

LA VIE TREPIDANTE DES ELECTRONS

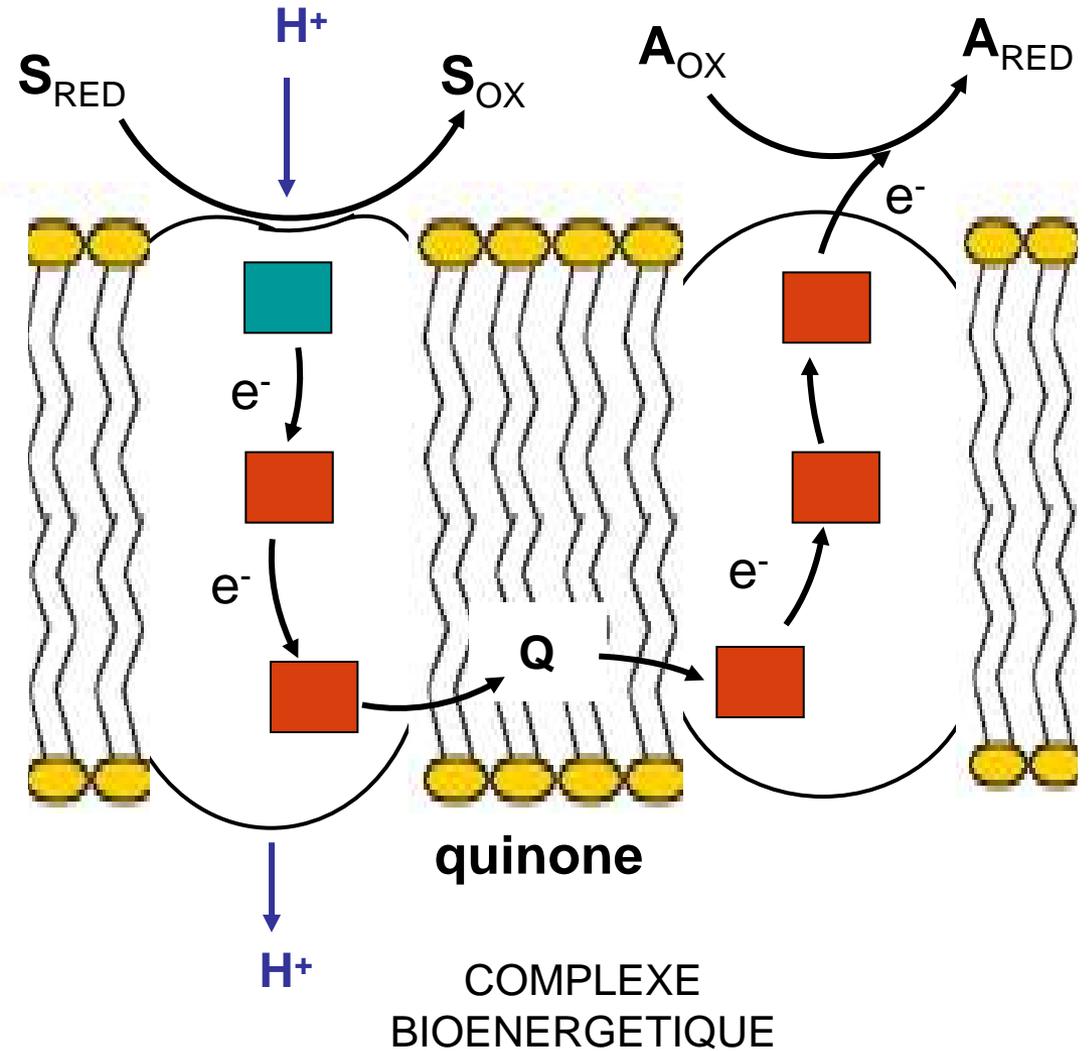
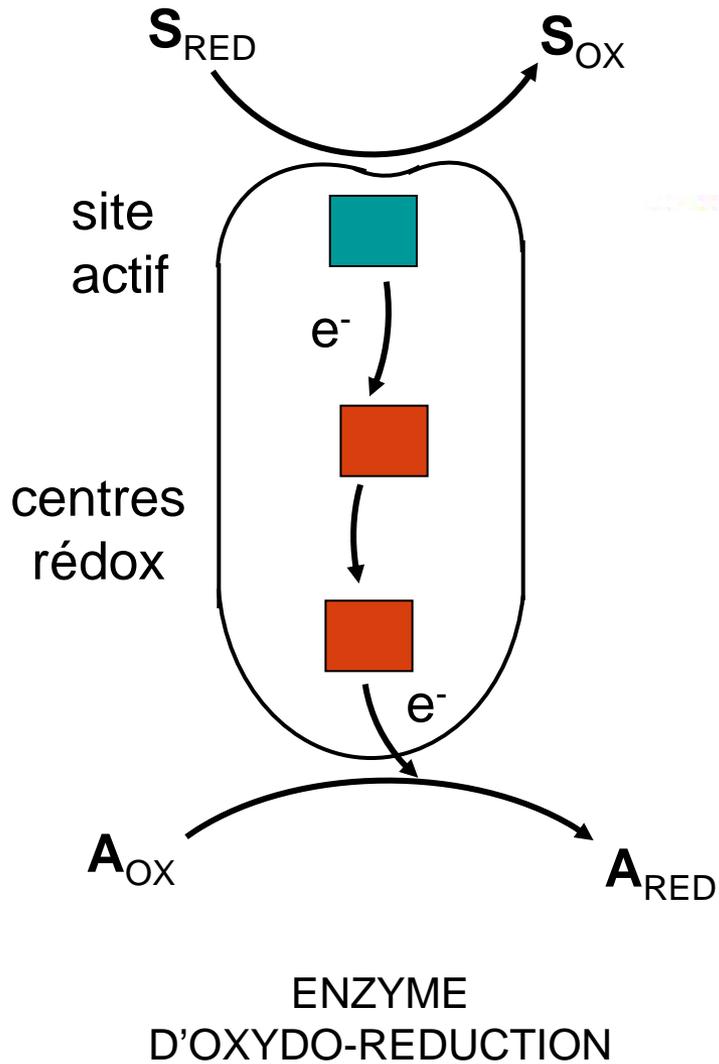
DANS LES ENZYMES D'OXYDO-REDUCTION

Patrick BERTRAND

Professeur à l'Université de Provence

Aix-Marseille 1

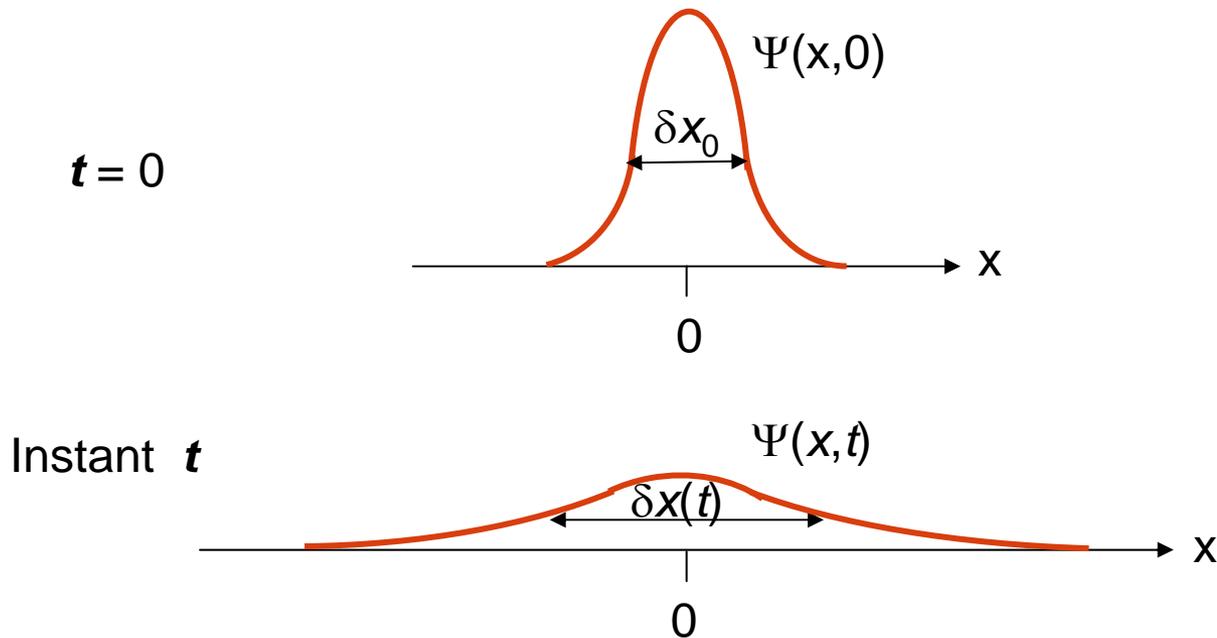
Collège de France, 8 avril 2009



LES PROPRIETES EXTRAORDINAIRES DES ELECTRONS

CAS D'UN ELECTRON LIBRE

Probabilité de présence: $(\Psi(x,t))^2$



L'électron **se délocalise** spontanément

A quelle vitesse ?

UN PETIT CALCUL

$$\delta x(t) = \sqrt{(\delta x_0)^2 + \left(\frac{\eta t}{m_e \delta x_0}\right)^2}$$

- **électron** ($m_e = 9,1 \times 10^{-31}$ kg) avec $\delta x_0 = 1 \text{ \AA}$

$$\begin{array}{ll} \delta x = 12 \text{ \AA} & t = 10^{-15} \text{ s} \\ \delta x = 1,2 \text{ mm} & t = 10^{-9} \text{ s} \end{array}$$

- objet **d'un kilogramme** avec $\delta x_0 = 0,1$ mm

$$\delta x = 1 \text{ mm pour } t = 30 \times 10^{18} \text{ ans}$$

(âge de l'Univers : 13×10^9 ans)

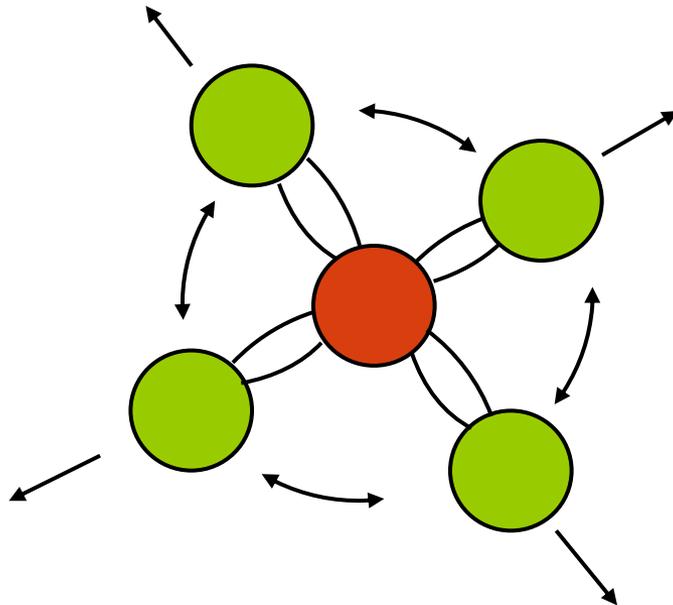
DANS LES **MOLECULES**, LES ELECTRONS NE SONT **PAS LIBRES** !

