

Chimie des processus biologiques

M. Marc FONTECAVE, membre de l'Institut
(Académie des sciences), professeur

La chimie du vivant : enzymes et métalloenzymes, des biocatalyseurs fascinants

La catalyse enzymatique, ce pouvoir que possèdent certaines protéines d'accélérer de façon extraordinaire et d'orienter avec une précision fascinante les réactions chimiques de la cellule, reste, encore aujourd'hui, l'un des grands mystères des systèmes vivants. Les réactions dont il est question vont de la simple hydrolyse de liaisons peptidiques à des processus poly-électroniques d'une très grande complexité, comme par exemple la réduction de l'oxygène en eau catalysée par la cytochrome oxydase, une enzyme clé de la respiration, ou encore l'oxydation de l'eau en oxygène que permet l'appareil photosynthétique des plantes. Il s'agit aussi des réactions de transferts d'électrons à longue distance (plusieurs dizaines d'angströms) qui jouent des rôles déterminants dans de nombreux processus cellulaires.

Quelle est l'origine de ce phénomène ? La réponse à cette question n'est pas simple et a alimenté, au cours des 50 dernières années, recherches et controverses. L'approche réductionniste du chimiste qui s'appuie sur des systèmes biomimétiques et bio-inspirés participe, de façon originale, à cette quête. Il apparaît cependant que l'une des clés de ce mystère réside dans l'utilisation répétée, par les organismes vivants, d'ions métalliques conférant aux protéines des propriétés uniques. La vie n'est donc pas seulement organique mais aussi « minérale », la chimie biologique pas seulement bio-organique mais aussi bio-inorganique. Ces métaux ont joué un rôle déterminant il y a près de 3,5 milliards d'années dans l'émergence de la vie et, un peu plus tard, dans l'apparition et l'utilisation de l'oxygène moléculaire.

Le but de ce cours était d'introduire un certain nombre de concepts concernant la catalyse enzymatique, les propriétés chimiques des ions métalliques et l'activation de petites molécules, dans le cas présent l'oxygène et l'eau, par des systèmes multiélectroniques naturels complexes.

1. L'âme des enzymes : le mystère de la biocatalyse

Les protéines sont des objets moléculaires doués de propriétés exceptionnelles. Leur organisation structurale et leur contenu en acides aminés, qui modulent leurs propriétés stéréoélectroniques et leur dynamique, leur permette de contrôler l'entrée et la sortie de petites molécules et la complémentarité entre les sites réactifs et les substrats. Les enzymes sont de fait capables d'accélérer de façon fantastique les réactions chimiques qu'elles catalysent et la mesure du facteur d'accélération est le plus souvent très difficile à obtenir. Pour illustrer les méthodologies mises en œuvre, le cas de l'uroporphyrinogène décarboxylase, une enzyme impliquée dans la biosynthèse de l'hème, de la chlorophylle et des cytochromes, a été discuté (R. Wolfenden, PNAS 2008, 105, 17328). Le facteur d'accélération est de l'ordre de 10^{17} . Les différentes théories permettant d'expliquer ces accélérations, en particulier celle, célèbre, de la stabilisation de l'état de transition, proposée par L. Pauling en 1948, ont été présentées. Il faut savoir qu'encore aujourd'hui ce pouvoir catalytique des enzymes reste un mystère et un sujet de controverses très profondes, en ce qui concerne le poids relatif des effets entropiques et enthalpiques, et la réalité d'un état de transition défini, auquel on peut appliquer la thermodynamique classique. Avec une présentation du lysozyme, de la triose phosphate isomérase, de la cytidine déaminase pour illustrer les différentes hypothèses, il ressort que les positionnements relatifs des acides aminés des sites actifs et des substrats, et les interactions électrostatiques qui en découlent, jouent un rôle majeur dans la catalyse. Cela signifie, comme le suggère A. Warshel, que l'origine de la catalyse réside dans la structure de la protéine et donc que son pouvoir catalytique, l'énergie catalytique, est implémenté d'une façon ou d'une autre, au moment de sa synthèse et non au moment de la réaction.

