

L'électroenzymologie, un outil pour étudier les enzymes redox

Vincent Fourmond

Résumé Connecter directement des enzymes redox à des électrodes permet de tirer parti de leurs performances catalytiques pour construire des dispositifs biotechnologiques comme des biocapteurs ou des biopiles. L'électrochimie directe des protéines consiste à immobiliser des enzymes redox sur des électrodes dans une configuration autorisant un transfert d'électrons direct, ce qui permet de mesurer leur activité catalytique et la manière dont elle varie afin d'étudier différents aspects de leur réactivité. Tout comme les techniques d'enzymologie classique en solution, l'électrochimie directe des protéines permet de déterminer des paramètres enzymatiques classiques, comme des constantes de Michaelis et des constantes d'inhibition. Cependant, la possibilité de varier très rapidement et dans une large gamme la force motrice de la réaction catalytique, *via* le potentiel d'électrode, donne accès à de nombreuses informations originales sur le mécanisme catalytique d'enzymes et sur leur réactivité. Cet article dresse un panorama des différentes manières dont on peut utiliser l'électrochimie directe des protéines, l'« électroenzymologie », pour étudier des enzymes redox.

Mots-clés Chimie bioinorganique, enzymes redox, études mécanistiques, enzymologie.

Abstract **Electroenzymology: a tool to study redox enzymes** Redox enzymes may be directly connected to electrodes to take advantage of their outstanding catalytic properties, to build biofuel cells or biosensors. Direct electrochemistry consists in immobilizing redox enzymes onto electrodes in a configuration that permits direct electron transfer. This makes it possible to measure their catalytic activity, and how it varies, in order to study various aspects of their reactivity. Like traditional solution enzymology, direct electrochemistry can be used to determine enzymatic parameters like Michaelis constants and inhibition constants. However, the possibility to rapidly change the driving force of the reaction *via* the potential applied to the electrode can be used to obtain original informations about the catalytic mechanism of enzymes and other aspects of their reactivity. This article draws a picture of the ways direct electrochemistry, "electroenzymology", can be used to study redox enzymes.

Keywords Bioinorganic chemistry, redox enzymes, mechanistic studies, enzymology.

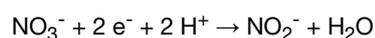
Les électrochimistes ont longtemps pensé que les enzymes redox étaient trop grandes et trop complexes pour interagir directement avec des électrodes, et qu'il était indispensable d'utiliser de petites molécules redox jouant le rôle de médiateurs pour que les échanges d'électrons soient possibles. Ce n'est qu'au cours des années 1980 qu'ils ont mis au point les premières électrodes permettant des transferts directs, comme des électrodes d'or modifiées avec des thiols ou des électrodes de graphite dites « edge », dans lesquelles les plans de graphite sont perpendiculaires à la surface de l'électrode. L'immobilisation d'enzymes sur des électrodes a permis de les utiliser dans des dispositifs biotechnologiques, par exemple pour construire des biocapteurs dits « de troisième génération » (enzyme immobilisée avec transfert électronique direct), qui tirent parti de la grande sélectivité et réactivité des catalyseurs naturels avec leur substrat dans le but d'en détecter de faibles quantités dans des milieux complexes, ou bien pour construire des biopiles à combustibles qui exploitent les performances exceptionnelles des enzymes tant en termes de vitesse de catalyse que d'efficacité énergétique pour générer de l'électricité à partir de combustibles variés (comme l'hydrogène ou le glucose).

La connexion directe d'enzymes redox à des électrodes a aussi donné naissance à une nouvelle discipline dont la vocation est l'étude du mécanisme de ces catalyseurs complexes : l'électrochimie directe de films protéiques [1-4].

Cette technique, originaire initialement du laboratoire de Fraser Armstrong à Oxford [2], consiste à immobiliser une enzyme sur une électrode dans une configuration telle que le transfert d'électron est direct et rapide (*figure 1*) : l'électrode se substitue ainsi au partenaire redox naturel de l'enzyme. Cette technique a été utilisée depuis plus de deux décennies pour étudier le mécanisme d'enzymes variées, comme les hydrogénases [5], qui oxydent et produisent H₂, des enzymes de la chaîne respiratoire mitochondriale comme la fumarate réductase, des enzymes à molybdène [6] comme les nitrate réductases, les formiate déshydrogénases, les sulfite oxydases, et plus récemment les nitrogénases, ou encore les CO déshydrogénases (qui oxydent CO en CO₂), et bien d'autres encore.

Un article précédent a déjà traité de l'utilisation de la combinaison de l'électrochimie directe avec des méthodes de chimie théorique pour l'étude de mécanismes enzymatiques [1]. Ce présent article se focalise plus sur les aspects cinétiques de l'électrochimie directe et sur la richesse des informations obtenues grâce au contrôle de la force motrice de la réaction offert par cette technique.

Prenons comme exemple la nitrate réductase, qui catalyse la réduction du nitrate en nitrite grâce à un cofacteur à molybdène (*figure 1*, gauche) :



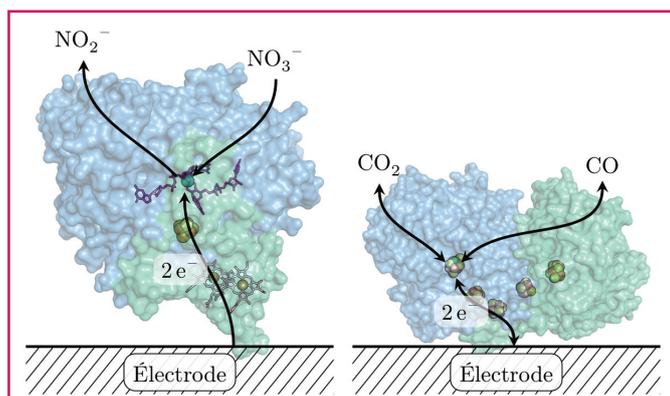


Figure 1 - Schéma de principe de l'électrochimie directe, avec à gauche la nitrate réductase périplasmique, et à droite la CO déshydrogénase, les deux principales enzymes discutées dans cet article.