Charge négative : interagissent avec les noyaux et les autres électrons

Mais **très petite masse**



- **délocalisation** dans des orbitales moléculaires : notion de **densité électronique**
- s'adaptent instantanément aux **variations de géométrie**:

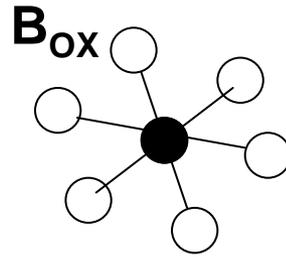
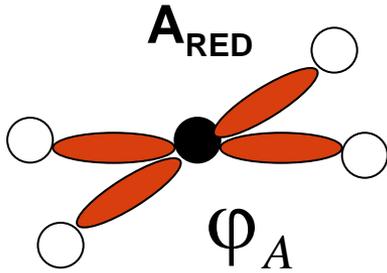


vibrations moléculaires

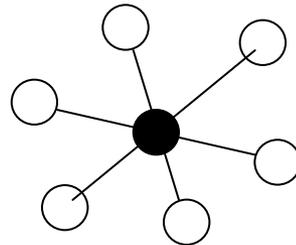
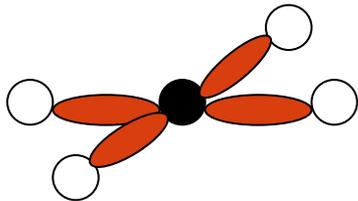
La densité électronique
s'étire et se contracte
en suivant les mouvements des noyaux

LES TRANSFERTS D'ELECTRONS A LONGUE DISTANCE

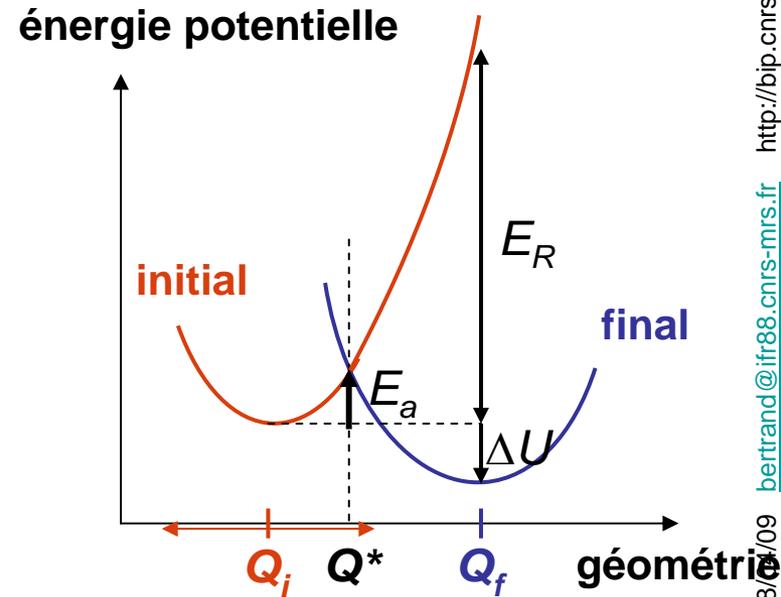
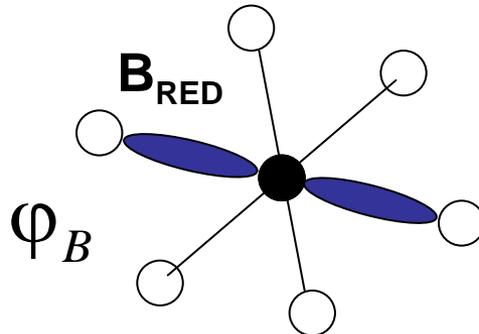
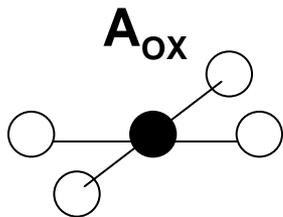
état initial
 Q_i



Q^*



état final
 Q_f



$$k \propto P \exp(- E_a / RT)$$

$$E_a = \frac{(\Delta U + E_R)^2}{4E_R}$$

EXPRESSION DE LA CONSTANCE DE VITESSE



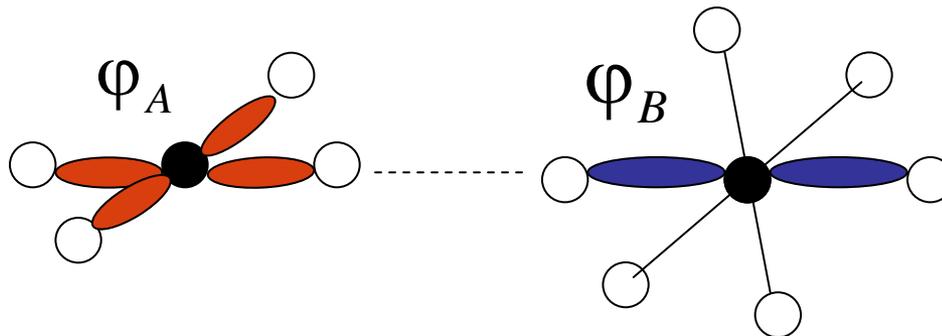
Analyse plus détaillée (**R. Marcus**, Prix Nobel de Chimie 1992)

$$k \propto P \exp\left(-\frac{(\Delta G^\circ + E_R)^2}{4RT E_R}\right)$$

- ΔU remplacé par ΔG° (variation d'enthalpie libre standard de la réaction)

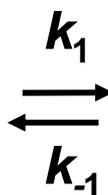
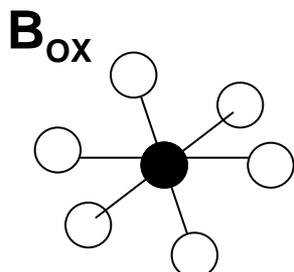
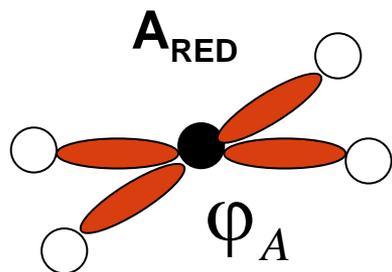
$$\Delta G^\circ = -\mathcal{F} \Delta E^\circ, \text{ avec } \Delta E^\circ = E^\circ_B - E^\circ_A \text{ potentiels rédox standards}$$

- P : facteur électronique : carré *recouvrement* des orbitales (distance et **masse**)

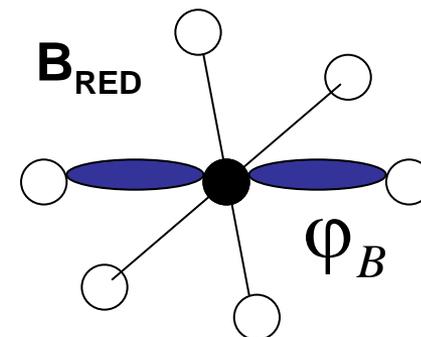
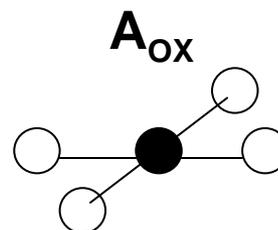


ET LE TRANSFERT INVERSE ?

état initial



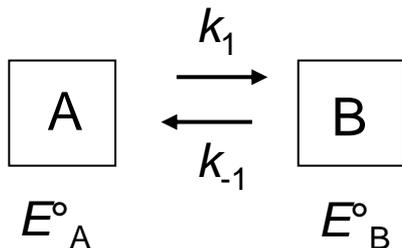
état final



k_1 et k_{-1} : même P et même E_R , mais $\Delta G^\circ \rightarrow -\Delta G^\circ$

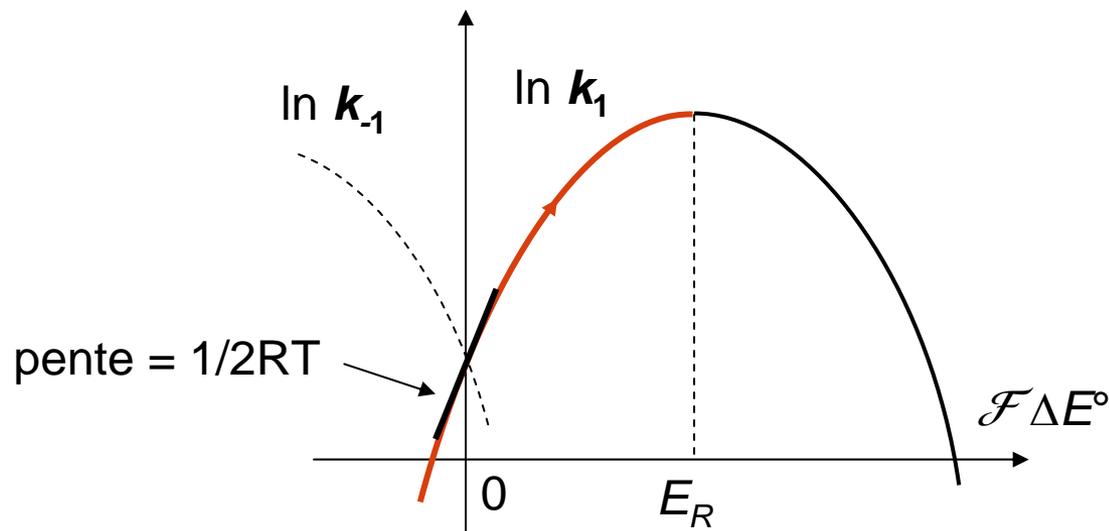
$$k_1/k_{-1} = \exp(-\Delta G^\circ/RT)$$

UNE PROPRIETE REMARQUABLE : VARIATION DE k_1 AVEC ΔE°



$$\Delta E^\circ = E^\circ_B - E^\circ_A$$

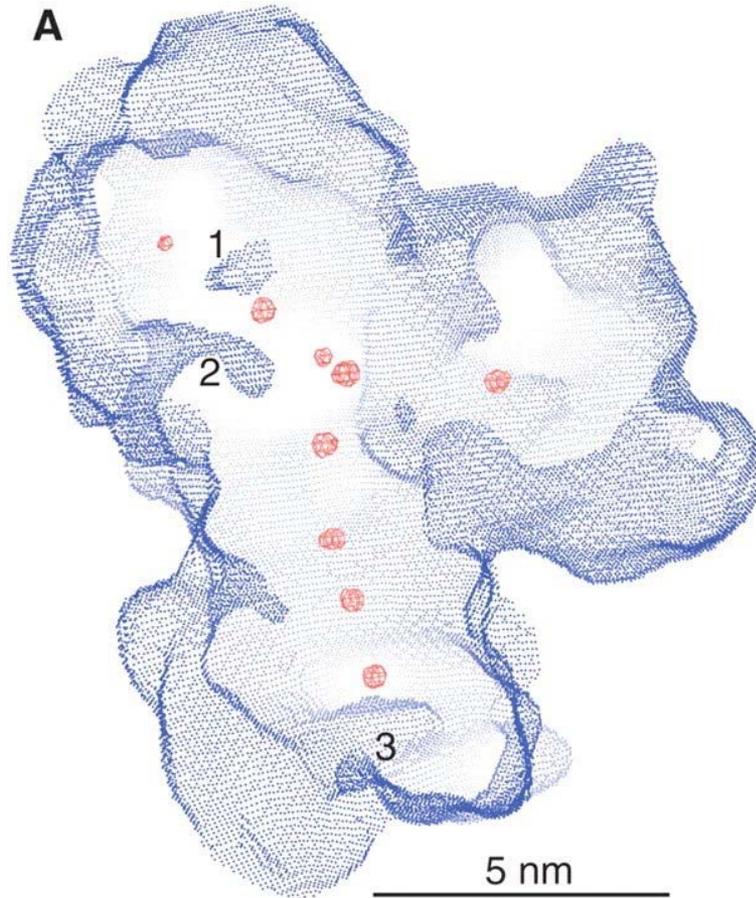
$$k_1 \propto P \exp\left(-\frac{(-F\Delta E^\circ + E_R)^2}{4RT E_R}\right)$$



