



Article

Activité de type catalase des biohybrides métalliques NP-enzymes

Noelia Losada-Garcia , Alba Rodriguez-Otero , Clara Ortega-Nieto , Ariane Azarmi  et José M. Palomo *

Instituto de Catálisis y Petroleoquímica (ICP), CSIC, C/Marie Curie 2, 28049 Madrid, Espagne *
Correspondance : josempalomo@icp.csic.es

Résumé : Dans ce travail, une synthèse efficace de bionanohybrides sous forme de métalloenzymes artificielles (Cu, Pd, Ag, Mn) basée sur l'application d'une enzyme comme échafaudage a été décrite. Ici, nous avons évalué l'effet de la modification du métal, du pH du milieu et de la quantité d'enzyme dans la synthèse de ces métalloenzymes artificielles, où se produisent des modifications des espèces métalliques et de la taille des nanoparticules. Ces nanozymes ont été appliqués à la dégradation du peroxyde d'hydrogène pour leur évaluation en tant que mimétiques de l'activité catalase, le meilleur étant le Mn@CALB-H₂O, qui présentait des nanostructures de MnO₂, avec une activité trois fois améliorée par rapport aux espèces Cu₂O, CuNPs@CALB. -P, et catalase gratuite.

Mots clés : bionanohybrides métalliques ; des nanozymes ; activité de type catalase ; peroxyde d'hydrogène



Citation : Losada-Garcia, N. ; Rodriguez-Otero, A. ; Ortega-Nieto, C. ; Azarmi, A. ; Palomo, JM Activité de type catalase des biohybrides métalliques NP – enzymes. Appl. Nano 2022, 3, 149–159. <https://doi.org/10.3390/applnano3030011>

Rédacteur académique : Angelo Maria Taglietti

Reçu : 16 juin 2022

Accepté : 12 juillet 2022

Publié : 7 août 2022

Note de l'éditeur : MDPI reste neutre en ce qui concerne les revendications juridictionnelles dans les cartes publiées et les affiliations institutionnelles.



Copyright : © 2022 par les auteurs.

Licencié MDPI, Bâle, Suisse.

Cet article est un article en libre accès distribué selon les termes et

conditions des Creative Commons

Licence d'attribution (CC BY) (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) est un sous-produit produit dans les cellules des organismes vivants et a des effets néfastes sur celles-ci [1–4]. Les catalases sont des enzymes utilisées par les cellules pour éliminer l'excès de peroxyde d'hydrogène cytoplasmique en les convertissant en eau et en oxygène moléculaire. Cependant, si la concentration de H₂O₂ augmente en raison d'une maladie, d'une exposition aux radiations et de certains produits chimiques et médicaments qui dépassent la capacité de la catalase, le H₂O₂ commence à s'accumuler et à endommager les cellules [5–8]. D'autre part, l'activité de l'enzyme catalase peut être affectée par différentes conditions environnementales, telles que la force ionique, le pH et la température (T), ou par la présence de composés qui inhibent son activité [9–11].

Le développement rapide des nanotechnologies au cours des dernières décennies a conduit à la création de nombreux nanomatériaux catalytiquement actifs [11]. Actuellement, des nanomatériaux de différentes natures sont largement utilisés en biologie, en médecine et en biotechnologie. Cette catégorie comprend les nanomatériaux dotés de propriétés mimétiques enzymatiques, tels que les nanoparticules métalliques et non métalliques, leurs oxydes, les nanoparticules magnétiques, les liposomes et les matériaux polymères et à base de carbone [12–14]. La capacité de ces nanomatériaux à remplacer des enzymes spécifiques peut offrir de nouvelles opportunités pour des applications basées sur les enzymes telles que les immunoessais, les biocapteurs, les procédés pharmaceutiques, l'oncothérapie, l'industrie alimentaire, l'écologie, etc. [15–18]. Cela démontre la grande importance et l'intérêt commercial de l'utilisation de nanomatériaux comme mimétiques d'enzymes. Comparés aux enzymes naturelles, les nanozymes dotés d'activités enzymatiques inhérentes ont récemment attiré une attention considérable en raison de leur facilité de préparation, de stockage et de séparation, ainsi que de leur faible coût [18,19].

L'un des métaux les plus utilisés dans la formation de métalloenzymes artificielles est le cuivre, en raison de son abondance, de son faible coût et de sa faible toxicité. Bien que la plupart des activités décrites dans la littérature concernent des matériaux Cu(II), en fait, récemment, dans notre groupe, des nanozymes Cu(II) avec activité catalase ont été développées [20].

Dans ce travail, nous décrivons la synthèse de catalyseurs de nanoparticules métalliques hétérogènes hautement stables (Cu, Mn, Pd et Ag) (NP métalliques – biohybrides enzymatiques), où les NP ont été créées in situ à partir d'une solution aqueuse du sel métallique (Figure 1A) [21,22]. De plus, nous avons montré que ces bionanohybrides de différentes natures, par exemple d'autres espèces de cuivre et différents métaux, comportements et tailles, ont la capacité d'imiter complètement l'activité enzymatique particulière de la catalase, améliorant même son activité (Figure 1B).

nous avons montré que ces bionanohybrides de natures différentes, par exemple d'autres coppe
Les espèces et différents métaux, comportements et tailles ont la capacité d'imiter complètement l'activité
enzymatique particulière de la catalase, améliorant même son activité (Figure 1B).

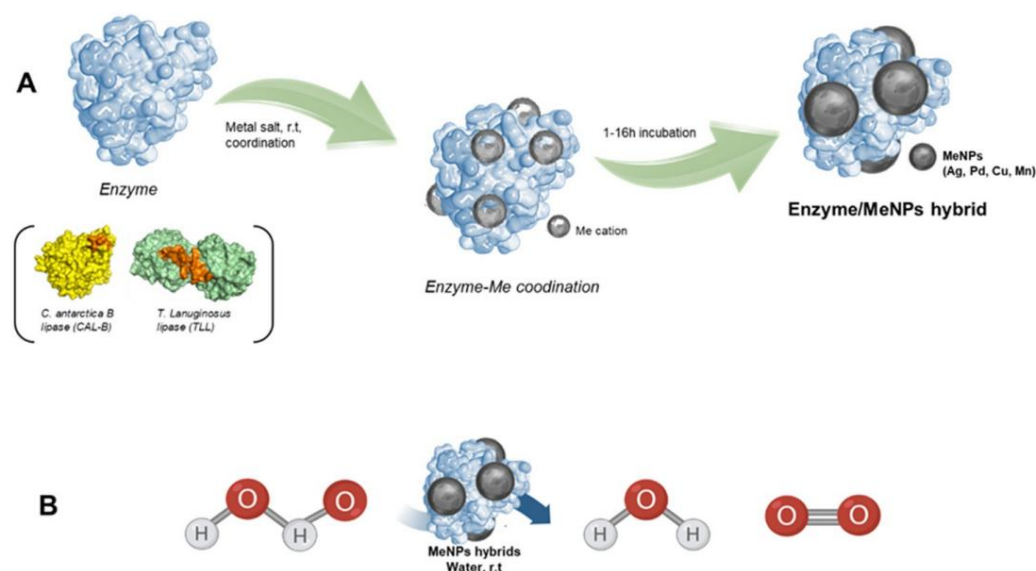


Figure 1. (A) Synthèse hybride nanoparticules métalliques-enzymes ; (B) activité de type catalase de différents bionanohybrides. Mol : métal, NP : nanoparticules.