Placée en présence de nitrate, si le potentiel appliqué à l'électrode est suffisamment réducteur, la nitrate réductase catalyse la réduction du nitrate. En conditions stationnaires, pour chaque molécule de nitrate réduite, deux électrons sont prélevés à l'électrode : l'activité catalytique de l'enzyme se traduit donc par un courant électrique dont l'intensité est proportionnelle au nombre de molécules de nitrate réduites par unité de temps, donc à la fréquence de turnover de l'enzyme⁽¹⁾. Pour suivre les variations de l'activité catalytique, il suffit donc de suivre les variations de courant en fonction des conditions expérimentales ; c'est pourquoi l'électrochimie directe se rapproche des techniques classiques d'enzymologie. L'électrochimie directe a cependant de nombreux avantages sur l'enzymologie traditionnelle :

- Elle est très peu gourmande en matériel biologique, puisqu'une journée de travail nécessite typiquement une centaine de picomoles d'enzyme, voire beaucoup moins, ce qui est appréciable pour travailler sur des enzymes difficiles à produire.
- Elle offre une résolution temporelle beaucoup plus grande que l'enzymologie classique (il suffit pour cela de choisir la fréquence à laquelle on échantillonne le courant, typiquement dix fois par seconde), ce qui permet de suivre des processus d'activation ou d'inactivation au cours du temps.
- Puisque l'enzyme est immobilisée sur l'électrode, il suffit de changer le tampon de la cellule électrochimique pour changer les conditions de l'expérience (pH, concentration en substrats), nul besoin de consommer à nouveau de l'enzyme.
- Enfin, et c'est sans doute le point le plus important, elle offre un grand contrôle sur un paramètre qu'il est en général difficile de maîtriser en solution : l'état redox de l'enzyme, ou de manière équivalente, la force motrice de la réaction, via le potentiel appliqué à l'électrode.

Ce dernier aspect est particulièrement important puisqu'il introduit une dimension expérimentale nouvelle, le potentiel, qu'il est facile de faire varier pour en étudier l'effet. Cette dimension supplémentaire est déterminante car, comme il sera montré plus loin, c'est souvent en faisant varier le potentiel qu'on arrive à comprendre les phénomènes observés. C'est à cause de cette dimension, absente en enzymologie traditionnelle, que l'on peut nommer cette nouvelle discipline l'électroenzymologie [7]. Le but de cet article est d'illustrer les différentes manières dont on peut utiliser l'électroenzymologie pour étudier divers aspects du fonctionnement de métalloenzymes redox complexes.

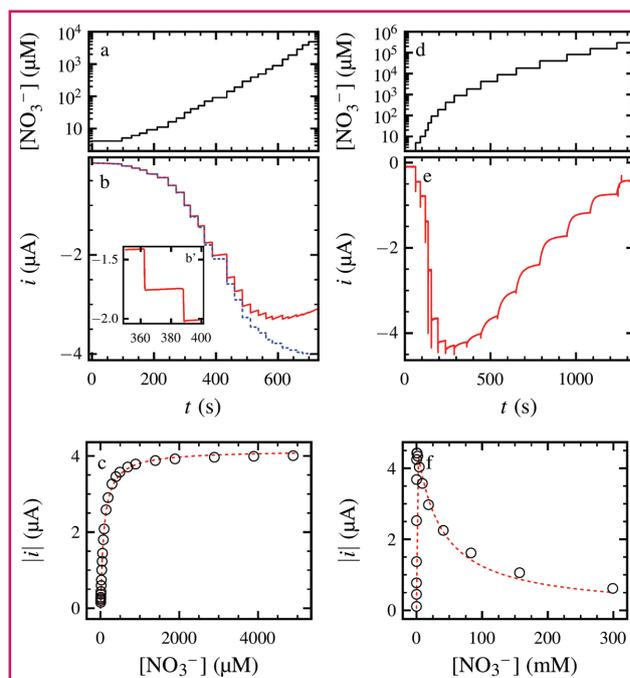


Figure 2 - Dépendance en fonction de la concentration de la nitrate réductase périplasmique. b et e : réponses en courant au cours du temps à des additions successives de nitrate (les concentrations sont données en a et d, respectivement). b' (à l'intérieur de b) : vue rapprochée de deux des sauts de courant. c et f : courant en fonction de la concentration (cercles) et modélisation des données (lignes). Conditions : a, b, c : pH 7 (données tirées de [8]) ; d, e, f : pH 6 (données tirées de [9]).

Enzymologie classique par électrochimie directe

L'électroenzymologie est bien une technique d'enzymologie, puisqu'en utilisant l'électrochimie directe, il est facile et rapide de déterminer les paramètres « classiques » de l'enzymologie, comme la constante de Michaelis (K_m) d'une enzyme pour son substrat. La figure 2b montre une expérience typique pour mesurer le K_m d'une nitrate réductase (ou de n'importe quelle enzyme avec un substrat non gazeux) : elle consiste, à un potentiel donné où l'enzyme est capable de réduire le nitrate, à augmenter petit à petit la concentration en nitrate par paliers (en injection dans la cellule électrochimique de quantités croissantes de solution concentrée, la concentration au cours du temps est montrée sur la figure 2a) et de mesurer l'évolution du courant résultant au cours du temps.

L'utilisation d'une électrode tournante induit un flux de tampon électrochimique en direction de l'électrode, de sorte à minimiser la déplétion en substrat due à sa consommation à l'électrode. Ainsi, le produit ne s'accumule jamais à proximité de l'électrode. À chaque addition de substrat, le courant augmente instantanément en valeur absolue, ce qui traduit le déplacement du cycle catalytique vers un nouvel état stationnaire (ce changement se manifeste par des sauts abrupts à chaque injection de nitrate sur la figure 2b, particulièrement visibles sur l'agrandissement de la figure 2b'). En traçant la valeur absolue du courant en fonction de la concentration en substrat (figure 2c), on obtient une courbe de saturation typique du comportement de Michaelis-Menten, qu'il suffit de modéliser pour obtenir K_m . La décroissance lente de l'amplitude du courant entre chaque injection correspond à la « perte

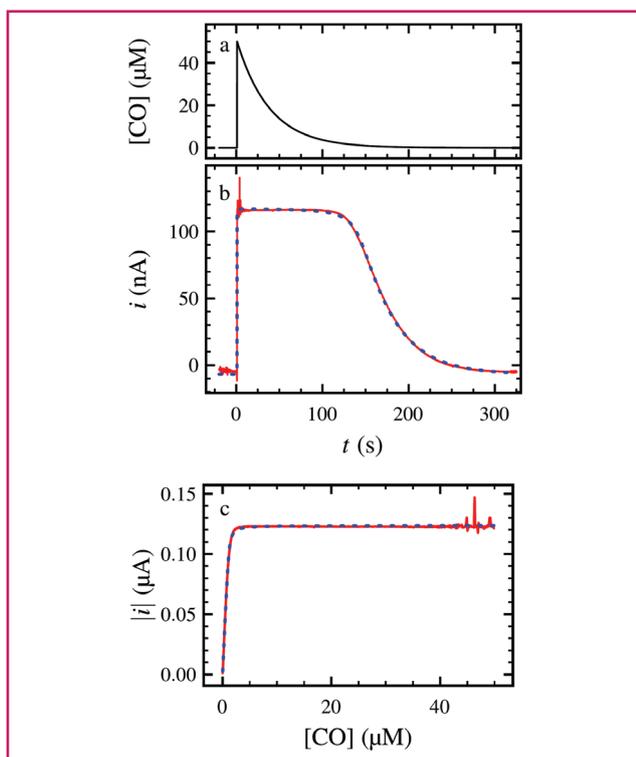


Figure 3 - Détermination de la constante de Michaelis de la CO déshydrogénase. b : réponse en courant à une unique injection de CO (courbe rouge) ; a : concentration de CO au cours du temps ; c : courant en fonction de la concentration en CO (données tirées de [10]). Dans b et c, la courbe en pointillés bleus est une modélisation du signal [11].

de film », la désorption des enzymes, que l'on peut corriger avec une analyse appropriée des données [8] (c'est ce qui est fait sur la courbe en pointillés bleus de la *figure 2b*). En utilisant cette technique d'injections successives, il ne faut qu'une dizaine de minutes pour obtenir une valeur fiable de K_m .

