



# Biocatalyse

M2 BOBI 2008-2009



# Plan du cours

- Introduction à la biocatalyse
- Catalyse acide/base (protéines à Zinc)
- Réactivité de  $O_2$  en (bio)catalyse
- Fixation de  $O_2$  (protéines à Fer et Cuivre)
- Activité « oxygénase » des protéines à Fer
- Activité « oxydase » et « oxygénase » des protéines à Fer et Cuivre



# Introduction à la Biocatalyse

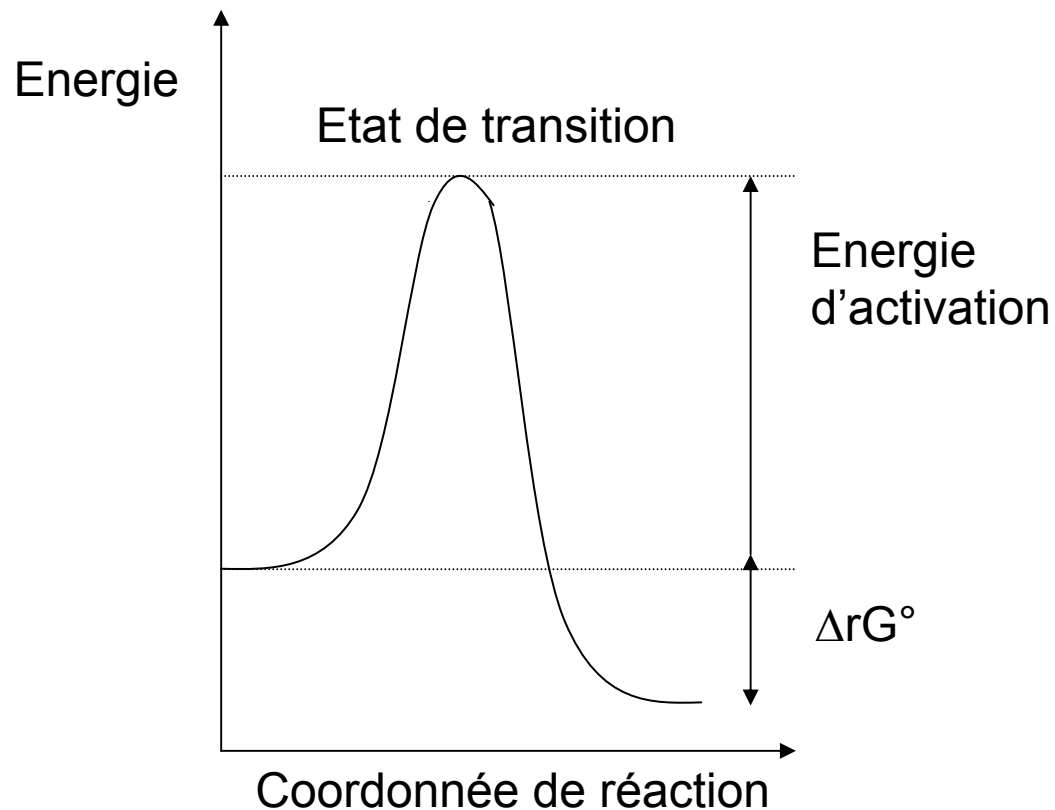


I. Introduction

II. Pré-organisation des enzymes

III. Métaux et biocatalyse

# I. Introduction

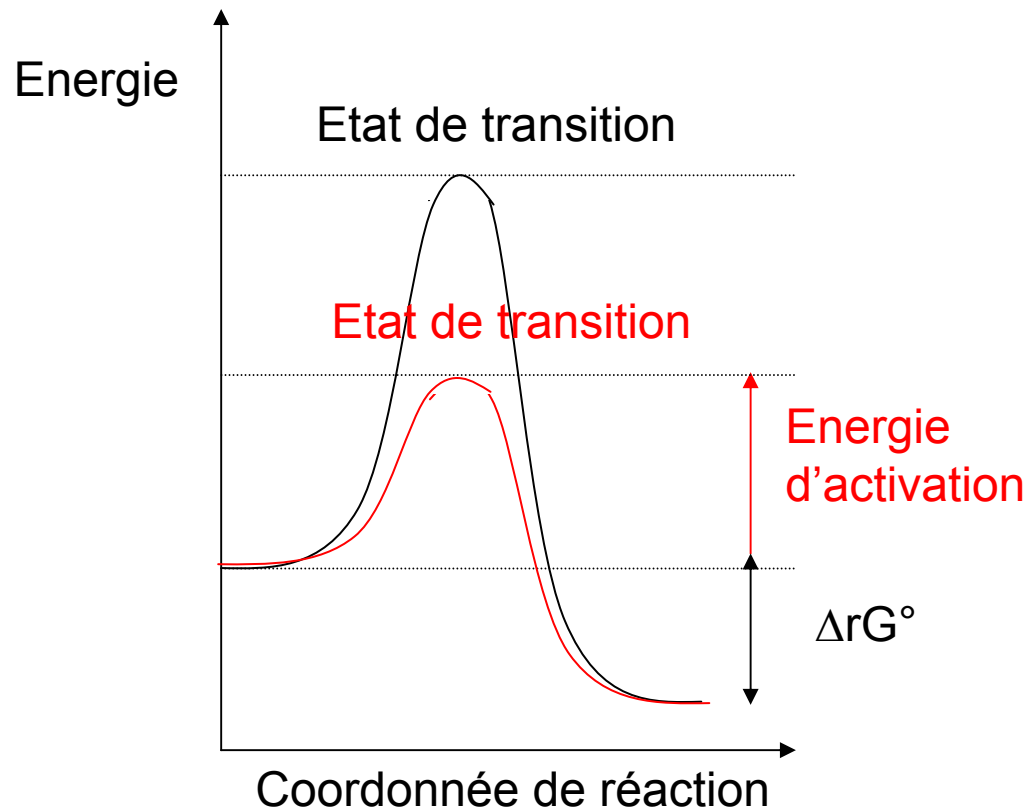


- + faible, + réaction facile
- Quand  $<$  énergie thermique à une température donnée, réaction spontanée

Un catalyseur va ...

- Être non consommé
- Rendre possible une réaction:
  - Oxydation du méthane en méthanol par la Méthane Monooxygénase
- Accélérer une réaction:
  - Hydrolyse d'amides:  $k = 0.01 \text{ s}^{-1}$  sans enzyme,  **$1000000 \text{ s}^{-1}$  avec Carboxypeptidase**

