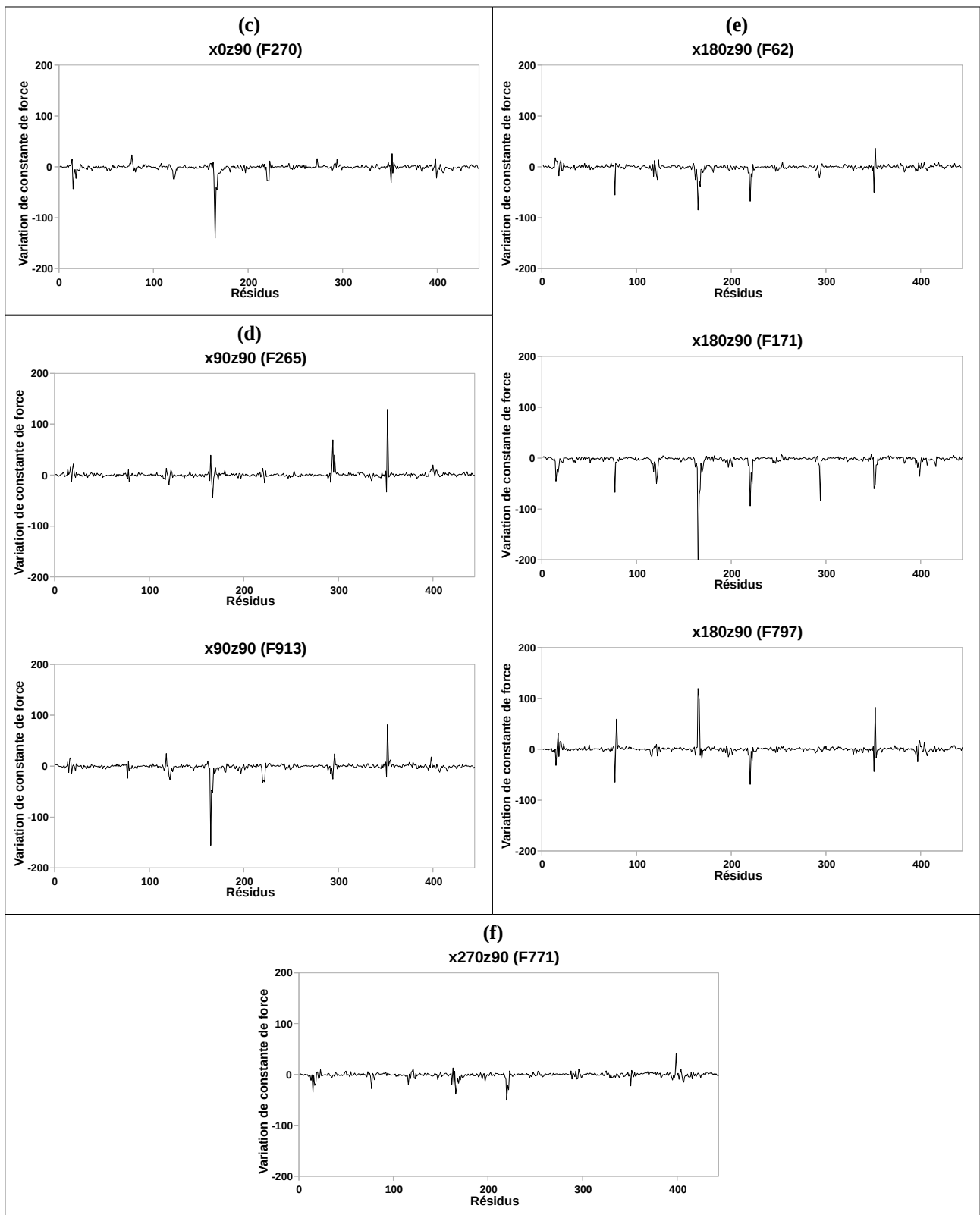


Annexe 5 Variation des constantes de forces des résidus par rapport à la structure de référence issue de la trajectoire en solution (la numérotation des courbes correspondant à l'image de la structure caractéristique). Les trajectoires avec une surface d'or fonctionnalisée sont listées en fonction de l'orientation initiale de l'enzyme, dans l'ordre suivant :

- (a) Trajectoire z0 ; (b) Trajectoire z180 ; (c) Trajectoire x0z90 ;
(d) Trajectoire x90z90 ; (e) Trajectoire x180z90 ; (f) Trajectoire x270z90.

L'étape de la simulation correspondant à chaque courbe est indiquée dans le titre entre parenthèses (par exemple F118 signifie frame 118/1000, soit 11,8 ns après le début de la trajectoire)





Annexe 6 Revue : Contrôler l'orientation d'enzymes redox sur des électrodes planes.

La revue qui suit a été rédigée dans le cadre de la coopération entre les équipes du BIP, du CBMN et du LBT et a été publiée en 2018, au cours de ma première année de thèse. Il s'agit d'un état de l'art concernant le contrôle de l'orientation d'enzymes redox sur la surface plane d'électrodes. Ce travail expose l'importance de l'orientation des enzymes sur les électrodes dans les dispositifs de production de courant par biocatalyse. Pour rappel, les enzymes envisagées comme biocatalyseurs sont dotées de centres métalliques impliqués dans la réaction catalysée ainsi que dans le transfert des électrons entre le site catalytique et l'extérieur de la protéine. L'orientation de ces enzymes, en particulier la proximité des centres métalliques avec la surface, détermine donc si le transfert électronique est direct (TED) ou médié (TEM) par le solvant. Enfin, cette revue fait la synthèse des moyens expérimentaux et de modélisation utilisables afin d'immobiliser les enzymes en privilégiant une orientation optimisant les performances d'un dispositif de biopile.

Review

Controlling Redox Enzyme Orientation at Planar Electrodes

Vivek Pratap Hitaishi ¹, Romain Clement ¹, Nicolas Bourassin ², Marc Baaden ² ,
Anne de Poulpiquet ¹, Sophie Sacquin-Mora ², Alexandre Ciaccafava ³ , and
Elisabeth Lojou ^{1,*} 

¹ National Center for Scientific Research (CNRS), Aix Marseille University, BIP, UMR 7281, 31 Chemin Aiguier, 13009 Marseille, France; vhitashi@imm.cnrs.fr (V.P.H.); rclement@imm.cnrs.fr (R.C.); adepoulpiquet@imm.cnrs.fr (A.d.P.)

² Laboratoire de Biochimie Théorique, National Center for Scientific Research (CNRS), UPR9080, Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, PSL Research University, 13 rue Pierre et Marie Curie, 75005 Paris, France; bourassin@ibpc.fr (N.B.); baaden@ibpc.fr (M.B.); Sophie.Sacquin-Mora@ibpc.fr (S.S.-M.)

³ Chemistry and Biology of Membranes and Nanoobjects, UMR 5248 CNRS, University of Bordeaux, Bat. B14 allée Geoffroy St. Hilaire, 33600 Pessac, France; a.ciaccafava@cbmn.u-bordeaux.fr

* Correspondence: lojou@imm.cnrs.fr; Tel.: +33-4-91-16-41-44

Received: 13 April 2018; Accepted: 28 April 2018; Published: 4 May 2018



Abstract: Redox enzymes, which catalyze reactions involving electron transfers in living organisms, are very promising components of biotechnological devices, and can be envisioned for sensing applications as well as for energy conversion. In this context, one of the most significant challenges is to achieve efficient direct electron transfer by tunneling between enzymes and conductive surfaces. Based on various examples of bioelectrochemical studies described in the recent literature, this review discusses the issue of enzyme immobilization at planar electrode interfaces. The fundamental importance of controlling enzyme orientation, how to obtain such orientation, and how it can be verified experimentally or by modeling are the three main directions explored. Since redox enzymes are sizable proteins with anisotropic properties, achieving their functional immobilization requires a specific and controlled orientation on the electrode surface. All the factors influenced by this orientation are described, ranging from electronic conductivity to efficiency of substrate supply. The specificities of the enzymatic molecule, surface properties, and dipole moment, which in turn influence the orientation, are introduced. Various ways of ensuring functional immobilization through tuning of both the enzyme and the electrode surface are then described. Finally, the review deals with analytical techniques that have enabled characterization and quantification of successful achievement of the desired orientation. The rich contributions of electrochemistry, spectroscopy (especially infrared spectroscopy), modeling, and microscopy are featured, along with their limitations.

Keywords: metalloenzymes; enzyme immobilization; enzyme orientation; electrodes; bioelectrocatalysis

1. Introduction: Interest in and Limitation of Bioelectrocatalysis Based on Immobilized Redox Enzymes

1.1. Fundamental Issue: Understanding Energy Chains, and the Mechanism of Biocatalysis Involving Redox Enzymes

Electron Transfer (ET) is an essential process allowing a variety of microorganisms to find energy for growth. Depending on its environment, and especially on the available substrates, a given microorganism may find its energy through a combination of different metabolic pathways. A variety of redox proteins and enzymes are involved in those energy chains, displaying a variety of structural

motifs, cofactors, and metal content. Many of these individual proteins and enzymes can be identified, and fully characterized in vitro. The way they interact in vivo to fulfill the ET chain, however, often remains obscure. Furthermore, for a given metabolic pathway, some redox chains are favored for a given organism, and some proteins or enzymes may be over- or under-expressed. Depending on the environment or on the type of microorganism, one protein can replace another one as electron donor or acceptor for a specific process. Photosynthesis is one relevant example for which the involvement of one protein over another varies depending on the considered species (such as algae, cyanobacteria, or plants) [1]. Heme- (cytochrome c_6) or copper-containing proteins (plastocyanin), on the one hand, and FeS cluster- or flavin mononucleotide-containing proteins (flavodoxin), on the other hand, act as electron transfer shuttles allowing the coupling of water oxidation to NADP⁺ reduction by photosystem I/photosystem II systems. Respiration of some exotic microorganisms known as extremophiles is also pertinent in this respect (Figure 1A). Although the latter are very interesting because they are sources of enzymes exhibiting outstanding properties, such as resistance to high temperatures, low pH, and high salinity, their electron pathways are far from being understood. In the respiratory chain of the acidophilic bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans*, two similar cupredoxins with close redox potentials are found, one soluble in the periplasm and the other anchored to the membrane. The reason for such redundancy in the electron pathway from ferrous oxidation to O₂ reduction is still unclear, despite many years of research on the organism [2]. Another relevant organism is *Aquifex aeolicus*, a hyperthermophilic ancestral bacterium which can sustain energy for growth from H₂ or H₂S oxidation coupled to either O₂ or sulfur reduction [3]. This feature leads to an intricate energy chain involving many enzymes interacting to sequentially transfer electrons within short timescales. Last, but not least, intramolecular ET also occurs inside an enzyme to transfer the electrons from the active site, where transformation of the substrate occurs, to the surface of the enzyme. In many cases, for huge enzymes in particular, the distance the electron must be transferred across is optimized by the maturation and incorporation of cofactors.

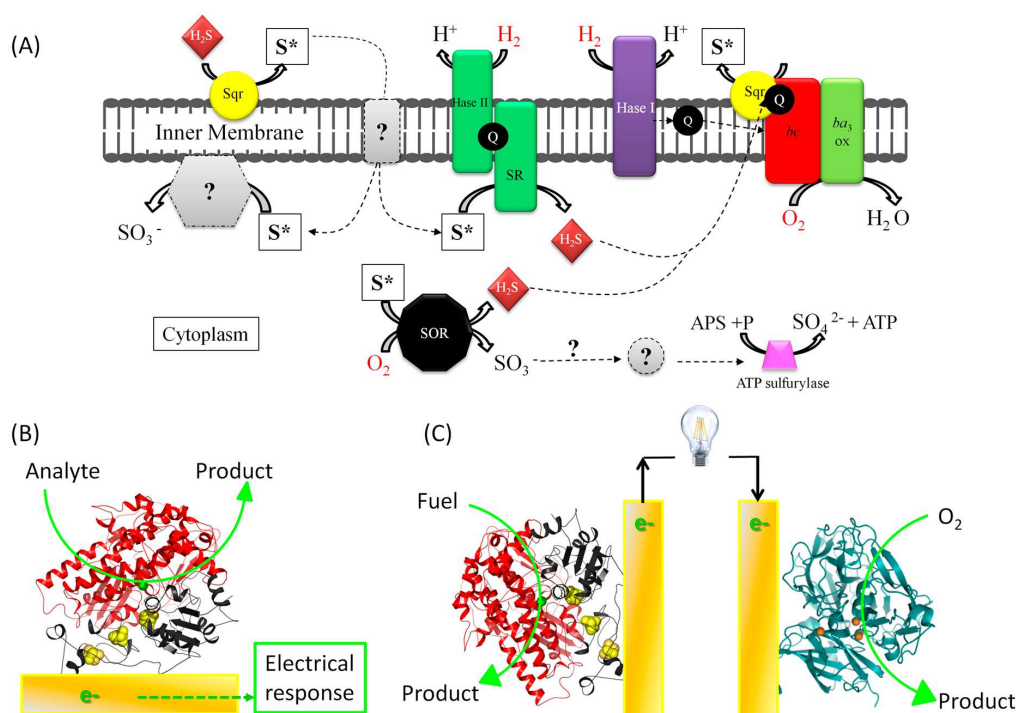


Figure 1. Electron transfer (ET) involving immobilized enzymes on interfaces: from metabolic ET chains (A) to biosensors (B) and enzymatic fuel cells (C). (A) is a schematic view of *A. aeolicus* metabolisms adapted from [3].

These few examples illustrate how the complexity of electron transfer pathways requires specific approaches to acquire some knowledge regarding the productive interaction between the involved enzymes and proteins. Common methods to analyze these fast ET processes include stop flow or chemical quench flow methods, as well as pulse radiolysis. Electrochemistry is another method of choice to quantify the rate of electron transfer processes. Not only can intramolecular ET within one protein be determined, but also the intermolecular ET between two interacting proteins can be characterized. The electron flow is then recorded as a current, which is related to the efficiency of the catalysis when an enzyme is involved. Furthermore, studying the ET between one protein and a conductive surface can mimic *in vivo* ET, because many of these processes occur at the surfaces of the interacting partners, or at the interface with the substrate. Interestingly, chemical functionalization of electrochemical interfaces has been a very active research field during the last years, since it provides a broad range of functionalities that will help to tune the interaction with a specific protein. Use of electrochemistry, however, requires as a first step the immobilization of the proteins or enzymes on conductive solid surfaces which act as electrodes, with the ultimate goal of keeping the protein structure as functional as possible.

1.2. The Applicative Issue: Use of Redox Enzymes Immobilized on Solid Conductive Supports for Biosensors, Bioreactors, and Biofuel Cells

Beyond fundamental knowledge of microorganism energy chains, the control and the functional immobilization of redox enzymes on conductive solid supports have found great interest in many environmentally friendly “green” biotechnological devices.

For these applications, the enzymes must be immobilized on the solid electrode surface in order to avoid diffusion into the biodevices, thereby losing the desired electrons, and compromising their effectiveness [4]. Among the currently developed biodevices, electrochemical biosensors have been the subject of extensive research for many years (Figure 1B). They have been preferred to other sensors such as those based on optical transduction because of the low cost and fast response of the electrochemical transduction. Large improvements in the detection limit down to fM concentrations, sensitivity, specificity, and stability of the biosensors have been achieved (see review [5] and references therein). This accomplishment is due to the identification and purification of new redox enzymes that are able to act as a recognition element, combined with the development of new conductive matrices for their efficient immobilization, essentially on the basis of large-surface-area nanomaterials. Electrochemical biosensors are used in many different domains, among which medical applications [5], food safety, and environmental monitoring [6] are those undergoing the largest developments. The earliest electrochemical biosensor for biomedical applications dates back to 1962, and uses the redox enzyme glucose oxidase to measure sugar in blood [7]. The increasing knowledge of the parameters that control enzymatic activity on electrodes has enabled the design of the current commercially available «finger-pricking» approach, and has opened the way to implantable glucose biosensors. Advanced technology allows us to now envision the integration of the glucose bioelectrochemical sensor in a smartphone platform, simplifying the lives of diabetic patients [8]. Furthermore, it is possible to measure glucose in other fluids than blood, i.e., interstitial liquid, urine, saliva, sweat, or ocular fluid [9]. These last developments have led to the design of new robust enzyme-decorated bioelectrodes, such as flexible electrodes [10]. Many other targets are detectable by electrochemical enzyme-based biosensors, such as nitric oxide [11], cholesterol [12], urea [13], or influenza virus [14]. In the domain of the environment, bioremediation is a process that involves redox enzymes for cleanup [15]. Oxygenases and multicopper oxidases (MCOs) are, for example, very efficient in the degradation of chlorinated and phenolic compounds. In this case, it should be productive to immobilize the enzyme on a conductive support to promote bioremediation by use of electrochemical methods.

More recent applications in the domain of bioreactors for fine chemistry have found great interest in the original use of redox enzymes immobilized on conductive supports. The two following examples illustrate this increasing research field nicely. A mandatory step for wide use of enzymes in biocatalysis

is the regeneration of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, known under its redox couple $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$. Actually, this cofactor is required for the function of a large number of identified enzymes that are efficient in industrial processes such as the production of alcohols, hydroxylation of aromatic compounds, hydrolysis of triglycerides, or Baeyer–Villiger reactions [16]. Economic considerations impose the regeneration of NADPH, as it is costly to synthesize it. Among the methods explored for that purpose, electrochemical ones would be of great interest thanks to their low cost and simplicity. In this case, the activity of enzymes immobilized on various electrodes would be one attractive way to regenerate the cofactor. The second example is the electrochemical reduction of CO_2 into fuel products, with the additional advantage of providing a method for CO_2 sequestration. Biology offers natural biocatalysts able to achieve CO_2 reduction with high efficacy. Although the current research mostly focuses on whole microorganisms colonizing electrodes [17], encouraging results have been reported on the activity of specific enzymes [18]. Here, the mandatory step would again be the functional immobilization of the enzyme on the electrode surface.

Finally, one emerging domain where the immobilization of redox enzymes is mandatory is the sustainable production of electricity. Fuel cells can be considered as green devices for electricity generation, since they produce no greenhouse gases. However, the transformation of H_2 and O_2 at the anode and cathode of the fuel cell requires catalysts based on expensive noble metals such as platinum. Some redox enzymes are known to catalyze fuel oxidation and oxidant reduction with high efficiency and specificity. This possibility opens the route for the development of the so-called enzymatic fuel cells, where the catalysts are the redox enzymes (Figure 1C). Two main categories of biofuel cells exist, mainly depending on the intended application and on the fuel used, with the oxidant being, in most cases, oxygen. The proof of concept of the first biofuel cell category appeared more than 40 years ago. It is based on the oxidation of glucose by flavin-based glucose oxidase or cellulose dehydrogenase. Many applications are targeted. As an illustration, one can cite biobatteries, small enough to be implanted in blood for feeding medical devices, such as a glucose biosensor or an insulin delivering pump, biobatteries implanted on ocular lenses to monitor ocular pressure, or biobatteries stuck on the skin to monitor lactate in sweat. Recent reviews report the major current developments in that type of biofuel cells [19]. A more recent concept uses the same fuel as in platinum-based fuel cells, with the aim of enhanced power output compared with sugar/ O_2 enzymatic fuel cells. Here, hydrogen oxidation is carried out by the highly efficient hydrogenases, whose active site is composed of nickel and iron atoms. Coupled to MCOs for oxygen reduction, H_2/O_2 biofuel cells display an open circuit voltage of around 1.1 V, depending on the origin of the enzymes, which is the highest ever reported for biofuel cells [20]. Late development of this new biofuel cell generation relies on the hydrogenases themselves, which—intrinsically—are very sensitive to oxygen. This sensitivity was observed for most of the enzymes known before the identification of some extremophilic hydrogenases from microorganisms able to sustain energy from a hydrogen–oxygen metabolism. These latter hydrogenases were demonstrated to be oxygen-tolerant and, moreover, resistant to carbon monoxide, opening the way to their use as biocatalysts in fuel cells. This second category of biofuel cells could be employed to power environmental sensors, with an additional advantage over platinum-based fuel cells. Indeed, thanks to the specificity and properties of some hydrogenases, it becomes possible to use nonpure H_2 , as hydrogen produced from biomass or waste. Recent research shows that high current densities in the order of $10 \text{ mA}/\text{cm}^2$, and all the most high currents reported (up to 1 A per mg of enzyme) can be reached, which is very promising [21].

1.3. Limitations of Bioelectrocatalysis: Stability, Wiring, and Interrelationships

For both fundamental research and applied perspectives described earlier, the main first step is the productive immobilization of redox enzymes on electrochemical interfaces. The aim is to optimize the ET rates both for intermolecular and interfacial ET, in order to ultimately optimize bioelectrocatalysis efficiency. Concomitantly, stabilization of the enzymes once immobilized would be desired. Many recent reviews analyze the issues relative to protein behavior once immobilized on solid

supports [22]. Although no general rules can be formulated, it is plausible to expect that the interaction between the solid support and the enzyme may cause an alteration in protein structure and/or flexibility, hence modifying its properties. Depending on the enzyme and on the support, enhanced stability and activity, or, on the contrary, destabilization may be observed. Immobilization may prevent enzyme aggregation, thus enhancing catalysis when compared with free enzymes in solution. Proper immobilization on a solid support mimicking the enzyme native environment may improve enzyme activity. Here, we particularly want to highlight the specific aspects of trying to perform conductive electron transfer processes by using a conductive surface for enzyme immobilization. With this goal in mind, additional principles have to be taken into account, and some of the general rules admitted for an efficient and stable immobilization process no longer hold. As an example, it is expected that in order to achieve high catalysis efficiency, nonredox enzymes must be oriented with the active site turning to the opposite side of the solid surface to facilitate substrate access. In the case of ET however, the situation is the opposite, since the ET rate strongly depends on the distance between the electrode and the active site. Hence, an orientation of the enzyme with the active site as close as possible to the solid surface will be targeted. This situation will be discussed further in the following. Along the same lines, it is also admitted that deleterious interactions between an enzyme and a surface should be avoided by introducing a linker on the enzyme. In the case of ET, however, this linker introduces an additional distance that can be prejudicial to the ET efficiency. Furthermore, the enzymes on conductive supports will be subjected to electric fields, as soon as the bioelectrode is polarized at the required operational potential. This operational condition implies that redox enzymes on solid electrodes must not only resist various nonphysiological environments (salt concentration, nonbuffered solution, etc.) but also resist high current flow, or a wide range of redox potentials.

These general considerations clearly illustrate that redox enzyme immobilization on solid electrochemical interfaces raises issues that are different from the general issues of enzyme immobilization on solid supports. The goal of the present review is to describe these specific aspects, and it will focus on the main parameters that govern the functional immobilization of redox enzymes on electrodes, as well as the current tools available to rationalize and control these parameters. We will limit our discussion to planar electrodes, for which fundamental studies of immobilized redox enzymes are more relevant, as discussed hereafter.

2. Interfacial Electron Transfer: Why Is Orientation a Key Issue?

The maturation of the idea to use redox enzymes in biodevices was driven in parallel by the increasing understanding of the ET mechanism in the context of biological processes [23]. According to Marcus theory, the ET rate k_{ET} between an electron acceptor and an electron donor is a function of the potential difference between the electron acceptor and donor, given as the Gibbs free energy of activation (ΔG), and of the reorganization energy [24]. k_{ET} can be expressed as $k_{ET} = \alpha(r)v e^{-\Delta G/RT}$, where αv depends on the electronic coupling between the reactants, with the transmission coefficient α exponentially varying with the distance r separating the donor and the acceptor. Based on this theory, the maximum distance of electron tunneling between donor and acceptor was estimated to be 20 Å [23,25]. Actually, this is the distance which is reached through complex formation between the active sites of two interacting proteins. The upper distance limit of 20 Å is also observed in many enzymes for the separation of active sites and electronic relays, although electrons can travel longer distances through conserved aromatic residues of the protein moiety [26]. As a consequence, the intramolecular ET does not limit the catalysis since k_{ET} is much higher than catalytic constants [27]. Considering now the electrode as the donor or the acceptor, the rule can be extended to define the limiting distance separating it from the enzyme for ET. As enzyme diameters are on the order of a few nm, active sites are often more distant from the surface than the predicted maximal distance for fast ET within the electrode. The consequence is that for interfacial ET to proceed, it is mandatory to place the active site at a distance compatible with ET, using controlled tethering to the surface. Because the active site is often protected from the external environment by deep embedding inside the protein

moiety, one has to play with the electronic relays inside the enzyme which allow fast intramolecular ET. The electron entry or exit point will be the particular electronic relay on the surface of the enzyme that must be located at a close distance from the electrode (Figure 2). The molecular-level features favoring a specific orientation can be determined based on the examination of the crystallographic structure of the enzyme, possibly in combination with molecular modeling approaches [28]. Nevertheless, it is experimentally very difficult to succeed in a single-point attachment of an enzyme on an electrode surface. The immobilization of the protein will often lead to a distribution of enzyme orientations. Even in the case of enzyme immobilization through specific anchors grafted on the enzymes (this will be discussed below), one cannot exclude ET through a variety of pathways because of enzyme flexibility on the surface. As the interfacial electron transfer constant k_0 between the enzyme and the electrode surface depends on the distance of the electron tunneling, the distribution in the enzyme orientations creates a dispersion of this constant that may lie in the range between k_{min} and $k_{max} = k_0$. In the case of a homogeneous distribution of enzyme orientations we have $k_{min} = k_0 \exp(-\beta d_0)$, where βd_0 is a parameter that represents the dispersion of possible orientations the enzyme molecules may adopt while maintaining electron exchange with the electrode. The βd_0 parameter governs the shape of the electrochemical signals as modeled by Armstrong's group [29], and reported in recent papers for the analysis of the ET of immobilized enzymes [30].