2. Les métaux : des origines aux biocatalyseurs d'aujourd'hui

Une présentation générale du type de métaux présents dans les systèmes vivants, de la grande variété des structures des sites actifs métalliques, de la réactivité de ces ions métalliques (acidité de Lewis, propriétés rédox, ...) a été proposée. Dans un second temps, il a été montré qu'il y avait une excellente corrélation entre le type d'ion métallique utilisé pour une fonction biologique donnée et, d'une part, l'abondance de l'élément, sous forme soluble, à la surface de la terre et, d'autre part, ses propriétés physico-chimiques intrinsèques (par exemple, le Zn pour des réactions d'hydrolyse et le fer et le cuivre pour des réactions rédox). Il est hautement probable que la vie n'a pu apparaître sur la terre que grâce à l'exploitation du potentiel chimique de ces métaux. Une hypothèse raisonnable, qui s'oppose à la vision d'une origine hétérotrophe de la vie de S. Miller (1953), est celle d'une origine autotrophe qui utilise les molécules de l'atmosphère comme l'azote, le dioxyde de carbone, le monoxyde de carbone, et des catalyseurs/réducteurs hétérogènes de type sulfures de nickel et de fer, en absence d'oxygène pour produire des acides aminés et des peptides. Ces catalyseurs ont été remarquablement conservés au cours de l'évolution. Cette période originelle peut être qualifiée d'« ère

du fer », laquelle dure 2 milliards d'années, si l'on considère l'importance de ce métal dans la chimie biologique et son abondance à la surface de la terre. Ensuite, l'arrivée de l'oxygène conduit à une oxydation massive du fer, à sa précipitation et à un changement drastique de l'environnement chimique de la vie. Par exemple, l'oxydation du cuivre le rend plus soluble et plus disponible et de nombreuses enzymes à cuivre sont alors inventées (« ère du cuivre »).

3. Les ions métalliques : pèlerinages cellulaires

Les ions métalliques doivent être récupérés de l'environnement, où ils s'accumulent, par les cellules. Les recherches actuelles dans ce domaine concernent de façon très active les questions de la solubilisation d'un ion métallique donné, de la traversée des membranes, de l'accès au bon compartiment cellulaire et de l'adressage à la bonne protéine où il doit se fixer de façon sélective. Ces questions ont été discutées en prenant comme modèle le métabolisme du cuivre qui met en œuvre des métallochaperones intracellulaires qui ont pour fonction de protéger et de guider les ions métalliques à travers le cytoplasme jusqu'à leurs cibles protéiques auxquelles elles délivrent leurs ions. Dans le cas du cuivre, qui est un métal toxique lorsqu'il est libre en solution, il y a une nécessité absolue de maintenir à un niveau très bas la concentration cellulaire de cuivre libre. Des métallochaperones impliquées dans le transport du cuivre – notamment pour alimenter une enzyme antioxydante comme la superoxyde dismutase ou des ATPases membranaires à cuivre dont les mutations sont responsables de maladies génétiques (maladie de Wilson et maladie de Menkès) – ont été plus particulièrement discutées du point de vue de leurs structures tridimensionnelles, de leurs modes de fixation du cuivre et de leurs mécanismes de transfert du cuivre aux cibles protéiques.

4. L'oxygène moléculaire : origines et paradoxes

Ce premier cours sur l'oxygène moléculaire a permis de poser un certain nombre de bases chimiques pour l'étude de la réactivité de l'oxygène dans les systèmes biologiques. L'oxygène est arrivé sur la terre d'une certaine façon par accident, étant le produit de la photosynthèse qui utilise l'eau comme donneur d'électrons pour la conversion du dioxyde de carbone en sucres. L'origine de l'oxygène et l'évolution de sa concentration dans l'atmosphère terrestre ont été brièvement discutées pendant ce cours en soulevant notamment la question de l'apparition soudaine, encore mal comprise, d'oxygène il y a environ 2,2 milliards d'années. Cependant ses propriétés oxydantes potentielles ont été ensuite abondamment utilisées dans une très grande variété de réactions métaboliques et biosynthétiques. Cette utilisation, thermodynamiquement très favorable, n'est pas simple car, en raison de son caractère paramagnétique, l'oxygène réagit avec les substrats organiques extrêmement lentement (interdiction de spin). Elle implique donc des mécanismes très fins d'activation de l'oxygène ou des substrats à oxyder. Ces différents mécanismes ont été brièvement présentés et illustrés par des exemples de métalloenzymes impliquées dans ces processus d'activation. En résumé, l'activation

d'un substrat passe par sa transformation en espèces radicalaires intermédiaires très réactives vis-à-vis de l'oxygène, tandis que l'activation de l'oxygène passe par sa réduction en peroxyde et l'activation du peroxyde par des ions métalliques (en particulier fer et cuivre).

