

L'électrochimie, un outil pour étudier les mécanismes enzymatiques

Carole Baffert, Sébastien Dementin, Vincent Fourmond et Christophe Léger

Résumé	Le fonctionnement des enzymes qui catalysent des réactions redox fait intervenir des étapes très diverses (diffusion du substrat à l'intérieur de l'enzyme, réactions chimiques au site actif, transferts à longue distance d'électrons et de protons) et qui impliquent des sites de la protéine distants les uns des autres. Cet article illustre, en prenant pour exemple les enzymes qui catalysent l'oxydation réversible du dihydrogène, comment l'électrochimie peut maintenant être utilisée en combinaison avec d'autres approches comme la chimie théorique et la mutagenèse dirigée, pour étudier des aspects variés du mécanisme moléculaire des enzymes redox.
Mots-clés	Chimie biologique, chimie théorique, chimie bioinorganique, cinétique enzymatique, électrochimie, voltammétrie cyclique, hydrogène.
Abstract	Electrochemistry, a tool to study the mechanism of enzymes The mechanism of redox enzymes involves a number of steps (intramolecular diffusion of the substrate, active site chemistry, long range electron and proton transfers) that occur on sites of the protein that are far apart from one another. This article presents the combined use of electrochemistry and other techniques, such as theoretical chemistry and protein engineering, to study the mechanism of redox enzymes. This approach is illustrated with recent results obtained with hydrogenases, the enzymes that oxidize hydrogen.
Keywords	Biological chemistry, theoretical chemistry, bioinorganic chemistry, enzyme kinetics, electrochemistry, cyclic voltammetry, hydrogen.

Les enzymes, ces protéines de grande taille (jusqu'à 1 000 kDa) qui catalysent les réactions chimiques dans le monde vivant, ont été découvertes à la fin du XIX^e siècle. La cinétique enzymatique, qui consiste à interpréter l'effet des conditions expérimentales sur la vitesse stationnaire de *turnover*, est longtemps restée la seule technique permettant d'étudier leur mécanisme catalytique.

Un renversement s'est produit dans le dernier quart du XX^e siècle avec une désaffection progressive pour cette approche et le développement de méthodes basées sur l'interaction matière-rayonnement, qu'il s'agisse de techniques structurales (diffraction des rayons X, RMN) ou spectroscopiques : il fallait voir pour croire. En même temps que l'intérêt se déplaçait ainsi de la fonction vers la structure, d'autres révolutions étaient en marche : dans les années 1990, celle de la biologie moléculaire, qui allait permettre de modifier l'ADN des organismes vivants pour leur faire exprimer des protéines sélectivement modifiées ; puis celle de la chimie théorique, avec le développement de méthodes numériques permettant d'explorer *in silico* la réactivité de systèmes chimiques de grande taille, développements récompensés en 2013 par le prix Nobel de chimie attribué à Martin Karplus, Michael Levitt et Arieh Warshel.

Il ne fait aucun doute que toutes ces techniques sont aujourd'hui aussi incontournables que complémentaires, comme cet article l'illustrera. Mais on peut regretter que la cinétique enzymatique ne soit plus utilisée dans les laboratoires que de façon marginale (pour vérifier l'activité d'un échantillon), et de façon rarissime pour explorer le mécanisme catalytique : il est en effet sans doute vain de chercher à

comprendre comment les enzymes *fonctionnent* sans s'appuyer sur les résultats d'expériences dans lesquelles elles *catalysent* réellement des réactions.

L'électrochimie dynamique est un outil qui s'est récemment développé pour étudier les enzymes qui catalysent des réactions redox. On sait depuis le milieu des années 1970 que certaines protéines peuvent échanger des électrons avec des surfaces conductrices. De très nombreuses enzymes ont pu être adsorbées sur des électrodes dans une configuration qui permet un transfert d'électrons direct tout en conservant les propriétés natives de l'enzyme. Cette approche permet aussi d'envisager le développement de biopiles ou de biocapteurs. Récemment, notre capacité à interpréter les signaux électrochimiques obtenus avec des enzymes adsorbées a beaucoup progressé ; les informations cinétiques quantitatives obtenues grâce au développement de la « cinétique enzymatique électrochimique » ont pu être confrontées à des résultats de calculs théoriques pour comprendre les réactions qui ont lieu à l'échelle moléculaire, à l'intérieur de l'enzyme.

Cette nouvelle façon de « voir » et comprendre la réactivité des enzymes, basée sur la combinaison d'expériences d'électrochimie, de mutagenèse dirigée et de chimie théorique, est illustrée dans cet article en discutant plusieurs aspects du fonctionnement des enzymes appelées hydrogénases.

Les hydrogénases [1]

La production d'énergie dans les êtres vivants fait intervenir des enzymes qui utilisent soit l'énergie lumineuse, soit

l'énergie de certaines réactions chimiques d'oxydoréduction pour synthétiser de l'ATP [1]. Le dihydrogène est l'un des combustibles biologiques oxydés dans ces réactions. Il joue par ailleurs un rôle important dans le métabolisme de la plupart des bactéries et de certaines algues unicellulaires. Certains micro-organismes le produisent en utilisant les électrons issus soit de l'oxydation de l'eau lors de la photosynthèse, soit de la fermentation des sucres. Ce dihydrogène peut être utilisé pour produire de l'énergie grâce à des enzymes « respiratoires » qui couplent son oxydation à la réduction du dioxygène ou d'un autre accepteur d'électron.

Les hydrogénases catalysent la production et/ou l'oxydation biologique du dihydrogène selon la réaction :



Ces métalloenzymes complexes sont constituées d'une seule protéine ou de l'assemblage de plusieurs protéines, ainsi que de cofacteurs inorganiques. On distingue deux familles d'enzymes capables d'oxyder le dihydrogène, selon que le site actif (le cofacteur où se produit l'oxydation du dihydrogène) est un site dinucléaire contenant du nickel et du fer (hydrogénases « NiFe ») ou bien seulement du fer (hydrogénases « FeFe »).

Les structures des sites actifs de ces hydrogénases ont été déterminées dans les années 1990 grâce aux efforts conjugués de biochimistes, cristallographes et spectroscopistes. Dans les hydrogénases de type NiFe, les deux ions métalliques sont pontés par les atomes de soufre de deux acides aminés cystéine ; au total, quatre cystéines lient l'ion Ni à la structure protéique (figure 1A). Dans les hydrogénases de type « FeFe », le dihydrogène est oxydé grâce à un site

actif $[\text{Fe}_2(\text{CN})_2(\text{CO})_3(\text{dtma})]$ (dtma : dithiométhylamine) représenté sur la figure 1C. Le dihydrogène se fixe sur le site de coordination libre du fer « distal », marqué d'une étoile, qui est aussi la cible des inhibiteurs tels que CO et O₂. Dans les deux cas, les ions fer du site actif sont liés à des ions cyanure CN⁻ et des molécules de CO (figure 1A et C).