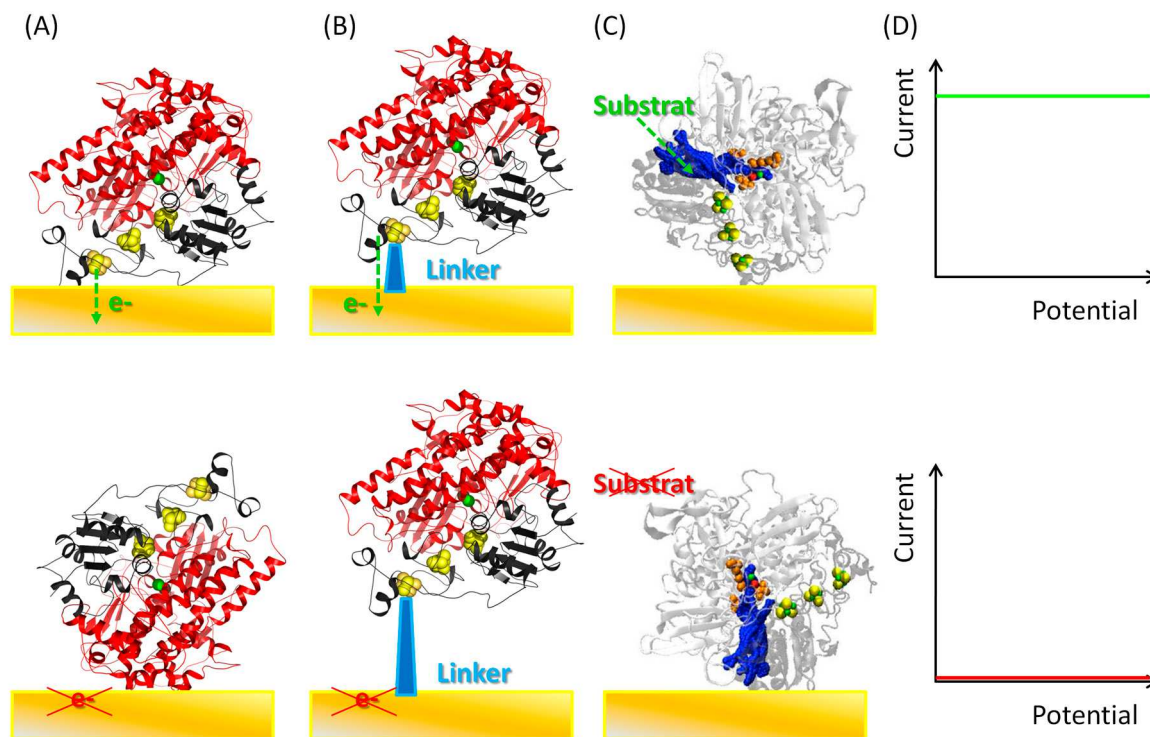


Figure 2. Schemes of enzyme immobilization conditions (A–C) allowing or precluding a direct electrical connection (DET) (D) at an electrochemical interface. (A) Illustrates how the distance between the active site, or a surface electronic relay, of an adsorbed enzyme and the electrode influences DET; (B) Illustrates the effect of the length of a linker used for enzyme immobilization on DET; (C) Illustrates the effect of the substrate channel access upon enzyme immobilization on DET.

Note that the enzyme orientation on the electrode is not only a key issue for interfacial electron transfer, but is also essential to facilitate the diffusion of substrates and products within the enzyme internal cavity network toward the catalytic site. Molecular Dynamics simulations on [NiFe] hydrogenases from *A. aeolicus* and *Desulfovibrio fructosovorans* have shown how these two homologous enzymes display their own specific internal tunnel network [31]. In the case of the

membrane-bound *A. aeolicus* hydrogenase, all the substrate entry points are located on the same side of the enzyme's surface. As a consequence, the enzyme's adsorption on an electrode with the wrong orientation might result in the shielding of some parts of its surface, such that a small substrate could no longer use it as an entry point to reach the active site.

3. The Key Components

3.1. Properties of Redox Proteins

Enzymes are large biomolecules that are abundantly found in living organisms with great variety and very specific functions. As biocatalysts, enzymes accelerate reactions by decreasing their activation energy. They are composed of one or more long chains of amino acid residues displaying a vast array of functions within organisms, including catalyzing metabolic reactions, DNA replication, and responding to stimuli. The structure of such proteins stands out as complex but with a high degree of organization compared to small molecules, as required to fulfill high selectivity. This structure/function relationship will have strong impact on further functional enzyme immobilization. Tertiary structures form by folding of the α -helix and pleating of the β -sheet in such a way as to achieve maximum stability or the lowest energy state. The final shape of the protein is stabilized by various interactions, including hydrogen bonding, disulfide bonds, ionic bonds, Van der Waals, and hydrophobic interactions. Coarse-grain modeling approaches can provide useful insight on the thermal unfolding of surface-immobilized enzymes [32]. More generally, how the immobilization will alter this structure is, of course, of great importance.

Among enzymes, redox enzymes are those proteins whose established role is to convert a substrate along an energy chain through electron exchange. They consist of a redox center, required for their bioactivity, with the ability to either accept or donate electrons. Different types of redox centers can be found in redox enzymes, ranging from metal-based ones (Ni, Fe, Mo, Cu, etc. ...) to inorganic ones such as flavin adenine dinucleotide (FAD), acting as a cofactor. In metalloenzymes, the metal ion is usually held by coordinate-covalent bonds on the amino acid side chains or inorganic ligands, or is bound to a prosthetic group (e.g., heme). The redox active center is very often embedded in the polypeptide structure, which protects it against hostile environments but, from a conductive point of view, insulates it. Different strategies have been used during maturation to succeed in a fast intramolecular ET, which is not limiting compared with the catalytic efficiency; this is illustrated hereafter by some relevant examples, widely studied in the literature (Figure 3).

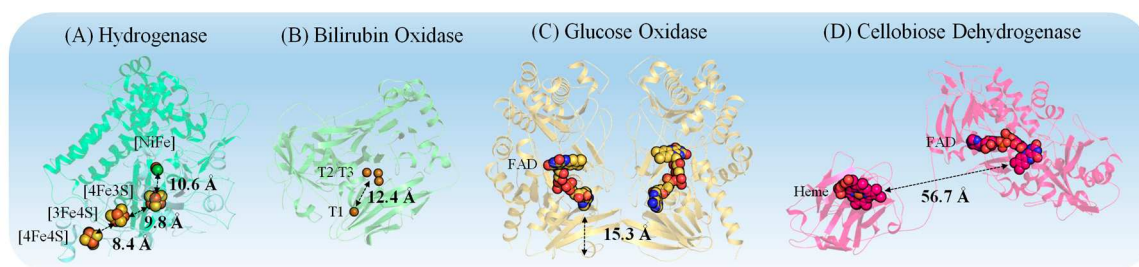


Figure 3. Representation of relevant distances for intramolecular and interfacial ET in several redox enzymes: metal center to metal center, metal center to cofactor, or cofactor to protein surface. (A) *A. aeolicus* hydrogenase model [31]; (B) Bilirubin oxidase (pdb ID: 2XLL); (C) Glucose oxidase (pdb ID: 1CF3); (D) Cellobiose dehydrogenase (pdb ID: 4QI7).

MCOs [33] such as laccases (LAC), bilirubin oxidases (BOD), or cuprous oxidase (CueO) are copper-containing enzymes that efficiently catalyze oxygen (O_2) reduction directly to water [34]. BODs and LACs are found in fungi, plants, and bacteria, where they catalyze the oxidation of bilirubin to biliverdin and the oxidation of polyphenol compounds, respectively. O_2 reduction requires four

copper sites which differ by their ligand coordination and geometry: one T1 Cu, and a trinuclear cluster composed of one T2 Cu center coupled to a binuclear T3 Cu center [34]. Physiologically, electrons are received from the substrate to the T1 Cu, and are transferred through a histidine–cysteine bridge to the trinuclear cluster 12–14 Å away, where O₂ reduction takes place [35]. In a mimicking way, one can imagine how an electrode can provide the electrons instead of the physiological substrate, which means that the electrode has to be wired to the copper T1.

Hydrogenases (Hases) are the enzymes that catalyze the reversible oxidation of molecular hydrogen (H₂) and reduction of protons. They are found in the periplasm or cytoplasm of various microorganisms, in many different environments, where their main role is to provide energy for the organisms by oxidation of molecular hydrogen. Hases are subclassified into three different types based on the active site metal content: iron–iron Hases, nickel–iron Hases, and iron Hases [36]. The [FeFe]-Hases are more specifically involved in H₂ production from proton reduction, whereas [NiFe]-Hases are more efficient in H₂ oxidation [37]. In the latter case, the [NiFe] active site, where the hydrogen binds, is buried deep inside the large subunit. To transfer the electrons from/to the active site, 3 FeS clusters less than 13 Å distant from each other constitute a conductive line in the small subunit towards/from the surface of the enzyme. Hydrogen reaches the active site through well-defined hydrophobic channels, [38] whereas avenues for proton evacuation are not yet so clearly identified. If one wants to immobilize such an enzyme, two conditions need to be met: (i) wire the enzyme to the electrode via the FeS cluster located closest to the surface of the protein; and (ii) make sure the channels for the substrate access and products removal are accessible.

Glucose oxidase (Gox) is the most studied redox enzyme so far, and catalyzes the oxidation of β-D-glucose to D-glucono-1,5-lactone and hydrogen peroxide using molecular oxygen. It is a large dimeric protein with a molecular weight of 160 kDa and an average diameter of 8 nm, containing one tightly bound FAD per monomer as a cofactor [39]. The FAD cofactor is deeply embedded inside the protein matrix. In addition, it was experimentally shown that the FAD molecule is located in a cavity deeper than 8 Å [40]. Various attempts have been made to establish the wiring between the active center of GOx and various electrodes [41]. However, many discrepancies in the results are reported, and uncertainty remains regarding the retention of the conformation of the enzymes.

Cellobiose dehydrogenases catalyze the oxidation of various saccharides into lactones. Their strategy to transfer electrons is different from Gox as each monomer consists in two domains, one with a FAD cofactor and the other with a heme. ET proceeds physiologically from the substrate to the FAD cofactor and finally to the heme. The latter is accessible to the solvent, and is connected to the FAD domain through a flexible linker [42], which can be a great advantage if using this type of enzyme on an electrode surface.

These few examples clearly indicate that the strategy required to succeed in the ET from/to the enzyme to/from the electrochemical interface will largely depend on the structure and specific features of the enzyme. Apart from fast intramolecular ET achieved thanks to electronics relays within the enzyme, ET between physiological partners in a given chain, or between the substrate and the enzyme, is facilitated by specific recognition surfaces involving both hydrophobic and hydrophilic moieties [43]. As illustrations, the third, surface-exposed FeS cluster in the [NiFe]-Hases from *Desulfovibrio* is surrounded by an acidic patch composed of glutamic amino acid residues, which recognize a lysine-rich environment of the interacting heme of the physiological partner, a cytochrome *c*₃ [31,44]. This electrostatic interaction allows both partners to come to a close distance which then induces fast intermolecular ET. Various other striking examples of electrostatic-driven protein–protein interactions for efficient ET are documented in the literature: interaction between cytochrome *c* oxidase and cytochrome *c* [45], sulfite reductase and ferredoxin [46], cytochrome P450 and putidaredoxin [47], and NADH-cytochrome *b*₅ reductase and Fe(III)-cytochrome *b*₅ [48]. Also, the Cu T1 in LACs is inserted in a hydrophobic pocket which allows favorable interaction with its natural organic substrates [49]. The knowledge of such recognition interfaces will become a key issue once a rational approach to immobilize enzymes on electrodes is envisioned.

Furthermore, from the 3D structure of given redox enzymes, it is possible to calculate the surface electrostatic potential distribution which indicates the existence of dipole moments [50]. A dipole moment, in the simplest case, is a vector quantity representing the separation of two opposite electrical charges. The magnitude of this quantity is equal to the distance between the charges multiplied by the charge. The direction of the vector is from negative to positive charge. In the general case, the dipole moment can be computed by the formula $\vec{\mu} = \sum_i q_i \times \vec{r}_i$, with $\vec{\mu}$ as the overall dipole moment generated by i charges, q_i as the magnitude of each partial charge i , and r_i as the position vector of charge i . Such calculations provide an initial understanding for preferential orientations of immobilized enzymes on electrodes, a feature that may be exploited to favor high ET rates. Another key aspect of enzymes is their internal cavity network that enables the diffusion of substrates/reaction products between the solvent and the enzyme's catalytic site, and which can also be investigated via modeling and free energy calculation [51]. From a theoretical perspective, the ET itself can be simulated using a wealth of different techniques involving mixed Quantum-Classical molecular dynamics (MD) simulations, Quantum Mechanics/Molecular Mechanics (QM/MM) approaches, or numerous Density Functional Theory (DFT) variants [52].

3.2. Conductive Electrode Surfaces

A large variety of electrodes are available, displaying high electric conductivity and mechanical and thermal stability. During the last years, a great deal of research has focused on the immobilization of redox enzymes in and on 3D conductive materials. The idea underlying the use of high surface area/volume materials is to enhance the loading of redox enzymes and, hence, the current for biocatalysis. Carbon-based materials such as carbon nanotubes, carbon nanofibers, carbon felt, or metal nanoparticles have been demonstrated to act as a very efficient host matrix [53]. It is also expected that tuning the size of the pores of the matrix may help in the stabilization of the enzyme by multipoint anchoring [54]. The control of enzyme loading and specific activity in such large-area materials is, however, in most cases hampered by the lack of methods able to monitor one individual enzyme in the matrix. In addition, homogeneous distribution and orientation of enzymes in the 3D network is rarely achieved. Nonetheless, it is worth mentioning the original work of Vincent's group, who set up a Protein Film Infrared Electrochemistry (PFIRE) method for the monitoring of the enzyme conformation entrapped in carbon black particles [55]. Mazurenko et al. also reported the resolution of enzyme partitions in carbon felts [21]. Nevertheless, it appears more relevant to study the immobilization of redox enzymes on more planar electrodes, to achieve easier control of the enzyme conformation, and to overcome mass transport and substrate partition issues arising from the surface meso- or nanoporosity which induces local variation of substrates and products (such as local acidification, for example) and complexifies the whole process. The notion of planarity itself must be discussed here. Given an average size of enzymes in few nanometer ranges, all materials that present macroporosity should be considered as planar from the enzyme immobilization point of view. However, macroporosity is most often accompanied by mesoporosity, in which the enzyme is connected through many points. Any porous materials should thus be considered as nonplanar.

Smooth metal surfaces like Au, Ag, and Pt, or more complex surfaces such as indium-tin-oxide (ITO), or flat carbon-based surfaces such as glassy carbon can be used for the immobilization of redox enzymes, as well. However, even these surfaces considered as planar present a roughness factor that may influence enzyme immobilization. Few studies report the effect of roughness on bioelectrocatalysis. It is worth noting the work from Thorum et al. in which roughness was induced on a gold electrode to force protruding of functionalities required to get access to the enzyme active site [56]. Gold supports/electrodes of different geometries are commercially available and are the model supports for analytic and surface-addressing techniques like Surface Plasmon Resonance (SPR), Quartz Crystal Microbalance (QCM), Polarization Modulation Infrared Reflectance Absorption Spectroscopy (PMIRRAS), Surface-Enhanced Infrared Absorption (SEIRA), and ellipsometry. As the chip used in these methods can also serve as the electrode for electrochemical sensing, the gold

surface appears all the more relevant when dealing with redox enzyme immobilization. In principle, single-crystal/monocrystalline gold surfaces should be used in all these techniques because they provide a controlled gold surface at the atomic level. However, the reusability of the surface is critical, whereas improved understanding of surface pretreatment for polycrystalline gold allows preparing reproducible surfaces [57]. Hence, polycrystalline gold surfaces, where the distribution of metal atoms is nonuniform throughout the electrode surface, are very handy. Surface treatment provides surface control and promotes their wide use for protein electrochemistry [58]. Electrochemical cleaning by cycling in H_2SO_4 solution between -0.35 V and $+1.5$ V vs. Ag/AgCl allows calculating of the real electroactive surface area by integrating the gold oxide reduction peak at $+0.9$ V, taking into account a charge of $390 \mu\text{C}\cdot\text{cm}^{-2}$ for the reduction of a gold oxide monolayer [59]. The roughness factor can thus be calculated ($R_f = A_{\text{electroactive}}/A_{\text{geometric}}$), which represents the difference between the projected geometric surface area and the electro-accessible surface area. R_f takes values around 2 to 5 depending on the kind of surface considered and the cleaning procedure [60].

Several spectroscopic methods have been coupled to electrochemistry taking advantage of conductive biocompatible materials. Surface-enhanced vibrational spectroscopies benefit from nanostructuration of the metal (Au or Ag) to increase their sensitivity (enhancement factor in absorption: 10^2 – 10^6) [61]. Because of the nanostructuration surface, here also a roughness factor can be calculated ($R_f = A_{\text{real}}/A_{\text{geometric}}$); the geometric area ($A_{\text{geometric}}$) represents a flat surface while the real area (A_{real}) is experimentally accessible, for example, via electrochemistry or AFM [60,62,63]. On the other hand, infrared spectroscopy based on reflection absorption techniques requires flat reflective surfaces [64]. While monocrystalline gold remains the most commonly used support, it was recently shown that despite lower-intensity infrared signals, glassy carbon is a promising alternative for broadening the applications related to electrochemistry [65].

A molecular-level picture of these surfaces can be obtained through modeling approaches such as MD simulations. Interestingly, the last decade has seen the development of numerous force fields (FF), specifically parameterized to model a large variety of solid surfaces [28]. Amongst the material models that are now accessible to computational chemists, one can mention metallic surfaces (Ag, Al, Au, Cu, Ni, Pb, Pd, Pt), for which Lennard-Jones potentials for nonbonded interactions have been developed [66]. Gold in particular can be modeled in common simulation codes such as GROMACS and NAMD using either the GoIP atomistic force field [67] or the METAL/INTERFACE force field [68]. Additional materials of interest for bioelectrochemistry can be modeled such as silica [69], but also graphite [70] or carbon nanotubes [71]. These latter materials cannot be considered as planar surfaces, however. An important issue when studying the adsorption of biomolecules with considerable dipole moments, such as redox enzymes, is the surface polarization, which can contribute to up to 20% of the total binding energy between the protein and the surface [72]. This aspect is taken into account in the GoIP-CHARMM FF for gold surfaces [73]. Another FF that incorporates polarization is the AMOEBA FF [74], which was already extended to model peptides on a graphene surface [75]. Still, development efforts in that field are mostly directed towards solvated biomolecules, and a lot remains to be done for the simulation of interfaces.

3.3. Interaction between Enzyme and Conductive Surface: How Can It Be Modulated?

Enzymes can be immobilized on the electrode surfaces following different processes including simple adsorption, entrapment in a complex matrix such as redox polymers, and covalent binding [76,77]. Among the challenges of immobilizing enzymes onto electrodes, preserving the native conformation and catalytic properties, and providing good electrical connection and relative stability are of outmost importance. In this respect, one philosophy of immobilizing enzymes is based on considering the electrode as a surrogate to the known physiological partner of the enzyme: a substrate, a cofactor, heme- or [Fe-S]-based protein shuttles, etc. To get a proper enzyme immobilization for the optimum ET, mimicking physiological interactions between partners, it is thus of great importance to gain the possibility to tune the interactions between enzymes and the electrode surface.

Two main options exist when trying to tune the interactions between a redox enzyme and an electrode: (i) chemical functionalization of the electrode surface; and (ii) engineering the enzyme.

3.3.1. Electrode Functionalization

Several methods have been developed to add surface chemical functions to planar electrodes [78] (Figure 4). Concerning gold surfaces, the most widely used functionalization is achieved through self-assembled monolayers (SAMs). SAMs are usually formed by spontaneous adsorption of sulfur. Alkanethiols, or dialkyl disulfides or sulfides possess high affinity for the surface of gold (but also for platinum or silver), with a bond energy of RS-Au of $\sim 40 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ [79]. This adsorption results in well-defined organic surfaces with desirable and alterable chemical functionalities, controlled simply by changing the terminal group of the thiol chain. The modification of a gold electrode with SAMs provides a choice of positive/negative/hydrophobic terminal functional groups such as $-\text{COOH}$, $-\text{NH}_2$, $-\text{SO}_3\text{H}$, $-\text{CH}_3$, and $-\text{OH}$. In addition, the knowledge of the pKa of the terminal moieties allows chemical control on the electrode surface. As examples, pKa values of 6.0 [80] and 6.9 [81] for SAMs of 11-mercaptoundecanoic acid (MUA) and 4-aminothiophenol (4ATP) groups on gold were determined, respectively. Dependence of the pKa of $-\text{NH}_2$ -based SAMs on thiol chain length was also reported [82].

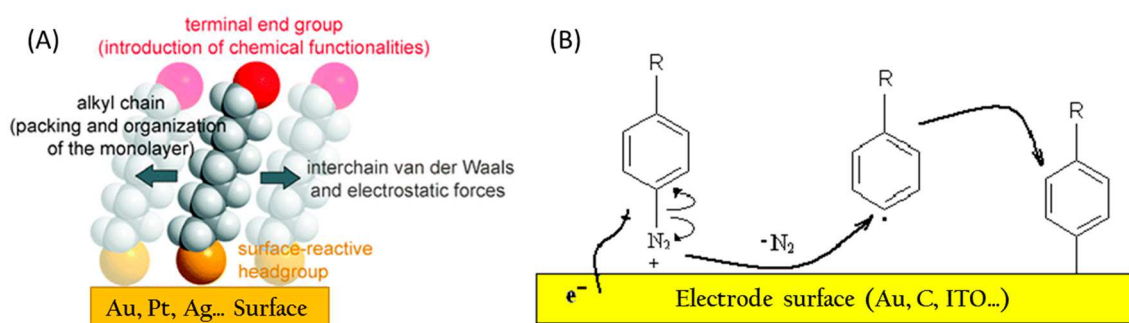


Figure 4. Representation of (A) self-assembled monolayer [83] and (B) scheme for electrografting of diazonium salts on electrode surfaces (Au, C or Indium Tin Oxide (ITO)) with alterable terminal chemical functionality.

Their ease of preparation from millimolar thiol solutions makes SAMs attractive candidates for surface tailoring. A surface coverage of the order of $\text{pmol}\cdot\text{cm}^{-2}$ is generally achieved and adsorption stops at the level of monolayer coverage [84]. This surface coverage, as well as compactness and organization of the layer, shows, however, dependence on the type of thiol molecules, nature of the metal surface, immobilization time, and thiol concentration [85]. Longer adsorption time and longer thiol chains are expected to provide a more organized SAM layer by decreasing pinhole defects or conformational defects in the alkane chains [86,87]. Long-chain thiols are expected to form well-organized assemblies due to stabilizing van der Waals interaction along the adsorbed chain. On the contrary, presence of long chains may screen their mobility in the solution and, hence, their accessibility to the metal surface. It was recently proposed that fast and repeated changes on applied potential pulses relative to potential of zero charge cause an ion stirring effect [88] which has an influence on the SAM formation kinetics. Immobilization of biomolecules on SAMs has been critically reviewed [89]. The possibility to prepare mixed SAMs is an added advantage, where homogeneous or separated phases of different thiols may allow the site-specific binding of enzyme to the surface [90].

Besides this, silane-based SAMs on ITO electrodes have been used owing to their simple preparation, good reproducibility, and high stability [91]. ITO, being low cost, highly stable, and transparent, is a very useful material as an electrode due to its electrical and optical properties [92] and plays an important role especially for biosensor technology [93]. The silane-based chemicals act as

cross-linkers because they contain Si–O bonds which react with the surface hydroxyl groups of ITO where the end groups of silane act as an immobilization matrix for biomolecules.

However, the use of SAMs for redox enzyme immobilization also raises critical issues. The first is linked to the ET process through the SAM itself, which can become a limiting step and control the whole ET process. As developed above, the efficiency of ET, given by the ET rate constant k_{ET} , is found to be a function of the distance d between the electrode surface and the redox species. A study related to the kinetics of ET between a gold electrode and a SAM of thiol of variable length confirms the exponential dependence of the rate constant on the chain length [94], according to $k_{ET} = k^{\circ} \exp[-\beta d]$. In the case of SAMs, an additional parameter is the surface coverage, θ , after SAM formation. For a complete monolayer of SAM without any defects ($\theta = 1$), the mechanism of ET is tunneling, as the monolayer shows blocking behavior. Therefore, the expression for the ET rate constant can be read as $k_{tunnel} = k^{\circ} \exp[-\beta d]$, where k° is the rate constant for a bare electrode, β is the constant of electron transfer through tunneling, and d the thickness of the SAM. This is the case for chemisorption of long-chain thiols on a gold surface, which usually results in well-organized monolayers with minor defects due to effective van der Waals interactions along the carbon chains [95]. Another mechanism is based on a membrane-like behavior of the SAM, so that redox species can permeate through the monolayer, and ET to/from the electrode takes place. This kinetic process is controlled by the partition coefficient, κ , between the solution and the membrane, the diffusion coefficient, D_f , in the membrane, and the kinetics of material transport at the film/solution interface with a rate constant, $k_{interface}$ [96]. In the presence of pinhole defects within the SAM, another ET pathway may be effective due to diffusion of the redox species through the defect sites to the electrode. This alternative transfer may operate in the case of short thiol chains which are expected to display less organized layers. All these ET phenomena may take place in parallel and an effective rate constant will reflect the relative contributions of the different pathways [97] (Figure 5). As an implication, for ET to proceed, a balance is needed between a sufficiently high ET rate and sufficient organization to be able to obtain a controlled SAM. This can be reasonably achieved by maintaining the length of thiols comprising around 6–8 carbons [98].