# Comment ?

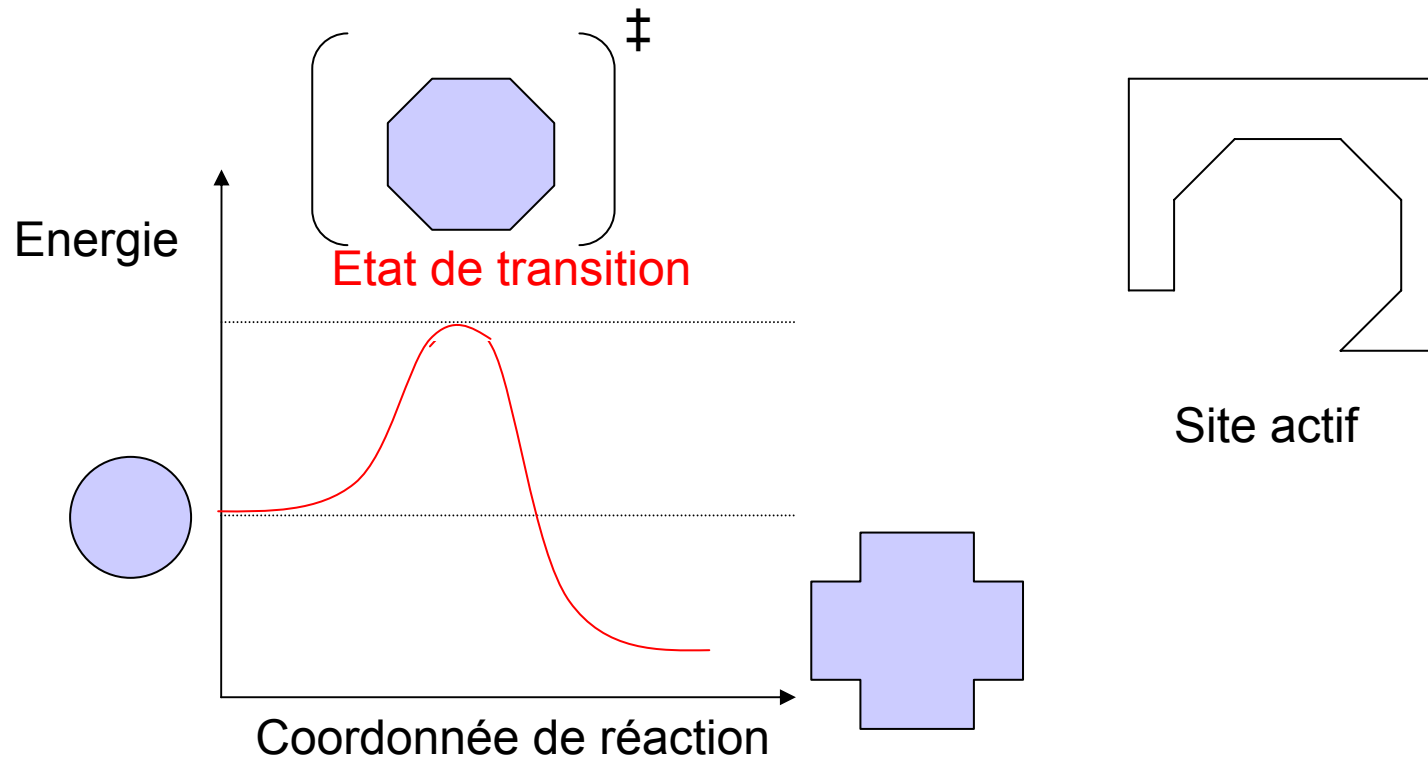


Rouge: Réaction catalysée

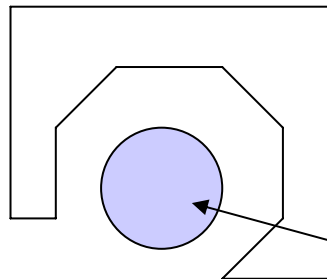
- Diminue l'énergie d'activation
- Revient à stabiliser l'état de transition

# Catalyse par des enzymes

- Pré-organisation du site actif: plus complémentaire avec l'état de transition qu'avec le substrat initial

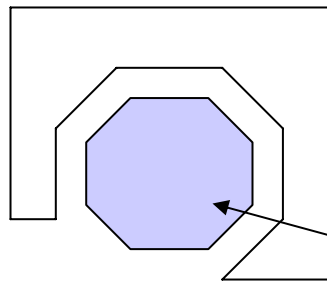


# Pour une catalyse efficace



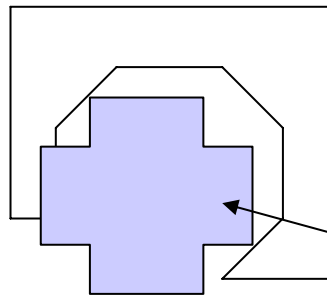
Forte affinité

Substrat



Très complémentaire

Etat de transition



Faible affinité

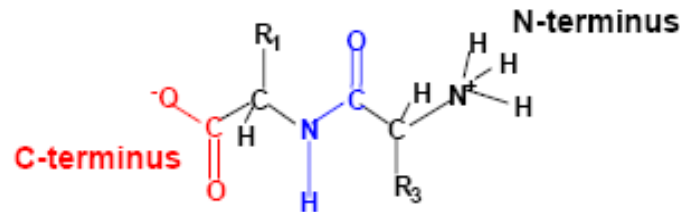
Produit

→ Structure tridimensionnelle des enzymes



## II. Préorganisation des enzymes (protéines)

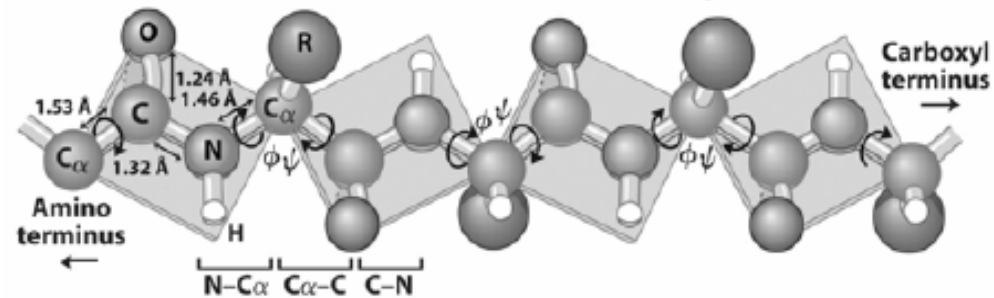
- Amino-acides connectés par des liens amides



- Résidus R vont jouer un rôle primordial dans:
  - Solubilité, interactions entre biomolécules (Balance hydrophile / lipophile)
  - Stabilité de la structure, fixation du substrat (Liaisons H ou hydrophobe, ponts S-S)
  - Catalyse acide / base
  - Coordination de métaux

# Structure des protéines

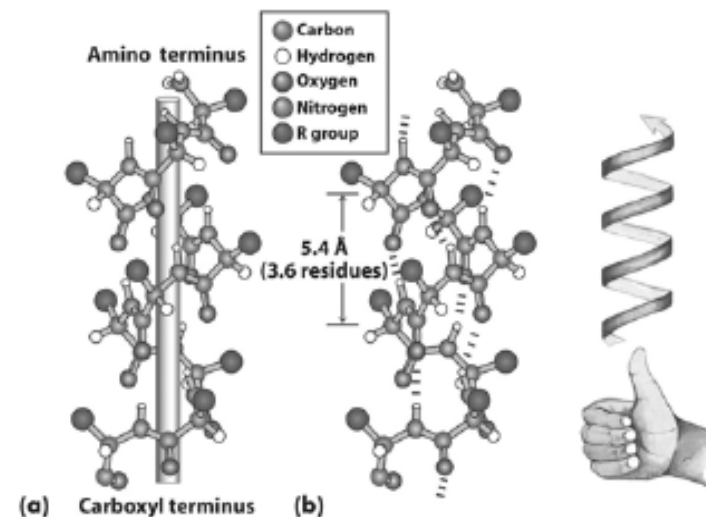
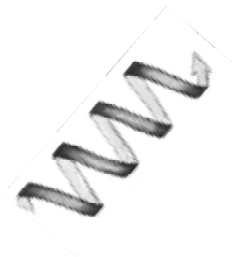
- Primaire: séquence d'acides aminés



- Secondaire: repliement de régions de protéines

- Hélices  $\alpha$ :