5. Vers la photosynthèse artificielle : des catalyseurs bio-inspirés

L'énergie est le grand défi de l'humanité du XXI^e siècle. L'augmentation de la population mondiale, la croissance économique des grands pays de la planète, la disparition programmée des sources d'énergie non renouvelables (pétrole, charbon, gaz et même uranium), enfin la nécessité de limiter la production des gaz à effet de serre nous obligent à l'innovation en matière de technologies de l'énergie, et ce de façon urgente. Cette innovation viendra d'un couplage toujours plus important entre recherche fondamentale et recherche technologique. Tout semble indiquer que même si nos sources d'énergie seront diversifiées dans le futur, bien plus qu'elles ne le sont aujourd'hui, le soleil est le seul à même de fournir l'énergie nécessaire à l'humanité d'une façon propre, durable, pendant des milliards d'années. L'une des contributions les plus fascinantes du monde vivant à ces questions réside dans la photosynthèse qui, justement, transforme très efficacement l'énergie solaire en carburants chimiques (sucres) en utilisant l'eau comme source d'électrons. L'eau est une molécule très stable et un mauvais réducteur. Elle nécessite d'être activée. Certains organismes vivants (cyanobactéries, algues, plantes) ont inventé un catalyseur unique et totalement conservé, à base de manganèse et de calcium, pour coupler deux molécules d'eau déprotonées et les oxyder en oxygène moléculaire. Les structures du photosystème et du site MnCa ont été présentées, permettant de proposer des mécanismes pour l'oxydation de l'eau. La compréhension de cette chimie et la mise au point de catalyseurs possédant les mêmes propriétés chimiques que le site MnCa du photosystème, pour des applications dans le domaine de l'énergie, ont conduit depuis des années les chimistes à mettre en œuvre une approche bio-inspirée pour préparer des complexes de coordination capables de fixer l'eau et l'oxyder en oxygène. L'histoire de cette recherche a été présentée de façon complète en discutant successivement des complexes biomimétiques polynucléaires de manganèse, puis les complexes mono- et poly-nucléaires de ruthénium, enfin des derniers matériaux à base de d'oxydes de cobalt proposés par D. Nocera au MIT (Science 2008 321 1072).

6. La cytochrome oxydase : l'enzyme de la réduction de l'oxygène moléculaire

La cytochrome oxydase est un système biologique chimiquement fascinant car il catalyse une réaction complexe, la réduction de l'oxygène moléculaire en eau, et physiologiquement essentielle car cette réaction, thermodynamiquement productrice d'énergie, est couplée à la production d'un carburant chimique, l'ATP, en grosses quantités. Malgré le caractère thermodynamiquement favorable de la réaction, la réduction de l'oxygène est complexe car elle implique un transfert de 4 électrons et nécessite donc un catalyseur. Par ailleurs le couplage avec la synthèse d'ATP

n'est pas direct mais passe par un couplage des réactions rédox avec la formation de gradients de pH à travers la membrane, de sorte que la cytochrome oxydase est non seulement un système de transfert d'électrons mais aussi une pompe à protons. Le cours a permis de présenter la thermodynamique de la réaction, la théorie chimio-osmotique et la notion de force proton motrice, les structures de la cytochrome oxydase et plus particulièrement de son site métallique de réduction de l'oxygène, un site binucléaire constitué d'une porphyrine de fer (cytochrome) et d'un complexe de cuivre. Ceci nous a permis de discuter les mécanismes de transfert d'électrons et de transfert de protons qui constituent encore à l'heure actuelle des sujets de recherche très controversés et très activement développés.

SÉMINAIRES

Séminaire du 8 avril 2009 :

La vie trépidante des électrons dans les enzymes d'oxydo-réduction

Patrick BERTRAND, professeur à l'université Aix-Marseille 1

De nombreuses réactions chimiques impliquent des échanges d'électrons, et ces échanges se produisent habituellement lorsque les molécules réagissent lors d'une collision. Cependant, on a découvert il y a plus de trente ans que des centres rédox distants de 10 à 20 Å pouvaient échanger rapidement des électrons dans les *enzymes d'oxydo-réduction* et les *systèmes bioénergétiques* de tous les êtres vivants. Ces transferts d'électrons à longue distance ont fait l'objet d'un grand nombre d'études théoriques et expérimentales. On sait maintenant qu'ils jouent un rôle essentiel dans le mécanisme catalytique de ces enzymes, et on connaît les facteurs qui déterminent leur vitesse. Des mystères demeurent cependant. Dans les nombreuses structures d'enzymes d'oxydo-réduction qui ont été déterminées ces dernières années, on distingue très bien des « chaînes de transfert d'électrons » constituées de plusieurs centres rédox séparés par une distance de 10 à 20 Å. Or, l'ordre des potentiels rédox des centres le long de ces chaînes n'est pas toujours favorable à des transferts rapides et quasi unidirectionnels. On peut donc se demander si ceux-ci sont *limitants* dans le cycle catalytique et s'ils jouent un rôle dans le *biais catalytique* de l'enzyme, c'est-à-dire sa capacité à mieux catalyser une réaction que la réaction inverse.