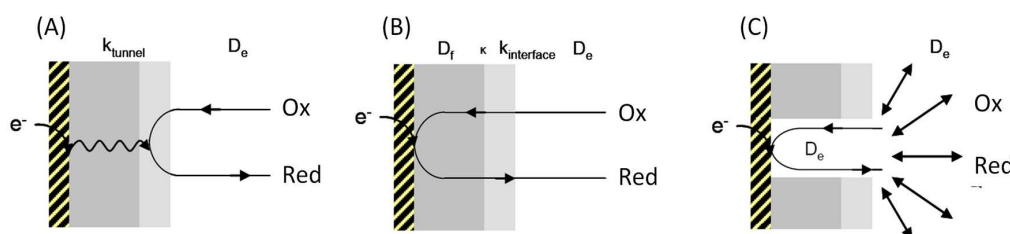


Figure 5. ET processes through a self-assembled monolayer (SAM) (in grey) formed on an electrode. (A) Tunneling ET process through a compact SAM; (B) ET through a SAM behaving as a membrane. ET will be controlled by a partition coefficient at the membrane/solution interface and by the diffusion coefficient inside the membrane; (C) ET proceeds through defects in the SAM. D_e and D_f are the diffusion coefficients in the electrolyte and in the SAM, respectively. Ox and Red designate a redox couple in solution. Adapted from [96].

The second critical issue is linked to the poor stability of the SAM, especially when the potential of the electrode is polarized to extreme values of potentials [99]. The Au–S bond is found to be stable only in a small potential window i.e., -0.6 to $+0.6$ V vs. Ag/AgCl [100]. Thiol-based SAMs are also sensitive to heating, and their thermal stability is limited to 400 K [101]. Above this temperature, thiol molecules start to desorb in the form of disulfides, suggesting that the Au–S bond is weaker than the S–C bond of thiols [102]. Some discrepancy, however, exists about the thermal stability of monolayers of thiol [103]. SAMs formed by long-chain thiols appear to be more thermally stable due to their well-organized nature on the surface [104].

As a consequence of the poor stability of the Au–S bond, a carbon–gold (Au–C) bond should be preferred [105]. Reduction of aryl-based diazonium salts is a widely used method to prepare functionalized surfaces, not only on carbon, but also on gold electrodes [106–108]. The interest in such modifications concerns the wide range of functional groups available that are associated to high stability over a large potential window. Formation of mixed monolayers by successive electrochemical reductions from a mixture of diazonium salts presents an added advantage towards surface functionalization [109,110]. The disadvantage is the difficulty to stop the reaction at the monolayer formation. Electrografting of aryl compounds on electrode surfaces is based on the formation and attachment of highly reactive aryl radicals. However, polymerization between two aryl radicals, and their chemical reaction with already adsorbed aryl molecules may compromise the quality of the monolayer. Possible control of the monolayer can be achieved by utilizing a so-called “protecting–deprotecting” approach, where a bulky group protects the functional group, avoiding both the formation of disordered multilayers and possible reaction of functional end groups with aryl radicals. Organization of the monolayer is typically controlled by the size of the protecting group [111]. On the other hand, the chemical substituent groups attached to the benzene ring of diazonium salt can significantly affect the electrografting of these molecules on the electrode surface, first due to their size and second due to their nucleophilic/electrophilic nature. QCM measurement was used to probe the thickness of the electrodeposited aryl organic layer on an Au electrode, and suggested that the large size of the substituent and its steric hindrance typically led to the formation of thin layers [112]. A recent study related to the kinetics of electrografting on gold surfaces also suggested that the presence of an electron-attracting group increases the rate of reaction of the aryl radical on the gold surface [113], whereas the presence of an electron-donating group slows down the grafting process, thereby offering control over the possibility to form monolayers. It should be noted that a mixed layer of aromatic diazonium salt and thiol can be advantageously used, as demonstrated in the case of LAC on gold electrodes. A submonolayer of aryl groups was formed to minimize multilayer formation by aryl radical attack, while full electrode coverage was achieved by further thiol adsorption [114].

Other tools to functionalize planar electrodes are noteworthy. Among additional immobilization strategies, a variety of amines can be covalently attached to the electrode surface through their electrooxidation onto the electrode [115]. Immobilization via *in vivo* natural enzyme substrate can be used alternatively to significantly increase electrocatalytic activity relative to simple protein adsorption on the electrode. Bilirubin is the natural substrate for BODs, which is *in vivo* oxidized to biliverdin with the reduction of oxygen to water. BOD was immobilized on a pyrolytic graphite (PG) electrode prefunctionalized by bilirubin, and a twofold increase in electrocatalytic activity in terms of current was reported compared to a bare PG electrode [116].

Infrared spectroscopy is a perfect tool to monitor an electrode functionalization and to judge the quality of the immobilization procedure regarding its impact on the protein structure. IR spectroelectrochemistry allows simultaneous monitoring of electrochemical signals and infrared spectra reflecting the secondary structure of the enzyme (Amide I and Amide II bands centered at $\sim 1650\text{ cm}^{-1}$ and $\sim 1550\text{ cm}^{-1}$, respectively). However, one important aspect when choosing an immobilization procedure is to avoid spectral interference between the immobilizing molecules and the enzymatic system to study. Since the electrode material used in spectroelectrochemical experiments is a metal (gold or silver), SAMs are the common platform used for enzyme immobilization. The spectral overlap between a SAM and a protein is usually negligible since the main signals arising from the alkyl chain are located in the high wavenumber region of the spectra (2800 cm^{-1} – 3000 cm^{-1}). However, one has to pay attention to the chemical head group of the SAM, especially amine functions (N–H bending mode of primary amines from 1650 – 1580 cm^{-1}) and carboxylic functions (C=O stretching mode from 1760 – 1690 cm^{-1}). This issue is compounded when much more complex modifications of the electrode are required. This problem has been tackled in a very elegant manner for the immobilization of a membrane protein—the bacterial respiratory ubiquinol/cytochrome *b_{o3}* (cyt *b_{o3}*) [117]. In this study, a tethered bilayer lipid membrane (tBLM) was used to immobilize cyt

b₀₃. The commonly used lipid tether cholesteryl (2-(2-(2-mercaptoethoxy)ethoxy)ethyl)carbamate (CPEO3), which serves as an anchor for the lipid bilayer, contains a carbamate function that strongly overlaps with the protein signals. In this respect, the authors have successfully synthesized a novel molecule WK3SH (dihydrocholesteryl (2-(2-(2-ethoxy)ethoxy)ethanethiol), an IR transparent variant of CPEO3 lacking the carbamate function, thereby suppressing interferences with signals arising from the secondary structure of the enzyme. This effort allowed the challenging monitoring of a transmembrane proton gradient generated by *cyt b₀₃* catalytic activity.

3.3.2. Enzyme Engineering

Engineering on the enzymes can alternatively serve to tune the interaction between bare or functionalized electrodes. Although very elegant, this strategy has been less employed so far, mainly because it can affect both stability and activity of the protein before and after immobilization. However, unlike nonspecific adsorption where multipoint connections between enzymes and electrodes are possible, site-specific attachment can provide an orientational immobilization that will also dictate the distance between the enzyme active site and the electrode surface [118–120]. The approach can thus maximize the rate of direct ET, with low distribution of ET rates. The basic approach is to use genetic engineering to introduce linkers on the functional proteins, then immobilize these protein molecules on the electrode via the linkers. The electrodes have to be chemically modified accordingly to specifically react with the labeled enzyme.

A classical site-specific immobilization method relies on the introduction of affinity tags like polyhistidine tags (His-tag), which are widely used in biochemistry for protein purification. His-tags have six sequential histidine residues that can chelate metals like Cu, Ni, or Co [121], or can favor the electrostatic interactions towards hydrophilic surfaces [122]. The issue here is to evaluate the effect of such site-specific immobilization of genetically engineered protein molecules compared to random immobilization on the interfacial ET efficiency. With His-tags being quite long linkers, the increased distance may impede the ET, or on the contrary may induce required flexibility of the immobilized enzymes. Oriented immobilization could be obtained via the formation of ternary metal chelate complexes between metalated nitriloacetic acid (NTA), such as a Cu-NTA functionality on the electrode, and His-tagged recombinant proteins. Balland et al. designed a short-length NTA-terminated alkane thiol to immobilize His-tagged LAC on a gold electrode through copper ligation [121]. Both N- and C-terminal His-tagged LACs were studied with the expectation of a more favorable orientation of LAC through the C-terminal labeling which is closer to the Cu T1. Although catalysis of O₂ reduction was reported in the presence of a redox mediator, no direct current could be obtained even in the most favorable C-terminal modification. This result strongly suggested that His-tag labeling at the C-terminal or N-terminal sequences in LAC does not allow Cu T1 to approach the electrode at a tunneling distance. In another study, deletion of a flexible 10-amino-acid sequence at the C-terminal end of a two-domain-type LAC was performed to expose the Cu T1. Labeling with a His-tag was additionally introduced in the mutated enzyme [122]. The catalytic activity of the wild-type LAC was compared to the mutated one, once immobilized on Au electrodes modified by SAM displaying various chemical functionalities [122]. Direct wiring of the enzymes was achieved and explained by the proximity of the C-terminal end to the Cu T1 in the LAC under study. Despite the fact that no significant difference in the surface concentration between adsorbed WT or mutants exists, direct electrochemical activity was reported to be much higher on mutated enzymes due to the oriented immobilization of genetically engineered enzymes. Li and collaborators introduced a cysteine-6-His-tag either at the C-terminal or N-terminal end of a LAC for an oriented immobilization on gold electrodes. The strategy was based on different distances to the Cu T1 or Cu T2/T3 between C-Ter and N-Ter. Based on the quantification of produced H₂O₂ during O₂ reduction, the authors proposed that a different orientation was obtained depending on the C-Ter or N-Ter grafting. It must be noticed, however, that no clear catalytic signals could be observed in both cases, underlining most probably a slow ET independently

of the immobilization strategy [123]. These three related examples illustrate the difficulty to rationalize the efficient immobilization of engineered enzymes for electrocatalysis.

Other peptides have potential binding properties for different types of surfaces. These peptides are expected to bind to surfaces by noncovalent interaction, and can exhibit high affinity and selectivity [124]. They are mostly selected by the phage display peptide library [125]. Few binding peptides display some affinity for material surfaces of interest for electrochemistry, such as for graphene [126], carbon nanostructures [127], and gold [128,129]. Some peptides are already used to anchor enzymes on different types of surfaces such as alkaline phosphatase on a gold surface [129]. Currently, these peptides are not used to immobilize and orient redox enzymes on electrode surfaces, but they could provide a robust method to bind the enzyme at a different part of the protein. However, this binding method could also suffer from inhibition of the ET because of the length of the linker.

The publications just described above engineered only the N-terminal or C-terminal end. It should be interesting to have possibilities of mutation at other targeted parts of the enzyme, eventually closer to the active site, or at any locations on the enzyme surface in order to relate the position at which the enzyme is immobilized to the ET rate. As a recent illustration, cellobiose dehydrogenase from *Myriococcum thermophilum* has been shown to be an ideal candidate for site-directed mutagenesis. Having no surface cysteine residues, this amino acid was introduced at specific surface locations in view of the oriented immobilization [130]. “Thiol-ene” click chemistry between the thiol group available on the cysteine moieties and vinyl groups grafted on the electrode was successfully exploited for site-specific covalent linkage. The cysteine moieties were introduced on the dehydrogenase domain in such a way that two different orientations of the active site (the heme group of the flexible cytochrome domain) were ensured upon immobilization. An increase in electrocatalytic activity in terms of current for site-directed covalent immobilization was reported compared to physical adsorption, in a ratio ~7, thus indicating favorable enzyme loading on the electrode. Interestingly, a significant difference in current output was also observed between the two different grafting localizations, suggesting a control of the orientation of the enzyme. In the same way, a fungal laccase presenting a unique surface lysine residue close to the T1 Cu site was immobilized on planar electrodes [131]. This strategy can be applied in all the cases where a unique surface residue can be genetically engineered. However, site-specific protein engineering is sometimes limited by the available sites on the protein surface and/or because such modifications might alter the function or structure of the protein. Homology modeling can also be used to design new mutants with enhanced catalytic activity and immobilization yield on a surface. This was the case in the work of Gao et al. who performed site-directed mutagenesis on formate dehydrogenase immobilized on nanoparticles [132].

An attractive new strategy is the use of noncanonical amino acids (ncAAs) like propargyl-L-lysine (PrK), which can be genetically introduced at desired locations on the enzyme [133] (Figure 6). Moreover, a unique alkyne chemical handle of ncAAs will ensure a covalent linkage of the mutated enzymes with the modified electrode via click chemistry [133]. By varying the length and position of the linker on the *E. coli* CueO, the distance of the enzyme’s electroactive site relative to the glassy carbon electrode was controlled [134]. It was shown that (i) site-directed anchorage was more efficient for direct O₂ reduction than nonspecific immobilization; and (ii) labeling far from the active site was not favorable to high catalysis efficiency. However, it was also emphasized that the ET efficiency was not directly related to the distance between the active site and the electrode, suggesting that other pathways such as ET through the structure of the protein may be involved. In that particular study, one can wonder whether the flexibility of the linker could be a major factor governing the overall ET.

The effectiveness of oriented immobilization and electrochemical operational stability for these genetically modified enzymes on electrode surfaces certainly depends upon the immobilization strategy. In case of chelation between a histidine moiety on the modified protein and Cu–NTA ligands on the electrode, stability can be affected by dissociation of the Cu ion from the NTA-modified electrodes induced by competitive binding with the His-tag on the enzyme [135]. In comparison,

the operational stability of bioelectrodes prepared by covalent conjunction using click chemistry between cysteine-modified protein and vinyl groups of the electrode lasts up to a few days [130].

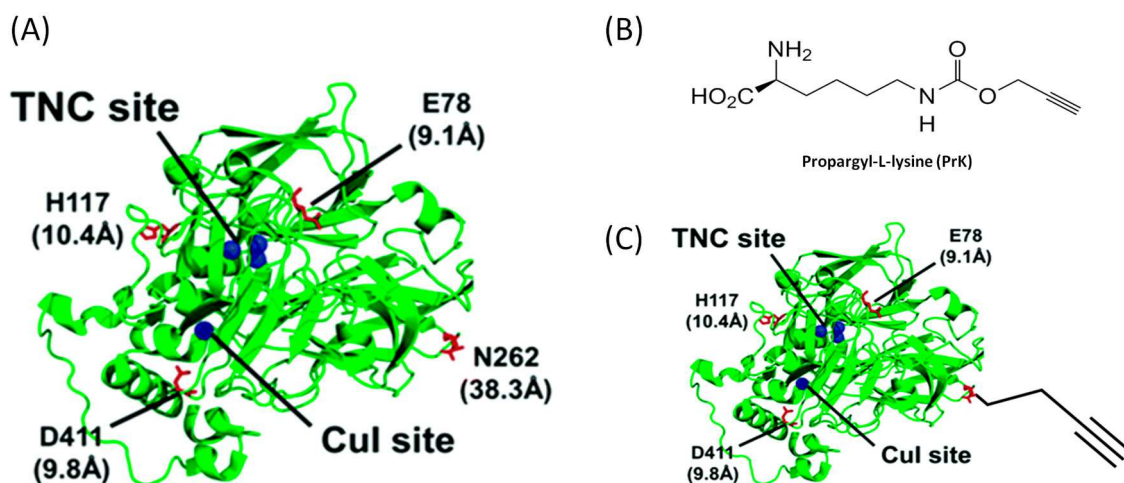


Figure 6. (A) 3D structure of cuprous oxidase (CueO) including the two redox centers (blue spheres). The four noncanonical amino acids (nCAAs) incorporation sites are labeled in red; (B) Chemical structure of Propargyl-L-lysine (PrK); (C) Genetically modified enzyme offering a unique alkyne moiety for site-specific attachment to electrodes via click chemistry [134].

4. How to Probe Enzyme Orientation on an Electrode

4.1. Electrochemistry

Electrochemical techniques are the ideal tools to study both intramolecular ET within an enzyme and interfacial ET between the enzymes and the electrodes. Theoretically, using cyclic voltammetry and chronoamperometry, kinetic parameters of the catalysis can be quantified. However, the type of kinetic data which can be obtained is linked to the type of interaction between the enzyme and the electrode, and especially to the enzyme's orientation [136]. Enzyme/electrode interaction is of utmost importance because the ET rate is exponentially dependent on the distance between the redox active center and the electrochemical interface, as predicted by the Marcus theory [24,137]. Fifteen years ago, most electrochemical studies involved the enzymes in combination with their physiological partners, or artificial redox partners, either diffusing or co-immobilized with the enzymes [138]. Unlike the observation of the redox signals for small proteins such as cytochrome *c* or ferredoxins [139], it was thought at that time that the size of the enzyme and the burying of the active site would preclude any direct electrical connection. Instead, the redox partners play the role of electron shuttles between the active site and the electrode, in a similar way as they are doing physiologically. Then, the so-called mediated catalytic current (MET) gave access to second-order rate constants between many different redox enzymes and their partners, and also allowed the demonstration of pseudo-specificity of the catalysis [140]. However, such a mediated electron transfer system has several disadvantages in terms of thermodynamic loss between the mediator and the enzyme, decreased efficiency due to potential mediator leaking, and difficulty to design a simplified system. The increasing knowledge of the arrangement of the active centers, of the cofactors, and of the distribution of surface charges and hydrophobic patches for an increasing number of redox enzymes has allowed the determination of the key parameters for their favorable orientation on functionalized electrodes. Hence, a direct electrical connection (DET) can be achieved, although many redox enzymes are still electrochemically silent. In some cases, the determination of the surface coverage of the enzymes participating in the catalysis, then the quantification of the catalytic constant k_{cat} , Michaelis constant (K_M), or inhibition constants was achieved [141]. This advanced analysis is mostly observed, however, on nanostructured

electrodes, such as carbon nanotube- or gold nanoparticle-modified electrodes, that are able to enhance the loading of enzymes, thus increasing the detection signals. Interestingly, studying the MET/DET ratio appears to be relevant for the evaluation of the distribution of the orientation of the enzymes on the electrode [136]. In addition, being a relative value, the MET/DET ratio is free from errors caused by the variation of adsorbed enzyme amount [30]. This strategy was applied to various enzymes immobilized on thiol-based SAMs and allowed to determine the surface chemistry on the electrode able to promote DET. One can cite relevant studies that analyzed the catalytic efficiency of *A. aeolicus* [NiFe]-Hase [142] on negative, positive, or hydrophobic SAMs on gold, of *D. gigas* Hase on positive SAM on gold [143], of *R. eutropha* [NiFe]-Hase on negative SAM on silver [61], of *Trametes hirsuta* LAC on neutral hydrophobic SAM on gold [144], of *Cerrena unicolor* C139 LAC positive SAM on gold [107], or of *Myrothecium verrucaria* BOD on positive or negative SAMs on gold [145] (Figure 7). In the latter paper, electrochemistry was coupled to SPR demonstrating that the switching between DET over MET when adsorption was performed either on negative or positive SAM was effectively linked to a different enzyme orientation and not to different enzyme loading. A similar study based on the coupling between electrochemistry and QCM to investigate O_2 reduction catalysis by *M. verrucaria* BOD further concluded with an optimum enzyme density on the SAM–Au electrode for direct catalysis [146].

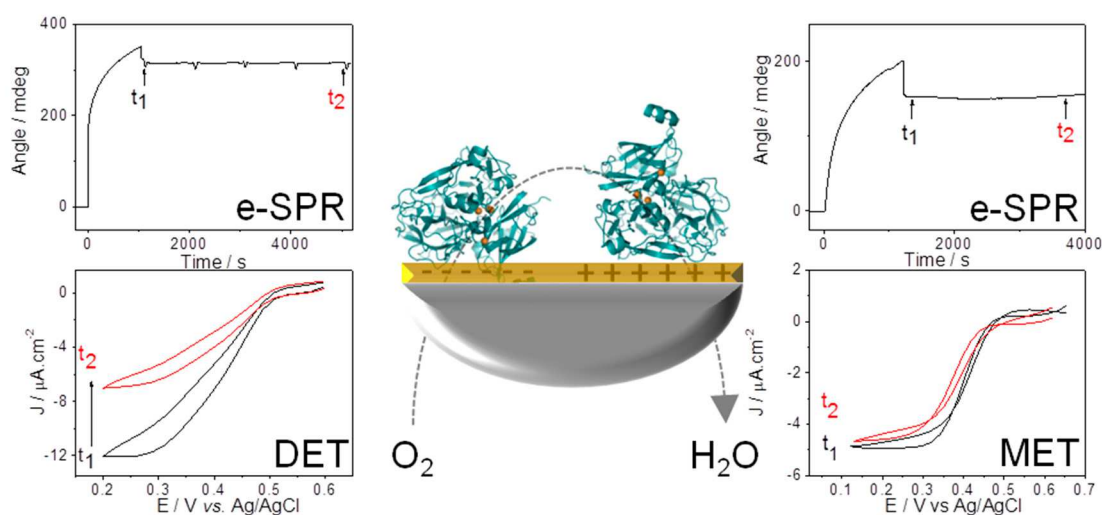


Figure 7. Coupling SPR with electrochemistry allowed the demonstration of a different orientation of the *M. verrucaria* bilirubin oxidase (BOD) according to the charge of the electrode controlling the type of ET process for enzymatic O_2 reduction. On either positive (**Right**) or negative (**Left**) SAM-modified gold electrodes, surface adsorption of the enzyme is successful. However, negatively charged SAM (**Left**) allows direct ET (DET), while positively charged SAM (**Right**) requires a redox mediator for catalysis (MET). Adapted from [145].

4.2. Spectroscopies

Thanks to specific surface selection rules [147], infrared techniques such as SEIRA and IRRAS spectroscopies have been successfully used in order to evaluate the orientation of redox enzymes immobilized onto electrodes. In those methods, the electromagnetic field propagates in a perpendicular direction to the metal surface. Therefore, the chemical groups with a dipole moment oriented perpendicular to the metal surface will exhibit the highest intensity of IR absorption, whereas the ones with a dipole moment parallel to the surface will show no absorption at all. For dipole moments lying in between, the intensity of the IR signal will depend on its angle with the surface normal. In proteins, the main secondary structure elements are α -helices and β -sheets, associated with specific amide I (C=O stretching mode, N–H bending) and amide II (combination of N–H bending and C–N stretching) spatial arrangements. Consequently, while the amide I dipole moment of an α -helix lies parallel to the

α -helix itself, its amide II component is perpendicular. For β -sheets, the situation is reversed for the main amide I and amide II components. As a consequence of this surface selection rule, the intensity ratio between Amide I and Amide II bands brings information regarding the orientation of the enzyme provided that a structure or a model of the enzyme is available [148] (Figure 8).

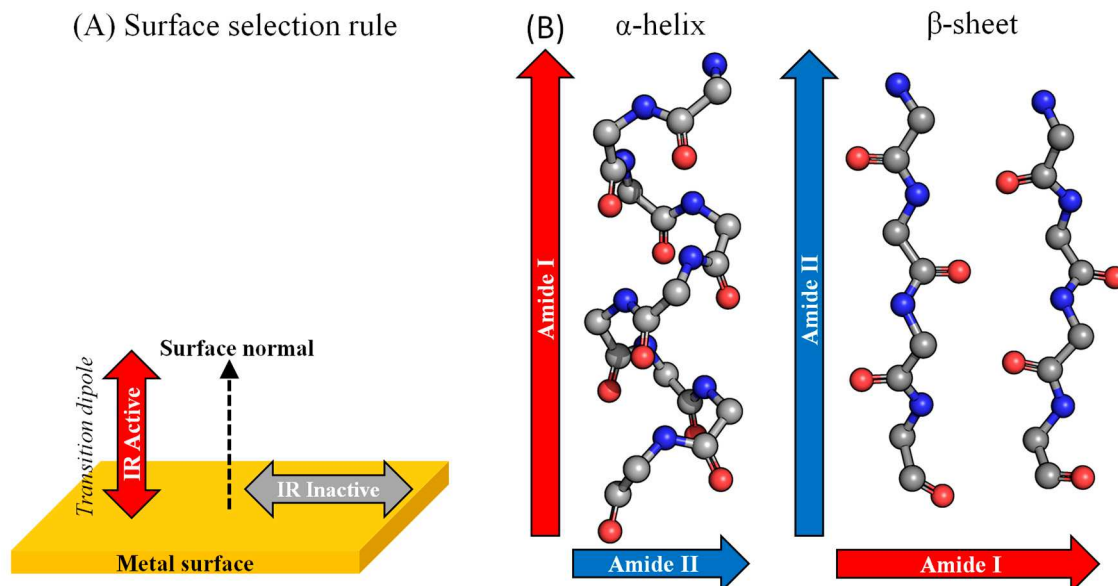


Figure 8. (A) Scheme representing the surface selection rule. Molecules with a transition dipole moment perpendicular to the metal surface exhibit the highest IR intensity while the parallel ones show no IR absorption; (B) Backbones of α -helix and β -sheet secondary structure elements with C=O and C–N highlighted in red and blue, respectively. Arrows show the direction of dipole moment depending on the type of chemical bond—amide I or amide II—relative to the secondary structure.

Surface-Enhanced Infrared Absorption (SEIRA) spectroscopy was used in combination with MD simulations to observe and rationalize the immobilization in a controlled orientation of membrane-bound [NiFe]-Hase from *Ralstonia eutropha* [149]. The membrane-bound Hase from *D. vulgaris* Hildenborough was reconstituted onto a SAM-modified gold electrode with a subsequent addition of a lipid membrane, either below or above the enzyme [150]. Immobilization on top of the membrane led to a great freedom of movement of the immobilized enzyme as indicated by the wide variation in the ratio of amide I to amide II between reproduced experiments. In the other configuration with the enzyme below the membrane, the direct interaction between the enzyme and the SAM-modified gold electrode led to a ratio of amide I to amide II close to 1, reproducible between experiments, indicating a more uniform immobilization procedure. Similarly, the different orientations adopted by a LAC depending on its covalent or noncovalent binding to the electrode [144] were monitored by SEIRA spectroscopy.