La dépendance de l'activité en fonction de la concentration en substrat ne suit pas toujours une loi de Michaelis-Menten. Par exemple, à bas pH, la nitrate réductase est inhibée par un excès de son substrat, ce qui se traduit par une décroissance du courant au fur et à mesure que l'on ajoute du nitrate, une fois passé un certain seuil (*figure 2def*). L'électroenzymologie permet de mettre en évidence et de caractériser ce type d'inhibition ; nous y reviendrons plus loin.

Dans le cas d'enzymes transformant des substrats gazeux, comme les CO déshydrogénases, qui oxydent le monoxyde de carbone en CO_2 , il est possible d'explorer une large gamme de concentration en quelques minutes, en tirant parti des échanges de gaz entre le tampon de la cellule électrochimique et l'atmosphère. Pour une cellule électrochimique ouverte, la concentration des gaz dissous relaxe de manière mono-exponentielle vers la concentration en équilibre avec l'atmosphère. La *figure 3b* montre la réponse en courant d'un film de CO déshydrogénase à une injection d'un aliquot de solution saturée en CO. Après l'augmentation instantanée au moment de l'injection (à $t = 0$), le courant reste quasiment constant pendant environ 120 s, signe que la concentration en CO est supérieure au K_m de l'enzyme : cette dernière reste saturée. Vers $t = 150$ s, une fois que la concentration en CO est descendue en dessous de K_m , le courant commence à décroître et finit par tomber à zéro. Une modélisation appropriée de ce type de courbes permet de déterminer le K_m de l'enzyme [11], avec une unique injection de

substrat. La CODH étudiée dans la *figure 3* présente une affinité très élevée pour CO, avec un K_m de l'ordre de 50 nM. Une valeur aussi basse est extrêmement difficile à mesurer avec des techniques d'enzymologie classique en solution, puisqu'il est nécessaire de détecter des variations de concentration en CO ou en partenaire redox de l'ordre de la dizaine de nM. Cette CODH est l'une des rares enzymes qui travaillent à la limite de diffusion [12] : dans la limite des basses concentrations, la vitesse de catalyse est seulement limitée par la vitesse à laquelle les molécules de CO atteignent le site actif de l'enzyme [10].

Le contrôle du potentiel, un atout pour décrypter la catalyse

La caractéristique qui différencie le plus les expériences d'électrochimie directe des expériences d'enzymologie classique est peut-être la possibilité de contrôler finement les conditions redox au moyen du potentiel appliqué à l'électrode. Ainsi, l'une des expériences les plus simples à réaliser (mais pas forcément à interpréter !) avec une enzyme sur une électrode est de la mettre en présence de son substrat et d'enregistrer un voltammogramme cyclique, qui consiste à balayer linéairement le potentiel d'électrode entre deux bornes et à enregistrer le courant en fonction du potentiel. Dans le cas où la réponse enzymatique est stationnaire, la courbe que l'on obtient, appelée « vague catalytique », reflète la dépendance de la fréquence de turnover de l'enzyme en fonction de la force motrice de la réaction. La forme que prend cette courbe et la manière dont elle évolue en fonction des conditions expérimentales (concentration en substrat, pH, etc.) peuvent apporter de nombreuses informations sur le mécanisme d'une enzyme.

Formellement, le potentiel appliqué à l'électrode s'apparente à une « concentration en électrons », ou plutôt à son logarithme. Considérons une enzyme qui réalise une oxydation à un électron ; il est possible que sa vague catalytique ressemble à celle de la *figure 4a*. Il s'agit d'une sigmoïde centrée sur un potentiel dont la valeur dépend du mécanisme catalytique et des divers paramètres des réactions : potentiels redox de l'enzyme bien sûr, mais aussi potentiellement les constantes de vitesse de toutes les réactions impliquées dans la catalyse. De même que K_m n'est strictement égal à une constante de dissociation que dans des cas bien particuliers [13], le potentiel de la vague n'est un « vrai » potentiel de réduction que sous certaines conditions.

La courbe de la *figure 4a* est identique à une courbe de Michaelis-Menten classique, pour peu qu'on la trace avec la concentration en échelle log, avec une correspondance de 60 mV par décade de concentration (c'est ce qui est fait sur la *figure 4b*, la *figure 4c* montre la manière « classique » de représenter les courbes de Michaelis-Menten). Le K_m de la courbe de la *figure 4b* a le même rôle que le potentiel de la vague dans la *figure 4a*. La comparaison s'arrête là. En effet, contrairement à la concentration de substrat en enzymologie classique, on peut faire varier instantanément cette « concentration d'électrons » de manière arbitraire, et sur une gamme très vaste (une fenêtre de 800 mV, relativement courante, correspond à environ treize ordres de grandeur de concentration !), ce qui permet de découvrir des comportements complexes.

L'un des exemples de ces comportements complexes est donné par la nitrate réductase. La *figure 5a* montre quelques voltammogrammes d'un film de nitrate réductase en présence de différentes concentrations de nitrate. Avant

