Utilisation de la spectrométrie d'impédance électrochimique pour l'étude des mécanismes biochimique de la (peroxydase de raifort) HRP en solution

Gianangelo Ghitti

▶ **To cite this version:**

Gianangelo Ghitti. Utilisation de la spectrométrie d'impédance électrochimique pour l'étude des mécanismes biochimique de la (peroxydase de raifort) HRP en solution. 2016. hal-01377676

HAL Id: hal-01377676
https://hal.science/hal-01377676

Preprint submitted on 7 Oct 2016

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

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

Utilisation de la spectrométrie d'impédance électrochimique pour l'étude des mécanismes biochimique de la (peroxydase de raifort) HRP en solution.

Gianangelo Ghitti,
Ghitticonsulting rue du Sergent Merx, 93 Liège 4000, Belgique
Email : ghitticonsulting@hotmail.com

Mots clés

Spectrométrie d'impédance, activité enzymatique, mécanisme, peroxydase de raifort, HRP, acide gallique, trolox, acide benzoique

Keywords

Electrochemical impedance spectroscopy, frequency response analysis, Horseradish peroxidase, enzymatic activity, gallic acid, trolox, benzoic acid

Introduction

Un enzyme contient un atome métallique, il est sujet lors de son processus catalytique non seulement à des réactions redox mais aussi à des changements dans sa conformation entraînant des variations de ses caractéristiques électriques. Le principe de spectroscopie d'impédance électrochimique est basé sur la mesure d'une fonction de transfert suite à la perturbation imposée du système électrochimique étudié. Couramment, la perturbation est sinusoïdale et de faible amplitude.

Cette technique est capable de mesurer de telle variation.

L'intérêt de notre étude est de pouvoir étudier le comportement de l'enzyme libre en solution. Cette approche permet d'étudier l'activité enzymatique sans fixer l'enzyme à l'électrode.

Compte tenu de l'hypothèse selon laquelle c'est l'enzyme qui fixe la capacité équivalente du système électrique. Nous cherchons à observer une modification de la composante RC de l'enzyme. C'est-à-dire la modification de la répartition des charges sur la structure et/ou de celle-ci consécutive à l'interaction avec un substrat, en absence et en présence d'un inhibiteur potentiel.

Nous avons pu montrer l'influence d'inhibiteur et d'activateur sur l'activité de la HRP (peroxydase de raifort).

An enzyme contains a metallic atom, it is subject during its catalytic process not only to reactions redox but also in changes in its conformation variations of its electric characteristics. The principle of spectroscopy of electrochemical impedance is based on the measure of a function of transfer further to the compulsory disturbance of the studied electrochemical system. Usually, the disturbance is sinusoidal and of low amplitude.
This technique is capable of measuring of such variation.
The interest of our study is to be able to study the behavior of the free enzyme in solution. This approach allows to study the enzymatic activity without fixing the enzyme to the electrode.
Considering the hypothesis according to which it is the enzyme which fixes the capacity.

Matériel et méthode

Le montage expérimental pour les mesures d'impédance se compose d'une cellule classique à trois électrodes, comprenant une électrode de travail (ET) (carbone vitreux), une contre-électrode (CE) (en platine) et une électrode de référence (ER) au calomel saturée en KCl (E = 0, 248V /ENH).

La cellule d'une capacité maximale de 300 µL est thermostatisée à une température de 37°C.

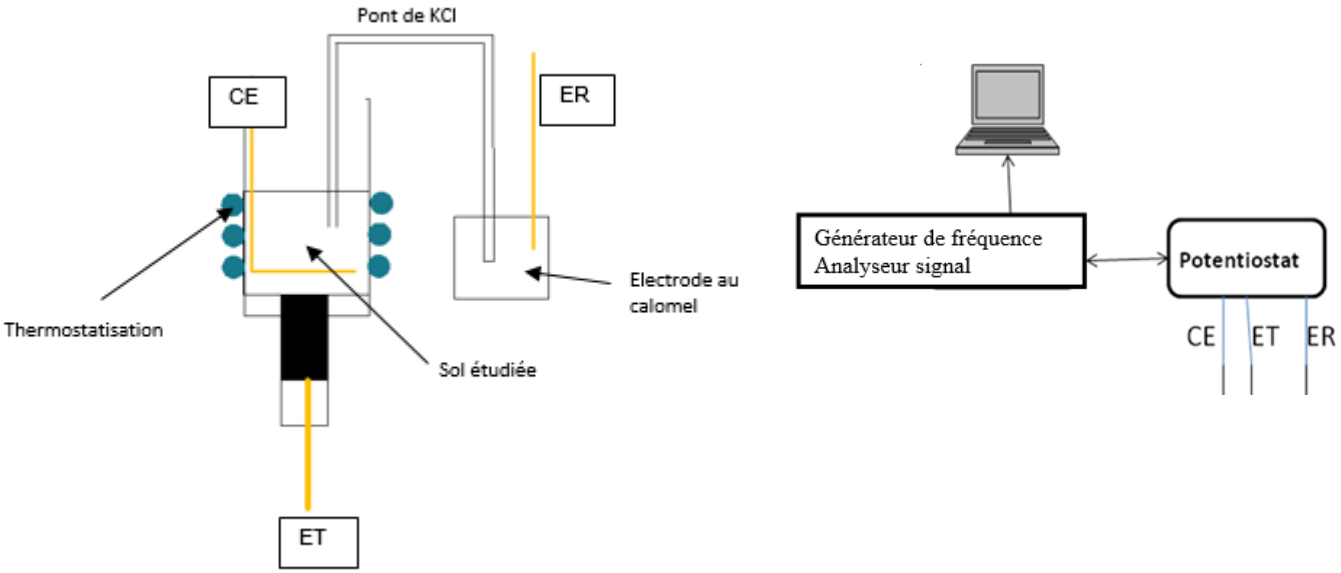


Fig 1 : Montage expérimental

L'appareil utilisé pour réaliser les mesures est basé sur le potentiostat décrit par Deluzarche et E. Zimmerlin (1).