Polarization Modulated Infrared Reflection Absorption Spectroscopy (PM-IRRAS) allowed the observation of different orientations of the membrane-bound Hase of *A. aeolicus* [142]. Indeed, depending on the physico-chemical properties of the SAM-modified gold electrode (hydrophilic or hydrophobic), the intensity of the ratio of amide I to amide II varied, reflecting different orientations of the enzyme. Moreover, on the basis of simulations, those ratios could be correlated to the angle of the α -helices (main secondary structure element) present in the enzyme with respect to the normal of the electrode, giving an idea of the absolute orientation of the enzyme. Those results provided a structural interpretation of the electrochemical behavior of *A. aeolicus* Hase alternating between pure MET or a mixed DET + MET process depending on the physicochemical properties of the electrode. Similarly, PM-IRRAS was used to study the orientation of LAC onto SAM-modified gold electrodes depending on

the charges of the SAM headgroup [107]. Different orientations correlated with electrochemical signals were observed with significantly higher catalytic signal for LAC immobilized on positively charged surfaces. The same authors studied various immobilization procedures comprising hydrophilic SAM (mercapto ethanol), lipidic SAM (Dipalmitoylphosphatidylglycerol), and charged diazonium salts. They were able to conclude that orientations of LAC with β -sheets lying parallel to the electrode were associated with electrochemical response for O_2 reduction [151]. BOD from *M. verracuria* BOD was recently studied in a combined study including PM-IRRAS [145]. Despite drastically different electrochemical signals for O_2 reduction depending on the charges of SAM-modified electrodes, similar spectral features were observed for the amide region. This apparent discrepancy was rationalized on the basis of the particular topology consisting of a repeated β -barrel motif in the *M. verracuria* BOD.

4.3. Microscopy

Studying protein orientation with AFM [152] was proposed quite early, though in an indirect way. Using antibodies that bind to a specific region of the protein and measuring the volume of the protein/protein complex allows us to decipher if the antibody is present and, therefore, to deduce the orientation of the protein. Similarly, measuring by AFM the height profile of the protein-modified electrode after incubation in an antibody solution could also indicate the presence or absence of antibody, and therefore give clues about the protein orientation. However, if this technique has sometimes been used for simple redox proteins, to the best of our knowledge this has never been applied to enzymes. On the other hand, very few studies report the use of microscopy for direct evaluation of enzyme orientation. Actually, the direct measure of height profiles by AFM without antibody is a valuable method only if one dimension of the enzyme is characteristic. Hence, no information about the orientation can be obtained when globular enzymes are studied. LAC immobilization on mixed SAMs was, for example, studied using AFM, which gave information regarding enzyme distribution on the electrode surface. However, since these enzymes are recorded as quasi-spheres, the method would not be useful to determine their orientation [153]. In another example, *A. aeolicus* membrane-bound Hase immobilized on hydrophobic SAM was examined with AFM. Once again, approximately 3 nm high spherical features were observed, thus indicating the presence of a monolayer of enzyme but not which orientation was adopted [142]. A similar result was obtained with another globular enzyme—*R. eutropha* membrane-bound Hase—immobilized on a gold electrode [149].

However, an STM study, as well as three examples where AFM proved useful in determining enzyme orientation, are worth mentioning. The cytochrome *c* nitrite reductase from *E. coli*, a decaheme-containing homodimer with asymmetric dimensions, was adsorbed at an Au (111) electrode. STM was used to measure the lateral dimension of the immobilized enzymes and thus inform about their orientation [154]. This approach demonstrated that a distribution of orientations is adopted and that the enzymes possibly immobilize as monomers and dimers. A recombinant horseradish peroxidase bearing His- or Cys-tags at different positions with respect to the heme active site was attached to a gold electrode via the tag [155]. AFM measurements were performed in liquid (in 150 μ L PBS), i.e., in an environment able to preserve the enzyme native structure (as far as it can be preserved on a solid surface). Various height profiles of the tagged proteins were measured on an Au (111) surface, indicating that different binding points lead to different orientations of the proteins. Furthermore, this observation was consistent with the different heterogeneous ET rates between enzyme and electrode recorded in electrochemical experiments.

The orientation of the [NiFeSe] membrane-bound Hase from *D. vulgaris* Hildenborough on a gold electrode modified with SAMs and a lipid bilayer was further studied by combining AFM and electrochemistry [156]. This Hase is characterized by the presence of a lipidic tail at the opposite of the distal 4Fe4S cluster—the exit point of electrons. The enzyme is elongated and the longest dimension corresponds to the axis 4Fe4S cluster-lipidic tail. When the electrode, first modified with SAMs and a lipid bilayer, was incubated in a Hase solution, AFM showed the apparition of globules whose height

suggested that the Hase's longer dimension was vertically oriented. This orientation happened only when the lipidic tail was present, and not when the soluble form of the enzyme was studied instead. Since only MET was possible in electrochemistry, this observation indicated that the lipidic tail was inserted in the lipid bilayer. On the contrary, when the electrode was co-incubated in a solution of Hase and phospholipids, AFM indicated a flat surface with deep holes. After dissolution of the lipid bilayer with surfactants, globular features corresponding to Hase molecules were recovered. Since in this second case DET was allowed, the 4Fe4S was supposed to be oriented towards the electrode, while the Hase lipidic tail was inserted in the lipid bilayer on top of it. The same enzyme was combined with *E. coli* F₁F₀ ATP-synthase inserted in the lipid bilayer overhanging it. This whole machinery allowed the use of H₂ as a fuel to produce the proton gradient necessary for ATP synthesis. The F₁F₀ ATP-synthase consists of a large soluble domain and a smaller membrane domain. The presence and the size of protrusions on top of the lipid bilayer recorded by AFM indicated a unique orientation of F₁F₀ ATP-synthase with its soluble domain directed towards the outer of the membrane [157].

Finally, the bacterial respiratory complex I from *Rhodothermus marinus* was reconstituted in a biomimetic membrane on a gold electrode. The complex is a single protein (NADH-menaquinone oxidoreductase) consisting of two L-shaped domains [158]. The complex in its native form was first inserted in liposomes before incubation of the SAM-modified gold electrode in the proteoliposome suspension. A lipid membrane with protrusions of 6–8 nm was evidenced by AFM. This distance is consistent with the hydrophilic part of the protein extending outside the lipid membrane, although the size is smaller than that evidenced by X-ray crystallography (13 nm), suggesting that the L structure is flexible (Figure 9).

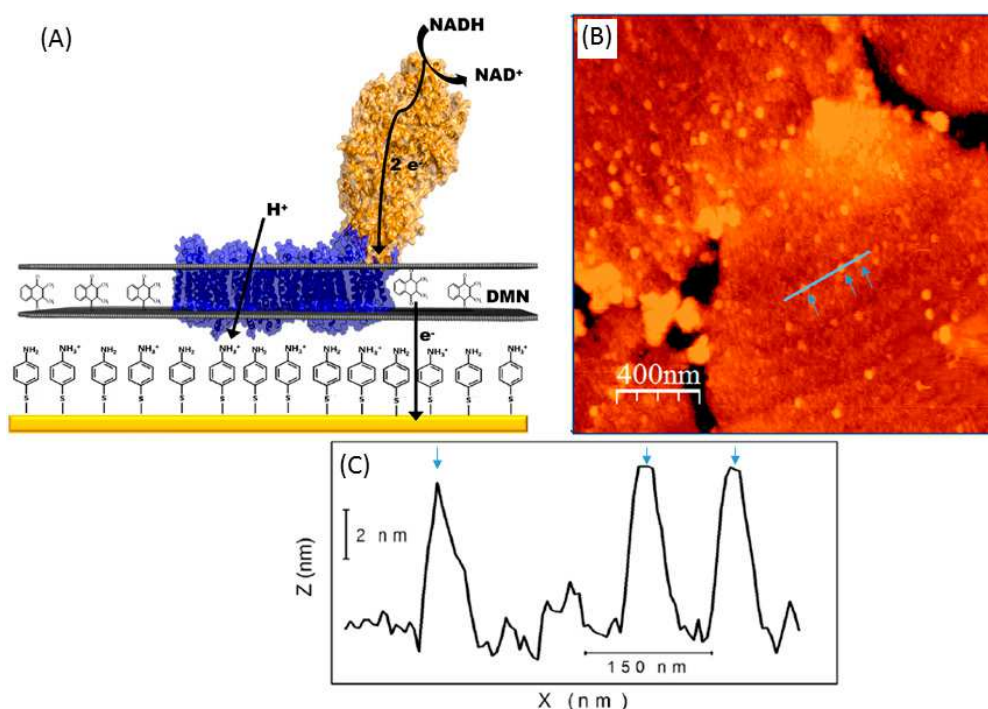


Figure 9. AFM study of the NADH-oxidizing respiratory complex I reconstituted in a phospholipid bilayer on a gold electrode. (A) Schematic representation of the reconstitution. The gold electrode is modified with 4-aminothiophenol and the phospholipid bilayer contains the redox mediator 2,3-dimethyl-1,4-naphthoquinone; (B) Tapping-mode AFM topography of a gold plate modified with 4-aminothiophenol to which complex I has been immobilized; (C) Z-axis profile across the line drawn in (B). The arrows indicate features whose height corresponds to the arm of complex I protruding outside the membrane (yellow structure in (A)). Adapted with permission from [158].

4.4. Modeling

To study functionalized electrode surfaces for enzyme immobilization, modeling approaches offer a window into the detailed surface interactions at the molecular level [28]. Several approaches can be used to predict the preferred orientation of enzymes on surfaces by modeling. SAM-functionalized gold surfaces have been modeled in numerous simulation works on enzyme–surface interactions, for example, to probe the enzyme binding orientation as a function of the surface charge [149]. Matanovic et al. used a combination of Density Functional Theory (DFT) and docking simulations to study the oriented interaction between bilirubin oxidase and a graphene electrode functionalized with bilirubin [159].

Sampling all relevant configurations sufficiently is one of the inherent challenges of such methods. ProtPOS (Prediction of Protein Preferred Orientation on a Surface) is software designed to predict the preferential orientations of a protein adsorbed on a surface. Its approach is to search for low-energy protein–surface conformations [160]. The use of a particle swarm optimization (PSO) algorithm allows fast computation of the energies of protein poses in every rotational and translational degree of freedom of the protein–surface complex [161]. The stochastic character of the PSO algorithm makes several runs necessary, with each run returning the lowest energy orientation of the protein on the surface that can be fed into MD simulations with a wide range of software—such as GROMACS [162] or AMBER [163,164].

More generally, the search for a global minimum in the enzyme–surface interaction energy landscape is a classic way to handle the question of protein orientation on a surface [165], and can be addressed via several modeling schemes such as parallel tempering Monte Carlo [166], docking via Brownian Dynamics Simulations [167], or MD simulations [168]. In their recent study on β -galactosidase grafted on a hydrophilic surface, Li et al. used coarse-grain MD simulations to probe the enzyme orientation and its catalytic activity as a function of the surface's hydrophilicity [169]. Such coarse-grain approaches have been developed for modeling protein–surface interactions because they allow an increase in the time and length scales that are accessible during simulations [28]. While coarse-grain representations can successfully address issues such as proteins binding on surfaces [161], or folding [32], they are, however, unable to deal with oxido-reduction processes and could not be used to describe ET between surfaces and enzymes until now.

When enzymes are immobilized on a surface via covalent bonds, for example, in the case of laccase bound on a SAM-functionalized gold surface, one can also determine the enzyme orientation by identifying the protein surface residue that will form the lowest energy bond with the SAM via calculations [169]. Bioinformatics tools represent another useful approach to determine a suitable orientation for enzymes immobilized on a surface in order to promote direct electron transfer, for example, by identifying hydrophobic patches on the protein surface [170].

5. Factors Driving the Oriented Immobilization at an Electrode

5.1. Importance of Electrostatic Interactions to Drive the Oriented Immobilization for Fast ET

As discussed in Section 3.1, electrostatic interactions are a major factor governing the stabilization of physiological protein–protein or protein–substrate interactions. In the context of intermolecular ET, it is therefore an essential parameter that needs to be evaluated and controlled in order to induce a proper orientation for an efficient electron transfer. Those interactions should inspire and guide the bioelectrochemist willing to achieve a physiological-like protein immobilization. Thus, when a molecular structure of the redox enzyme is available, calculations of the dipole moment of the enzyme might give hints for a rational approach to immobilize the targeted redox enzyme. In cases where the enzyme has a strong dipole moment, the preferential adsorption orientation can be predicted based on the surface chemistry of the electrode [171], while enzymes with less stable dipole moments can display several stable adsorption orientations [149]. Several computational studies on [NiFe]-Hases from various species have highlighted the importance of the enzyme dipole for

determining its orientation on a charged electrode [149]. In particular, the weak, fluctuating dipole moment in the membrane-bound [NiFe]-Hase from *A. aeolicus* enables the enzyme to adsorb efficiently on both negatively and positively charged surfaces [172]. BODs and LACs have been the subject of many studies highlighting the role of dipole moments in their oriented immobilization. For example, the orientation of laccase from *T. versicolor* adsorbed on charged SAMs was shown to be controlled by the enzyme's dipole moment and the distribution of charged patches all over the protein surface [173] (Figure 10).

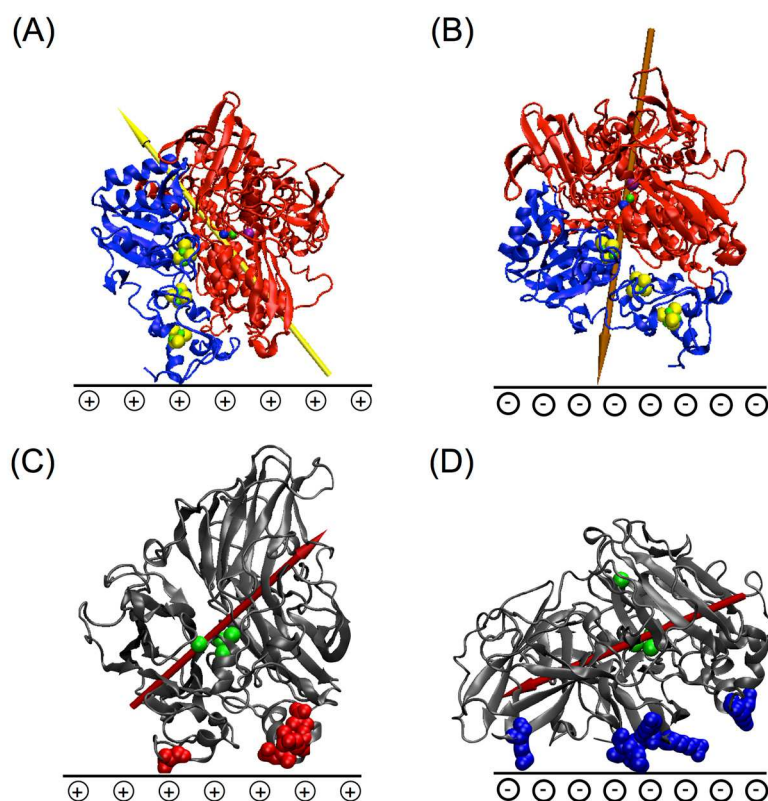


Figure 10. The fluctuating dipole moment of the [NiFe]-Hase from *A. aeolicus* enables it to adsorb efficiently on both positively and negatively charged surfaces (panels (A) and (B), respectively) [172]. On the other hand, the strong dipole moment in the LAC from *T. versicolor* leads to different enzyme orientations on positively and negatively charged surfaces (panels (C) and (D), respectively) [173]. Negatively charged residues interacting with the surface are shown as red van der Waals spheres in panel (C), while positively charged residues are shown in blue in panel (D).

The oriented immobilization on electrode surfaces presenting different charges of two different BODs, one from a fungus (*M. verrucaria*) and the other from a bacterium (*Bacillus pumilus*), was shown to be controlled by the variation of their dipole moments as a function of pH [30]. Hence, direct connection of *M. verrucaria* BOD was obtained upon adsorption at pH 6 on negatively charged surfaces, in relation with a dipole moment pointing towards the T1 Cu, while only mediated catalytic current was obtained on positively charged surfaces [145]. On the contrary, *B. pumilus* BOD, with a dipole moment directed toward the opposite side of the T1 Cu in all the pH range, was unable to achieve any direct connection on negatively charged surfaces. This last example clearly demonstrates that the dipole moment is the key property driving the orientation, much more than the global surface charge which is similar for the two BODs.

Electrostatic control of the orientation of enzymes was reported in other papers, although a direct link with dipole moments was not underlined. Modeling studies highlight the crucial role played

by the surface charge for effective reactions at the interface. For example, the hexameric tyrosine coordinated protein (HTHP) will adsorb in a nonproductive orientation for DET on positively charged SAMs [174]. In their work on sulfite oxidase adsorbing on SAMs, Utesch et al. showed how the solution ionic strength impacts the enzyme adsorption [175]. High ionic strengths tend to inhibit the interaction between the cyt b_5 domain and the SAMs both by competitive adsorption between ions and the cytochrome units, and by the shielding of the electrostatic attraction between the enzyme and the surface. The same group also investigated the effect of the protonation degree of the SAM surface on the immobilization of a [NiFe]-Hase [171]. They showed how the number of contacts between the SAM and negatively charged areas on the enzyme surface increase with the SAM ionization level. The strength of the enzyme/surface interaction is proportional to the SAM degree of protonation. However, MD simulations show that a high (50%) protonation degree of the SAM induces conformation changes in the enzyme that might be detrimental to its catalytic activity. However, one should note that, from a simulation perspective, the vast majority of modeling studies dealing with protein–solid surface systems concerns peptides grafted on surfaces, while the larger, more complex redox enzymes have, until now, attracted much less attention. Electrochemistry was thus the main method used throughout. Ulstrup et al. extensively studied the electrochemical behavior of four MCOs (three LACs, i.e., *Coprinus cinereus* (CcL), *Myceliophthora thermophila* (MtL), and *Streptomyces coelicolor* (ScL) as well as BOD from *M. verrucaria*) on different SAMs terminated by methyl, carboxylate, and amino groups [176]. A clear DET signal for catalytic reduction was reported for *M. verrucaria* BOD and CcL immobilized on negative carboxylate SAMs, and for ScL immobilized on positive or hydrophobic SAMs. No catalytic current could be obtained for MtL on any SAMs. Such observations demonstrate the clear sensitivity of a given enzyme to the local chemistry of the electrode surface more likely due to their electrostatic interactions. Enzymes having negative (ScL) or positive (*M. verrucaria* BOD, CcL) surface charge around the copper T1 active site are adsorbed on positive or negative SAMs, respectively, in a DET-type orientation derived by electrostatic interactions between opposite charges. Hydrophobic interactions have also featured for ScL immobilization on octanethiol SAMs, typically due to the hydrophobic environment around the active site along with negative surface charges. Although MtL is structurally similar to *M. verrucaria* BOD, no clear DET on any SAM surface indicates an entirely different environment around the Cu T1. Oriented immobilization of a [FeFe]-Hase from *Clostridium acetobutylicum* having large positive surface regions was achieved at negative SAMs on gold electrodes [177]. On the contrary, an oxygen-tolerant [NiFe]-Hase from *R. eutropha* adopted favorable orientation for DET-type electrocatalysis on 6-amino-1-hexanethiol coated gold electrodes [149]. This Hase being homologous to *A. aeolicus* Hase, one can suspect that the dipole moment of the enzyme may explain such a result.

5.2. Effect of Covalent Attachment

Covalent attachment is viewed as a general solution to avoid enzyme leaching from the electrochemical interface. The presence of amino, carboxylate, or hydroxyl groups within the amino acid moieties of an enzyme is exploited for covalent binding. SAMs on gold also offer a variety of terminal chemical functionalities that permit ease of covalent conjunction. For covalent attachment, carbodiimide chemistry is the most popular one, where water-soluble 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC) and N-hydroxysuccinimide (NHS) reagents are commonly used [178,179]. The issue here is whether the covalent attachment will preclude any specific orientation of the enzyme, and hence decrease the ET efficiency. Actually, covalent attachment may result in multipoint attachment of the enzyme as more than one surface functional group may participate during bond formation. Consequently, the relative position achieved by immobilized enzymes is random and enzymes adopt nonuniform distribution orientations.

Infrared spectroscopy is a valuable tool to monitor the formation of a covalent bond between an immobilized enzyme and a linker. The EDC/NHS coupling reaction catalyzing the formation of amide bonds between the amino groups of a linker molecule on the surface of the Au electrode and

the carboxylic acid groups of a LAC was performed [144]. As a result of this covalent attachment, an absorption band appeared at 1737 cm^{-1} , typical of a carbonyl group, confirming the formation of covalent amide bonds between the amino-terminated linker of the gold electrode and the carboxylic functions of the LAC exposed to the solvent. Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS) was used to monitor the covalent attachment of the azido-modified horseradish peroxidase onto gold electrodes modified with an alkynyl complex—1,4-dialkynylbenzene (DEB). The success of the click chemistry reaction was evidenced by the disappearance of the azide band of the enzyme involved in the covalent bond with the DEB monolayer [180]. Rudiger et al. reported higher operational stability compared to adsorbed enzymes when *D. gigas* [Ni-Fe]-Hase was covalently attached to gold electrodes modified with a SAM of 4-aminothiophenol. After 80 h of continuous operation, 25% of the initial current was maintained. A clear DET signal confirmed that the immobilization method favors an orientation where the active site of the enzyme faces the electrode surface [143]. Gutierrez-Sanchez et al. reported similar higher operational stability for covalent conjunction of *M. verucaria* BOD to gold electrodes modified by carboxylate-terminated SAM [145]. This result was obtained by coupling SPR to electrochemistry, and was unexpected since it was also demonstrated that before covalent attachment, the decrease in the catalytic signal was not related to any enzyme desorption from the gold surface. This observation clearly demonstrates that covalent binding induces some rigidification of the structure which is favorable to enzyme stability once immobilized. However, with the same *M. verucaria* BOD enzyme and on the same type of negative SAM on gold, Blanford et al. did not find any improvement of stability of the catalytic signal after covalent linking, and even showed a decrease in the magnitude of the current [181]. Actually, characteristics of the immobilized systems, including surface coverage, electrocatalytic activity, and stability of the proteins are considerably affected by the type of bond formed between electrode and protein, which is driven by the immobilization method. In the two cases just reported, the binding reaction was performed in two different ways. In the first case, the enzyme was first oriented according to electrostatic interaction on the SAM-modified gold electrode, and then the coupling reaction was performed. In the second case, the activated ester was first immobilized on the gold electrodes before enzyme coupling.

5.3. Effect of Enzyme Partition

In vivo, catalytic reactions mostly occur in an enzyme-crowded environment. It can thus be suspected that the density of enzymes on the electrode interface might impact the catalysis efficiency. The enzyme surface packing on the electrode could also influence its redox potential. For example, MD simulations and quantum calculations performed on cytochrome *c* covalently bound on a bare gold surface have shown that crowding of the proteins can raise their redox potential to around 100 mV [182]. This effect would be due to the change in the polarizability of the enzyme's environment, where much less polarizable proteins replace water. Concomitantly, enzyme surface density may alter enzyme orientation because of interactions between neighboring molecules. At the same time, such interactions may impede important functional movements. McArdle et al. used electrochemistry coupled to QCM with dissipation analysis to explore the effect of *M. verucaria* BOD molecular density on catalytic activity and layer rigidity. An optimum concentration of enzymes to be adsorbed was found as a balance between rates of adsorption, enzyme denaturation, and reorientation [146]. One way to vary the enzyme density at planar electrodes is to use mixed SAMs composed of different thiol derivatives. These SAMs are usually prepared by co-adsorption from a solution containing different thiol components onto an electrode surface. Mixed SAMs present stronger overall polarization than pure SAMs as a consequence of antiparallel orientation of dipoles within the SAM. In case of electrostatic binding of enzymes, this polarization induces an enhanced amount of enzyme loading [183]. Many studies dedicated to enzymatic electrocatalysis use mixed SAMs, although the partition of the thiols in such mixed layers is not straightforward, and a detailed relationship between the SAM mixed chemistry and the enzyme activity is rarely provided. Actually, dilution of two different thiols may result in homogeneous [184], or phase-separated monolayers [185]. It is

noteworthy that Traunsteiner et al. used electrochemistry to study the effect of the structure of a mixed SAM obtained by the dilution of short-chain thiols with a longer thiol chain, the linker, on the binding and catalytic efficiency of *T. versicolor* LAC (Figure 11). The linker was chosen to fit the Cu T1 pocket and to bind LAC in a favorable orientation for electrocatalysis. The arrangement of the linker was visualized by high-resolution STM, showing two configurations as a function of water content in the thiol solutions. In case of separated domains of the linker and the short thiol chain, very small catalytic current was observed, contrary to the high current obtained when LAC was immobilized on homogeneous mixed SAM. In the latter case, it was suggested that the isolation of the linker by short thiol molecules improved the binding of LAC [153].

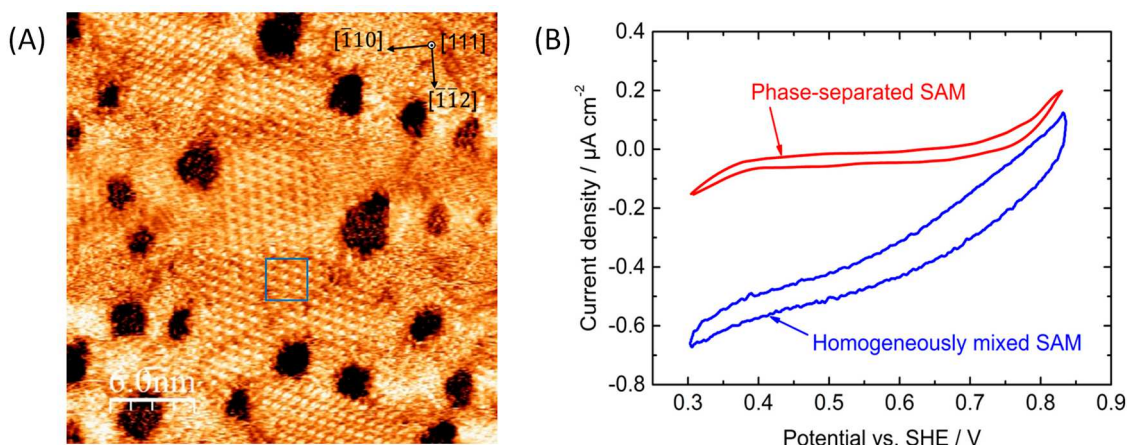


Figure 11. (A) EC-STM image showing homogeneous phase of a mixed SAM on Au(111) and (B) CVs of *T. versicolor* LAC immobilized on the homogeneously mixed SAM (blue) and the phase-separated SAM (red) on Au(111) in oxygen-saturated solution [153].

