

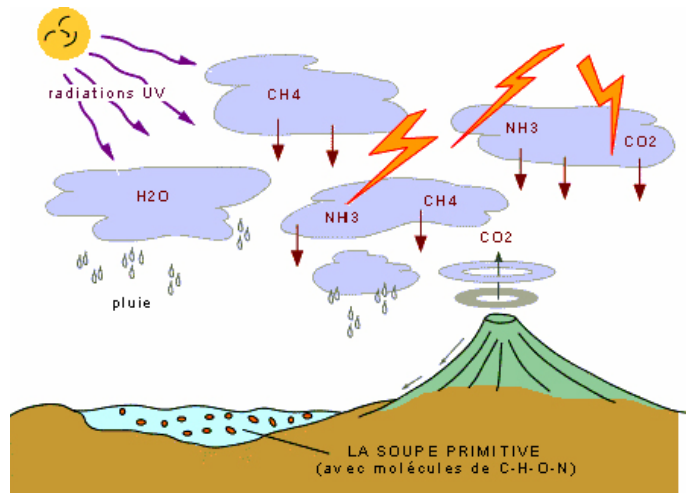


Enzymes à Fer

- I. Introduction
- II. Enzymes à monofer non-héminique
- III. Enzymes à di-fer non-héminique
- IV. P450 (fer héminique)
- V. Conclusion

I. Introduction

Élément devenu indisponible il y a 1.7 milliard d'années lorsque l'atmosphère est devenue oxydante



Atmosphère réductrice
(CO₂, N₂, H₂, NH₃, CH₄)

Production de O₂ par photosynthèse →
Atmosphère devient oxydante ([O₂] augmente)

Fe²⁺ soluble (biodisponible)
Cu⁺ soluble (biodisponible)

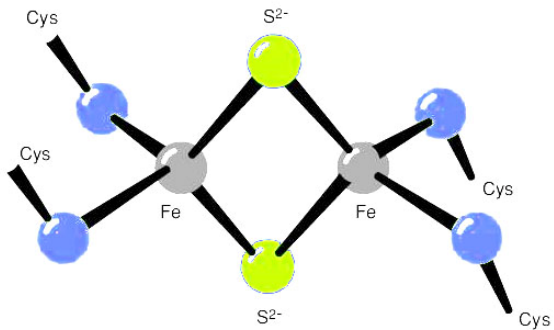
Fe³⁺ très peu soluble (peu disponible)
Cu²⁺ soluble (biodisponible)

La vie s'est construite sur les enzymes à fer puis a évolué vers i) les enzymes à cuivre et ii) des systèmes de capture de Fer et de protection contre les dégâts oxydatifs.

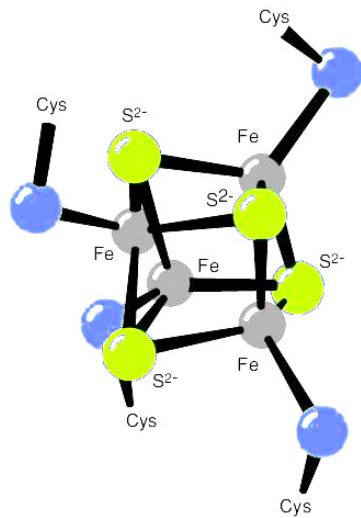
Propriétés chimiques du fer (II et III)

- $E^\circ(\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}) = 0.77 \text{ V}$. Situé dans le domaine de stabilité de l'eau donc les propriétés rédox peuvent être exploitées par les enzymes. Rem: Fe^{2+} s'oxyde en Fe^{3+} en présence de O_2 . ($E^\circ(\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^0) = -0.44 \text{ V}$)
- Propriétés électroniques:
 - $\text{Fe}^{2+} d^6$: haut spin paramagnétique / bas spin diamagnétique; bandes de transfert de charge en UV-Visible.
 - $\text{Fe}^{3+} d^5$: haut spin / bas spin \rightarrow 1 ou 5 électrons célibataires, détectable en RPE, bandes de transfert de charge en UV-Visible.

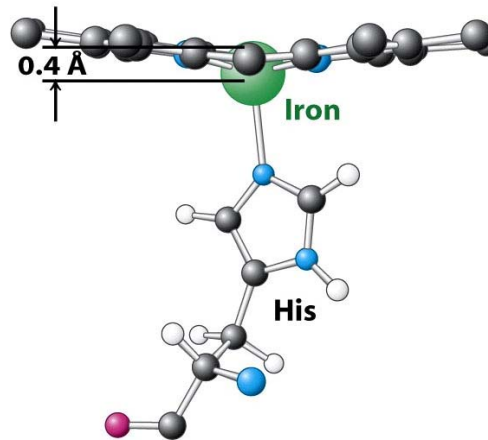
Géométries du fer



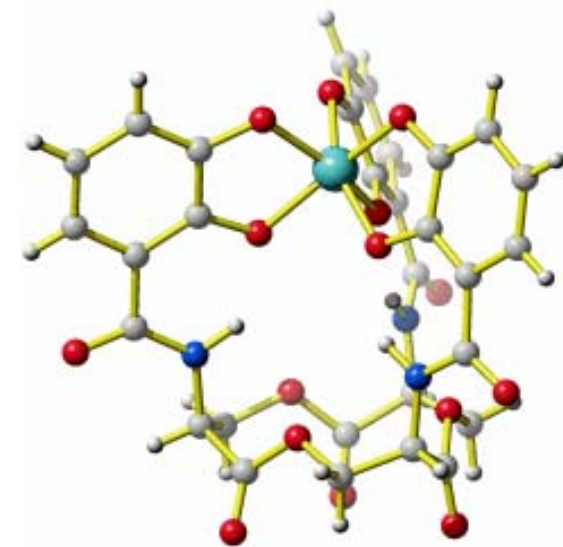
[2Fe-2S]



Tétraèdre: Centre FeS



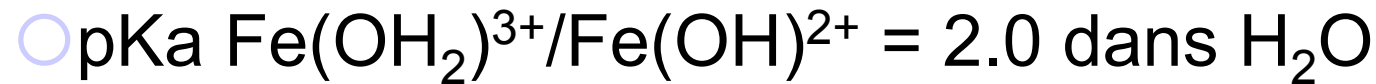
Pyramide base carrée:
hème (hémoglobine)



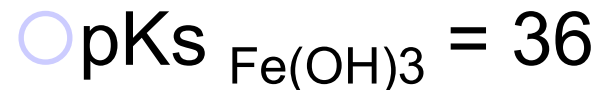
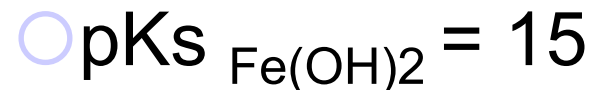
Octaèdre: Fer complexé à un
sidérophore (entérobactine)

Propriétés chimiques du fer (II et III)

- Acidité de Lewis :



- Solubilité:



Forte charge de Fe^{3+} (+ petit diamètre, ion dur):

→ Fort acide de Lewis (plus fort que Cu^{2+} ou Zn^{2+})
et très faible solubilité.



Rôles physiologiques

- Transfert d'électron (centre fer soufre)
- Catalyse (synthèse de l'ADN, détoxification, métabolisme, oxydation d'alcane ...)
- Rôle structural
- Transport de O₂

Surcharge comme déficit sont létaux:
Systèmes de capture (Fe³⁺ très peu soluble),
transport, stockage et régulation très sophistiqués



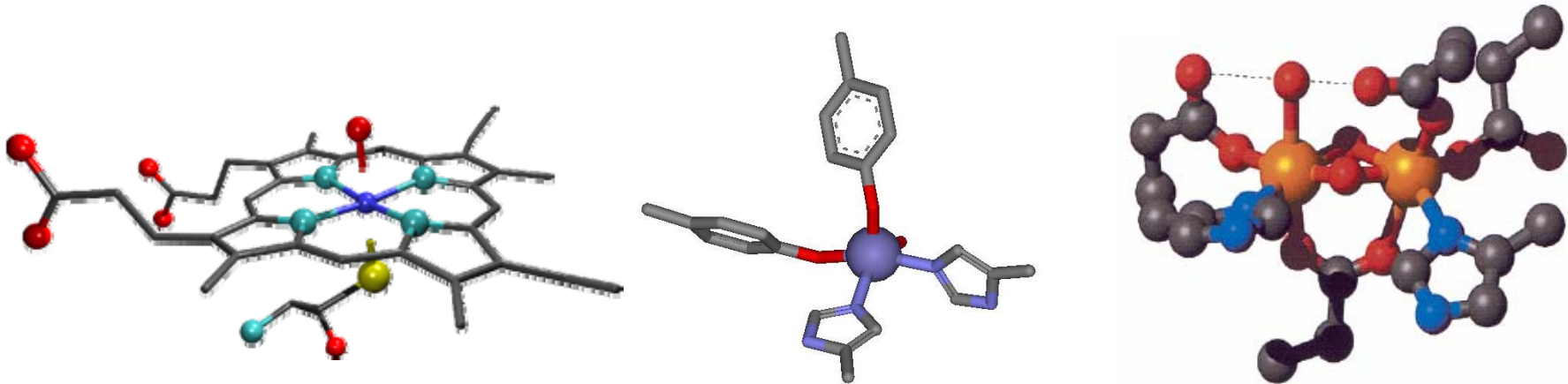
Rôles physiologiques

- Transfert d'électron (centre fer soufre)
- Catalyse (synthèse de l'ADN, détoxification, métabolisme, oxydation d'alcane...)
- Rôle structural
- Transport de O₂

Surcharge comme déficit sont létaux:
Systèmes de capture (Fe³⁺ très peu soluble),
transport, stockage et régulation très sophistiqués

Types de centres catalytiques à fer

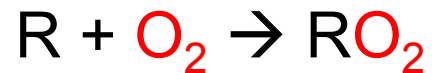
- Hèmes (similaire à l'hémoglobine)
- Fer non héminique (mono- et di-fer)



La géométrie, l'environnement et le degré d'oxydation du métal vont dicter sa réactivité

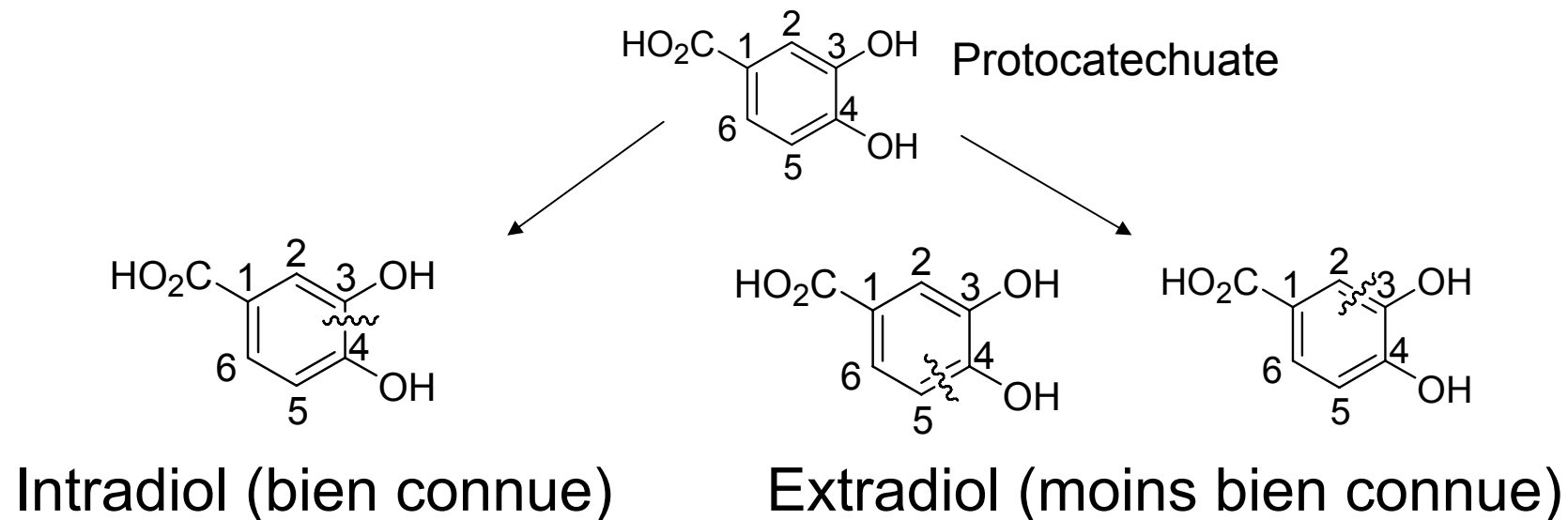
II. Enzymes à monofer non-héminique: Protocatechuate dioxygénases

- Activité dioxygénase :



- 2 classes selon l'état d'oxydation du fer:

- Fe(III) dans les intradiol dioxygénases et lipoxygénases
- Fe(II) dans les extradiol dioxygénases (et toutes les autres enzymes à fer non-héminique mononucléaires).



II.1 Intradiol: Protocatechuate 3,4-dioxygenase (ac 3,4-PCD Adp1)

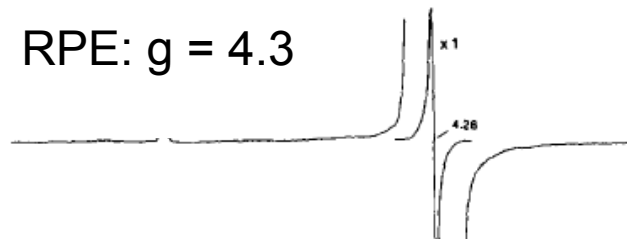
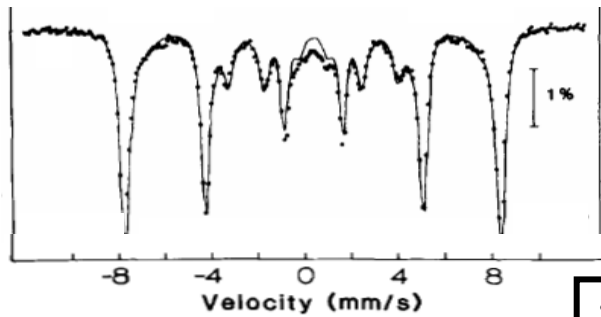


Protocatechuate 3,4-dioxygenase

- Rôle critique dans l'assimilation de carbones aromatiques par les bactéries
- Dodécamère composé de d'hétérodimères $\alpha\beta$, PM 587 kDa.
- Chaque hétérodimère comporte 1 fer

Etat d'oxydation du fer (*brevibacterium fuscum*): Resting state

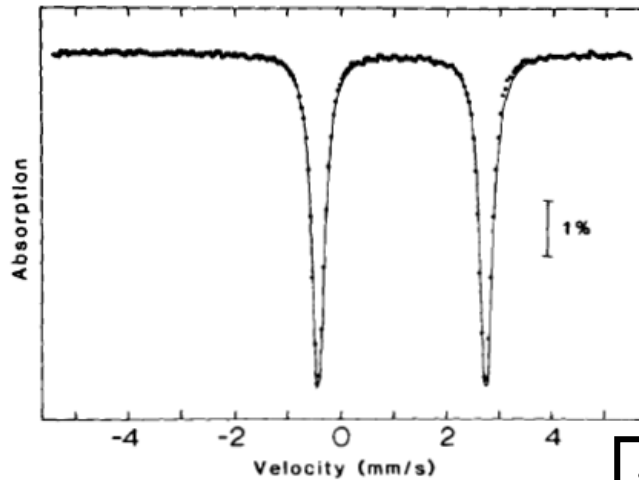
Forme active (resting state)



$\delta = 0.43 \text{ mm/s}, \Delta E_q = 0.40 \text{ mm/s}$

Fe^{III} haut spin

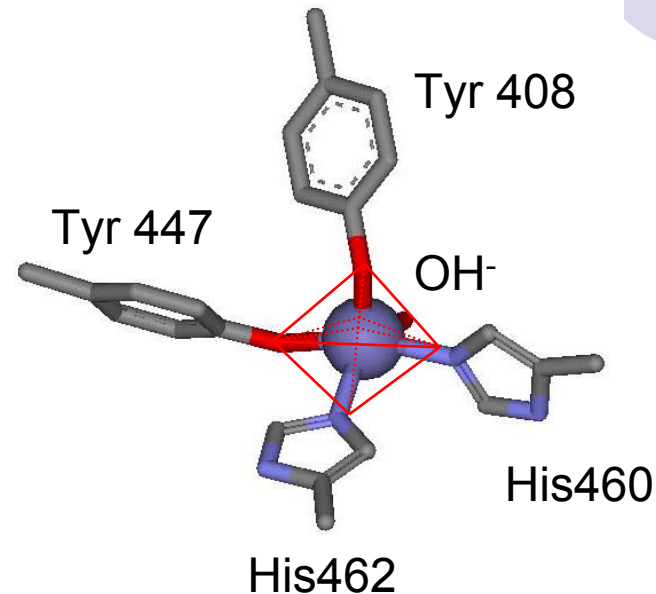
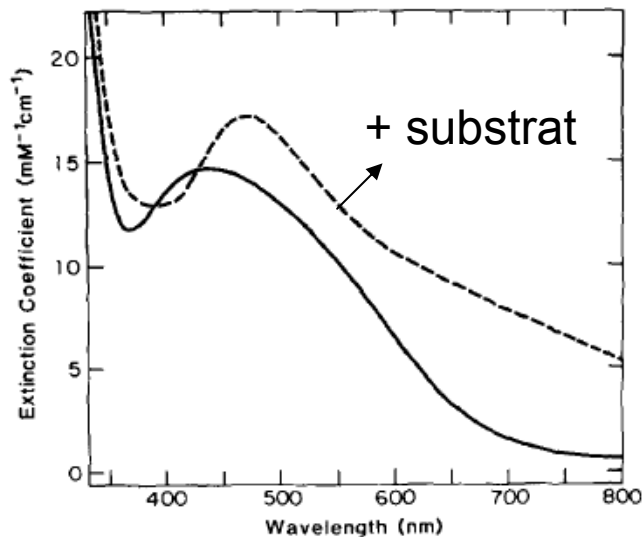
+ DTT (forme inactive)



$\delta = 1.21 \text{ mm/s}, \Delta E_q = 3.19 \text{ mm/s}$

Fe^{II} haut spin

Site métallique (ac 3,4-PCD Adp1)



- Fe(III) bipyramide trigonale
- OH⁻ ou OH₂ ? Fe-O: 1.93 Å
- Tyrosine / tyrosinate?
 - Transferts de charge vers les 450 nm
 - Fe-OTyr408: 1.88 Å, Fe-OTyr447: 2.05 Å

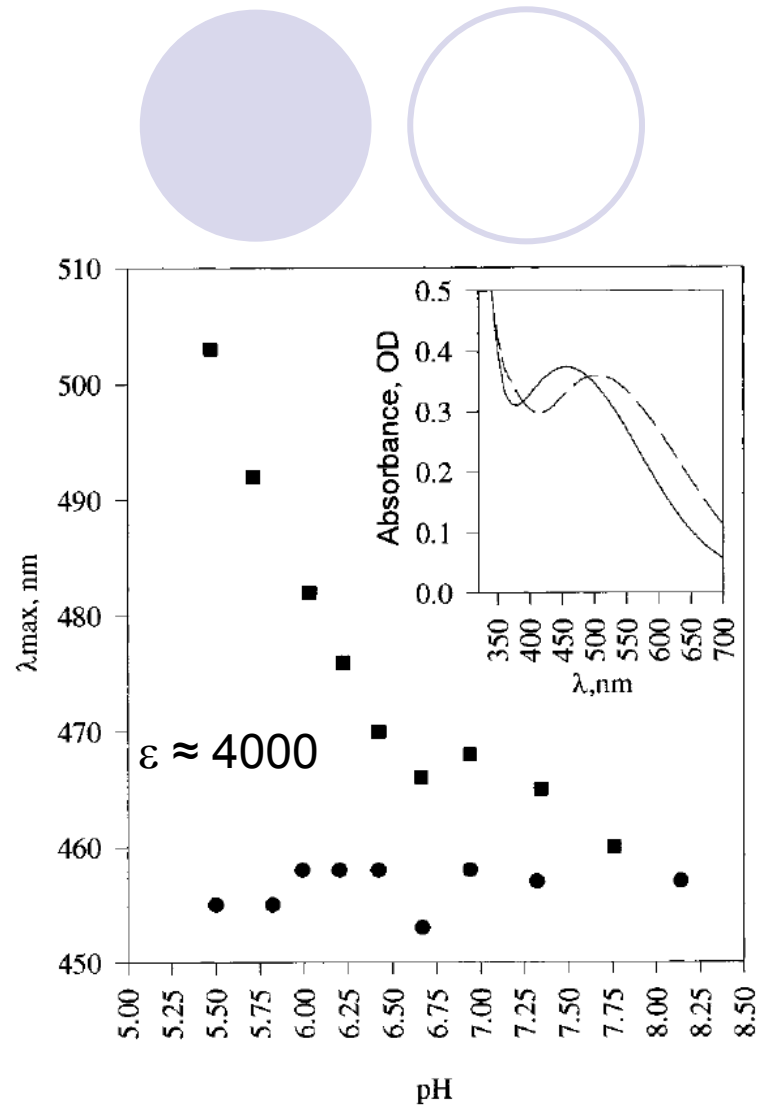
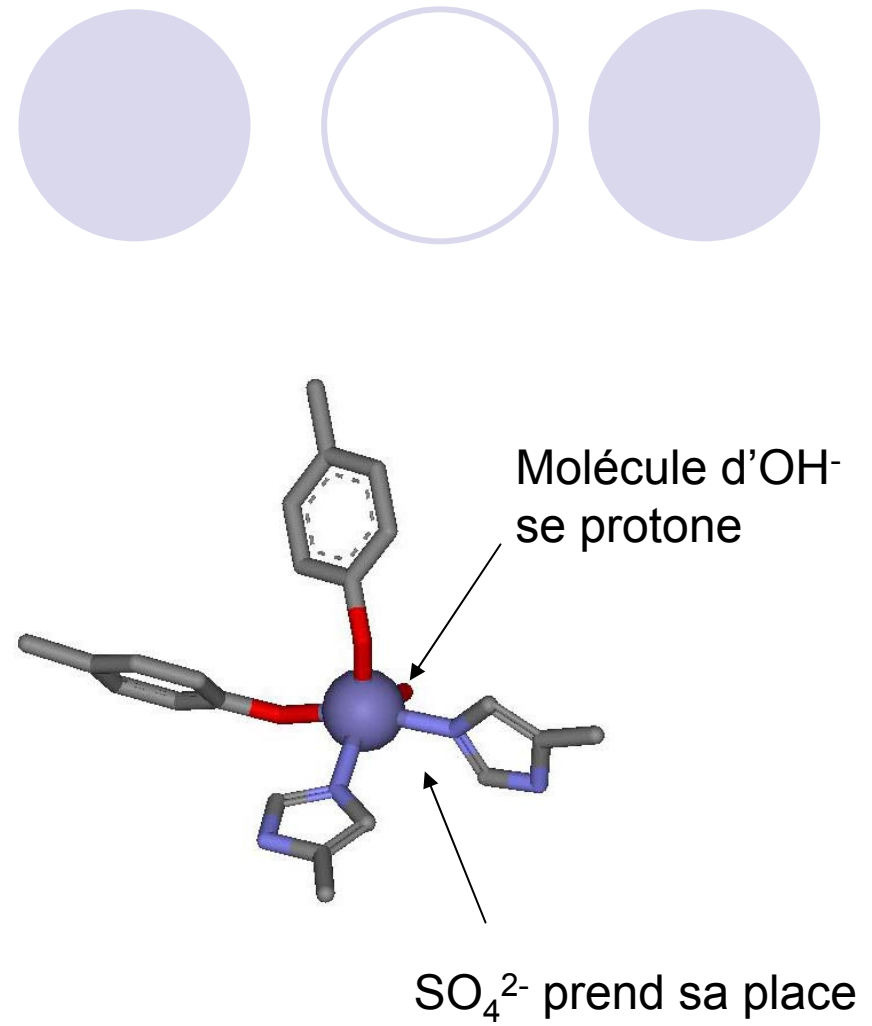
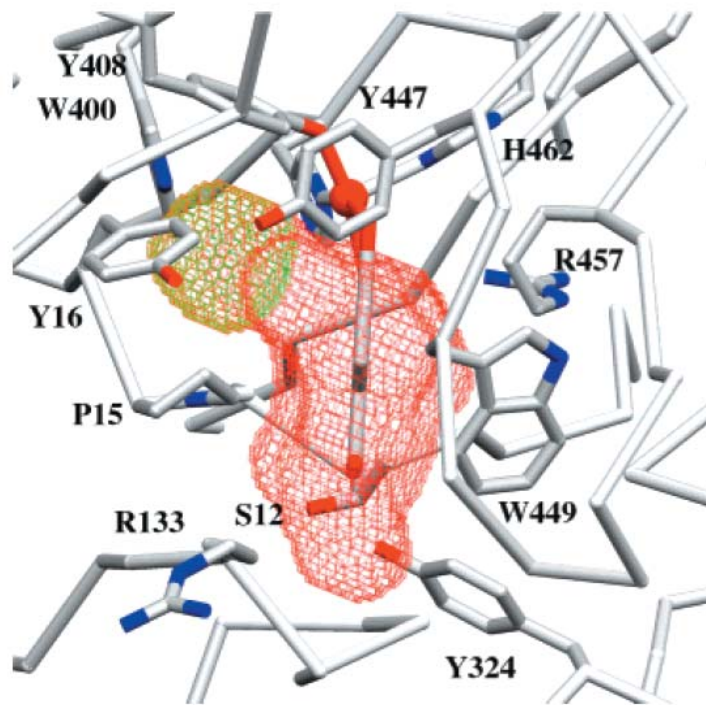


FIGURE 4: Shift in λ_{max} as a function of pH for Ac 3,4-PCD with (squares) and without 1.5 M ammonium sulfate (circles). (Inset) Spectrum of Ac 3,4-PCD at pH 7.0 with (dashed) and without 1.5 M ammonium sulfate (solid).