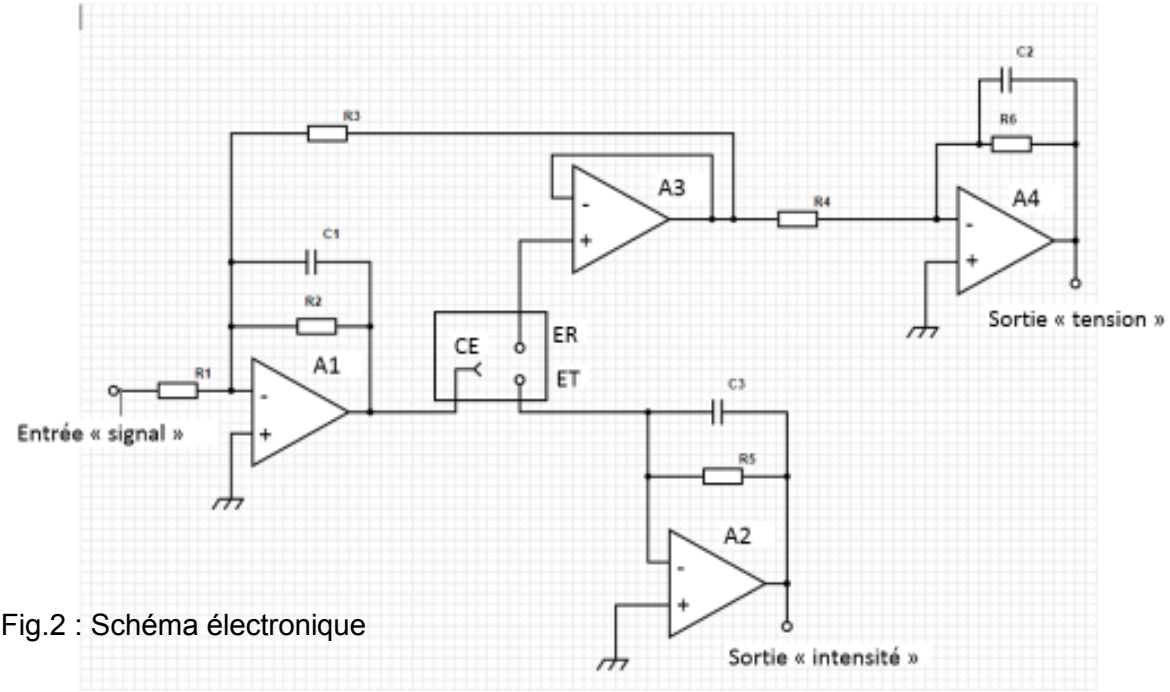


Fig.2 : Schéma électronique

R1	R2	R3	R4	R5	R6	C1	C2	C3
10kΩ	10 MΩ	10kΩ	100k	1kΩ	100kΩ	1 nF	1 nF	1 nF

Les amplificateurs opérationnels (A1 à 3) font parties d'un circuit intégré TL084CN

CE : contre électrode en Pt

ET : électrode de travail en carbone vitreux

ER : électrode de réference

Potentiostat : sur base d'un schéma décrit dans la littérature (1), une adaptation a été réalisée afin de l'adapter au besoin de la spectrométrie d'impédance. Pour cela, nous avons utilisé une interface PClab200 de Velleman permettant d'une part d'injecter un signal sinusoïdal de faible amplitude 0.2V, de réaliser un balayage en fréquence et d'autre part, l'acquisition sur un ordinateur des données expérimentales qui sont ensuite traitées dans le logiciel Excel.

Procédé d'acquisition.

Le générateur de fréquence de l'interface PCLab200 injecte dans le système avec une tension d'entrée (Ve) une onde sinusoïdale de fréquence variable.

Ce même interface récupère une tension de sortie (Vs) et mesure le déphasage entre la tension d'entrée et de sortie.

Traitement des données.

Les données acquises sont exploitées via un diagramme de Bode.

Deux représentions peuvent être utilisées.

- *dBV en fonction de la fréquence.*

dBV = 10 log (Vs/Ve)

- *Déphasage en fonction de la fréquence*

Les résultats les plus explicites sont obtenus via l'utilisation du déphasage en fonction de la fréquence.

Dans notre étude le balayage en fréquence débute à 1 kHz pour finir à 1 MHz.

La tension de l'onde sinusoïdale d'entrée sera fixée à 0.2V.

Aspect biochimique.

Les mesures sont réalisées dans une solution tampon phosphate à pH 7.4 à une température de 37°C.

A 900 µl de tampon sont ajoutés 100 µl des solutions impliquées dans l'expérience réalisée.

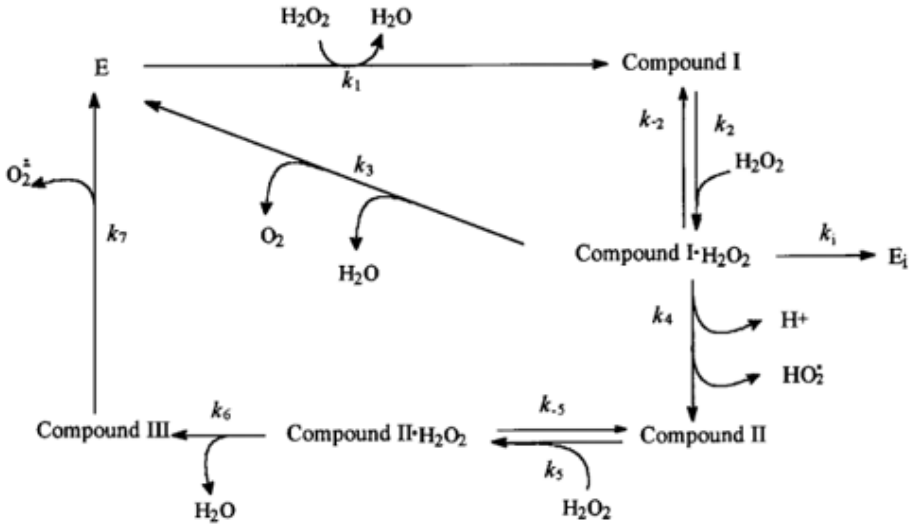
Les concentrations finales en HRP et en antioxydant sont de 10^{-4} M

La concentration finale en H_2O_2 est de10^{-3} M

La concentration finale en KNO_2 est de10^{-3} M ou 10^{-4} M suivant l'expérience.

Les mesures sont réalisées en triple exemplaire.

La **peroxydase de raifort** (HRP, en anglais *horseradish peroxidase)* catalyse des réactions de la forme $AH_2 + H_2O_2 \rightarrow A + 2H_2O$, où AH_2 joue le rôle de réducteur et H_2O_2 d'oxydant.