5.4. Effect of Potential, Electric Field

Electrical potential is a major parameter which controls redox enzyme activity, but also the formation of inactive states, or reactivation processes, by modulating the redox state of the active site. In addition to electrostatic interactions between charged species (either electrode or enzyme) induced by pH-dependent surface chemistry, electrical potential may also influence the enzyme conformation and orientation (and, hence, catalysis) in two different ways. First, performing the adsorption of the enzyme under an applied potential may have an impact on the orientation by creating an electric field around the enzyme. Second, imposing a potential once the enzyme is adsorbed on an electrode surface should affect its orientation and even its conformation by changing the charge in the environment of the enzyme. These two processes have been explored in only rare papers.

Proteins can be divided into hard and soft proteins depending on the conformational entropy of their structure. It was shown by ellipsometry and MD simulations that soft proteins, such as glucose oxidase, are less sensitive to changes in the conformation under applied potential once immobilized on a solid surface [186]. CueO [187] and fructose dehydrogenase (FDH) [188] adsorbed on a bare gold electrode at potentials around the potential of zero charge (E_{pzc}) showed the highest direct catalytic activity, suggesting a more favorable enzyme orientation. For both enzymes, DET activity decreased when enzymes were allowed to adsorb at electrode potentials far from the E_{pzc} . Different behavior as a function of the adsorbed potential was observed depending on the surface of the gold electrode, either bare, or modified by a hydrophobic thiol layer. The proposed model explains how the electrostatic interaction between the enzymes and the electrode in the electric double layer affects the orientation, but also the stability of the adsorbed enzymes. Lopez et al. immobilized *M. verrucaria* BOD on bare and nanocrystalline gold electrodes via potential pulse-assisted immobilization [189].

An increase in the direct catalytic current was observed compared to the electrode simply prepared by drop casting of enzyme, likely from a preferential orientation of *M. verrucaria* BOD.

The effect of electrode potential on protein immobilization after enzyme adsorption has also been investigated. Change in enzyme orientation upon application of a potential on the membrane-bound Hase from *R. eutropha* was monitored by spectroelectrochemistry [149]. Indeed, as discussed above, application of a negative potential below the E_{PZC} of the SAM-coated Au electrode confirms a reorientation of a fraction of the enzyme population in a more favorable configuration for DET, leading finally to an increase in catalytic current. On the other hand, possible deleterious side effects induced by the application of potential have been evidenced [190]. In the case of the anaerobic [NiFe]-Hase from *D. vulgaris* Miyazaki F, continuous potential application leads to a decrease in the intensity arising from the infrared markers of the active site (one $C\equiv O$ and two $C\equiv N$ ligands). Remarkably, the signal intensity arising from amide I and amide II bands reflecting the structural integrity of the enzyme remains constant, suggesting a targeted destruction of the active site. The authors suggest the in situ generation of ROS reacting with the active site and leading to its destruction. This experimental dataset argues against the widely used “film loss” explanation. Besides this, catalytic current dependence on the electrochemical methods used emphasized that cyclic voltammetry induced a faster decrease in the current for O_2 reduction by *M. verrucaria* BOD with time than did chronopotentiometry, suggesting a clear influence of the applied potential on the current stability [181]. The interfacial electric field has also been pointed out to affect the redox potential of enzymes. A SEIRA study of the type II NADH: Quinone Oxidoreductase from *E. coli* immobilized on SAM-modified gold electrodes outlined a substantial increase in the redox potential of the enzyme (~ 140 mV) [191]. The authors attributed this upshift in potential to an electric-field-driven stabilization of the flavin cofactor. This interpretation was supported by previous similar observations on tetraheme cytochromes c_3 [192].

6. Future Directions: Towards Rational Bioelectrode Design

We have reviewed how to control the orientation of redox enzymes on electrochemical interfaces. This step is mandatory to achieve a fast ET process and maximize the quantity of loaded enzymes on the surface. Success in such oriented immobilization is particularly important for practical applications as it will enable higher sensitivity for biosensors as well as higher current densities—and, hence, power densities—for biofuel cells. Fundamental understanding of the physiological processes in which redox enzymes are involved for ET is essential if one wants to provide the best tailored immobilization procedure. Protein–protein interactions can be investigated using numerous modeling tools, especially to identify potential interaction partners, and to determine the structure of protein assemblies on a surface [193] and the stability over time of these complexes. In particular, the modeling of protein complexes permits the identification of conformational changes induced by protein binding, which are likely to have a noticeable effect on the enzyme’s biological function. Key parameters that may yield some degree of control over the orientation of enzymes may be deduced. The molecular bases for functional orientation of common and largely used enzymes are now available. This is the case for BOD and LAC, the enzymes widely used for O_2 reduction. This is also the case for Hases, which have been studied in depth on different types of planar electrodes. However, many enzymes, particularly less broadly used ones, remain silent in electrochemistry, which illustrates that the sole examination of the structure of an enzyme is not sufficient to describe the immobilization and ET phenomenon in its full complexity. The influence of tags used for purification, and surfactants in the case of membrane proteins, may play an essential role in enzyme orientation which is often underestimated.

One important issue that still needs to be further investigated is the effect of the orientation required for DET on the conformation and dynamics of the immobilized enzyme. Electrostatic interactions are most often required to guide a proper orientation of the enzyme yielding a high ET rate constant. Whether these interactions can affect the native conformation, or even denature the enzymes, is still an open question. From a theoretical perspective, molecular modeling approaches provide us

with a detailed picture on the molecular level of how the surface/protein interaction can control the enzymes' orientation, and eventually impact their conformation and internal dynamics. In addition, quantum calculation can help determine potential modifications of the enzymes' redox properties and catalytic activity when they are immobilized on the electrode surface. Some experimental works already clearly state change in the conformation of enzymes upon immobilization on an electrode. As a relevant illustration, the two highly homologous membrane-bound [NiFe]-Hases from *A. aeolicus* and *R. eutropha* display completely different behavior on highly negatively charged electrode surfaces [194]. Recovering of the catalytic signal for H₂ oxidation after surfactant addition in the *R. eutropha* Hase sample suggested that the absence of a surfactant compared to the *A. aeolicus* Hase sample induced structural changes of the enzyme because of the strong electrostatic interactions. LAC and BOD immobilized for DET on gold electrodes were shown to face potential-induced structural changes as revealed by SERRS and ellipsometry experiments [58,141]. QCM and dual-polarization interferometry studies of BOD immobilized on negative SAM-based gold electrodes highlighted that deformation required for DET should lead to a decrease in activity at high enzyme concentrations [146].

To improve the understanding and control of the molecular details involved in protein–electrode interaction, it is now mandatory to develop new methods that are able to relate in real time electrocatalytic activity to enzyme loading, enzyme partition, and enzyme conformation and dynamics. However, very few works nowadays report such coupled methods. One exception is SPR and QCM coupled to electrochemistry, the so-called e-SPR and e-QCM approaches that were already developed to correlate enzyme loading to activity [145,181]. Such coupled methods established for the first time the relation between the amount of deposited enzymes and the enzymatic activity. They also allowed a definite demonstration that a decrease in catalytic currents was not a result of enzyme leaking in most cases, but was due to other processes. Whether these other processes involved are reorientation, change in conformation, or denaturation must be now elucidated. Further developments in orientation-sensitive spectroelectrochemical methods such as PMIRRAS and Plasmon Waveguide Resonance [195], a much more sensitive variant of SPR able to measure affinity and kinetics of interaction, are currently running. They may allow us to relate the conformation of the enzyme or reorientation to its activity. To characterize the overall surface topology, fluorescence microscopy, or AFM approaches, should also be coupled to electrochemistry to constitute a map of enzyme localization on an electrode surface, and visualize the real effect of enzyme density. Such approaches require technological set ups that are currently under investigation for other redox systems than enzymes, but may be applied to redox enzymes in the near future [196]. Sampling issues remain a bottleneck in the simulation of enzyme–surface interactions, in particular, for investigating processes taking place on a large range of length and time scales. Therefore, the development of enhanced sampling methods and multiscale approaches represents a central challenge for studying such complex systems. Finally, sensitive electrochemical methods have to be developed to search for noncatalytic signals, allowing us to access the real amounts of enzymes effectively participating in the catalysis.

With that objective and to enhance the signal-to-noise ratio, electrochemical interfaces other than planar electrodes should be used. However, one should define for which conditions the key parameters for a specific enzyme orientation obtained on flat electrodes could be extended to more complex electrodes, and beyond to 3D nanostructures. A few recently reported examples demonstrated the ability to transfer the determined molecular basis for DET from a planar to a more complex-structured electrode. The physicochemical properties of the SAM-modified gold electrodes obtained in the case of *M. verrucaria* BOD were transposed to functionalized nanoporous gold [197], as well as to functionalized carbon nanotubes films [30]. The requirement of an aromatic linker to anchor LAC via the Cu T1 was confirmed on films made of gold nanoparticles [198]. Catalysis with *A. aeolicus* Hase immobilized on carbon nanotubes presenting different surface chemistry highlighted good correlation with catalytic currents observed on the corresponding SAM functionality on planar gold electrodes. Agreement between the magnitudes of the catalytic current as a function of the surface chemistry on the carbon nanotubes with theoretical modeling of the dipole moment of the enzyme was also

demonstrated [194]. Nevertheless, only a low percentage, around 10%, of the loaded enzymes were electrically connected in the 3D structure [21], which suggests that other parameters than a correct enzyme orientation for DET drive catalysis in 3D conductive structures. One should be aware of the heterogeneity of electrochemical interfaces such as those formed by carbon nanotubes or carbon particles. Indeed, on such surfaces the walls of the carbon nanotubes are hydrophobic. Chemical functions are created upon carbon nanotube oxidative treatment or after π -binding of aromatic derivatives, yielding surfaces presenting various functionalities. The multiporosity displayed by 3D conductive surface must also be taken into account. Such a property is expected to be suitable for electrocatalysis, with macroporosity (pore diameter more than 50 nm) allowing fast substrate transport and mesoporosity allowing stable enzyme encapsulation. In the case when the pore is of the same dimension as the enzyme, one can expect that electrical connection of the enzyme might be efficient independently of its orientation, with the functionalities on the material serving only for stable anchorage [199]. In this case, however, transport processes should play a key role, both to provide a sufficient level of substrate to the enzyme and to permit fast evacuation of the product to avoid enzyme inhibition. This means that efficient bioelectrocatalysis will be achieved through a balance between electrical connection of a high amount of redox enzymes, protection of the enzymes in a suitable conductive structure, and substrate availability.

Acknowledgments: This work was supported by ANR (ENZYMOR-ANR-16-CE05-0024) and by the “Initiative d’Excellence” program from the French State (Grant “DYNAMO”, ANR-11-LABX-0011-01).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Mellor, S.B.; Vavitsas, K.; Nielsen, A.Z.; Jensen, P.E. Photosynthetic fuel for heterologous enzymes: The role of electron carrier proteins. *Photosynth. Res.* **2017**, *134*, 329–342. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Ilbert, M.; Bonnefoy, V. Insight into the evolution of the iron oxidation pathways. *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* **2013**, *1827*, 161–175. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Guiral, M.; Aussignargues, C.; Prunetti, L.; Infossi, P.; Ilbert, M.; Giudici-Orticoni, M.T. The energy sulfur metabolism of the hyperthermophilic bacterium *Aquifex aeolicus*. *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* **2012**, *1817*, S155. [[CrossRef](#)]
4. Moehlenbrock, M.J.; Minteer, S.D. Extended lifetime biofuel cells. *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 1188–1196. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Maduraiveeran, G.; Sasidharan, M.; Ganesan, V. Electrochemical sensor and biosensor platforms based on advanced nanomaterials for biological and biomedical applications. *Biosens. Bioelectron.* **2018**, *103*, 113–129. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Justino, C.I.L.; Duarte, A.C.; Rocha-Santos, T.A.P. Recent Progress in Biosensors for Environmental Monitoring: A review. *Sensors* **2017**, *17*, 2918. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Clark, L.C.; Lyons, C. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1962**, *102*, 29–45. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Bandothkar, A.J.; Imani, S.; Nunez-Flores, R.; Kumar, R.; Wang, C.Y.; Mohan, A.M.V.; Wang, J.; Mercier, P.P. Re-usable electrochemical glucose sensors integrated into a smartphone platform. *Biosens. Bioelectron.* **2018**, *101*, 181–187. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Bruen, D.; Delaney, C.; Florea, L.; Diamond, D. Glucose Sensing for Diabetes Monitoring: Recent Developments. *Sensors* **2017**, *17*, 1866. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Bandothkar, A.J.; Wang, J. Non-invasive wearable electrochemical sensors: A review. *Trends Biotechnol.* **2014**, *32*, 363–371. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Santharaman, P.; Venkatesh, K.A.; Vairamani, K.; Benjamin, A.R.; Sethy, N.K.; Bhargava, K.; Karunakaran, C. ARM-microcontroller based portable nitrite electrochemical analyzer using cytochrome *c* reductase biofunctionalized onto screen printed carbon electrode. *Biosens. Bioelectron.* **2017**, *90*, 410–417. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

12. Huang, Y.; Tan, J.; Cui, L.J.; Zhou, Z.D.; Zhou, S.F.; Zhang, Z.H.; Zheng, R.; Xue, Y.W.; Zhang, M.X.; Li, S.S.; et al. Graphene and Au NPs co-mediated enzymatic silver deposition for the ultrasensitive electrochemical detection of cholesterol. *Biosens. Bioelectron.* **2018**, *102*, 560–567. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Jakhar, S.; Pundir, C.S. Preparation, characterization and application of urease nanoparticles for construction of an improved potentiometric urea biosensor. *Biosens. Bioelectron.* **2018**, *100*, 242–250. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Anik, U.; Tepeli, Y.; Diouani, M.F. Fabrication of Electrochemical Model Influenza A Virus Biosensor Based on the Measurements of Neuroaminidase Enzyme Activity. *Anal. Chem.* **2016**, *88*, 6151–6153. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Sharma, B.; Dangi, A.K.; Shukla, P. Contemporary enzyme based technologies for bioremediation: A review. *J. Environ. Manag.* **2018**, *210*, 10–22. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Morrison, C.S.; Armiger, W.B.; Dodds, D.R.; Dordick, J.S.; Koffas, M.A.G. Improved strategies for electrochemical 1,4-NAD(P)H₂ regeneration: A new era of bioreactors for industrial biocatalysis. *Biotechnol. Adv.* **2018**, *36*, 120–131. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Bajracharya, S.; Srikanth, S.; Mohanakrishna, G.; Zacharia, R.; Strik, D.; Pant, D. Biotransformation of carbon dioxide in bioelectrochemical systems: State of the art and future prospects. *J. Power Sources* **2017**, *356*, 256–273. [[CrossRef](#)]
18. Hadj-Said, J.; Pandelia, M.E.; Leger, C.; Fourmond, V.; Dementin, S. The Carbon Monoxide Dehydrogenase from *Desulfovibrio vulgaris*. *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* **2015**, *1847*, 1574–1583. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Gamella, M.; Koushanpour, A.; Katz, E. Biofuel cells—Activation of micro- and macro-electronic devices. *Bioelectrochemistry* **2018**, *119*, 33–42. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Mazurenko, I.; Wang, X.; de Poulpique, A.; Lojou, E. H₂/O₂ enzymatic fuel cells: From proof-of-concept to powerful devices. *Sustain. Energy Fuels* **2017**, *1*, 1475–1501. [[CrossRef](#)]
21. Mazurenko, I.; Monsalve, K.; Infossi, P.; Giudici-Orticoni, M.T.; Topin, F.; Mano, N.; Lojou, E. Impact of substrate diffusion and enzyme distribution in 3D-porous electrodes: A combined electrochemical and modelling study of a thermostable H₂/O₂ enzymatic fuel cell. *Energy Environ. Sci.* **2017**, *10*, 1966–1982. [[CrossRef](#)]
22. Hoarau, M.; Badieyan, S.; Marsh, E.N.G. Immobilized enzymes: Understanding enzyme—Surface interactions at the molecular level. *Org. Biomol. Chem.* **2017**, *15*, 9539–9551. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Winkler, J.R.; Gray, H.B. Electron flow through metalloproteins. *Chem. Rev.* **2013**, *114*, 3369–3380. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Marcus, R.A.; Sutin, N. Electron transfers in chemistry and biology. *Biochim. Biophys. Acta* **1985**, *811*, 265–322. [[CrossRef](#)]
25. Moser, C.C.; Keske, J.M.; Warncke, K.; Farid, R.S.; Dutton, P.L. Nature of biological electron-transfer. *Nature* **1992**, *355*, 796–802. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Bostick, C.D.; Mukhopadhyay, S.; Pecht, I.; Sheves, M.; Cahen, D.; Lederman, D. Protein bioelectronics: A review of what we do and do not know. *Rep. Prog. Phys.* **2018**, *81*, 026601. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Page, C.C.; Moser, C.C.; Chen, X.X.; Dutton, P.L. Natural engineering principles of electron tunnelling in biological oxidation-reduction. *Nature* **1999**, *402*, 47–52. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Ozboyaci, M.; Kokh, D.B.; Corni, S.; Wade, R.C. Modeling and simulation of protein-surface interactions: Achievements and challenges. *Q. Rev. Biophys.* **2016**, *49*, e4. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Léger, C.; Bertrand, P. Direct electrochemistry of redox enzymes as a tool for mechanistic studies. *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 2379–2438. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Mazurenko, I.; Monsalve, K.; Rouhana, J.; Parent, P.; Laffon, C.; Goff, A.L.; Szunerits, S.; Boukherroub, R.; Giudici-Orticoni, M.-T.; Mano, N. How the intricate interactions between carbon nanotubes and two bilirubin oxidases control direct and mediated O₂ reduction. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2016**, *8*, 23074–23085. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Oteri, F.; Baaden, M.; Lojou, E.; Sacquin-Mora, S. Multiscale simulations give insight into the hydrogen in and out pathways of [NiFe]-hydrogenases from *Aquifex aeolicus* and *Desulfovibrio fructosovorans*. *J. Phys. Chem. B* **2014**, *118*, 13800–13811. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Ogorzalek, T.L.; Wei, S.; Liu, Y.; Wang, Q.; Brooks, C.L., III; Chen, Z.; Marsh, E.N.G. Molecular-level insights into orientation-dependent changes in the thermal stability of enzymes covalently immobilized on surfaces. *Langmuir* **2015**, *31*, 6145–6153. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

33. Mano, N.; de Poulpique, A. O₂ Reduction in Enzymatic Biofuel Cells. *Chem. Rev.* **2018**, *118*, 2392–2468. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Sakurai, T.; Kataoka, K. Basic and applied features of multicopper oxidases, CueO, bilirubin oxidase, and laccase. *Chem. Rec.* **2007**, *7*, 220–229. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Solomon, E.I.; Augustine, A.J.; Yoon, J. O₂ Reduction to H₂O by the multicopper oxidases. *Dalton Trans.* **2008**, *30*, 3921–3932. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Lubitz, W.; Ogata, H.; Rüdiger, O.; Reijerse, E. Hydrogenases. *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 4081–4148. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Fontecilla-Camps, J.C.; Volbeda, A.; Cavazza, C.; Nicolet, Y. Structure/function relationships of [NiFe]- and [FeFe]-hydrogenases. *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 4273–4303. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Wang, P.-H.; Best, R.B.; Blumberger, J. Multiscale simulation reveals multiple pathways for H₂ and O₂ transport in a [NiFe]-hydrogenase. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 3548–3556. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Wilson, R.; Turner, A. Glucose oxidase: An ideal enzyme. *Biosens. Bioelectron.* **1992**, *7*, 165–185. [[CrossRef](#)]
40. Hecht, H.; Schomburg, D.; Kalisz, H.; Schmid, R. The 3D structure of glucose oxidase from *Aspergillus niger*. Implications for the use of GOD as a biosensor enzyme. *Biosens. Bioelectron.* **1993**, *8*, 197–203. [[CrossRef](#)]
41. Zebda, A.; Gondran, C.; Le Goff, A.; Holzinger, M.; Cinquin, P.; Cosnier, S. Mediatorless high-power glucose biofuel cells based on compressed carbon nanotube-enzyme electrodes. *Nat. Commun.* **2011**, *2*, 370. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Ludwig, R.; Ortiz, R.; Schulz, C.; Harreither, W.; Sygmund, C.; Gorton, L. Cellobiose dehydrogenase modified electrodes: Advances by materials science and biochemical engineering. *Anal. Bioanal. Chem.* **2013**, *405*, 3637–3658. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Secundo, F. Conformational changes of enzymes upon immobilisation. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 6250–6261. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Sugimoto, Y.; Kitazumi, Y.; Shirai, O.; Nishikawa, K.; Higuchi, Y.; Yamamoto, M.; Kano, K. Electrostatic roles in electron transfer from NiFe hydrogenase to cytochrome *c*₃ from *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F. *Biochim. Biophys. Acta Proteins Proteom.* **2017**, *1865*, 481–487. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Shimada, S.; Shinzawa-Itoh, K.; Baba, J.; Aoe, S.; Shimada, A.; Yamashita, E.; Kang, J.Y.; Tateno, M.; Yoshikawa, S.; Tsukihara, T. Complex structure of cytochrome *c*-cytochrome *c* oxidase reveals a novel protein-protein interaction mode. *EMBO J.* **2017**, *36*, 291–300. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Kim, J.Y.; Kinoshita, M.; Kume, S.; Gt, H.; Sugiki, T.; Ladbury, J.E.; Kojima, C.; Ikegami, T.; Kurisu, G.; Goto, Y.; et al. Non-covalent forces tune the electron transfer complex between ferredoxin and sulfite reductase to optimize enzymatic activity. *Biochem. J.* **2016**, *473*, 3837–3854. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Andralojc, W.; Hiruma, Y.; Liu, W.M.; Ravera, E.; Nojiri, M.; Parigi, G.; Luchinat, C.; Ubbink, M. Identification of productive and futile encounters in an electron transfer protein complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2017**, *114*, E1840–E1847. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Kollipara, S.; Tatireddy, S.; Pathirathne, T.; Rathnayake, L.K.; Northrup, S.H. Contribution of Electrostatics to the Kinetics of Electron Transfer from NADH-Cytochrome *b*₅ Reductase to Fe(III)-Cytochrome *b*₅. *J. Phys. Chem. B* **2016**, *120*, 8193–8207. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Cracknell, J.A.; Vincent, K.A.; Armstrong, F.A. Enzymes as working or inspirational electrocatalysts for fuel cells and electrolysis. *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 2439–2461. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Felder, C.E.; Prilusky, J.; Silman, I.; Sussman, J.L. A server and database for dipole moments of proteins. *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, W512–W521. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Topin, J.; Rousset, M.; Antonczak, S.; Golebiowski, J. Kinetics and thermodynamics of gas diffusion in a NiFe hydrogenase. *Proteins Struct. Funct. Bioinform.* **2012**, *80*, 677–682. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Narth, C.; Gillet, N.; Cailliez, F.; Lévy, B.; de la Lande, A.L. Electron transfer, decoherence, and protein dynamics: Insights from atomistic simulations. *Acc. Chem Res.* **2015**, *48*, 1090–1097. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Mazurenko, I.; de Poulpique, A.; Lojou, E. Recent developments in high surface area bioelectrodes for enzymatic fuel cells. *Curr. Opin. Electrochem.* **2017**, *5*, 74–84. [[CrossRef](#)]
54. Mazurenko, I.; Clément, R.; Byrne-Kodjabachian, D.; de Poulpique, A.; Tsujimura, S.; Lojou, E. Pore size effect of MgO-templated carbon on enzymatic H₂ oxidation by the hyperthermophilic hydrogenase from *Aquifex aeolicus*. *J. Electroanal. Chem.* **2018**, *812*, 221–226. [[CrossRef](#)]

