

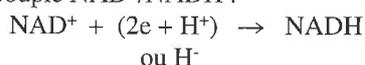
Comportement électrochimique du couple redox NAD⁺/NADH

Jacques Moiroux

Le coenzyme pyridinique nicotinamide adénine dinucléotide ou coenzyme I intervient dans un très grand nombre de réactions redox enzymatiquement catalysées. Un exemple typique est l'oxydation de l'éthanol par NAD⁺ en présence d'alcool déshydrogénase ADH.



Du point de vue thermodynamique le potentiel redox apparent du couple NAD⁺/NADH :



est connu : $E^{\circ}_{\text{NAD}^+/\text{NADH}, \text{pH}=7} = -0,56 \text{ V/ ECS}$. La forme réduite présente un hétérocycle 1,4-dihydronicotinamide, l'oxydation produit le pyridinium correspondant. Les objectifs visés à travers l'étude des comportements électrochimiques de NAD⁺ et de NADH sont multiples. D'un point de vue mécanistique, est-il possible d'acquiescer des informations sur la nature du « transfert d'hydrure » qui constitue le bilan de la réaction entre le substrat enzymatique et le coenzyme et qui est stéréosélectif ? Y-a-il transfert d'un hydrure en une seule étape ou s'agit-il d'un processus multiétapes de type e, H⁺, e ou e, H⁻ voire H⁻, e ? Comme les enzymes concernées, particulièrement les déshydrogénases, sont très spécifiques vis-à-vis de ce type de coenzyme, est-il envisageable de régénérer électrochimiquement le coenzyme ? Enfin, est-il possible d'utiliser les méthodes électrochimiques pour doser NAD⁺ et / ou NADH ?

Les premiers travaux ont été consacrés à l'étude de l'électrochimie directe de NAD⁺ à une cathode et de NADH à une anode. Puis c'est une électrochimie indirecte qui a été mise en œuvre, par l'utilisation d'un médiateur introduit en solution ou immobilisé à la surface de l'électrode. NADH et NAD⁺ ne sont pratiquement solubles qu'en milieu aqueux. Pour éviter l'hydrolyse acide de NADH et l'hydrolyse basique de NAD⁺, ce milieu doit être tamponné à un pH compris entre 7,5 et 9,2.

1. Electrochimie directe

1.1. Réduction de NAD⁺

Une réduction monoélectronique de NAD⁺ est d'abord observable. Elle procède selon le processus suivant, qui comprend une première étape de dimérisation [1]:



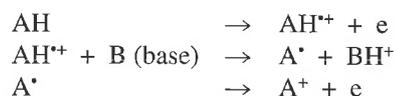
A un potentiel nettement plus négatif (-1,6 V/ECS), NAD⁺ peut être réduit en 1,2 ou 1,4 ou 1,6 dihydronicotina-

mide. Seul l'isomère 1,4 est enzymatiquement actif. Il est obtenu avec un rendement au mieux égal à 70%. La régénération efficace de la forme réduite du coenzyme par électrochimie directe est donc impossible.

1.2. Oxydation de NADH

Un processus biélectronique d'oxydation de NADH en NAD⁺ est observé avec une surtension égale ou supérieure à 0,7 V par rapport à $E^{\circ}_{\text{NAD}^+/\text{NADH}, \text{pH}7}$. Cette surtension est très nettement fonction des matériaux constituant l'anode et de leur état de surface [2]. L'utilisation de cette régénération de NAD⁺ à partir de NADH, dans un système d'électrocatalyse enzymatique, montre qu'elle se produit avec un rendement supérieur à 99,99% [3].

Dans l'acétonitrile, il a pu être établi que l'oxydation d'analogue (AH) de NADH procède selon la séquence suivante [4]:



2. Electrochimie indirecte

2.1. Réduction de NAD⁺

L'objectif est d'obtenir NADH enzymatiquement actif par mise en œuvre d'un médiateur électrochimiquement régénéré ou par introduction d'une enzyme catalysant la réduction de NAD⁺ en NADH, cette enzyme acceptant comme cosubstrat un médiateur électrochimiquement régénéré. Certains complexes peuvent être utilisés dans le premier cas de figure [5] et des systèmes enzymatiques ont été proposés pour le second cas [6].

2.2. Oxydation de NADH

L'objectif est d'abaisser la surtension, également par l'introduction d'un médiateur. Il existe des hétéropolyanions et plusieurs types de quinones ou d'hétérocycles, transféreurs d'hydrures électrochimiquement actifs, qui permettent de procéder ainsi [7].

Références

- [1] W.T. Bresnahan, P.J. Elving, *J. Am. Chem. Soc.*, **1981**, *103*, 6533.
- [2] a : W.J. Blaedel, R.G. Haas, *Anal. Chem.*, **1970**, *42*, 918.
b : P. Leduc, D. Thévenot, *J. Electroanal. Chem.*, **1973**, *47*, 543.
c : J. Moiroux, P.J. Elving, *Anal. Chem.*, **1978**, *50*, 1056.