2. Matériels et méthodes

2. Matériels et méthodes

2.1. Matériaux

Synthèse de lipase B de *Candida antarctica* (CALB) et Catzyme® 25 L (catalase de *Aspergillus niger*) ont été achetés chez Novozymes (Copenhague, Danemark). Cuivre (II) [Cu₂SO₄ × 5H₂O], N,N-diméthylformamide (DMF) et hydrogène (H₂) provenait de Panreac (Barcelone, Espagne). Bicarbonate de sodium, sodium le sulfate pentahydraté [Cu₂SO₄ × 5H₂O], le N,N-diméthylformamide (DMF) et l'hydrogénophosphate, le borohydrure de sodium, le permanganate de potassium, la base Tris et le tétraperoxyde de sodium (33 % v/v) provenaient de Panreac (Barcelone, Espagne). Le bicarbonate de sodium, le chloropalladate de sodium ont été achetés auprès de Thermo Fisher (Waltham, MA, USA). Le chloropalladate de sodium ont été achetés auprès de Thermo Fisher (Waltham, MA, USA). La base Tris, le tétraperoxyde de sodium et le chloropalladate (II) a été acheté chez Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Argent ni- 2.2. Techniques de caractérisation utilisées

La spectrométrie d'émission optique-plasma à couplage inductif (ICP-OES) a été réalisée

sur un spectromètre OPTIMA 2100 DV (PerkinElmer, Waltham, MA, USA). Diffraction des rayons X caractérisation utilisées (XRD) ont été obtenus à l'aide d'un diffractomètre avancé d'analyse de texture D8 (Bruker, Billerica, MA, USA) avec rayonnement Cu Kα. Microscopie électronique à transmission (TEM) et haute résolution X-ray (HRTEM) ont été obtenues sur un microscope 2100F (PerkinElmer, Waltham, MA, USA). Des images de microscopie TEM Les modes de diffraction (XRD) ont été obtenus à l'aide d'un appareil Texture Analysis D8 Advance Diffractomètre Bruker (Billerica, MA, USA) avec rayonnement Cu Kα. Les données de diffraction ont été analysées à l'aide de la méthode de Rietveld (Rietveld, 1969) et les données ont été analysées à l'aide de la méthode de Rietveld (Rietveld, 1969) et les données ont été analysées à l'aide de la méthode de Rietveld (Rietveld, 1969).

Les analyses de diffraction (XRD) ont été obtenues à l'aide d'un appareil Texture Analysis D8 Advance Diffractomètre Bruker (Billerica, MA, USA) avec rayonnement Cu Kα. Les données de diffraction ont été analysées à l'aide de la méthode de Rietveld (Rietveld, 1969) et les données ont été analysées à l'aide de la méthode de Rietveld (Rietveld, 1969).

bouteille en verre contenant un petit agitateur à barreau magnétique. Ensuite, 600 mg de Cu₂SO₄ × 5H₂O

2.3. Synthèse des Bionanohybrides CuNPs@CALB

3,6 ml de lipase B commerciale provenant d'une solution de *Candida antarctica* (CALB) ; Les analyses trophométriques ont été effectuées sur un spectrophotomètre V-730 (JASCO, Tokyo, Japon). 10 mg/mL) a été ajouté à 60 mL de tampon 0,1 M (phosphate de sodium pH 7,0) dans un bain de 250 mL. La solution aqueuse de NaBH₄ (300 mg) (1,2 M) a été ajoutée à la solution trouble (en deux quantités de 3 mL). La solution est devenue rapidement noire et le mélange a été réduit pendant 30 min. Après l'incubation, dans tous les cas, le mélange a été centrifugé à 8 000 tr/min pendant 5 min. Le culot généré a été remis en suspension dans 15 mL de eau distillée. Il a été à nouveau centrifugé à 8 000 tr/min pendant 5 min à température ambiante et le surnageant a été retiré. Le processus a été répété deux fois de plus. Finalement, le surnageant a été retiré, et le culot a été remis en suspension dans 2 mL d'eau distillée, transféré dans un tube à centrifuger et congelé.

Après l'incubation, dans tous les cas, le mélange a été centrifugé à 8 000 tr/min pendant 5 min avec de l'azote

solide a été obtenu. L'hybride s'appelait CuNPs@CALB-P. Une autre variante du protocole consistait à éviter l'étape de lyophilisation, en conservant le catalyseur sous forme de suspension liquide. Cela s'appelait CuNPs@CALB-P-NL.

D'autres hybrides ont été synthétisés selon les protocoles précédemment établis dans différentes conditions de pH, de séchage et de réduction (tableau S1) qui ont été testés dans nos travaux (23). Ces bionanohybrides étaient appelés CuNPs@CALB-P*, CuNPs@CALB-B et CuNPs@CALB-B*.

2.4. Synthèse des Bionanohybrides MnNPs@CALB

2.4.1. Méthode 1

Un total de 3 ml de solution commerciale CALB (10 mg/mL) ont été ajoutés à 100 ml de tampon phosphate de sodium 0,1 M pH 7,0 dans une bouteille en verre de 250 ml contenant un petit agitateur à barreau magnétique. Ensuite, 70 mg de $\text{MnSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ (0,7 mg/mL) ont été ajoutés à la solution protéique et maintenus pendant 16 h. Après 16 h, 6 ml de solution aqueuse de NaBH_4 (300 mg) (1,2 M) ont été ajoutés à la solution trouble (en deux quantités de 3 ml) comme agent réducteur. Le mélange a été réduit pendant 30 min. Après l'incubation, le mélange a été centrifugé à 8 000 tr/min pendant 5 min à température ambiante (10 mL par tube de type Falcon de 15 mL). Le culot généré a été remis en suspension dans 15 ml d'eau distillée. Il a été à nouveau centrifugé à 8 000 tr/min pendant 5 minutes et le surnageant a été éliminé. Le processus a été répété deux fois de plus. Enfin, le surnageant a été éliminé et le culot de chaque faucon a été remis en suspension dans 2 ml d'eau distillée ; toutes les solutions ont été recueillies dans un ballon à fond rond, congelées avec de l'azote liquide et lyophilisées pendant 16 h. Après cela, 47 mg de MnNPs@CALB-P ont été obtenus.