55. Ash, P.A.; Liu, J.; Coutard, N.; Heidary, N.; Horch, M.; Gudim, I.; Simler, T.; Zebger, I.; Lenz, O.; Vincent, K.A. Electrochemical and Infrared Spectroscopic Studies Provide Insight into Reactions of the NiFe Regulatory Hydrogenase from *Ralstonia eutropha* with O₂ and CO. *J. Phys. Chem. B* **2015**, *119*, 13807–13815. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Thorum, M.S.; Anderson, C.A.; Hatch, J.J.; Campbell, A.S.; Marshall, N.M.; Zimmerman, S.C.; Lu, Y.; Gewirth, A.A. Direct, Electrocatalytic Oxygen Reduction by Laccase on Anthracene-2-methanethiol-Modified Gold. *J. Phys. Chem. Lett.* **2010**, *1*, 2251–2254. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Feng, G.; Niu, T.; You, X.; Wan, Z.; Kong, Q.; Bi, S. Studies on the effect of electrode pretreatment on the coverage of self-assembled monolayers of dodecanethiol on gold by electrochemical reductive desorption determination. *Analyst* **2011**, *136*, 5058–5063. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Pankratov, D.; Sotres, J.; Barrantes, A.; Arnebrant, T.; Shleev, S. Interfacial behavior and activity of laccase and bilirubin oxidase on bare gold surfaces. *Langmuir* **2014**, *30*, 2943–2951. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Trasatti, S.; Petrii, O. Real surface area measurements in electrochemistry. *Pure Appl. Chem.* **1991**, *63*, 711–734. [[CrossRef](#)]
60. Monsalve, K.; Roger, M.; Gutierrez-Sanchez, C.; Ilbert, M.; Nitsche, S.; Byrne-Kodjabachian, D.; Marchi, V.; Lojou, E. Hydrogen bioelectrooxidation on gold nanoparticle-based electrodes modified by *Aquifex aeolicus* hydrogenase: Application to hydrogen/oxygen enzymatic biofuel cells. *Bioelectrochemistry* **2015**, *106*, 47–55. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
61. Sezer, M.; Millo, D.; Weidinger, I.M.; Zebger, I.; Hildebrandt, P. Analyzing the catalytic processes of immobilized redox enzymes by vibrational spectroscopies. *IUBMB Life* **2012**, *64*, 455–464. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Buividas, R.; Fahim, N.; Juodkazytė, J.; Juodkazis, S. Novel method to determine the actual surface area of a laser-nanotextured sensor. *Appl. Phys. A* **2014**, *114*, 169–175. [[CrossRef](#)]
63. Fang, S.-U.; Hsu, C.-L.; Hsu, T.-C.; Juang, M.-Y.; Liu, Y.-C. Surface roughness-correlated SERS effect on Au island-deposited substrate. *J. Electroanal. Chem.* **2015**, *741*, 127–133. [[CrossRef](#)]
64. Mendelsohn, R.; Mao, G.; Flach, C.R. Infrared Reflection-Absorption Spectroscopy: Principles and Applications to Lipid-Protein Interaction in Langmuir Films. *Biochim. Biophys. Acta* **2010**, *1798*, 788–800. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Dongmo, S.; Wittstock, G.; Christoffers, J.; Brand, I. In situ determination of potential-driven structural changes in a redox-active plumbagin polymer film on a glassy carbon electrode using PM IRRAS under electrochemical control. *Electrochim. Acta* **2017**, *255*, 298–308. [[CrossRef](#)]
66. Heinz, H.; Vaia, R.; Farmer, B.; Naik, R. Accurate simulation of surfaces and interfaces of face-centered cubic metals using 12–6 and 9–6 Lennard-Jones potentials. *J. Phys. Chem. C* **2008**, *112*, 17281–17290. [[CrossRef](#)]
67. Iori, F.; Di Felice, R.; Molinari, E.; Corni, S. GoLP: An atomistic force-field to describe the interaction of proteins with Au (111) surfaces in water. *J. Comput. Chem.* **2009**, *30*, 1465–1476. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. Heinz, H.; Lin, T.-J.; Kishore Mishra, R.; Emami, F.S. Thermodynamically consistent force fields for the assembly of inorganic, organic, and biological nanostructures: The INTERFACE force field. *Langmuir* **2013**, *29*, 1754–1765. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
69. Kubiak-Ossowska, K.; Jachimska, B.; Mulheran, P.A. How Negatively Charged Proteins Adsorb to Negatively Charged Surfaces: A Molecular Dynamics Study of BSA Adsorption on Silica. *J. Phys. Chem. B* **2016**, *120*, 10463–10468. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
70. Mücksch, C.; Urbassek, H.M. Molecular dynamics simulation of free and forced BSA adsorption on a hydrophobic graphite surface. *Langmuir* **2011**, *27*, 12938–12943. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
71. Trohalaki, S.; Pachter, R.; Luckarift, H.; Johnson, G. Immobilization of the Laccases from *Trametes versicolor* and *Streptomyces coelicolor* on Single-wall Carbon Nanotube Electrodes: A Molecular Dynamics Study. *Fuel Cells* **2012**, *12*, 656–664. [[CrossRef](#)]
72. Heinz, H.; Jha, K.C.; Luettmer-Strathmann, J.; Farmer, B.L.; Naik, R.R. Polarization at metal–biomolecular interfaces in solution. *J. R. Soc. Interface* **2011**, *8*, 220–232. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Wright, L.B.; Rodger, P.M.; Corni, S.; Walsh, T.R. GoLP-CHARMM: First-principles based force fields for the interaction of proteins with Au (111) and Au (100). *J. Chem. Theory Comput.* **2013**, *9*, 1616–1630. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Shi, Y.; Xia, Z.; Zhang, J.; Best, R.; Wu, C.; Ponder, J.W.; Ren, P. Polarizable atomic multipole-based AMOEBA force field for proteins. *J. Chem. Theory Comput.* **2013**, *9*, 4046–4063. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

75. Akdim, B.; Pachter, R.; Kim, S.S.; Naik, R.R.; Walsh, T.R.; Trohalaki, S.; Hong, G.; Kuang, Z.; Farmer, B.L. Electronic properties of a graphene device with peptide adsorption: Insight from simulation. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2013**, *5*, 7470–7477. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Datta, S.; Christena, L.R.; Rajaram, Y.R.S. Enzyme immobilization: An overview on techniques and support materials. *3 Biotech* **2013**, *3*, 1–9. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Mohamad, N.R.; Marzuki, N.H.C.; Buang, N.A.; Huyop, F.; Wahab, R.A. An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* **2015**, *29*, 205–220. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
78. Arya, S.K.; Prusty, A.K.; Singh, S.; Solanki, P.R.; Pandey, M.K.; Datta, M.; Malhotra, B.D. Cholesterol biosensor based on *N*-(2-aminoethyl)-3-aminopropyl-trimethoxysilane self-assembled monolayer. *Anal. Biochem.* **2007**, *363*, 210–218. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
79. Ulman, A. Formation and structure of self-assembled monolayers. *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 1533–1554. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
80. Jin, B.; Wang, G.-X.; Millo, D.; Hildebrandt, P.; Xia, X.-H. Electric-field control of the pH-dependent redox process of cytochrome *c* immobilized on a gold electrode. *J. Phys. Chem. C* **2012**, *116*, 13038–13044. [[CrossRef](#)]
81. Bryant, M.A.; Crooks, R.M. Determination of surface pK_a values of surface-confined molecules derivatized with pH-sensitive pendant groups. *Langmuir* **1993**, *9*, 385–387. [[CrossRef](#)]
82. Marmisollé, W.A.; Capdevila, D.A.; de la Llave, E.; Williams, F.J.; Murgida, D.H. Self-Assembled Monolayers of NH₂-Terminated Thiolates: Order, pK_a, and Specific Adsorption. *Langmuir* **2013**, *29*, 5351–5359. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Gooding, J.J.; Ciampi, S. The molecular level modification of surfaces: From self-assembled monolayers to complex molecular assemblies. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 2704–2718. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Dubois, L.H.; Nuzzo, R.G. Synthesis, structure, and properties of model organic surfaces. *Ann. Rev. Phys. Chem.* **1992**, *43*, 437–463. [[CrossRef](#)]
85. Love, J.C.; Estroff, L.A.; Kriebel, J.K.; Nuzzo, R.G.; Whitesides, G.M. Self-assembled monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology. *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 1103–1170. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
86. Schwartz, D.K. Mechanisms and kinetics of self-assembled monolayer formation. *Ann. Rev. Phys. Chem.* **2001**, *52*, 107–137. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
87. Porter, M.D.; Bright, T.B.; Allara, D.L.; Chidsey, C.E. Spontaneously organized molecular assemblies. 4. Structural characterization of *n*-alkyl thiol monolayers on gold by optical ellipsometry, infrared spectroscopy, and electrochemistry. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 3559–3568. [[CrossRef](#)]
88. Jambrec, D.; Conzuelo, F.; Estrada-Vargas, A.; Schuhmann, W. Potential-Pulse-Assisted Formation of Thiol Monolayers within Minutes for Fast and Controlled Electrode Surface Modification. *ChemElectroChem* **2016**, *3*, 1484–1489. [[CrossRef](#)]
89. Samanta, D.; Sarkar, A. Immobilization of bio-macromolecules on self-assembled monolayers: Methods and sensor applications. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 2567–2592. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
90. Mondal, P.C.; Fontanesi, C. Electrochemistry of Metalloproteins Attached through Functional Self-Assembled Monolayers on Gold and Ferromagnetic Electrodes. *ChemPhysChem* **2018**, *19*, 60–66. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
91. Aydın, E.B.; Sezginçtürk, M.K. Indium Tin Oxide (ITO): A promising material in biosensing technology. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2017**, *97*, 309–315. [[CrossRef](#)]
92. Vashist, S.K.; Lam, E.; Hrapovic, S.; Male, K.B.; Luong, J.H. Immobilization of antibodies and enzymes on 3-aminopropyltriethoxysilane-functionalized bioanalytical platforms for biosensors and diagnostics. *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 11083–11130. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
93. Yoshioka, K.; Kato, D.; Kamata, T.; Niwa, O. Cytochrome P450 modified polycrystalline indium tin oxide film as a drug metabolizing electrochemical biosensor with a simple configuration. *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 9996–9999. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
94. Smalley, J.F.; Feldberg, S.W.; Chidsey, C.E.; Linford, M.R.; Newton, M.D.; Liu, Y.-P. The kinetics of electron transfer through ferrocene-terminated alkanethiol monolayers on gold. *J. Phys. Chem.* **1995**, *99*, 13141–13149. [[CrossRef](#)]
95. Xu, J.; Li, H.; Zhang, Y. Relationship between electronic tunneling coefficient and electrode potential investigated by using self-assembled alkanethiol monolayers on gold electrodes. *J. Phys. Chem.* **1993**, *97*, 11497–11500. [[CrossRef](#)]

96. Mokrani, C.; Fattison, J.; Guerente, L.; Labbe, P. Structural characterization of (3-mercaptopropyl)sulfonate monolayer on gold surfaces. *Langmuir* **2005**, *21*, 4400–4409. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
97. Liu, B.; Bard, A.J.; Mirkin, M.V.; Creager, S.E. Electron transfer at self-assembled monolayers measured by scanning electrochemical microscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 1485–1492. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
98. Chi, Q.J.; Zhang, J.D.; Andersen, J.E.T.; Ulstrup, J. Ordered assembly and controlled electron transfer of the blue copper protein azurin at gold (111) single-crystal substrates. *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105*, 4669–4679. [[CrossRef](#)]
99. Beulen, M.W.; Kastenbergh, M.I.; van Veggel, F.C.; Reinhoudt, D.N. Electrochemical stability of self-assembled monolayers on gold. *Langmuir* **1998**, *14*, 7463–7467. [[CrossRef](#)]
100. Ovchinnikova, S.; Medvedev, A.Z. Desorption of octanethiol from gold electrode surface during its electrochemical cleaning. *Russ. J. Electrochem.* **2015**, *51*, 287–293. [[CrossRef](#)]
101. Stettner, J.; Winkler, A. Characterization of alkanethiol self-assembled monolayers on gold by thermal desorption spectroscopy. *Langmuir* **2010**, *26*, 9659–9665. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
102. Rzeźnicka, I.I.; Lee, J.; Maksymovych, P.; Yates, J.T. Nondissociative chemisorption of short chain alkanethiols on Au (111). *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 15992–15996. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
103. Ossowski, J.; Nascimbeni, G.; Żaba, T.; Verwüster, E.; Rysz, J.; Terfort, A.; Zharnikov, M.; Zojer, E.; Cyganik, P. Relative Thermal Stability of Thiolate- and Selenolate-Bonded Aromatic Monolayers on the Au (111) Substrate. *J. Phys. Chem. C* **2017**, *121*, 28031–28042. [[CrossRef](#)]
104. Wang, Y.; Solano Canchaya, J.G.; Dong, W.; Alcamí, M.; Busnengo, H.F.; Martin, F. Chain-Length and Temperature Dependence of Self-Assembled Monolayers of Alkylthiolates on Au (111) and Ag (111) Surfaces. *J. Phys. Chem. A* **2014**, *118*, 4138–4146. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
105. Guo, L.; Ma, L.; Zhang, Y.; Cheng, X.; Xu, Y.; Wang, J.; Wang, E.; Peng, Z. Spectroscopic Identification of the Au–C Bond Formation upon Electroreduction of an Aryl Diazonium Salt on Gold. *Langmuir* **2016**, *32*, 11514–11519. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
106. Vacca, A.; Mascia, M.; Rizzardini, S.; Palmas, S.; Mais, L. Coating of gold substrates with polyaniline through electrografting of aryl diazonium salts. *Electrochim. Acta* **2014**, *126*, 81–89. [[CrossRef](#)]
107. Olejnik, P.; Palys, B.; Kowalczyk, A.; Nowicka, A.M. Orientation of laccase on charged surfaces. Mediatorless oxygen reduction on amino- and carboxyl-ended ethylphenyl groups. *J. Phys. Chem. C* **2012**, *116*, 25911–25918. [[CrossRef](#)]
108. Hetemi, D.; Pinson, J. Surface functionalisation of polymers. *Chem. Soc. Rev.* **2017**, *46*, 5701–5713. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
109. Santos, L.; Ghilane, J.; Lacroix, J.C. Formation of mixed organic layers by stepwise electrochemical reduction of diazonium compounds. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 5476–5479. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
110. Santos, L.; Mattiuzzi, A.; Jabin, I.; Vandecasteele, N.; Reniers, F.O.; Reinaud, O.; Hapiot, P.; Lhenry, S.B.; Leroux, Y.; Lagrost, C. One-Pot Electrografting of Mixed Monolayers with Controlled Composition. *J. Phys. Chem. C* **2014**, *118*, 15919–15928. [[CrossRef](#)]
111. Leroux, Y.R.; Hapiot, P. Nanostructured monolayers on carbon substrates prepared by electrografting of protected aryl diazonium salts. *Chem. Mater.* **2013**, *25*, 489–495. [[CrossRef](#)]
112. Zhang, X.; Rösicke, F.; Syritski, V.; Sun, G.; Reut, J.; Hinrichs, K.; Janietz, S.; Rappich, J. Influence of the para-substituent of benzene diazonium salts and the solvent on the film growth during electrochemical reduction. *Z. Phys. Chem.* **2014**, *228*, 557–573. [[CrossRef](#)]
113. Bouden, S.; Pinson, J.; Vautrin-UI, C. Electrografting of diazonium salts: A kinetics study. *Electrochem. Commun.* **2017**, *81*, 120–123. [[CrossRef](#)]
114. Pita, M.; Gutierrez-Sanchez, C.; Olea, D.; Velez, M.; Garcia-Diego, C.; Shleev, S.; Fernandez, V.M.; De Lacey, A.L. High Redox Potential Cathode Based on Laccase Covalently Attached to Gold Electrode. *J. Phys. Chem. C* **2011**, *115*, 13420–13428. [[CrossRef](#)]
115. Alam, M.T.; Gooding, J.J. Modification of carbon electrode surfaces. In *Electrochemistry of Carbon Electrodes*; Wiley: Hoboken, NJ, USA, 2016; Volume 16.
116. Cracknell, J.A.; McNamara, T.P.; Lowe, E.D.; Blandford, C.F. Bilirubin oxidase from *Myrothecium verrucaria*: X-ray determination of the complete crystal structure and a rational surface modification for enhanced electrocatalytic O₂ reduction. *Dalton Trans.* **2011**, *40*, 6668–6675. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

117. Wiebalck, S.; Kozuch, J.; Forbrig, E.; Tzschucke, C.C.; Jeuken, L.J.C.; Hildebrandt, P. Monitoring the Transmembrane Proton Gradient Generated by Cytochrome *bo*₃ in Tethered Bilayer Lipid Membranes Using SEIRA Spectroscopy. *J. Phys. Chem. B* **2016**, *120*, 2249–2256. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
118. Wu, J.C.Y.; Hutchings, C.H.; Lindsay, M.J.; Werner, C.J.; Bundy, B.C. Enhanced enzyme stability through site-directed covalent immobilization. *J. Biotechnol.* **2015**, *193*, 83–90. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
119. Rueda, N.; dos Santos, J.; Ortiz, C.; Torres, R.; Barbosa, O.; Rodrigues, R.C.; Berenguer-Murcia, Á.; Fernandez-Lafuente, R. Chemical modification in the design of immobilized enzyme biocatalysts: Drawbacks and opportunities. *Chem. Rec.* **2016**, *16*, 1436–1455. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
120. Hibino, Y.; Kawai, S.; Kitazumi, Y.; Shirai, O.; Kano, K. Mutation of heme *c* axial ligands in D-fructose dehydrogenase for investigation of electron transfer pathways and reduction of overpotential in direct electron transfer-type bioelectrocatalysis. *Electrochem. Commun.* **2016**, *67*, 43–46. [[CrossRef](#)]
121. Balland, V.; Hureau, C.; Cusano, A.M.; Liu, Y.; Tron, T.; Limoges, B. Oriented Immobilization of a Fully Active Monolayer of Histidine-Tagged Recombinant Laccase on Modified Gold Electrodes. *Chemistry* **2008**, *14*, 7186–7192. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
122. Tsujimura, S.; Asahi, M.; Goda-Tsutsumi, M.; Shirai, O.; Kano, K.; Miyazaki, K. Direct electron transfer to a metagenome-derived laccase fused to affinity tags near the electroactive copper site. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, *15*, 20585–20589. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
123. Li, Y.; Zhang, J.; Huang, X.; Wang, T. Construction and direct electrochemistry of orientation controlled laccase electrode. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2014**, *446*, 201–205. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
124. Care, A.; Bergquist, P.L.; Sunna, A. Solid-binding peptides: Smart tools for nanobiotechnology. *Trends Biotechnol.* **2015**, *33*, 259–268. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
125. Shiba, K. Natural and artificial peptide motifs: Their origins and the application of motif-programming. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 117–126. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
126. Cui, Y.; Kim, S.N.; Jones, S.E.; Wissler, L.L.; Naik, R.R.; McAlpine, M.C. Chemical Functionalization of Graphene Enabled by Phage Displayed Peptides. *Nano Lett.* **2010**, *10*, 4559–4565. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
127. Nguyen, P.Q.; Botyanszki, Z.; Tay, P.K.R.; Joshi, N.S. Programmable biofilm-based materials from engineered curli nanofibres. *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 4945. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
128. Hnilova, M.; Oren, E.E.; Seker, U.O.S.; Wilson, B.R.; Collino, S.; Evans, J.S.; Tamerler, C.; Sarikaya, M. Effect of Molecular Conformations on the Adsorption Behavior of Gold-Binding Peptides. *Langmuir* **2008**, *24*, 12440–12445. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
129. Khatayevich, D.; Gungormus, M.; Yazici, H.; So, C.; Cetinel, S.; Ma, H.; Jen, A.; Tamerler, C.; Sarikaya, M. Biofunctionalization of materials for implants using engineered peptides. *Acta Biomater.* **2010**, *6*, 4634–4641. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
130. Al-Lolage, F.A.; Meneghello, M.; Ma, S.; Ludwig, R.; Bartlett, P.N. A flexible method for the stable, covalent immobilization of enzymes at electrode surfaces. *ChemElectroChem* **2017**, *4*, 1528–1534. [[CrossRef](#)]
131. Lalaoui, N.M.; Rousselot-Pailley, P.; Robert, V.; Mekmouche, Y.; Villalonga, R.; Holzinger, M.; Cosnier, S.; Tron, T.; Le Goff, A. Direct electron transfer between a site-specific pyrene-modified laccase and carbon nanotube/gold nanoparticle supramolecular assemblies for bioelectrocatalytic dioxygen reduction. *ACS Catal.* **2016**, *6*, 1894–1900. [[CrossRef](#)]
132. Gao, X.; Ni, K.; Zhao, C.; Ren, Y.; Wei, D. Enhancement of the activity of enzyme immobilized on polydopamine-coated iron oxide nanoparticles by rational orientation of formate dehydrogenase. *J. Biotechnol.* **2014**, *188*, 36–41. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
133. Guan, D.; Kurra, Y.; Liu, W.; Chen, Z. A click chemistry approach to site-specific immobilization of a small laccase enables efficient direct electron transfer in a biocathode. *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 2522–2525. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
134. Schlesinger, O.; Pasi, M.; Dandela, R.; Meijler, M.M.; Alfonta, L. Electron transfer rate analysis of a site-specifically wired copper oxidase. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2018**, *20*, 6159–6166. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
135. Johnson, D.L.; Martin, L.L. Controlling protein orientation at interfaces using histidine tags: An alternative to Ni/NTA. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 2018–2019. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
136. Milton, R.D.; Minter, S.D. Direct enzymatic bioelectrocatalysis: Differentiating between myth and reality. *J. R. Soc. Interface* **2017**, *14*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
137. Marcus, R.A. Electron transfer reactions in chemistry. Theory and experiment. *Rev. Mod. Phys.* **1993**, *65*, 599. [[CrossRef](#)]

138. Lojou, E.; Cutruzzola, F.; Tegoni, M.; Bianco, P. Electrochemical study of the intermolecular electron transfer to *Pseudomonas aeruginosa* cytochrome cd₁ nitrite reductase. *Electrochim. Acta* **2003**, *48*, 1055–1064. [[CrossRef](#)]
139. Dos Santos, M.M.C.; de Sousa, P.M.P.; Goncalves, M.L.S.; Krippahl, L.; Moura, J.J.G.; Lojou, E.; Bianco, P. Electrochemical studies on small electron transfer proteins using membrane electrodes. *J. Electroanal. Chem.* **2003**, *541*, 153–162. [[CrossRef](#)]
140. Pedroso, H.A.; Silveira, C.M.; Almeida, R.M.; Almeida, A.; Besson, S.; Moura, I.; Moura, J.J.G.; Almeida, M.G. Electron transfer and docking between cytochrome cd₁ nitrite reductase and different redox partners—A comparative study. *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* **2016**, *1857*, 1412–1421. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
141. Dagys, M.; Laurynėnas, A.; Ratautas, D.; Kulys, J.; Vidžiūnaitė, R.; Talaikis, M.; Niaura, G.; Marcinkevičienė, L.; Meškys, R.; Shleev, S. Oxygen electroreduction catalysed by laccase wired to gold nanoparticles via the trinuclear copper cluster. *Energy Environ. Sci.* **2017**, *10*, 498–502. [[CrossRef](#)]
142. Ciaccafava, A.; Infossi, P.; Ilbert, M.; Guiral, M.; Lecomte, S.; Giudici-Orticoni, M.T.; Lojou, E. Electrochemistry, AFM, and PM-IRRA Spectroscopy of Immobilized Hydrogenase: Role of a Hydrophobic Helix in Enzyme Orientation for Efficient H₂ Oxidation. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 953–956. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
143. Rudiger, O.; Gutierrez-Sanchez, C.; Olea, D.; Pereira, I.A.C.; Velez, M.; Fernandez, V.M.; De Lacey, A.L. Enzymatic Anodes for Hydrogen Fuel Cells based on Covalent Attachment of Ni-Fe Hydrogenases and Direct Electron Transfer to SAM-Modified Gold Electrodes. *Electroanalysis* **2010**, *22*, 776–783. [[CrossRef](#)]
144. Vaz-Dominguez, C.; Pita, M.; de Lacey, A.L.; Shleev, S.; Cuesta, A. Combined ATR-SEIRAS and EC-STM Study of the Immobilization of Laccase on Chemically Modified Au Electrodes. *J. Phys. Chem. C* **2012**, *116*, 16532–16540. [[CrossRef](#)]
145. Gutierrez-Sanchez, C.; Ciaccafava, A.; Blanchard, P.Y.; Monsalve, K.; Giudici-Orticoni, M.T.; Lecomte, S.; Lojou, E. Efficiency of Enzymatic O₂ Reduction by *Myrothecium verrucaria* Bilirubin Oxidase Probed by Surface Plasmon Resonance, PMIRRAS, and Electrochemistry. *ACS Catal.* **2016**, *6*, 5482–5492. [[CrossRef](#)]
146. McArdle, T.; McNamara, T.P.; Fei, F.; Singh, K.; Blanford, C.F. Optimizing the Mass-Specific Activity of Bilirubin Oxidase Adlayers through Combined Electrochemical Quartz Crystal Microbalance and Dual Polarization Interferometry Analyses. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2015**, *7*, 25270–25280. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
147. Osawa, M.; Ataka, K.-I.; Yoshii, K.; Nishikawa, Y. Surface-Enhanced Infrared Spectroscopy: The Origin of the Absorption Enhancement and Band Selection Rule in the Infrared Spectra of Molecules Adsorbed on Fine Metal Particles. *Appl. Spectrosc.* **1993**, *47*, 1497–1502. [[CrossRef](#)]
148. Jiang, X.; Zaitseva, E.; Schmidt, M.; Siebert, F.; Engelhard, M.; Schlesinger, R.; Ataka, K.; Vogel, R.; Heberle, J. Resolving voltage-dependent structural changes of a membrane photoreceptor by surface-enhanced IR difference spectroscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 12113–12117. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
149. Heidary, N.; Utesch, T.; Zerball, M.; Horch, M.; Millo, D.; Fritsch, J.; Lenz, O.; von Klitzing, R.; Hildebrandt, P.; Fischer, A.; et al. Orientation-controlled electrocatalytic efficiency of an adsorbed oxygen-tolerant hydrogenase. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0143101. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
150. Gutiérrez-Sanz, O.; Marques, M.; Pereira, I.A.C.; De Lacey, A.L.; Lubitz, W.; Rüdiger, O. Orientation and Function of a Membrane-Bound Enzyme Monitored by Electrochemical Surface-Enhanced Infrared Absorption Spectroscopy. *J. Phys. Chem. Lett.* **2013**, *4*, 2794–2798. [[CrossRef](#)]
151. Olejnik, P.; Pawłowska, A.; Pałys, B. Application of Polarization Modulated Infrared Reflection Absorption Spectroscopy for electrocatalytic activity studies of laccase adsorbed on modified gold electrodes. *Electrochim. Acta* **2013**, *110*, 105–111. [[CrossRef](#)]
152. Bergkvist, M.; Carlsson, J.; Oscarsson, S. A method for studying protein orientation with atomic force microscopy using relative protein volumes. *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105*, 2062–2069. [[CrossRef](#)]
153. Traunsteiner, C.; Sek, S.; Huber, V.; Valero-Vidal, C.; Kunze-Liebhaeuser, J. Laccase immobilized on a mixed thiol monolayer on Au (111)—Structure-dependent activity towards oxygen reduction. *Electrochim. Acta* **2016**, *213*, 761–770. [[CrossRef](#)]
154. Gwyer, J.D.; Zhang, J.; Butt, J.N.; Ulstrup, J. Voltammetry and in situ scanning tunneling microscopy of cytochrome *c* nitrite reductase on Au (111) electrodes. *Biophys. J.* **2006**, *91*, 3897–3906. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
155. Kartashov, A.V.; Serafini, G.; Dong, M.; Shipovskov, S.; Gazaryan, I.; Besenbacher, F.; Ferapontova, E.E. Long-range electron transfer in recombinant peroxidases anisotropically orientated on gold electrodes. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, *12*, 10098–10107. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