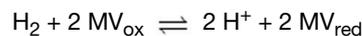
Mais une hydrogénase est bien plus grosse que son site actif ! La plus petite hydrogénase caractérisée (figure 1D) est une protéine d'environ 6 nm de diamètre, assemblée à partir d'environ 450 acides aminés, soit environ 7 000 atomes. Le rôle de la partie protéique qui entoure le site actif est multiple et encore mal connu, mais on pense qu'il donne des propriétés catalytiques spécifiques aux différentes hydrogénases dont les sites actifs (FeFe ou NiFe) sont invariables.

La protéine protège le site actif de certaines molécules qui pourraient l'endommager (comme dans certains cas le dioxygène ou les molécules d'eau) et elle guide les réactifs et produits à l'intérieur de la protéine : des acides aminés protonables permettent le transport des protons de proche en proche entre le solvant et le site actif ; un chapelet de cofacteurs redox (des agrégats constitués de fer et de soufre, figure 1B) permet le transfert d'électrons depuis et vers le partenaire redox de l'enzyme ; le dihydrogène est aussi conduit à l'intérieur de l'enzyme par des tunnels qui convergent vers le site actif (figure 1B).

Étudier le mécanisme d'oxydation biologique du dihydrogène, c'est s'interroger sur tous ces aspects du cycle catalytique : le transport à longue distance du dihydrogène, des protons et des électrons à l'intérieur de l'enzyme, en plus de la transformation chimique au niveau du site actif (figure 2).

La mesure électrochimique de l'activité

L'activité d'un échantillon enzymatique est la fréquence de *turnover* de l'enzyme. Dans le cas des hydrogénases, elle peut dépasser les 10 000 molécules de dihydrogène oxydées ou produites par seconde et par molécule d'enzyme. Pour la mesurer, il suffit d'introduire dans la cuvette d'un spectromètre UV-visible une solution de l'enzyme saturée en H₂ et un partenaire redox dont la réduction s'accompagne d'un changement de couleur (figure 3). En pratique, on utilise souvent le méthylviologène (MV, E⁰ = - 450mV vs SHE) ou le bleu de méthylène (E⁰ = + 10 mV) :



Le suivi de la variation d'absorbance de la solution permet alors de mesurer simplement la vitesse initiale (stationnaire) d'oxydation de H₂. La mesure de vitesse peut éventuellement être répétée en faisant varier la concentration en chacun des substrats (hydrogène et partenaire redox). La variation de vitesse (v) suit une loi de type Michaelis et Menten pour chacun des substrats lorsqu'on garde la concentration de l'autre constante :

$$v = \frac{v_{\text{max}}}{1 + \frac{K_m}{[S]}}$$

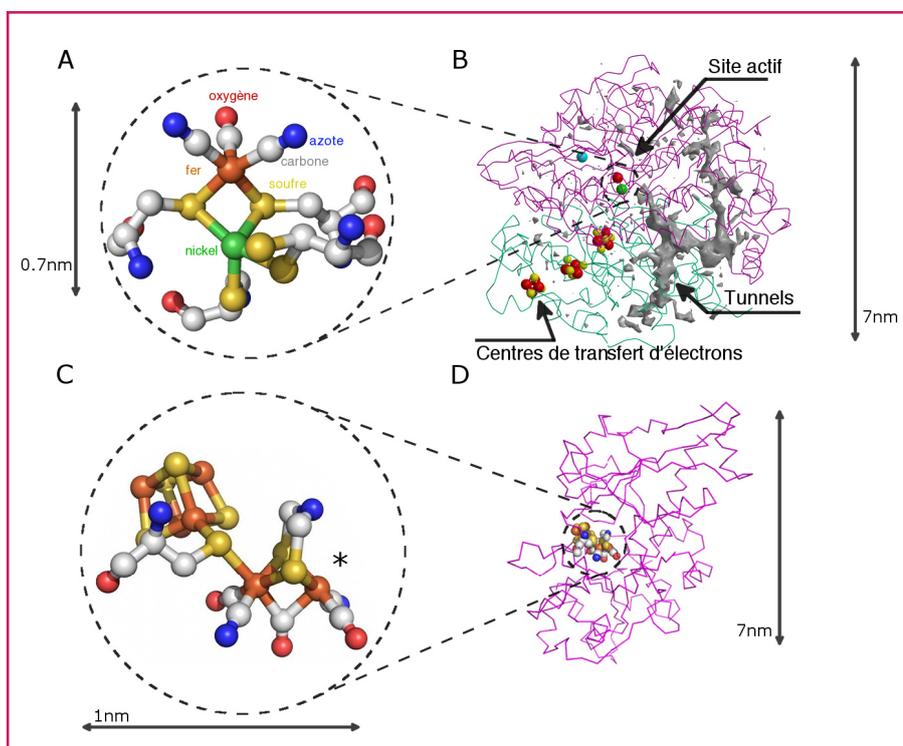


Figure 1 - Structures de deux hydrogénases parmi les plus simples que nous connaissons. Les figures du haut montrent la structure d'une enzyme dont le site actif (panel A) contient du nickel et du fer (enzyme périplasmique de la bactérie *Desulfovibrio fructosovorans*). Cette enzyme est assemblée à partir de deux protéines, dont les « squelettes » (les chaînes principales) sont indiqués sur le panel B par des rubans mauve et vert. Les panels C et D montrent le site actif de type fer-fer et le squelette protéique d'une petite hydrogénase présente dans l'algue unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii*. Sur le panel C, l'étoile montre l'endroit où le dihydrogène se fixe sur le site actif.