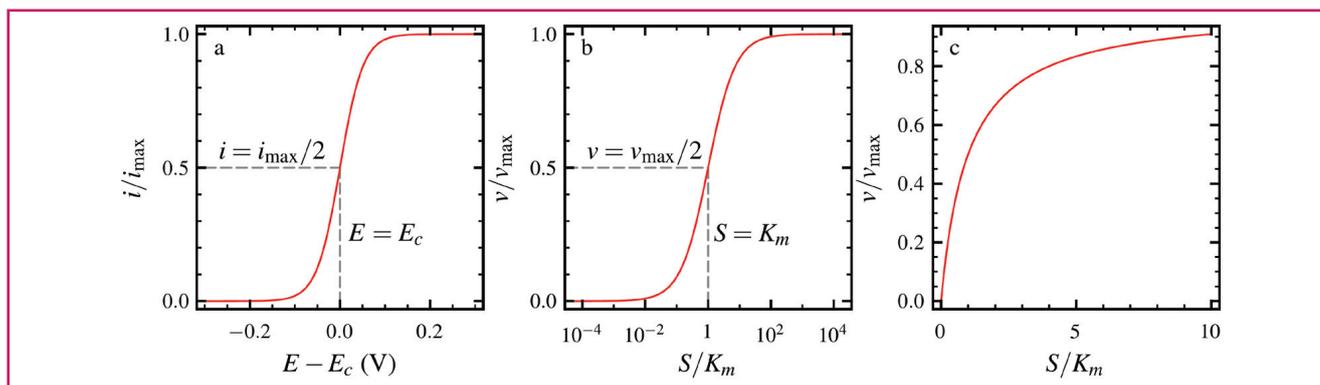


Figure 4 - a : forme de la vague ($i = f(E)$) d'une enzyme hypothétique catalysant une réaction d'oxydation à un électron. b : activité catalytique d'une enzyme suivant la loi de Michaelis-Menten en fonction de la concentration en substrat (en échelle logarithmique). c : mêmes données que sur b, mais présentées sous forme « classique », avec une échelle linéaire en abscisse.

d'interpréter la réponse enzymatique proprement dite, remarquons d'abord que dans ces voltammogrammes, le courant des scans vers les bas potentiels est décalé de celui des scans en direction des hauts potentiels⁽²⁾ par ce que l'on appelle le courant capacitif, qui correspond à la réponse de l'électrode seule (figure 5a, courbe en pointillés noirs). Une fois que l'on a soustrait ce courant capacitif des autres voltammogrammes, on obtient des courbes où les scans dans les deux directions sont superposés (figure 5b), ce qui signifie que dans cette expérience, l'activité enzymatique est en permanence à l'état stationnaire : il n'y a aucune évolution au cours du temps. À haut potentiel, l'enzyme est trop oxydée pour être en mesure de réduire le nitrate : il n'y a donc pas de courant. À plus bas potentiel, un courant de réduction catalytique du nitrate apparaît, et croît en valeur absolue jusqu'à l'obtention d'un plateau à des potentiels intermédiaires (noté par un * sur la figure 5b), puis décroît en valeur absolue à plus bas potentiel, bien que la force motrice de la réaction continue à augmenter. Ce comportement contre intuitif, où la vitesse

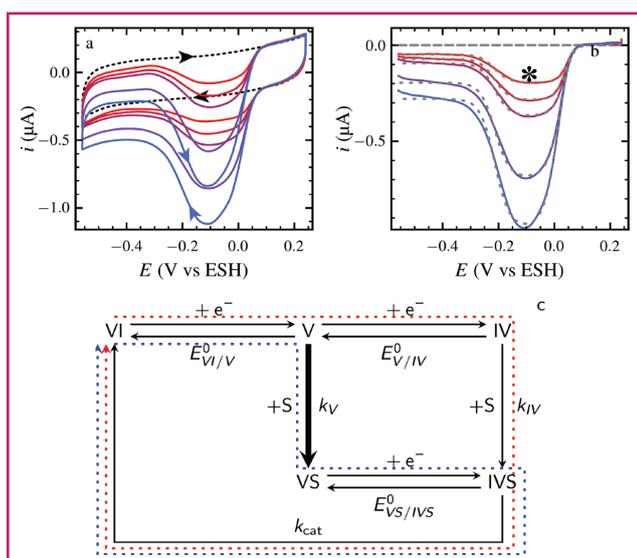


Figure 5 - **Forme de la vague de la nitrate réductase périplasmique.** a : voltammogrammes en présence de différentes concentrations croissantes de nitrate (de 1 μM pour la courbe rouge à 15 μM pour la bleue), la courbe noire en pointillés est obtenue en absence de nitrate. b : données de a après soustraction de la ligne de base, avec un fit du modèle de c (même code couleur). c : modèle utilisé pour ajuster les données de b.

d'une réaction diminue bien que sa force motrice augmente, n'est pas unique à la nitrate réductase, mais a été observé pour de nombreuses enzymes redox ; c'est par exemple le cas de l'une des toutes premières enzymes étudiées par électrochimie directe, la succinate déshydrogénase [14].

Dans le cas de la nitrate réductase, une explication relativement simple a été avancée. On sait que le site actif de l'enzyme, un centre à molybdène, peut se trouver sous trois états redox : Mo(IV), Mo(V) et Mo(VI). On peut expliquer quantitativement la forme des voltammogrammes de la figure 5b avec le schéma cinétique de la figure 5c, en formulant les hypothèses suivantes : (i) le substrat se lie irréversiblement aux formes V et IV ; (ii) la liaison du substrat sur la forme V est plus rapide que sur la forme IV ; et (iii) la réduction de l'état V lié au substrat (VS) est plus facile que celle de l'état V non lié au substrat [15-16]. Dans ces conditions, à potentiel intermédiaire, le chemin préférentiel de réduction du nitrate passe par VI, V, VS, IVS avant de revenir dans l'état de départ, VI (cycle en pointillés bleus dans la figure 5c). Au contraire, à bas potentiel, le chemin préférentiel est VI, V, IV puis IVS (cycle en pointillés rouges sur la figure 5c). Puisque la liaison du nitrate est plus rapide sur l'état V que sur l'état IV, le cycle à bas potentiel est plus lent que celui à potentiel intermédiaire, d'où la forme particulière du voltammogramme.

Pour aller plus loin, on peut dériver une équation prédisant la dépendance du courant en fonction du potentiel à partir du schéma cinétique de la figure 5c, et on l'ajuste aux données pour obtenir les différentes valeurs des constantes de vitesse et des potentiels (les ajustement du modèle sont donnés par les lignes en pointillés gris sur la figure 5b). La bonne qualité de l'ajustement permet de confirmer que le modèle de la figure 5c est suffisant pour reproduire les données expérimentales, et permet par ailleurs la détermination des constantes de vitesse et des potentiels du schéma 5c, ce qui ouvre la possibilité d'en étudier la variation en fonction des conditions expérimentales (température, pH, etc.) pour disséquer les étapes qui les constituent.