Une autre variante du protocole était l'omission de l'étape de réduction en utilisant un tampon phosphate de sodium 25 mM à pH 8,5. Après cela, 58 mg de MnNPs@CALB-P-NR ont été obtenus.

2.4.2. Méthode 2

KMnO_4 (500 mg) a été dissous dans 10 ml de DMF ou d'eau distillée. Cette solution a été ajoutée à 40 mL d'une solution d'eau distillée contenant 2 mL de CALB (10 mg/mL). La solution finale a été maintenue sous légère agitation magnétique pendant 24 h à température ambiante (TA). Après cela, la suspension résultante a été séparée par centrifugation (10 000 tr/min ; 4 °C ; 15 min). Le culot récupéré a été lavé une fois avec 10 ml d'eau distillée contenant 20 % (v/v) du co-solvant correspondant et deux fois avec de l'eau distillée (2 x 10 ml). Après cela, la suspension a été directement lyophilisée pour obtenir le catalyseur sous forme de poudre pour une utilisation ultérieure. Après cela, env. 350 mg de chaque bionanohybride ont été obtenus, appelés respectivement MnNPs@CALB-H₂O et MnNPs@CALB-DMF.

2.5. Synthèse des bionanohybrides MeNPs@CATb

AgNO_3 (20 mg) ou Na_2PdCl_4 (10 mg) ont été dissous dans 5 ml de solution d'eau distillée contenant 7,5 mg de catalase bovine (CATb). La solution a été maintenue sous légère agitation magnétique pendant 24 h à température ambiante. Après cela, la suspension résultante a été séparée par centrifugation (8 000 tr/min ; 4 °C ; 15 min). Le culot récupéré a été lavé trois fois avec 10 ml d'eau distillée. La suspension est ensuite directement lyophilisée. Les bionanohybrides étaient appelés AgNPs@CATb et PdNPs@CATb.

La caractérisation des différents bionanohybrides métalliques a été réalisée par XRD, ICP–Analyse OES, TEM, HR-TEM et SEM.

2.6. Activité de type catalase des bionanohybrides

métalliques Une solution de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (33 % (p/p)) a été préparée en ajoutant 52 µL de peroxyde d'hydrogène à 9,8 ml de tampon phosphate 100 mM ou 5 mM (pH 6,0, pH 7,0 et pH 8,0), tampon tris base 5 mM pH 9, tampon MES 5 mM pH 5, ou eau distillée afin d'obtenir une concentration finale de 50 mM. Le pH de la solution a été ajusté à l'aide de HCl ou de NaOH 1 M. Pour démarrer la réaction, différentes quantités d'hybrides MeNPs (2 mg ou 4,5 mg) ou 50 µL de Catzyme® 25 L (31 mg/mL) ont été ajoutées à 3 ou 10 mL de la solution 50 mM

à RT. La réaction a été suivie en mesurant la dégradation du peroxyde d'hydrogène en enregistrant la diminution de l'absorbance par spectrophotométrie à 240 nm dans des cuvettes en quartz de 1 cm de trajet en ajoutant 2 mL de cette solution à différents instants. Les expériences ont été réalisées en triple.

Afin de déterminer l'activité catalase pour chaque catalyseur, la valeur $\Delta\text{Abs}/\text{min}$ a été calculée en utilisant la partie linéaire de la courbe (ΔAbs). L'activité spécifique (U/mg) a été calculée à l'aide de l'équation suivante :

$$U \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1} = \Delta\text{Abs}/\text{min}\cdot V \cdot \frac{1000}{\epsilon \cdot \text{mgcatalyseur}} \quad (1)$$

où le coefficient d'extinction molaire (ϵ) utilisé était de $43,6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1} \text{ mg}^{-1}$, et mgcatalyst fait référence à d'enzyme ou de métal hybride.

3. Résultats

3.1. Synthèse et caractérisation des biohybrides MeNPs@Enzyme La

synthèse des biohybrides MeNPs@Enzyme a été réalisée en milieu aqueux en utilisant une solution commerciale de lipase B de *Candida antarctica* (CAL-B) ou de catalase bovine (CATb). Cette enzyme a été préalablement dissoute dans de l'eau distillée, et le sel métallique a été préalablement dissous dans un co-solvant (20 % (v/v)) ou ajouté directement à la solution aqueuse à température ambiante et sous douce agitation. Après 30 minutes, la solution claire initiale s'est transformée en une suspension légèrement trouble, qui était complètement trouble après 16 à 24 heures d'incubation. Un solide a été facilement obtenu après centrifugation, qui a d'abord été lavé avec le même solvant de réaction, puis avec de l'eau distillée, puis finalement congelé dans de l'azote liquide et lyophilisé, donnant l'hybride MeNPs@CALB. Dans certains cas, il a été nécessaire d'ajouter une étape de réduction utilisant NaBH_4 après l'incubation, car bien que l'enzyme CALB utilisée comme échafaudage induit une réduction des métaux, dans les métaux à faible potentiel de réduction tels que les métaux de transition tels que Cu, Fe, Mn, Zn, Co, etc., une étape de réduction supplémentaire est nécessaire pour obtenir des espèces provenant d'états de valence inférieurs.

Tout d'abord, les biohybrides CuNPs@CALB ont été analysés par XRD, démontrant des différences entre les espèces, en fonction des hybrides (Figure 2A). Lorsque les bionanohybrides présentaient 0,6 mg/mL d'enzyme, CuNPs@CALB-P et CuNPs@CALB-B ont été obtenus. Dans ces catalyseurs, des espèces de cuivre presque uniques, Cu_2O (correspondant bien à la carte JCPDS n° 05-0667) ou $\text{Cu}(0)$ (correspondant bien à la carte JCPDS n° 04-0836), respectivement, ont pu être observées. Cependant, lorsque la quantité d'enzyme était inférieure (0,3 mg/mL), les hybrides synthétisés par ces protocoles, CuNPs@CALB-P* et CuNPs@CALB-B*, contenaient les deux espèces de cuivre, Cu_2O et $\text{Cu}(0)$. Dans le cas de CuNPs@CALB-P*, il présentait 40 % de $\text{Cu}(0)$ (Figure 2A), et dans le cas de CuNPs@CALB-B*, il présentait 30 % d'espèces $\text{Cu}(I)$. Ces différences pourraient être dues à l'effet que l'enzyme exerce lors de l'étape de réduction, puisque l'environnement protéique ralentit le processus de réduction. L'analyse TEM a démontré la formation de nanoparticules de diamètres différents (Figures 2 et S1), dans une plage comprise entre 6 et 15 nm (Tableau S1), les plus petites étant dans CuNPs@CALB-B (Figure S1D).