Ala, Glu, Leu, Met, Pro, Gly,  
Tyr, Ser

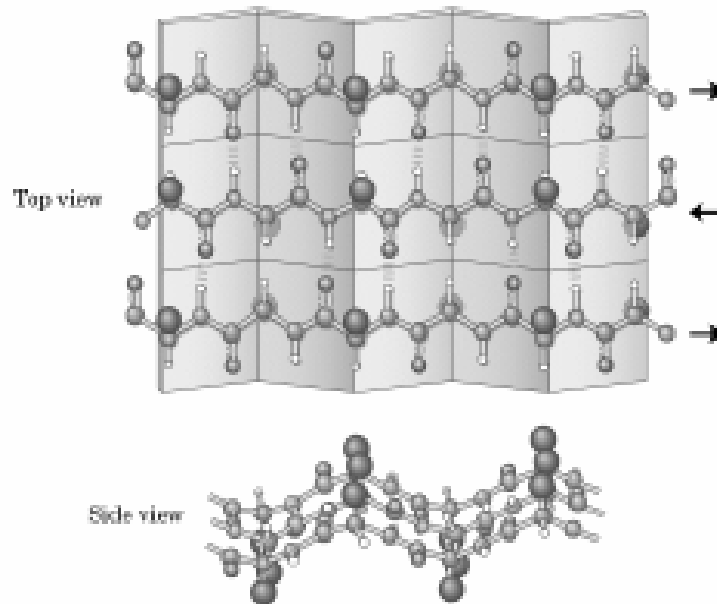


# Structure des protéines

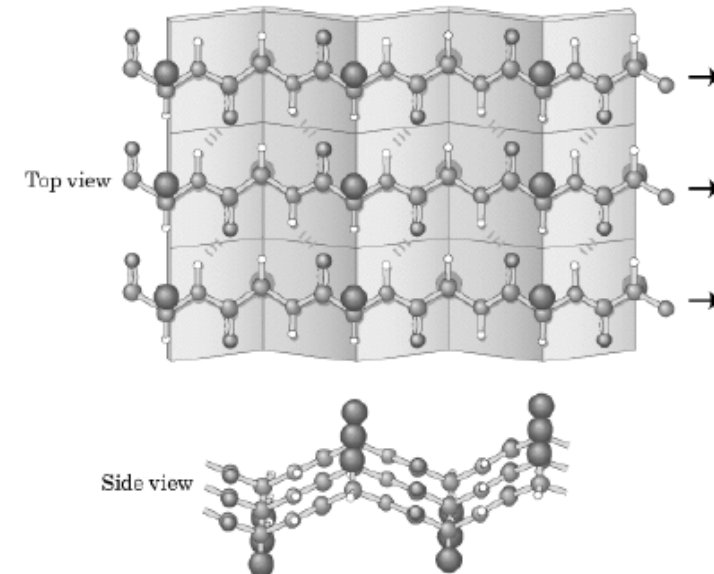
- Secondaire: repliement de régions de protéines
- Feuillets  $\beta$ :  
Val, Leu, Ile, Trp, Tyr, Thr, Phe



(a) Antiparallel

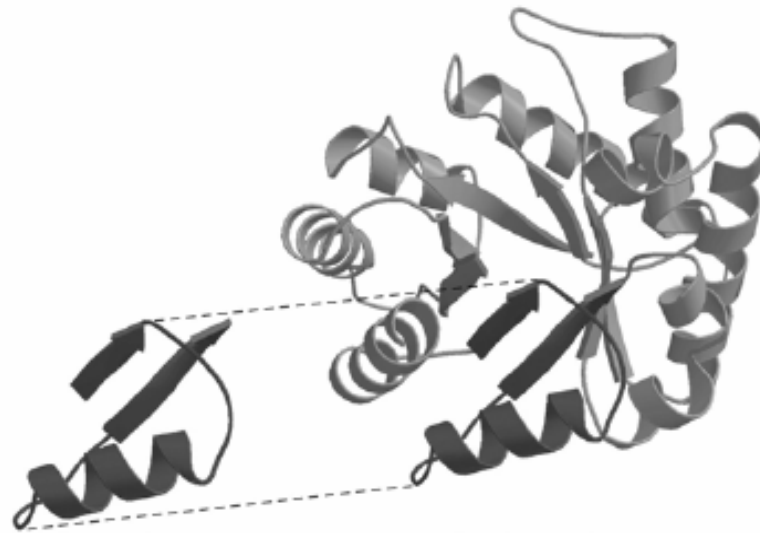


(b) Parallel



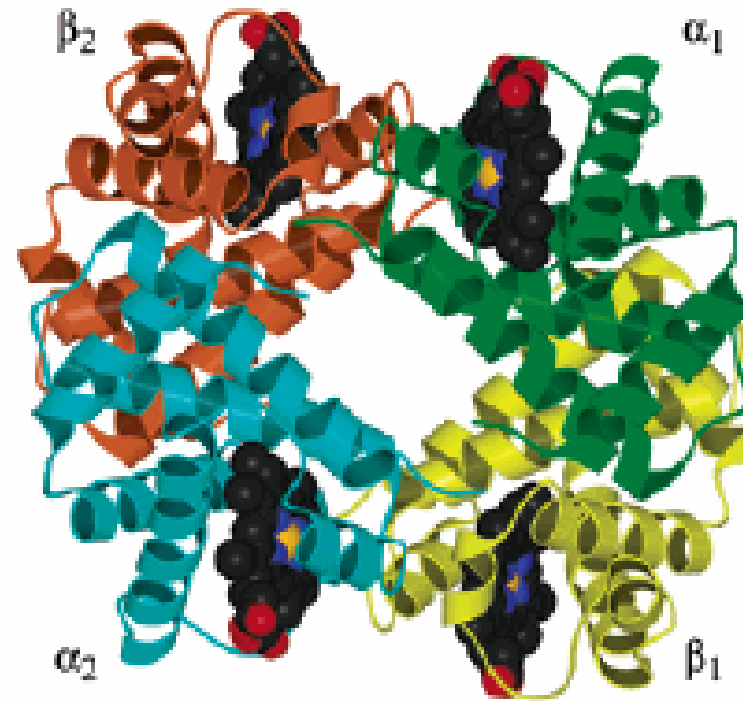
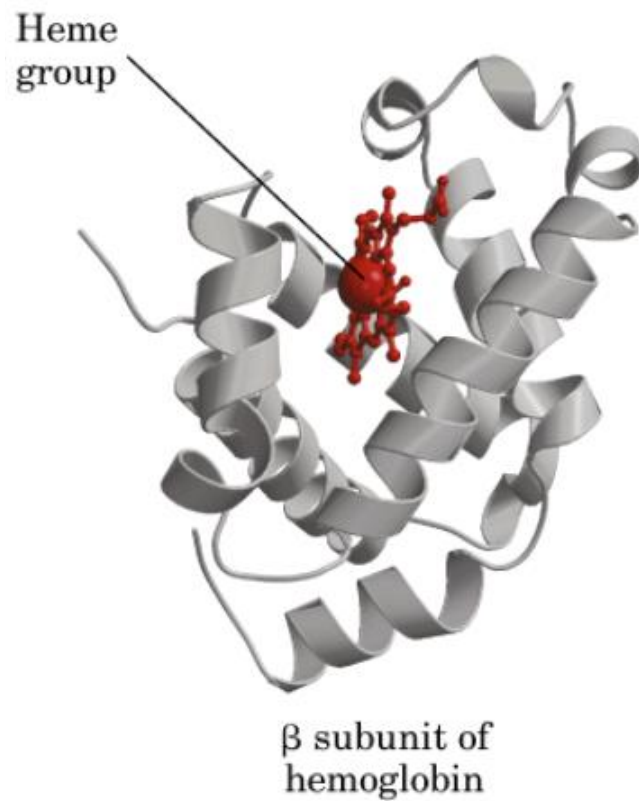
# Structure des protéines

- Structure tertiaire: forme de la protéine entière



- Structure quaternaire: Résulte de l'interaction entre plusieurs sous-unités. Responsable de l'allostérie de l'hémoglobine par ex.