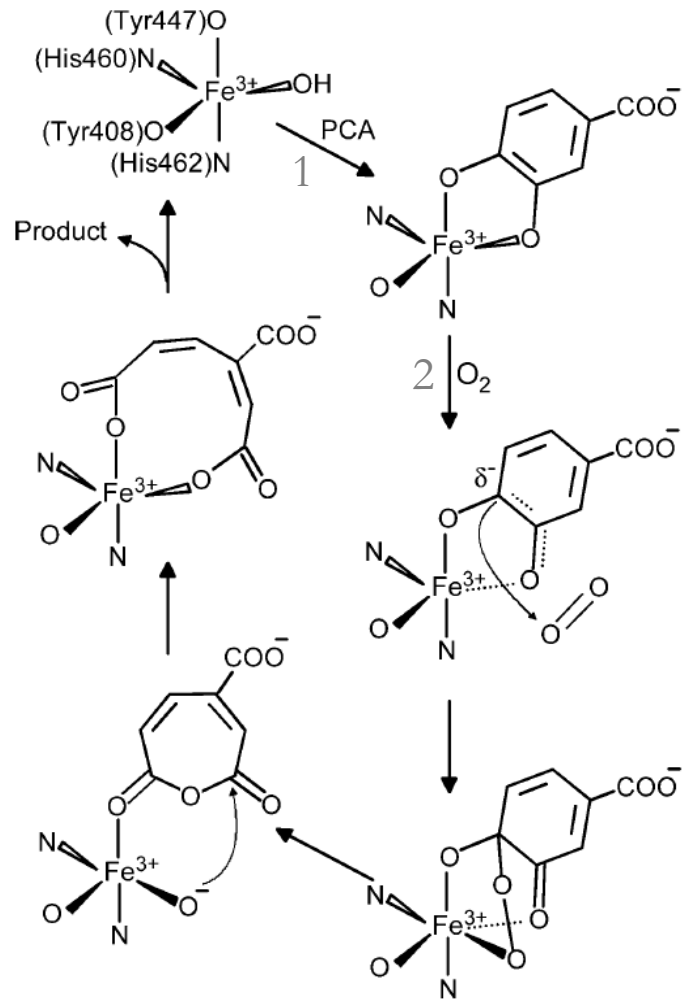
Même à pH 5 les tyrosines sont déprotonées

Environnement du site actif



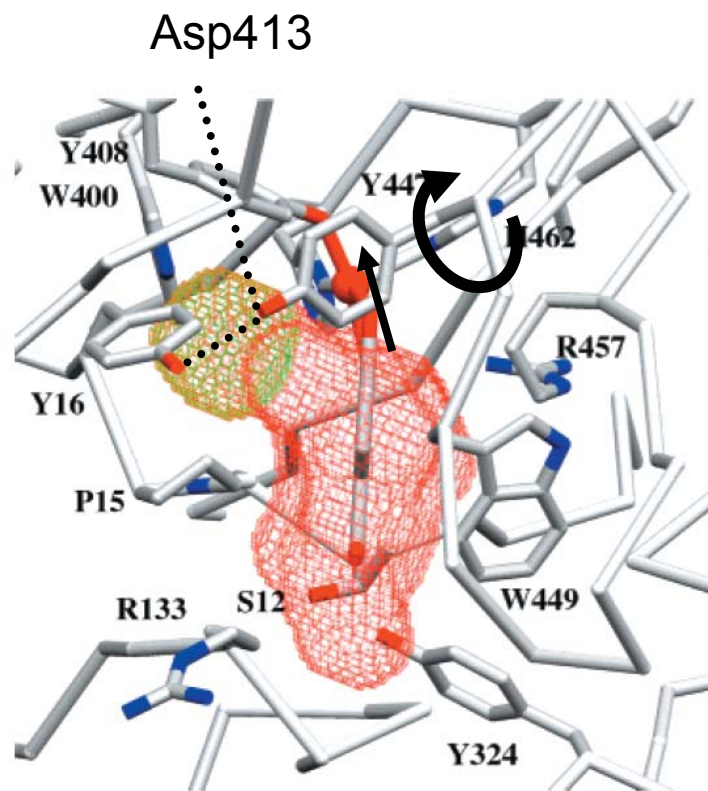
- Canal de 8 à 26 Å de côté pour accéder au site actif
- Arg, Lys conservées (Pp, Adp1...) au voisinage du site actif: approche
- Poche hydrophobe et plane pour le substrat

Cycle catalytique de la Protocatechuate 3,4-dioxygénase



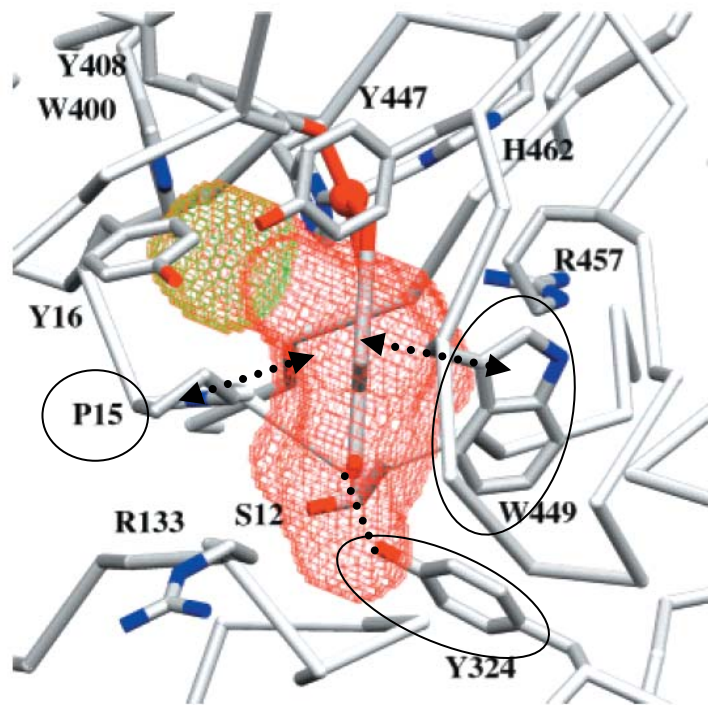
1. Substrat - rentre dans le canal +. Se place dans la poche hydrophobe
2. Fe^{III}: acide de Lewis; OH⁻ et Tyr447 jouent le rôle de bases; Déplacement de Tyr447 et H₂O: Fixation bidente du substrat

Déplacement de Y447



- Protonation = Rotation de Y447
- Formation de liaisons H qui la stabilise dans cette conformation
- Mutants Y447H: Activité catalytique fortement réduite (fixe substrat 100-1000 fois moins vite et relargue le produit de réaction 100-1000 fois moins vite !!!)

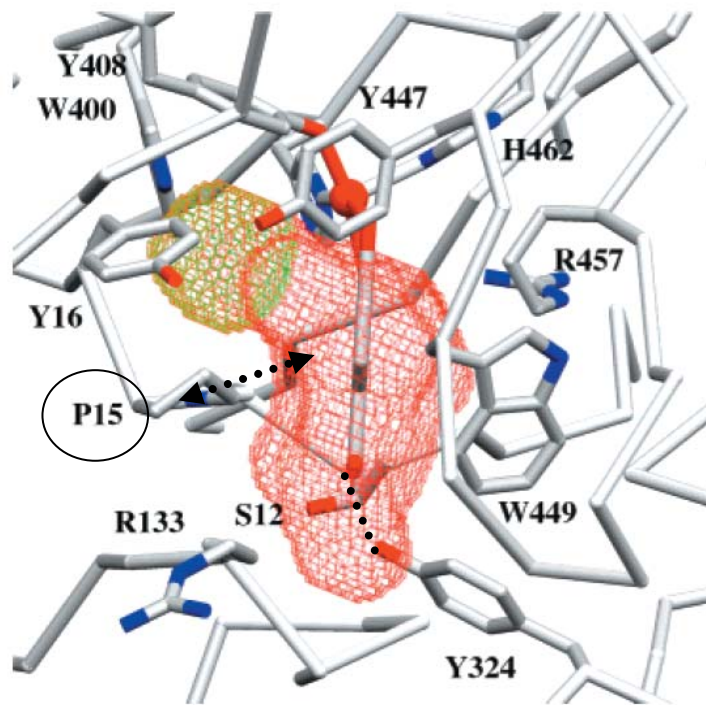
Positionnement du substrat



- P15, W449: interaction hydrophobe avec substrat
- Y324: liaison H avec le carboxylate du substrat

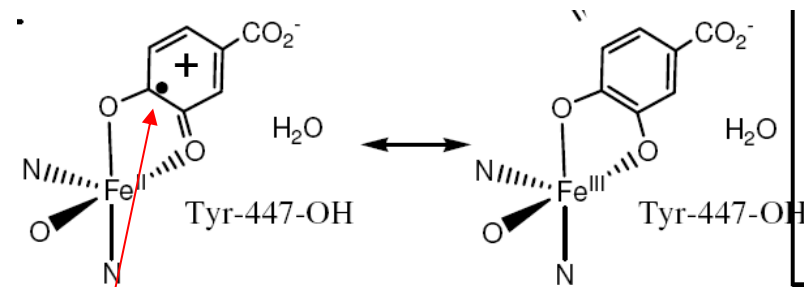
Substrat occupe quasi toute la poche

Initiation de la catalyse



Substrat occupe quasi toute la poche

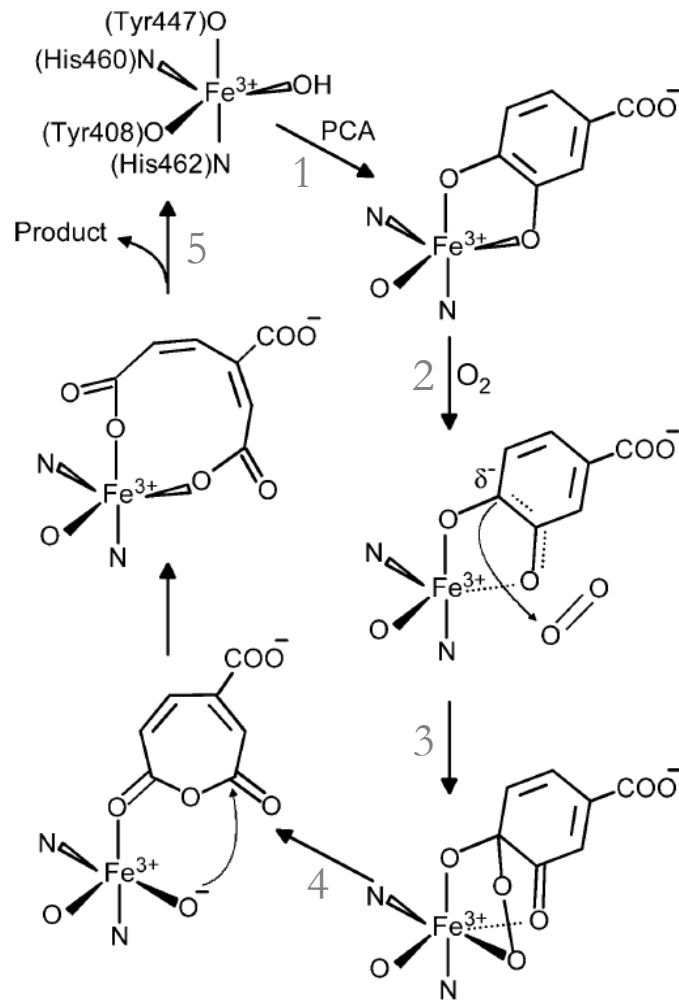
- Arg457: Charge positive qui va stabiliser la forme anionique du substrat (mutants R457S non viables)
- En vert site de fixation de O₂



Existence de formes mésomères

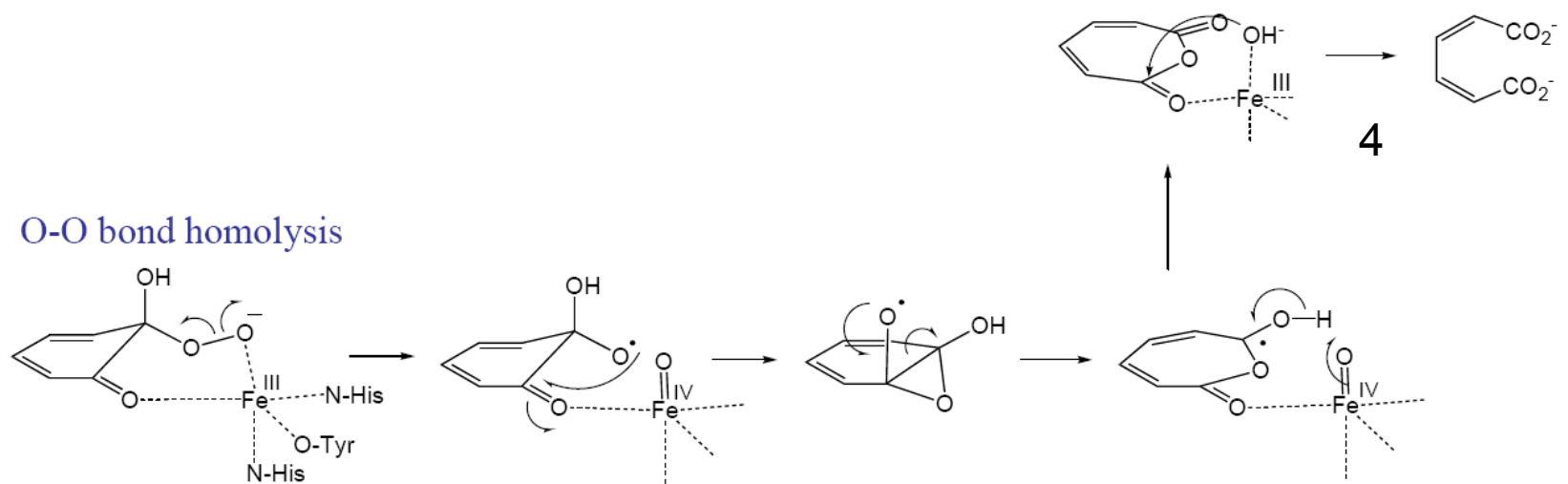
Réactivité avec O₂ !!

Cycle catalytique de la Protocatechuate 3,4-dioxygénase



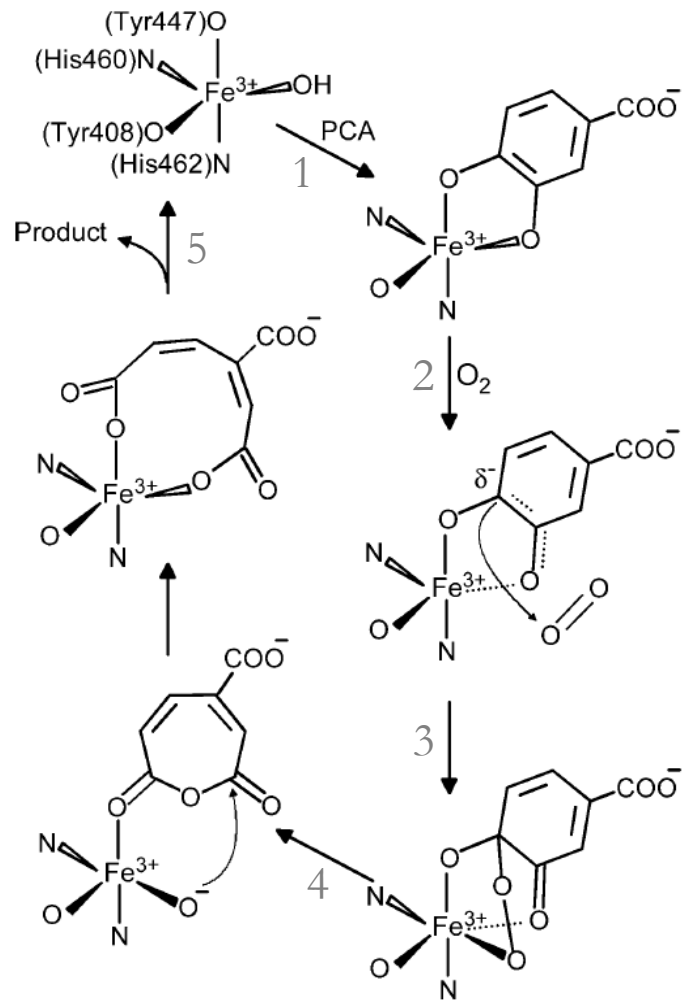
3. Faible distance $\text{Fe}^{3+}\text{-O}$, environnement non symétrique, \neq octaèdre
Arg457: Charge positive qui va stabiliser la forme anionique du substrat
→ Attaque électrophile directe de O_2 sur substrat

Attaque électrophile passerait par un intermédiaire $\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$ puis réarrangement



Mécanisme proposé mais non démontré directement

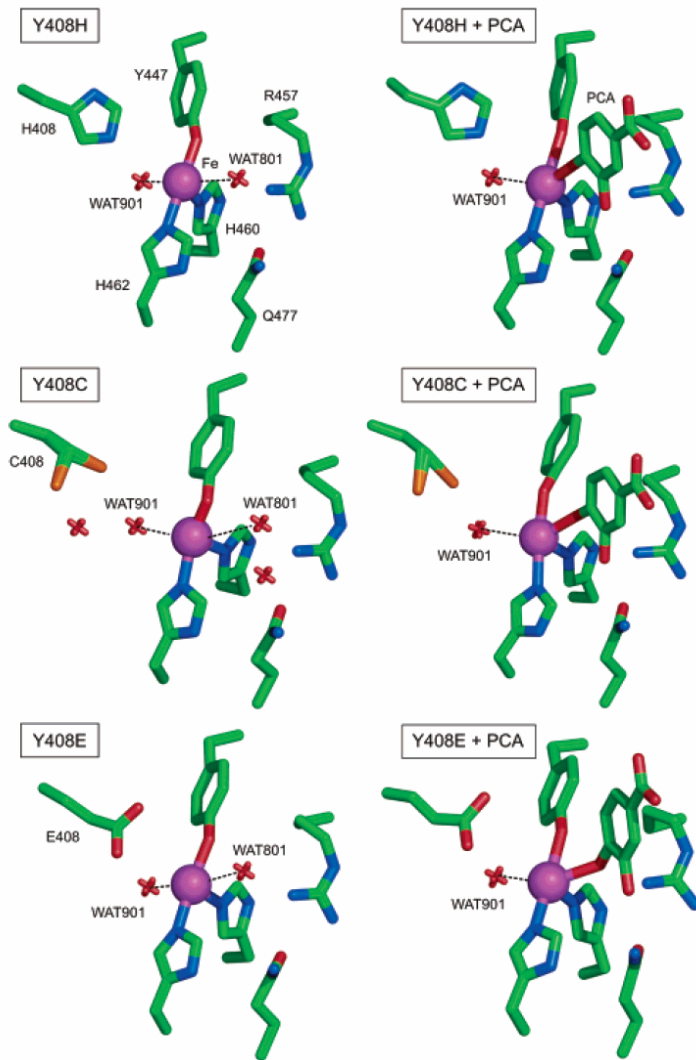
Cycle catalytique de la Protocatechuate 3,4-dioxygénase



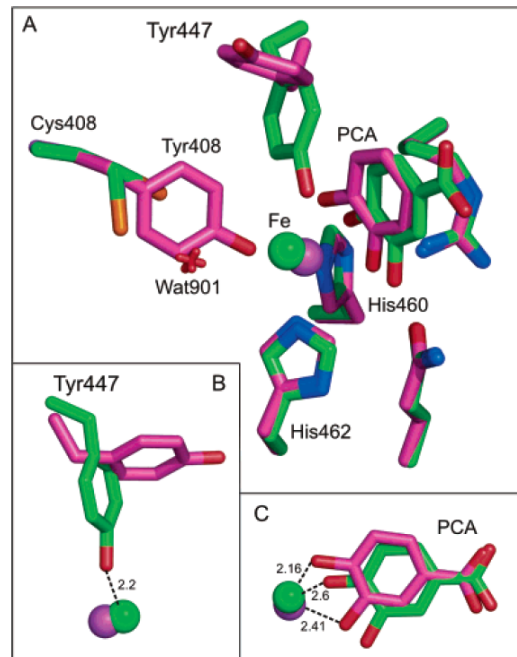
5. Etape limitante:
relarguage du produit

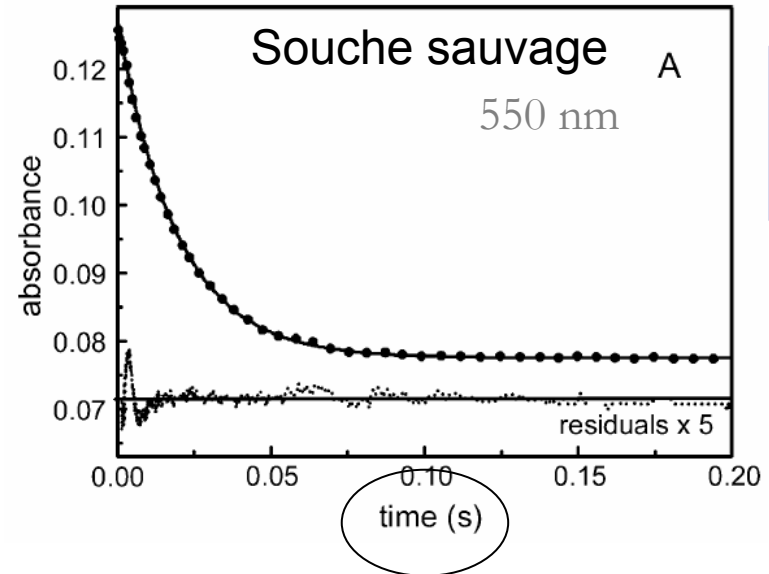
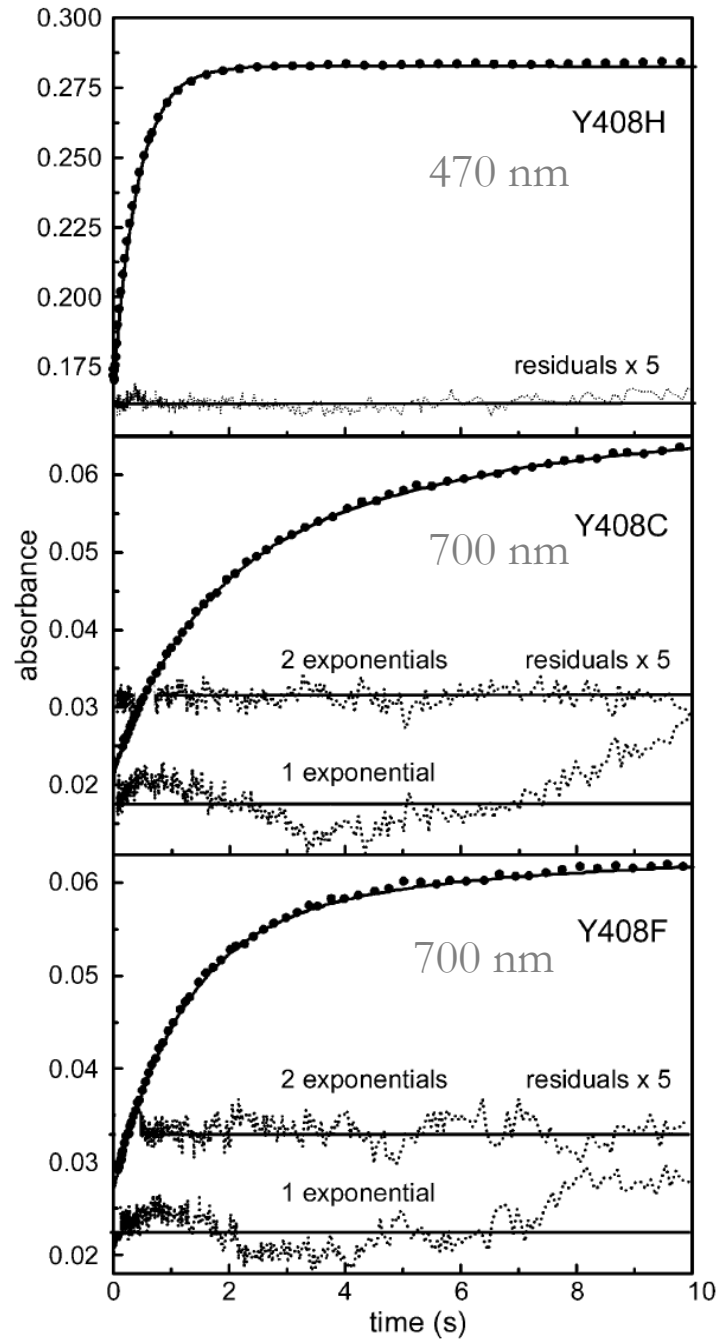
His460,462 et Tyr408
restent fixés mais pas
Tyr447: Cinétique
d'échange très rapides
sur cette Tyr

Mutagénèse dirigée sur Y408 (His, Glu, Phe, Cys)

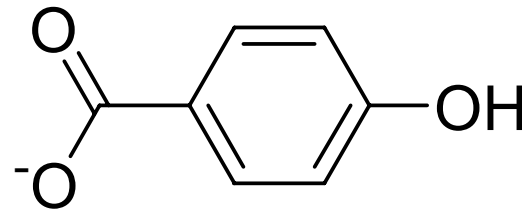


- Résidu 408 plus fixé au métal: Molécule d'eau prend la place de la tyrosine
- Tyr447 ne se dissocie plus, donc plus de base pour déprotoner le second hydroxyle du substrat.