Une autre modification du protocole de synthèse a été l'élimination de l'étape de lyophilisation, entraînant la production de CuNPs@CALB-P-NL. En analysant le modèle XRD, la non-congélation de la structure enzymatique a pu être observée ; les espèces de ce bionanohybride présentaient un mélange d'espèces de cuivre [Cu_2O et $\text{Cu}(0)$] (75:25 $\text{Cu}_2\text{O}:\text{Cu}(0)$). L'analyse TEM a démontré que le diamètre des nanoparticules était le même que celui des CuNPs@CALB-P, à savoir 10 nm (tableau S1).

La quantité de Cu sur le solide a été déterminée par analyses ICP – OES. Les pourcentages de cuivre dans les différents hybrides CuNPs@CALB étaient de 45 % à 93 % (tableau S1).

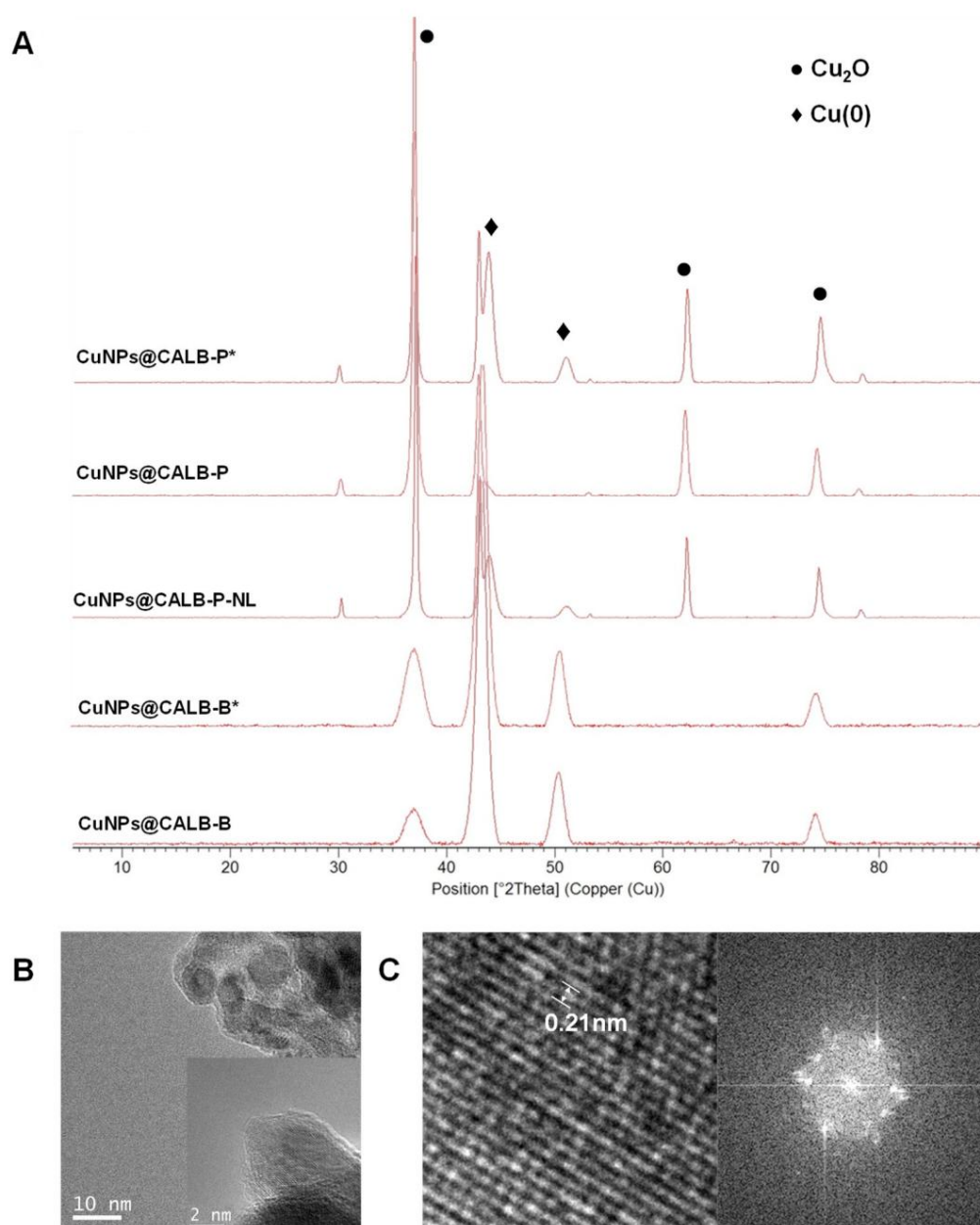


Figure 2. (A) Spectre XRD des hybrides CuNPs@CALB; (B) Images TEM et HR-TEM (encadré) de CuNPs@CALB-P; (C) Analyse FFT de CuNPs@CALB-P.

Une autre modification a été effectuée (sel de MnSO_4) dans un tampon phosphate de sodium a été utilisé. Dans ce cas, MnNPs@CALB-P ou MnNPs@CALB-P-NR ont été obtenus, respectivement. Le modèle XRD, dans ce la même relation de la structure manganèse de manganèse dans les espèces de $\text{Mn}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (Figure 3A) [24]. L'analyse SEM a montré des structures mésoporeuses similaires (Figure 3B,C). Cela montre que l'étape de réduction n'a eu aucune conséquence sur celui des CuNPs@CALB-P, à savoir 10 nm (tableau S1).

La quantité de Cu sur le solide a été déterminée par analyses ICP – OES. Les pourcentages de cuivre dans les différents hybrides CuNPs@CALB étaient de 45 % à 93 % (tableau S1).

Par la suite, un sel de manganèse (sel de MnSO_4) dans un tampon phosphate de sodium a été utilisé. Dans ce cas, MnNPs@CALB-P ou MnNPs@CALB-P-NR ont été obtenus, respectivement. Le modèle XRD a montré la même espèce de manganèse dans les deux cas, à savoir $\text{Mn}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (Figure 3A) [24]. L'analyse SEM a montré des structures mésoporeuses similaires (Figure 3B,C). Cela montre que l'étape de réduction n'a eu aucune conséquence.



En plus, des présences de MnO₂ (qui également était présente dans MnO₂ et MnO₂ + MnO) ont été observées dans les deux catalyseurs MnNP@CALB-DMF. (20 spectres XRD ont révélé la présence de MnO₂ dans les deux catalyseurs MnNP@CALB-DMF). Les images SEM montraient des morceaux amorphes et MnO₂ (Carte JCPDS n° 18-0802) dans les deux catalyseurs (Figure 4A) [25]. Les images SEM ont montré de l'amor-
phisme dans le solide dans chaque cas était d'environ 25 % déterminée par ICP-OES (analyse (tableau S1)).