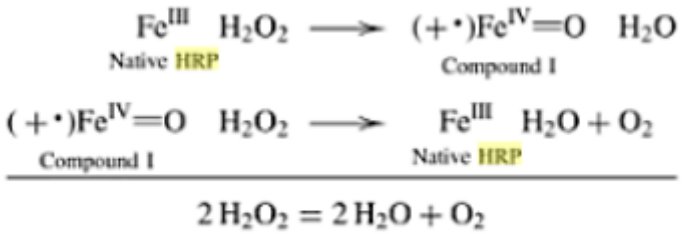


Fig. 3 : Modèle de réaction de la HRP avec H_2O_2. (7)

Résultats et discussion

La figure 4 illustre l'influence de la valeur de la tension sinusoïdale appliquée sur la réponse de divers systèmes

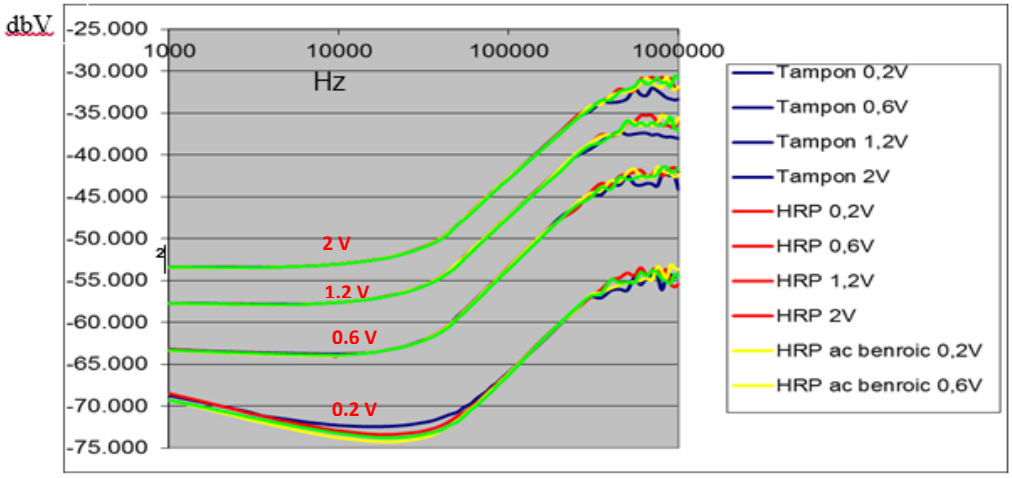


Fig. 4 : influence de la tension sinusoïdale

De manière à ne pas provoquer de réaction d'oxydo-réduction toutes les mesures seront réalisées avec une tension sinusoïdale de 0,2V.

Avant d'étudier l'influence d'inhibiteur ou d'activateur, il convient d'étudier la HRP seule et au repos. La figure 5 illustre la réponse d'une solution 10^{-4} M en HRP dans le tampon à pH 7.4 et à 37°C. La fréquence de déphase se situé 4900 Hz pour la solution tampon seul et 4500 Hz pour la solution de HRP

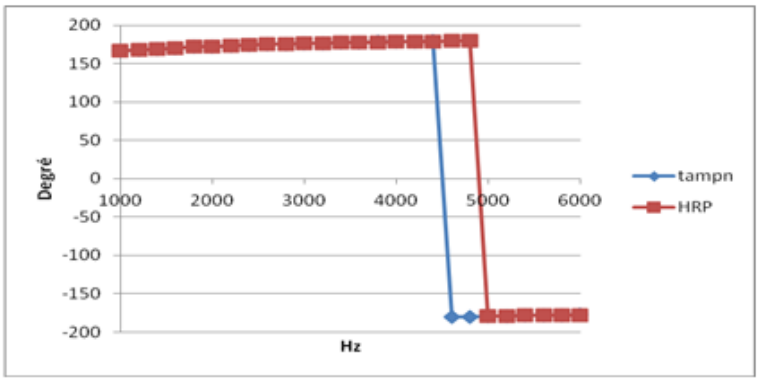


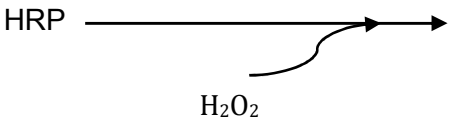
Fig. 5 : Réponse de la solution tampon et d'une solution 10^{-4} M en HRP dans le tampon pH 7.4

La figure 6 illustre la réponse en fonction du temps de la HRP en fonctionnement avec H_2O_2

En « 1 » nous avons la réponse de la HRP et de l'eau oxygénée seul.

Dès l'ajout H_2O_2 l'enzyme commence à l'utiliser, la réponse est significativement différente « 2 et 3» de la HRP au repos.

Les concentrations en HRP et H_2O_2 étant équimolaire au bout de 30 min l'enzyme a dégradé toute l'eau oxygénée « 4 » et les résultats des mesures de 30 à 60 min sont identiques.



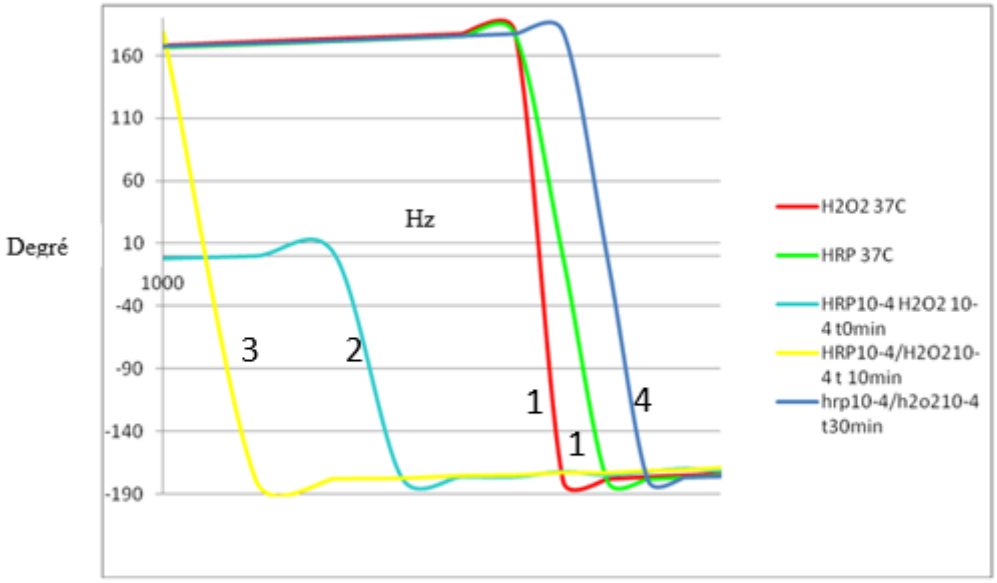


Fig.6 : évolution du déphase d'une solution HRP 10^{-4} M / H_2O_2 10^{-4} M en fonction du temps.