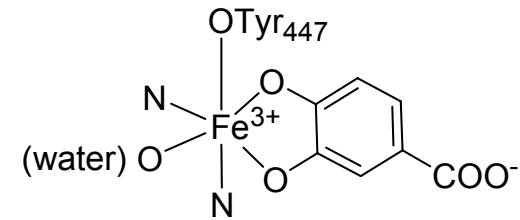
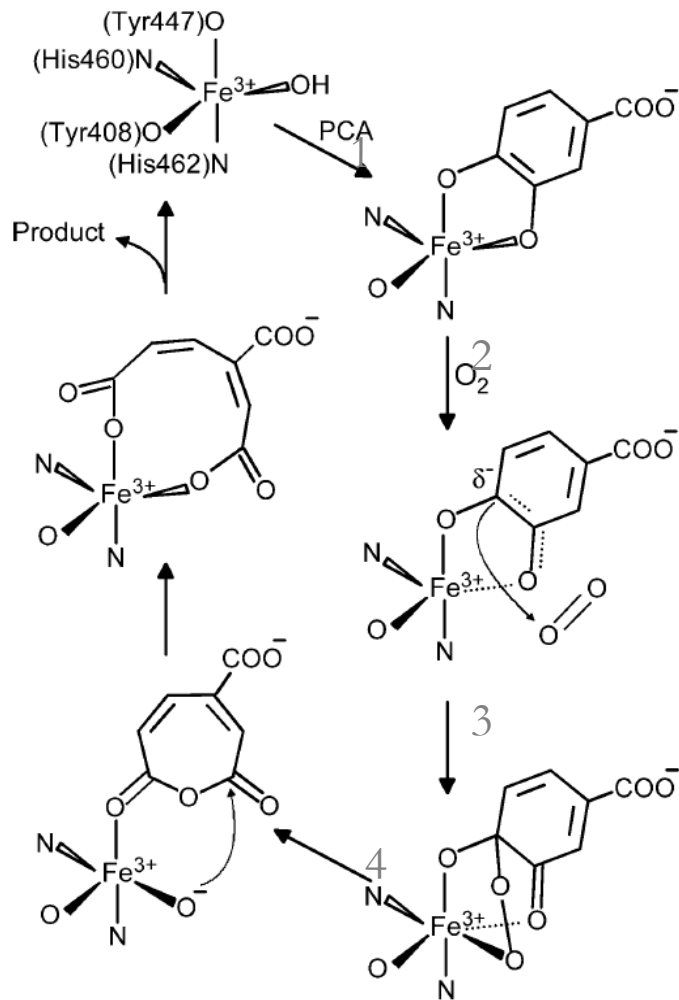




- Fixation du 4-hydroxybenzoate
Beaucoup plus lente dans les mutants

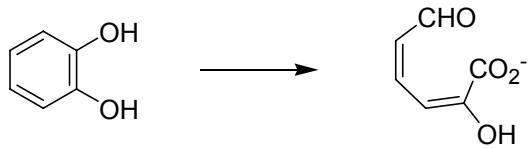


Mutagénèse dirigée sur Y408 (His, Glu, Phe, Cys)

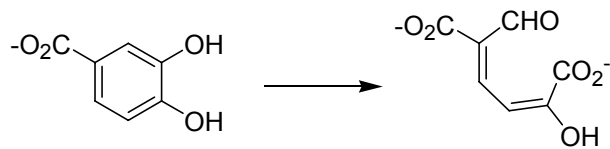


- Nombre de cycles x 0.0001
- Etape limitante: Réactivité avec O₂
- De plus Tyr408 par effet trans, acidité de Lewis ... contribuait à la labilité des liaisons Fe³⁺-O⁻

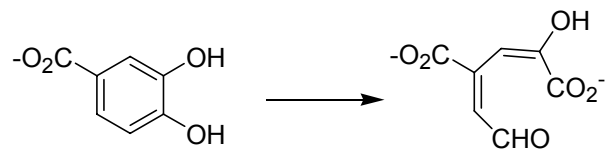
II.2 Extradiol dioxygenases



Catéchol 2,3-dioxygénase



Homoprotocatechuate 2,3-dioxygénase



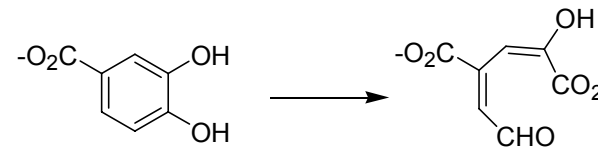
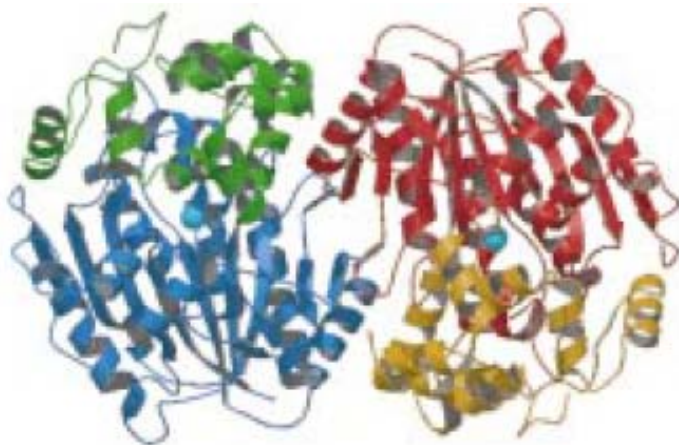
Protocatechuate 4,5-dioxygénase

→ **Structure RX**

Sera plus détaillé, mais
mode d'action similaire pour
les autres

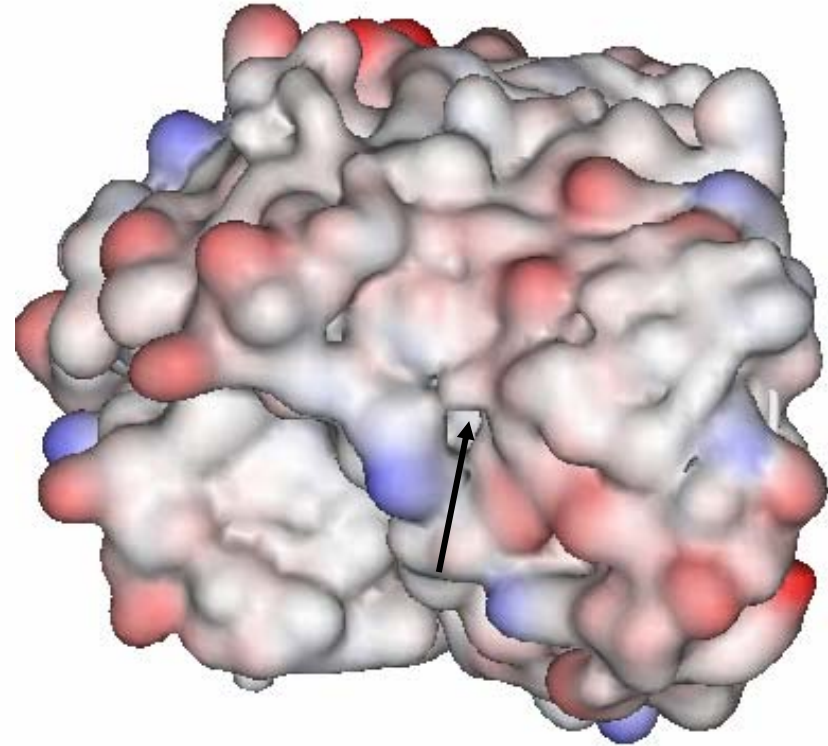
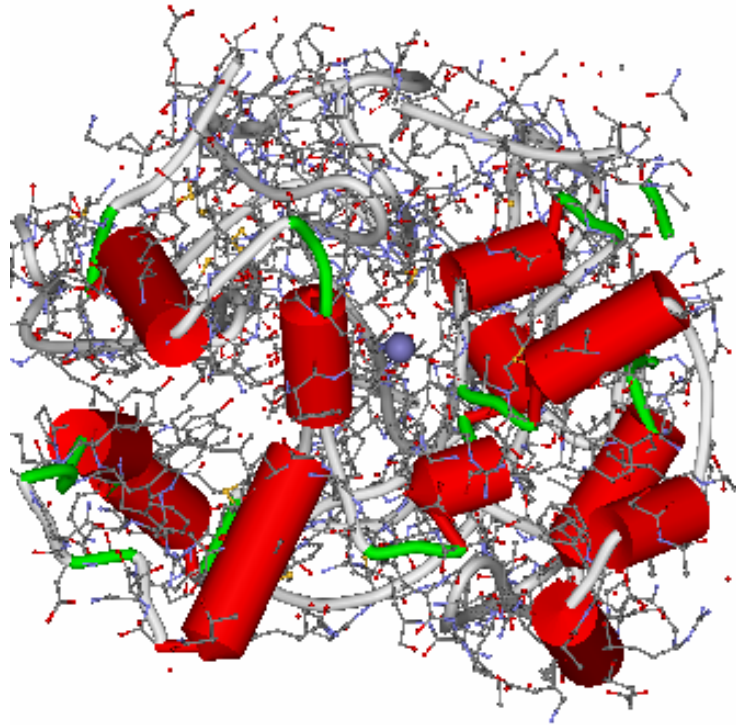
Protocatechuate 4,5-dioxygenase (LigA)

- Structure $\alpha_2\beta_2$
- α = 139 amino-acides, β = 302 amino-acides
- Sous unités α - β fortement liées entre elles
- Site actif à fer lié à sous-unité β .



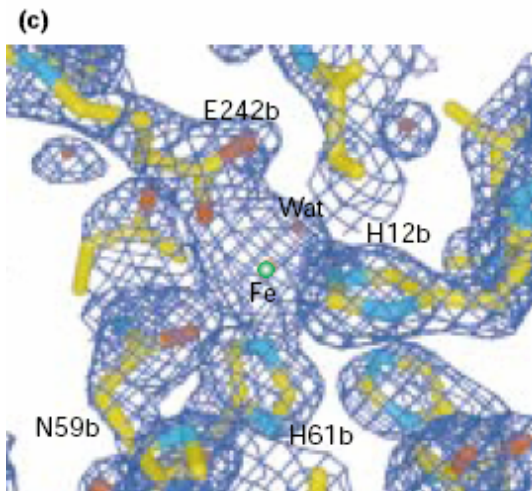
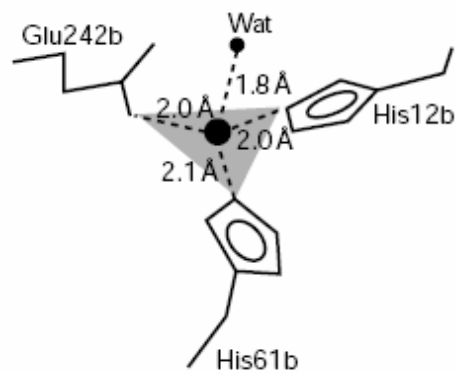
Protocatechuate 4,5-dioxygenase

Site actif (LigA)



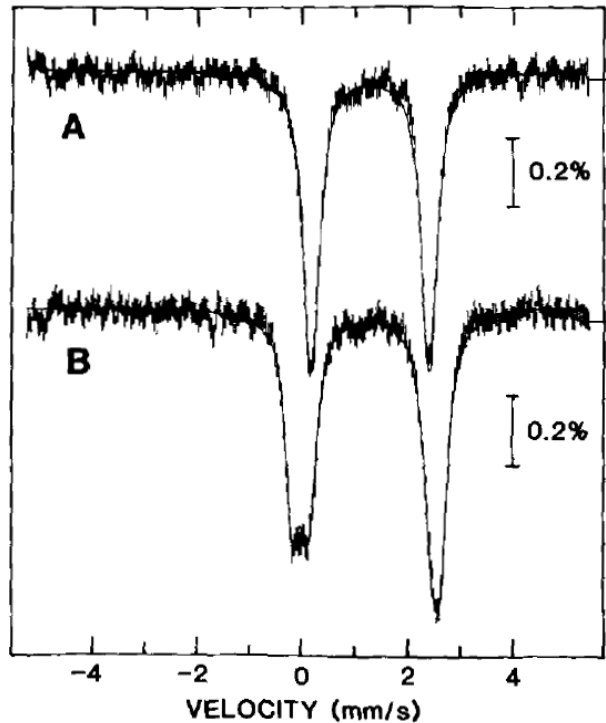
- Site actif enfoui de 15 Å dans la protéine.
- Des hélices vont fermer l'entrée du site actif.

Coordination du fer



- Fer en géom pyramide trigonale – tétraèdre
- Fer 0.5 Å au dessus du plan formé par les aa
- Sphère de coordination 2 His + 1 Glu conservée pour dioxygénases de même classe
- Glu sur une hélice (rigide). 2 His sur un loop (flexible) → Changement de conformation probable lors de fixation substrat.

Etat d'oxydation du fer \neq intradiol



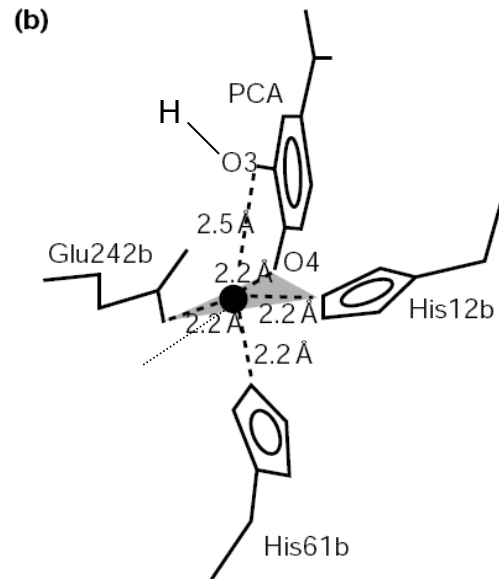
Absence de substrat
 $\delta (\Delta E_q) = 1.28 (2.22)$

Présence de substrat
 $\delta (\Delta E_q) = 1.27 (2.33), 1.22 (2.80)$

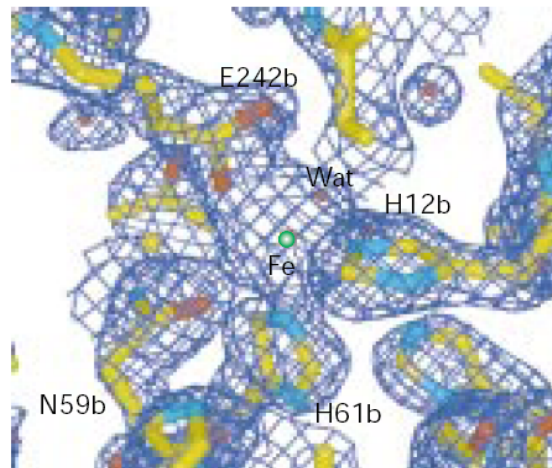
Fe^{II} haut spin

Enzyme sample	% of Total Fe ^a		Calculated Fe ^{2+c}	Quantitated Fe ^{2+d}	Activity
	Axial Fe ^{3+b}	Rhombic Fe ^{3+b}			
			% of max	% of max	% of max
Native	16	26	68	79	75
+ Ascorbate	0	15	100	100	100
+ PCA	0	45	65	61	75
+ Ascorbate + PCA	0	20	94	100	100
+ H ₂ O ₂	36	57	8	6	2
+ H ₂ O ₂ + ascorbate	0	40	70	52	50

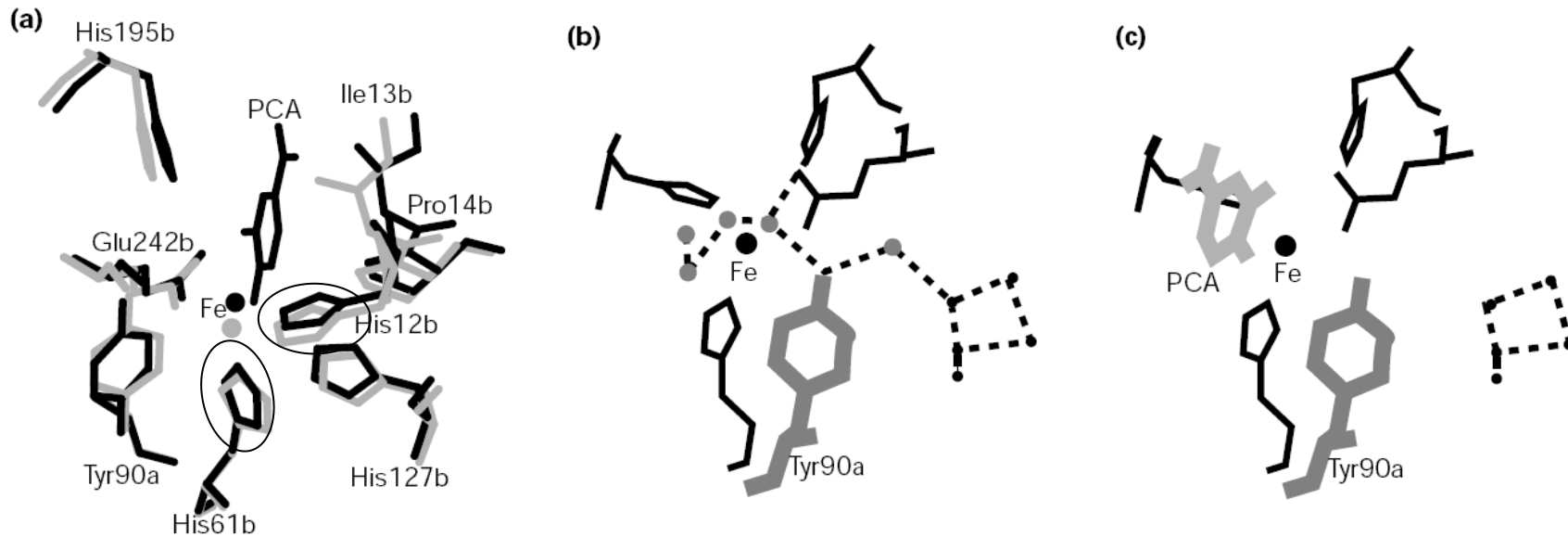
Coordination du fer en présence de substrat



- Fer en géom bipyramide tétragonale
- Plan: His12b, Glu242b, O4,x (O₂?)
- Axe: His61b, O3



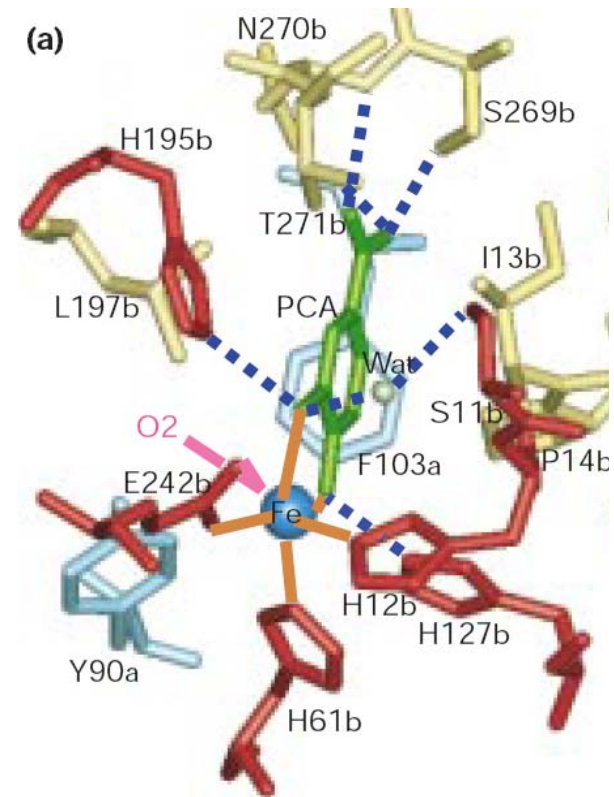
Mouvements induits lors de la fixation du substrat