- [3] J. Bonnefoy, J. Moiroux, J.M. Laval, C. Bourdillon, *J. Chem. Soc. Faraday Trans. I*, **1988**, 84, 941.
- [4] A. Anne, P. Apiot, J. Moiroux, P. Neta, J.M. Savéant, *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, 114, 4694.
- [5] R. Ruppert, S. Herrmann, E. Steckhan, *Tetrahedron Lett.*, **1987**, 28, 6583.
- [6] a : R. Di Cosimo, C.H. Wong, L. Daniels, G.M. Whitesides, *J. Org. Chem.*, **1981**, 46, 4622.
b : H. Durliat, M. Comtat, J.L. Séris, *Anal. Lett.*, **1991**, 24, 1471.
- c : J. Cantet, A. Bergel, M. Comtat, *Enz. Microbiol. Technol.*, **1996**, 18, 72.
- [7] a : D.C.S. Tse, T. Kuwana, *Anal. Chem.*, **1978**, 50, 1315.
b : C. Degrand, L.L. Miller, *J. Am. Chem. Soc.*, **1980**, 102, 5728.
c : B.W. Carlson, L.L. Miller, *J. Am. Chem. Soc.*, **1985**, 107, 479.
d : L. Gorton, A. Torstensson, H. Jaegfeldt, G.J. Johansson, *J. Electroanal. Chem.*, **1985**, 196, 81.
e : B. Persson, L. Gorton, *J. Electroanal. Chem.*, **1990**, 292, 115.
f : B. Keita, K. Essaaki, L. Nadjjo, R. Contant, Y. Justun, *J. Electroanal. Chem.*, **1996**, 404, 271.

Électrochimie des protéines d'oxydo-réduction

Pierre Bianco

Dans deux processus physiologiques fondamentaux, la respiration et la photosynthèse, les cellules vivantes emmagasinent de l'énergie sous la forme de molécules dont l'une des plus connues est l'adénosine triphosphate (ATP). Cette énergie peut provenir de l'oxydation de composés organiques (respiration) ou de la lumière (photosynthèse) ; dans les deux cas, elle est consacrée à la fabrication d'ATP, qui sert de « réservoir d'énergie » dans lequel les cellules puisent au fur et à mesure de leurs besoins.

Les réactions chimiques qui aboutissent à la synthèse de l'ATP sont assez bien connues. On sait en outre que dans les chloroplastes des cellules des plantes vertes, l'eau fournit des électrons et des protons qui peuvent finalement se combiner au dioxyde de carbone pour former des molécules organiques. Dans le cas des mitochondries, de l'eau est synthétisée. La réaction $1/2 O_2 + H_2 \rightarrow H_2O$ n'est en fait qu'une réaction globale très simplifiée recouvrant des processus bien plus complexes dont les mécanismes sont loin d'être connus.

Ces transferts d'électrons sont assurés dans des chaînes complexes par certaines molécules appelées transporteurs d'électrons ; par exemple la chaîne de transporteurs de la membrane du chloroplaste comprend la chlorophylle (P-680), la plastoquinone (PQ/PQH₂), le cytochrome f. Les protéines d'oxydoréduction ont des structures parfois très complexes, et seules quelques unes d'entre elles commencent à être relativement bien connues, surtout celles dont les masses molaires sont assez faibles. Citons, par exemple, certaines ferrédoxines (6000 - 10000 Da), des cytochromes de type c (10000 - 15000 Da), des hydrogénases (70000 Da).

Les protéines présentant une activité enzymatique comprennent deux parties principales :

1) La chaîne polypeptidique formée par une suite d'acides aminés ; ces acides aminés se répartissent en trois groupes :

– a) ceux qui ne possèdent pas de fonctions latérales ionisables,

– b) ceux qui sont porteurs de fonctions latérales acides - COOH (acide glutamique, acide aspartique) se déprotonant à des pH relativement bas,

– c) ceux qui sont porteurs de fonctions latérales basiques - NH₃⁺ (lysine, arginine) se déprotonant aux pH élevés. Il en résulte qu'aux pH physiologiques, la charge globale d'une protéine peut varier en fonction de la nature des acides aminés qu'elle contient. La répartition des charges à la surface de la protéine peut lui conférer un moment dipolaire, donc lui donner une orientation privilégiée dans un champ électrique et ces facteurs doivent être pris en compte pour évaluer l'électroactivité d'une protéine.

2) Le centre « actif » de la protéine d'oxydoréduction, qui passe de l'état oxydé à l'état réduit, et inversement est le siège d'échanges d'électrons.

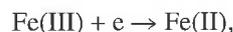
On connaît quelques centres actifs comme :

– les clusters [Fe-S], rencontrés dans les ferrédoxines et dans certaines hydrogénases,

– les hèmes, dans lesquels les atomes de fer sont au centre d'un complexe plan-carré, les ligands axiaux étant des résidus d'acides aminés de la chaîne polypeptidique,

– la flavine, que l'on rencontre chez les flavoprotéines.

Avec les métalloprotéines à fer, on assiste généralement à l'échange :



mais d'autres réactions plus complexes peuvent aussi être envisagées.

1. L'électrochimie : une autre approche pour étudier les protéines d'oxydoréduction

Depuis longtemps, la potentiométrie constitue un outil fort utile pour étudier les systèmes d'intérêt biologique, en particulier certaines protéines. Les travaux les plus anciens faits par des biochimistes, consistaient à effectuer des