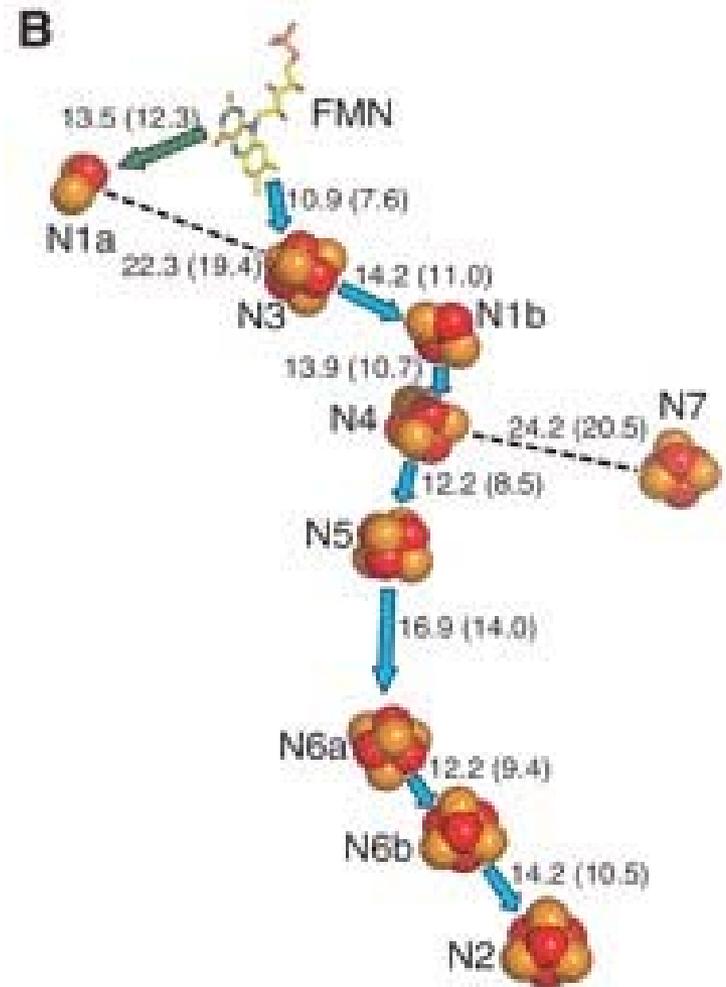
Dans les molécules biologiques : $\mathcal{F}\Delta E^\circ < E_R$ (0,5 à 1 eV)

régime « normal » : k_1 augmente avec ΔE°

DES CHAINES DE TRANSFERT D'ELECTRON DANS LES ENZYMES



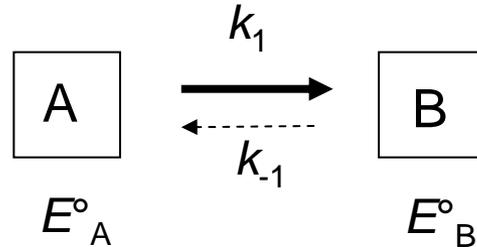
LE COMPLEXE I MITOCHONDRIAL



Sazanov et al., *Science* (2005, 2006)

COMMENT OPTIMISER UNE CHAINE DE TRANSFERT D'ELECTRON ?

UN MAILLON :



$$\Delta E^\circ = E^\circ_B - E^\circ_A$$

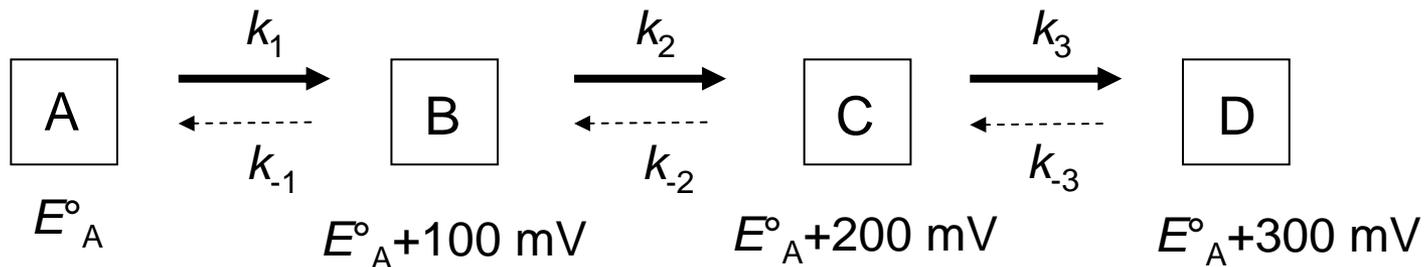
$$k_1 / k_{-1} = \exp(\mathcal{F} \Delta E^\circ / RT)$$

Pour privilégier le transfert **de A vers B** ($k_1 \gg k_{-1}$) : $\mathcal{F} \Delta E^\circ \gg RT$

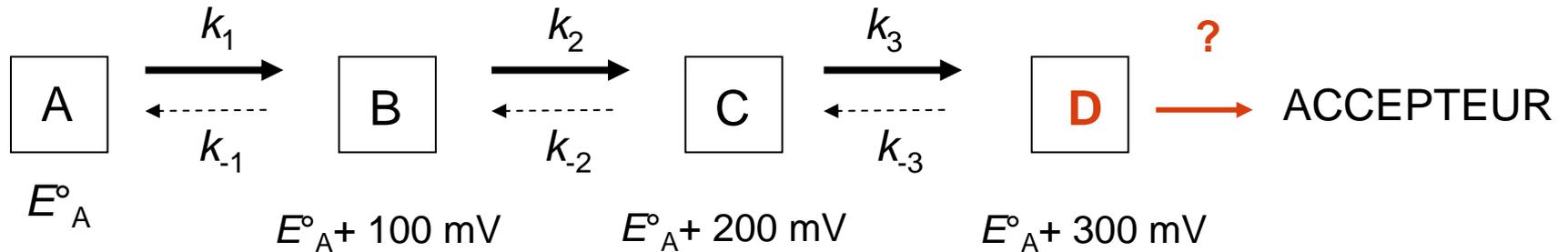
à $T = 300 \text{ K}$, $\Delta E^\circ = 100 \text{ mV} \Rightarrow k_1 / k_{-1} = 50$

$\Delta E^\circ = 200 \text{ mV} \Rightarrow k_1 / k_{-1} = 2500$

UNE CHAINE « DIRECTIONNELLE »

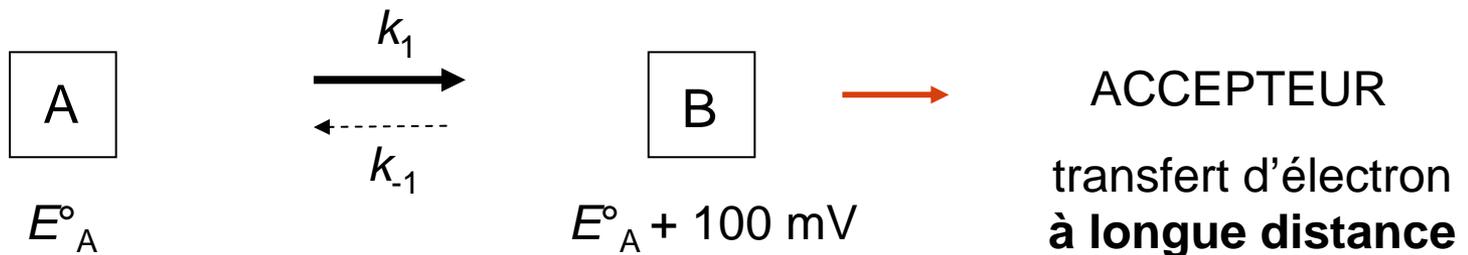


LE PRIX A PAYER



- Les électrons sur **D** ont perdu beaucoup de leur pouvoir réducteur
- La *biosynthèse* des centres rédox coûte cher aux organismes vivants

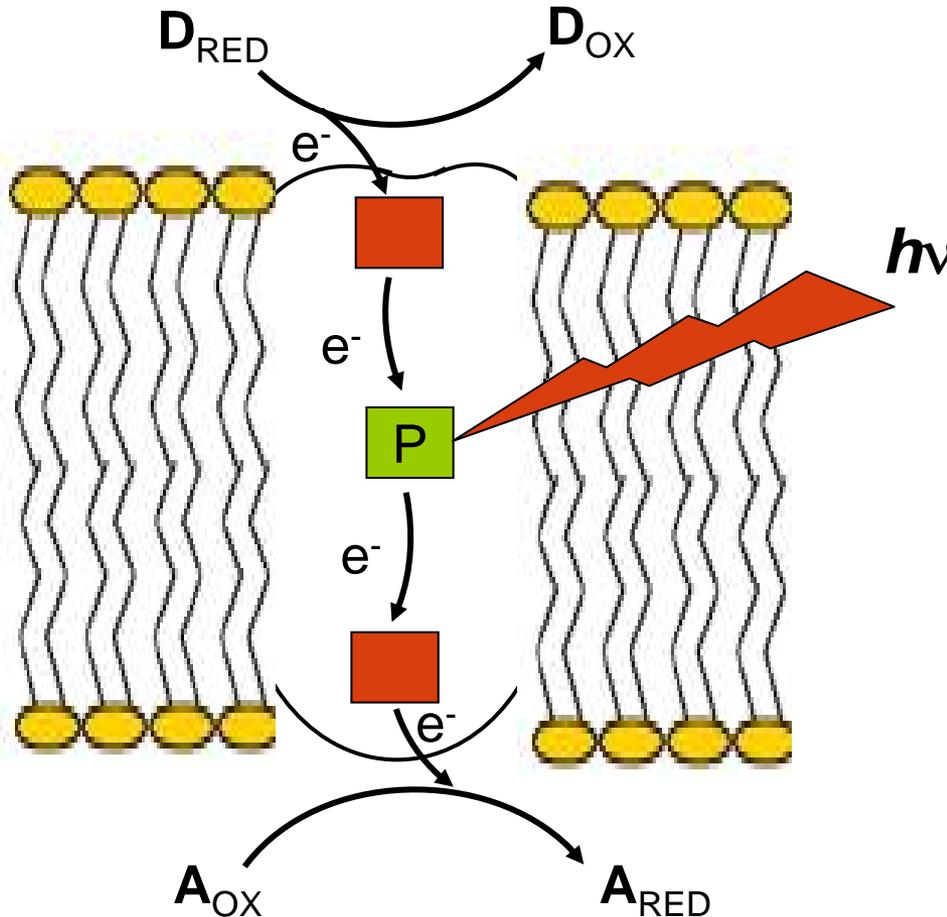
LA SOLUTION : DIMINUER LE NOMBRE D'INTERMEDIAIRES



LA NATURE PROCEDE -T- ELLE AINSI ?