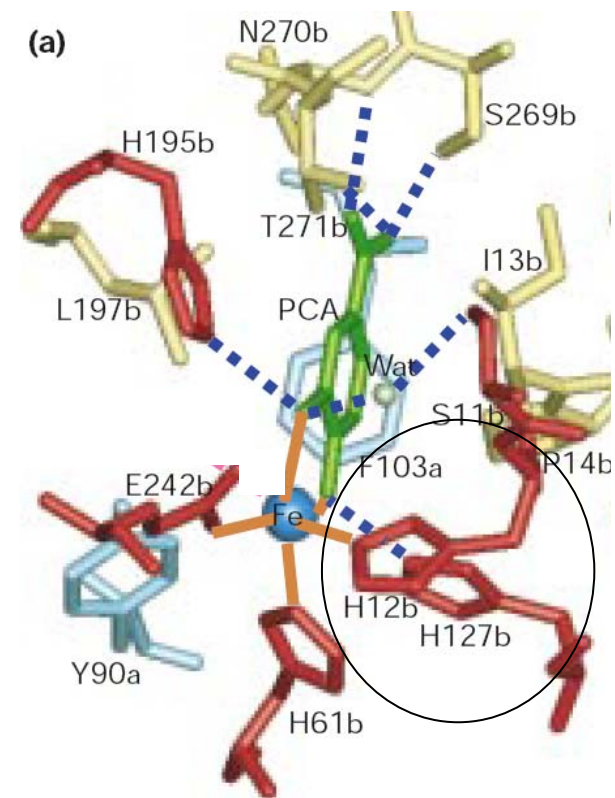
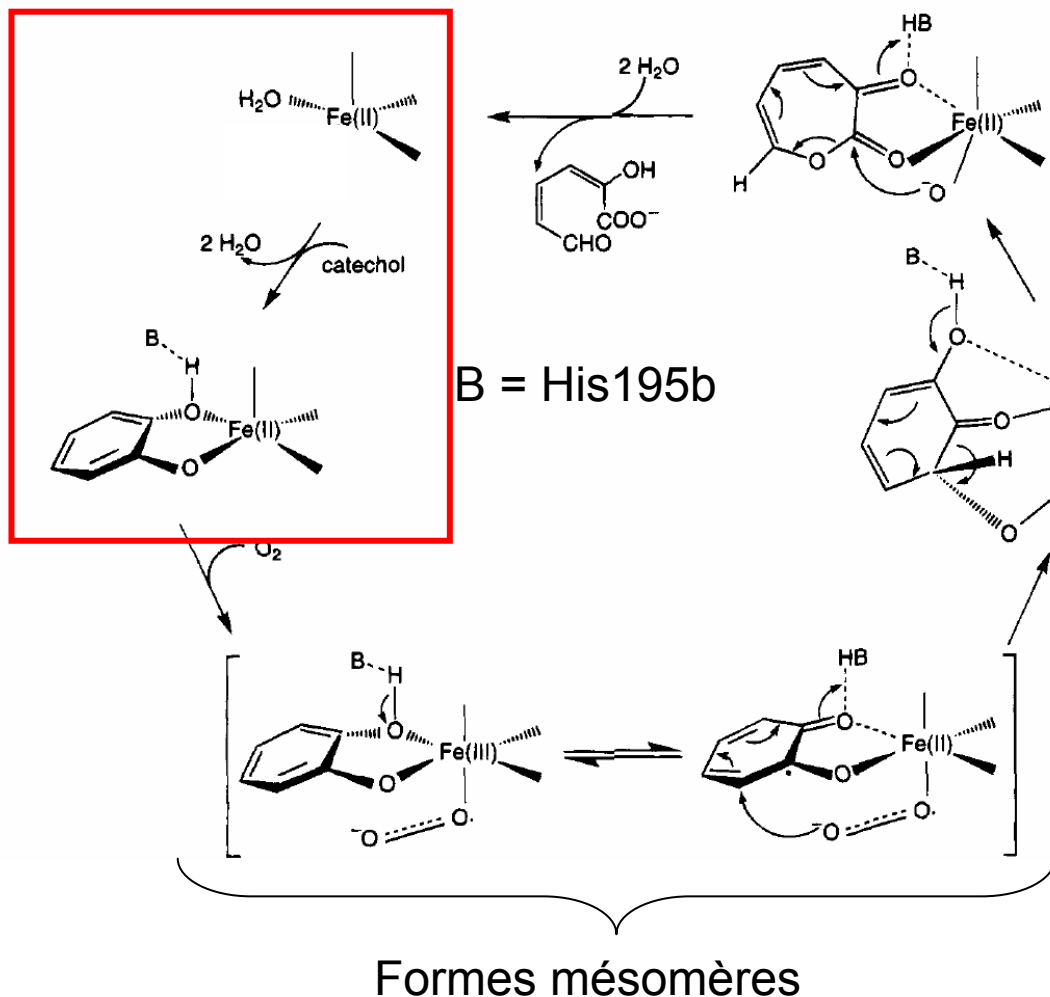
Molécules d'eau chassées par le substrat

Site actif en présence de substrat

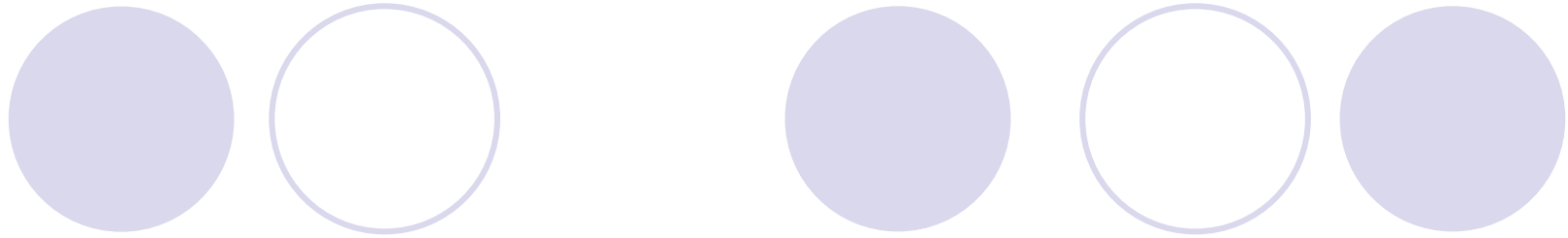
- Poche hydrophobe: Ile13b, Pro14b, Leu197b, Phe103a, His195b, Thr271b profonde de 5 Å
- Liaisons H: His195b, His127b...
- CO₂⁻ essentiel à l'activité catalytique: Liaisons H indispensables
- Y90a semble pouvoir tourner pour permettre la fixation de O₂



Mécanisme proposé (valable pour 4,5-PCA dioxygenase et 2,3-catéchol dioxygenase)



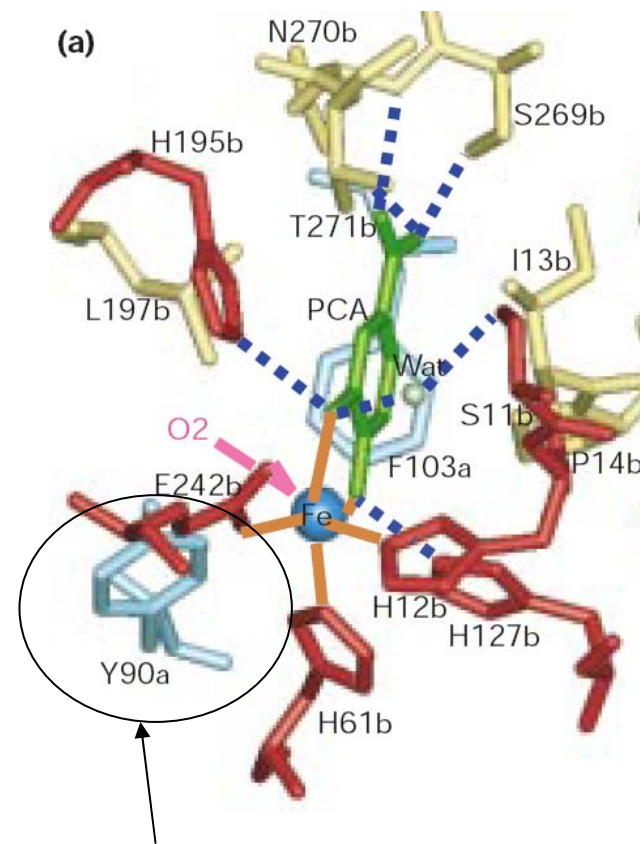
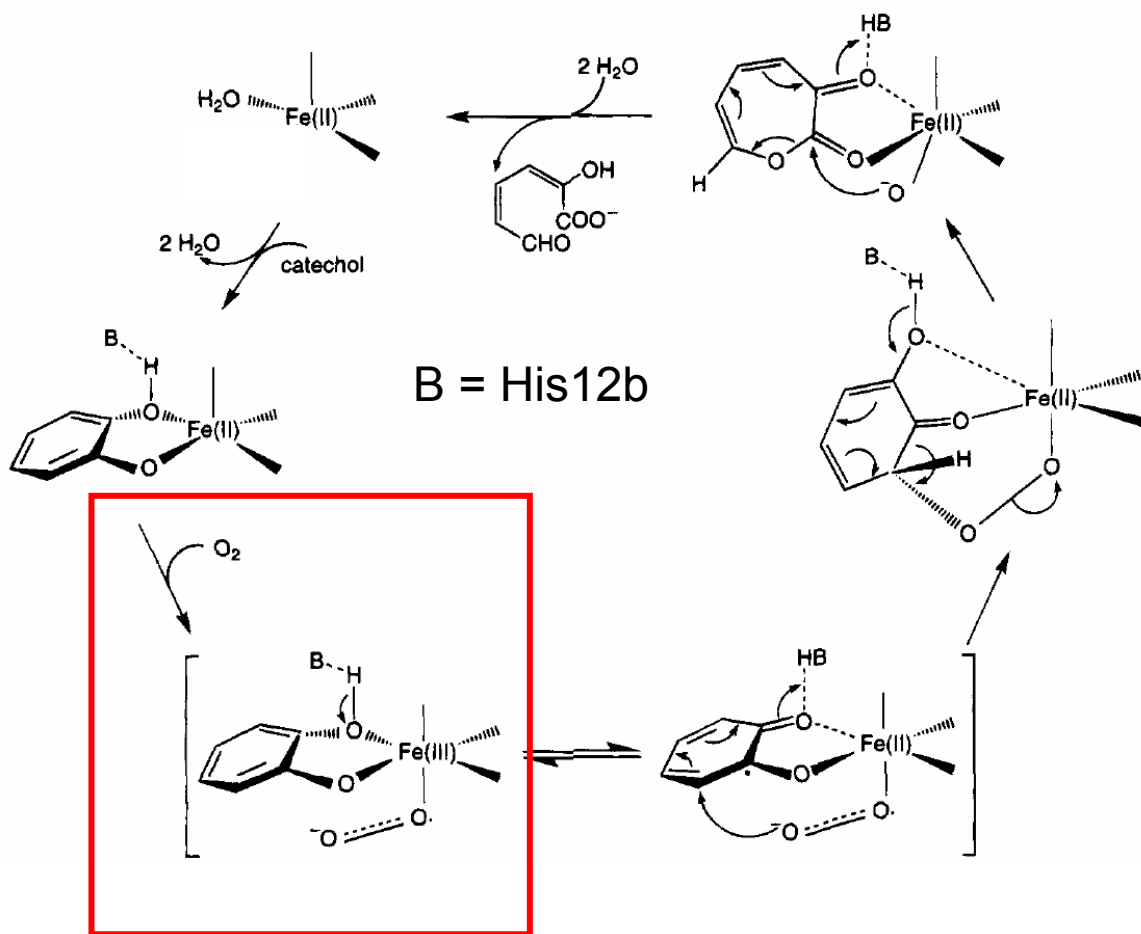
Acidité de Lewis de Fe(II) + liaison H avec His12b facilitent déprotonation



- Fixation de l'anion CatO^- :

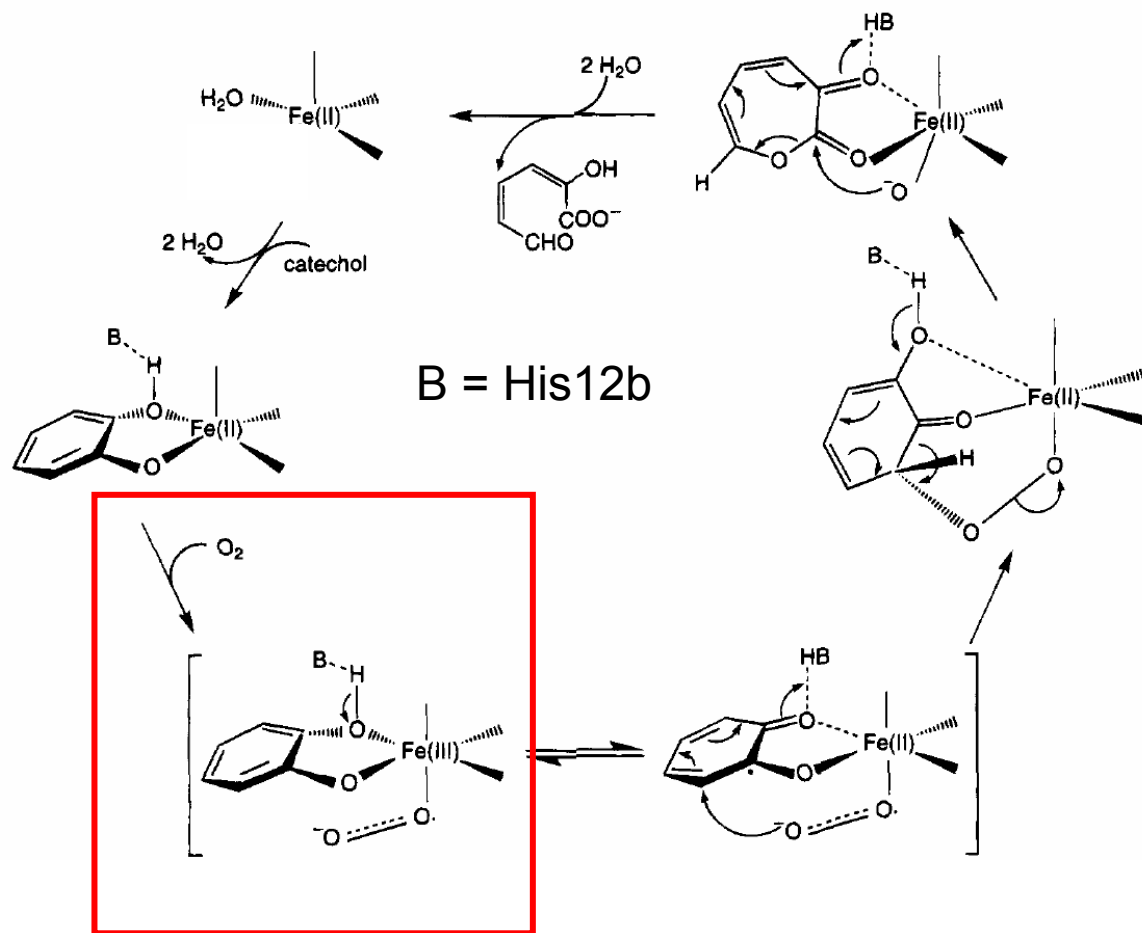
- Diminution de $E^\circ_{\text{FeIII/FeII}}$
- Augmentation d'affinité pour O_2 (ex: affinité mesurée pour NO est 1000X plus forte en présence de substrat)

Mécanisme proposé

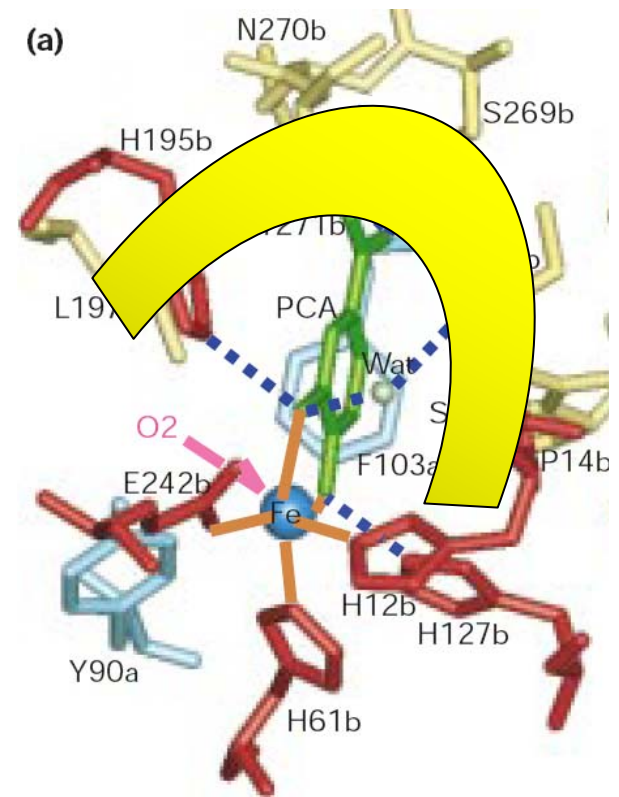


Mouvement permettant à O_2 de rentrer

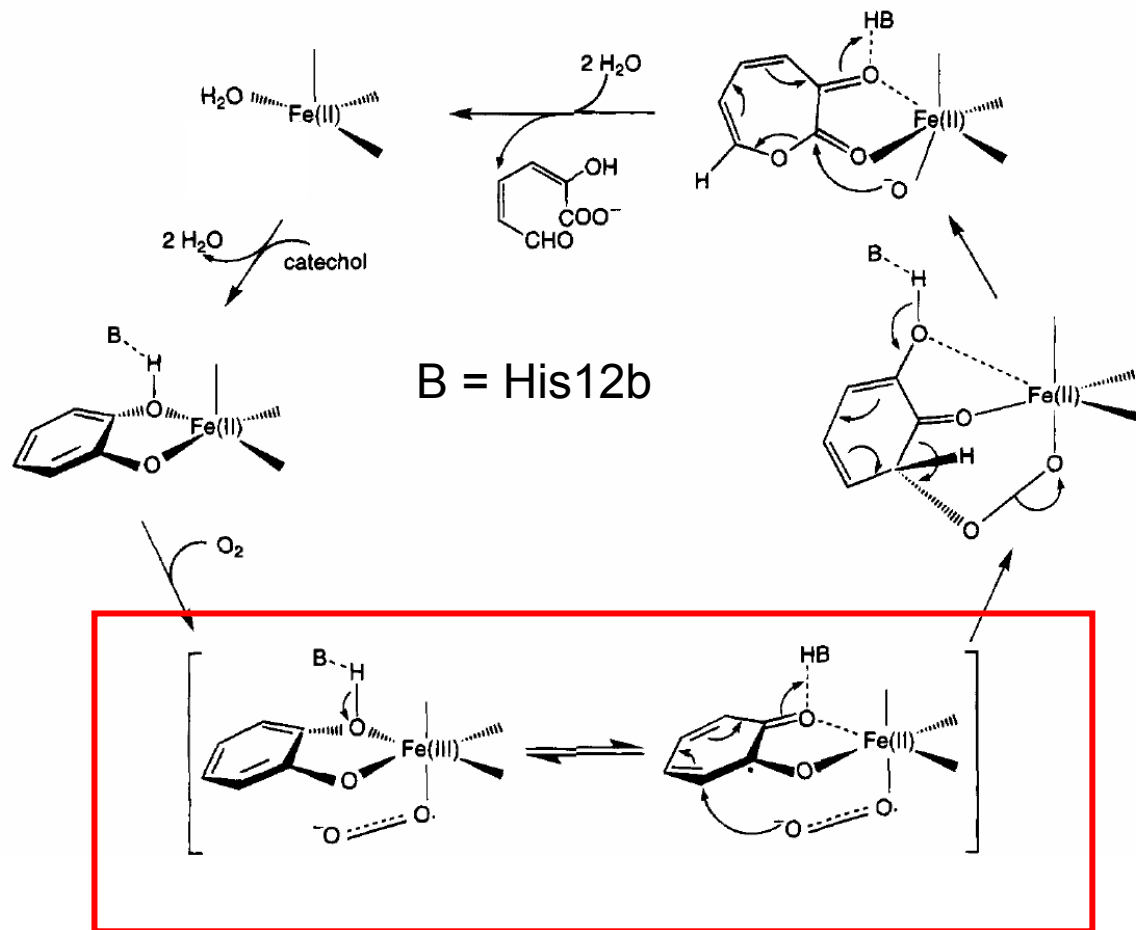
Mécanisme proposé



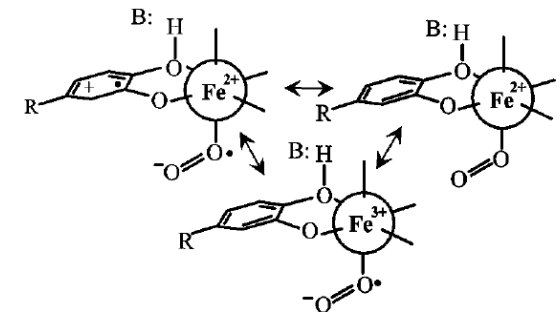
Aromatique protégé du solvan



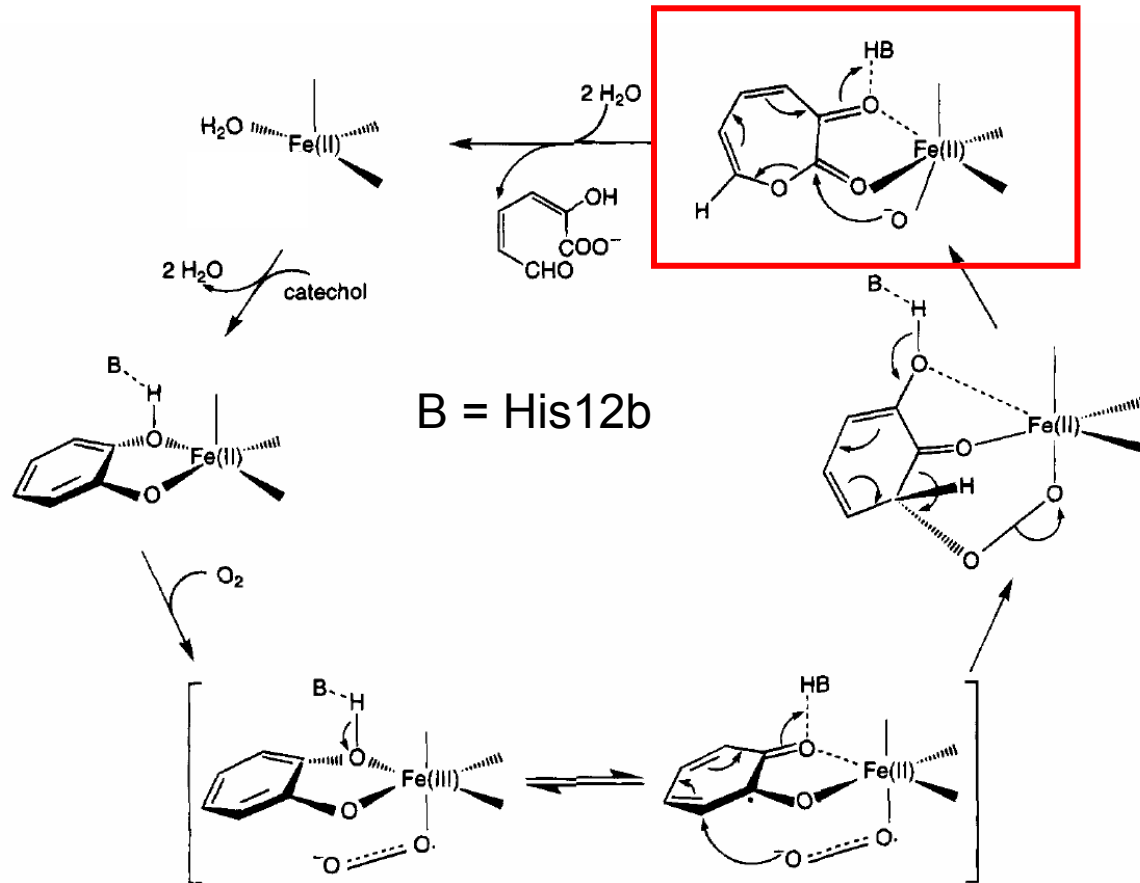
Mécanisme proposé



- Mouvement de densité électronique du catéchol vers le métal
- Attaque nucléophile du superoxyde sur le catéchol



Mécanisme proposé

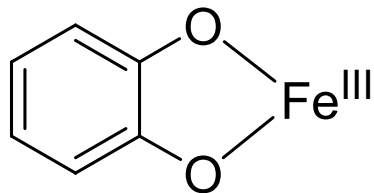


- Hydrolyse de la lactone catalysée par His12b

II.3 Différence entre intra (Fe(III)) et extra (Fe(II)) diol ?