Ces différents points ont été abordés au cours du séminaire. Nous avons d'abord précisé les facteurs qui déterminent la valeur de la constante de vitesse de transfert d'électron et nous avons vu pourquoi ces transferts ont lieu sur de grandes distances dans les enzymes d'oxydo-réduction. Nous avons ensuite présenté les méthodes qui ont été élaborées ces dernières années pour mesurer cette vitesse dans les enzymes de type « respiratoire » et analysé les données obtenues pour plusieurs enzymes susceptibles d'applications dans le domaine des biotechnologies.

Séminaire du 6 mai 2009 :

D'où viennent les métaux du système solaire ?

Jacques REISSE, professeur à l'université de Bruxelles

Les métaux jouent un rôle très important au sein du monde vivant. Il est donc intéressant de s'interroger sur l'origine de ces métaux que les organismes autotrophes trouvent dans les couches superficielles de l'écorce terrestre.

Le Terre est un corps différencié et des métaux comme le fer sont concentrés essentiellement dans le cœur de la planète. Néanmoins, il reste du fer et bien d'autres métaux dans l'écorce. Pourquoi ? La réponse à cette question entraîne une autre question. D'où proviennent les métaux terrestres ou, plus généralement, les métaux qui sont présents dans les planètes, satellites et astéroïdes qui constituent le système solaire ? Ils devaient être déjà présents dans la protonébuleuse solaire au sein de laquelle se sont formés tous ces corps. Pourquoi ? La réponse à cette question est connue mais elle entraîne une autre question puis une autre encore jusqu'à une limite puisque, dans le cadre du modèle cosmologique standard, les seuls éléments présents dans l'Univers primordial étaient des éléments légers (essentiellement H et He). Notre Univers a donc nécessairement connu un état « pré-métallique ».

L'exposé a donc porté sur l'origine des métaux dans l'Univers mais aussi sur l'apport de métaux, de matière organique et d'eau sur la Terre primitive, durant la phase dite post-accrétionnelle.

Séminaire du 13 mai 2009 :

La nutrition ferrique des organismes vivants : du complexant moléculaire aux nanostructures autoassemblées

Jean-Louis PIERRE, professeur à l'université Joseph Fourier (Grenoble)

Suite à l'apparition de l'oxygène, qui a entraîné la précipitation des hydroxydes du fer devenu ferrique, donc insoluble, les microorganismes ont développé une stratégie efficace pour acquérir le fer indispensable à leur croissance. Cette réponse évolutionnaire implique : la biosynthèse de petites molécules (sidérophores) qui, externalisées, sont capables de solubiliser le fer ferrique de l'environnement, un système de protéines membranaires réceptrices des ferrisidérophores et des réductases qui délivrent du fer ferreux, permettant ainsi l'utilisation du métal par les apoprotéines à fer.

La conception et l'étude de sidérophores de synthèse répond à un triple but :

- forger des outils chimiques pour mieux comprendre le métabolisme du fer (beaucoup de « boîtes noires » persistent encore à ce jour) ;
- développer des médicaments chélateurs du fer pour traiter la surcharge (hémochromatose), maladie létale qui touche des millions de personnes ;

– développer des complexes ferriques adaptés à la nutrition des bactéries marines (celles-ci jouent un rôle fondamental dans la transformation du CO₂ en oxygène) qui dépérissent en cas de manque de fer ou encore à la nutrition végétale, en particulier dans les sols calcaires.

Cet exposé a rapporté les travaux d'un laboratoire de chimie dans la problématique des synthèses de nouveaux chélateurs du fer, des études physico-chimiques de la complexation (thermodynamique et cinétique) et des applications biologiques, incluant le développement de chélateurs moléculaires ainsi que celui de systèmes amphiphiles, mimes des sidérophores des bactéries marines capables de s'autoassembler en vésicules.