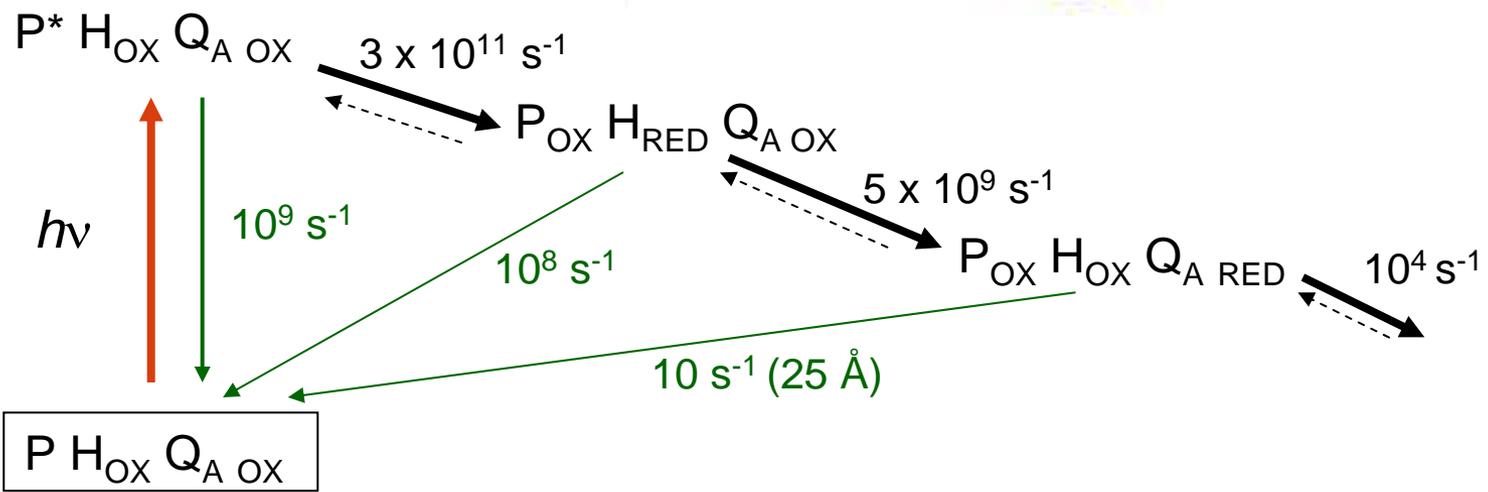
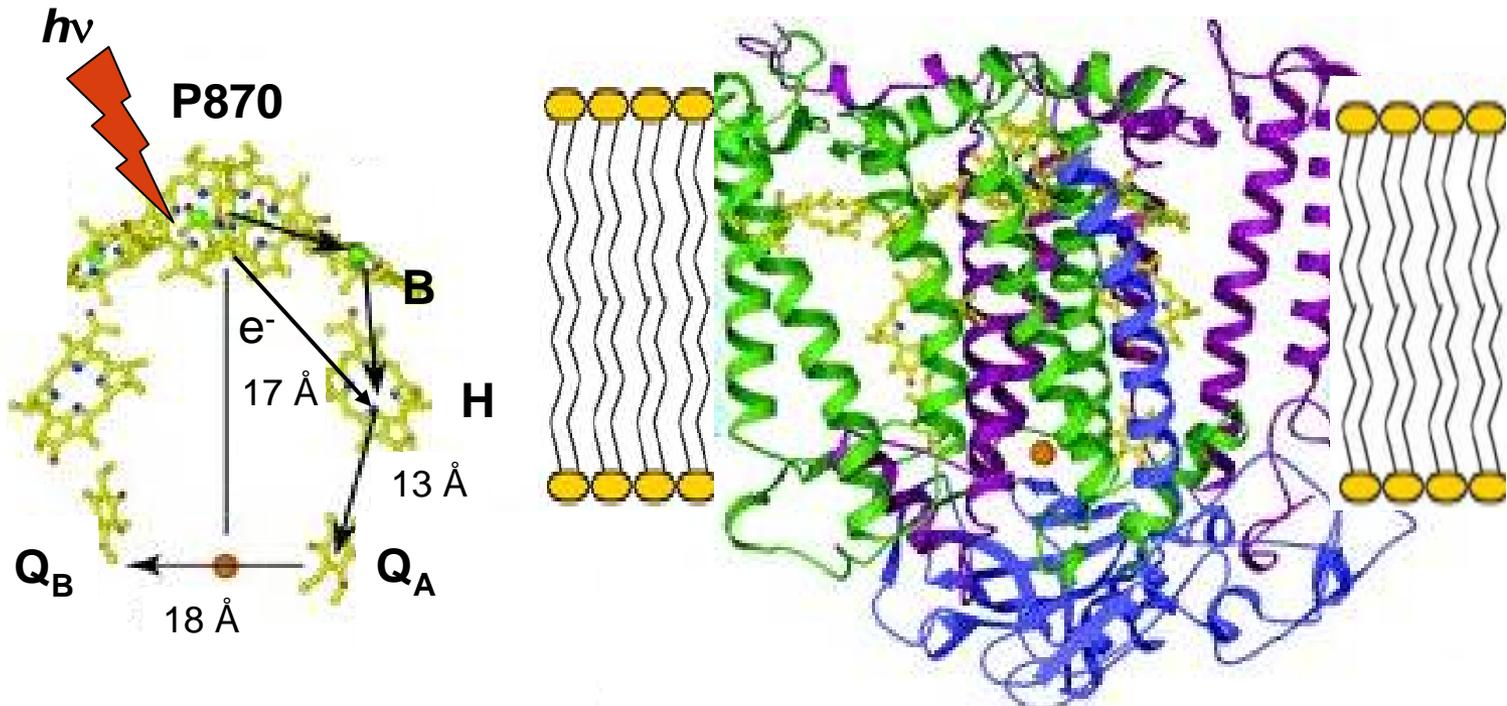
LA NATURE A TRES BIEN FAIT LES CHOSES DANS LES CENTRES REACTIONNELS DE LA PHOTOSYNTHESE

Catalysent les réactions : $D_{\text{RED}} + A_{\text{OX}} + \text{énergie lumineuse} \longrightarrow D_{\text{OX}} + A_{\text{RED}}$



Les transferts
doivent être
extrêmement rapides
pour que les électrons arrivent
sur l'accepteur

LE CENTRE REACTIONNEL BACTERIEN

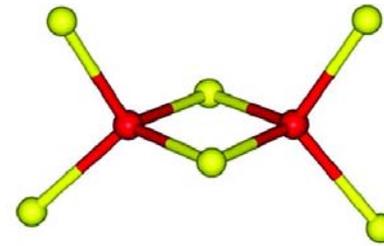
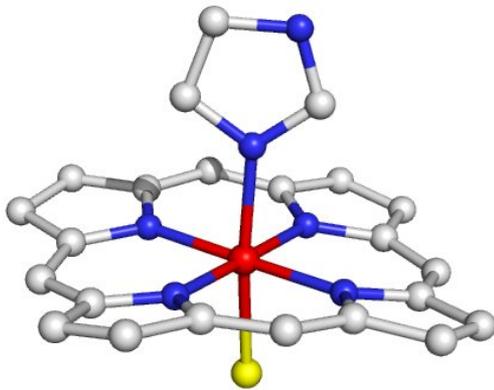


QU'EN EST-IL DANS LES ENZYMES D'OXYDO-REDUCTION « ORDINAIRES » ?

LES CENTRES REDOX

Les centres fer-soufre

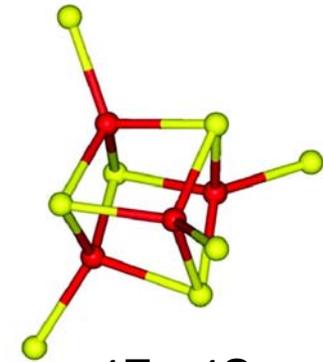
Les hèmes



2Fe-2S

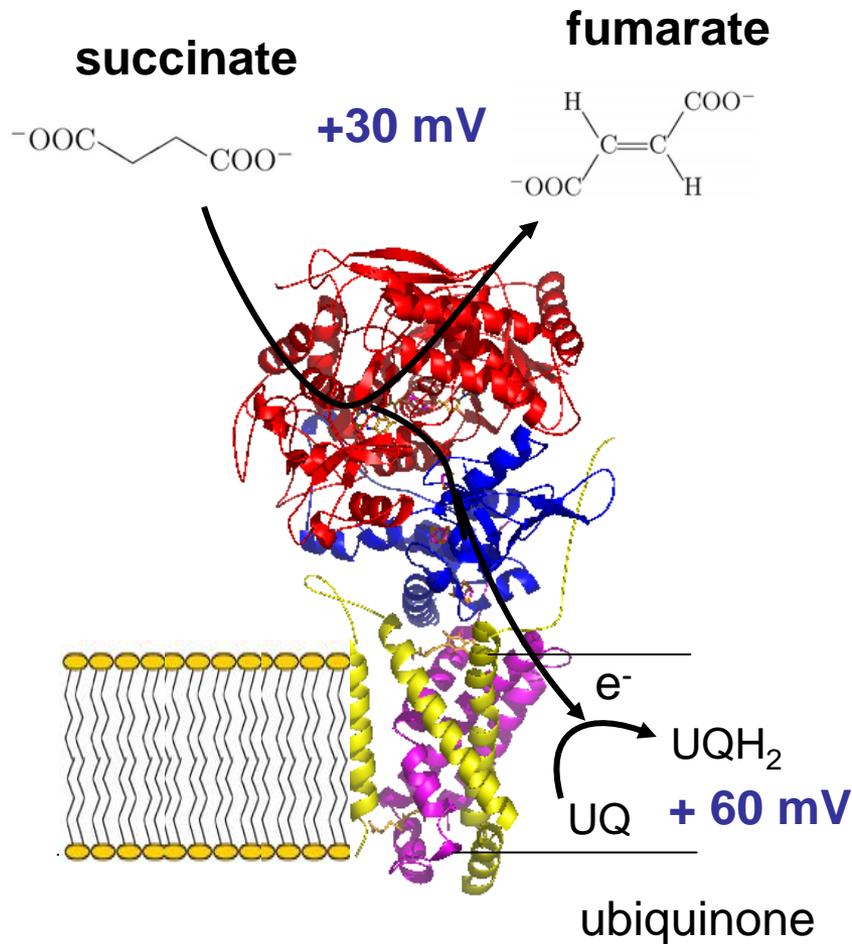


3Fe-4S

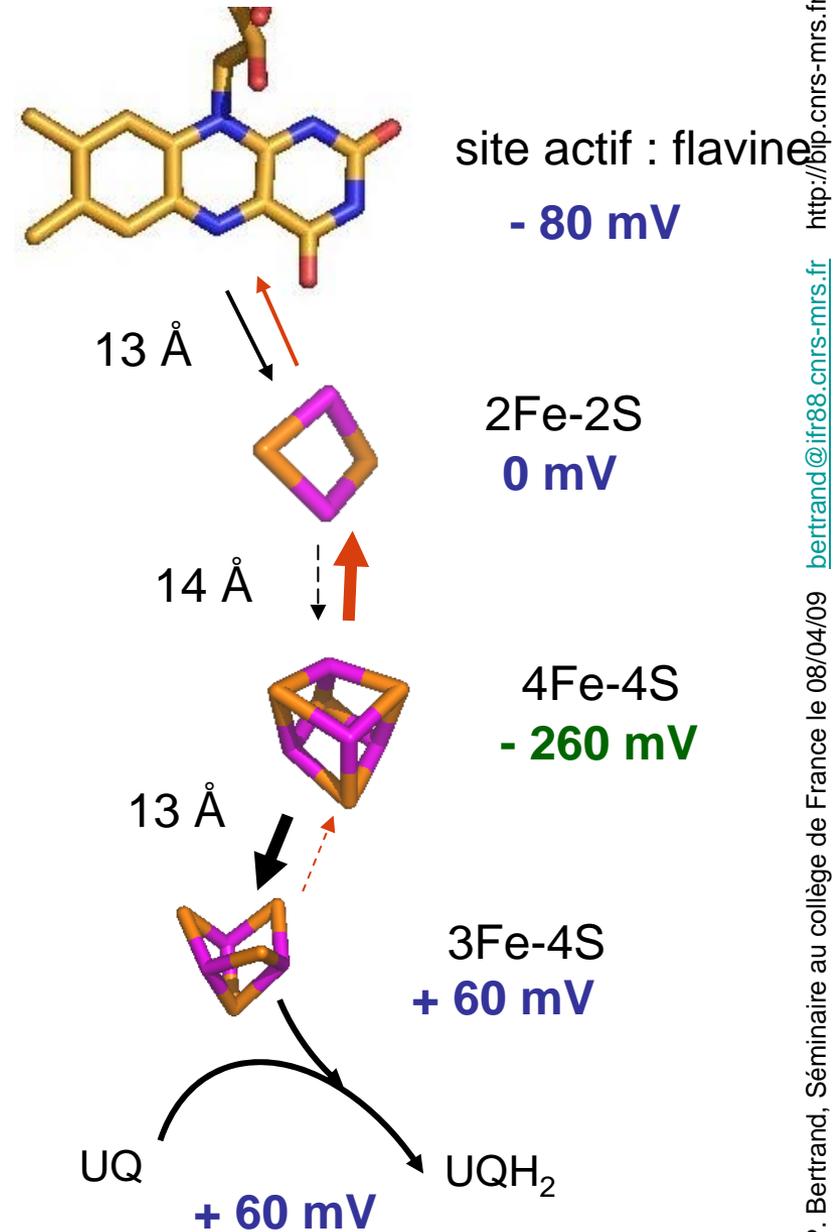


4Fe-4S

La succinate deshydrogénase (Complexe II mitochondrial)