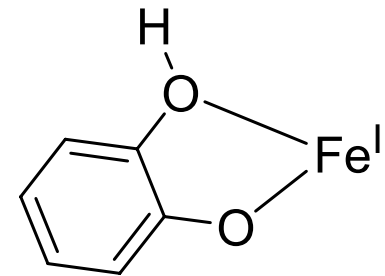
→ Mécanisme

Intradiol



- Affinité O_2 pour Fe^{III} faible
- Fe^{III} : Fort acide de Lewis → Déprotonation totale du substrat
- Cat^{2-} : plus riche en électrons
- Attaque électrophile directe de O_2 sur Cat^{2-}

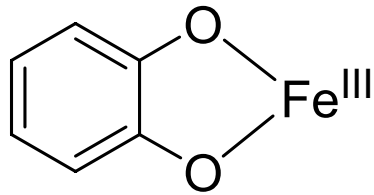
Extradiol



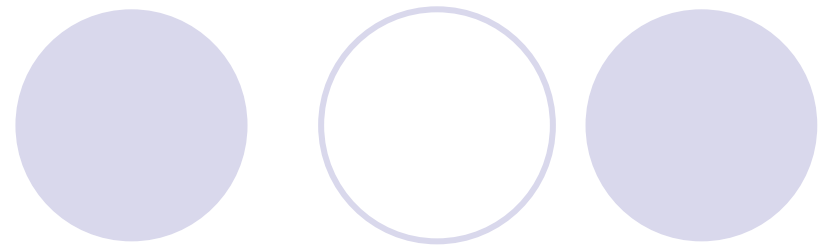
- Affinité O_2 pour Fe^{II} forte
- Fe^{II} : Acide de Lewis moins fort → Déprotonation partielle du substrat
- Cat^- : Moins riche en électrons
- Attaque initiale de O_2 sur le métal



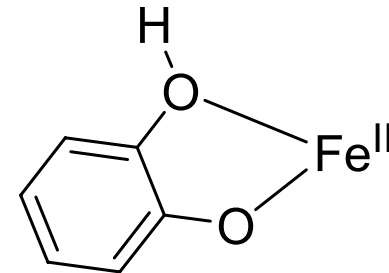
Intradiol



- O_2 est électrophile
- Attaque sur le carbone le plus riche en électron (portant O^-)



Extradiol



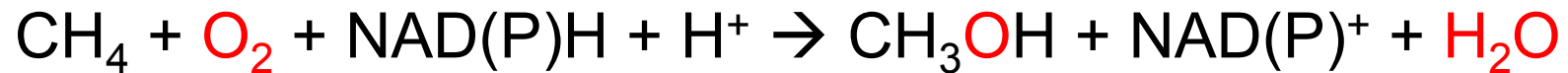
- O_2 est nucléophile (forme $O_2^{\bullet-}$)
- Attaque sur un carbone moins riche en électron (ortho de celui portant O^-)



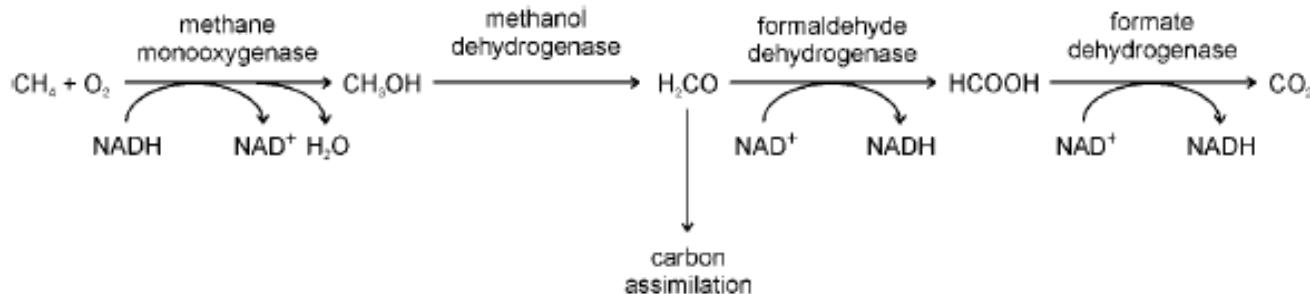
Cofactor	Fe(III)	Fe(II)
Ligands	Tetradentate 2 x Tyr, 2 x His	Tridentate 2 x His, 1 x Glu
O ₂ Activation	Substrate activation by iron (III)	O ₂ activation by iron (II)
Mechanism of C-C cleavage	1,2-acyl migration O-O bond homolysis	1,2-alkenyl migration Acid/base catalysis
Model chemistry	Fe(III) + Tetradentate N ₄ , N ₃ O ligands	Fe(II) + Macrocyclic N ₃ ligand

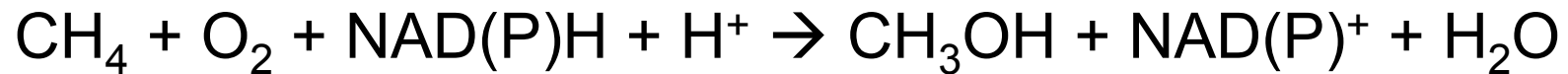
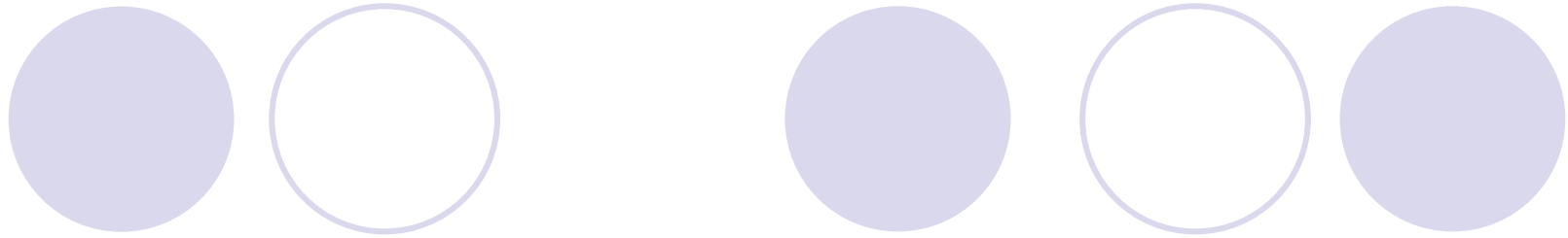
III. Enzymes à di-fer non-héminique: Méthane Monooxygénase

- Monoxygénase (≠ Protocatéchuate dioxygenase)



- Système multicomposant
- Enzyme très peu sélective: CH₄ peut être remplacé par n'importe quel hydrocarbure (saturé ou non) jusqu'à C8. Halogéno-alcanes et -alcènes aussi.
- Impliquée dans l'assimilation du carbone:

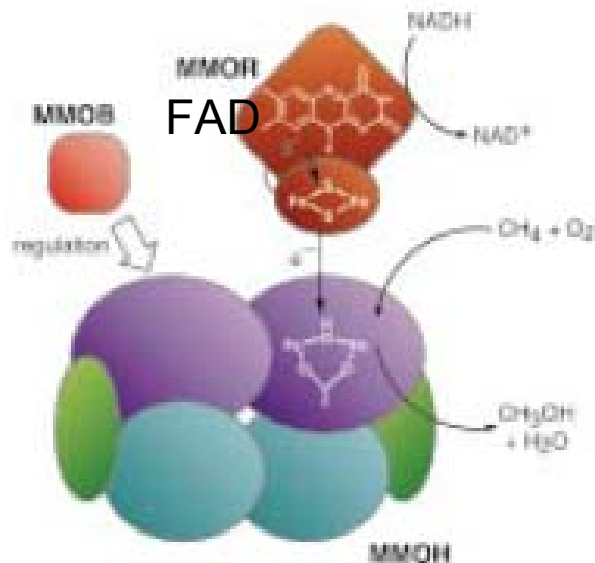




- Très forte énergie de dissociation de liaison C-H: 104 kcal/mol (CH₄): CH₄ très dur à oxyder!
→ Donc une espèce très oxydante est formée au cours du cycle catalytique
(≠ protocatéchuate dioxygénase)

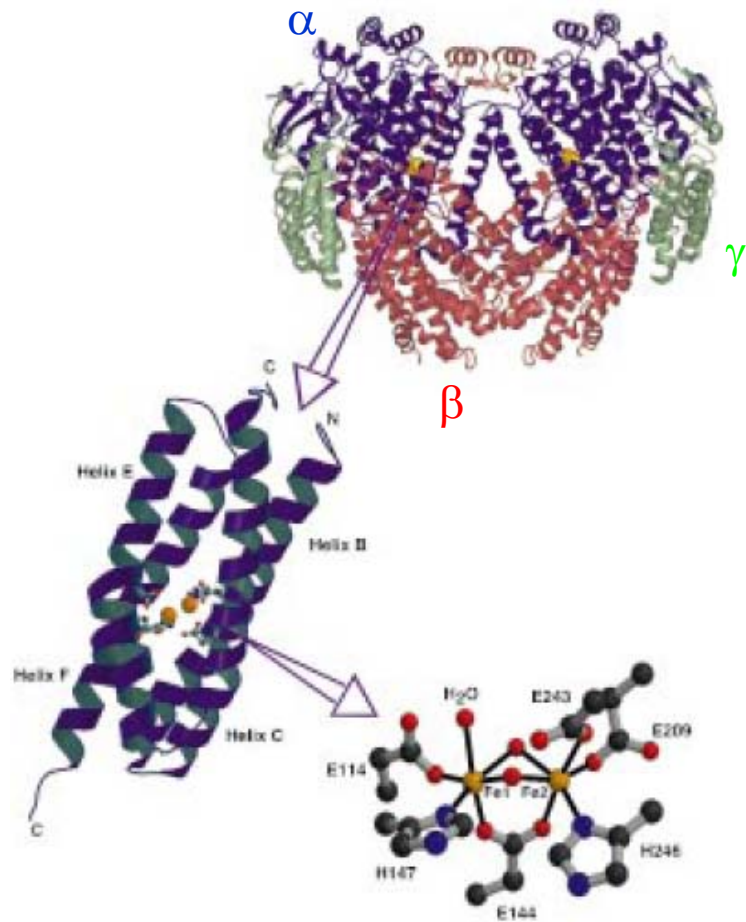
MMO: Système multicomposants

→ Permet d'éviter que les électrons de NADH ne soient trop proches du site actif (très oxydant) et ne le réduise directement (à la place du substrat).



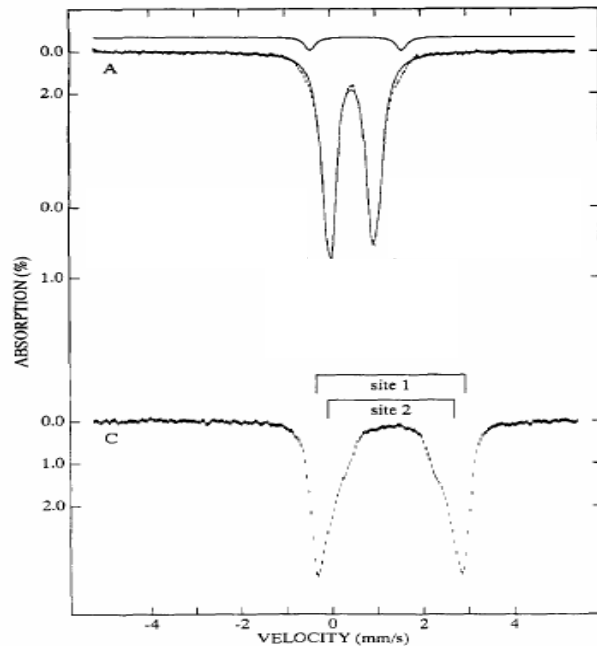
- MMOH: 245 kDa, hydroxylase qui contient 2 atomes de fer (site actif)
- MMOB: 15 kDa, régulation
- MMOR: 40 kDa, Réductase (2 atomes de fer + flavine)

MMOH: Site actif = Difer



- Dimère, chaque sous-unité est α, β, γ
- $\alpha = 60.6$ kDa, $\beta = 45$ kDa, $\gamma = 19.8$ kDa
- Site actif constitué de 2 fers: Même lieu pour l'activation de O_2 et l'hydroxylation du substrat
- Entre hélices E et F qui semblent s'ouvrir pour laisser passer les substrats

Etat d'oxydation MMOH



Resting state, pas de réaction avec O_2

Après transfert de 2 électrons par MMOR
Réaction avec O_2



sample	T (K)	site 1			site 2		
		ΔE_Q^a (mm/s)	δ (mm/s)	%	ΔE_Q^a (mm/s)	δ (mm/s)	%
oxidized $Fe^{3+} \cdot Fe^{3+}$							
pH 7	4.2	1.16	0.51	48 ^b	0.87	0.50	48 ^b
pH 7 + Me ₂ SO	4.2	1.16	0.52	50	0.91	0.51	50
mixed-valence $Fe^{3+} \cdot Fe^{2+}$							
pH 7							
pH 7 + Me ₂ SO	150	-1.3	0.48	50	+2.4	1.19	50
reduced $Fe^{2+} \cdot Fe^{2+}$							
pH 7	4.2	~3.10	~1.3	50 ^c	2.4-3.0	1.3	50 ^c
pH 7 + Me ₂ SO	4.2	~3.0	1.3	50	~2.7	1.3	50

Coordination du fer

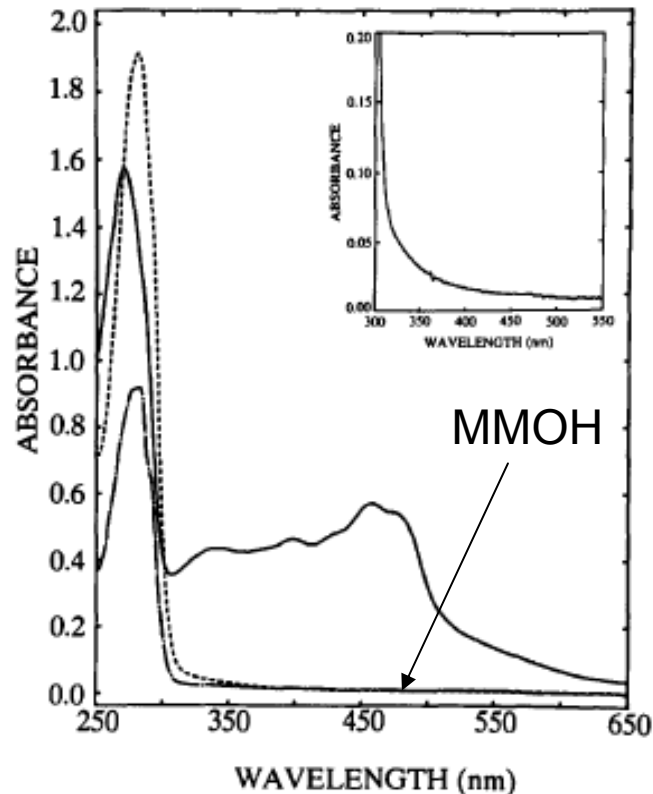
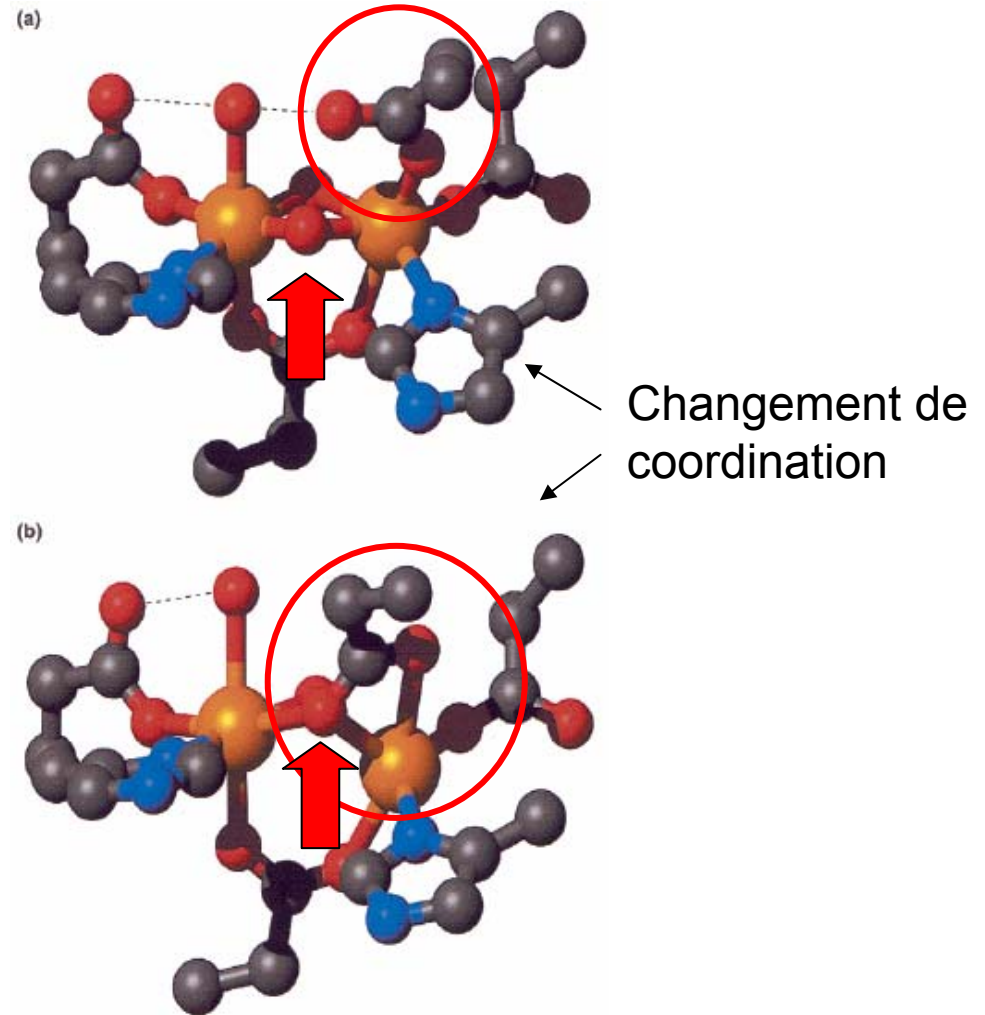
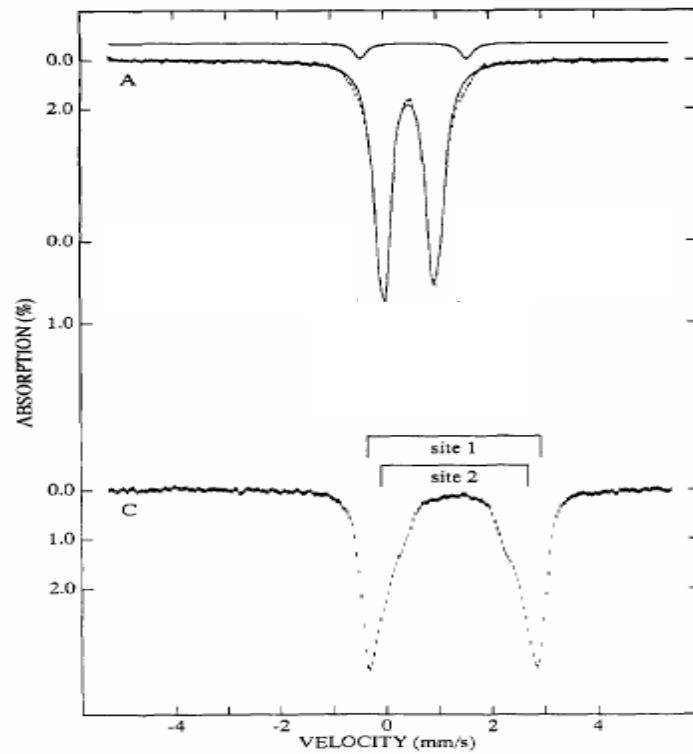


FIG. 2. Optical spectra of the methane monooxygenase components. Reductase (—, 1 mg/ml protein, 25 μ M); component B (- - -, 1 mg/ml protein, 60 μ M); hydroxylase (- · - ·, 1 mg/ml protein, 4 μ M). The inset shows the absorbance spectrum in the visible region of the oxidized hydroxylase enlarged 10-fold.

- Pas de transferts de charge: Pas de ligands Tyrosinate (\neq intradiol dioxygénase).
- Pas de bande de Soret: Pas d'hème.

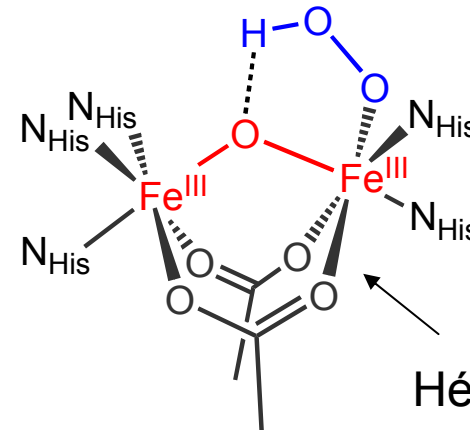
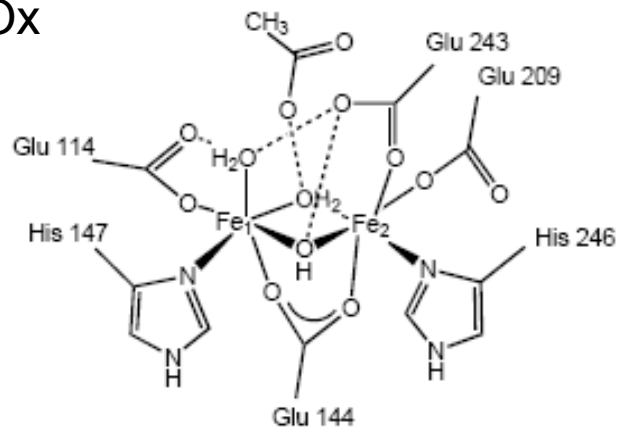
Structures RX

$d(\text{Fe}^{\text{III}}-\text{Fe}^{\text{III}}) = 3.1\text{-}3.4 \text{ \AA}$ selon l'organisme



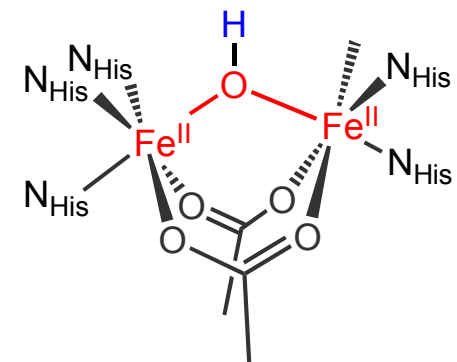
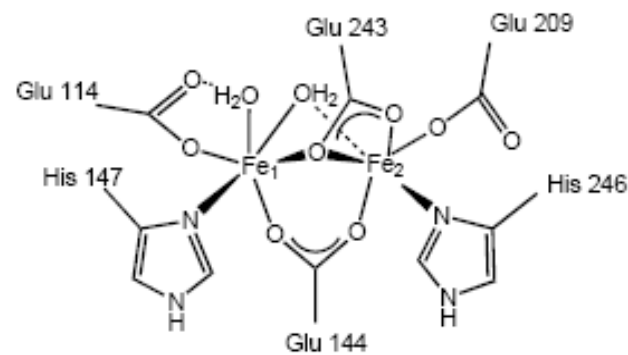
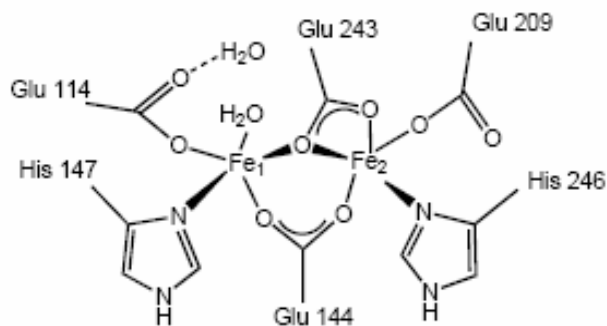
Homologie avec l'hémérythrine