156. Gutierrez-Sanchez, C.; Olea, D.; Marques, M.; Fernandez, V.M.; Pereira, I.A.C.; Velez, M.; De Lacey, A.L. Oriented Immobilization of a Membrane-Bound Hydrogenase onto an Electrode for Direct Electron Transfer. *Langmuir* **2011**, *27*, 6449–6457. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
157. Gutierrez-Sanz, O.; Natale, P.; Marquez, I.; Marques, M.C.; Zacarias, S.; Pita, M.; Pereira, I.A.C.; Lopez-Montero, I.; De Lacey, A.L.; Velez, M. H₂-Fueled ATP Synthesis on an Electrode: Mimicking Cellular Respiration. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 6216–6220. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
158. Gutierrez-Sanz, O.; Olea, D.; Pita, M.; Batista, A.P.; Alonso, A.; Pereira, M.M.; Velez, M.; De Lacey, A.L. Reconstitution of Respiratory Complex I on a Biomimetic Membrane Supported on Gold Electrodes. *Langmuir* **2014**, *30*, 9007–9015. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
159. Matanovic, I.; Babanova, S.; Chavez, M.S.; Atanassov, P. Protein–Support Interactions for Rationally Designed Bilirubin Oxidase Based Cathode: A Computational Study. *J. Phys. Chem. B* **2016**, *120*, 3634–3641. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
160. Ngai, J.C.; Mak, P.-I.; Siu, S.W. ProtPOS: A python package for the prediction of protein preferred orientation on a surface. *Bioinformatics* **2016**, *32*, 2537–2538. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
161. Liu, J.; Yu, G.; Zhou, J. Ribonuclease A adsorption onto charged self-assembled monolayers: A multiscale simulation study. *Chem. Eng. Sci.* **2015**, *121*, 331–339. [[CrossRef](#)]
162. Kutzner, C.; Pall, S.; Fechner, M.; Esztermann, A.; de Groot, B.L.; Grubmuller, H. Best bang for your buck: GPU nodes for GROMACS biomolecular simulations. *J. Comput. Chem.* **2015**, *36*, 1990–2008. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
163. Salomon-Ferrer, R.; Case, D.A.; Walker, R.C. An overview of the Amber biomolecular simulation package. *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Mol. Sci.* **2013**, *3*, 198–210. [[CrossRef](#)]
164. Ponder, J.W.; Case, D.A. Force fields for protein simulations. *Adv. Protein Chem.* **2003**, *66*, 27–85. [[PubMed](#)]
165. Makrodimitris, K.; Masica, D.L.; Kim, E.T.; Gray, J.J. Structure prediction of protein–solid surface interactions reveals a molecular recognition motif of statherin for hydroxyapatite. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 13713–13722. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
166. Xie, Y.; Zhou, J.; Jiang, S. Parallel tempering Monte Carlo simulations of lysozyme orientation on charged surfaces. *J. Chem. Phys.* **2010**, *132*, 02B602. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
167. Brancolini, G.; Kokh, D.B.; Calzolari, L.; Wade, R.C.; Corni, S. Docking of ubiquitin to gold nanoparticles. *ACS Nano* **2012**, *6*, 9863–9878. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
168. Zheng, J.; Li, L.; Chen, S.; Jiang, S. Molecular simulation study of water interactions with oligo (ethylene glycol)-terminated alkanethiol self-assembled monolayers. *Langmuir* **2004**, *20*, 8931–8938. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
169. Li, Y.; Ogorzalek, T.L.; Wei, S.; Zhang, X.; Yang, P.; Jasensky, J.; Brooks, C.L.; Marsh, E.N.G.; Chen, Z. Effect of immobilization site on the orientation and activity of surface-tethered enzymes. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2018**, *20*, 1021–1029. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
170. Cazelles, R.; Lalaoui, N.; Hartmann, T.; Leimkühler, S.; Wollenberger, U.; Antonietti, M.; Cosnier, S. Ready to use bioinformatics analysis as a tool to predict immobilisation strategies for protein direct electron transfer (DET). *Biosens. Bioelectron.* **2016**, *85*, 90–95. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
171. Utesch, T.; Millo, D.; Castro, M.A.; Hildebrandt, P.; Zebger, I.; Mrogiński, M.A. Effect of the protonation degree of a self-assembled monolayer on the immobilization dynamics of a [NiFe] hydrogenase. *Langmuir* **2013**, *29*, 673–682. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
172. Oteri, F.; Ciaccafava, A.; De Poulpiquet, A.; Baaden, M.; Lojou, E.; Sacquin-Mora, S. The weak, fluctuating, dipole moment of membrane-bound hydrogenase from *Aquifex aeolicus* accounts for its adaptability to charged electrodes. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2014**, *16*, 11318–11322. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
173. Liu, J.; Xie, Y.; Peng, C.; Yu, G.; Zhou, J. Molecular Understanding of Laccase Adsorption on Charged Self-Assembled Monolayers. *J. Phys. Chem. B* **2017**, *121*, 10610–10617. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
174. Peng, L.; Utesch, T.; Yarman, A.; Jeoung, J.H.; Steinborn, S.; Dobbek, H.; Mrogiński, M.A.; Tanne, J.; Wollenberger, U.; Scheller, F.W. Surface-Tuned Electron Transfer and Electrocatalysis of Hexameric Tyrosine-Coordinated Heme Protein. *Chemistry* **2015**, *21*, 7596–7602. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
175. Utesch, T.; Sezer, M.; Weidinger, I.M.; Mrogiński, M.A. Adsorption of sulfite oxidase on self-assembled monolayers from molecular dynamics simulations. *Langmuir* **2012**, *28*, 5761–5769. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

176. Climent, V.; Zhang, J.; Friis, E.P.; Østergaard, L.H.; Ulstrup, J. Voltammetry and single-molecule in situ scanning tunneling microscopy of laccases and bilirubin oxidase in electrocatalytic dioxygen reduction on Au (111) single-crystal electrodes. *J. Phys. Chem. C* **2011**, *116*, 1232–1243. [[CrossRef](#)]
177. Madden, C.; Vaughn, M.D.; Díez-Pérez, I.; Brown, K.A.; King, P.W.; Gust, D.; Moore, A.L.; Moore, T.A. Catalytic turnover of [FeFe]-hydrogenase based on single-molecule imaging. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *134*, 1577–1582. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
178. Xia, N.; Xing, Y.; Wang, G.; Feng, Q.; Chen, Q.; Feng, H.; Sun, X.; Liu, L. Probing of EDC/NHSS-mediated covalent coupling reaction by the immobilization of electrochemically active biomolecules. *Int. J. Electrochem. Sci.* **2013**, *8*, 2459–2467.
179. Palazon, F.; Montenegro Benavides, C.; Léonard, D.; Souteyrand, E.I.; Chevolot, Y.; Cloarec, J.-P. Carbodiimide/NHS derivatization of COOH-terminated SAMs: Activation or byproduct formation? *Langmuir* **2014**, *30*, 4545–4550. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
180. Ran, Q.; Peng, R.; Liang, C.; Ye, S.; Xian, Y.; Zhang, W.; Jin, L. Covalent immobilization of horseradish peroxidase via click chemistry and its direct electrochemistry. *Talanta* **2011**, *83*, 1381–1385. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
181. Singh, K.; McArdle, T.; Sullivan, P.R.; Blanford, C.F. Sources of activity loss in the fuel cell enzyme bilirubin oxidase. *Energy Environ. Sci.* **2013**, *6*, 2460–2464. [[CrossRef](#)]
182. Zanetti-Polzi, L.; Daidone, I.; Bortolotti, C.A.; Corni, S. Surface packing determines the redox potential shift of cytochrome *c* adsorbed on gold. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 12929–12937. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
183. Krzemiński, Ł.; Cronin, S.; Ndamba, L.; Canters, G.W.; Aartsma, T.J.; Evans, S.D.; Jeuken, L.J.C. Orientational Control over Nitrite Reductase on Modified Gold Electrode and Its Effects on the Interfacial Electron Transfer. *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115*, 12607–12614. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
184. Kakiuchi, T.; Iida, M.; Gon, N.; Hobara, D.; Imabayashi, S.-I.; Niki, K. Miscibility of adsorbed 1-undecanethiol and 11-mercaptopundecanoic acid species in binary self-assembled monolayers on Au (111). *Langmuir* **2001**, *17*, 1599–1603. [[CrossRef](#)]
185. Smith, R.K.; Reed, S.M.; Lewis, P.A.; Monnell, J.D.; Clegg, R.S.; Kelly, K.F.; Bumm, L.A.; Hutchison, J.E.; Weiss, P.S. Phase separation within a binary self-assembled monolayer on Au {111} driven by an amide-containing alkanethiol. *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105*, 1119–1122. [[CrossRef](#)]
186. Benavidez, T.E.; Torrente, D.; Marucho, M.; Garcia, C.D. Adsorption of Soft and Hard Proteins onto OTCEs under the Influence of an External Electric Field. *Langmuir* **2015**, *31*, 2455–2462. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
187. Sugimoto, Y.; Kitazumi, Y.; Tsujimura, S.; Shirai, O.; Yamamoto, M.; Kano, K. Electrostatic interaction between an enzyme and electrodes in the electric double layer examined in a view of direct electron transfer-type bioelectrocatalysis. *Biosens. Bioelectron.* **2015**, *63*, 138–144. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
188. Sugimoto, Y.; Kitazumi, Y.; Shirai, O.; Yamamoto, M.; Kano, K. Role of 2-mercaptoethanol in direct electron transfer-type bioelectrocatalysis of fructose dehydrogenase at Au electrodes. *Electrochim. Acta* **2015**, *170*, 242–247. [[CrossRef](#)]
189. Lopez, F.; Siepenkoetter, T.; Xiao, X.; Magner, E.; Schuhmann, W.; Salaj-Kosla, U. Potential pulse-assisted immobilization of *Myrothecium verrucaria* bilirubin oxidase at planar and nanoporous gold electrodes. *J. Electroanal. Chem.* **2018**, *812*, 194–198. [[CrossRef](#)]
190. Millo, D.; Ranieri, A.; Gross, P.; Ly, H.K.; Borsari, M.; Hildebrandt, P.; Wuite, G.J.L.; Gooijer, C.; van der Zwan, G. Electrochemical Response of Cytochrome *c* Immobilized on Smooth and Roughened Silver and Gold Surfaces Chemically Modified with 11-Mercaptoundecanoic Acid. *J. Phys. Chem. C* **2009**, *113*, 2861–2866. [[CrossRef](#)]
191. Salewski, J.; Batista, A.P.; Sena, F.V.; Millo, D.; Zebger, I.; Pereira, M.M.; Hildebrandt, P. Substrate-Protein Interactions of Type II NADH:Quinone Oxidoreductase from *Escherichia coli*. *Biochemistry* **2016**, *55*, 2722–2734. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
192. Rivas, L.; Soares, C.M.; Baptista, A.M.; Simaan, J.; Di Paolo, R.E.; Murgida, D.H.; Hildebrandt, P. Electric-field-induced redox potential shifts of tetraheme cytochromes *c*₃ immobilized on self-assembled monolayers: Surface-enhanced resonance Raman spectroscopy and simulation studies. *Biophys. J.* **2005**, *88*, 4188–4199. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
193. Petrey, D.; Honig, B. Structural bioinformatics of the interactome. *Annu. Rev. Biophys.* **2014**, *43*, 193–210. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

194. Monsalve, K.; Mazurenko, I.; Gutierrez-Sanchez, C.; Ilbert, M.; Infossi, P.; Frielingsdorf, S.; Giudici-Orticoni, M.T.; Lenz, O.; Lojou, E. Impact of Carbon Nanotube Surface Chemistry on Hydrogen Oxidation by Membrane-Bound Oxygen-Tolerant Hydrogenases. *Chemelectrochem* **2016**, *3*, 2179–2188. [[CrossRef](#)]
195. Salamon, Z.; Fitch, J.; Cai, M.; Tumati, S.; Navratilova, E.; Tollin, G. Plasmon-waveguide resonance studies of ligand binding to integral proteins in membrane fragments derived from bacterial and mammalian cells. *Anal. Biochem.* **2009**, *387*, 95–101. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
196. Bouffier, L.; Doneux, T. Coupling electrochemistry with in situ fluorescence (confocal) microscopy. *Curr. Opin. Electrochem.* **2017**, *6*, 31–37. [[CrossRef](#)]
197. Siepenkoetter, T.; Salaj-Kosla, U.; Xiao, X.X.; Conghaile, P.O.; Pita, M.; Ludwig, R.; Magner, E. Immobilization of Redox Enzymes on Nanoporous Gold Electrodes: Applications in Biofuel Cells. *Chempluschem* **2017**, *82*, 553–560. [[CrossRef](#)]
198. Gutierrez-Sanchez, C.; Pita, M.; Vaz-Dominguez, C.; Shleev, S.; De Lacey, A.L. Gold Nanoparticles as Electronic Bridges for Laccase-Based Biocathodes. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 17212–17220. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
199. Sugimoto, Y.; Kitazumi, Y.; Shirai, O.; Kano, K. Effects of Mesoporous Structures on Direct Electron Transfer-Type Bioelectrocatalysis: Facts and Simulation on a Three-Dimensional Model of Random Orientation of Enzymes. *Electrochemistry* **2017**, *85*, 82–87. [[CrossRef](#)]



© 2018 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Bibliographie

- [1] Guilbert S., Les Protéines Végétales, L'Actualité Chimique (2002), SFC. ISSN 0151 9093
- [2] Fowler, S., Roush, R., Wise, J., & Stronck, D. (2013). Concepts of Biology. OpenStax College, Rice University.
- [3] Yolken, R. H. (1980). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): a practical tool for rapid diagnosis of viruses and other infectious agents. The Yale journal of biology and medicine, 53(1), 85.
- [4] Clark, M. F., Lister, R. M., & Bar-Joseph, M. (1986). ELISA techniques. Methods in enzymology, 118, 742-766.
- [5] Crowther, J. R. (1995). ELISA: theory and practice (Vol. 42). Springer Science & Business Media.
- [6] Crowther, J. R. (2001). The ELISA guidebook (Vol. 149). Springer Science & Business Media.
- [7] Aydin, S. (2015). A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. Peptides, 72, 4-15.
- [8] Liu, W., Liu, L., Kou, G., ... & Xiong, Z. (2020). Evaluation of nucleocapsid and spike protein-based enzyme-linked immunosorbent assays for detecting antibodies against SARS-CoV-2. Journal of clinical microbiology, 58(6).
- [9] Nicol, T., Lefeuvre, C., Serri, O., Pivert, A., ... & Le Guillou-Guillemette, H. (2020). Assessment of SARS-CoV-2 serological tests for the diagnosis of COVID-19 through the evaluation of three immunoassays: Two automated immunoassays (Euroimmun and Abbott) and one rapid lateral flow immunoassay (NG Biotech). Journal of Clinical Virology, 129, 104511.
- [10] Okba, N. M., Müller, M. A., Li, W., Wang, ... & Yazdanpanah, Y. (2020). Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2– specific antibody responses in coronavirus disease patients. Emerging infectious diseases, 26(7), 1478-1488.
- [11] Adams, E. R., Anand, R., Andersson, M. I., Auckland, K., ... & Chinnakannan, S. (2020). Evaluation of antibody testing for SARS-Cov-2 using ELISA and lateral flow immunoassays. MedRxiv.
- [12] Sheldon, R. A., & Pereira, P. C. (2017). Biocatalysis engineering: the big picture. Chemical Society Reviews, 46(10), 2678-2691.
- [13] Daniel, R. M., Dines, M., & Petach, H. H. (1996). The denaturation and degradation of stable enzymes at high temperatures. Biochemical journal, 317(1), 1-11.
- [14] Sabaté Brescó, M., Harris, L. G., Thompson, K., Stanic, B., ... & Moriarty, T. F. (2017). Pathogenic mechanisms and host interactions in Staphylococcus epidermidis device-related infection. Frontiers in microbiology, 8, 1401.
- [15] Vickery, K., Hu, H., Jacombs, A. S., Bradshaw, D. A., & Deva, A. K. (2013). A review of bacterial biofilms and their role in device-associated infection. Healthcare infection, 18(2), 61-66.

- [16] Genzer, J., & Efimenko, K. (2006). Recent developments in superhydrophobic surfaces and their relevance to marine fouling: a review. *Biofouling*, 22(5), 339-360.
- [17] Mazurenko, I., Wang, X., de Poulpiquet, A., & Lojou, E. (2017). H₂/O₂ enzymatic fuel cells: from proof-of-concept to powerful devices. *Sustainable Energy & Fuels*, 1(7), 1475-1501.
- [18] Talha, M., Ma, Y., Kumar, P., Lin, Y., & Singh, A. (2019). Role of protein adsorption in the bio corrosion of metallic implants—A review. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 176, 494-506.
- [19] Burrows, P. M., Scott, S. W., Barnett, O. W., & McLaughlin, M. R. (1984). Use of experimental designs with quantitative ELISA. *Journal of virological methods*, 8(3), 207-216.
- [20] Gouda, M. D., Kumar, M. A., Thakur, M. S., & Karanth, N. G. (2002). Enhancement of operational stability of an enzyme biosensor for glucose and sucrose using protein based stabilizing agents. *Biosensors and bioelectronics*, 17(6-7), 503-507.
- [21] Xie, Q., Zhao, Y., Chen, X., Liu, H., Evans, D. G., & Yang, W. (2011). Nanosheet-based titania microspheres with hollow core-shell structure encapsulating horseradish peroxidase for a mediator-free biosensor. *Biomaterials*, 32(27), 6588-6594.
- [22] Ruan, M., Seydou, M., Noel, V., Piro, B., Maurel, F., & Barbault, F. (2017). Molecular dynamics simulation of a RNA aptasensor. *The Journal of Physical Chemistry B*, 121(16), 4071-4080.
- [23] Sun, X., Liu, Z., Welsher, K., Robinson, J. T., Goodwin, A., Zaric, S., & Dai, H. (2008). Nano-graphene oxide for cellular imaging and drug delivery. *Nano research*, 1(3), 203-212.
- [24] Wang, C., Ravi, S., Garapati, U. S., Das, M., ... & Mohapatra, S. (2013). Multifunctional chitosan magnetic-graphene (CMG) nanoparticles: a theranostic platform for tumor-targeted co-delivery of drugs, genes and MRI contrast agents. *Journal of Materials Chemistry B*, 1(35), 4396-4405.
- [25] Huang, Z. B., Shi, X., Mao, J., & Gong, S. Q. (2016). Design of a hydroxyapatite-binding antimicrobial peptide with improved retention and antibacterial efficacy for oral pathogen control. *Scientific reports*, 6(1), 1-11.
- [26] Zhang, M., Cao, Y., Chong, Y., Ma, Y., ... & Zhang, Z. (2013). Graphene oxide based theranostic platform for T₁-weighted magnetic resonance imaging and drug delivery. *ACS applied materials & interfaces*, 5(24), 13325-13332.
- [27] Luan, B., Huynh, T., Zhao, L., & Zhou, R. (2015). Potential toxicity of graphene to cell functions via disrupting protein-protein interactions. *ACS nano*, 9(1), 663-669.
- [28] Gu, Z., Yang, Z., Wang, L., Zhou, H., Jimenez-Cruz, C. A., & Zhou, R. (2015). The role of basic residues in the adsorption of blood proteins onto the graphene surface. *Scientific reports*, 5(1), 1-11.
- [29] Wei, S., Zou, X., Tian, J., Huang, H., Guo, W., & Chen, Z. (2019). Control of protein conformation and orientation on graphene. *Journal of the American Chemical Society*, 141(51), 20335-20343.

- [30] Liu, Q., Shi, J., Sun, J., Wang, T., Zeng, L., & Jiang, G. (2011). Graphene and graphene oxide sheets supported on silica as versatile and high-performance adsorbents for solid-phase extraction. *Angewandte Chemie*, 123(26), 6035-6039.
- [31] Chen, X., Hai, X., & Wang, J. (2016). Graphene/graphene oxide and their derivatives in the separation/isolation and preconcentration of protein species: A review. *Analytica chimica acta*, 922, 1-10.
- [32] Alava, T., Mann, J. A., Théodore, C., Benitez, J. J., Dichtel, W. R., Parpia, J. M., & Craighead, H. G. (2013). Control of the graphene–protein interface is required to preserve adsorbed protein function. *Analytical chemistry*, 85(5), 2754-2759.
- [33] Mieszawska, A. J., Nadkarni, L. D., Perry, C. C., & Kaplan, D. L. (2010). Nanoscale control of silica particle formation via silk– silica fusion proteins for bone regeneration. *Chemistry of Materials*, 22(20), 5780-5785.
- [34] Tarasevich, Y. I., & Monakhova, L. I. (2002). Interaction between globular proteins and silica surfaces. *Colloid Journal*, 64(4), 482-487.
- [35] Brown, S. (1997). Metal-recognition by repeating polypeptides. *Nature biotechnology*, 15(3), 269-272.
- [36] Kashiwagi, K., Tsuji, T., & Shiba, K. (2009). Directional BMP-2 for functionalization of titanium surfaces. *Biomaterials*, 30(6), 1166-1175.
- [37] Bedford, N. M., Hughes, Z. E., Tang, Z., Li, Y., ... & Walsh, T. R. (2016). Sequence-dependent structure/function relationships of catalytic peptide-enabled gold nanoparticles generated under ambient synthetic conditions. *Journal of the American Chemical Society*, 138(2), 540-548.
- [38] Bedford, N. M., Ramezani-Dakhel, H., Slocik, J. M., Briggs, B. D., ... & Knecht, M. R. (2015). Elucidation of peptide-directed palladium surface structure for biologically tunable nanocatalysts. *ACS nano*, 9(5), 5082-5092.
- [39] Lee, Y. J., Yi, H., Kim, W. J., Kang, K., ... & Belcher, A. M. (2009). Fabricating genetically engineered high-power lithium-ion batteries using multiple virus genes. *Science*, 324(5930), 1051-1055.
- [40] Nam, Y. S., Magyar, A. P., Lee, D., Kim, J. W., ... & Belcher, A. M. (2010). Biologically templated photocatalytic nanostructures for sustained light-driven water oxidation. *Nature nanotechnology*, 5(5), 340-344.
- [41] Soto-Rodríguez, J., Hemmatian, Z., Josberger, E. E., Rolandi, M., & Baneyx, F. (2016). A palladium-binding deltarhodopsin for light-activated conversion of protonic to electronic currents. *Advanced Materials*, 28(31), 6581-6585.
- [42] Wei, Y., Thyparambil, A. A., Wu, Y., & Latour, R. A. (2014). Adsorption-induced changes in ribonuclease A structure and enzymatic activity on solid surfaces. *Langmuir*, 30(49), 14849-14858.
- [43] Liu, J., Yu, G., & Zhou, J. (2015). Ribonuclease A adsorption onto charged self-assembled monolayers: A multiscale simulation study. *Chemical Engineering Science*, 121, 331-339.

- [44] Hitaishi, V. P., Clement, R., Bourassin, N., Baaden, M., De Poulpiquet, A., Sacquin-Mora, S., ... & Lojou, E. (2018). Controlling redox enzyme orientation at planar electrodes. *Catalysts*, 8(5), 192.
- [45] Oteri, F., Ciaccafava, A., De Poulpiquet, A., Baaden, M., Lojou, E., & Sacquin-Mora, S. (2014). The weak, fluctuating, dipole moment of membrane-bound hydrogenase from *Aquifex aeolicus* accounts for its adaptability to charged electrodes. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 16(23), 11318-11322.
- [46] Liu, C., Li, F., Ma, L. P., & Cheng, H. M. (2010). Advanced materials for energy storage. *Advanced materials*, 22(8), E28-E62.
- [47] Larcher, D., & Tarascon, J. M. (2015). Towards greener and more sustainable batteries for electrical energy storage. *Nature chemistry*, 7(1), 19-29.
- [48] Wang, H., Yang, Y., & Guo, L. (2017). Nature-inspired electrochemical energy-storage materials and devices. *Advanced Energy Materials*, 7(5), 1601709.
- [49] Zdarta, J., Meyer, A. S., Jesionowski, T., & Pinelo, M. (2018). Developments in support materials for immobilization of oxidoreductases: A comprehensive review. *Advances in colloid and interface science*, 258, 1-20.
- [50] Morozan, A., Josselme, B., & Palacin, S. (2011). Low-platinum and platinum-free catalysts for the oxygen reduction reaction at fuel cell cathodes. *Energy & Environmental Science*, 4(4), 1238-1254.
- [51] Hou, J., Yang, M., Ke, C., Wei, G., ... & Zhang, J. (2020). Platinum-group-metal catalysts for proton exchange membrane fuel cells: From catalyst design to electrode structure optimization. *EnergyChem*, 2(1), 100023.
- [52] Borup, R. L., Kusoglu, A., Neyerlin, K. C., Mukundan, R., ... & Myers, D. J. (2020). Recent developments in catalyst-related PEM fuel cell durability. *Current Opinion in Electrochemistry*, 21, 192-200.
- [53] Al-Lolage, F. A., Bartlett, P. N., Gounel, S., Staigre, P., & Mano, N. (2019). Site-directed immobilization of bilirubin oxidase for electrocatalytic oxygen reduction. *Acs Catalysis*, 9(3), 2068-2078.
- [54] Darst, D. M. (2013). Portfolio investment opportunities in precious metals. John Wiley & Sons.
- [55] Cracknell, J. A., McNamara, T. P., Lowe, E. D., & Blanford, C. F. (2011). Bilirubin oxidase from *Myrothecium verrucaria*: X-ray determination of the complete crystal structure and a rational surface modification for enhanced electrocatalytic O₂ reduction. *Dalton Transactions*, 40(25), 6668-6675.
- [56] Ciaccafava, A., Infossi, P., Ilbert, M., Guiral, M., Lecomte, S., Giudici-Orticoni, M. T., & Lojou, E. (2012). Electrochemistry, AFM, and PM-IRRA spectroscopy of immobilized hydrogenase: role of a hydrophobic helix in enzyme orientation for efficient H₂ oxidation. *Angewandte Chemie International Edition*, 51(4), 953-956.