Séminaire du 20 mai 2009 :

Le photosystème II : l'enzyme de l'oxydation de l'eau

Alfred W. RUTHERFORD, directeur de recherches au CNRS CEA Saclay

L'enzyme d'oxydation de l'eau dans le photosystème est en large partie responsable de la conversion de l'énergie solaire en composés chimiques à haute énergie nécessaires à la vie sur la planète et qui se sont accumulés sous forme de carburants fossiles. Cette enzyme produit également l'oxygène présent dans l'atmosphère qui rend la biosphère aérobie avec toutes les répercussions associées (respiration aérobie, vie multicellulaire, protection par l'ozone etc.). C'est aussi le seul catalyseur qui peut oxyder l'eau au potentiel thermodynamique optimum. En conséquence, elle fait l'objet de toutes les attentions dans le but de mieux comprendre son fonctionnement et de produire des catalyseurs bio-inspirés potentiellement utiles pour la mise au point de dispositifs efficaces pour la conversion de l'énergie : a) production d'H₂ par électrolyse ou photolyse ; b) production d'électricité par les piles à combustibles. Le groupe à Saclay applique des approches biophysiques, biochimiques et biologiques pour étudier la photochimie et l'enzymologie de cette enzyme remarquable. Ces approches sont appliquées aux enzymes isolées d'espèces thermophiles de cyanobactéries, car elles sont plus robustes et homogènes. L'étude porte plus particulièrement sur le cluster d'ions métalliques (4 ions Mn et un ion calcium). En parallèle nous synthétisons et étudions des modèles chimiques reproduisant certaines propriétés de l'enzyme. Ces systèmes artificiels pourraient avoir des applications dans la production de carburants solaires et dans les piles à combustibles (supported by EU network Solar H2).

Séminaire du 27 mai 2009 :

Hydrogène et catalyse : des algues aux nanomatériaux

Vincent ARTERO, chercheur CEA Grenoble

La photosynthèse oxygénique permet aux plantes d'utiliser l'énergie solaire pour réduire le dioxyde de carbone et produire leur biomasse. Certaines micro-algues

ou bactéries ont même développé une variante de ce processus leur permettant de produire de l'hydrogène grâce à une enzyme spécifique et très efficace, l'hydrogénase. Cependant, si l'hydrogène est un gaz à haute capacité énergétique massique qui pourrait constituer le carburant idéal d'une économie de l'après-pétrole, de nombreux verrous scientifiques et technologiques restent à lever, notamment en ce qui concerne sa production à partir de ressources renouvelables. Nous montrerons comment les chimistes peuvent s'inspirer du fonctionnement des systèmes biologiques pour développer des nouveaux catalyseurs ou photocatalyseurs pour produire l'hydrogène sans recourir à des métaux nobles comme le platine.

Séminaire du 3 juin 2009 :

Un modèle fonctionnel pour le site actif de la Cytochrome c Oxidase réduit de façon catalytique l'oxygène en eau dans des conditions physiologiques

James COLLMAN, professeur à l'université de Stanford (USA)

À pH et potentiel physiologiques, un modèle synthétique du site actif de l'enzyme cytochrome c oxydase (CcO) catalyse la réduction de l'oxygène à 4 électrons. Ce modèle est attaché de façon covalente à une monocouche auto-assemblée (SAM) sur une électrode d'or. Le modèle possède tous les composants essentiels du site actif de CcO : un hème à fer (« heme a3 ») avec ligand imidazole proximal et un ensemble de trois imidazoles distaux fixés au cuivre (« Cu-b »). Un phénol mimant la « tyrosine 244 » est attaché à l'un des imidazoles distaux. Les trois composants rédox-actifs sont nécessaires pour minimiser la production d'espèces partiellement réduites de l'oxygène pendant la réduction de l'oxygène. Ce modèle fonctionnel démontre comment CcO lui-même peut tolérer l'hormone NO, connue pour diffuser à travers la mitochondrie. Il est proposé que Cu-b délivre du superoxyde à NO fixé au Fe de l'hème a3 pour former du peroxy-nitrite et du nitrate, qui diffusent ensuite.

RÉFÉRENCES PRINCIPALES

COLLMAN, James P., DEVARAJ, Neal K., DECRÉAU, Richard A., YANG, Ying, YAN, Yilong, EBINA, Wataru, EBERSPACHER, Todd A., CHIDSEY, CHRISTOPHER E. D., "A Cytochrome c Oxidase Model Catalyzes Oxygen to Water Reduction Under Rate-Limiting Electron Flux", *Science*, **2007**, 315, 1565-1568.

COLLMAN, James P., DEY, Abhishek, DECREAU, Richard A., YANG, Ying, HOSSEINI, Ali, SOLOMON, Edward I., EBERSPACHER, Todd A., "Interaction of Nitric Oxide with a Functional Model of Cytochrome c Oxidase", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2008**, 105(29), 9892-9896.