Ox



Hémérythrine

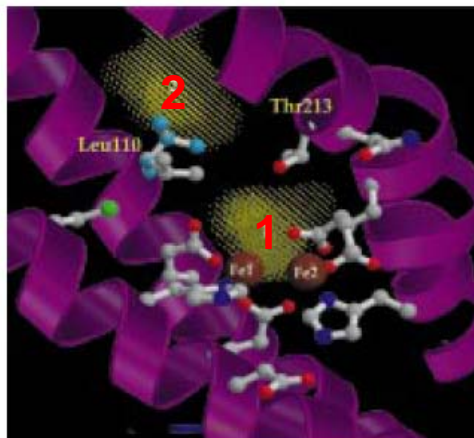
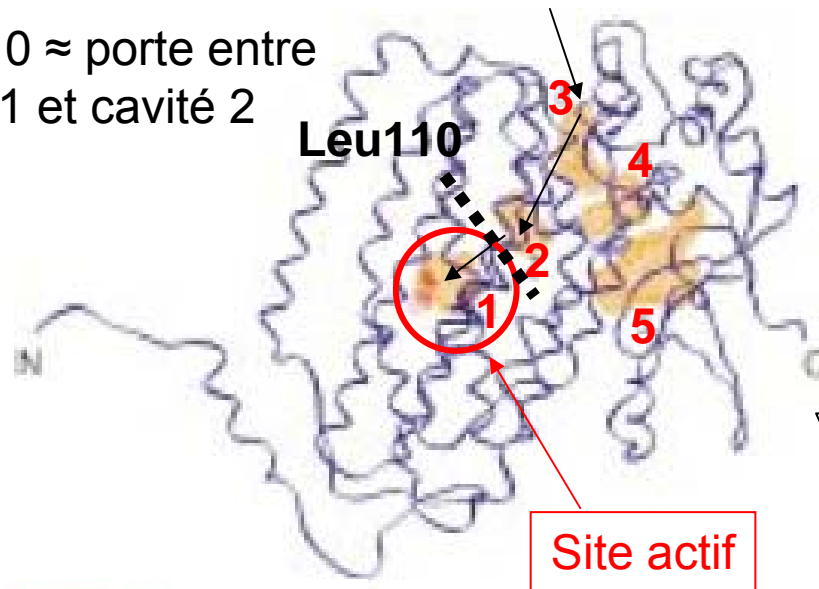
Red



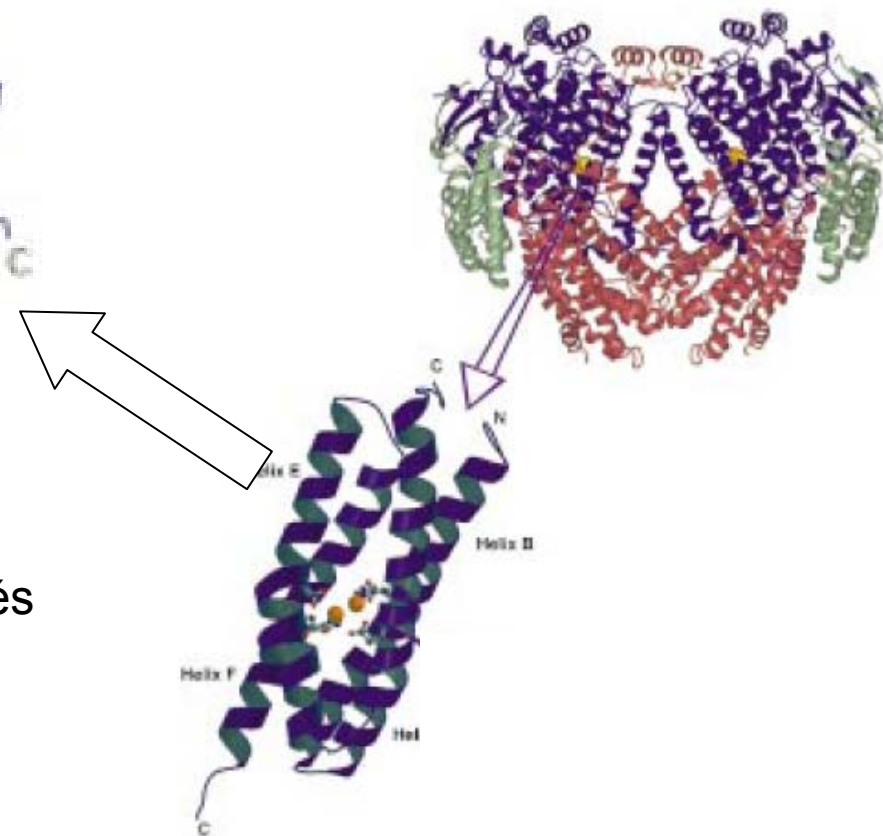
Environnement du site actif

Molécules hydrophobes (O_2 et CH_4)

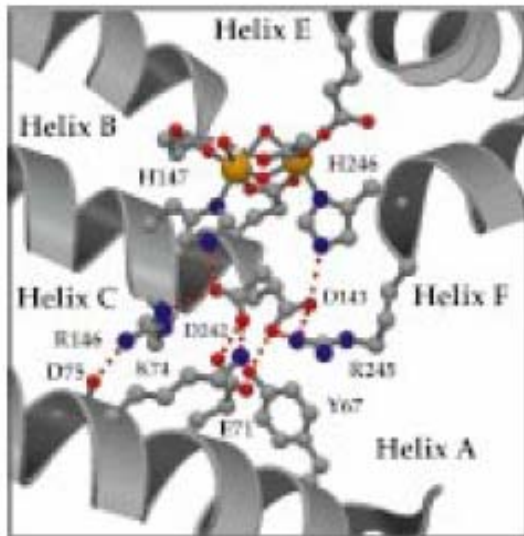
Leu 110 \approx porte entre
cavité 1 et cavité 2



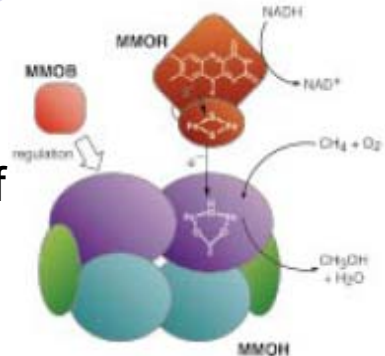
En orange: cavités
hydrophobes



Transfert d'électrons au site actif

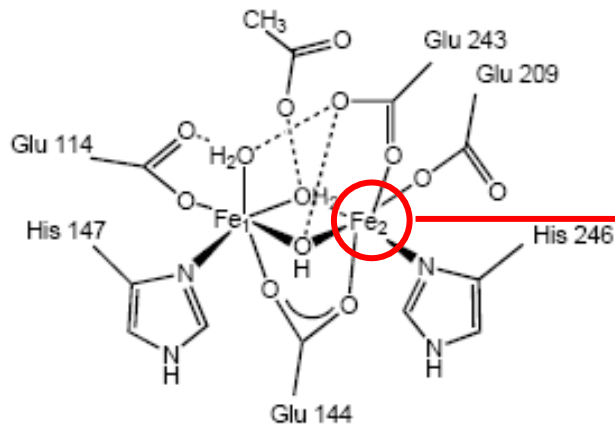


Réseau de liaisons H impliquées dans le transfert d'électron: 10 Å entre le site actif et un canyon à la surface (MMOR)



Transfert d'électron dicté par les potentiels:

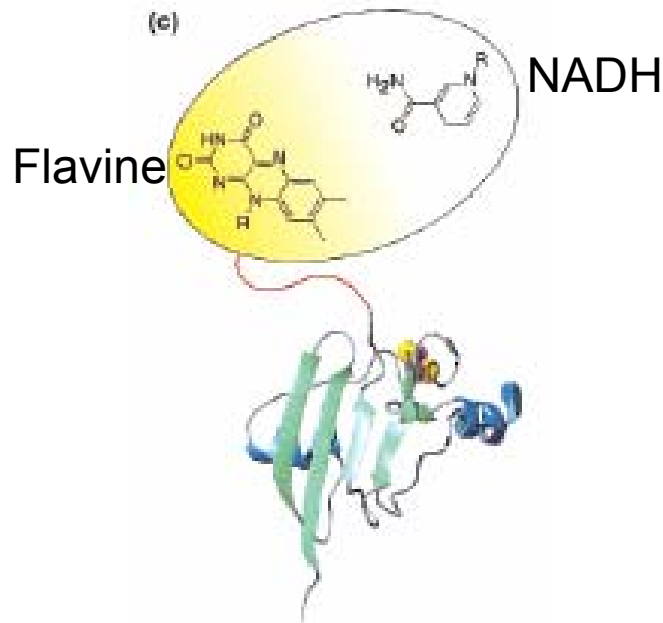
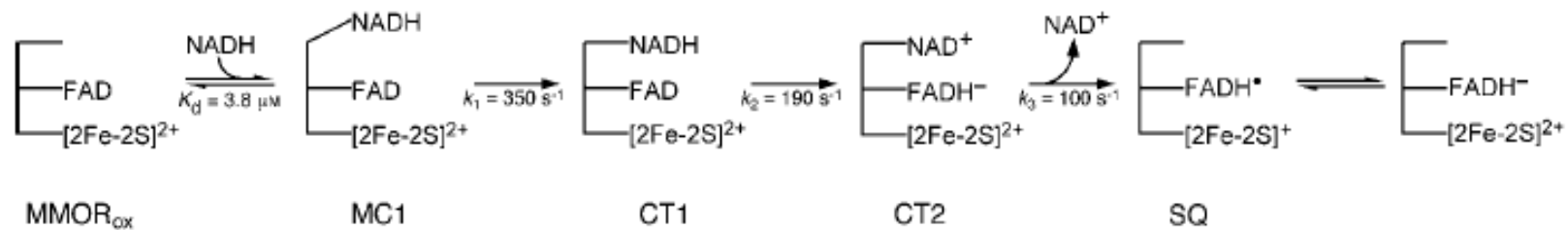
MMOH ox/red	+0.1 V
2Fe2S ox/red	-0.21 V
FAD ox/red	-0.26 à -0.18 V
NADH ox/red	-0.32 V



Plus faiblement lié

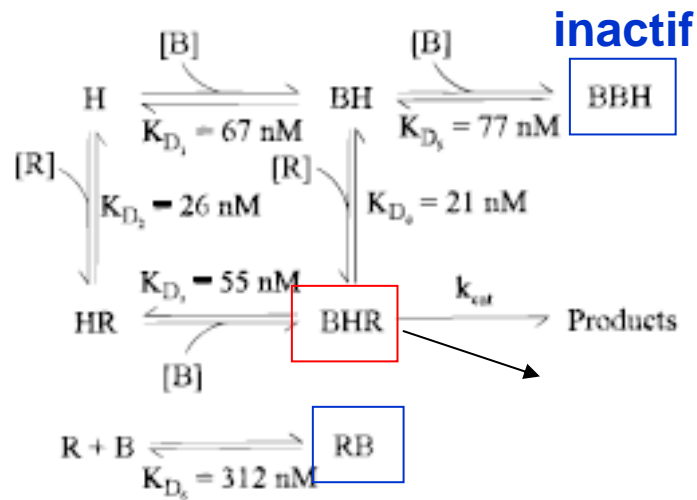
Bouge lorsque MMOB se fixe, mais E° ne change pas

MMOR

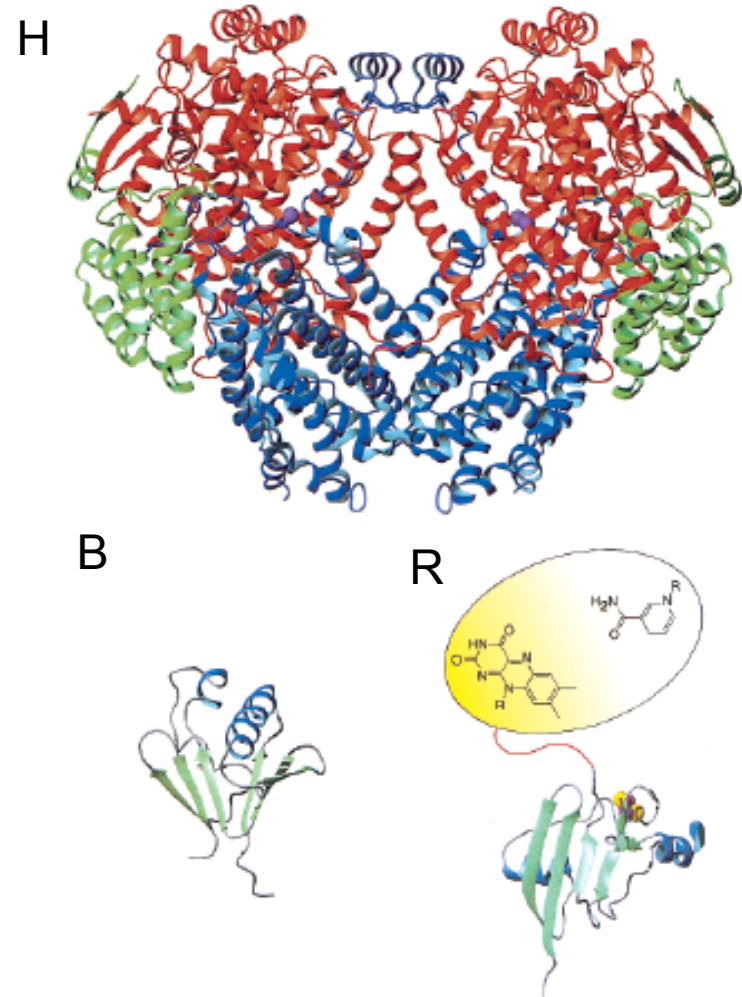
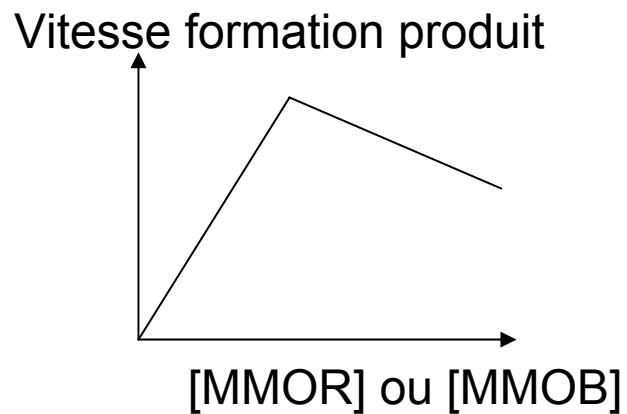


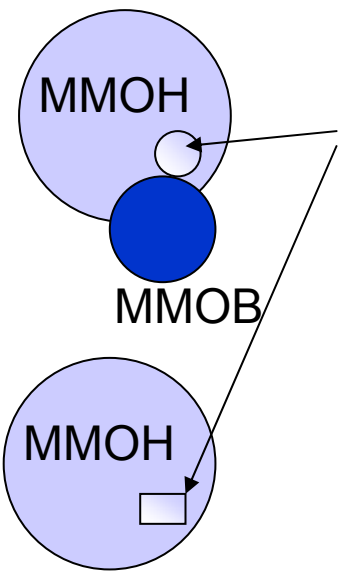
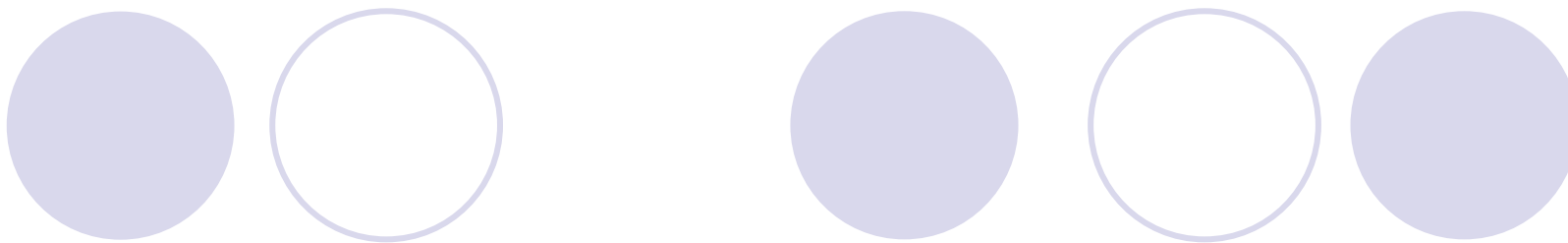
- Electrons arrivent de NADH (bas potentiel)
- 2 électrons stockés temporairement sur MMOR avant transfert à MMOH
- Séparation partie acceptrice d'électrons et partie très oxydante

Régulation par assemblage du complexe MMOR – MMOB - MMOH

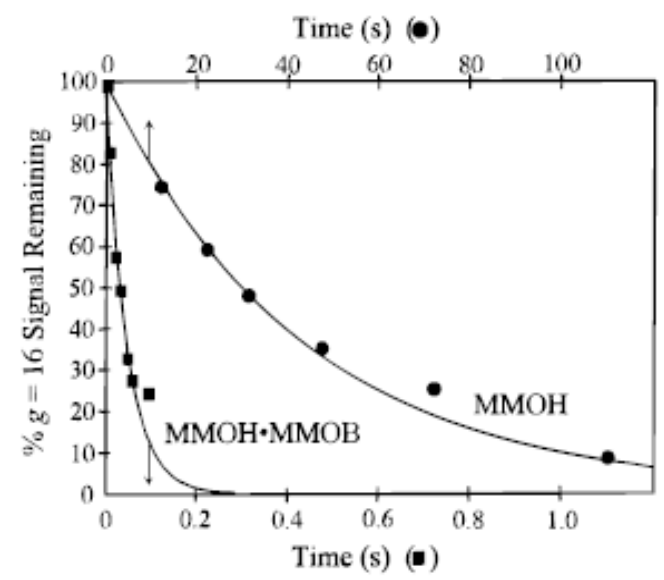


Ne se fixe pas sur MMOH

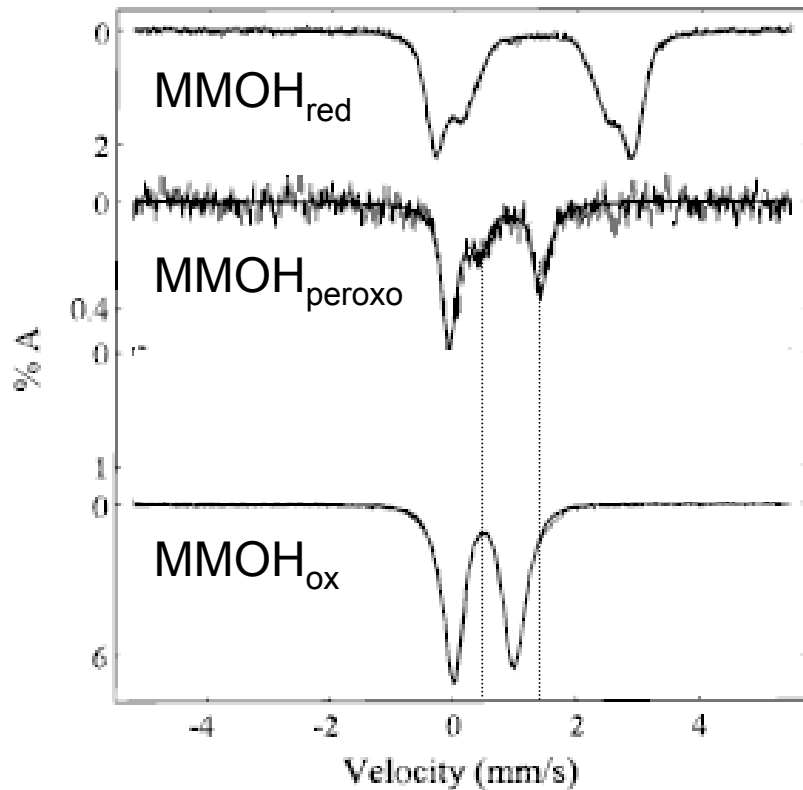




Fixation de MMOB influence la géométrie du site actif



Réaction de MMOH + MMOR avec O₂

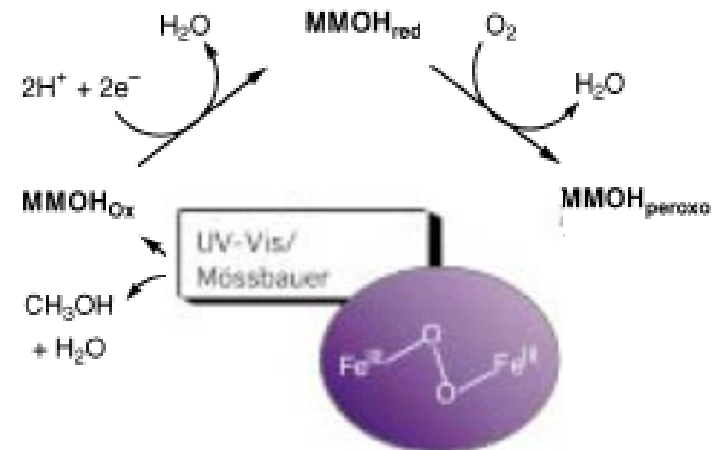


MMOH oxydée + NADH: difer(II), RPE

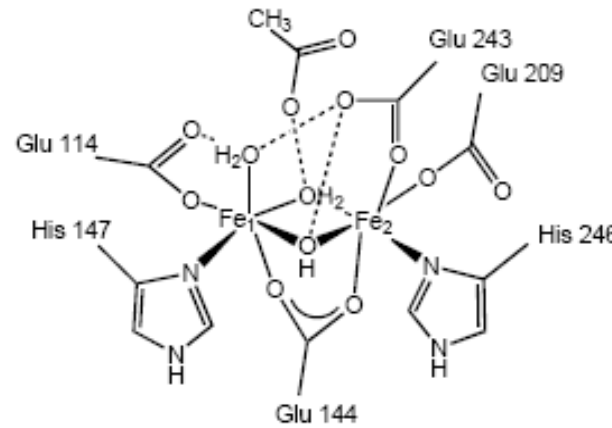
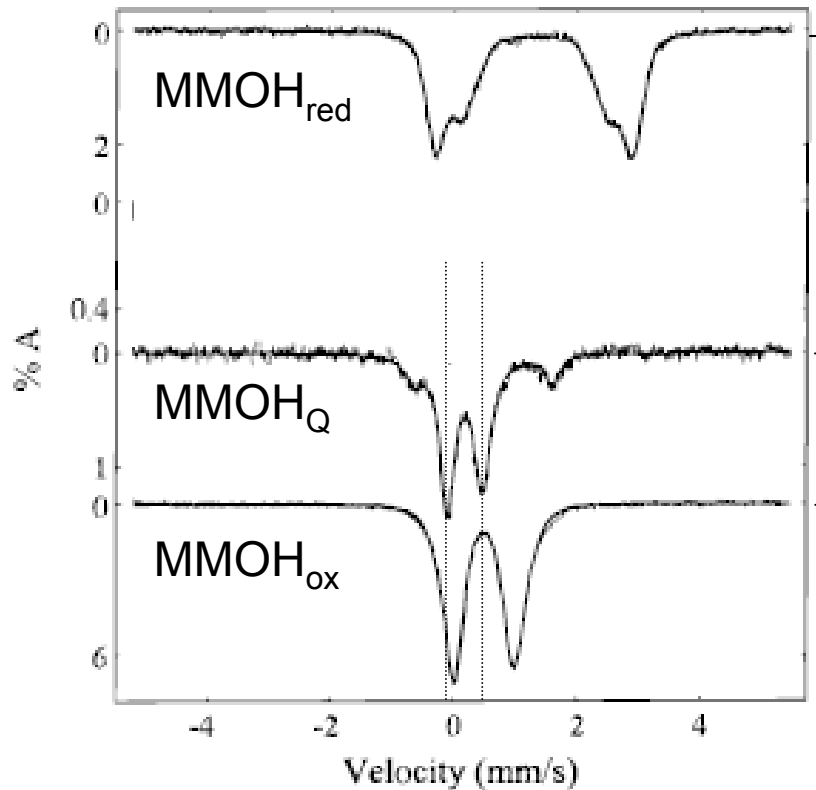
MMOH oxydée + NADH + O₂ qq msec: difer(III), pas de RPE