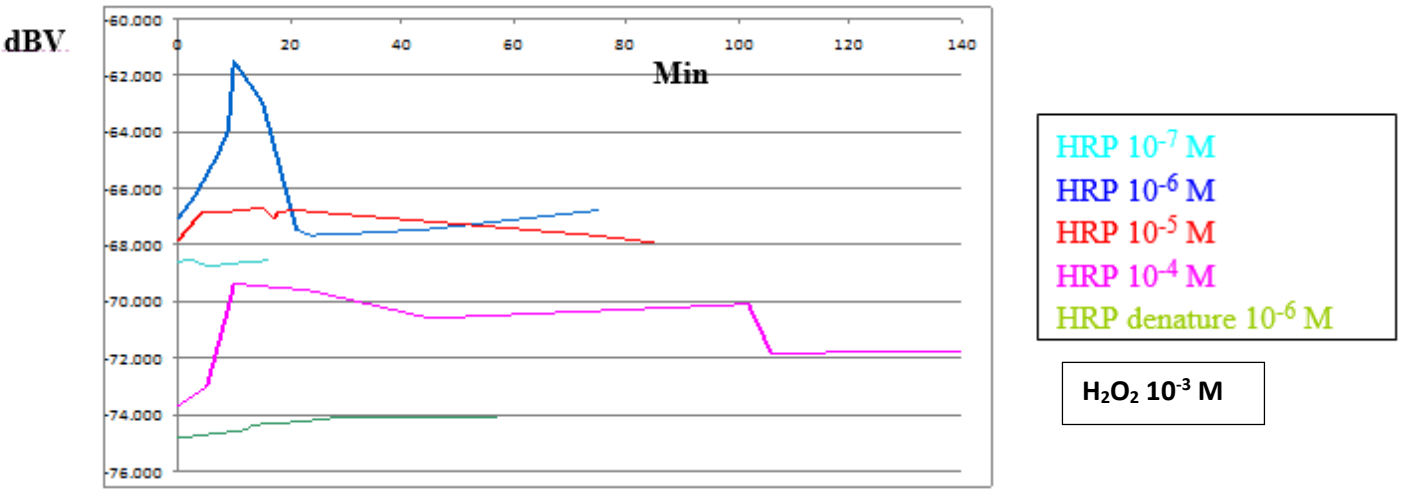


Fig 7 variation de dBV en fonction du temps et de la concentration en HRP

On constate que plus la concentration en HRP diminue plus la durée de réaction diminue pour une même concentration en eau oxygénée. Cette observation est logique compte tenu de la diminution du nombre de molécule HRP qui peuvent participer à la transformation.

En ce qui concerne une concentration 10^{-7}M en HRP. La technique est assez sensible pour observer des variations au sein de la solution.

La première remarque consiste dans le fait que la HRP une fois diluée dans le tampon subit des variations se traduisant par une variation du dBV en fonction du temps. Ce phénomène se passe également pour des concentrations plus élevées mais la durée est courte (2 à 3 min).

<u>Déplacement sur l'axe des ordonnées (dBV)</u>

Si on observe le déplacement des valeurs sur l'axe des ordonnées (dBV) celle-ci se déplace vers des valeurs moins négatives en fonction de la diminution de la concentration en HRP traduit le fait que le signal de sortie devient de plus en plus petit par rapport au signal d'entrée qui lui est constant à 0.2 V pic à pic.

L'on observe bien que c'est la HRP qui fixe les paramètres du circuit électronique équivalent.

Nous avons testé la réponse de la HRP après l'avoir dénaturée. Pour ce faire une solution 10^{-6} M en HRP est chauffée 2 min à ébullition avant d'être soumisse au test.

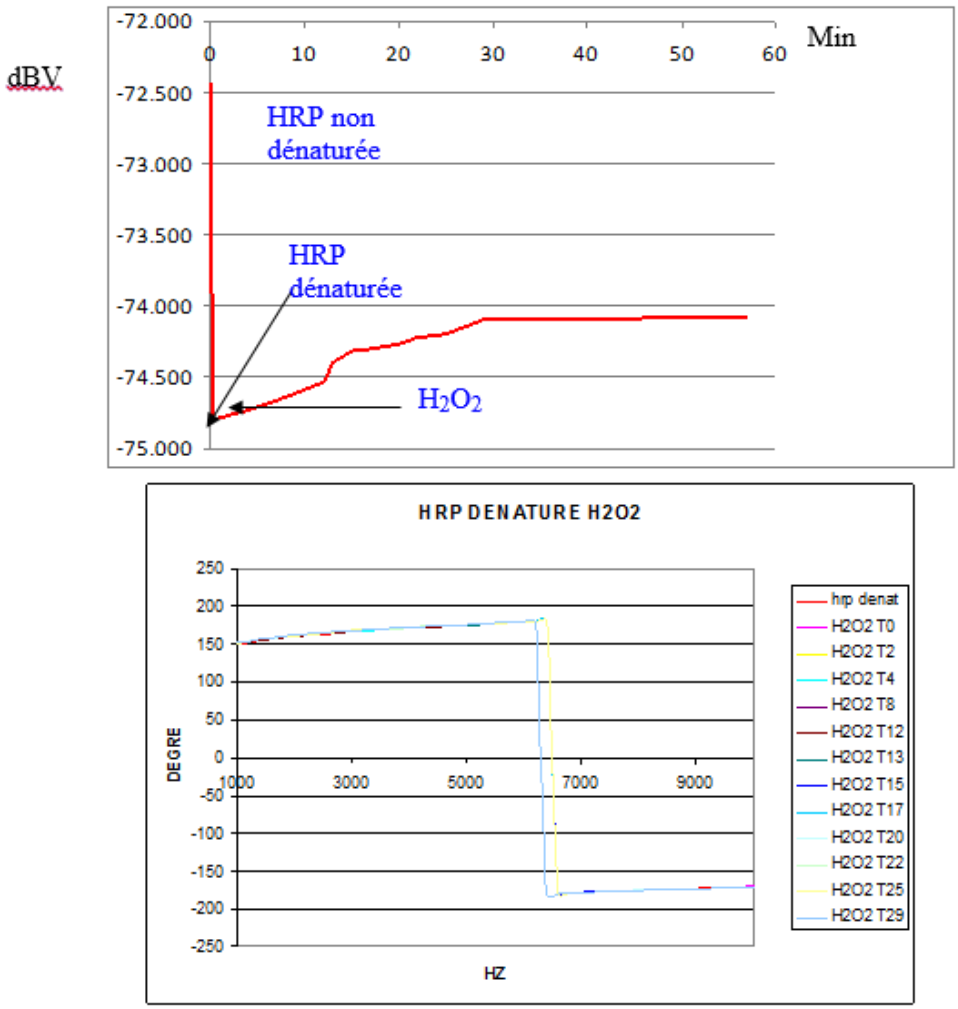


Fig. 8 Réponse de la HRP dénaturée

Le comportement de la HRP une fois dénaturée est complètement différent.