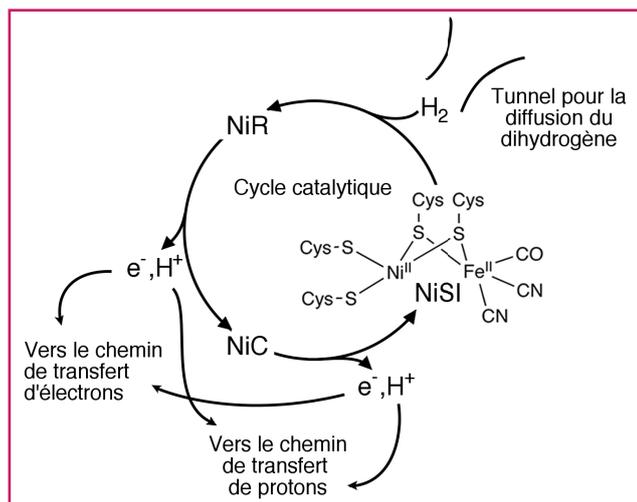


Figure 2 - Représentation du cycle catalytique de l'hydrogénase NiFe, schématisant les événements qui se produisent lorsque l'enzyme oxyde le dihydrogène (mais toutes les étapes sont en fait réversibles). Le dihydrogène, qui accède au site actif par un tunnel (figure 1B), se fixe sur le site actif dans un état $\text{Fe}^{\text{II}}\text{Ni}^{\text{II}}$ appelé « NiSI » (« SI » voulant dire « silencieux en RPE »), pour donner l'état « R » (réduit). Les deux électrons et deux protons successivement produits au site actif sont évacués le long de chemins spécifiques : un chapelet de centre redox pour les électrons (figure 1B) et une série d'acides aminés protonables pour les protons.

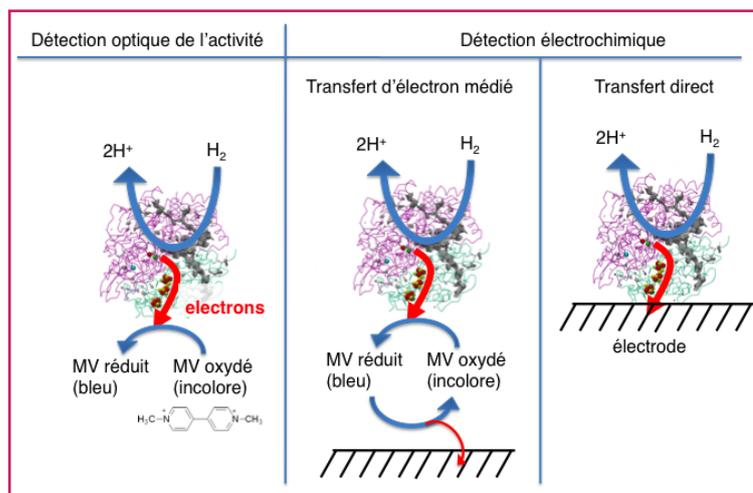


Figure 3 - Diverses méthodes pour mesurer la vitesse d'oxydation du dihydrogène par une hydrogénase : on peut utiliser une méthode optique pour détecter la consommation d'un partenaire redox, utiliser une électrode pour régénérer le partenaire redox (électrochimie médiée) ou utiliser une électrode qui accepte directement les électrons.

Dans ce dernier cas, le courant est directement proportionnel à la vitesse de turnover [2a]. Si le substrat de l'enzyme est gazeux (par exemple pour une hydrogénase), on peut l'introduire en le faisant buller dans la solution. L'électrode est mise en rotation pour minimiser l'effet du transport de matière vers l'électrode.

La seule mesure des paramètres v_{max} et K_m n'est évidemment qu'une caractérisation très rudimentaire des propriétés catalytiques de l'enzyme. Une information utile sur le mécanisme ne peut éventuellement être obtenue qu'à partir de la variation de ces paramètres avec les conditions expérimentales (pH, température, nature du partenaire redox, échange isotopique, mutation de certains acides aminés etc.). Ces expériences de cinétique enzymatique sont donc nécessairement fastidieuses.

L'électrochimie peut permettre de déterminer l'activité d'un échantillon de deux façons [2] : soit l'électrode sert à régénérer le partenaire redox (on parle d'électrochimie médiée), soit elle remplace le partenaire redox en oxydant ou réduisant directement l'enzyme (figure 3). C'est cette deuxième configuration, appelée électrochimie directe, qui nous intéresse ici [2a]. On évite la limitation que constituerait la lente diffusion des enzymes vers l'électrode en les y adsorbant ou en les y attachant de façon covalente : on peut par exemple greffer sur des électrodes des fonctions carboxylates ou amine en réduisant des cations diazonium ($^+\text{N}\equiv\text{N}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{COO}^-$ ou $^+\text{N}\equiv\text{N}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{NO}_2$) et former ensuite des liaisons peptidiques avec les chaînes latérales des acides aminés exposés à la surface de la protéine [3]. L'orientation des molécules d'enzyme sur l'électrode est souvent hétérogène, mais cela ne complique que faiblement l'interprétation des signaux électrochimiques [4a].

Lorsque le potentiel d'électrode est suffisamment élevé, l'enzyme oxydée oxyde le dihydrogène, et le flux d'électrons stationnaire vers l'électrode est mesuré comme un courant dont la valeur est proportionnelle à la fréquence de turnover et à la quantité d'enzyme adsorbée. Cette dernière est le plus souvent inconnue, mais on peut obtenir des informations en examinant les variations de courant qui résultent des variations de certains paramètres expérimentaux. En cinétique homogène, mesurer une activité prend du temps, typiquement 15 à 20 minutes. En électrochimie, la mesure est virtuellement instantanée et elle peut aisément être échantillonnée à haute fréquence. C'est évidemment très utile si cette activité varie au cours du temps, par exemple parce que l'enzyme s'inhibe ou s'inactive.

Diffusion intramoléculaire le long du canal de l'hydrogénase NiFe [5]

De nombreuses enzymes redox transformo ou sont inhibées par de petites molécules (CO , O_2 , H_2 , N_2 , NO). Les chemins préférentiels empruntés par ces molécules à l'intérieur de l'enzyme sont révélés par la présence de cavités hydrophobes dans les structures cristallographiques, ou bien par les résultats de calculs de dynamique moléculaire, qui permettent de mettre en évidence des cavités formées de façon transitoire. Par exemple, le site actif de l'hydrogénase de type NiFe est enfoui au cœur de la protéine et connecté au solvant par une cavité hydrophobe allongée (un tunnel) qui guide la diffusion du substrat H_2 mais aussi des inhibiteurs, comme le monoxyde de carbone (figure 4A). Ce tunnel se termine par un étranglement dont la forme est donnée par les chaînes latérales de deux acides aminés conservés, la leucine 122 et valine 74 (figure 4B).