MMOH oxydée : difer(III), pas de RPE

Difer(III): couplage antiferromagnétique
 Difer(II): Coupage ferromagnétique

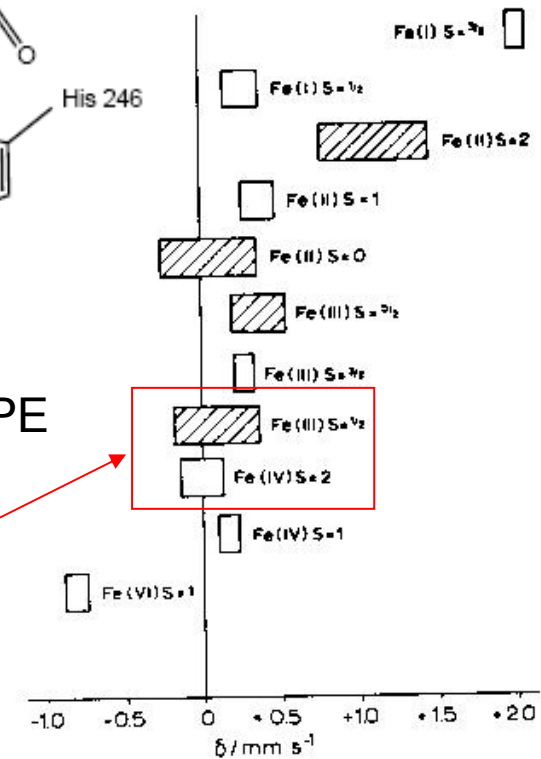


Réaction de MMOH + MMOR avec O₂: Intermédiaire Q



MMOH oxydée :
difer(III), pas de RPE

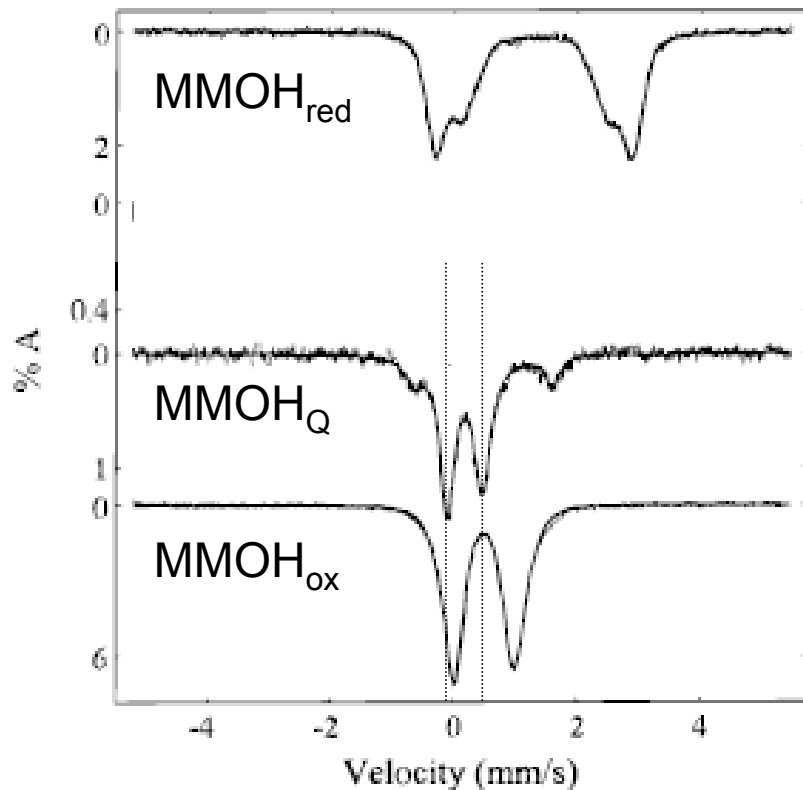
difer(II), RPE



$\delta = 0.17 \text{ mm/s}, \Delta E_Q = 0.53 \text{ mm/s}$

Fe^{III} bas spin connu pour être stabilisé surtout par ligands azotés

Réaction de MMOH + MMOR avec O₂: Intermédiaire Q

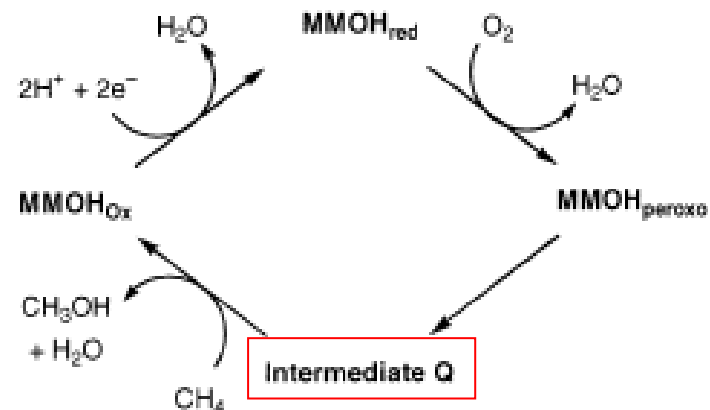


MMOH oxydée + NADH: difer(II), RPE

MMOH oxydée + NADH + O₂ qq sec :
difer(III), pas de RPE

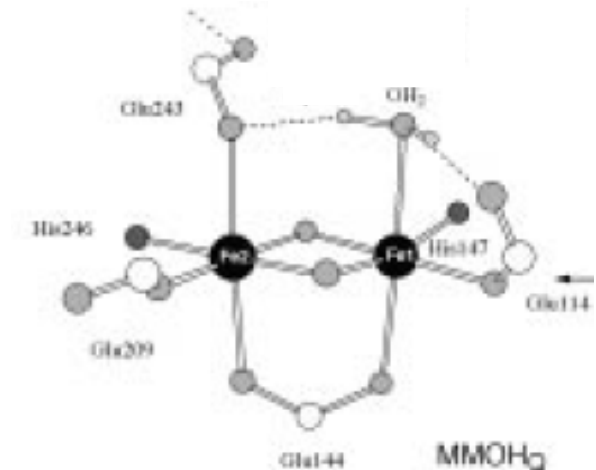
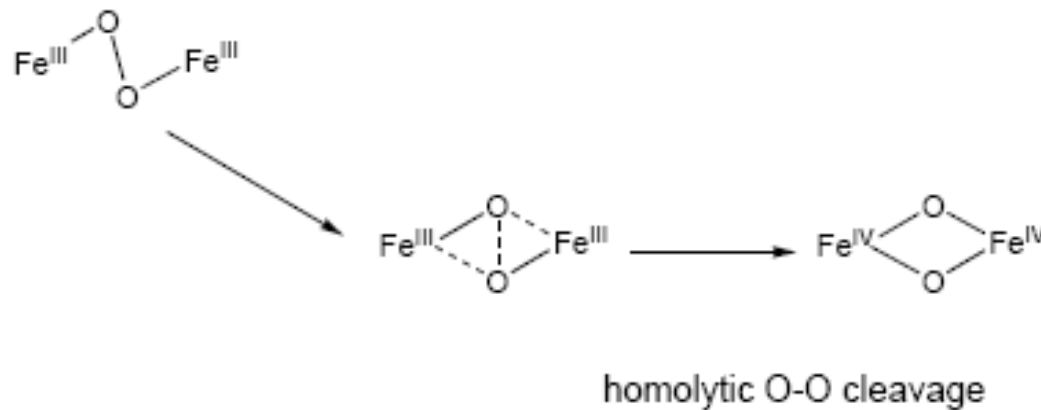
MMOH oxydée : difer(III), pas de RPE

$\delta = 0.17 \text{ mm/s}$, $\Delta E_Q = 0.53 \text{ mm/s}$
Intermédiaire Q
→ 2 Fe^{IV} en interaction



Formule proposée pour l'intermédiaire Q

$d(\text{Fe}^{\text{IV}}-\text{Fe}^{\text{IV}}) = 2.46 \text{ \AA}$ (rappel: $d(\text{Fe}^{\text{III}}-\text{Fe}^{\text{III}}) > 3 \text{ \AA}$)
 $d(\text{Fe}^{\text{IV}}-\text{O}) = 1.77, 2.00 \text{ \AA}$

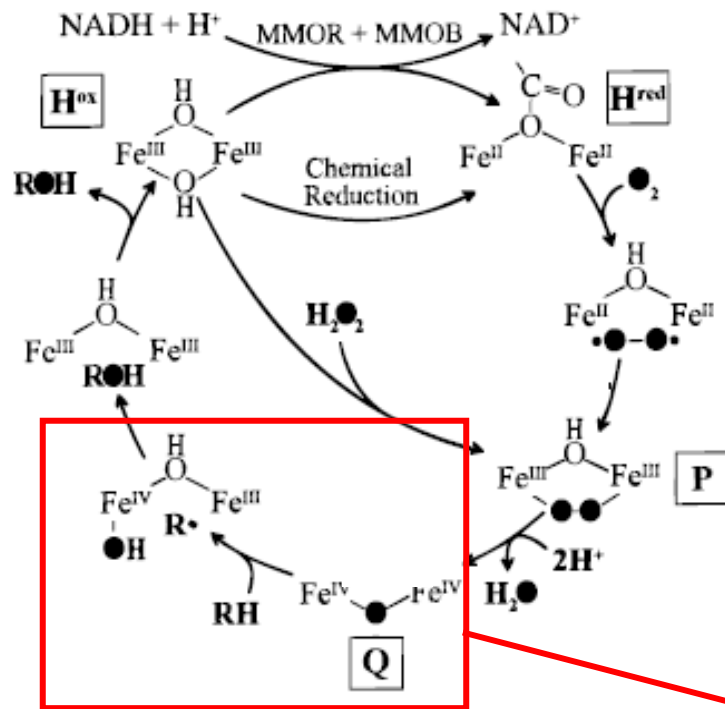


Structure (calculée)

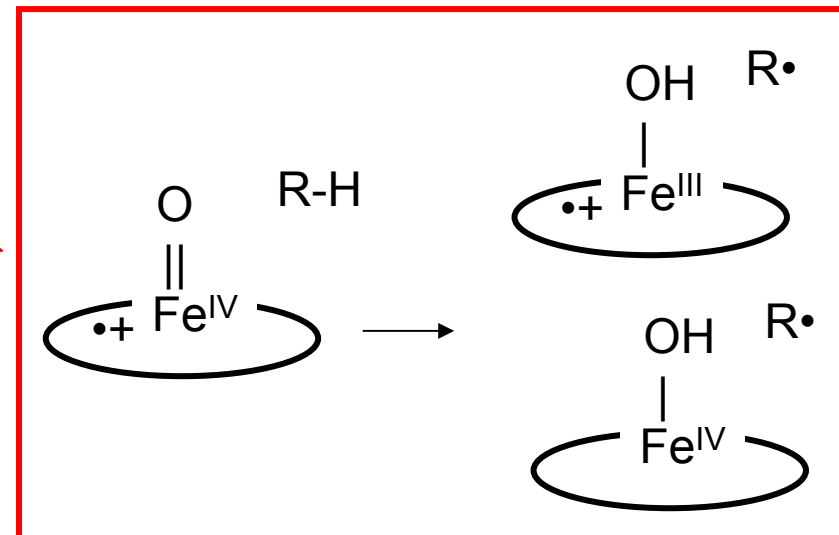
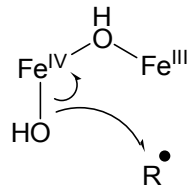
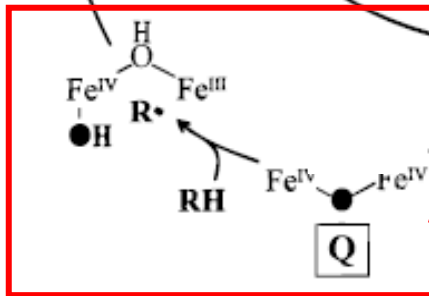
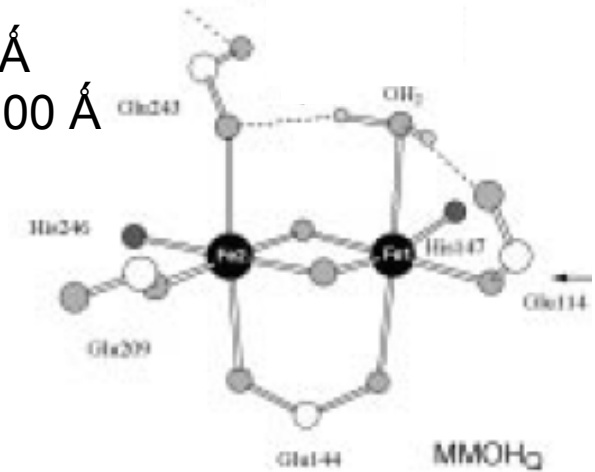
Quand addition de substrat à P, pas de décomposition de P

Quand addition de substrat à Q, Q se décompose plus vite: Q est l'espèce oxydante

Réactivité de l'intermédiaire Q



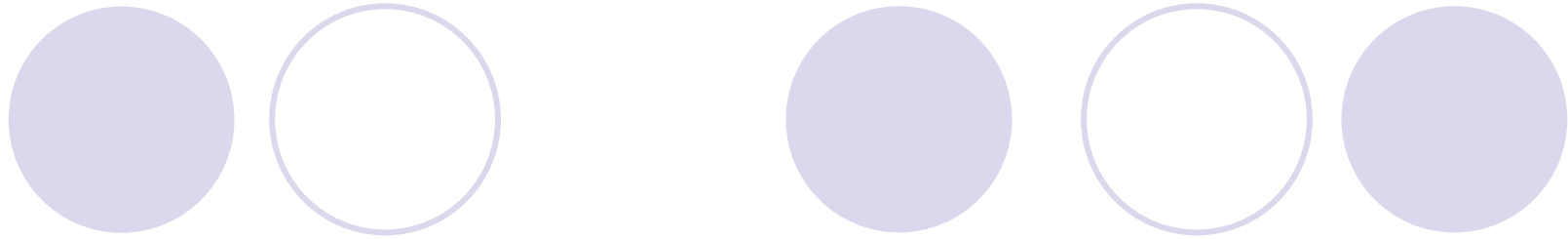
$d(\text{Fe}^{\text{IV}}-\text{Fe}^{\text{IV}}) = 2.46 \text{ \AA}$
 $d(\text{Fe}^{\text{IV}}-\text{O}) = 1.77, 2.00 \text{ \AA}$



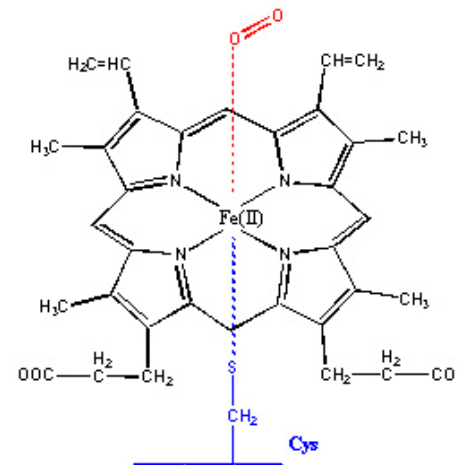
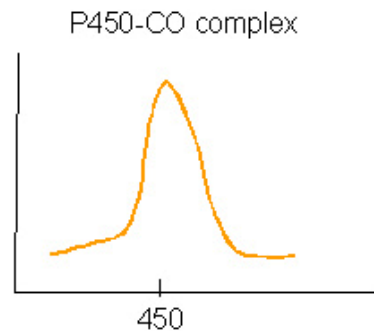
Analogie avec P450 (substrats difficiles à oxyder)

IV. Enzymes à fer héminique: Cyt P450

- R.T. Williams - in vivo, 1947.
- Enzymes cytochrome P450 (hémoprotéines) impliquées dans le métabolisme intra-cellulaire et la décomposition de xénobiotiques.
- Dans les cellules procaryotes et eucaryotes
- Chez l'humain différentes enzymes P450 se trouvent dans tous les tissus: Poumon, cerveau...



- Doit son nom à son spectre en présence de CO:
Absorption à 450 nm (Soret = $\pi-\pi^*$ due à la coordination d'un thiolate à l'hème
- Mammifères: Protéines membranaires
- Bactéries: on les retrouve solubles





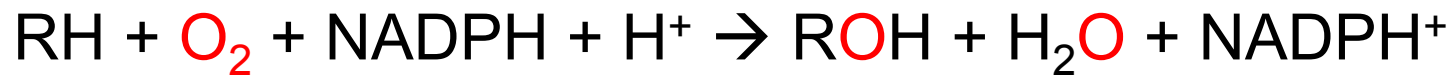
Familles et sous-familles

- Classification en famille et sous-famille selon les similitudes de séquence
- > 40% de similitude d'aa: même famille.
- > 55% de similitude d'aa: même sous-famille
- Chez l'humain: 18 familles et 43 sous-familles
- Plus de 2500 cyt P450 connus

- **CYP1 drug metabolism (3 subfamilies, 3 genes, 1 pseudogene)**
- **CYP2 drug and steroid metabolism (13 subfamilies, 16 genes, 16 pseudogenes)**
- **CYP3 drug metabolism (1 subfamily, 4 genes, 2 pseudogenes)**
- **CYP4 arachidonic acid or fatty acid metabolism (5 subfamilies, 11 genes, 10 pseudogenes)**
- **CYP5 Thromboxane A2 synthase (1 subfamily, 1 gene)**
- **CYP7A bile acid biosynthesis 7-alpha hydroxylase of steroid nucleus (1 subfamily member)**
- **CYP7B brain specific form of 7-alpha hydroxylase (1 subfamily member)**
- **CYP8A prostacyclin synthase (1 subfamily member)**
- **CYP8B bile acid biosynthesis (1 subfamily member)**
- **CYP11 steroid biosynthesis (2 subfamilies, 3 genes)**
- **CYP17 steroid biosynthesis (1 subfamily, 1 gene) 17-alpha hydroxylase**
- **CYP19 steroid biosynthesis (1 subfamily, 1 gene) aromatase forms estrogen**
- **CYP20 Unknown function (1 subfamily, 1 gene)**
- **CYP21 steroid biosynthesis (1 subfamily, 1 gene, 1 pseudogene)**
- **CYP24 vitamin D degradation (1 subfamily, 1 gene)**
- **CYP26A retinoic acid hydroxylase important in development (1 subfamily member)**
- **CYP26B probable retinoic acid hydroxylase (1 subfamily member)**
- **CYP26C probable retinoic acid hydroxylase (1 subfamily member)**
- **CYP27A bile acid biosynthesis (1 subfamily member)**
- **CYP27B Vitamin D3 1-alpha hydroxylase activates vitamin D3 (1 subfamily member)**
- **CYP27C Unknown function (1 subfamily member)**
- **CYP39 unknown function (1 subfamily member)**
- **CYP46 cholesterol 24-hydroxylase (1 subfamily member)**
- **CYP51 cholesterol biosynthesis (1 subfamily, 1 gene, 3 pseudogenes) lanosterol 14-alpha demethylase**

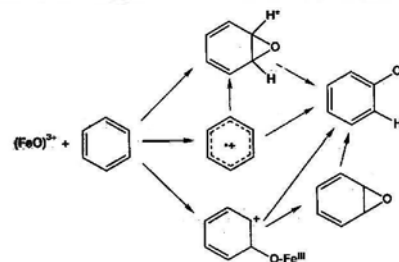
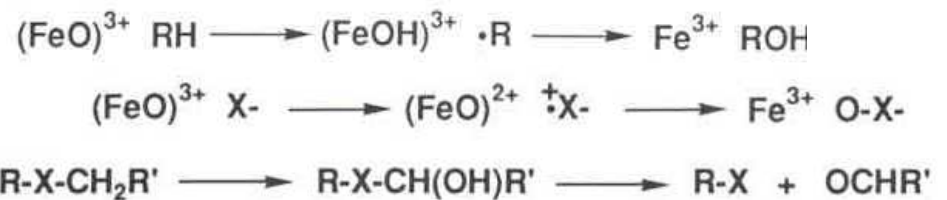
Réactions des CyP450

- Activité monooxygénase :



- Enzymes CyP450 catalysent une multitude de réactions chimiques:

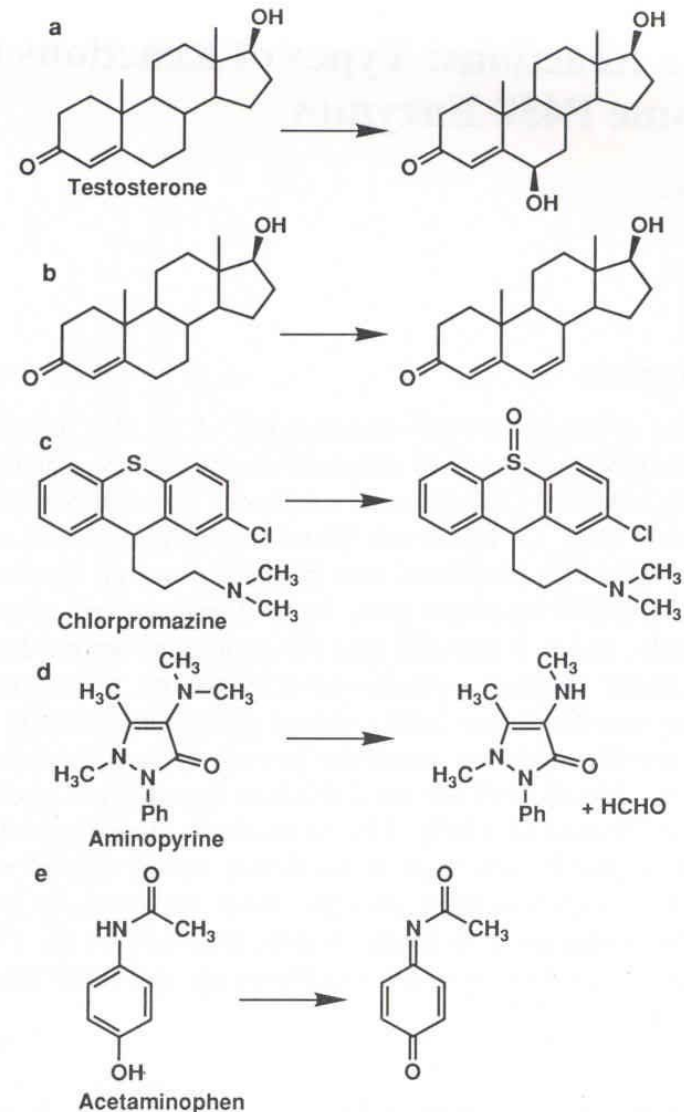
- Hydroxylation de carbones
- Hydroxylation d'hétéroatomes
- Relargage d'hétéroatomes
- Oxydation d'aromatiques



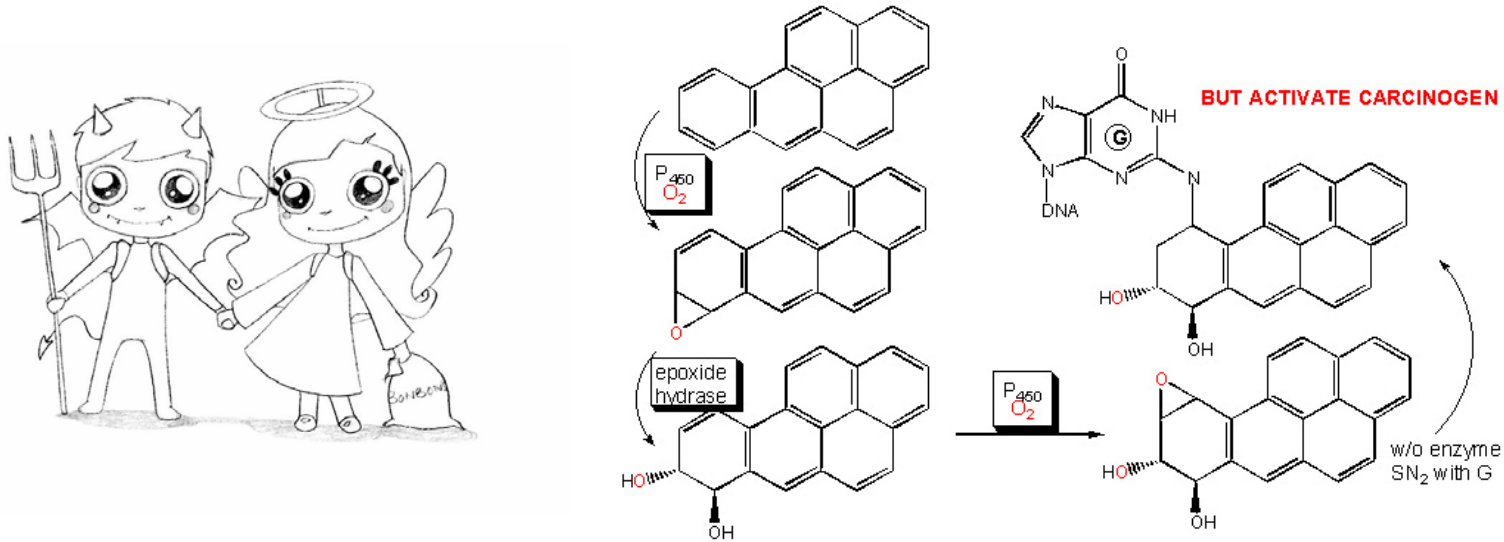
CYP2D6 est capable d'oxyder plus de 70 substrats différents