Le modèle de la figure 5c permet de reproduire les données expérimentales de manière adéquate, mais cette adéquation ne garantit pas que le modèle correspond au cycle catalytique réel de l'enzyme. Pour aller plus loin, il faut examiner la cohérence des données cinétiques et thermodynamiques obtenues par la modélisation avec ce qui est su par ailleurs de l'enzyme. Contrairement au cas de l'enzymologie classique, où l'expérimentateur dispose d'un arsenal de méthodes pour déterminer le mécanisme d'enzymes à plusieurs substrats (séquentiel, ping-pong, etc.), ce travail de

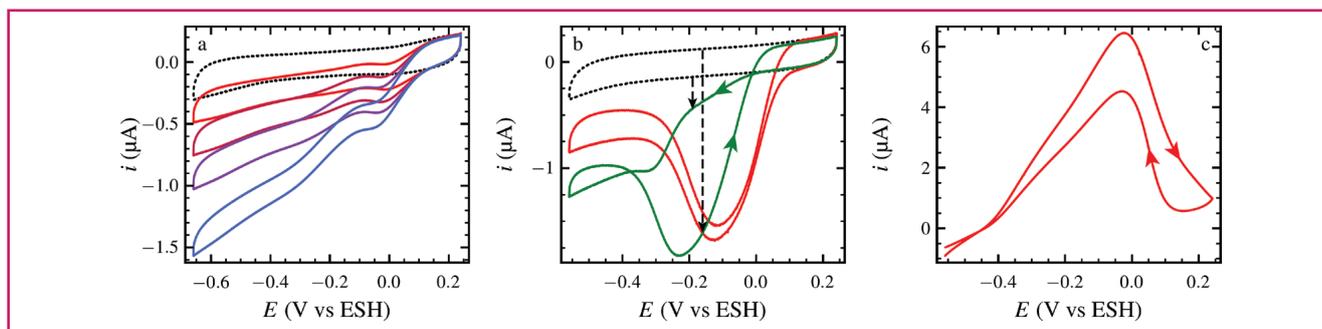


Figure 6 - **Autres exemples de formes de vagues complexes.** a : voltammogrammes de la nitrate réductase membranaire en présence de différentes concentrations de nitrate. b : voltammogrammes de la nitrate réductase périplasmique en présence de petites (courbe rouge, 100 μM) et grandes quantités (courbe verte, 300 mM) de nitrate ; ce dernier montre une hystérésis prononcée. c : voltammogramme de l'hydrogénase à fer d'algue verte, qui montre une hystérésis dans la région à haut potentiel.

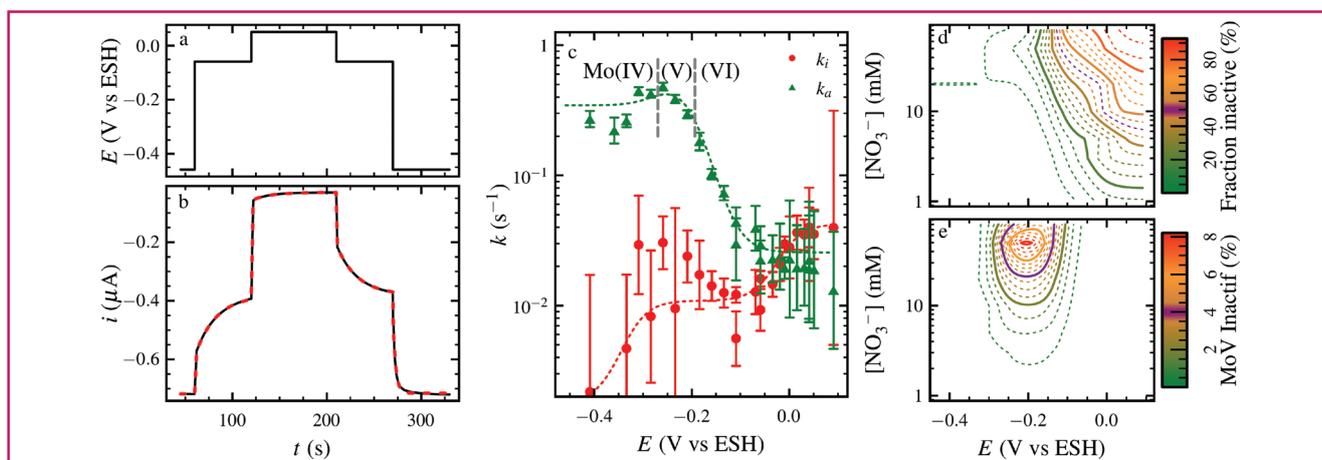


Figure 7 - **Étude de l'inactivation lente par excès de nitrate de la nitrate réductase.** a : série de pas de potentiels typiques utilisés pour l'étude. b : réponse en courant de la nitrate réductase à ces pas de potentiel, avec l'ajustement du modèle utilisé pour mesurer les constantes de vitesse (tracé en pointillés). c : dépendance en fonction du potentiel des constantes de vitesse d'inactivation et d'activation. d : fraction de l'enzyme dans la forme inactive en fonction du potentiel et de la concentration en nitrate. e : fraction de l'enzyme dans la forme inactive paramagnétique en fonction du potentiel et de la concentration en nitrate.

fond n'a pas encore été réalisé dans le cas de l'électroenzymologie et les travaux futurs devront porter sur la caractérisation de différents schémas cinétiques, ce qui sera nécessaire par exemple pour modéliser les vagues d'autres enzymes qui donnent des formes encore plus complexes, comme une autre nitrate réductase, celle-ci impliquée dans la respiration anaérobie de *E. coli* (figure 6a).

Évolutions au cours du temps : activations/inactivations

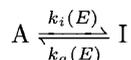
Souvent, les métalloenzymes s'inactivent dans des conditions redox particulières pour former des espèces qui peuvent à leur tour se réactiver. Si la formation et la réactivation de ces espèces inactives n'est ni trop lente ni trop rapide par rapport à l'échelle de temps d'un voltammogramme, ces changements se manifestent par des hystérésis dans les voltammogrammes. Nous avons vu plus haut que la nitrate réductase peut être inhibée par son substrat dans certaines conditions. Cette inhibition est lente et dépend des conditions redox, ce qui se traduit par des voltammogrammes ressemblant à ceux de la figure 6b, montrant une hystérésis particulièrement marquée. Par exemple, aux potentiels intermédiaires, le courant sur le scan en direction des bas potentiels est beaucoup plus petit en valeur absolue que sur le scan suivant, en direction

des hauts potentiels (flèches en pointillés sur la figure 6b), ce qui indique que l'enzyme s'est activée entre les deux passages à ce potentiel (donc à bas potentiel). Les cycles suivants ont exactement la même forme, ce qui implique que l'enzyme s'inactive à nouveau lors de son passage à haut potentiel. Ces phénomènes d'inactivation/activation dépendants du potentiel sont relativement courants ; la figure 6c montre l'exemple d'une hydrogénase, une enzyme qui catalyse l'oxydation de H_2 , dont les voltammogrammes présentent une hystérésis également très marquée (ce phénomène a été discuté en détail dans un précédent article de *L'Actualité Chimique* [1]).