On n'observe plus la courbe caractéristique d'une HRP active en présence d'eau oxygénée.

De 0 à 30 min, le changement de structure consécutive à la dénaturation permet à certains acides aminés terminaux de ne plus être impliqués dans des liaisons faibles. Cette disponibilité spatiale leurs permets de réagir avec l'eau oxygénée.

Au bout de 30 min, on n'observe plus d'évolution traduisant ainsi la fin des réactions d'oxydation.

Influence du KNO2

Examinons à présent l'influence du KNO_2 qui peut catalyser le retour de la HRP « Compound I » vers HRP « compound II » et ainsi lui permettre de réagir de nouveau avec l'eau oxygénée.

$$\text{HRP-I} + NO_2^- \longrightarrow \text{HRP-II} + NO_2$$
$$\text{HRP-II} + NO_2^- \longrightarrow \text{HRP} + NO_2$$
$$2NO_2 + H_2O \xrightarrow{\text{fast}} NO_3^- + NO_2^- + 2H^+$$

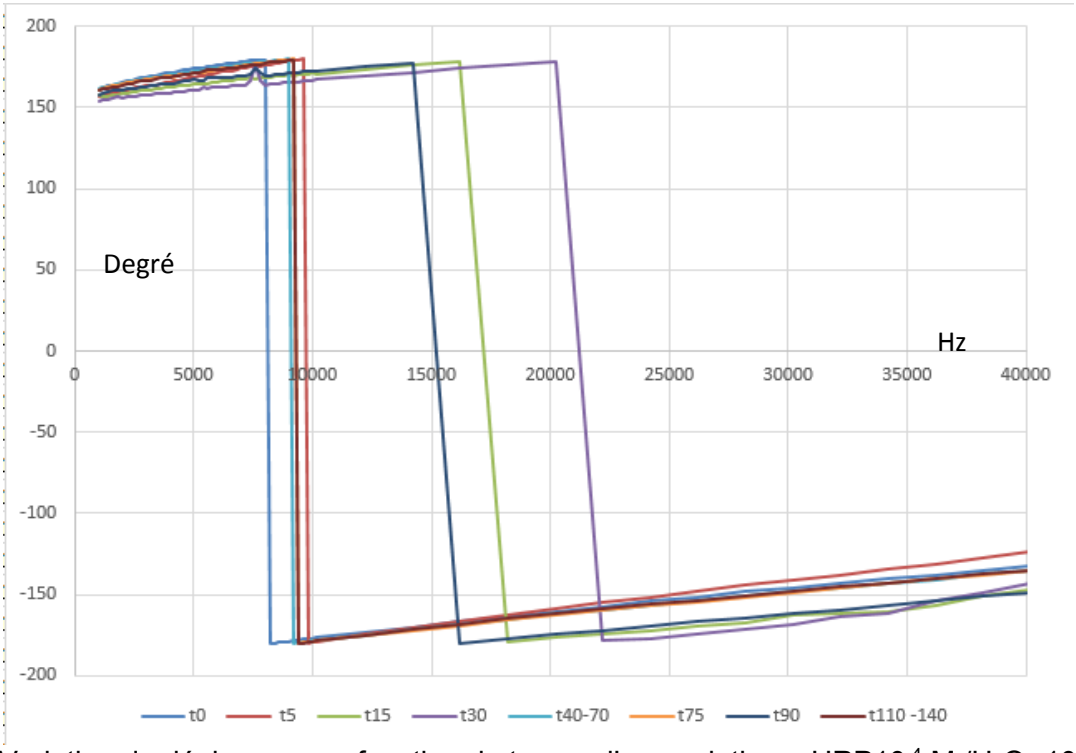


Fig.9 Variation du déphasage en fonction du temps d'une solution « HRP10^{-4} M /H_2O_2 10^{-3} M/ / $KNO_2 10^{-4}$ M »

La représentation binaire de l'activité est montrée à la fig.10. Lorsque l'on observe un déplacement de la fréquence de déphasage on note que l'activité vaut 1. Dans le cas contraire l'activité est nulle.

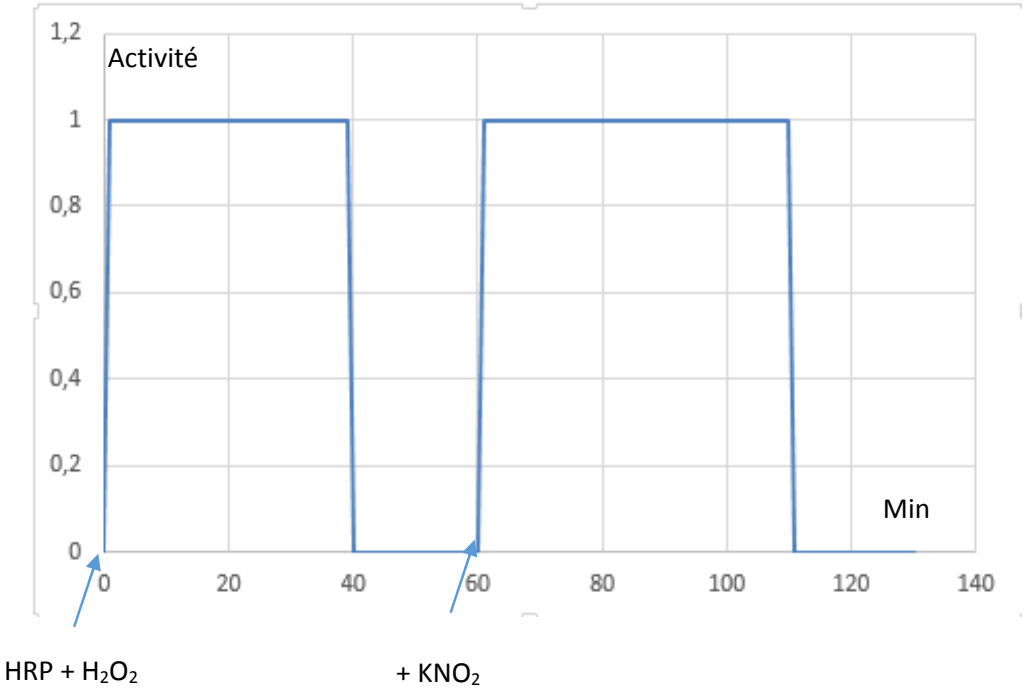


Fig.10 Traduction binaire de la variation de l'activité en fonction du temps d'une solution « HRP10^{-4} M /H_2O_2 10^{-3} M/ / $KNO_2 10^{-4}$ M »