Pour la synthèse de l'hybride AgNPs@CATb, différentes espèces d'Ag ont été formées, à savoir Ag(0), Ag₂O et AgO, comme observé dans le spectre XRD (Figure 5A(I)). MEB l'analyse a démontré un agrégat avec une superstructure amorphe mésoporeuse, et Les images TEM ont montré des nanoparticules d'une taille comprise entre 10 et 20 nm en raison des différentes espèces formées (figures 5A (II, III) et S2). La quantité d'Ag était de 34 %, déterminée avec Analyse ICP – OES (tableau S1).

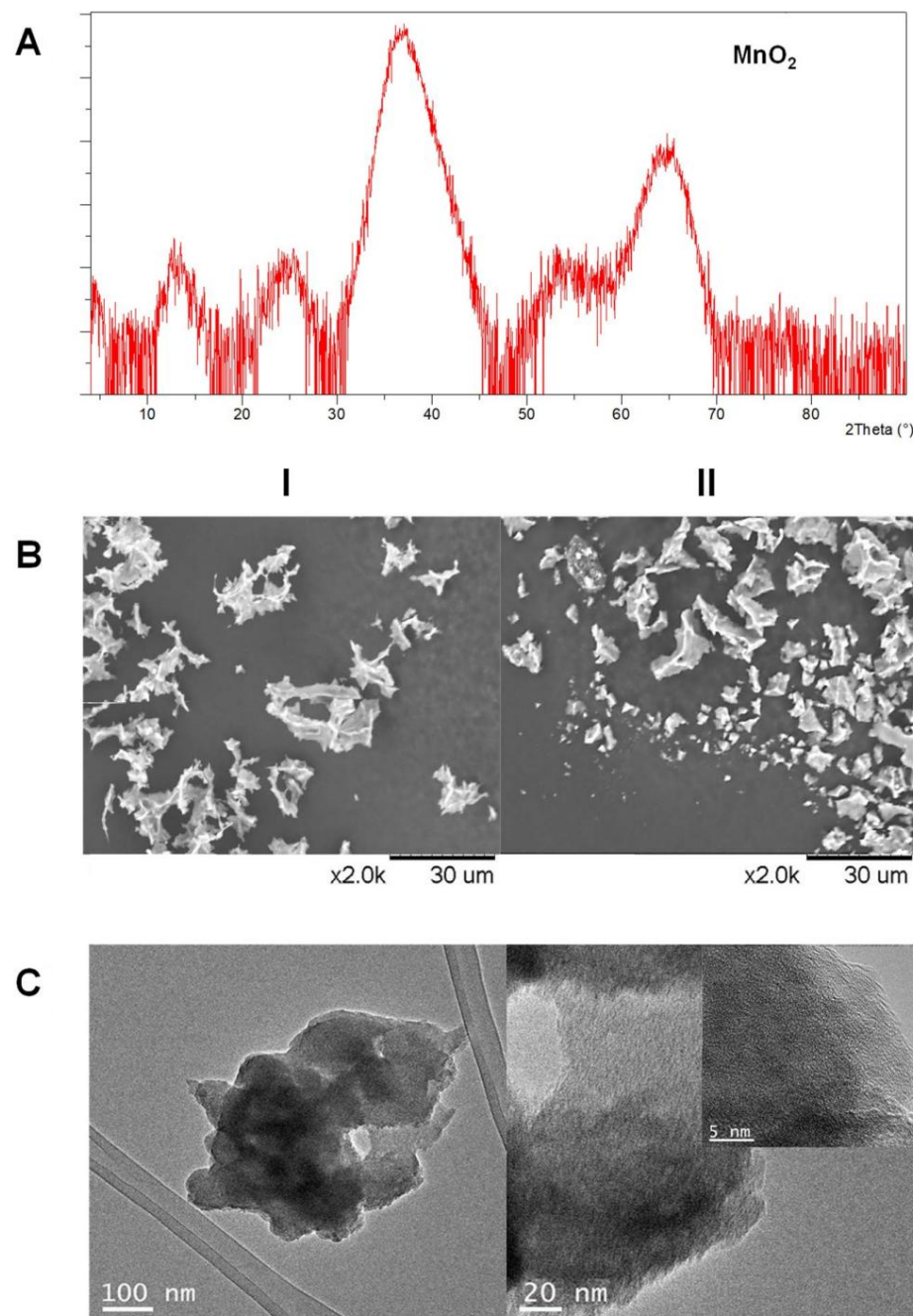
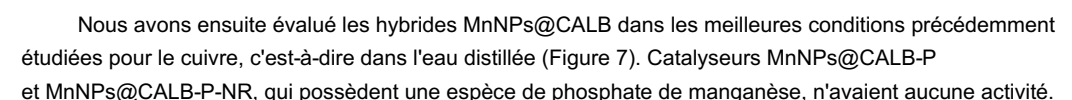


Figure 4. Caractérisation des hybrides $\text{MnO}_2\text{@CABH}_2\text{O}$ et $\text{MnO}_2\text{@CABDDMF}$: (A) spectre XRD, (B) images SEM (I) $\text{MnO}_2\text{@CABH}_2\text{O}$ et (II) $\text{MnO}_2\text{@CABDDMF}$, (C) images TEM des $\text{MnO}_2\text{@CABH}_2\text{O}$ (I) et $\text{MnO}_2\text{@CABDDMF}$ (II).

D'autre part, PdNPs@CATb a été synthétisé avec de la catalase bovine comme échantillon. La quantité de Mn dans le solide dans chaque cas était d'environ 25 %, déterminée par analyse ICP-OES (tableau S1). Le spectre XRD a mis en évidence l'existence de nanoparticules de chlorure de palladium (Figure 5B(I)) [26]. L'analyse SEM a démontré des structures mésoporeuses et des images TEM ont montré la formation de petites nanoparticules sphériques d'un diamètre moyen de 10 nm. En plus du changement de métal, une autre variante du système a été l'introduction qui a montré la formation de petites nanoparticules sphériques d'un diamètre moyen de 10 nm. Comme autres métaux, l'argent (AgNO_3) et le palladium (Na_2PdCl_4) a été utilisé pour obtenir AgNPs@CATb et PdNPs@CATb , respectivement (Tableau S1).

Pour la synthèse de l'hybride AgNPs@CATb , différentes espèces d'Ag ont été formées, à savoir $\text{Ag}(0)$, Ag_2O et AgO , comme observé dans le spectre XRD (Figure 5(AI)). MEB l'analyse a démontré un agrégat avec une superstructure amorphe mésoporeuse et les images TEM ont montré des nanoparticules d'une taille comprise entre 10 et 20 nm en raison des différentes espèces formées (Figure 5 (AII, AIII) et S2). La quantité d'Ag était de 34 %, déterminée avec Analyse ICP – OES (tableau S1).