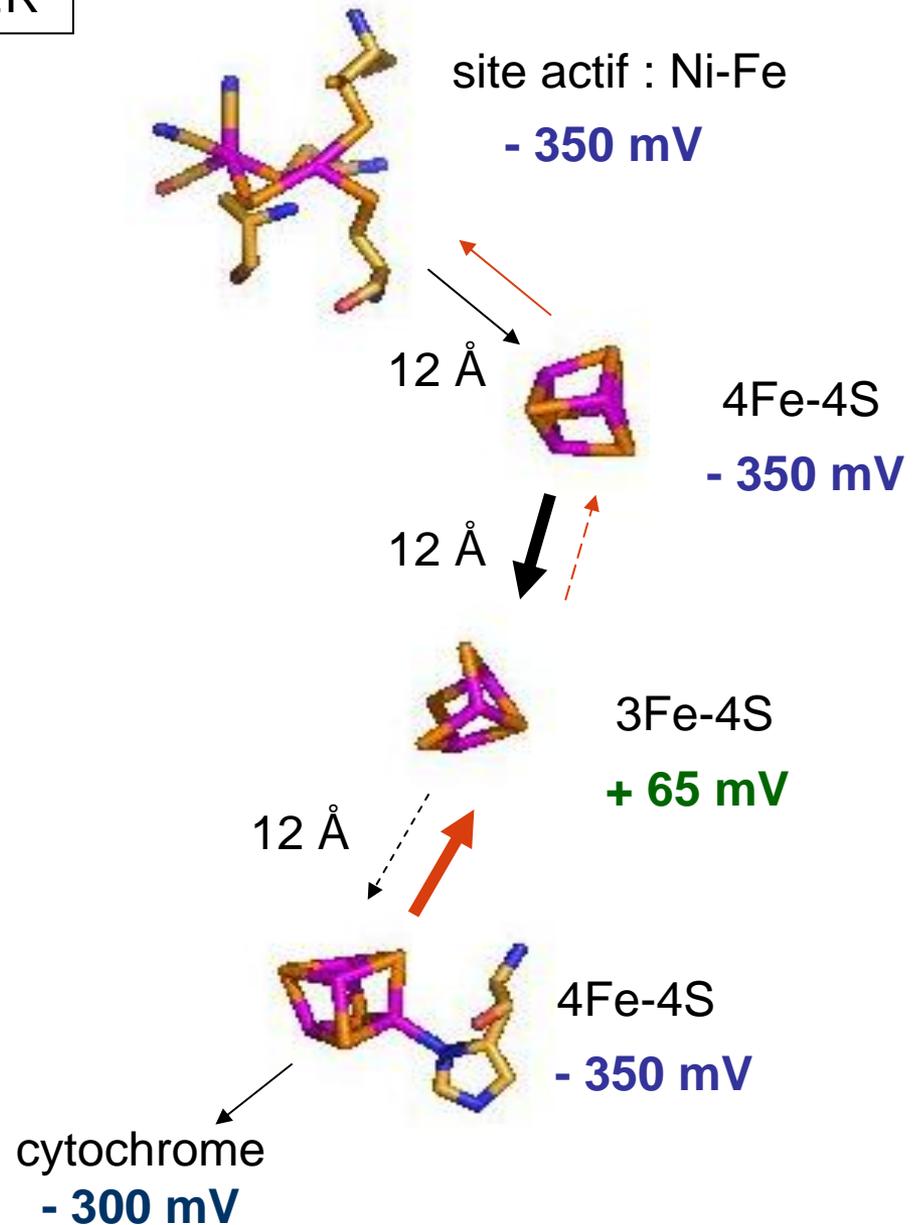
Structure : Iverson et al., *Science* (1999)



LES HYDROGENASES A NICKEL-FER



Structure: Volbeda et al., *Nature* (1995)



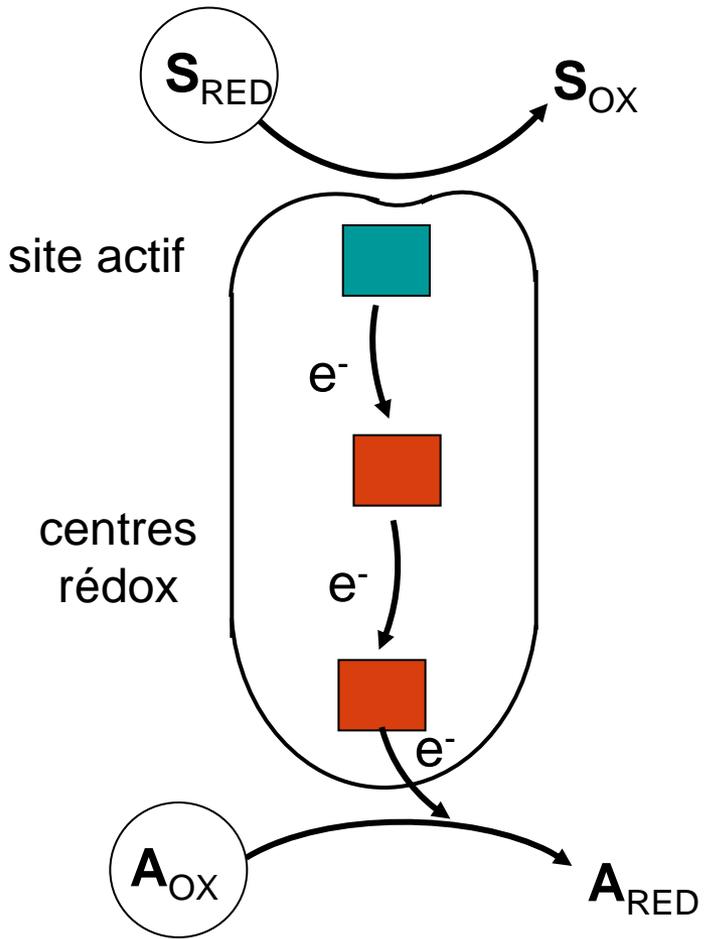
Que faut-il en déduire ?

- Les transferts d'électrons limitent-ils l'activité des enzymes ?
- Les potentiels rédox mesurés sont-ils pertinents ?
- La théorie du transfert d'électron doit-elle être révisée ?

Il faut comparer

- **l'activité des enzymes**
- **la vitesse des transferts d'électron**

ACTIVITE DES ENZYMES D'OXYDO-REDUCTION



- mélange (S_{RED} , A_{OX})

- A $t = 0$, on ajoute l'enzyme et on mesure la *vitesse initiale* :

$$v_i = -\frac{d[A_{OX}]}{dt} = \frac{d[A_{RED}]}{dt}$$

- v_i proportionnelle à [enzyme] : *activité* ($M s^{-1}$) dépend de processus très variés

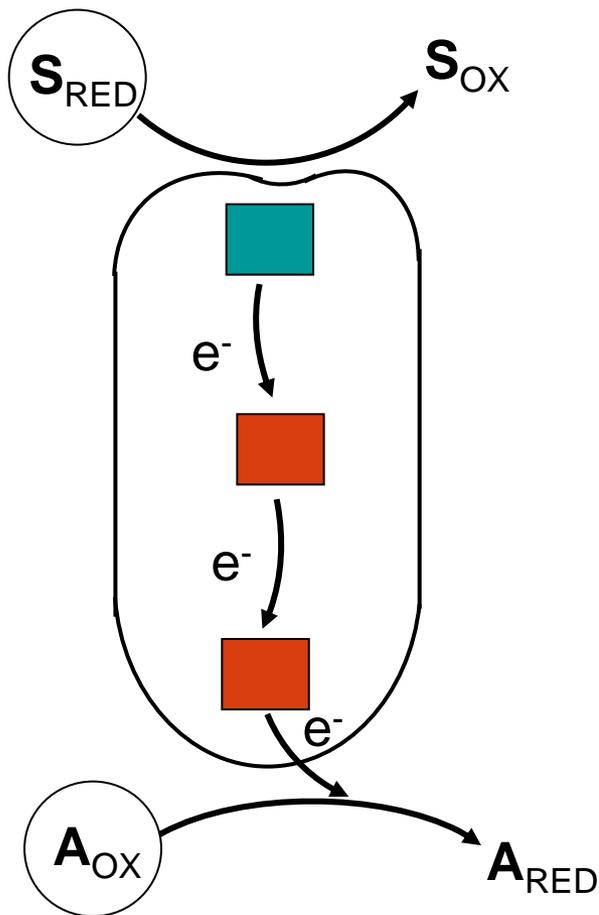
- *intermoléculaires* : diffusion

S_{RED} \longrightarrow site actif
 A_{OX} \longrightarrow site favorable au TE

- *intramoléculaires* :

chimie au site actif
 transferts de protons
transferts d'électrons

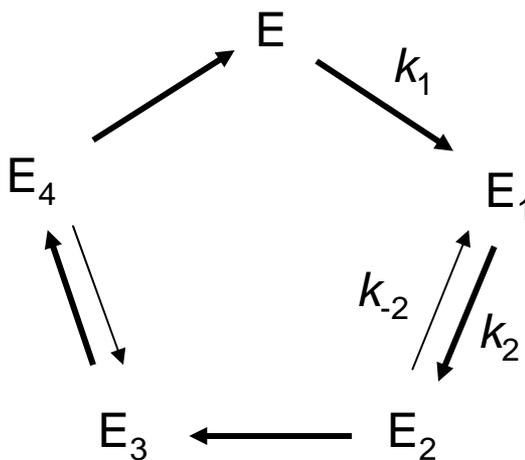
LA CONSTANTE CATALYTIQUE k_{CAT}



- Quand $[S_{RED}]_0$ et $[A_{OX}]_0$ assez grandes (saturantes) :
 V_i ne dépend que des processus **intramoléculaires**

$$V_i = k_{CAT} [\text{enzyme}]$$

- cycle catalytique



k_{CAT} = nombre de cycles par seconde

modèle cinétique

$$k_{CAT} = f(k_1, k_2, k_{-2}, \dots)$$

Si étapes **quasi irréversibles** : $1/k_{CAT} = 1/k_1 + 1/k_2 + 1/k_3 + 1/k_4 + 1/k_5$

Notion **d'étape limitante**

LES LACCASES

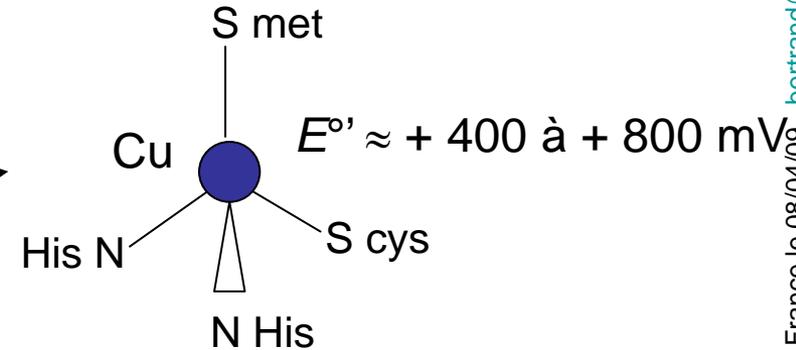
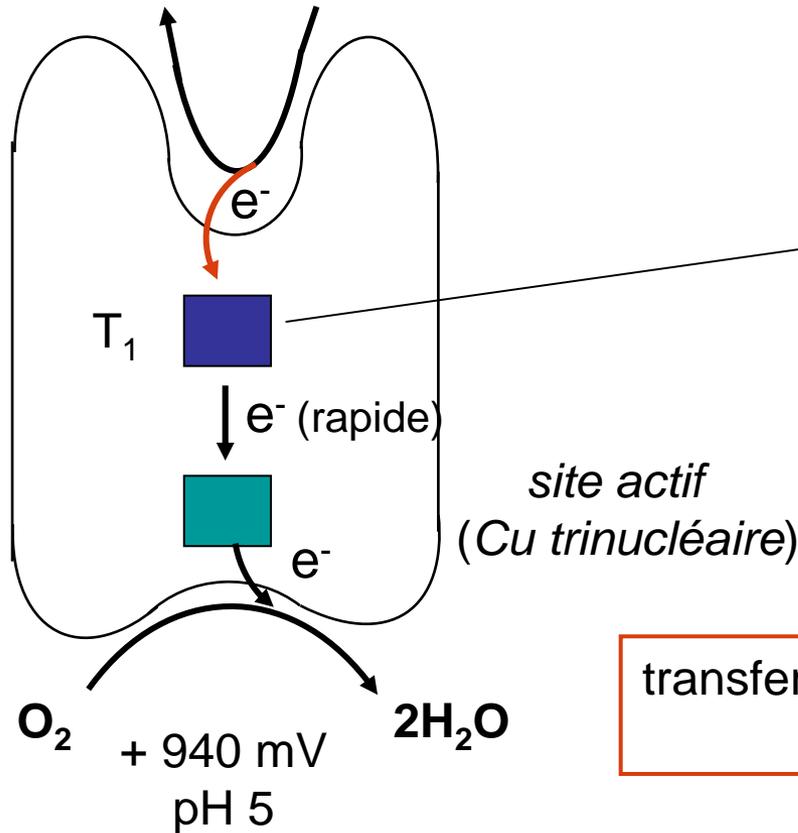
Substrats aromatiques
 E° très positifs