On constate que le fait d'ajouter du KNO_2 en quantité équimolaire par rapport à la HRP conduit à une reprise d'activité de celle-ci. Cette reprise a une durée équivalente à la première activité soit 30 min.

Cette observation laisse penser que le nitrite contribue à réduire le fer de l'état 4+ à l'état 3+. Permettant ainsi à la HRP de reprendre son activité catalytique jusqu'au moment où toutes les molécules de HRP ont de nouveau leur fer à l'état 4+.

Nous avons également vérifié que le nitrite n'est pas un inhibiteur de la HRP.

Pour ce faire nous avons incubé la HRP avec le nitrite. En principe, comme le nitrite agit en Compound I et compound II, il ne devrait-t pas y avoir d'inhibition. C'est bien ce que l'on observe à la fig. 11.

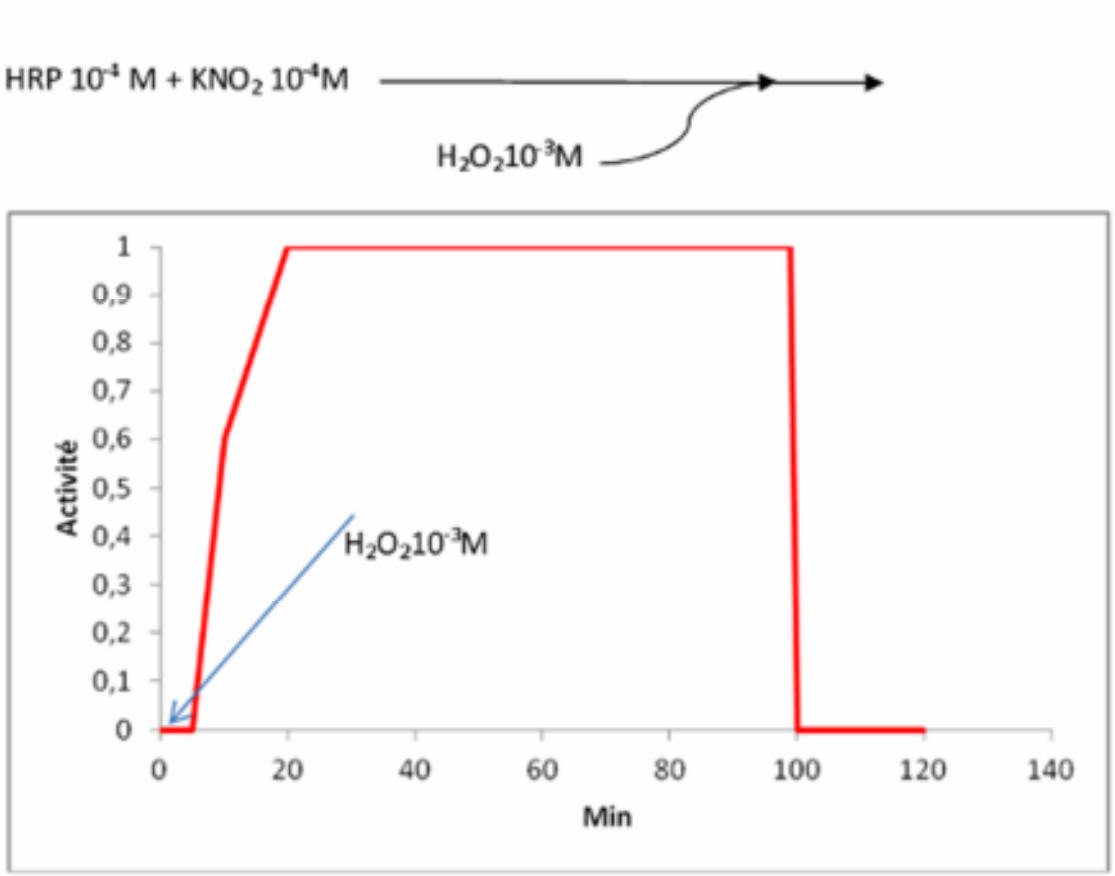


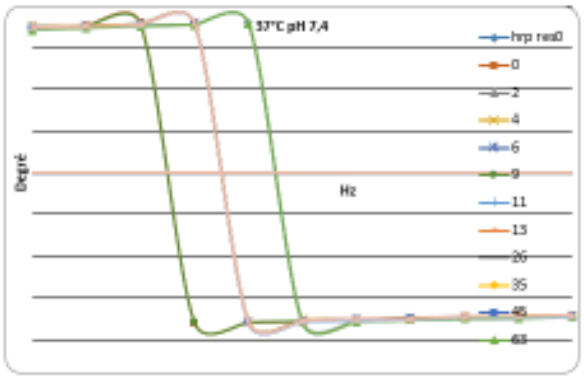
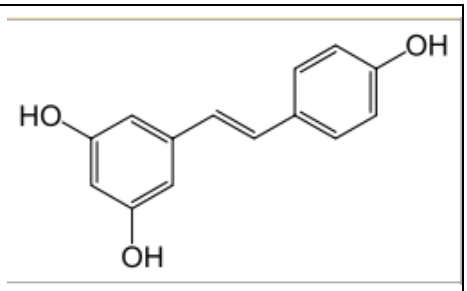