Si ces processus d'inactivation/réactivation sont particulièrement aisés à mettre en évidence par voltammétrie cyclique, c'est en revanche rarement la meilleure manière de les étudier : il est en général préférable de séparer les effets du temps et du potentiel, et d'utiliser une série de pas de potentiels au cours desquels on suit l'évolution au cours du temps du courant, donc de l'activité, à potentiel constant.

C'est ce qui est illustré dans le cas de la nitrate réductase sur la figure 7. On impose une série de pas de potentiels en partant de conditions réductrices (où l'enzyme est complètement active), en montant à deux potentiels plus élevés et en revenant au potentiel initial (le potentiel au cours du temps est montré sur la figure 7a). Chaque saut de potentiel

s'accompagne d'un changement instantané du courant qui révèle un changement de la fréquence de turnover de la forme active en fonction du potentiel (c'est l'influence de la forme de la vague que l'on a discutée précédemment), suivi par une évolution lente du courant qui correspond à une inactivation ou une activation. Dans les cas simples comme celui de la nitrate réductase, l'évolution lente du courant est parfaitement modélisée par une relaxation exponentielle, ce qui signifie que le processus correspond à l'interconversion d'une forme active A avec une unique forme inactive I suivant une cinétique du premier ordre, avec une constante de vitesse d'inactivation k_i et une constante de vitesse de réactivation k_a :



Un tel modèle donne une évolution exponentielle du courant sur chaque pas. Une modélisation appropriée permet de déterminer les constantes de vitesse sur chaque pas, et donc, avec une série d'expériences à différents potentiels, leur dépendance en fonction du potentiel.

La dépendance de k_i et k_a en fonction du potentiel renseigne sur les états redox des formes de départ : k_i renseigne sur les états de la forme active et k_a sur la forme inactive. La *figure 7c* montre la dépendance en fonction du potentiel de k_i et k_a dans le cas de la nitrate réductase. Ces données sont compatibles avec la présence des espèces inactives et actives sous trois états redox, correspondant aux trois états redox possibles du site actif, Mo(VI), (V) et (IV). Des traits verticaux marquent les transitions entre les états redox en ce qui concerne l'espèce inactive.

Les données de la *figure 7c* montrent par ailleurs que l'inhibition est beaucoup plus prononcée dans l'état inactif Mo(VI), puisque c'est dans cet état que la constante de vitesse de réactivation est la plus petite et que la constante de vitesse d'inhibition est la plus grande. Puisque l'inactivation correspond à la liaison d'une molécule de nitrate, la molécule de nitrate qui inhibe est beaucoup plus liée à l'état le plus oxydé du site actif qu'aux états plus réduits, ce qui peut se comprendre si les interactions coulombiennes dominent dans la liaison de cette molécule de nitrate.

La détermination des états redox dans lesquels se trouve l'enzyme inactive est importante dans la mesure où ces états inactifs peuvent s'accumuler dans des conditions utilisées pour piéger des intermédiaires réactionnels et les caractériser par des techniques spectroscopiques, notamment la résonance paramagnétique électronique qui a beaucoup été utilisée pour étudier les nitrate réductases et d'autres molybdoenzymes (le site actif à molybdène est paramagnétique dans son état V). Pour éviter de prendre une forme inactive pour un intermédiaire catalytique, nous avons donc entrepris de déterminer la fraction stationnaire d'enzyme sous forme inactive en fonction du potentiel et de la concentration en nitrate (*figure 7d* ; elle se déduit des valeurs de k_i et k_a extraites d'une série de données comme celles de la *figure 7c* à différentes concentrations en nitrate), et de déterminer la fraction de cette enzyme sous forme paramagnétique (*figure 7e*). Nous avons pu en conclure que si dans certaines conditions de potentiel et de concentration en nitrate, l'enzyme peut se trouver majoritairement sous forme inactive, en revanche, la plus grande part est sous une forme diamagnétique (Mo(VI)), la fraction de Mo(V) inactif étant au maximum de l'ordre de 10 %. Par conséquent, une espèce paramagnétique qui s'accumule de manière significative (sensiblement plus que 10 %) ne correspond pas à la forme inhibée par excès de substrat [9].

Au-delà de l'état stationnaire : étude de la sulfite oxydase humaine

Dans tous les travaux décrits précédemment, le cycle catalytique est en permanence à l'état stationnaire ; la catalyse n'est affectée par les phénomènes d'inactivation/réactivation, beaucoup plus lents, que dans la mesure où ces derniers changent le nombre d'enzymes qui peuvent participer à la catalyse. Nous allons maintenant décrire un exemple de situation où ce n'est plus le cas, où les changements de potentiel se font à une échelle de temps comparable à celle du cycle catalytique, ce qui donne lieu à l'observation de régimes transitoires. Le sujet de l'étude est une autre enzyme à molybdène, la sulfite oxydase humaine, qui est impliquée entre autres dans la détoxification des sulfites et le métabolisme des acides aminés soufrés. Une déficience de cette enzyme cause une atrophie grave du cerveau chez les nourrissons et une mort rapide.

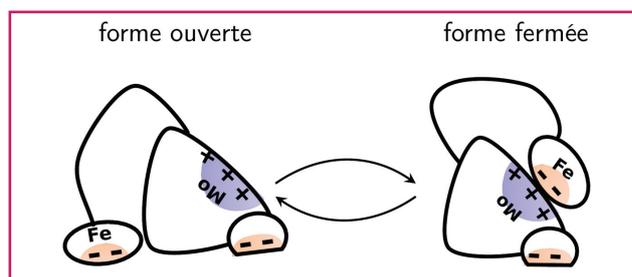


Figure 8 - Représentation schématique du changement de conformation de la sulfite oxydase.

La sulfite oxydase est composée de deux domaines : un domaine qui contient le site catalytique (un cofacteur à molybdène similaire à celui de la nitrate réductase discutée plus haut), et un domaine qui contient un hème, dont le rôle est de relayer les électrons depuis le site actif vers les partenaires redox de l'enzyme. La liaison entre les deux domaines est flexible et la protéine peut adopter deux conformations (*figure 8*) : une conformation ouverte, dans laquelle le transfert électronique intramoléculaire n'est pas possible, mais qui permet l'échange entre l'hème et les partenaires extérieurs, et une conformation fermée, dans laquelle c'est le transfert d'électron intermoléculaire qui est bloqué, mais le transfert intramoléculaire peut avoir lieu. Il a été montré en solution que ce changement de conformation fait partie intégrante du cycle catalytique, mais la question de la possibilité même d'un changement de conformation d'une enzyme immobilisée sur une électrode se posait. Pour le vérifier, nous avons utilisé la voltammétrie cyclique dite « rapide ». L'idée de cette technique est que, si l'on balaye suffisamment rapidement en potentiel, on peut donner et reprendre des électrons à l'enzyme sans que ceux-ci n'aient eu le temps de participer à d'autres réactions (transfert d'électron intramoléculaire, catalyse, etc.). Comparons par exemple les voltammogrammes *a* et *b* de la *figure 9* : dans *9a*, la vitesse de balayage est très lente et l'on voit le signal catalytique stationnaire d'oxydation du sulfite. En revanche dans *9b*, la vitesse de balayage est très grande et le signal obtenu correspond uniquement à l'oxydation et la réduction de l'hème.