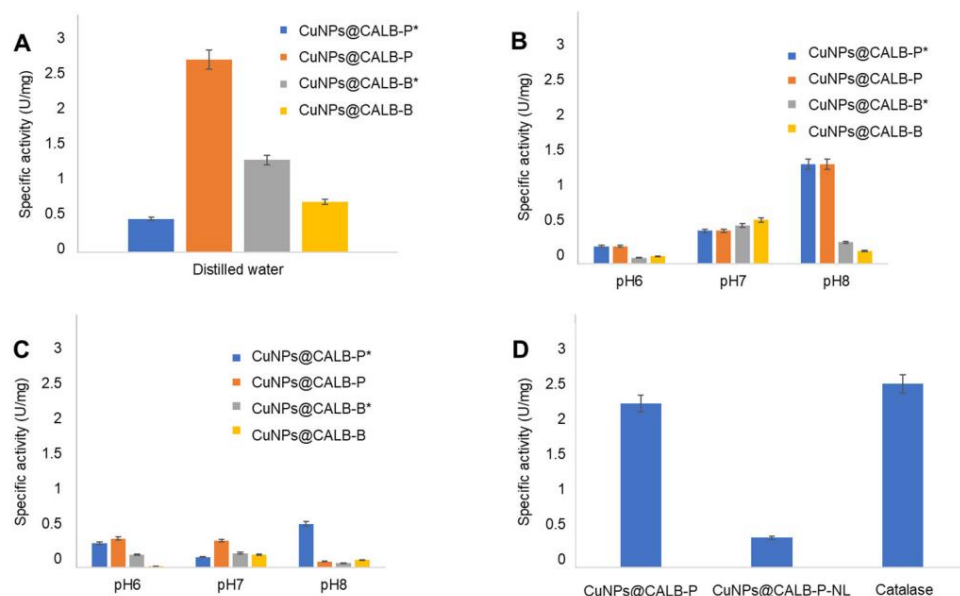


Figure 6. Activité de type catalase de différents hybrides CuNPs@CALB. (A) Eau distillée; (B) sodium phosphate de sodium 5 mM; (C) tampon phosphate de sodium 100 mM; (D) CuNPs@CALB-P dans l'eau distillée comparé à la catalase libre et CuNPs@CALB-P-NL.

D'autre part, d'autres tests ont été réalisés dans des solutions tampons à force ionique faible ou élevée (5 mM et 100 mM) dans une plage de pH de 6,0 à 8,0 (Figure 6B,C). Dans ces cas, une diminution générale de l'activité de tous les catalyseurs a été observée, même avec de très faibles quantités de tampon. Plus précisément, à faible force ionique, lorsque le pH était plus élevé, ils présentaient une activité catalase plus élevée, bien que dans le cas de CuNPs@CALB-P, à n'importe quel pH, elle présentait une activité au moins six fois inférieure à celle de l'eau distillée. Lorsque le milieu avait une force ionique élevée, les résultats étaient pires dans tous les cas.

Cet effet d'inhibition des ions phosphate dans la dégradation du peroxyde d'hydrogène par les nanoparticules de cuivre pourrait s'expliquer par une sorte de liaison d'un groupe phosphate au cuivre, générant des espèces intermédiaires et réduisant la réactivité du catalyseur. En effet, cela peut être corroboré par les résultats obtenus lorsqu'un hybride contenant des espèces de phosphate de cuivre [23] a été utilisé. Dans ce cas, l'activité catalase de cet hybride était plus de 20 fois inférieure dans l'eau distillée à celle des hybrides Cu présents dans ce travail (données non présentées).

Par conséquent, pour les conditions de plus grande activité dans CuNPs@CALB-P (eau distillée), l'activité catalase du même hybride a été évaluée mais sans traitement de lyophilisation (Figure 6D) (CuNPs@CALB-P-NL), où une activité 5,5 fois inférieure a été observée, démontrant l'effet de la présence d'espèces Cu(0). Enfin, l'activité de CuNPs@CALB-P a été comparée à l'activité de la catalase libre (Figure 6D), où une

Figure 7. Activité de type catalase des hybrides MnNPs@CALB dans l'eau distillée.

Après cela, nous avons évalué les hybrides MnNPs@CALB dans les meilleures conditions auparavant. En revanche, lorsque les espèces étaient des nanostructures de MnO₂, MnNPs@CALB-P présentait une activité 4 fois supérieure (Figure 7). Catalase MnNPs@CALB-DMF.

En revanche, lorsque les espèces étaient des nanostructures de MnO₂, Mn- et MnNPs@CALB-P-NR, qui possèdent des catalyseurs Mn(II) et Mn(III) dans leurs structures, MnNPs@CALB-P-NR présentait une activité 2 fois supérieure à celle de MnNPs@CALB-P (Figure S4). Dans le cas du tampon MnNPs@C pH 9 et de MnNPs@CALB-DMF, l'activité catalase était 45 fois inférieure à celle de MnNPs@CALB-H₂O et 45 fois inférieure à celle de MnNPs@CALB-DMF. Dans le cas d'un tampon de pH plus élevé (pH 9), MnNPs@CALB-DMF présentait une activité catalase 45 fois inférieure à celle de MnNPs@CALB-H₂O et 45 fois inférieure à celle de MnNPs@CALB-DMF. Dans le cas d'un tampon avec un p supérieur à celui de MnNPs@CALB-DMF, il présentait une activité similaire, tandis que pour MnNPs@CALB- halt (Figure S4).

Enfin, le biohybride MnNPs@CALB-H₂O a présenté une activité trois fois celle de la catalase naturelle à TA dans l'eau distillée Fiure 7.

Enfin, deux biohybrides de métaux précieux (Ag et Pd) ont été synthétisés en utilisant la catalase bovine comme échafaudage (AgNPs@CATb et PdNPs@CATb) pour évaluer un effet synergique potentiel entre la catalase et les nanoparticules métalliques. Cependant, l'activité spécifique des deux catalyseurs était très faible (plus de 100 fois inférieure à celle de l'hybride Mn) (données non présentées).

Ceux-ci pourraient être dus au type d'espèces métalliques formées dans chaque cas, à savoir PdCl₂ pour l'hybride Pd et un mélange de différents oxydes d'argent pour l'hybride Ag.