M_{OX} → M_{RED} médiateurs

Champignons, plantes, insectes, bactéries

Enzymes peu spécifiques
 Applications biotechnologiques



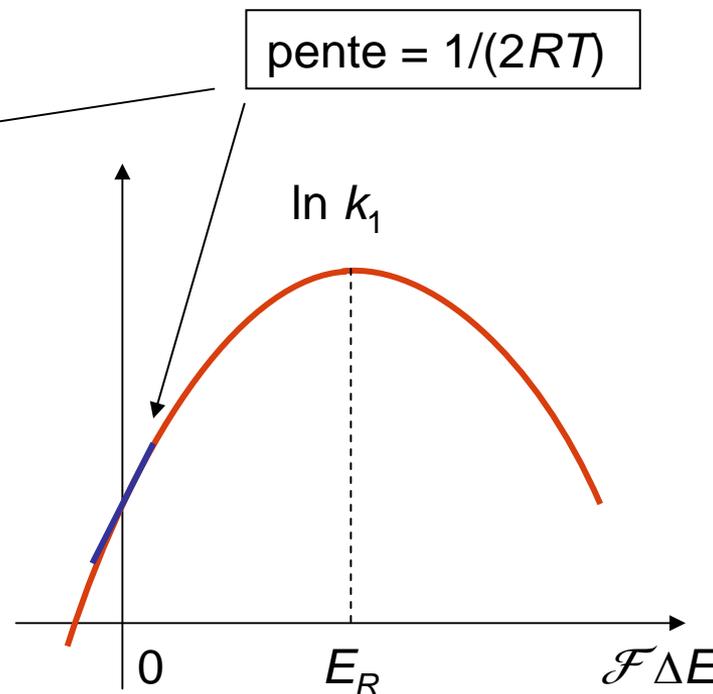
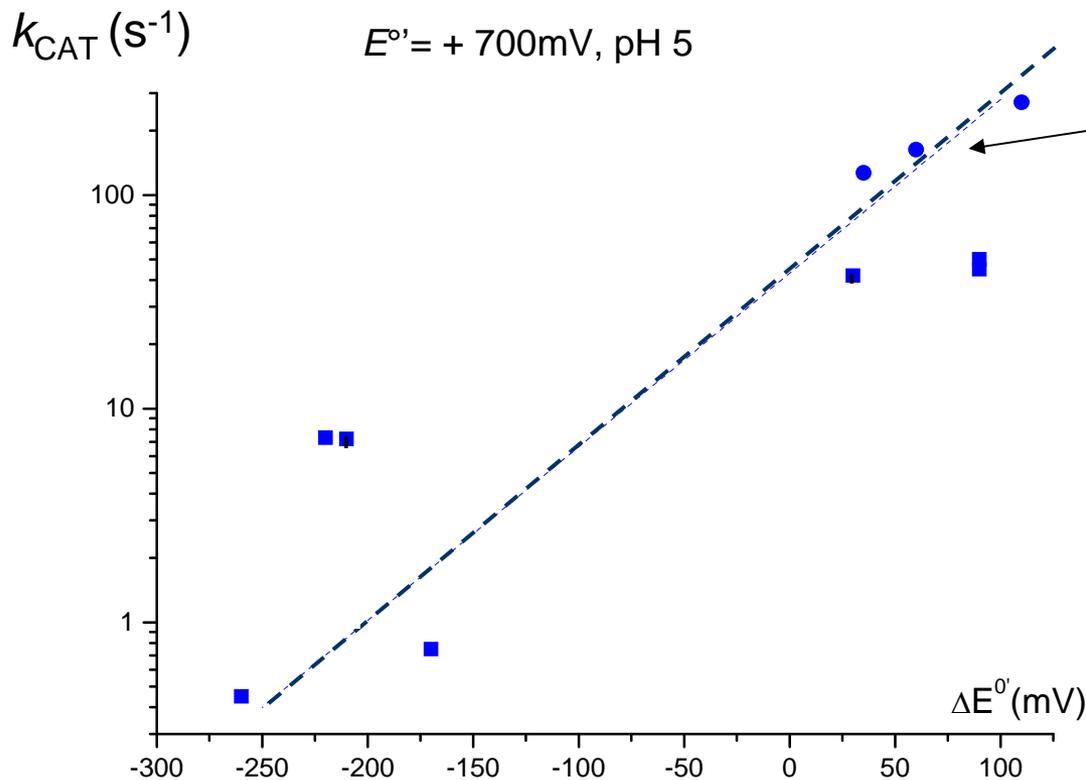
transfert d'électron médiateur → T_1 : limitant ?
 Etude bibliographique

VARIATION DE k_{CAT} EN FONCTION DE $\Delta E^\circ = E^\circ(T1) - E^\circ(\text{med})$

Série de 10 laccases, même médiateur

médiateur (non phénolique) = ABTS

$$k \propto P \exp\left(-\frac{(-F\Delta E^\circ + E_R)^2}{4RT E_R}\right)$$

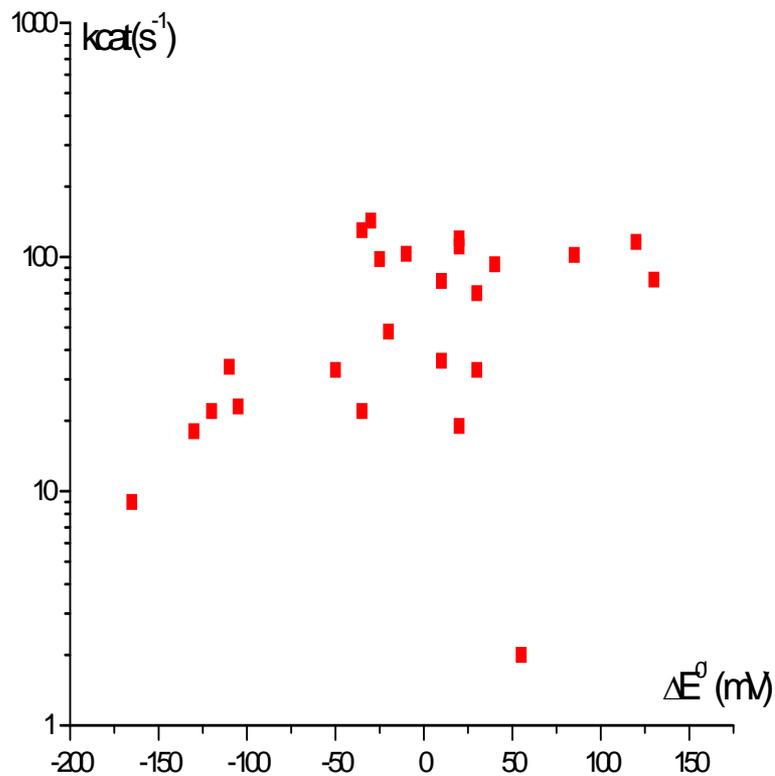


VARIATION DE k_{CAT} EN FONCTION DE $\Delta E^\circ = E^\circ(T1) - E^\circ(\text{med})$

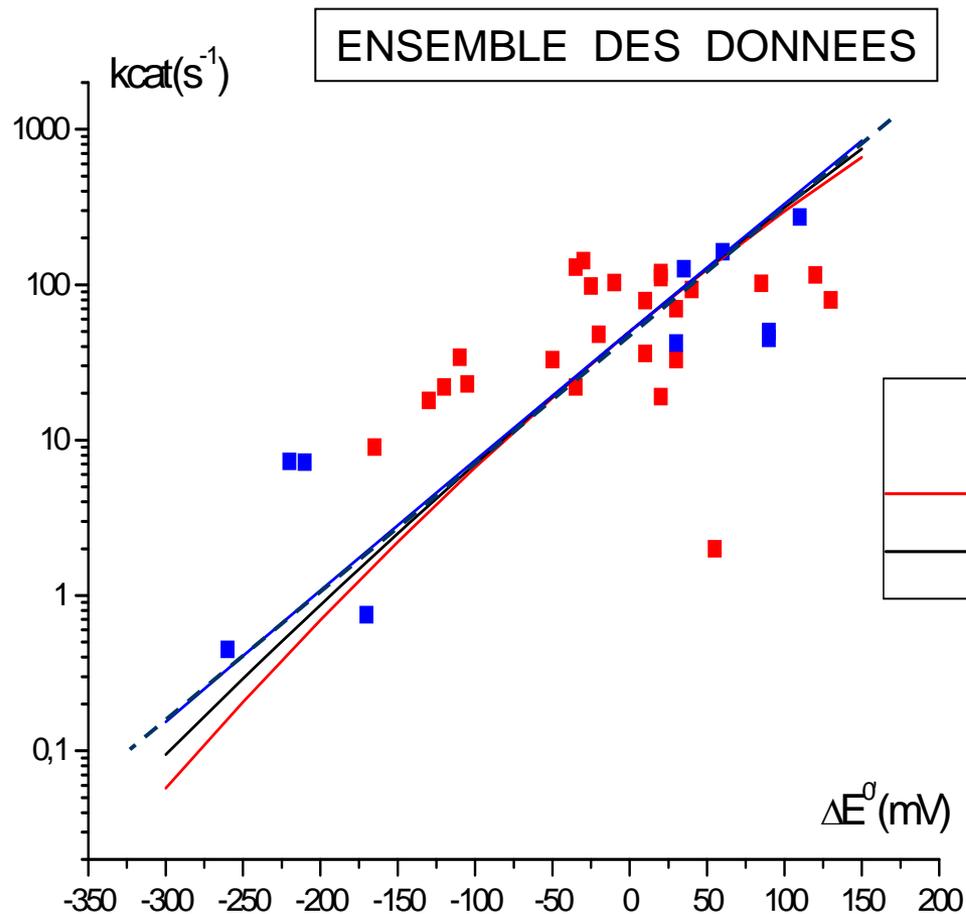
Une laccase (*Polyporus pinsitus*)