Ce sont les situations intermédiaires, où l'on voit encore la catalyse mais où elle n'est plus stationnaire, que l'on peut le mieux discerner entre différents cas de figure. La *figure 10a* montre des données à une vitesse de balayage intermédiaire entre celles de *9a* et de *9b*, avec une modélisation qui ne tient

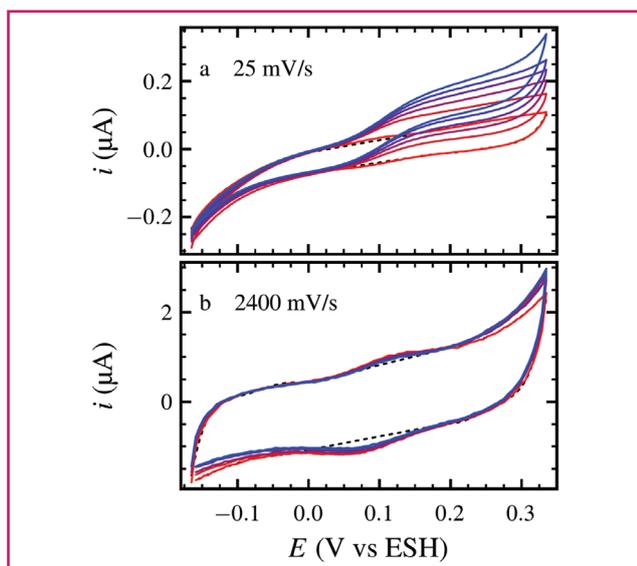


Figure 9 - Voltammogrammes d'un film de sulfite oxydase en présence de différentes concentrations de sulfite (de 0, rouge, à 200 μM , bleu) à basse (a) ou haute (b) vitesse de balayage.

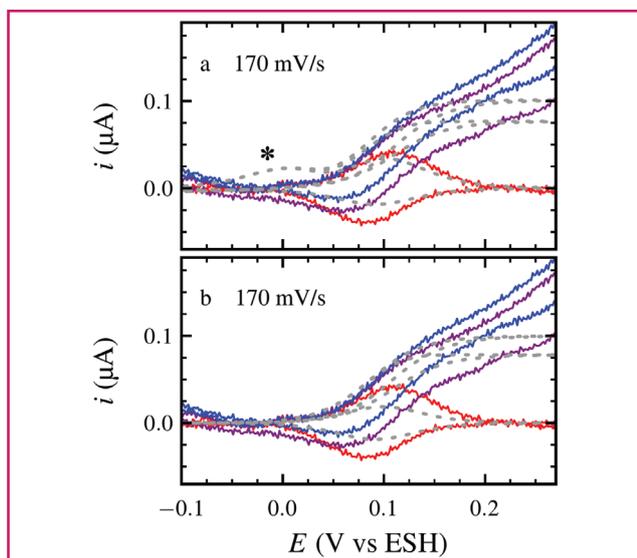


Figure 10 - Modélisation de voltammogrammes de la sulfite oxydase à vitesse de balayage intermédiaire par deux modèles (lignes pointillées) tenant compte (b) ou non (a) des changements de conformation.

pas compte du changement de conformation, tandis que la figure 10b montre les mêmes données modélisées en tenant compte du changement de conformation. La modélisation de la figure 10a comporte un pic (indiqué par un *) qui n'est pas présent ni dans les données ni dans la modélisation de la figure 10b, ce qui montre que prendre en compte le changement de conformation permet de mieux reproduire les données [17]. Schématiquement, le pic supplémentaire provient de la réoxydation du site actif. Dans le modèle qui ne tient pas compte du changement de conformation, cette réoxydation est forcément possible si le modèle doit rendre compte de la catalyse. En revanche, la prise en compte du changement de conformation permet de « cacher » cette réoxydation qui devient trop lente car limitée par le changement de conformation.

Ce type d'approche en est à ses débuts, mais la démonstration est faite qu'en poussant le cycle catalytique hors de l'état stationnaire, il est possible d'obtenir des informations auxquelles la seule analyse des données stationnaires ne donne pas accès.

Perspectives de l'électroenzymologie

L'électroenzymologie est une discipline jeune et prometteuse, pour laquelle il reste encore beaucoup à faire. Par exemple, les formes de vagues catalytiques peuvent potentiellement nous apprendre énormément sur le mécanisme de nombreuses enzymes, mais elles sont encore sous-exploitées, en grande partie parce que la théorie n'est pour l'instant pas encore suffisamment développée, mais aussi parce que la modélisation de ce type de données est difficile avec les logiciels usuels d'analyse de données. Une partie des efforts doit donc porter sur l'élaboration d'une base théorique solide pour la compréhension des formes de la vague et d'autres aspects de l'électroenzymologie, mais aussi sur le développement d'outils logiciels implémentant ces modèles, ce qui est aussi l'une des activités de l'équipe [18].

Par ailleurs, au cours des dernières années, des techniques électrochimiques déjà bien établies, comme la spectroscopie d'impédance électrochimique ou la voltammétrie AC à transformée de Fourier, ont été utilisées pour la première fois pour l'étude d'enzymes immobilisées sur des électrodes. Ces techniques ont en commun de moduler un signal continu avec un signal alternatif de fréquence donnée. Elles permettent en principe de sonder les transitoires du cycle catalytique et jouent en quelque sorte, par rapport à l'analyse « classique » des formes de la vague, le même rôle que les techniques de spectroscopie « rapide » (« stopped-flow », spectrophotomètres de type « Joliot », etc.) jouent par rapport aux expériences de cinétique enzymatique stationnaire en solution. En apportant une information sur les transitoires, on peut grandement augmenter la finesse avec laquelle on étudie les cycles catalytiques. L'électroenzymologie, semble-t-il, a de beaux jours devant elle !