Il n'y a pas de méthode générale permettant de vérifier que des cavités sont réellement fonctionnelles pour le transport du substrat ou de mesurer la vitesse de diffusion des petites molécules à l'intérieur des enzymes, mais nous avons récemment mis au point deux méthodes qui peuvent être utilisées avec des hydrogénases [5a]. L'une d'elles consiste à mesurer la vitesse de diffusion du CO le long du tunnel dans une expérience d'électrochimie très simple, dans laquelle on mesure à potentiel constant le courant d'oxydation du dihydrogène (figure 4) et l'on injecte dans la cellule électrochimique une petite quantité de solution saturée en CO que l'on chasse ensuite en bullant du dihydrogène dans la solution. La concentration en CO augmente en une fraction de seconde puis décroît exponentiellement comme indiqué

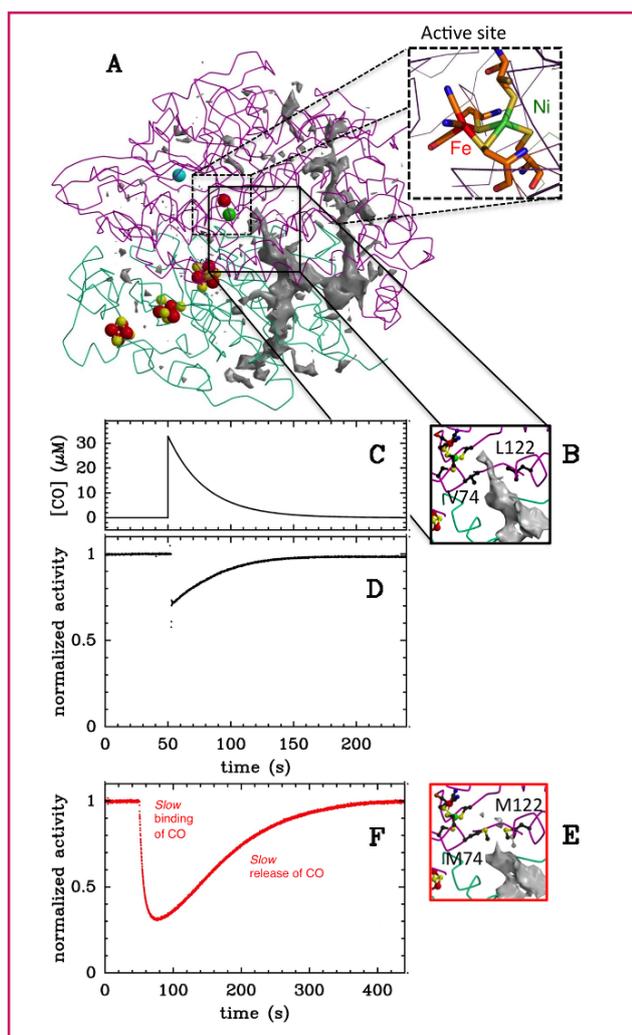


Figure 4 - Illustration d'une méthode permettant de mesurer la vitesse d'inhibition par le CO de l'hydrogénase. CO est un inhibiteur compétitif de l'enzyme (il se lie au site actif à la place du substrat), qui utilise le même chemin que H₂ pour accéder au site actif. Le panel B est un zoom sur l'extrémité du canal. Le panel D montre la variation de courant catalytique d'oxydation de l'hydrogène lorsque la concentration en CO dans la solution varie comme indiqué sur le panel C. Lorsque le tunnel est modifié par ingénierie des protéines (panel E), la variation de courant est lente (panel F) et elle peut être modélisée pour déterminer les constantes de vitesses correspondant à la liaison et dissociation du CO.

sur la figure 4C. La diminution transitoire du courant (panel D) révèle la fixation du CO sur un site de coordination vacant sur le nickel du site actif (la présence du ligand CO inhibe l'enzyme en empêchant le dihydrogène de s'y fixer). Quand l'expérience est réalisée avec l'hydrogénase NiFe « sauvage » (non modifiée), la variation d'activité suit presque instantanément la variation de concentration en CO dans la solution, ce qui suggère que le CO diffuse très rapidement entre la solution et le site actif. Mais lorsque les chaînes latérales des acides aminés qui tapissent le tunnel sont modifiées (panel E), la variation d'activité se produit avec des retards qui témoignent de la lenteur de la diffusion du CO le long du tunnel. Les signaux comme celui de la figure 4F peuvent être modélisés simplement pour déterminer les vitesses de diffusion dans les deux directions [5a].

Nous avons répété ces expériences avec de nombreux mutants différents de l'hydrogénase NiFe, dans lesquels la valine 74 et/ou la leucine 122 ont été substituées. Chaque

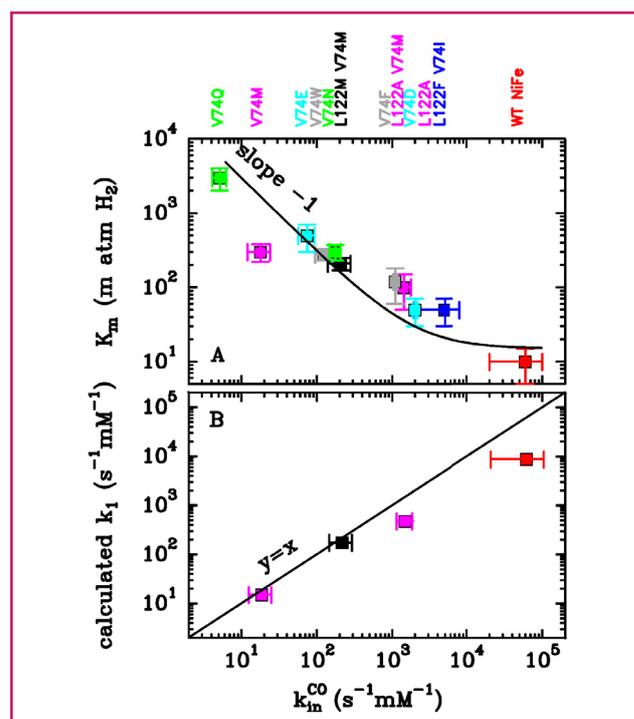


Figure 5 - Chaque point correspond à un mutant de l'hydrogénase NiFe, dans lequel la valine 74 ou la leucine 122, dont les chaînes latérales tapissent le canal (figure 4B), ont été substituées. Le panel A montre la constante de Michaelis en fonction de la vitesse d'inhibition par CO, mesurée dans des expériences comme celles de la figure 4F [5b]. Le panel B compare les vitesses d'inhibition par CO mesurées (en abscisse) et les valeurs récemment calculées par une méthode utilisant des simulations de type dynamique moléculaire [5c]. La ligne noire est la droite unité.

point sur la figure 5A correspond à un mutant. Les données montrent que les mutations ralentissent les vitesses d'inhibition par le monoxyde de carbone jusqu'à mille fois et permettent d'étudier la relation entre la structure du canal et la cinétique de diffusion à l'intérieur de l'enzyme. La relation qui existe dans cette série de mutants entre les vitesses de diffusion du CO et le K_m de l'enzyme pour le dihydrogène (figure 5A), ou entre la vitesse d'inhibition par CO et la vitesse d'inhibition par O₂ (figure 4D dans la réf. [5b]), montrent que les mutations affectent de la même façon les vitesses de diffusion de ces trois petites molécules, qui empruntent donc les mêmes chemins à l'intérieur de l'enzyme [5b].