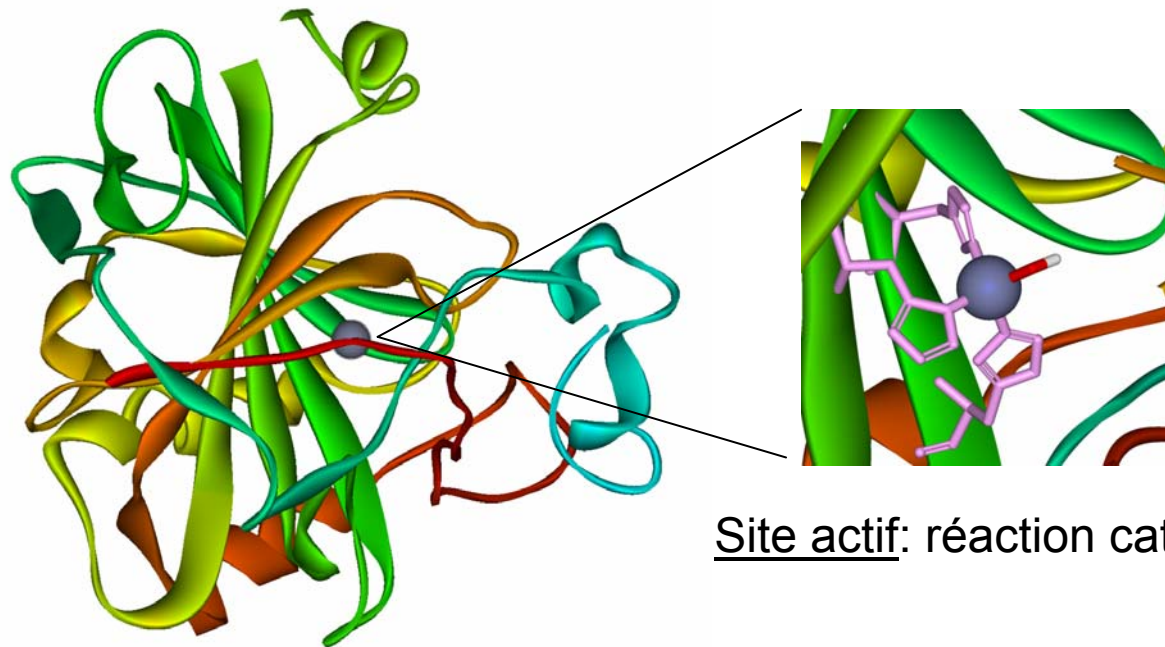
# Ex de structure quaternaire



Assemblage permettant l'allostérie

# Site actif

- Là où la réaction catalytique a lieu
- Domaine très restreint de la protéine



Site actif: réaction catalytique

Enveloppe protéique: Stabilité, régulation, allostérie, fixation de cofacteurs, interaction avec d'autres biomolécules



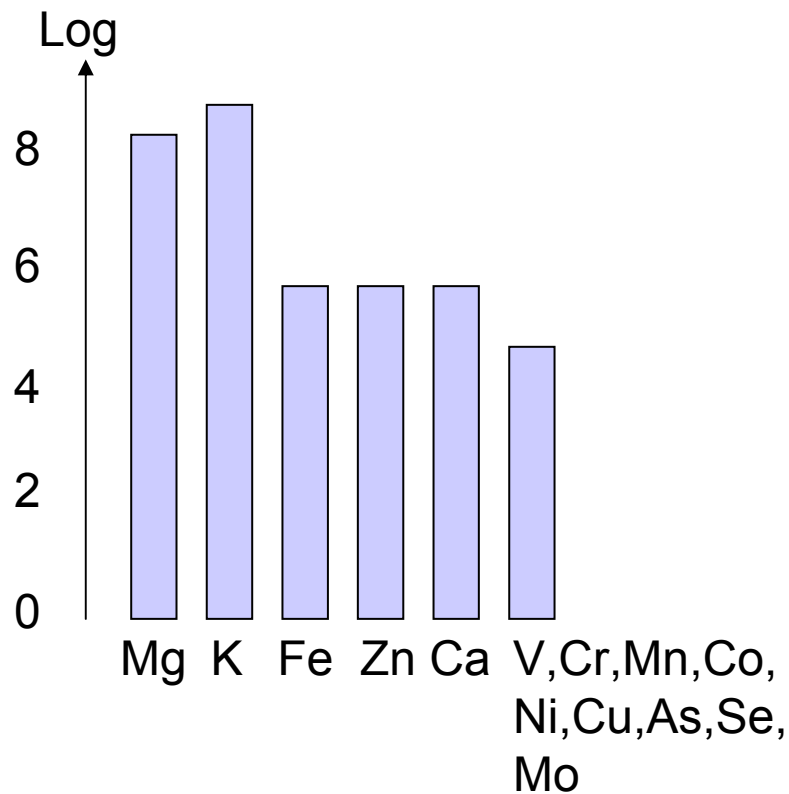
### III. Métaux et biocatalyse

- Acidité de Lewis: Facilitent les réactions **acide-base**
- Multiples degrés rédox accessibles: Facilitent les réactions **rédox**
- Activation par coordination: Facilitent le **transfert d'atomes ou de groupements**

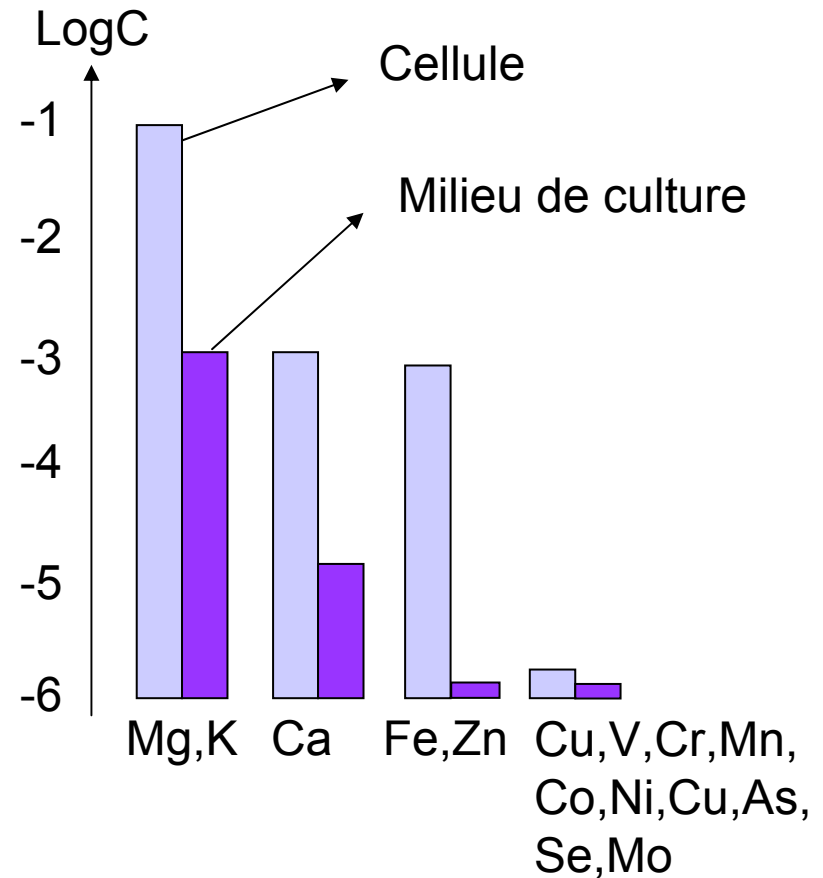
**Métaux omniprésents car la plupart des grandes réactions biochimiques peuvent être facilitées !!!**

# Concentration en métaux au niveau cellulaire

● Nb atome / Cellule  
(*E. Coli*)