Même si seul un petit nombre de systèmes ont été pris comme exemples ici, les approches décrites sont le résultat du travail de nombreux membres de l'équipe sur des systèmes variés. Par conséquent, l'auteur remercie tous les membres de l'équipe (présents ou antérieurs) qui ont participé à ces travaux : Abbas Abou-Hamdan, Carole Baffert, Martino Benvenuti, Patrick Bertrand, Pierre Ceccaldi, Melisa del Barrio Rondo, Sébastien Dementin, Mariam Fadel, Arianna Ferrari, Laura Fradale, Jessica Hadj-Saïd, Viviane Hajj, Christophe Léger (également pour sa relecture critique du manuscrit), Marco Lorenzi, Meriem Merrouch, Christophe Orain et Matteo Sensi. Par ailleurs, ces travaux ne seraient pas possibles sans les collaborateurs biologistes des groupes de Hervé Bottin (CEA Saclay), David Pignol (CEA Cadarache), Holger Dobbek (Humboldt Universität Berlin), Myriam Brugna, Marie-Thérèse Guidici-Ortoni, Axel Magalon (CNRS Marseille), Isabelle Meynial-Salles (INSA Toulouse), Inês Pereira (ITQB, Lisbonne) et Marc Fontecave (Collège de France).

Notes et références

- (1) L'activité catalytique consomme le substrat au voisinage de l'électrode. Pour éviter que la réaction catalytique ne ralentisse par manque de substrat, on utilise une électrode tournante, qui induit un flux de tampon électrochimique en direction de l'électrode, ce qui permet de minimiser la déplétion en substrat dans son voisinage.
 - (2) La direction des scans est indiquée par des flèches dans la figure 4a.
- [1] Baffert C., Dementin S., Fourmond V., Léger C., L'électrochimie, un outil pour étudier les mécanismes enzymatiques, *L'Act. Chim.*, **2015**, 392, p. 9.
- [2] Armstrong F.A., Heering H.A., Hirst J., Reactions of complex metalloproteins studied by protein-film voltammetry, *Chem. Soc. Rev.*, **1997**, 26, p. 169.

- [3] Léger C., Bertrand P., Direct electrochemistry of redox enzymes as a tool for mechanistic studies, *Chem. Rev.*, **2008**, *108*, p. 2379.
- [4] Fourmond V., Léger C., Protein electrochemistry: questions and answers, *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, **2016**, *158*, p. 1.
- [5] Sensi M., del Barrio M., Baffert C., Fourmond V., Léger C., New perspectives in hydrogenase direct electrochemistry, *Curr. Opin. Electrochem.*, **2017**, sous presse.
- [6] Fourmond V., Direct electrochemistry of molybdenum and tungsten enzymes, in *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering*, Elsevier, **2017**.
- [7] Léger C., Elliott S.J., Hoke K.R., Jeuken L.J.C., Jones A.K., Armstrong F.A., Enzyme electrokinetics: using protein film voltammetry to investigate redox enzymes and their mechanisms, *Biochemistry*, **2003**, *42*, p. 8653.
- [8] Fourmond V., Lautier T., Baffert C., Leroux F., Liebgott P.-P., Dementin S., Rousset M., Arnoux P., Pignol D., Meynial-Salles I., Soucaille P., Bertrand P., Léger C., Correcting for electrocatalyst desorption or inactivation in chronoamperometry experiments, *Anal. Chem.*, **2009**, *81*, p. 2962.
- [9] Jacques J.G.J., Burlat B., Arnoux P., Sabaty M., Guigliarelli B., Léger C., Pignol D., Fourmond V., Kinetics of substrate inhibition of periplasmic nitrate reductase, *Biochim. Biophys. Acta*, **2014**, *1837*, p. 1801.
- [10] Domnik L., Merrouch M., Goetzl S., Jeoung J.-H., Léger C., Dementin S., Fourmond V., Dobbek H., CODH-IV: a novel high efficiency CO-scavenging CO dehydrogenase with increased resistance to O₂, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2017**, sous presse.
- [11] Merrouch M., Hadj-Saïd J., Léger C., Dementin S., Fourmond V., Reliable estimation of the kinetic parameters of redox enzymes by taking into account mass transport towards rotating electrodes in protein film voltammetry experiments, *Electrochim. Acta*, **2017**, *245*, p. 1059.
- [12] Bar-Even A., Noor E., Savir Y., Liebermeister W., Davidi D., Tawfik D.S., Milo R., The moderately efficient enzyme: evolutionary and physicochemical trends shaping enzyme parameters, *Biochemistry*, **2011**, *50*, p. 4402.
- [13] Cornish-Bowden A., *Fundamentals of Enzyme Kinetics*, 3rd ed., Portland Press, **2004**.
- [14] Sucheta A., Ackrell B.A., Cochran B., Armstrong F.A., Diode-like behaviour of a mitochondrial electron-transport enzyme, *Nature*, **1992**, *356*, p. 361.
- [15] Frangioni B., Arnoux P., Sabaty M., Pignol D., Bertrand P., Guigliarelli B., Léger C., In *Rhodobacter sphaeroides* respiratory nitrate reductase, the kinetics of substrate binding favors intramolecular electron transfer, *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*, p. 1328.
- [16] 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.
- [17] Zeng T., Leimkühler S., Wollenberger U., Fourmond V., Transient catalytic voltammetry of sulfite oxidase reveals rate limiting conformational changes, *J. Am. Chem. Soc.*, **2017**, *139*, p. 11559.
- [18] Fourmond V., QSoas: a versatile software for data analysis, *Anal. Chem.*, **2016**, *88*, p. 5050.



Vincent Fourmond

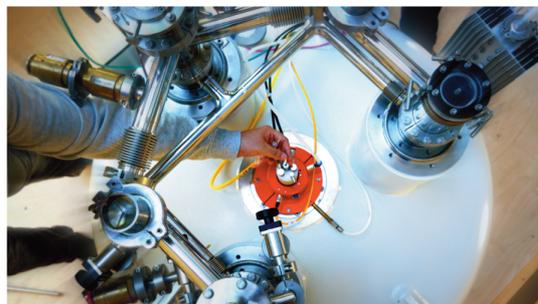
est chargé de recherche au Laboratoire de Bioénergétique et Ingénierie des Protéines, Aix-Marseille Université*.

Il a reçu la Médaille de bronze du CNRS en 2016.

* Aix-Marseille Université, CNRS, BIP UMR 7281, 31 chemin J. Aiguier, F-13402 Marseille Cedex 20. Courriel : vincent.fourmond@imm.cnrs.fr



Étudier la Chimie à l'ENS



Le Département de Chimie de l'École Normale Supérieure offre une formation au plus haut niveau en chimie contemporaine :

- enseignement au cœur d'une activité de recherche intense,
- ouvertures aux frontières de la discipline,
- stages à l'international dans les meilleures universités étrangères.



Lieu d'émancipation intellectuelle et de maturation scientifique, le département de chimie de l'ENS ouvre à des carrières très variées :

- Chercheur (CNRS, Université, Industrie)
- Enseignant (Université, CPGE)
- Haut fonctionnaire
- Chef d'entreprise
- Analyste financier
- Directeur de la communication
- Médecin...



Département de
CHIMIE

www.chimie.ens.fr