- [57] Buffeteau, T., Desbat, B., & Turllet, J. M. (1991). Polarization modulation FT-IR spectroscopy of surfaces and ultra-thin films: experimental procedure and quantitative analysis. *Applied Spectroscopy*, 45(3), 380-389.
- [58] Allara, D. L., & Swalen, J. D. (1982). An infrared reflection spectroscopy study of oriented cadmium arachidate monolayer films on evaporated silver. *The Journal of Physical Chemistry*, 86(14), 2700-2704.
- [59] Golden, W. G., Saperstein, D. D., Severson, M. W., & Overend, J. (1984). Infrared reflection-absorption spectroscopy of surface species: a comparison of Fourier transform and dispersion methods. *The Journal of Physical Chemistry*, 88(3), 574-580.
- [60] Arnold, R., Terfort, A., & Wöll, C. (2001). Determination of molecular orientation in self-assembled monolayers using IR absorption intensities: the importance of grinding effects. *Langmuir*, 17(16), 4980-4989.
- [61] W. G. Golden, Infrared-reflection-absorption-spectroscopy, in “Fourier Transform Infrared Spectroscopy”, eds: J. R. Ferraro, L. J. Basile, Academic Press, Orlando, (1985), p315.
- [62] Bellion, M., Santen, L., Mantz, H., Hähl, H., ... & Jacobs, K. (2008). Protein adsorption on tailored substrates: long-range forces and conformational changes. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 20(40), 404226.
- [63] Secundo, F. 2013. Conformational changes of enzymes upon immobilisation. *Chem. Soc. Rev.* 42:6250-6261.
- [64] Marruecos, D. F., Schwartz, D. K., & Kaar, J. L. (2018). Impact of surface interactions on protein conformation. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 38, 45-55.
- [65] Bolivar, J. M., and B. Nidetzky. 2020. On the relationship between structure and catalytic effectiveness in solid surface-immobilized enzymes: Advances in methodology and the quest for a single-molecule perspective. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom* 1868:140333.
- [66] Sacquin-Mora, S., & Lavery, R. (2006). Investigating the local flexibility of functional residues in hemoproteins. *Biophysical journal*, 90(8), 2706-2717.
- [67] Sacquin-Mora, S., Laforet, E., & Lavery, R. (2007). Locating the active sites of enzymes using mechanical properties. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 67(2), 350-359.
- [68] Sacquin-Mora, S. (2016). Bridging enzymatic structure function via mechanics: a coarse-grain approach. In *Methods in enzymology* (Vol. 578, pp. 227-248). Academic Press.
- [69] Raut, V. P., Agashe, M. A., Stuart, S. J., & Latour, R. A. (2005). Molecular dynamics simulations of peptide– surface interactions. *Langmuir*, 21(4), 1629-1639.
- [70] Hoefling, M., Iori, F., Corni, S., & Gottschalk, K. E. (2010). The conformations of amino acids on a gold (111) surface. *ChemPhysChem*, 11(8), 1763-1767.
- [71] Iori, F., & Corni, S. (2008). Including image charge effects in the molecular dynamics simulations of molecules on metal surfaces. *Journal of computational chemistry*, 29(10), 1656-1666.

- [72] Bourassin, N., Baaden, M., Lojou, E., & Sacquin-Mora, S. (2020). Implicit Modeling of the Impact of Adsorption on Solid Surfaces for Protein Mechanics and Activity with a Coarse-Grained Representation. *The Journal of Physical Chemistry B*, 124(39), 8516-8523.
- [73] Metropolis, N., Rosenbluth, A. W., Rosenbluth, M. N., Teller, A. H., & Teller, E. (1953). Equation of state calculations by fast computing machines. *The journal of chemical physics*, 21(6), 1087-1092.
- [74] Alder, B. J., & Wainwright, T. E. (1957). *Molecular Dynamics by Electronic Computers* in *International Symposium on Transport Processes in Statistical Mechanics*. I. Prigogine, New York: John Wiley Int, 97.
- [75] Alder, B. J., & Wainwright, T. E. (1957). Molecular dynamics simulation of hard sphere system. *J. Chem. Phys*, 27(1), 208-1.
- [76] Battimelli, G., Battimelli, G., Ciccotti, G., Greco, P., & Scalone. (2020). *Computer Meets Theoretical Physics*. Springer International Publishing.
- [77] Kendrew, J. C., Bodo, G., Dintzis, H. M., Parrish, R. G., Wyckoff, H., & Phillips, D. C. (1958). A three-dimensional model of the myoglobin molecule obtained by x-ray analysis. *Nature*, 181(4610), 662-666.
- [78] Rahman, A., & Stillinger, F. H. (1971). Molecular dynamics study of liquid water. *The Journal of Chemical Physics*, 55(7), 3336-3359.
- [79] Levitt, M., & Warshel, A. (1975). Computer simulation of protein folding. *Nature*, 253(5494), 694-698.
- [80] Anandakrishnan, R., Drozdetski, A., Walker, R. C., & Onufriev, A. V. (2015). Speed of conformational change: comparing explicit and implicit solvent molecular dynamics simulations. *Biophysical journal*, 108(5), 1153-1164.
- [81] D.A. Case, K. Belfon, I.Y. Ben-Shalom, S.R. Brozell, ... & P.A. Kollman (2020), *AMBER 2020*, University of California, San Francisco.
- [82] Wang, J., Wolf, R. M., Caldwell, J. W., Kollman, P. A., & Case, D. A. (2004). Development and testing of a general amber force field. *Journal of computational chemistry*, 25(9), 1157-1174.
- [83] Allen, F. H., Kennard, O., Watson, D. G., Brammer, L., Orpen, A. G., & Taylor, R. (1987). Tables of bond lengths determined by X-ray and neutron diffraction. Part 1. Bond lengths in organic compounds. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*, (12), S1-S19.
- [84] Wu, W., Owino, J., Al-Ostaz, A., & Cai, L. (2014, May). Applying periodic boundary conditions in finite element analysis. In *SIMULIA Community Conference*, Providence (pp. 707-719).
- [85] MacKerell AD, Bashford D, Bellott M, Dunbrack RL, Evanseck JD, Field MJ, et al. (April 1998). "All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins". *The Journal of Physical Chemistry B*. 102 (18): 3586–616

- [86] Malaspina, D. C., & Faraudo, J. (2020). Computer Simulations of the interaction between SARS-CoV-2 spike glycoprotein and different surfaces. *Biointerphases*, 15(5), 051008.
- [87] Hoefling, M., Iori, F., Corni, S., & Gottschalk, K. E. (2010). Interaction of amino acids with the Au (111) surface: adsorption free energies from molecular dynamics simulations. *Langmuir*, 26(11), 8347-8351.
- [88] Ozboyaci, M., Kokh, D. B., & Wade, R. C. (2016). Three steps to gold: mechanism of protein adsorption revealed by Brownian and molecular dynamics simulations. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 18(15), 10191-10200.
- [89] Wang, Q., Wang, M., Lu, X., Wang, K., Fang, L., Ren, F., & Lu, G. (2017). Effects of atomic-level nano-structured hydroxyapatite on adsorption of bone morphogenetic protein-7 and its derived peptide by computer simulation. *Scientific reports*, 7(1), 1-14.
- [90] Ozboyaci, M., Kokh, D. B., Corni, S., & Wade, R. C. (2016). Modeling and simulation of protein–surface interactions: achievements and challenges. *Quarterly reviews of biophysics*, 49.
- [91] Mirau, P. A., Naik, R. R., & Gehring, P. (2011). Structure of peptides on metal oxide surfaces probed by NMR. *Journal of the American Chemical Society*, 133(45), 18243-18248.
- [92] Calzolari, L., Franchini, F., Gilliland, D., & Rossi, F. (2010). Protein – nanoparticle interaction: identification of the ubiquitin – gold nanoparticle interaction site. *Nano letters*, 10(8), 3101-3105.
- [93] Mongan, J., & Case, D. A. (2005). Biomolecular simulations at constant pH. *Current opinion in structural biology*, 15(2), 157-163.
- [94] Salomon-Ferrer, R., Case, D. A., & Walker, R. C. (2013). An overview of the Amber biomolecular simulation package. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science*, 3(2), 198-210.
- [95] Berthelot, D. (1898). Sur le mélange des gaz. *Compt. Rendus*, 126, 1703-1706.
- [96] Lorentz, H. A. (1881). Ueber die Anwendung des Satzes vom Virial in der kinetischen Theorie der Gase. *Annalen der physik*, 248(1), 127-136.
- [97] Agrawal, P. M., Rice, B. M., & Thompson, D. L. (2002). Predicting trends in rate parameters for self-diffusion on FCC metal surfaces. *Surface Science*, 515(1), 21-35.
- [98] Gotz, A. W., Williamson, M. J., Xu, D., Poole, D., Le Grand, S., & Walker, R. C. (2012). Routine microsecond molecular dynamics simulations with AMBER on GPUs. 1. Generalized born. *Journal of chemical theory and computation*, 8(5), 1542-1555.
- [99] Salomon-Ferrer, R., Götz, A. W., Poole, D., Le Grand, S., & Walker, R. C. (2013). Routine microsecond molecular dynamics simulations with AMBER on GPUs. 2. Explicit solvent particle mesh Ewald. *Journal of chemical theory and computation*, 9(9), 3878-3888.
- [100] Le Grand, S., Götz, A. W., & Walker, R. C. (2013). SPFP: Speed without compromise—A mixed precision model for GPU accelerated molecular dynamics simulations. *Computer Physics Communications*, 184(2), 374-380.

- [101] Nosé, S. (1984). A unified formulation of the constant temperature molecular dynamics methods. *The Journal of chemical physics*, 81(1), 511-519.
- [102] Quigley, D., & Probert, M. I. J. (2004). Langevin dynamics in constant pressure extended systems. *The Journal of chemical physics*, 120(24), 11432-11441.
- [103] Lemak, A. S., & Balabaev, N. K. (1994). On the Berendsen thermostat. *Molecular Simulation*, 13(3), 177-187.
- [104] Humphrey, W., Dalke, A., & Schulten, K. (1996). VMD: visual molecular dynamics. *Journal of molecular graphics*, 14(1), 33-38.
- [105] Felder, C. E., Prilusky, J., Silman, I., & Sussman, J. L. (2007). A server and database for dipole moments of proteins. *Nucleic acids research*, 35(suppl_2), W512-W521.
- [106] Dolinsky, T. J., Czodrowski, P., Li, H., Nielsen, J. E., Jensen, J. H., Klebe, G., & Baker, N. A. (2007). PDB2PQR: expanding and upgrading automated preparation of biomolecular structures for molecular simulations. *Nucleic acids research*, 35(suppl_2), W522-W525.
- [107] Marrink, S. J., Risselada, H. J., Yefimov, S., Tieleman, D. P., & De Vries, A. H. (2007). The MARTINI force field: coarse grained model for biomolecular simulations. *The journal of physical chemistry B*, 111(27), 7812-7824.
- [108] Ostuni, M. A., Hermand, P., Saindoy, E., Guillou, N., Guellec, J., Coens, A., ... & Lequin, O. (2020). CX3CL1 homo-oligomerization drives cell-to-cell adherence. *Scientific Reports*, 10(1), 1-16.
- [109] Vaiwala, R., Sharma, P., Puranik, M., & Ayappa, K. G. (2020). Developing a Coarse-Grained Model for Bacterial Cell Walls and Evaluating Mechanical Properties and Free Energy Barriers. *bioRxiv*.
- [110] Buyan, A., Cox, C. D., Barnoud, J., Li, J., Chan, H. S., Martinac, B., ... & Corry, B. (2020). Piezo1 Forms Specific, Functionally Important Interactions with Phosphoinositides and Cholesterol. *Biophysical Journal*.
- [111] Pezeshkian, W., König, M., Wassenaar, T. A., & Marrink, S. J. (2020). Backmapping triangulated surfaces to coarse-grained membrane models. *Nature communications*, 11(1), 1-9.
- [112] Basdevant, N., Borgis, D., & Ha-Duong, T. (2013). Modeling protein-protein recognition in solution using the coarse-grained force field SCORPION. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 9(1), 803-813.
- [113] Zacharias, M. (2003). Protein-protein docking with a reduced protein model accounting for side-chain flexibility. *Protein Science*, 12(6), 1271-1282.
- [114] Tozzini, V. (2005). Coarse-grained models for proteins. *Current opinion in structural biology*, 15(2), 144-150.
- [115] Tirion, M. M. (1996). Large amplitude elastic motions in proteins from a single-parameter, atomic analysis. *Physical review letters*, 77(9), 1905.

- [116] Tama, F., & Sanejouand, Y. H. (2001). Conformational change of proteins arising from normal mode calculations. *Protein engineering*, 14(1), 1-6.
- [117] Kondrashov, D. A., Van Wynsberghe, A. W., Bannen, R. M., Cui, Q., & Phillips Jr, G. N. (2007). Protein structural variation in computational models and crystallographic data. *Structure*, 15(2), 169-177.
- [118] Bahar, I., & Jernigan, R. L. (1999). Cooperative fluctuations and subunit communication in tryptophan synthase. *Biochemistry*, 38(12), 3478-3490.
- [119] Bahar, I., Erman, B., Jernigan, R. L., Atilgan, A. R., & Covell, D. G. (1999). Collective motions in HIV-1 reverse transcriptase: examination of flexibility and enzyme function. *Journal of molecular biology*, 285(3), 1023-1037.
- [120] Yang, L. W., & Bahar, I. (2005). Coupling between catalytic site and collective dynamics: a requirement for mechanochemical activity of enzymes. *Structure*, 13(6), 893-904.
- [121] Hinsen, K. (1998). Analysis of domain motions by approximate normal mode calculations. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 33(3), 417-429.
- [122] Hinsen, K., Thomas, A., & Field, M. J. (1999). Analysis of domain motions in large proteins. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 34(3), 369-382.
- [123] Navizet, I., Cailliez, F., & Lavery, R. (2004). Probing protein mechanics: residue-level properties and their use in defining domains. *Biophysical journal*, 87(3), 1426-1435.
- [124] Tama, F., Wriggers, W., & Brooks III, C. L. (2002). Exploring global distortions of biological macromolecules and assemblies from low-resolution structural information and elastic network theory. *Journal of molecular biology*, 321(2), 297-305.
- [125] Delarue, M., & Sanejouand, Y. H. (2002). Simplified normal mode analysis of conformational transitions in DNA-dependent polymerases: the elastic network model. *Journal of molecular biology*, 320(5), 1011-1024.
- [126] Sacquin-Mora Sophie. Représentations gros-grain pour la modélisation des protéines : Propriétés mécaniques et interactions. Chimie théorique et/ou physique. Université Paris-Diderot - Paris VII, 2011. tel-00652917
- [127] Ermak, D. L., & McCammon, J. A. (1978). Brownian dynamics with hydrodynamic interactions. *The Journal of chemical physics*, 69(4), 1352-1360.
- [128] Pastor, R. W., Venable, R. M., & Karplus, M. (1988). Brownian dynamics simulation of a lipid chain in a membrane bilayer. *The Journal of chemical physics*, 89(2), 1112-1127.
- [129] Rotne, J., & Prager, S. (1969). Variational treatment of hydrodynamic interaction in polymers. *The Journal of Chemical Physics*, 50(11), 4831-4837.
- [130] Wade, R. C., Davis, M. E., Luty, B. A., Madura, J. D., & McCammon, J. A. (1993). Gating of the active site of triose phosphate isomerase: Brownian dynamics simulations of flexible peptide loops in the enzyme. *Biophysical journal*, 64(1), 9-15.

- [131] Bocahut, A., Bernad, S., Sebban, P., & Sacquin-Mora, S. (2011). Frontier residues lining globin internal cavities present specific mechanical properties. *Journal of the American Chemical Society*, 133(22), 8753-8761.
- [132] Sacquin-Mora, S., Delalande, O., & Baaden, M. (2010). Functional modes and residue flexibility control the anisotropic response of guanylate kinase to mechanical stress. *Biophysical journal*, 99(10), 3412-3419.
- [133] Sacquin-Mora, S. (2014). Motions and mechanics: investigating conformational transitions in multi-domain proteins with coarse-grain simulations. *Molecular Simulation*, 40(1-3), 229-236.
- [134] Sacquin-Mora, S. (2018). Mechanical variations in proteins with large-scale motions highlight the formation of structural locks. *Journal of structural biology*, 203(3), 195-204.
- [135] Sleat, R., Mah, R. A., & Robinson, R. (1984). Isolation and characterization of an anaerobic, cellulolytic bacterium, *Clostridium cellulovorans* sp. nov. *Applied and environmental microbiology*, 48(1), 88-93.
- [136] Tamaru, Y., Miyake, H., Kuroda, K., Nakanishi, ... & Ueda, M. (2010). Genome sequence of the cellulosome-producing mesophilic organism *Clostridium cellulovorans* 743B. *Journal of bacteriology*, 192(3), 901-902.
- [137] Doi, R. H., & Tamaru, Y. (2001). The *Clostridium cellulovorans* cellulosome: an enzyme complex with plant cell wall degrading activity. *The Chemical Record*, 1(1), 24-32.
- [138] Jeng, W. Y., Wang, N. C., Lin, M. H., Lin, C. T., ... & Wang, A. H. J. (2011). Structural and functional analysis of three β -glucosidases from bacterium *Clostridium cellulovorans*, fungus *Trichoderma reesei* and termite *Neotermes koshunensis*. *Journal of structural biology*, 173(1), 46-56.
- [139] Singhanian, R. R., Patel, A. K., Sukumaran, R. K., Larroche, C., & Pandey, A. (2013). Role and significance of beta-glucosidases in the hydrolysis of cellulose for bioethanol production. *Bioresource technology*, 127, 500-507.
- [140] Jasensky, J., Ferguson, K., Baria, M., Zou, X., ... & Chen, Z. (2018). Simultaneous observation of the orientation and activity of surface-immobilized enzymes. *Langmuir*, 34(31), 9133-9140.
- [141] Dolinsky, T. J., Nielsen, J. E., McCammon, J. A., & Baker, N. A. (2004). PDB2PQR: an automated pipeline for the setup of Poisson–Boltzmann electrostatics calculations. *Nucleic acids research*, 32(suppl_2), W665-W667.
- [142] James C. Phillips, David J. Hardy, Julio D. C. Maia, John E. Stone, ... & Emad Tajkhorshid. Scalable molecular dynamics on CPU and GPU architectures with NAMD. *Journal of Chemical Physics*, 153:044130, 2020.
- [143] MacKerell Jr, A. D., Bashford, D., Bellott, M. L. D. R., Dunbrack Jr, R. L., ... & Karplus, M. (1998). All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins. *The journal of physical chemistry B*, 102(18), 3586-3616.

- [144] Brooks, B. R., Brooks III, C. L., Mackerell Jr, A. D., Nilsson, ... & Karplus, M. (2009). CHARMM: the biomolecular simulation program. *Journal of computational chemistry*, 30(10), 1545-1614.
- [145] Jorgensen, W. L., & Tirado-Rives, J. (1988). The OPLS [optimized potentials for liquid simulations] potential functions for proteins, energy minimizations for crystals of cyclic peptides and crambin. *Journal of the American Chemical Society*, 110(6), 1657-1666.
- [146] Iori, F., Di Felice, R., Molinari, E., & Corni, S. (2009). GolP: An atomistic force-field to describe the interaction of proteins with Au (111) surfaces in water. *Journal of computational chemistry*, 30(9), 1465-1476.
- [147] Peng, C., Liu, J., & Zhou, J. (2015). Molecular simulations of cytochrome c adsorption on a bare gold surface: insights for the hindrance of electron transfer. *The Journal of Physical Chemistry C*, 119(35), 20773-20781.
- [148] Hoefling, M., Monti, S., Corni, S., & Gottschalk, K. E. (2011). Interaction of β -sheet folds with a gold surface. *PloS one*, 6(6), e20925.
- [149] Power, D., Rouse, I., Poggio, S., Brandt, E., Lopez, H., Lyubartsev, A., & Lobaskin, V. (2019). A multiscale model of protein adsorption on a nanoparticle surface. *Modelling and Simulation in Materials Science and Engineering*, 27(8), 084003.
- [150] Koppenol, W. H., Rush, J. D., Mills, J. D., & Margoliash, E. (1991). The dipole moment of cytochrome c. *Molecular biology and evolution*, 8(4), 545-558.
- [151] Yang, S., Liu, J., Quan, X., & Zhou, J. (2018). Bilirubin oxidase adsorption onto charged self-assembled monolayers: Insights from multiscale simulations. *Langmuir*, 34(33), 9818-9828.
- [152] Bekker, H., Berendsen, H. J. C., Dijkstra, E. J., Achterop, S., ... & Renardus, M. K. R. (1993). Gromacs: A parallel computer for molecular dynamics simulations. In *Physics computing* (Vol. 92, pp. 252-256). World Scientific Singapore.
- [153] Berendsen, H. J., van der Spoel, D., & van Drunen, R. (1995). GROMACS: a message-passing parallel molecular dynamics implementation. *Computer physics communications*, 91(1-3), 43-56.
- [154] Lindahl, E., Hess, B., & Van Der Spoel, D. (2001). GROMACS 3.0: a package for molecular simulation and trajectory analysis. *Molecular modeling annual*, 7(8), 306-317.
- [155] Van Der Spoel, D., Lindahl, E., Hess, B., Groenhof, G., Mark, A. E., & Berendsen, H. J. (2005). GROMACS: fast, flexible, and free. *Journal of computational chemistry*, 26(16), 1701-1718.
- [156] Hess, B., Kutzner, C., Van Der Spoel, D., & Lindahl, E. (2008). GROMACS 4: algorithms for highly efficient, load-balanced, and scalable molecular simulation. *Journal of chemical theory and computation*, 4(3), 435-447.

- [157] Pronk, S., Páll, S., Schulz, R., Larsson, P., ... & Hess, B. (2013). GROMACS 4.5: a high-throughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit. *Bioinformatics*, 29(7), 845-854.
- [158] Páll, S. A. M. J., Abraham, M. J., Kutzner, C., Hess, B., & Lindahl, E. (2014, April). Solving software challenges for exascale. In *International Conference on Exascale Applications and Software*.
- [159] Abraham, M. J., Murtola, T., Schulz, R., Páll, S., Smith, J. C., Hess, B., & Lindahl, E. (2015). GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX*, 1, 19-25.
- [160] Ha, T., Enderle, T., Ogletree, D. F., Chemla, D. S., Selvin, P. R., & Weiss, S. (1996). Probing the interaction between two single molecules: fluorescence resonance energy transfer between a single donor and a single acceptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(13), 6264-6268.
- [161] Moerner, W. E., & Fromm, D. P. (2003). Methods of single-molecule fluorescence spectroscopy and microscopy. *Review of Scientific instruments*, 74(8), 3597-3619.
- [162] Weltz, J. S., Kienle, D. F., Schwartz, D. K., & Kaar, J. L. (2020). Reduced Enzyme Dynamics upon Multipoint Covalent Immobilization Leads to Stability-Activity Trade-off. *Journal of the American Chemical Society*, 142(7), 3463-3471.
- [163] Hitaishi, V. P., Mazurenko, I., Harb, M., Clément, R., ... & Lojou, E. (2018). Electrostatic-driven activity, loading, dynamics, and stability of a redox enzyme on functionalized-gold electrodes for bioelectrocatalysis. *Acs Catalysis*, 8(12), 12004-12014.
- [164] Zou, X., Wei, S., Badiyan, S., Schroeder, M., ... & Chen, Z. (2018). Investigating the effect of two-point surface attachment on enzyme stability and activity. *Journal of the American Chemical Society*, 140(48), 16560-16569.
- [165] Talaga, D., Bremner, A., Buffeteau, T., Vallée, R. A., Lecomte, S., & Bonhommeau, S. (2020). Total Internal Reflection Tip-Enhanced Raman Spectroscopy of Cytochrome c. *The journal of physical chemistry letters*, 11(10), 3835-3840.
- [166] Warshel, A., & Levitt, M. (1976). Theoretical studies of enzymic reactions: dielectric, electrostatic and steric stabilization of the carbonium ion in the reaction of lysozyme. *Journal of molecular biology*, 103(2), 227-249.
- [167] Field, M. J., Bash, P. A., & Karplus, M. (1990). A combined quantum mechanical and molecular mechanical potential for molecular dynamics simulations. *Journal of Computational Chemistry*, 11(6), 700-733.
- [168] Senn, H. M., & Thiel, W. (2009). QM/MM methods for biomolecular systems. *Angewandte Chemie International Edition*, 48(7), 1198-1229.
- [169] Srnec, M., Ryde, U., & Rulíšek, L. (2011). Reductive cleavage of the O–O bond in multicopper oxidases: a QM/MM and QM study. *Faraday discussions*, 148, 41-53.

- [170] Hu, L., Farrokhnia, M., Heimdal, J., Shleev, S., Rulisek, L., & Ryde, U. (2011). Reorganization energy for internal electron transfer in multicopper oxidases. *The Journal of Physical Chemistry B*, 115(45), 13111-13126.
- [171] Rulíšek, L., & Ryde, U. (2013). Theoretical studies of the active-site structure, spectroscopic and thermodynamic properties, and reaction mechanism of multicopper oxidases. *Coordination Chemistry Reviews*, 257(2), 445-458.