● Concentration









# La nature a sélectionné des métaux:

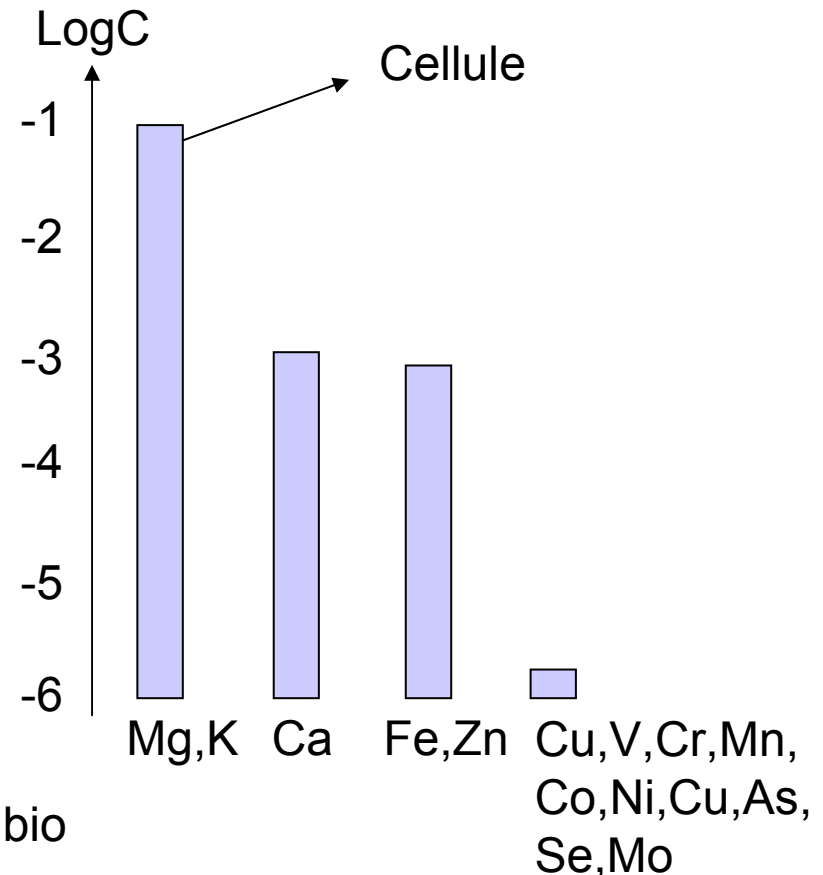
- Abondants

- Sinon coût énergétique

Abondance dans la croûte terrestre:

● Si: $2.8 \times 10^5$
● <u>Fe: <math>5 \times 10^4</math></u>
● Ca: $3.6 \times 10^4$
● Na: $2.8 \times 10^4$
● K: $2.6 \times 10^4$
● Mg: $2.1 \times 10^4$
● <u>Mn: 950</u>
● <u>V: 135</u>
● <u>Cr: 100</u>
● <u>Ni: 75</u>
● Zn: 70
● <u>Cu: 55</u>
● <u>Co: 25</u>

Rem: Soulignés = métaux rédox actifs en bio



# La nature a sélectionné des métaux

- Abondants
  - Sinon coût énergétique
- Plutôt labiles (Cr rare en bio)
  - Réactions facilitées au niveau des sites actifs de métalloprotéines
- Dont les complexes sont stables thermodynamiquement
  - Stabilité des biomolécules

# Métaux les plus « universels » en biocatalyse: Fer et Cuivre

Fonction	Fer	Cuivre
Transport d'O <sub>2</sub>	Hémoglobine	Hémocyanine
Oxygénation	Cytochrome P450 Catéchol dioxygénase	Tyrosinase
Oxydase	Hème peroxydase Peroxydase	Amine oxydase Galactose oxydase
Transfert d'électrons	Cytochrome	protéine « blue copper »
Antioxydant	Peroxydase	Superoxyde dismutase
Réduction de nitrites	Cytc nitrite réductase	Cu nitrite réductase

Protéines à Fe et Cu ayant même fonction: Théorie de l'évolution

→ Adaptation du vivant à la présence d'oxygène: Fe<sup>2+</sup> s'oxyde en Fe<sup>3+</sup> qui précipite et devient indisponible pour le vivant. Cu<sup>+</sup> toxique s'oxyde en Cu<sup>2+</sup> qui va être utilisé à la place du fer.

# Propriétés générales des métaux

## a- Acidité de Lewis

- Comportement des ions métalliques dans l'eau:
  - H<sub>2</sub>O: base de Lewis → Formation de complexes aquo  $M(H_2O)_n^{z+}$
  - Effet du métal (acide de Lewis): Acidité des molécules d'eau coordonnées augmente  
Ex:  $pK_a \text{ Fe}(H_2O)_6^{3+} / \text{Fe}(H_2O)_5(OH)^{2+} = 2 !!$
  - Acidité augmente qd z augmente et r diminue

# b- Propriétés rédox

M	Struct. Élect	Nbres d'oxydation observés dans les complexes												
Sc	3d <sup>1</sup> 4s <sup>2</sup>						0			3				
Ti	3d <sup>2</sup> 4s <sup>2</sup>						0		2	3	4			
V	3d <sup>3</sup> 4s <sup>2</sup>													
Cr	3d <sup>5</sup> 4s <sup>1</sup>													
Mn	3d <sup>5</sup> 4s <sup>2</sup>													
Fe	3d <sup>6</sup> 4s <sup>2</sup>													
Co	3d <sup>7</sup> 4s <sup>2</sup>													
Ni	3d <sup>8</sup> 4s <sup>2</sup>													
Cu	3d <sup>10</sup> 4s <sup>1</sup>													
Zn	3d <sup>10</sup> 4s <sup>2</sup>													

En violet:  
Degrés d'oxydation courants en biologie

# Effet de ligand sur le potentiel d'oxydation

- Chargé négativement: Stabilise haut degré d'oxydation
- $\sigma$ -donneur: Stabilise haut degré d'oxydation
- $\pi$ -accepteur: Stabilise bas degré d'oxydation
- Effet stérique !



# Effet des ligands sur le potentiel d'oxydation

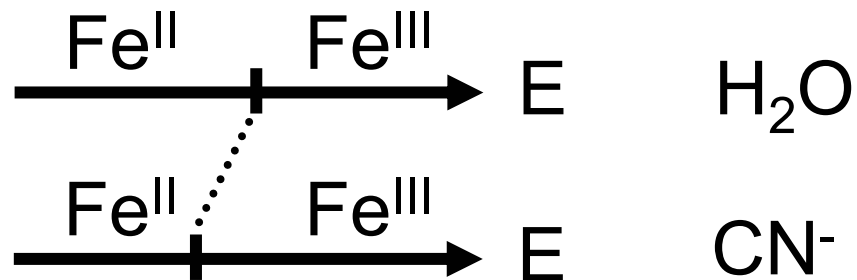
- $E^\circ (\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+} / \text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}) = 0.77 \text{ V}$
- $E^\circ (\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-} / \text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}) = 0.36 \text{ V}$

● Explication:

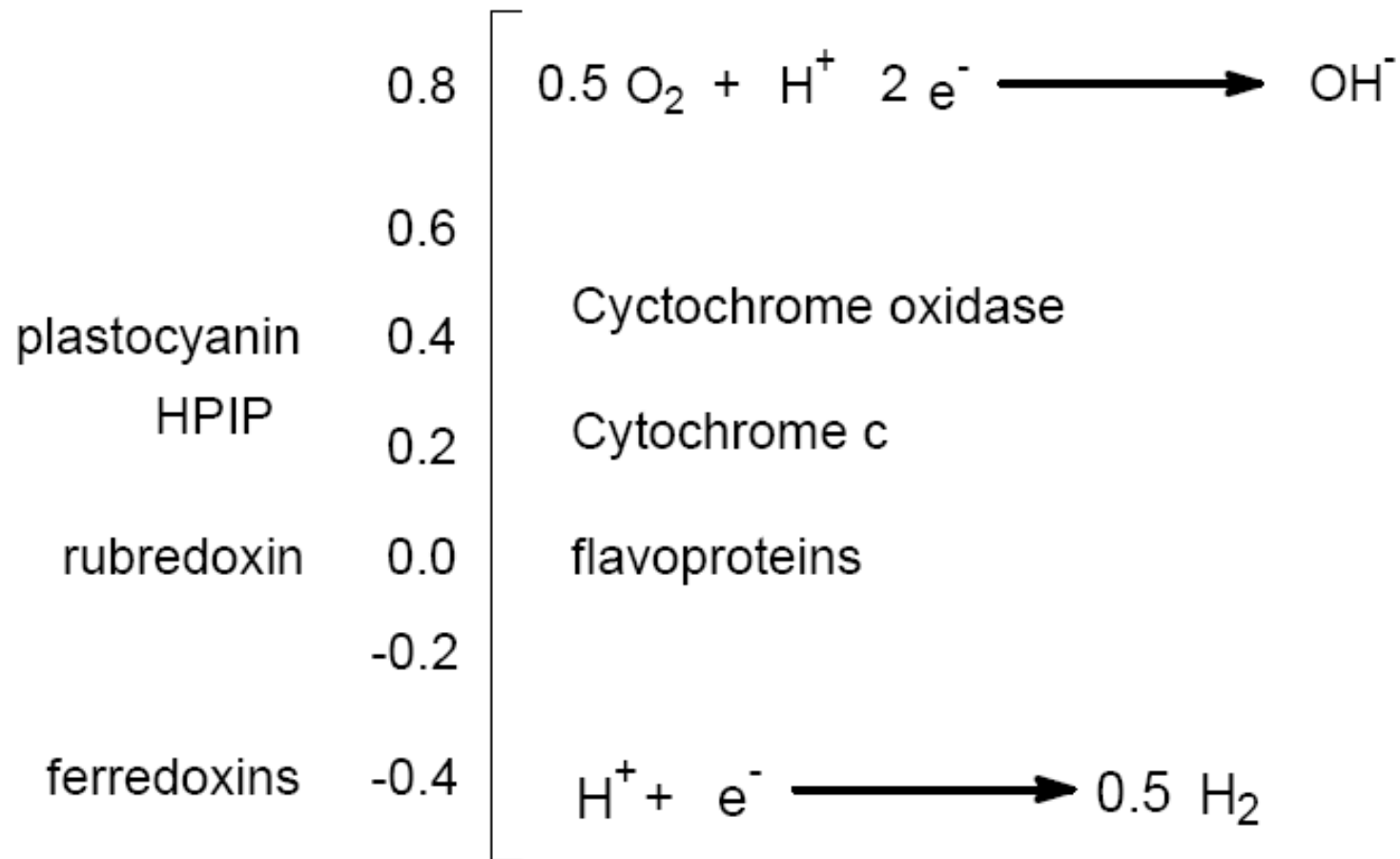
$\text{CN}^-$  est un meilleur ligand que  $\text{H}_2\text{O}$  pour  $\text{Fe}^{3+}$

Degré +III du complexe favorisé

Plus grand domaine de prédominance



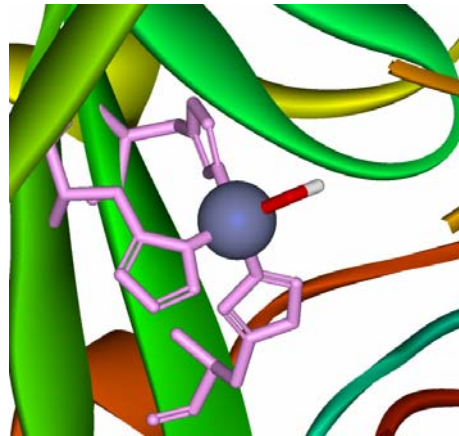
# Potentiels de métalloenzymes à Fe ou Cu catalysant des réactions rédox



→ En fonction du ligand tous les potentiels sont accessibles !!!

## c- Sites actifs de **métalloenzymes**

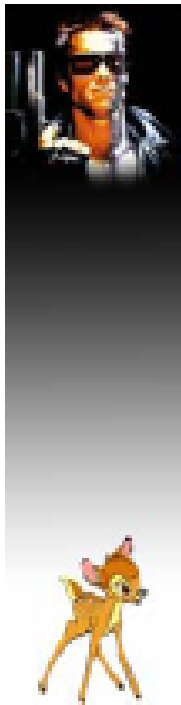
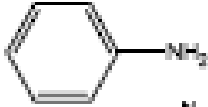

- Le squelette protéique définit une sphère de coordination autour du métal
- Normalement un métal bien défini se fixe
- Effet de la seconde sphère de coordination souvent non négligeable



Première sphère: coordination directe (en rose)

Deuxième sphère: acides aminés dans les feuillets b adjacents

# Quel ligand pour quel métal ? → Théorie HSAB

Hard	Cation	Ligand	Durs
	$H^+$ $Mn^{2+}$ $Cr^{3+}$ $Na^+$ $Al^{3+}$ $Co^{3+}$ $K^+$ $Ca^{3+}$ $Fe^{3+}$ $Mg^{2+}$ $Ca^{2+}$ $Ti^{3+}$	$H_2O$ $CO_3^{2-}$ $NH_3$ $OH^-$ $NO_3^-$ $RNH_2$ $ROH$ $N_2H_4$ $PO_4^{3-}$ $R_2O$ $RO^-$ $Cl^-$	Petite taille Charge élevée Faible électronégativité
	$Fe^{2+}$ $Ni^{2+}$ $Zn^{2+}$ $Co^{2+}$ $Cu^{2+}$	$NO_2^-$  $N_2$ $SO_3^{2-}$ $N_3^-$ 	
	$Cu^+$ $Pt^{2+}$ $Pt^{4+}$ $Au^+$ $Tl^+$ $Hg^{2+}$ $Cd^{2+}$ $Pb^{2+}$	$R_2S$ $R_3P$ $RS^-$ $CN^-$ $RSH$ $RNC$ $(RS)_2PO^{2-}$ $SCN^-$ $CO$ $H^-$	Mous grande taille faible charge électronégativité élevée
	Soft		

Liaison: dur-dur → Caractère ionique  
 mou-mou → Caractère covalent



## d. Classes de ligands biologiques

- Amino-acides
- ADN (phosphates)
- Sucres (hydroxyles)
- Cofacteurs, groupements prosthétiques (porphyrines ...)
- Agrégats (ferritine)

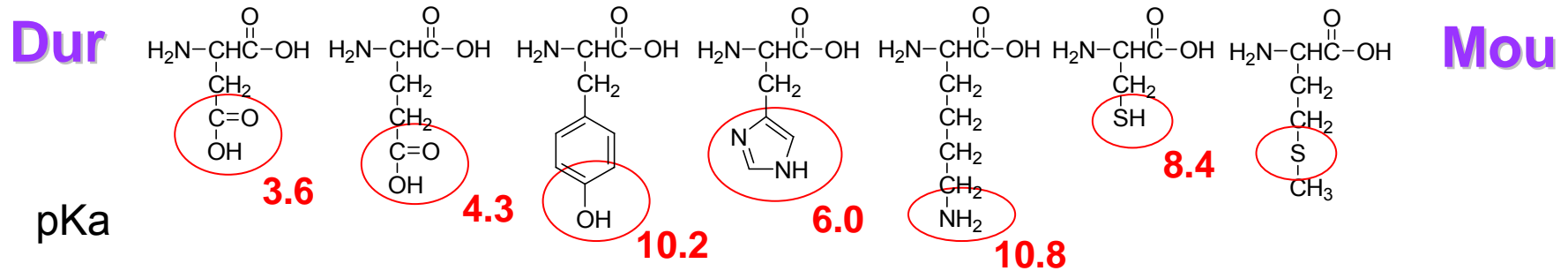



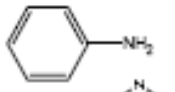

## d. Classes de ligands biologiques

- Amino-acides
- ADN (phosphates)
- Sucres (hydroxyles)
- Cofacteurs, groupements prosthétiques (porphyrines ...)
- Agrégats (ferritine)