Longtemps les calculs de dynamique moléculaire n'ont été utilisés que pour prédire des chemins d'accès à l'intérieur des protéines. Mais les données expérimentales de la figure 5A ont pu récemment servir de « benchmark » pour mettre au point la première méthode numérique permettant de calculer des vitesses de diffusion intramoléculaires [5c]. La figure 5B montre des vitesses calculées (k_1) en fonction des vitesses expérimentales pour quelques mutants de l'hydrogénase NiFe.

La diffusion le long du canal de l'hydrogénase est une étape importante dans le mécanisme, parce qu'elle détermine en partie les propriétés catalytiques globales du catalyseur. Nous nous sommes par exemple intéressés aux raisons pour lesquelles certaines enzymes sont, en termes de v_{max} , de meilleurs catalyseurs dans une direction de la réaction que dans l'autre. Il nous a récemment été possible de démontrer que certaines hydrogénases sont de bons catalyseurs de l'oxydation du dihydrogène et de mauvais catalyseurs de la

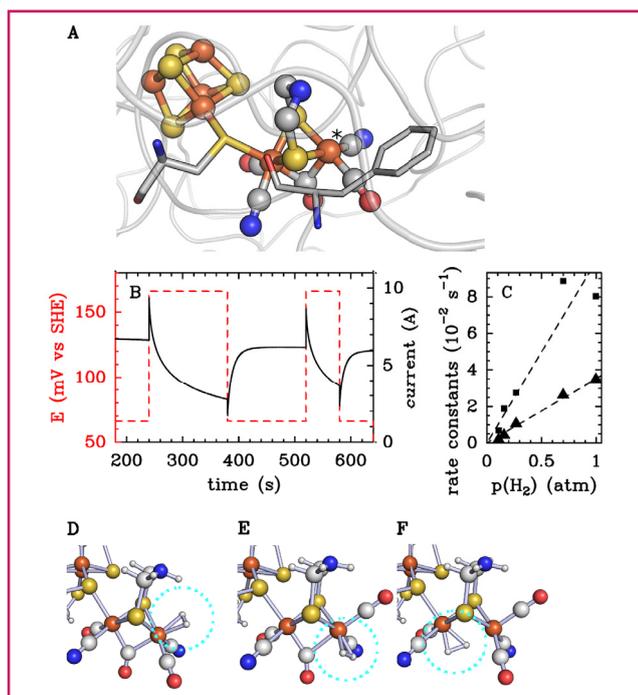


Figure 6 - Panel A : le site actif (« cluster-H ») de l'hydrogénase FeFe, avec le site « normal » de coordination du dihydrogène marqué d'une étoile sur l'ion fer « distal » (qui est aussi la cible de l'inhibiteur O_2) et une phénylalanine qui semble faire obstacle au mouvement du ligand CO sur le fer distal. Le panel B montre une expérience de chronoampérométrie, avec un suivi du courant d'oxydation catalytique du dihydrogène, mettant en évidence l'inactivation biphasique et réversible de l'enzyme en conditions oxydantes. Cette expérience permet de mesurer les vitesses d'inactivation, qui sont proportionnelles à la pression partielle d'hydrogène (panel C). Les panels D-F sont des résultats de calculs de type DFT montrant la fixation de H_2 sur le site de coordination normal (D), ou sur des positions anormales (E, F), ce qui bloque le cycle catalytique [6b].

production du dihydrogène, justement parce que la diffusion le long du canal est lente et constitue l'étape limitante de la réaction de réduction des protons [5d].

Réactivité du site actif de l'hydrogénase FeFe [6]

En plus d'être inhibées par certaines molécules, de très nombreuses métalloenzymes peuvent être converties réversiblement en des formes inactives en réponse à des changements de conditions redox. Ces transformations sont suffisamment lentes pour qu'elles apparaissent clairement dans des expériences d'électrochimie comme des variations de courant catalytique, par exemple en réponse à des changements brusques de potentiel d'électrode. La mesure électrochimique du courant peut permettre d'identifier le mécanisme de ces transformations.

Lorsqu'une hydrogénase FeFe (figure 1C et D) est adsorbée sur une électrode, en présence de dihydrogène, et que le potentiel de l'électrode est changé comme indiqué sur la figure 6B, les variations de courant montrent que l'enzyme s'inactive à haut potentiel et que l'activité est restaurée dans des conditions moins oxydantes. L'hypothèse présente dans la littérature, basée sur des études de petites molécules modèles du site actif, était que l'inactivation résulte de la coordination du fer distal par l'azote du ligand dtma (figure 1C), mais cela a été exclu récemment par des calculs prenant en compte l'effet de la matrice protéique autour du site actif [6a].

L'analyse des transitoires dans les expériences d'électrochimie comme celle de la figure 6B montre que le processus est biphasique et que chacune des deux constantes de vitesse d'inactivation est proportionnelle à la concentration en H_2 (figure 6C). Cela donne une information cruciale : l'inactivation résulte de la fixation non productive du dihydrogène pour former deux états inactifs distincts, ce qui implique l'existence d'autres sites de fixation de H_2 que le site de coordination « normal » marqué d'une étoile sur la figure 6A. Seul le déplacement des ligands CO intrinsèques peut libérer des sites de coordination pour la fixation de H_2 . La structure cristallographique suggère que le cycle aromatique d'une phénylalanine conservée (figure 6A) empêche le mouvement de ces ligands, mais des calculs de dynamique moléculaire montrent au contraire que l'environnement du site actif est suffisamment flexible pour que l'isomérisation du site actif se produise. Des calculs DFT montrent que le dihydrogène peut alors se fixer sur les sites de coordination ainsi libérés (cercles turquoise sur les panels 6E et F) pour former des états inactifs.