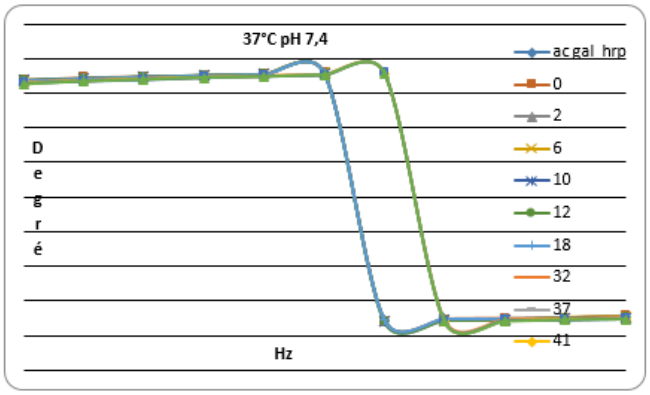
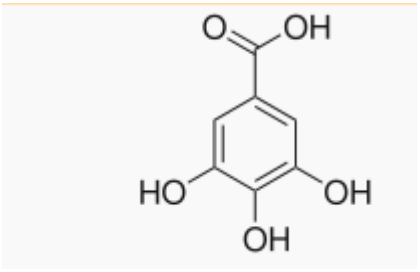
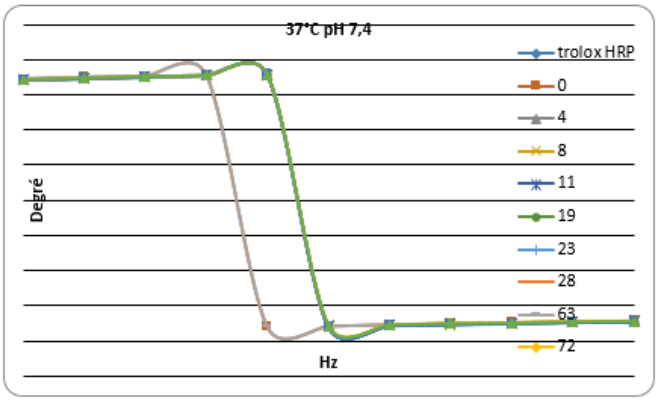
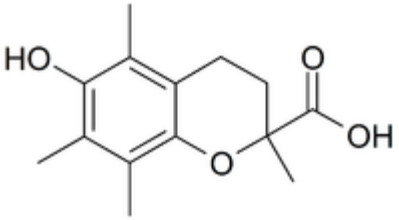
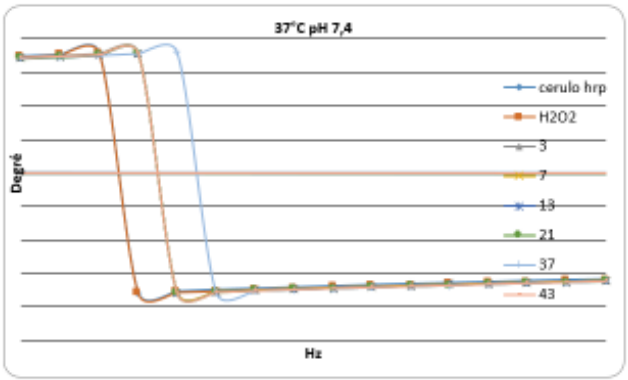
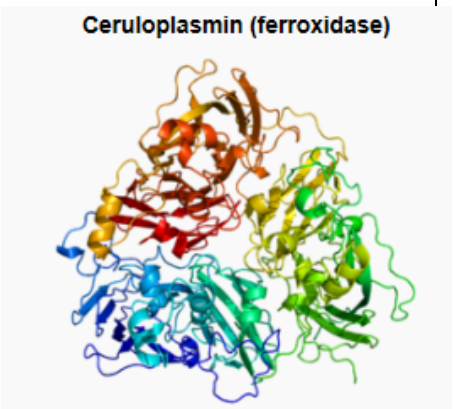
Fig.11 variation de l'activité d'une solution HRP/KNO2/ H2O2

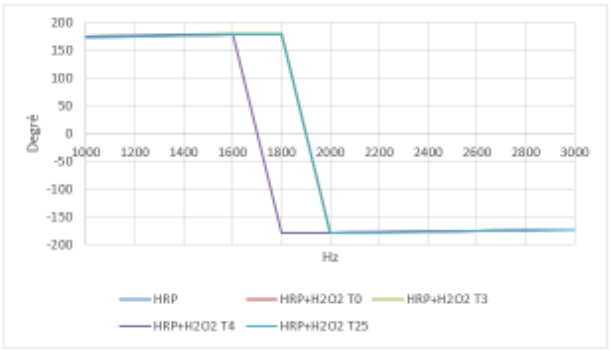
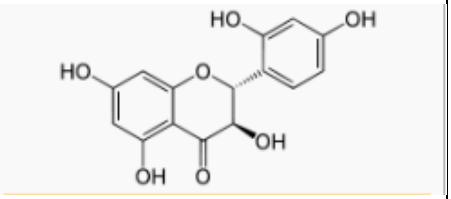
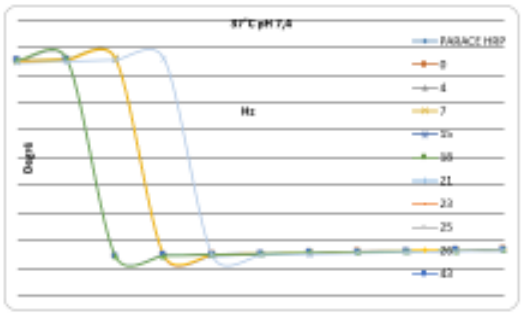
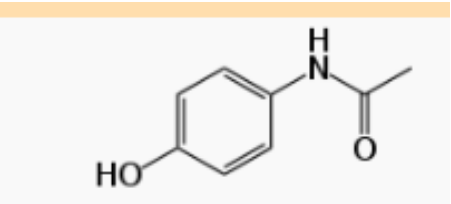
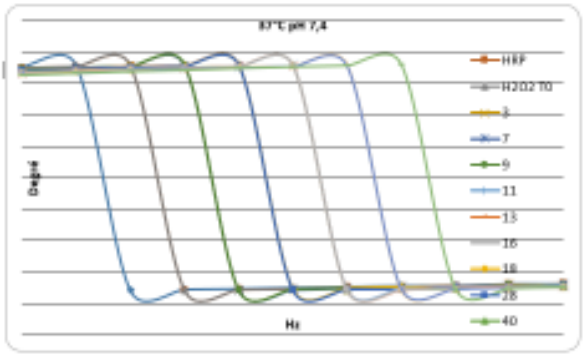
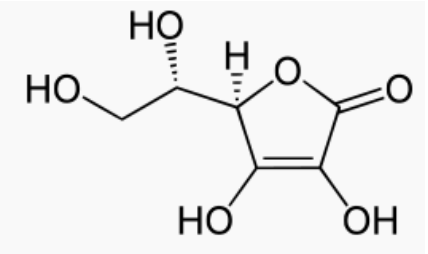
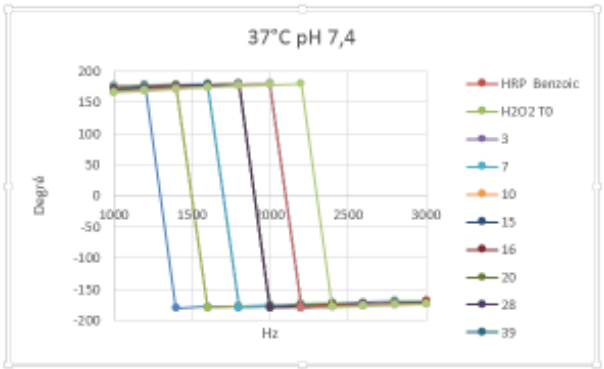
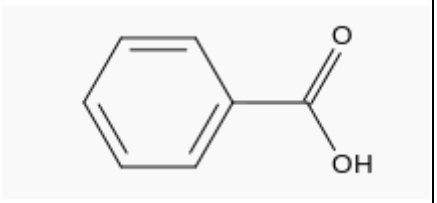
A présent nous allons observer l'influence de diverses molécules incubée 5 minutes avec la HRP préalablement à l'ajout d'eau oxygénée. Le temps t0 correspond au moment où l'on ajouté la solution d'eau oxygénée à la solution incubée (HRP – X)