$E^\circ(T1) = 790 \text{ mV}$

Série de 24 médiateurs , pH 5



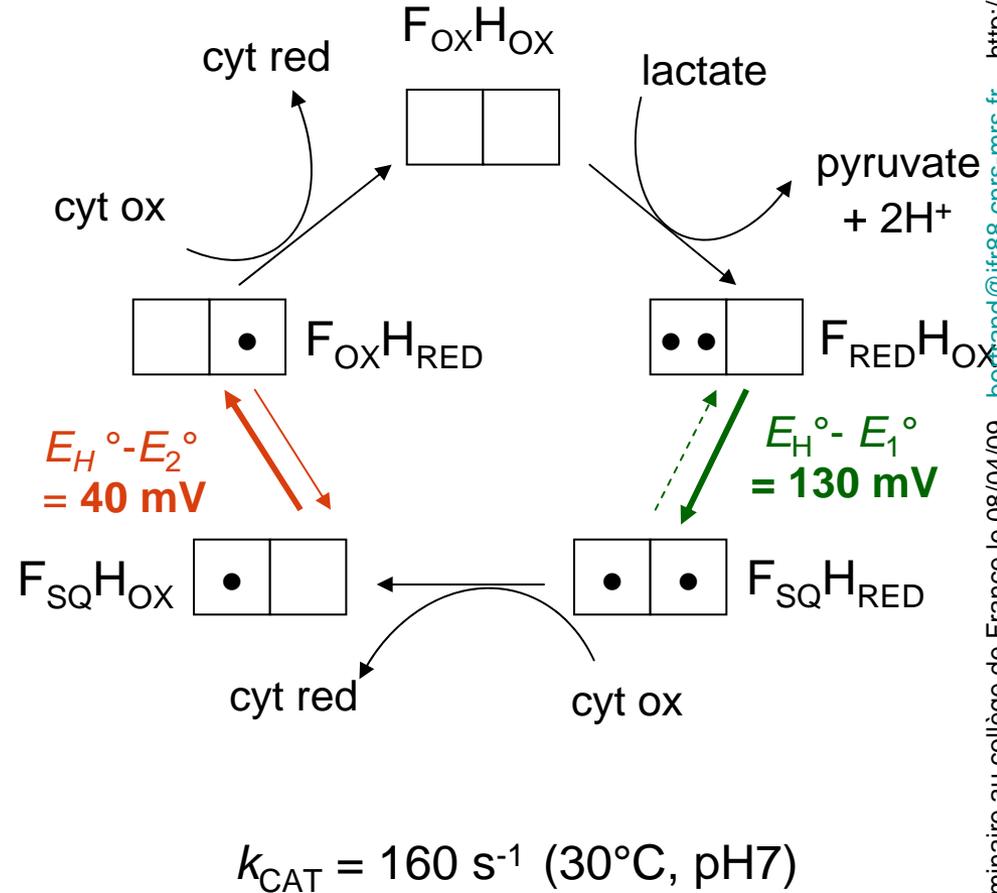
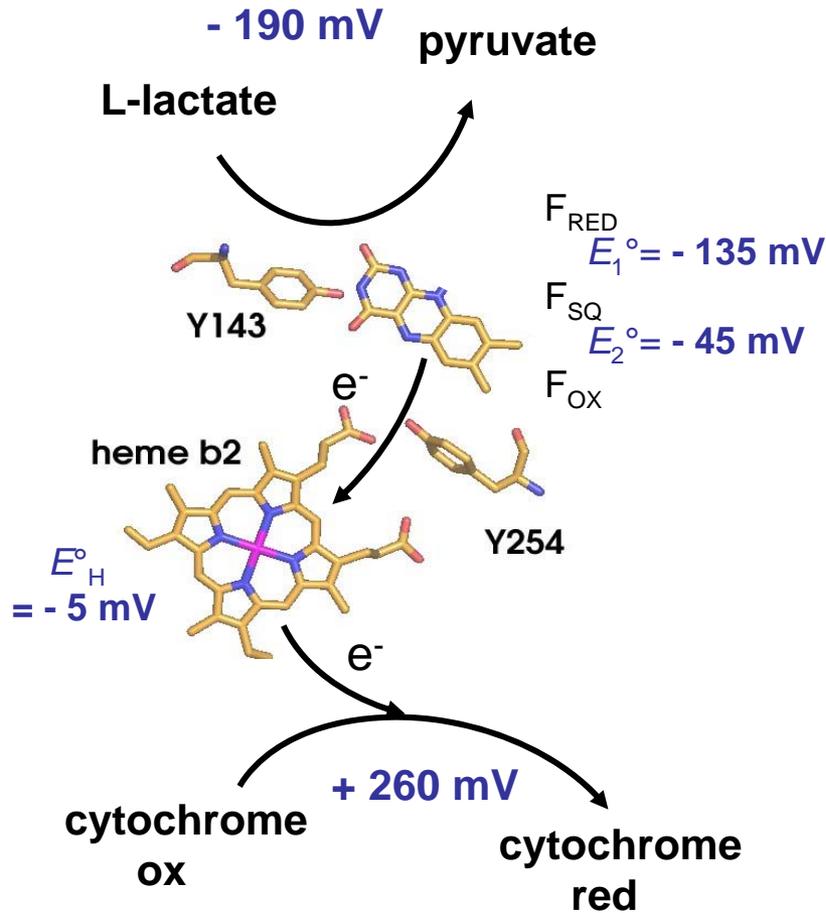
Kulys et al., *JBIC* (2000)



LES TRANSFERTS D'ELECTRONS SONT-ILS LIMITANTS DANS LES **LACCASES** ?

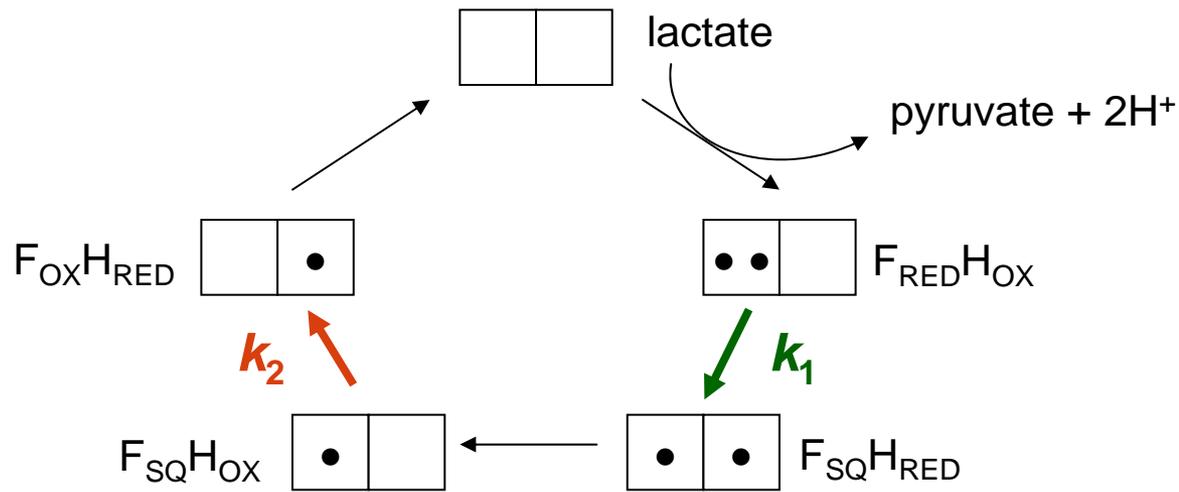
- Le paramètre k_{CAT} dépend de $\Delta E^\circ = E^\circ(\text{T}_1) - E^\circ(\text{médiateur})$
- Dépendance conforme « en moyenne » à celle attendue pour k (transfert électron)
- Grande dispersion par rapport à la moyenne :
 - Facteur électronique du transfert d'électron ?
 - Autres facteurs, indépendants du transfert d'électron ?

LE FLAVOCYTOCHROME b_2 DE *Saccharomyces cerevisiae*



Expériences de **saut de température** sur formes sauvage et mutées

MESURE DES CONSTANTES DE VITESSE (16°C)



k_{CAT}
(30°C, pH7)

$E_H^\circ - E_2^\circ$ k_2

$E_H^\circ - E_1^\circ$ k_1

Forme sauvage: 160 s⁻¹

40 mV, 170 s⁻¹

130 mV, 1500 s⁻¹

Y143 F: 60 s⁻¹

-25 mV, 50 s⁻¹

150 mV -

Y254 F: 15 s⁻¹

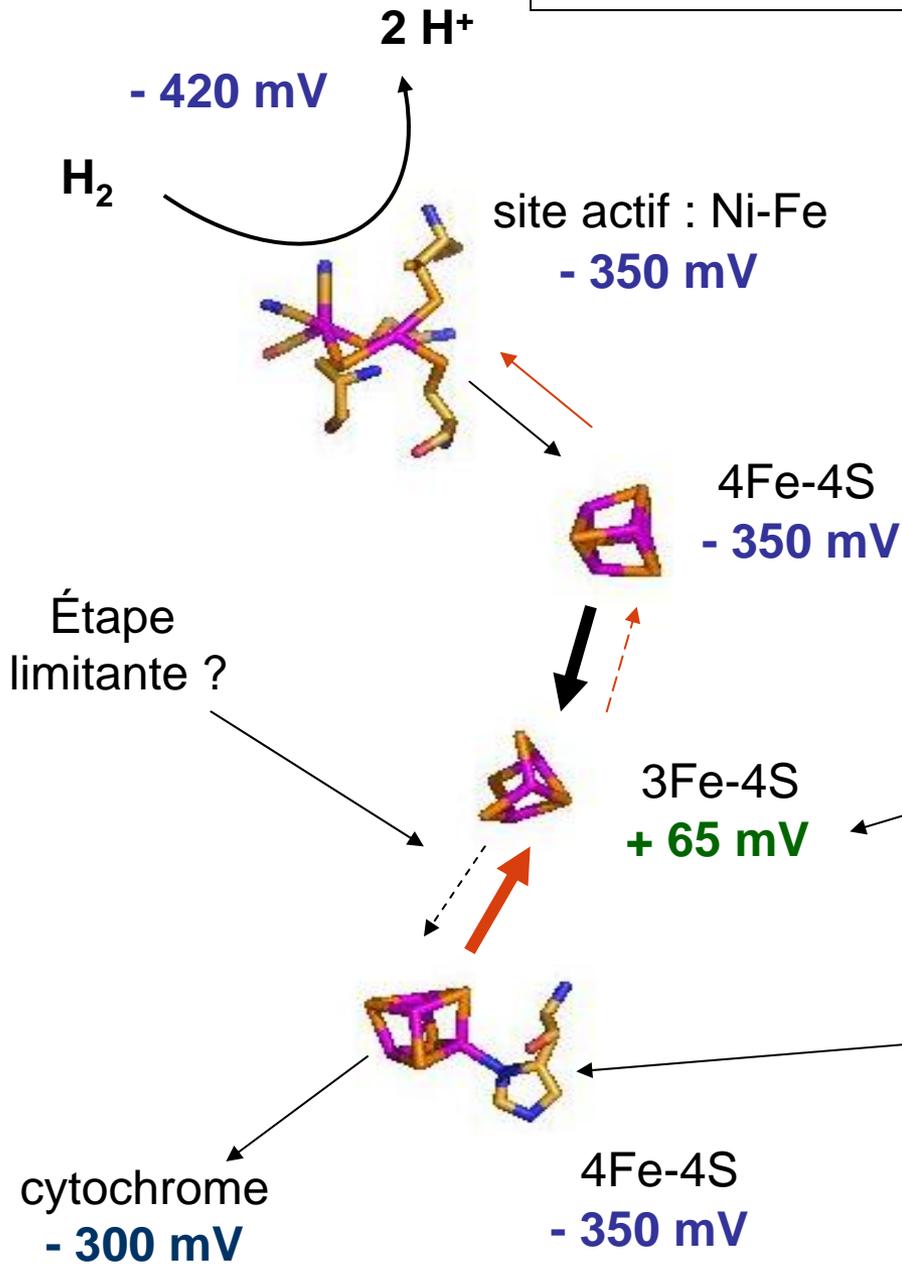
-10 mV, 27 s⁻¹

145 mV -

CONCLUSION : transfert d'électron « partiellement limitant »

Tegoni et al, *Biochemistry* (1998)