Le résultat d'une expérience de mutagenèse dirigée confirme que la chaîne latérale de la phénylalanine influence la vitesse d'isomérisation du site actif : on s'attend à ce que le fait d'augmenter le volume de cette chaîne latérale rende le mouvement du ligand CO plus difficile, et en effet, remplacer la phénylalanine par une tyrosine entraîne une forte diminution des vitesses d'inactivation. Enfin, puisque le site de coordination marqué d'une étoile sur la figure 6A est aussi la cible des inhibiteurs comme le monoxyde de carbone extrinsèque et le dioxygène, on prévoit que les états inactifs sont protégés de l'oxygène, ce qui est confirmé par des observations expérimentales.

C'est donc ici une combinaison d'informations issues de techniques très variées (mutagenèse dirigée, DFT, dynamique moléculaire, cinétique électrochimique) qui permet d'élucider le mécanisme d'inactivation de l'hydrogénase et de montrer que la flexibilité du site actif autorise une chimie de coordination plus riche qu'on ne pouvait l'imaginer [6b].

Un exemple d'interprétation de la forme des voltammogrammes catalytiques [7]

Dans une expérience de voltammétrie, le potentiel d'électrode E est balayé alternativement vers les hauts et les bas potentiels, avec une vitesse qui impose un certain temps caractéristique. La figure 7 illustre quelques formes de réponses électrochimiques (des « voltammogrammes ») obtenues avec des enzymes adsorbées, sur lesquelles nous avons travaillé. Dans certains cas, la réponse électrochimique catalytique est stationnaire (indépendante de la vitesse v et du sens du balayage), avec une forme sigmoïdale simple (panel A) ou complexe (panels B et E). De nombreux modèles sont maintenant disponibles pour interpréter ces signaux stationnaires, en lien avec le mécanisme catalytique de l'enzyme, la cinétique de transfert d'électron intramoléculaire (le long des chaînes de centres redox qui conduisent les électrons entre le site actif et la surface de l'enzyme) et la cinétique de fixation du substrat [2a, 4].

Il arrive aussi souvent que la réponse électrochimique présente une hystérésis qui résulte de la transformation lente de l'enzyme en réponse au changement de potentiel (panels C, D et F), comme cela a été évoqué plus haut pour l'hydrogénase FeFe. Le voltammogramme peut alors être simulé en multipliant la réponse électrochimique stationnaire de la

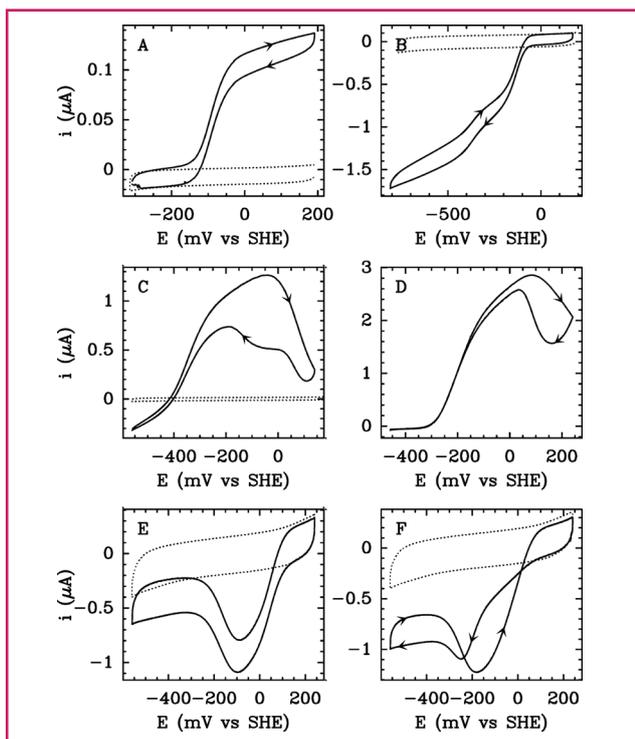


Figure 7 - Collection de voltammogrammes catalytiques aux formes complexes, obtenus avec des enzymes échangeant des électrons directement avec une électrode tournante.

Les courants positifs (resp., négatifs) révèlent une réaction d'oxydation (resp., de réduction). Les flèches indiquent le sens du balayage du potentiel. Panel A : oxydation du succinate par la fumarate réductase de *Escherichia coli* ; B : réduction du fumarate par la fumarate réductase de *E. coli* ; C et D : oxydation du dihydrogène par un mutant de l'hydrogénase de *Chlamydomonas reinhardtii* et l'hydrogénase sauvage de *Aquifex aeolicus* ; E et F : réduction du nitrate par la nitrate réductase de *Rhodobacter sphaeroides*. Les traits pointillés sont des voltammogrammes de contrôle, enregistrés sans enzyme, ne montrant que le courant capacitif.

forme active de l'enzyme par la fraction non stationnaire d'enzyme dans la forme active [6b, 7ab].

Les figures 7D et 8A montrent des signaux typiques obtenus avec des hydrogénases NiFe ; cette enzyme s'inactive dans des conditions très oxydantes – ce qui entraîne une diminution du courant lorsqu'on augmente le potentiel d'électrode –, et se réactive lors du balayage retour. Cette transformation entre formes actives et inactives étant lente devant l'échelle de temps du voltammogramme, la forme de ce dernier dépend beaucoup de la vitesse de balayage (v) : l'hystérésis s'atténue quand l'inactivation n'a pas le temps d'avancer pendant la durée d'enregistrement du signal, à haute vitesse de balayage. Comme exemple illustrant l'interprétation quantitative de ces signaux complexes, nous avons choisi de montrer ici qu'on peut obtenir simplement une information importante en examinant la façon dont la position du point d'inflexion sur le scan retour dépend de la vitesse de balayage. Ce potentiel est traditionnellement appelé E_{sw} (sw : « switch ») et on a indiqué sa valeur avec des traits verticaux sur la figure 8A.