Dans la littérature, il existe différentes méthodologies pour la dégradation du H₂O₂ en tant que mimétique de l'activité catalase. Certains d'entre eux utilisent des complexes de métaux précieux, parfois supportés, ou des structures tubulaires, où il est nécessaire de synthétiser des systèmes dans des conditions drastiques et toxiques [27-30]. Par conséquent, la méthodologie proposée dans nos travaux présente un avantage en termes de simplicité et de durabilité dans la création de métalloenzymes artificielles capables de dégrader H₂O₂ en milieu aqueux à température ambiante.

4. Conclusions

En conclusion, dans cette étude, nous avons présenté une stratégie simple mais polyvalente pour la préparation de différentes métalloenzymes artificielles à activité de type catalase (MeNPs@Enzyme) basée sur l'application d'une enzyme qui induit la formation in situ de nanoparticules métalliques sur la protéine. réseau.

Différents bionanohybrides de différents métaux (Cu, Mn, Pd, Ag) ont été synthétisés et évalués en termes de capacité à décomposer le peroxyde d'hydrogène à température ambiante en milieu aqueux. MnNPs@CALB-H₂O, formé de nanostructures de MnO₂, présentait une excellente activité mimétique, étant même trois fois supérieure à la catalase naturelle.

Par conséquent, ces résultats ouvrent l'application potentielle de ces nouveaux bionanohybrides en combinaison avec d'autres systèmes enzymatiques pour les processus biologiques et biomédicaux.

Documents supplémentaires : les informations complémentaires suivantes peuvent être téléchargées sur : <https://www.mdpi.com/article/10.3390/applnano3030011/s1>, Figure S1. (I) Images TEM ; (II) Images HR-TEM. (A) CuNPs@CALB-P* ; (B) CuNPs@CALB-P-NL ; (C) CuNPs@CALB-B* ; (D) CuNPs@CALB-B. Figure S2. Caractérisation de AgNPs@CATb : (A) images SEM ; (B) Image TEM ; Figure S3. Caractérisation de PdNPs@CATb : (A) images SEM ; (B) Image TEM ; Figure S4. Activité de type catalase des hybrides MnNPs@CALB dans 5 mM de TRIS BASE pH 9 (bleu) et 5 mM de MES pH 5 (orange).

Tableau S1. Synthèse d'hybrides MeNPs@Enzyme.

Contributions des auteurs : NL-G., AR-O., CO-N. et AA a réalisé les expériences ; JMP a conçu et supervisé l'étude et les expériences ; et JMP et NL-G. a écrit le manuscrit. Tous les auteurs ont lu et accepté la version publiée du manuscrit.

Financement : Ce travail a été soutenu par le gouvernement espagnol : le Conseil national espagnol de la recherche (CSIC) (PTI-Health CSIC SGL2103036).

Déclaration de disponibilité des données : sans objet.

Remerciements : Les auteurs remercient Ramiro Martinez de Novozymes.

Conflits d'intérêts : Les auteurs ne déclarent aucun conflit d'intérêts.

Les références

1. Wu, Z.; Liu, M.; Liu, Z.; Tian, Y. Imagerie en temps réel et quantification simultanée du H₂O₂ mitochondrial et de l'ATP dans les neurones avec une seule sonde basée sur la fluorescence à deux photons. *Chimique. Soc.* 2020, 142, 7532-7541. [Référence croisée] [Pub Med]
2. Chanson, X.; Bai, S.; Poule,.; Wang, R.; Xing, Y.; Lv, C.; Yu, F. Évaluation en temps réel des lésions causées par le peroxyde d'hydrogène dans des modèles de souris atteints de fibrose pulmonaire avec une sonde fluorescente proche infrarouge ciblée sur les mitochondries. *ACS Sénat.* 2021, 6, 1228-1239. [Référence croisée] [Pub Med]
3. Filip, C.; Albu, E. (Eds.) *Espèces réactives de l'oxygène (ROS) dans les cellules vivantes*; IntechOpen : Londres, Royaume-Uni, 2018.
4. Bai, Z.; Li, G.; Liang, J.; Su, J.; Zhang, Y.; Chen, H.; Huang, Y.; Sui, W.; Zhao, Y. Biocapteur électrochimique non enzymatique basé sur des nano-hybrides PtNPs/RGO-CS-Fc pour la détection du peroxyde d'hydrogène dans les cellules vivantes. *Biosens. Bioélectron.* 2016, 82, 185-194. [Référence croisée] [Pub Med]
5. Rachid, RT; Mansoor, HS; Abdallah, TA ; Juzsakova, T. ; Al-Jammal, N. ; Salman, AD; Al-Shaikhly, RR ; Le, PC; Domokos, E. ; Abdulla, TA Synthèse, caractérisation des nanoparticules de V₂O₅ et détermination de l'activité mimétique de la catalase par une nouvelle méthode colorimétrique. *J. Therm. Anal. Calorim.* 2021, 145, 297-307. [Référence croisée]