# d.1 Amino-acides

## ● Coordination par les chaines laterales



Hard	Cation	Ligand
	H <sup>+</sup> Mn <sup>2+</sup> Cr <sup>3+</sup>	H <sub>2</sub> O CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> NH <sub>3</sub>
	Na <sup>+</sup> Al <sup>3+</sup> Co <sup>3+</sup>	OH <sup>-</sup> NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> RNH <sub>2</sub>
	K <sup>+</sup> Ca <sup>3+</sup> Fe <sup>3+</sup>	ROH N <sub>2</sub> H <sub>4</sub> PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>
	Mg <sup>2+</sup> Ca <sup>2+</sup> Ti <sup>3+</sup>	R <sub>2</sub> O RO <sup>-</sup> Cl <sup>-</sup>
	Fe <sup>2+</sup> Ni <sup>2+</sup> Zn <sup>2+</sup>	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> 
	Co <sup>2+</sup> Cu <sup>2+</sup>	N <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> 
		N <sub>3</sub> <sup>-</sup>
	Cu <sup>+</sup> Pt <sup>2+</sup> Pt <sup>4+</sup>	R <sub>2</sub> S R <sub>3</sub> P RS <sup>-</sup>
	Au <sup>+</sup> Tl <sup>+</sup> Hg <sup>2+</sup>	CN <sup>-</sup> RSH RNC
	Cd <sup>2+</sup> Pb <sup>2+</sup>	(RS) <sub>2</sub> PO <sub>2</sub> <sup>2-</sup> SCN <sup>-</sup> CO H <sup>-</sup>
Soft		

## d.1 Amino-acides

- Cas particulier des oligopeptides: Complexation par les N<sup>-</sup> d'amides déprotonés ou les carbonyles d'amides.

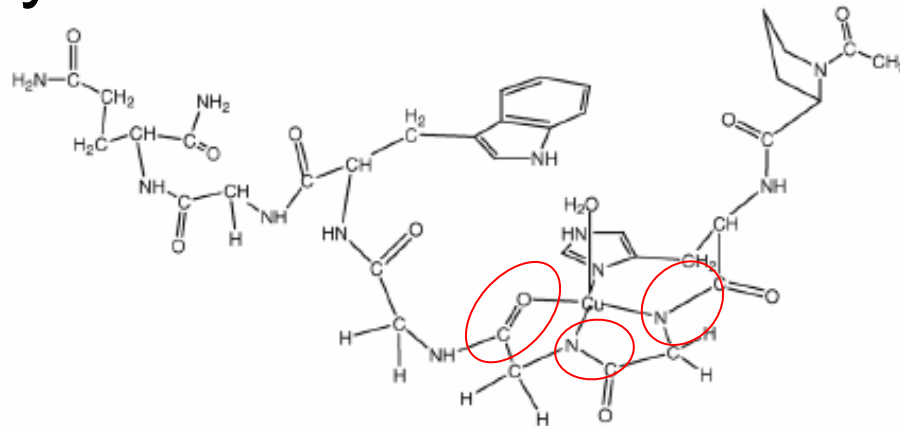


Fig. 3. The proposed structure of the Cu<sup>2+</sup>-Ac-PHGGGWGQ-NH<sub>2</sub> complex.

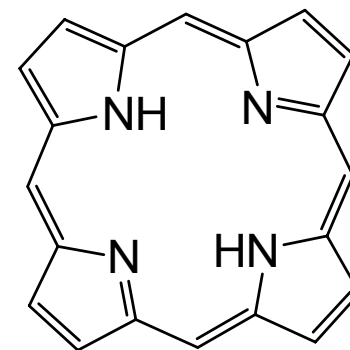
- Mode de coordination observé uniquement lorsque la biomolécule est flexible
- Rarement observé lorsque la protéine présente une structure tertiaire ou quaternaire

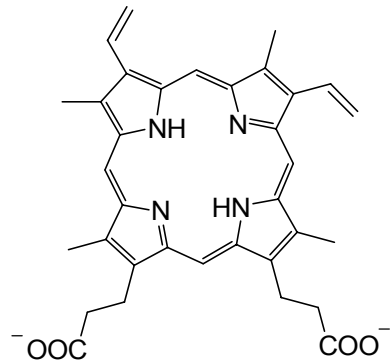
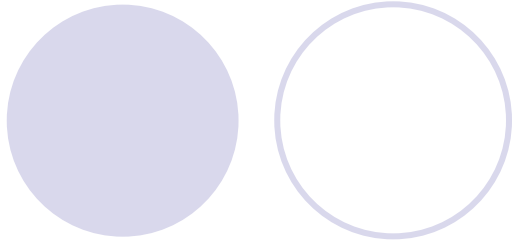


## d.2 Groupements prosthétiques

Définition: groupe ou ligand fixant le métal et qui peut être enlevé (intact) de la protéine

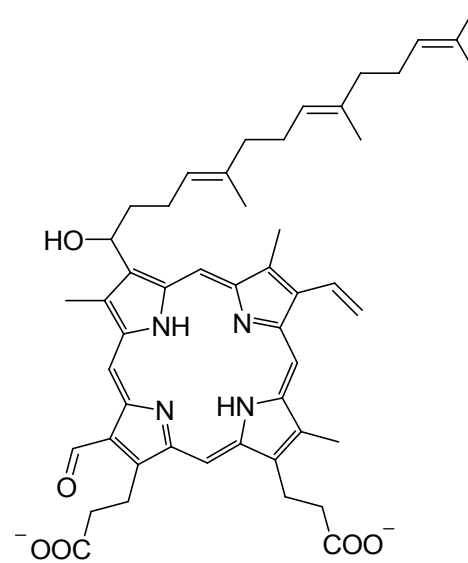
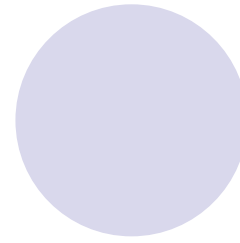
- Le plus couramment rencontré: Hème
- Structure dérivée du tétrapyrrole
- Métaux: essentiellement Fe (hémoglobine) et Mg (chlorophylle)





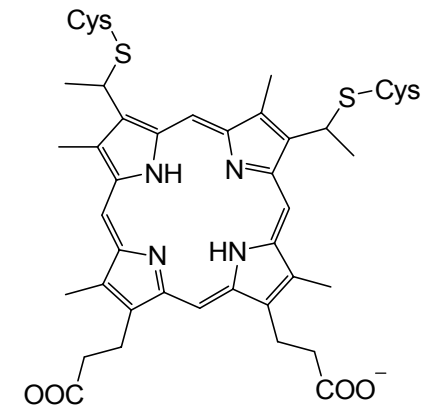
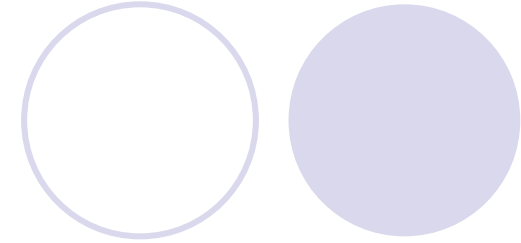
Protoporphyrine IX

Hémoglobine



Hème a

Cytochrome Oxydase



Hème c

(lié de manière covalente  
≠ prosthétique)