La figure 8B montre un exemple d'expérience de chronoampérométrie. L'analyse des relaxations monoexponentielles du courant après chaque échelon de potentiel permet de déterminer la constante de temps de conversion entre les formes actives et inactives, dont les variations en fonction du potentiel d'électrode sont représentées par des carrés sur le panel C. Notons que cette constante de temps est reliée aux constantes de vitesse du premier ordre pour les réactions lentes d'activation et d'inactivation, k_a et k_i , par :

$$1/\tau = k_i + k_a \quad (1)$$

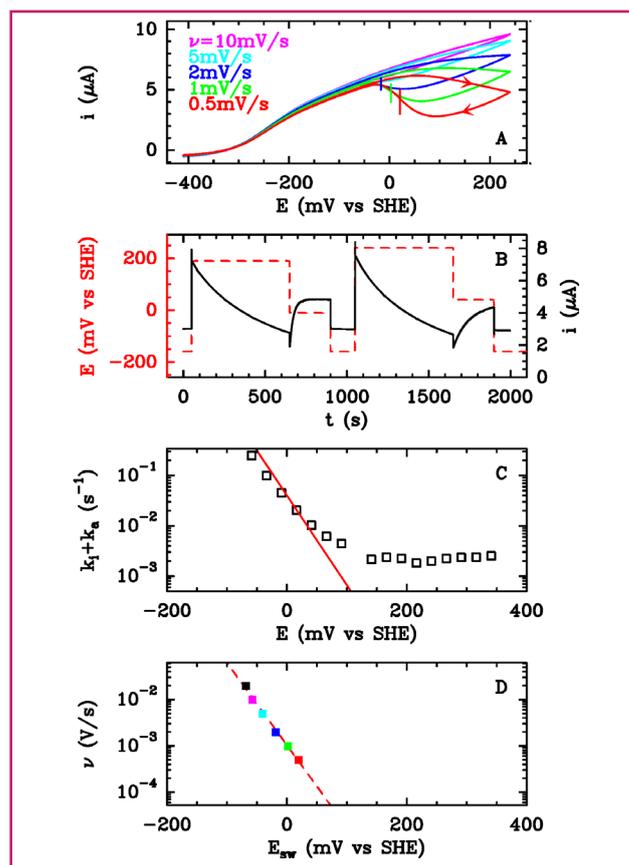


Figure 8 - Exemple d'interprétation de voltammogrammes catalytiques obtenus avec l'hydrogénase NiFe, et dont la forme dépend beaucoup de la vitesse de balayage (panel A) et témoigne de l'inactivation lente et réversible de l'enzyme en condition oxydantes.

Les chronoampérométries du panel B permettent de déterminer la dépendance en potentiel de la somme des constantes de vitesse d'activation et d'inactivation tracées sur le panel C. Le panel D montre la dépendance en fonction de la vitesse de balayage (v) de la position du point d'inflexion sur le scan retour du voltammogramme (ce potentiel est marqué de traits verticaux sur le panel A ; on utilise le même code couleur sur les panels A et D). Son paramétrage par une droite (éq. 4) permet de recalculer la dépendance en fonction du potentiel d'électrode de la vitesse d'inactivation (dans la gamme de potentiel qui correspond à la réactivation sur le voltammogramme), tracée en rouge sur le panel C.

À relativement bas potentiel ($E < 100$ mV), k_a est beaucoup plus grand que k_i et varie de façon exponentielle avec le potentiel d'électrode (figure 7C) :

$$k_a(E) = k \exp \frac{F}{RT} E \quad (2)$$

C'est ce qui entraîne une augmentation très brutale de la fraction active de l'enzyme et du courant sur le scan retour (figure 8A). À plus haut potentiel, k_i est plus grand que k_a et ne dépend pas du potentiel (figure 8C).

On peut interpréter la position du point d'inflexion sur le scan retour par analyse dimensionnelle [7a] : on s'attend à ce que la réactivation apparaisse quand le temps caractéristique de la réactivation, $1/k_a$, devient du même ordre de grandeur que le temps caractéristique de l'expérience, soit :

$$k_a(E_{sw}) = \frac{Fv}{RT} \quad (3)$$

Cette équation peut être démontrée rigoureusement (SI dans la référence [7b]) si on fait l'hypothèse que la réactivation est irréversible dans cette gamme de potentiel et qu'elle se produit avec une vitesse donnée par l'équation 2. On réalise alors que les deux temps caractéristiques qu'il faut comparer

sont en fait celui de la réactivation et celui de la croissance de la vitesse de réactivation quand le potentiel décroît.

En combinant les équations 2 et 3, on prédit simplement que la valeur de E_{sw} varie linéairement avec le logarithme de la vitesse de balayage :

$$E_{sw} = -\frac{RT}{F} \ln \frac{F}{RTk} - \frac{RT}{F} \ln v \quad (4)$$

comme cela est en effet observé dans les expériences (figure 7D). La variation de k_a avec E , recalculée avec l'équation 2 après avoir paramétré les données de la figure 7D avec l'équation 4, est montrée par une droite sur le panel C : l'accord avec les résultats des expériences de chronoampérométrie démontre la cohérence de l'analyse.

On retient que la position du point d'inflexion sur le scan retour est entièrement déterminé par la cinétique de réactivation (et n'est donc pas, contrairement à une hypothèse courante [7c], le potentiel de réduction de la forme inactive), et qu'il est possible d'interpréter les voltammogrammes enregistrés à différentes vitesses de balayage pour mesurer la dépendance en potentiel de la vitesse de réactivation de l'hydrogénase. Cette méthode simple et rapide nous a permis de cribler des mutants de l'hydrogénase NiFe, dont il est nécessaire d'optimiser les propriétés en vue de leur utilisation dans certaines applications [7b].

Conclusion et perspectives

L'électrochimie est un outil remarquable pour les études de réactivité parce qu'elle permet de déclencher et de suivre les réactions chimiques redox avec une grande précision et résolution temporelle. Cette technique s'est imposée pour l'étude des réactions chimiques provoquées par les transferts d'électrons [8a], mais aussi, dans le domaine de la biologie, pour l'étude de certains phénomènes cellulaires [8b]. Cette même configuration permet aussi d'utiliser les enzymes redox dans des dispositifs biotechnologiques, comme cela a été récemment décrit dans ce journal [8c]. Nous avons voulu montrer ici que la connexion directe d'une enzyme redox avec une électrode peut donner des informations fines sur des étapes très différentes du mécanisme catalytique (y compris des étapes non redox du mécanisme), pourvu que la mesure soit interprétée quantitativement, intégrée à une approche de mutagenèse dirigée, et comparée à des modèles cinétiques et des résultats de calculs de chimie théorique. Notre équipe explore en ce moment ce type d'approche pluridisciplinaire en s'intéressant à une autre enzyme complexe, qui utilise un cofacteur à nickel et fer pour catalyser la conversion du dioxyde de carbone en CO. Comprendre le mécanisme de cette réaction est crucial, maintenant qu'on ne peut plus douter de l'effet sur le climat de l'augmentation de la concentration en CO₂ dans l'environnement.

Cette recherche n'existerait pas sans une étroite collaboration avec de nombreux groupes de biochimistes, en particulier ceux de Marie-Thérèse Giudici-Ortoni, Myriam Brugna et Axel Magalon (CNRS Marseille), et David Pignol (CEA, Cadarache), Hervé Bottin (CEA Saclay), Philippe Soucaille (INSA Toulouse), que les auteurs tiennent à remercier chaleureusement.