LES HYDROGENASES A NICKEL-FER



Très courtisées actuellement

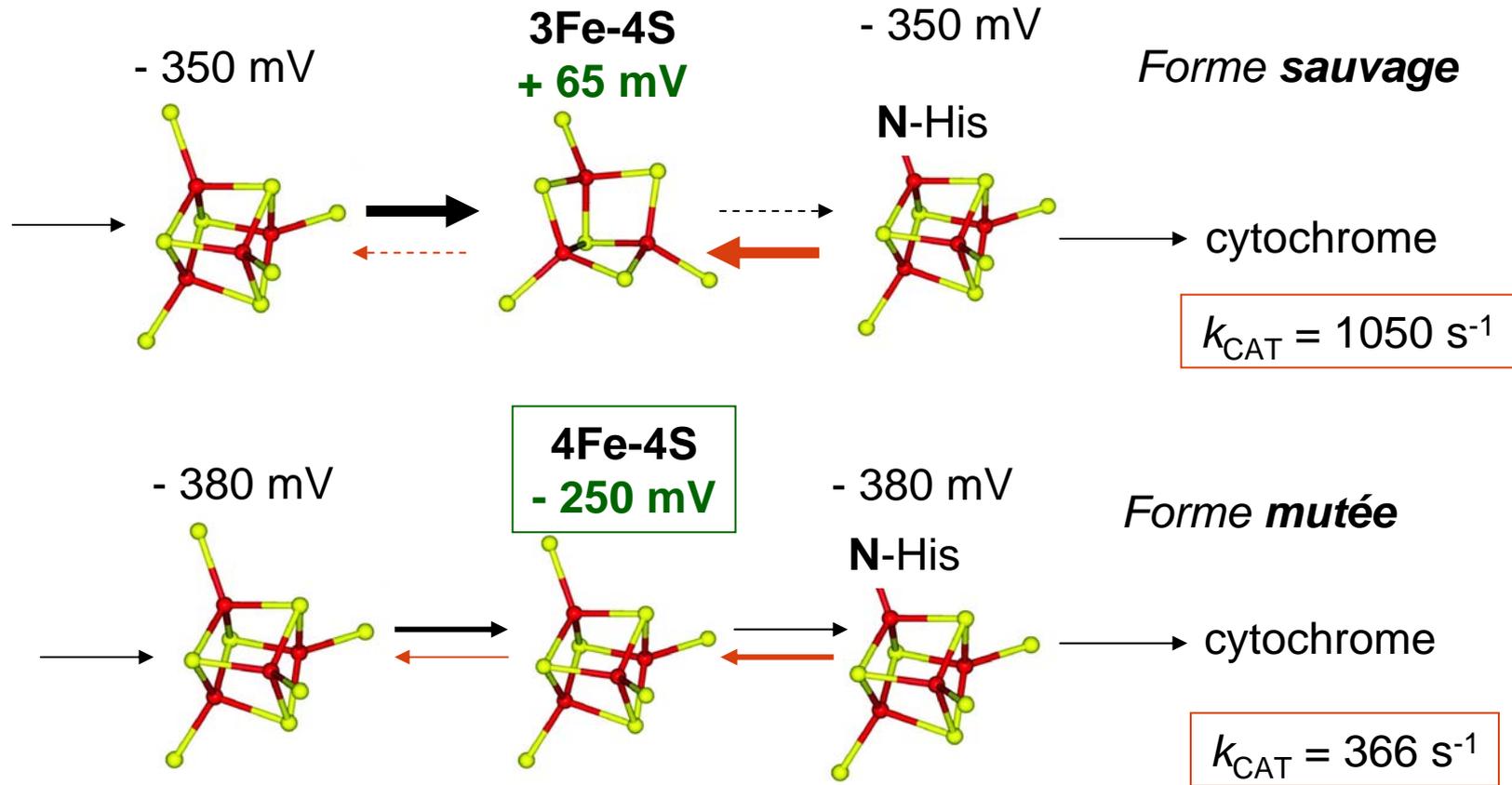
- Production de H_2 à partir de H_2O et énergie solaire.
- Catalyseur dans biopiles H_2/O_2

Étape limitante ?

Pourquoi un centre de haut potentiel ?

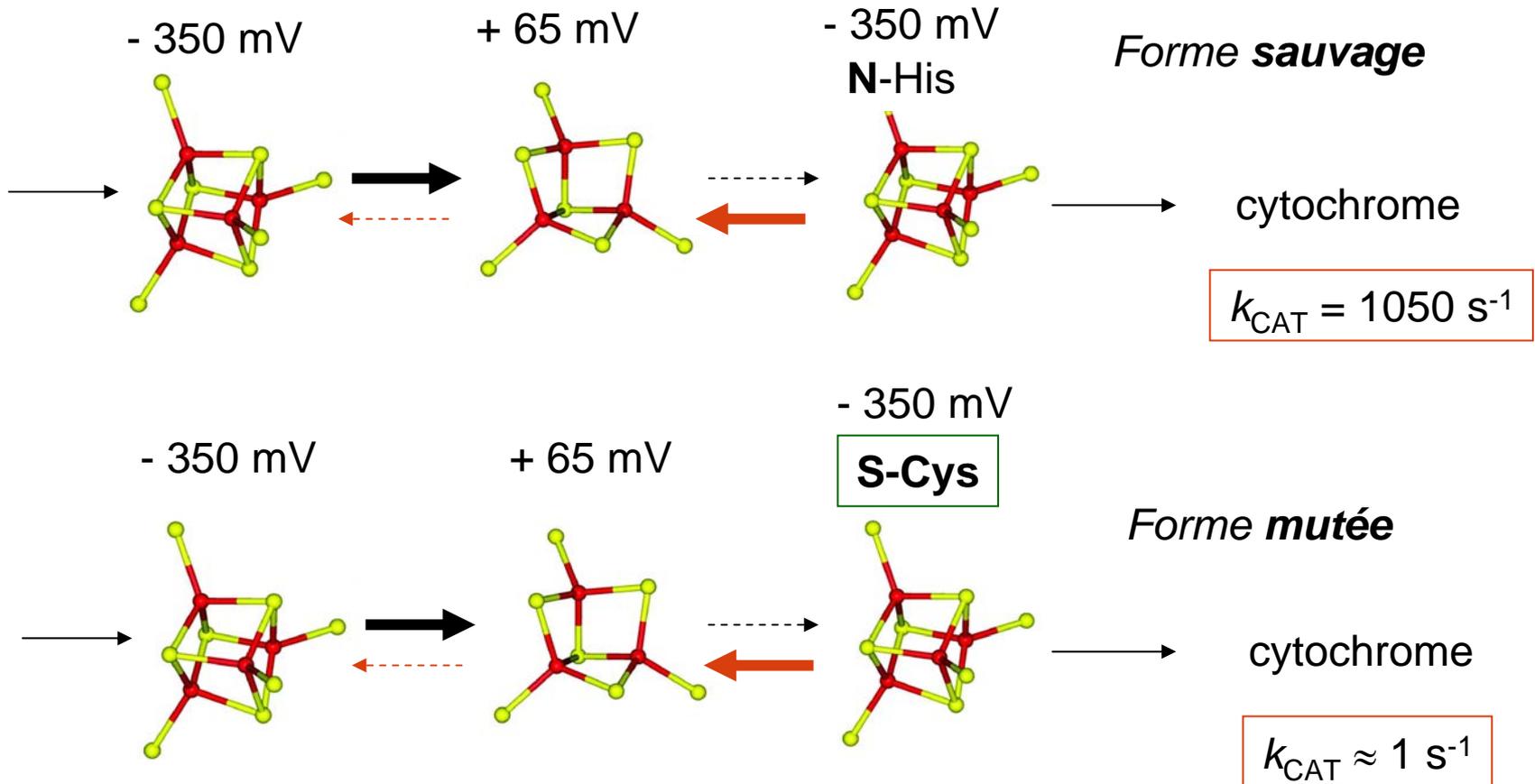
Pourquoi un ligand histidine ?

REMPACEMENT DU CENTRE 3Fe-4S PAR UN CENTRE 4Fe-4S



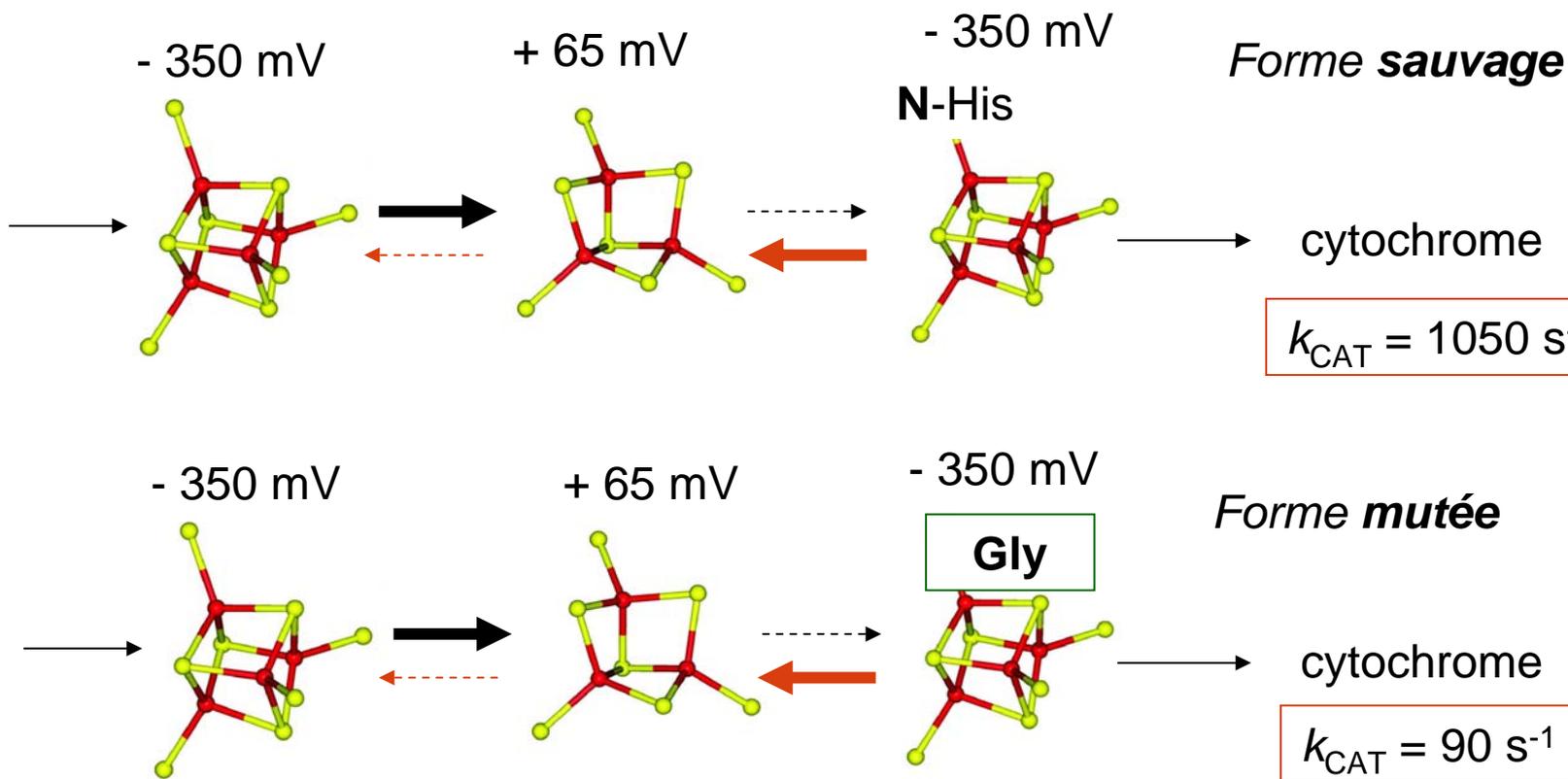
CONCLUSION : le centre [3Fe-4S] est « meilleur » !

REMPACEMENT DU LIGAND HISTIDINE → CYSTEINE



CONCLUSION : le ligand histidine est **essentiel** !

REMPACEMENT LIGAND HISTIDINE → GLYCINE



Mais $k_{\text{CAT}} = 540 \text{ s}^{-1}$ avec 10 mM imidazole !

Confirmation de l'importance du ligand **histidine**

CONCLUSION (PROVISOIRE)

- Hydrogénase: le transfert d'électron est limitant dans les formes mutées

Mais dans la forme **sauvage** ?

- L'efficacité d'une chaîne de transfert d'électron ne dépend
pas seulement de l'ordre des potentiels rédox des centres

Facteur électronique ?

A suivre...