Cytochrome c

# Porphyrines

Ion	Rayon ionique (pm)	Adéquation en tant que centre métallique dans les tétrapyrrole
Be <sup>2+</sup>	45	too small
Mg <sup>2+</sup>	72	proper size → chlorophyll
Ca <sup>2+</sup>	100	too big
Al <sup>3+</sup>	53	rather small
Ga <sup>3+</sup>	62	okay but Ga <sup>3+</sup> rare in environment
In <sup>3+</sup>	80	large and rare element
O=V <sup>2+</sup>	ca. 60	okay but not seen in biology –found in oil
Mn <sup>2+</sup>	83	too large
Mn <sup>3+</sup>	ca.60	okay, synthetic oxidation catalysis
Co <sup>2+</sup> (l.s)	65	proper size → cobalmins
Ni <sup>2+</sup>	69	proper size F430 → tunichlorin
Cu <sup>2+</sup>	73	relatively large, not found in biology
Zn <sup>2+</sup>	74	relatively large, not seen in biology
Fe <sup>2+</sup> h.s.	78	too-large (out of plane structure)
Fe <sup>2+</sup> l.s	61	proper size
Fe <sup>3+</sup> h.s	65	proper size
Fe <sup>3+</sup> l.s	55	rather small

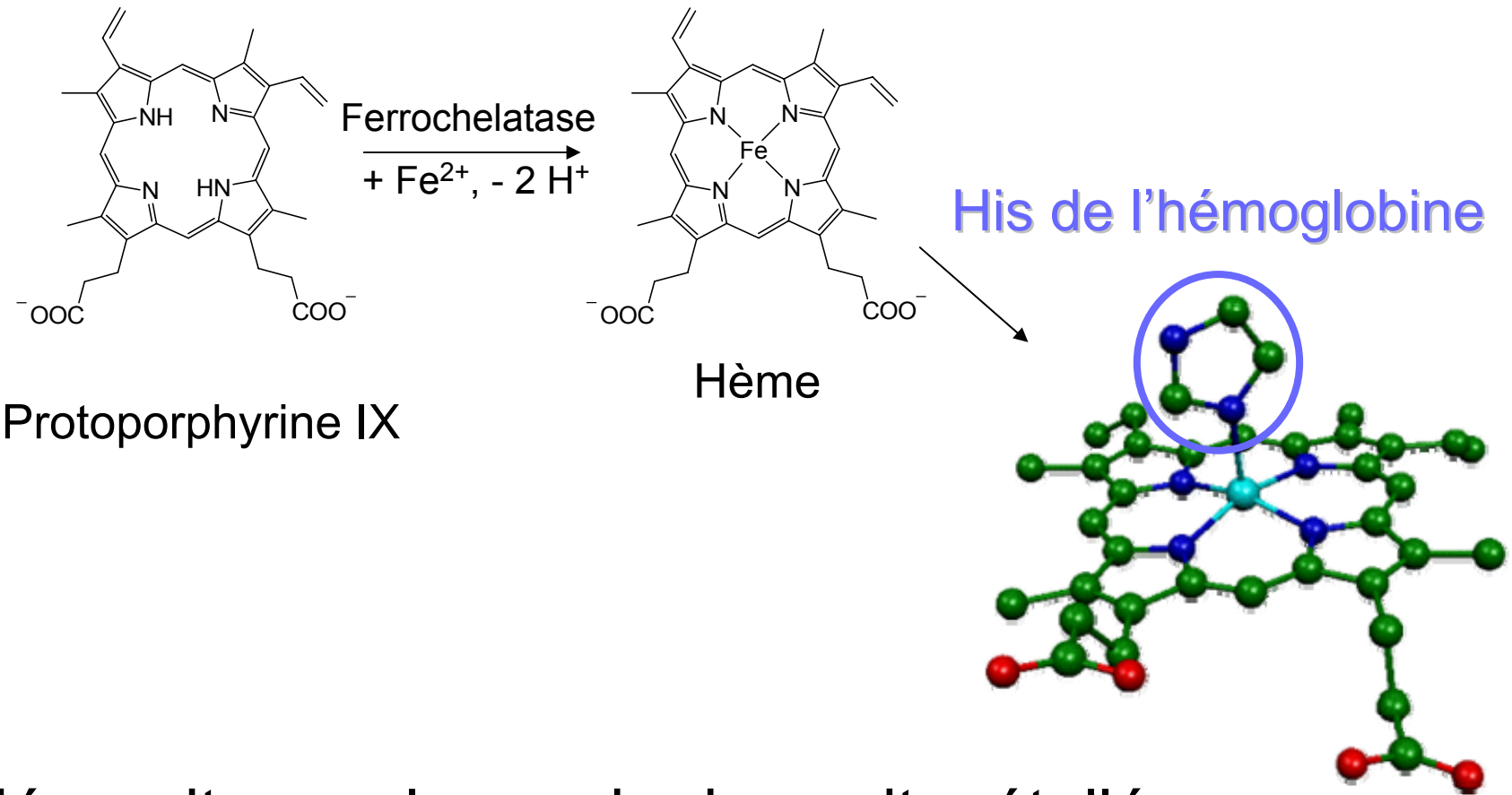
# Réactivité des protéines à fer héminique (les plus courantes)

Metalloprotein*	Iron co-ordination number	Electronic states†	Oxidation states
<b>O<sub>2</sub> carrier</b>			
Haemoglobin	5	HS/LS (O <sub>2</sub> )	II
Myoglobin	5	HS/LS (O <sub>2</sub> )	II
<b>NO binding</b>			
G protein	5 ?	HS/LS (NO)	II
<b>CO binding</b>			
Cytochrome <i>c'</i>	5	HS/LS (CO)	II–III
<b>O<sub>2</sub> activator</b>			
Oxidases	5 ?	HS/LS (O <sub>2</sub> )	II–VI
Cytochrome <i>a<sub>3</sub></i>	5 ?	HS/LS (O <sub>2</sub> )	II–VI
P-450	5/6	HS/LS (O <sub>2</sub> )	II–VI
Peroxidases (O <sub>2</sub> )	5	HS	II
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> activator</b>			
Peroxidases (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	5	HS	III–V
Catalases (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	5	HS	III–V
<b>Electron transfer</b>			
Cytochromes <i>a</i>	6	LS	II–III
Cytochromes <i>b</i>	6	LS	II–III
Cytochromes <i>c</i>	6	LS	II–III

Réactivité dictée par:

- L'environnement protéique (ionisation)
- Le type d'hème
- Le métal, son degré rédox, son spin

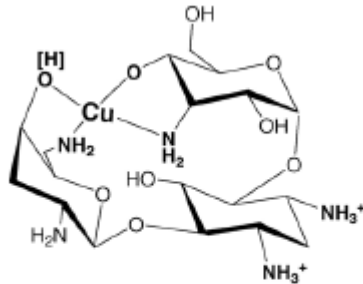
# Fixation de la porphyrine à la protéine



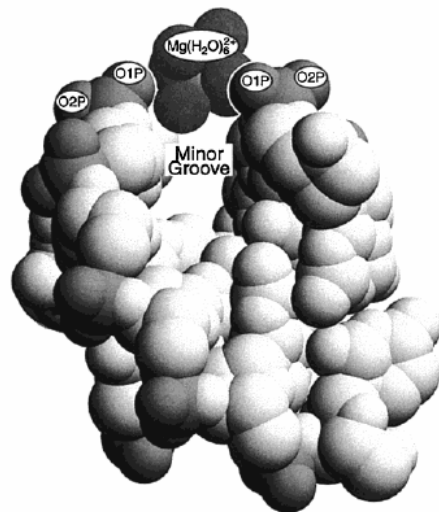
Nécessite que la porphyrine soit métallée

## d.3 Autres modes de coordination (moins intéressants en catalyse)

- Coordination avec des sucres:



- ADN:



- Cœur minéral