Références

- [1] Léger C., Dementin S., Structure et fonction des hydrogénases, in *L'énergie à découvert*, CNRS Éditions, 2013.
 [2] a) Léger C., Bertrand P., Direct electrochemistry of redox enzymes as a tool for mechanistic studies, *Chem. Rev.*, 2008, 108, p. 2379 ; b) Savéant J.M., *Elements of Molecular and Biomolecular Electrochemistry: An Electrochemical Approach to Electron Transfer Chemistry*, Wiley-Blackwell, 2006.

- [3] a) Allongue P., Delamar M., Desbat B., Fagebaume O., Hitmi R., Pinson J., Savéant J.M., Covalent modification of carbon surfaces by aryl radicals generated from the electrochemical reduction of diazonium salts, *J. Am. Chem. Soc.*, 1997, 119, p. 201 ; b) Rüdiger O., Abad J.M., Hatchikian E.C., Fernandez V.M., De Lacey A.L., Oriented immobilization of desulfurovibrio gigas hydrogenase onto carbon electrodes by covalent bonds for non-mediated oxidation of H₂, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, 127, p. 16008 ; c) Baffert C., Sybirna K., Ezanno P., Lautier T., Hajj V., Meynial-Salles I., Soucaille P., Bottin H., Léger C., Covalent attachment of FeFe hydrogenases to carbon electrodes for direct electron transfer, *Anal. Chem.*, 2012, 84, p. 7999.
 [4] a) Léger C., Jones A.K., Albracht S.P.J., Armstrong F.A., Effect of a dispersion of interfacial electron transfer rates on steady state catalytic electron transport in [Ni-Fe]-hydrogenase and other enzymes, *J. Phys. Chem. B*, 2002, 106, p. 13058 ; b) Bertrand P., Frangioni B., Dementin S., Sabaty M., Arnoux P., Guigliarelli B., Pignol D., Léger C., Effects of slow substrate binding and release in redox enzymes: theory and application to periplasmic nitrate reductase, *J. Phys. Chem. B*, 2007, 111, p. 10300 ; c) Fourmond V., Baffert C., Sybirna K., Lautier T., Abou Hamdan A., Dementin S., Soucaille P., Meynial-Salles I., Bottin H., Léger C., Steady-state catalytic wave-shapes for 2-electron reversible electrocatalysts and enzymes, *J. Am. Chem. Soc.*, 2013, 125, p. 3926.
 [5] a) Leroux F., Dementin S., Burlat B., Cournac L., Volbeda A., Champ S., Martin L., Guigliarelli B., Bertrand P., Fontecilla-Camps J., Rousset M., Léger C., Experimental approaches to kinetics of gas diffusion in hydrogenase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2008, 105, p. 11188 ; b) Liebgott P.-P., Leroux F., Burlat B., Dementin S., Baffert C., Lautier T., Fourmond V., Ceccaldi O., Cavazza C., Meynial-Salles I., Soucaille P., Fontecilla-Camps J., Guigliarelli B., Bertrand P., Rousset M., Léger C., Relating diffusion along the substrate tunnel and oxygen sensitivity in hydrogenase, *Nat. Chem. Biol.*, 2010, 6, p. 63 ; c) Wang P.H., Blumberger J., Mechanistic insight into the blocking of CO diffusion in [NiFe]-hydrogenase mutants through multiscale simulation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2012, 109, p. 6399 ; d) Abou Hamdan A., Dementin S., Liebgott P.P., Gutierrez-Sanz O., Richaud P., De Lacey A.L., Rousset M., Bertrand P., Cournac L., Léger C., Understanding and tuning the catalytic bias of hydrogenase, *J. Am. Chem. Soc.*, 2012, 134, p. 8368.
 [6] a) Miyake T., Bruschi M., Cosentino U., Baffert C., Fourmond V., Léger C., Moro G., De Gioia L., Greco C., Does the environment around the H-cluster allow coordination of the pendant amine to the catalytic iron center in [FeFe] hydrogenases? Answers from theory, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2013, 18, p. 693 ; b) Fourmond V., Greco C., Sybirna K., Baffert C., Wang P.H., Ezanno P., Montefiori M., Bruschi M., Meynial-Salles I., Soucaille P., Blumberger J., Bottin H., De Gioia L., Léger C., The oxidative inactivation of FeFe hydrogenase reveals the flexibility of the H-cluster, *Nature Chem.*, 2014.
 [7] a) Fourmond V., Infossi P., Guidici-Ortoni M.T., Bertrand P., Léger C., Two-step chronoamperometric method for studying the anaerobic inactivation of an oxygen tolerant NiFe hydrogenase, *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, 132, p. 4848 ; b) Abou Hamdan A., Liebgott P.P., Fourmond V., Gutierrez-Sanz O., De Lacey A.L., Infossi P., Rousset M., Dementin S., Léger C., Relation between anaerobic inactivation and oxygen tolerance in a large series of NiFe hydrogenase mutants, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2012, 109, p. 19916 ; c) Vincent K.A., Parkin A., Armstrong F.A., Investigating and exploiting the electrocatalytic properties of hydrogenases, *Chem. Rev.*, 2007, 107, p. 4366.
 [8] a) Robert M., Costentin C., L'électrochimie moléculaire pour sonder les secrets de la réactivité redox, *L'Act. Chim.*, 2009, 333, p. 25 ; b) Amatore C., Arbault A., Guille M., Lemaître F., Synapses artificielles et stress oxydant, *L'Act. Chim.*, 2011, 348-349, p. 25 ; c) Tingry S., Cretin M., Innocent C., Les biopiles enzymatiques pour produire de l'électricité, *L'Act. Chim.*, 2013, 373, p. 18.



C. Baffert



S. Dementin



V. Fourmond



C. Léger

Carole Baffert est maître de conférences, Aix Marseille Université, Sébastien Dementin et Vincent Fourmond, chargés de recherche au CNRS, et Christophe Léger (auteur correspondant), directeur de recherche au CNRS, Laboratoire de Bioénergétique et Ingénierie des Protéines, Aix Marseille Université*.

* Laboratoire de Bioénergétique et Ingénierie des Protéines, UMR 7281 CNRS/Aix-Marseille Université, 31 chemin Joseph Aiguier, F-13402 Marseille Cedex 20. Courriel : christophe.leger@imm.cnrs.fr http://bip.cnrs-mrs.fr/bip06