6. Nandi, A. ; Yan, LJ; Jana, CK; Das, N. Rôle de la catalase dans les maladies dégénératives associées au stress oxydatif et à l'âge. *Oxyde. Méd. Cellule. Longev.* 2019, 13, 123-132. [\[Référence croisée\]](#)
7. Ali, F. ; Manzoor, U. ; Khan, FI ; Posé.; Khan, député; Chandrashekharaiah, KS; Singh, LR ; Dar, TA Effet des osmolytes de polyol sur l'intégrité structure-fonction et la propension à l'agrégation de la catalase : une étude complète basée sur des mesures de simulation spectroscopiques et dynamiques moléculaires. *Int. J. Biol. Macromol.* 2022, 209, 198-210. [\[Référence croisée\]](#)
8. Nantapong, N. ; Murata, R. ; Trakulnaleamsai, S. ; Kataoka, N. ; Yakushi, T. ; Matsushita, K. L'effet des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et des enzymes éliminant les ROS, la superoxyde dismutase et la catalase, sur la capacité thermotolérante de *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnologie.* 2019, 103, 5355-5366. [\[Référence croisée\]](#)
9. Fernandez-Lafuente, R. Stabilisation des enzymes multimériques : stratégies pour prévenir la dissociation des sous-unités. *Microbe enzymatique. Technologie.* 2009, 45, 405-418. [\[Référence croisée\]](#)
10. Hromic-Jahjefendic, A. Test de la stabilité de la température et du pH de l'enzyme catalase en présence d'inhibiteurs. *Période. Ing. Nat. Sci.* 2022, 10, 18-29. [\[Référence croisée\]](#)
11. Cormode, DP; Gao, L. ; Koo, H. Applications biomédicales émergentes des nanomatériaux catalytiques de type enzyme. *Tendances Biotechnologie.* 2018, 36, 15-29. [\[Référence croisée\]](#)
12. Jiao, M. ; Li, Z. ; Li, X. ; Zhang, Z. ; Yuan, Q. ; Vriesekoop, F. ; Liang, H. ; Liu, J. Résoudre le problème des sous-produits H₂O₂ en utilisant une cascade de nanozymes imitant la catalase pour améliorer l'acide glycolique oxydase. *Chimique. Ing. J.* 2020, 388, 124249. [\[CrossRef\]](#)
13. Zhang, H. ; Yang, KL Formation in situ et immobilisation de nanoparticules d'or sur du polydiméthylsiloxane (PDMS) présentant activité mimétique de la catalase. *Chimique. Commun.* 2020, 56, 6416-6419. [\[Référence croisée\]](#)
14. Zhang, J. ; Lu, X. ; Tang, D. ; Wu, S. ; Hou, X. ; Liu, J. ; Wu, P. Points de carbone phosphorescents pour une photosensibilisation à l'oxygène très efficace et comme nanozymes photo-oxydants. *Application ACS. Maître. Interfaces* 2018, 10, 40808-40814. [\[Référence croisée\]](#) [\[Pub Med\]](#)
15. Chen, H. ; Seiber, JN; Hotze, M. ACS, sélection sur la nanotechnologie dans l'alimentation et l'agriculture : une perspective sur les implications et applications. *J. Agric. Chimie alimentaire.* 2014, 62, 1209-1212. [\[Référence croisée\]](#) [\[Pub Med\]](#)
16. Chen, W. ; Chen, J. ; Feng, YB; Hong, L. ; Chen, QY ; Wu, LF; Lin, X.-H. ; Xia, X.-H. Activité de type peroxydase des nanoparticules d'oxyde de cuivre solubles dans l'eau et son application analytique pour la détection du peroxyde d'hydrogène et du glucose. *Analyste* 2012, 137, 1706-1712. [\[Référence croisée\]](#) [\[Pub Med\]](#)
17. Lu, L. ; Wang, X. ; Xiong, C. ; Yao, L. Progrès récents dans la détection biologique avec des nanoparticules magnétiques comme outil utile. *Sci. Chine Chim.* 2015, 58, 793-809. [\[Référence croisée\]](#)
18. Wang, Q. ; Wei, H. ; Zhang, Z. ; Wang, E. ; Dong, S. Nanozyme : Une alternative émergente à l'enzyme naturelle pour la biodétection et l'immunoessai. *Analyste des tendances. Chimique.* 2018, 105, 218-224.
19. Wu, JJ; Wang, XY; Wang, Q. ; Lou, ZP ; Li, SR; Zhu, YY; Qin, L. ; Wei, H. Nanomatériaux dotés de caractéristiques semblables à celles d'une enzyme (nanozymes) : Enzymes artificielles de nouvelle génération (II). *Chimique. Soc. Rév.* 2019, 48, 1004-1076. [\[Référence croisée\]](#)
20. Losada-Garcia, N. ; Jiménez-Alesanco, A. ; Velazquez-Campoy, A. ; Abien, O. ; Palomo, JM Nanozymes hybrides enzyme/nanocopper : modulation de l'activité de type enzymatique par la structure protéique pour la biodétection et la thérapie catalytique des tumeurs. *Application ACS. Maître. Interfaces* 2021, 13, 5111-5124. [\[Référence croisée\]](#)
21. Palomo, JM Nanobiohybrids : Un nouveau concept pour la synthèse de nanoparticules métalliques. *Chimique. Commun.* 2019, 55, 9583-9589. [\[Référence croisée\]](#)
22. Filice, M. ; Losada-Garcia, N. ; Pérez-Rizquez, C. ; Marciello, M. ; Morales, MDP; Palomo, JM Palladium-nanoparticules BioHybrids en chimie appliquée. *Appl. Nano* 2020, 2, 1-13. [\[Référence croisée\]](#)
23. Losada-Garcia, N. ; Rodriguez-Otero, A. ; Palomo, JM Synthèse sur mesure de nanobiohybrides hétérogènes enzyme-cuivre et leur application dans l'oxydation sélective du benzène en phénol. *Catal. Sci. Technologie.* 2020, 10, 196-206. [\[Référence croisée\]](#)
24. Munyemana, JC; Il h.; Ding, S. ; Yin, J. ; Xi, P. ; Xiao, J. Synthèse de nanofleurs hybrides de phosphate de manganèse par biominéralisation sur modèle de collagène. *RSC Adv.* 2018, 8, 2708-2713. [\[Référence croisée\]](#) [\[Pub Med\]](#)
25. Li, Y. ; Xiao, L. ; Liu, F. ; Dou, Y. ; Liu, S. ; Fan, Y. ; Cheng, G. ; Chanson, W. ; Zhou, J. Structure noyau-coquille Ag@Pd nanoparticules prises en charge sur un substrat de MnO₂ en couches comme catalyseur d'oxydation du toluène. *J. Nanopart. Rés.* 2019, 21, 28. [\[Réf. croisée\]](#)
26. Manepalli, RKNR; Madhav, BTP; Giridhar, G. ; Srinivasulu, M. ; Tejaswi, M. ; Sivaram, K. ; Jayaprada, P. ; Pisipati, VGKM Caractérisation et comportement mésomorphe de cristaux liquides avec des nanoparticules de PdCl₂ dispersées. *Liq. Cristal. Aujourd'hui* 2017, 26, 32-38. [\[Référence croisée\]](#)
27. Chaibakhsh, N. ; Moradi-Shoeili, Z. Activités mimétiques enzymatiques des nanoferrites substitués par spinelle (MFe₂O₄) : Une revue de la synthèse, mécanisme et applications potentielles. *Maître. Sci. Ing. C* 2019, 99, 1424-1447. [\[Référence croisée\]](#)
28. Marr, KM; Chen, B. ; Mootz, EJ; Geder, J. ; Pruessner, M. ; Melde, BJ; Vanfleet, RR ; Mendintz, Illinois ; Iverson, BD; Claussen, JC Membranes de nanotubes de carbone à rapport d'aspect élevé décorées d'oursins à nanoparticules de platine pour la propulsion de micro-véhicules sous-marins via la décomposition de H₂O₂. *ACS Nano* 2015, 9, 7791-7803. [\[Référence croisée\]](#)
29. Zhang, H. ; Deng, X. ; Jiao, C. ; Lu, L. ; Zhang, S. Préparation et activités catalytiques pour la décomposition H₂O₂ de nanoparticules bimétalliques Rh/Au. *Maître. Rés. Taureau.* 2016, 79, 29-35. [\[Référence croisée\]](#)
30. Yesmurzayeva, NN; Nourakhmetova, ZA; Tatykhanova, GS ; Selenova, BS; Kudaibergenov, SE Activité catalytique de l'or et nanoparticules d'argent supportées sur oxyde de zinc. *Supramol. Catal.* 2015, 2, 1–8. [\[Référence croisée\]](#)