Dans toutes ces études, nous avons suivi le schéma suivant

HRP+ molécules (X) ⟶

H_2O_2

Resveratrol		
Acide gallique		
TROLOX		
CERUPLASMINE		

AMPELOPSINE		
PARACETAMOL		
Acide ascorbique		
Acide benzoîque		

Nous obtenons deux types de réponses

Les molécules connues comme étant inhibitrice de la HRP, tel que l'acide gallique (4) ou le trolox (5) présente une réponse montrant peu de variation en fonction du temps (fig.12).

Par contre, les molécules connues comme non inhibitrice, tel que l'acide benzoïque (6) le graphique montre une fluctuation de la réponse électrique en fonction du temps (fig.13)

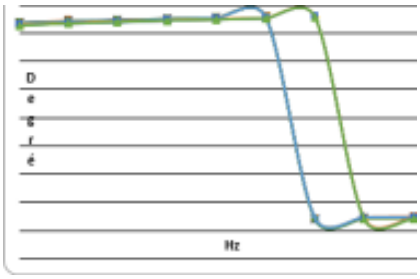


Fig.12 Réponse du système inhibé

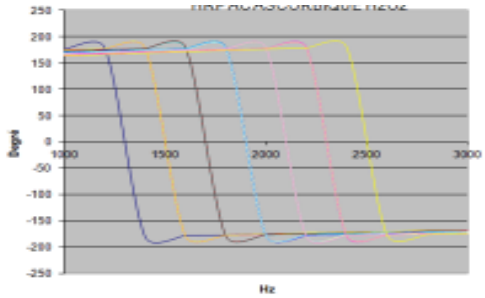


Fig.13 Réponse du système NON inhibé

Conclusions

La spectroscopie d'impédance électrochimique est un puissant outil pour étudier les mécanismes enzymatiques en solution.

L'approche que nous avons réalisé permet d'étudié l'enzyme en solution. Evitant ainsi des phénomènes parasites liés à la fixation de l'enzyme sur une électrode.

La possibilité d'utilisé une faible quantité d'enzyme (10^{-7} M) est un atout important compte tenu de la difficulté d'obtenir d'importante quantité de certain enzyme.

Nous avons pu montrer l'influence de divers composés, notamment du nitrite, sur le mécanisme d'action de l'enzyme.

Les molécules potentiellement inhibitrices d'une enzyme peuvent être étudiées avec rapidité (1 heure) et efficacité.

Les résultats présentés sous forme du déphasage en fonction de la fréquence et du temps de réaction permettent sans équivoque de prédire si une molécule sera ou non inhibitrice de la HRP.

Bibliographie

1) Michel Deluzarche et Etienne Zimmerlin. Janvier 2002, Bulletin de l'union des physiciens Vol 96, 103-111

2) Dipak K. BHATTACHARYYA, Subrata ADAK, Uday BANDYOPADHYAY and Ranajit K. BANERJEE*

Biochem. J. (1994) 298, 281-288

3) Nigel C. Veitch

Phytochemistry 65 (2004) 249–259

4) Yumiko Yoshiki, H. Yuan, T. Lida, S. Kawabata

Chemiluminescence of Horseradish Peroxidase and Acetaldehyde Related with Gallic Acid and Hydrogen Peroxide Interaction

Photochemistry and Photobiology 68(6):802 - 808 · December 1998

5) José Carlos Rebuglio Vellosa, Najeh Maissar Khalil , Vânia Ortega Gutierres , Vânia Aparecida de Freitas Formenton Macedo dos Santos , Maysa Furlan , Iguatemy Lourenço Brunetti , Olga Maria Mascarenhas de Faria Oliveira

Salacia campestris root bark extract: peroxidase inhibition, antioxidant and antiradical profile

Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences vol. 45, n. 1, jan./mar., 2009.

6) Thierry Franck, Ange Mouithys-Mickalad, Thierry Robert, Gianangelo Ghitti, Ginette Deby-Dupont, Philippe Neven, Didier Serteyn

Differentiation between stoichiometric and anticatalytic antioxidant properties of benzoic acid analogues : structure/redox potential relationship study

Chemico-Biological Interactions 206 (2013) 194-203

7) Veitch, Nigel C., Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme, Phytochemistry, 65, 2004, 249-259, 23-May-2010

8) Dunford, H.Brian and Jones, Peter A., Peroxidases and Catalases: Biochemistry, Biophysics, Biotechnology and Physiology, 2ndEdition, 2010, John Wiley and Sons Inc.

9) Oertling, W. Anthony,
Resonance Raman Scattering from Horseradish Peroxidase Compound I,
Journal of the American Chemical Society, 1985, 107 (22), 6406-6407, 23-May-2010

10) Berglund, Gunnar I., Carlsson, Gunilla H., et al., The catalytic pathway of horseradish peroxidase at high resolution, Nature, 2002, 417, 463-468, 23-May-2010