Quelques rôles physiologiques

- Impliqués dans la synthèse du cholestérol, stéroïdes et d'autres lipides tels que les prostacyclines ou le thromboxane A2.
- Impliqués dans les processus de détoxification: Augmentation de solubilité de xénobiotiques aromatiques apolaires



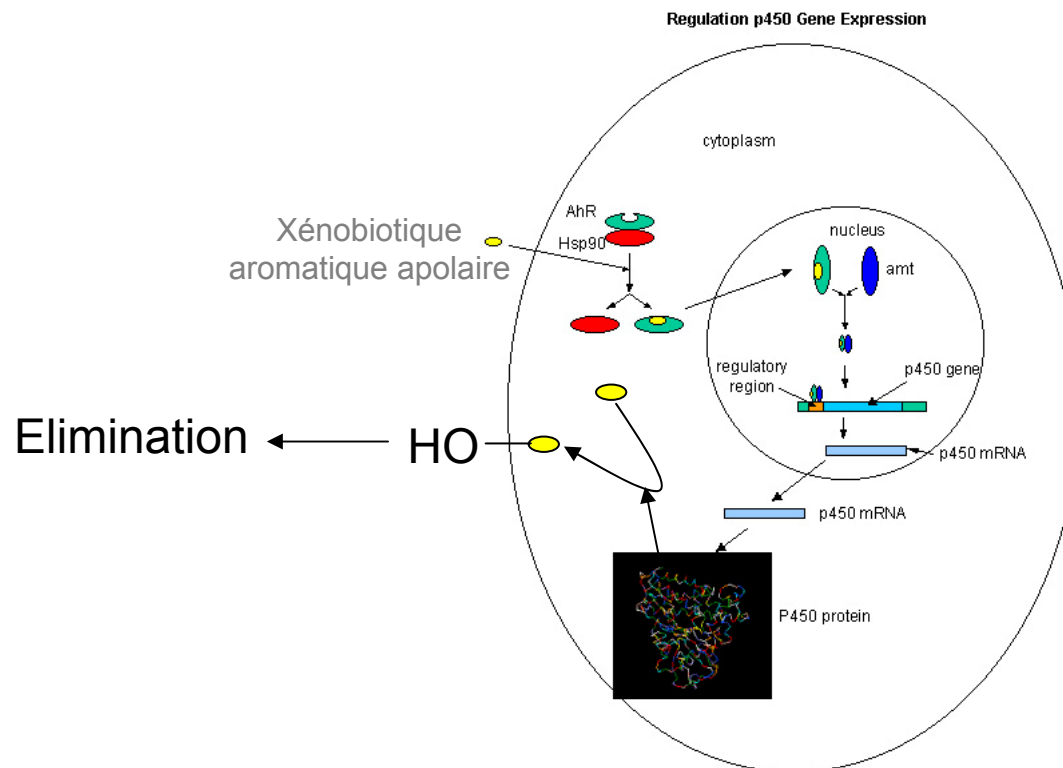
Réaction du CytP450



- Détoxification par solubilisation
- Mais il peut rendre encore plus cancérigène certains xénobiotiques !!!

Multiples régulations: Induction du gène

- Transcription de gène induite en présence de:
 - Hormones stéroïdes
 - CYP4A1: Proliférateurs de péroxisomes (là où oxydation d'acides gras)
 - CYP1: Chaînes aromatiques carbonées...

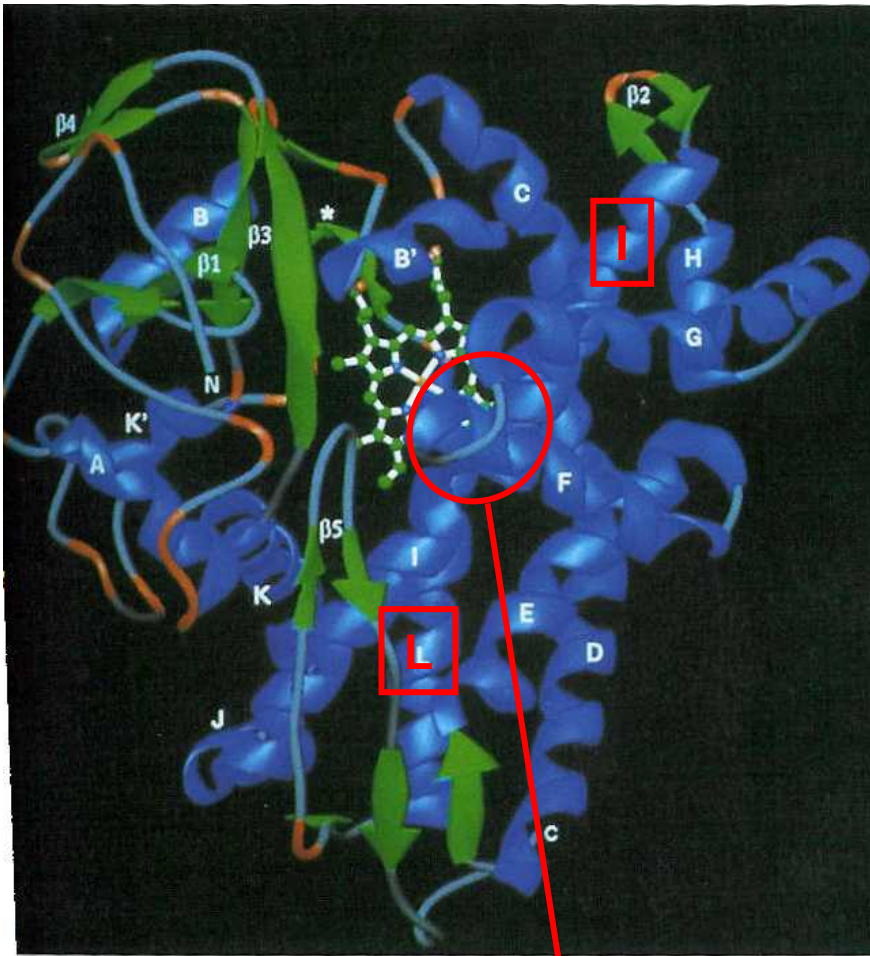




Structure par diffraction des RX

- 1er P450 cristallisé: P450Cam de bactérie soluble. Membranaires: Structure similaire + une ancre sur la partie N-terminale.

Structure par diffraction des RX

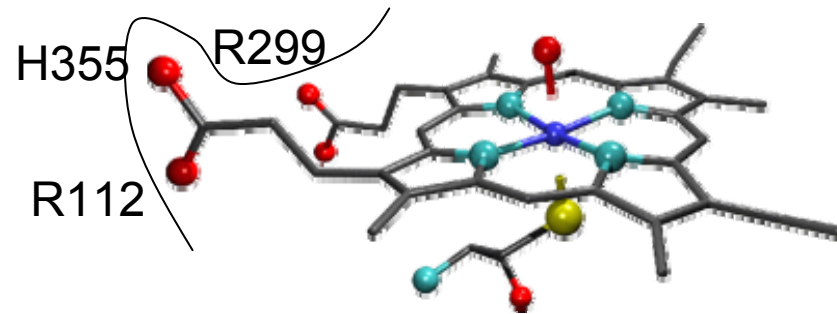


Distortion de l'hélice au niveau du site de fixation de l'hème

- 1er P450 cristallisé: P450Cam de bactérie soluble.
Membranaires (CYP2C5):
Structure similaire + ancre sur la partie N-terminale.
- 14 hélices α , 5 feuilletts β
- Structure compacte, spécifiquement dans la région riche en hélices
- Dynamique conformationnelle primordiale.
- Hème entre les hélices L et I.
- Cys-357 (début de l'hélice L) lie l'hème à l'enzyme

Fixation de l'hème

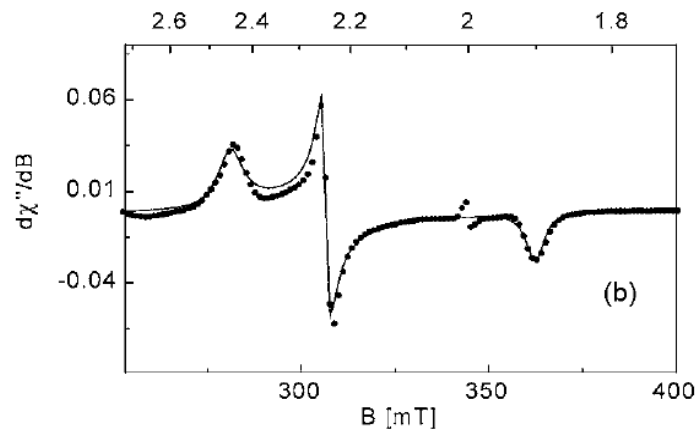
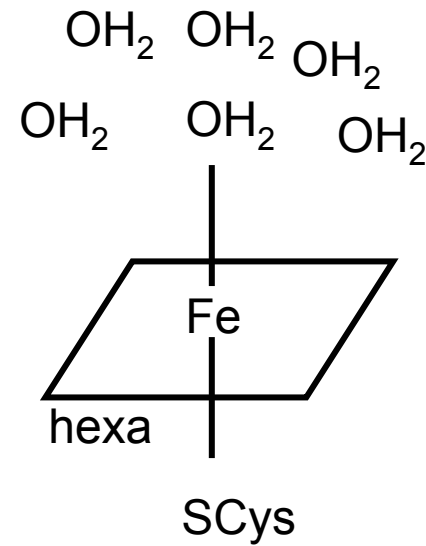
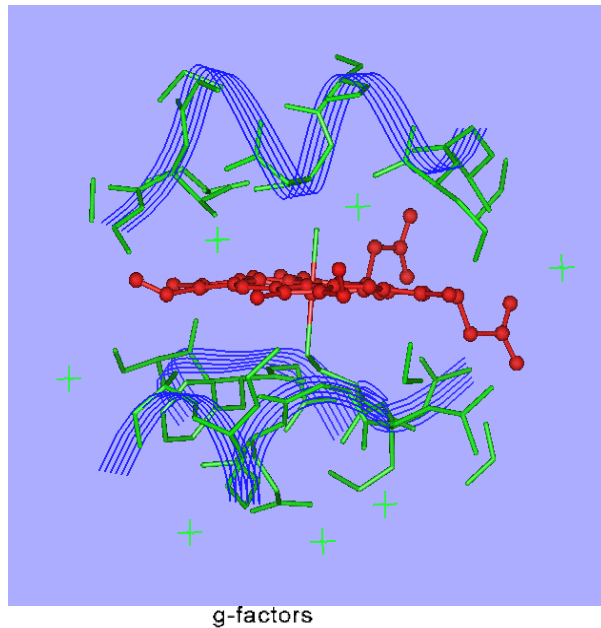
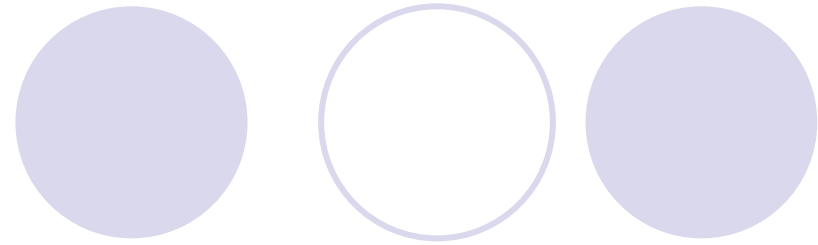
- Résidue Cys-S⁻ (C357)
- Ponts salins avec R299 (2 liaisons), H355, R112
- Séquence H355-X-C357 conservée



Fixation de l'hème

- Hème orienté presque parallèle à la surface, entre les hélices L et I.
- Site actif enfoui dans la protéine; Pas de canal que le substrat pourrait emprunter →
Vraisemblablement la protéine « respire » pour laisser passer le substrat

Resting state

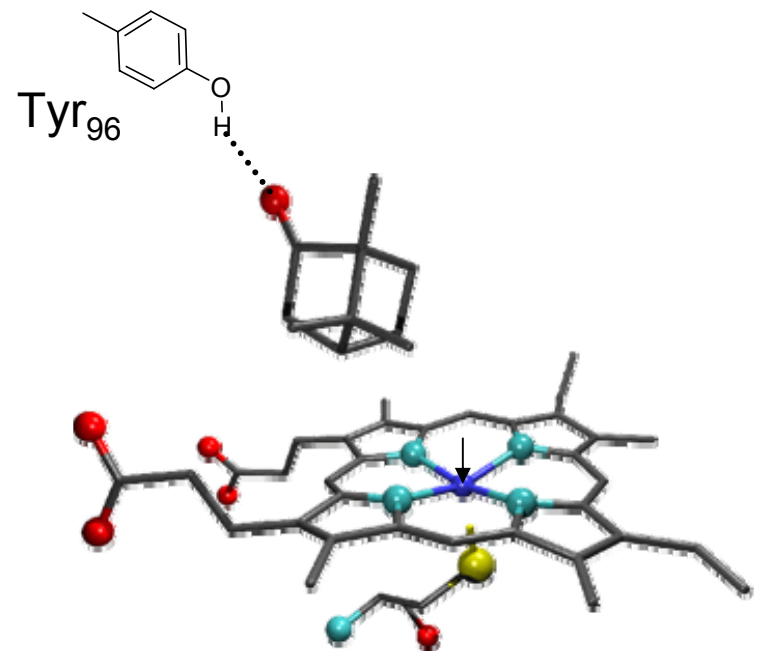
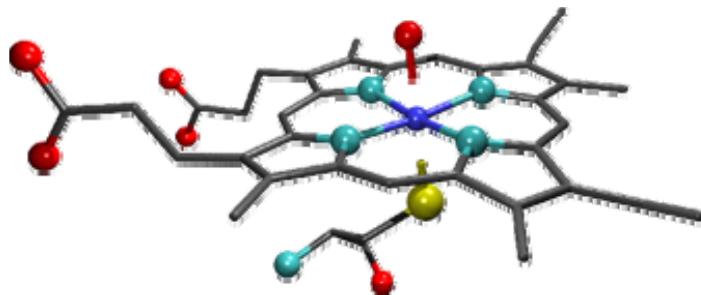
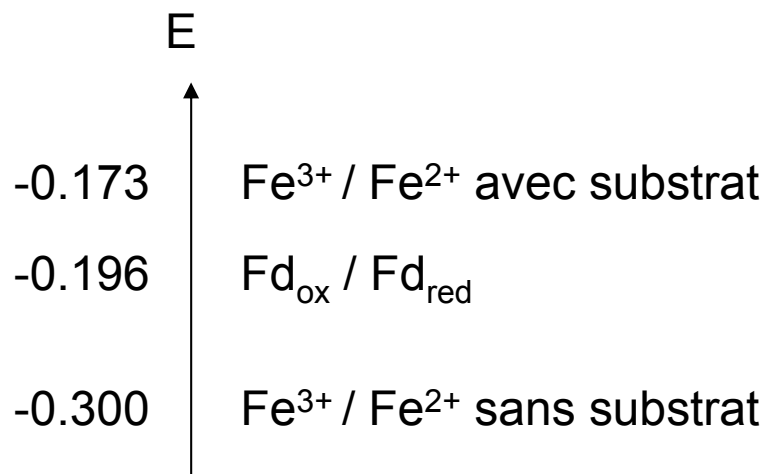
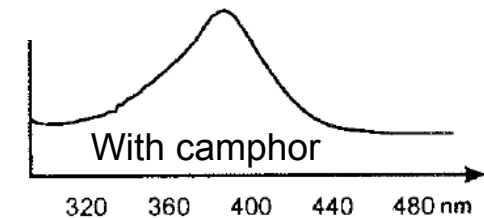


Mössbauer :

$$\delta = 0.38 \text{ mm/s}, \Delta E_q = 2.85 \text{ mm/s}$$

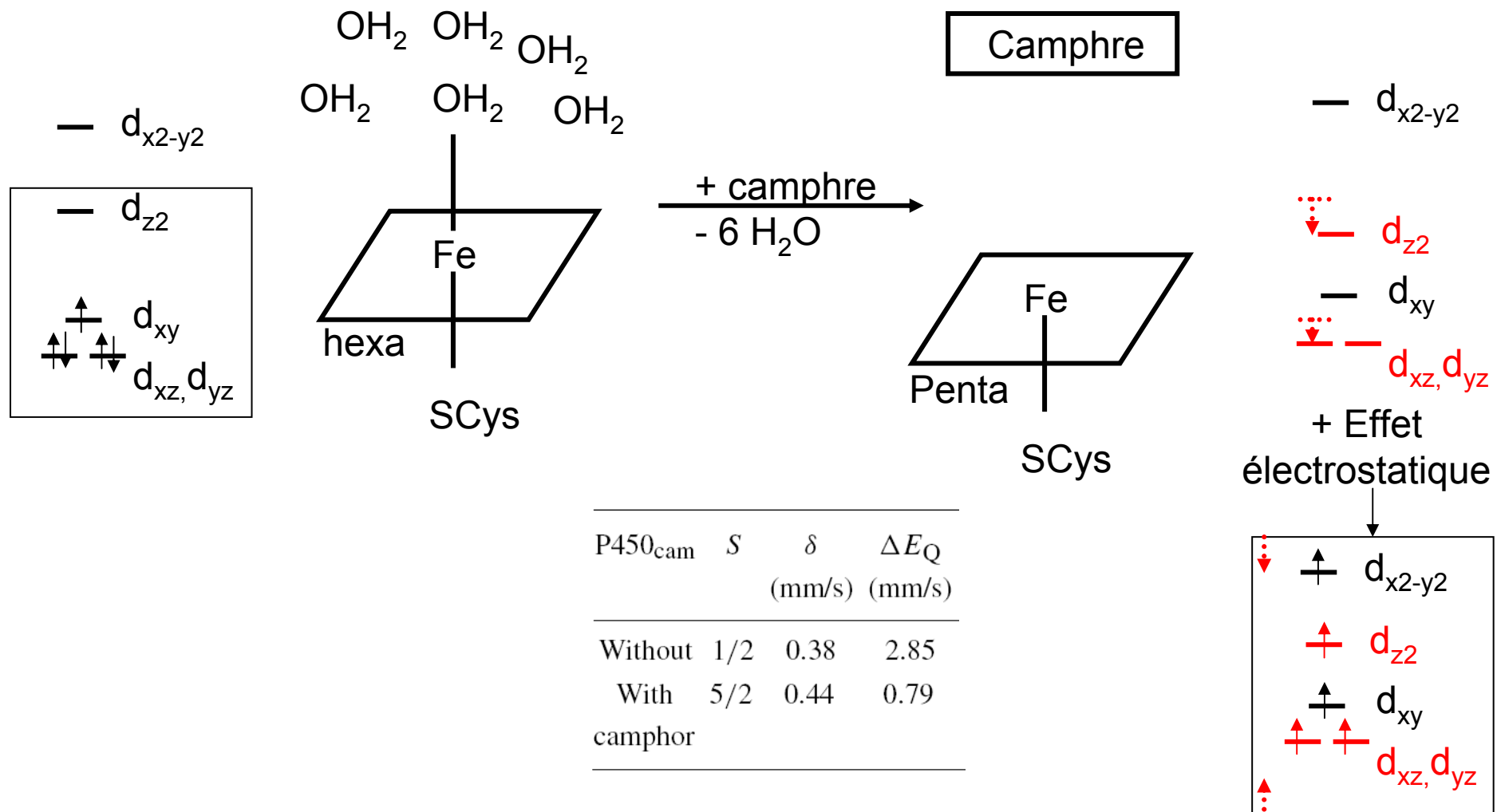
Fixation du substrat

- Interactions hydrophobes avec Leu-244 et Val-295 (substrat hydrophobe)
- Déplacement de la bande de Soret
- Rend l'hème plus facile à réduire



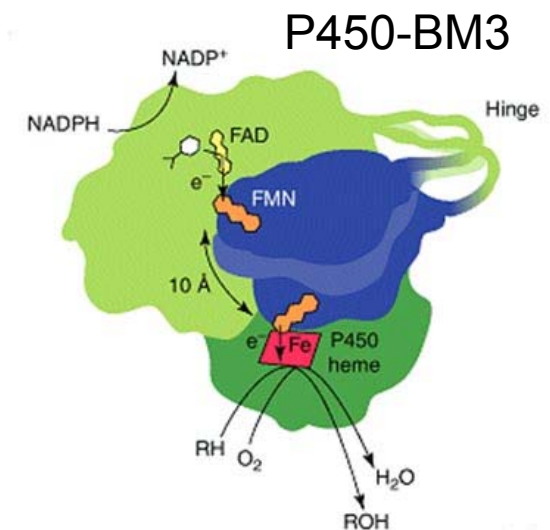
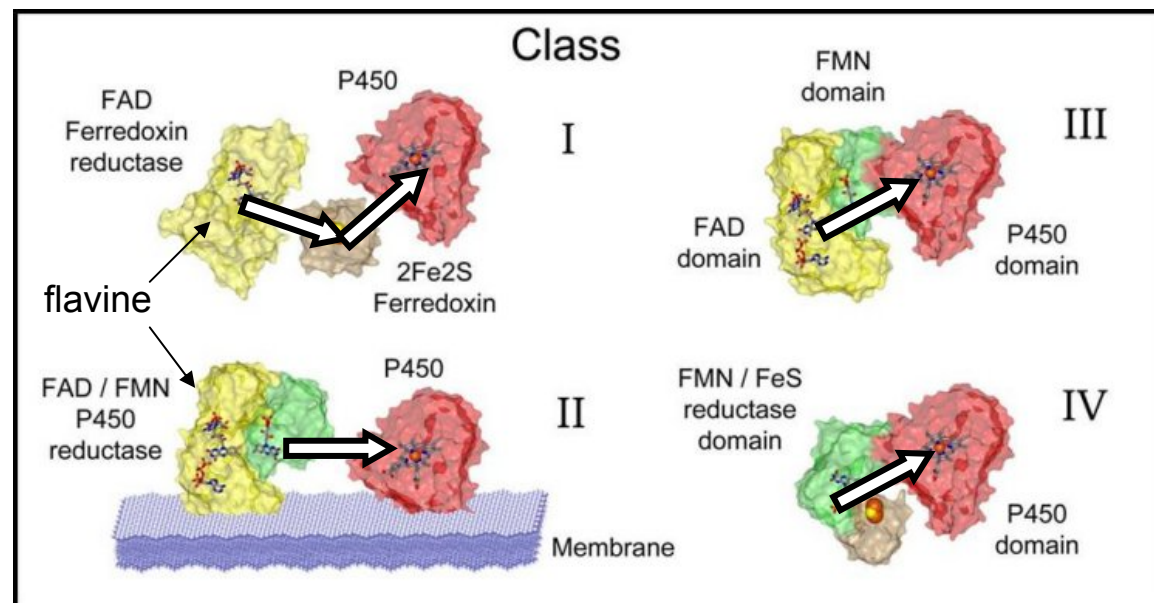
Fer 0.3 Å hors du plan

Fixation du substrat: Bas \rightarrow haut spin



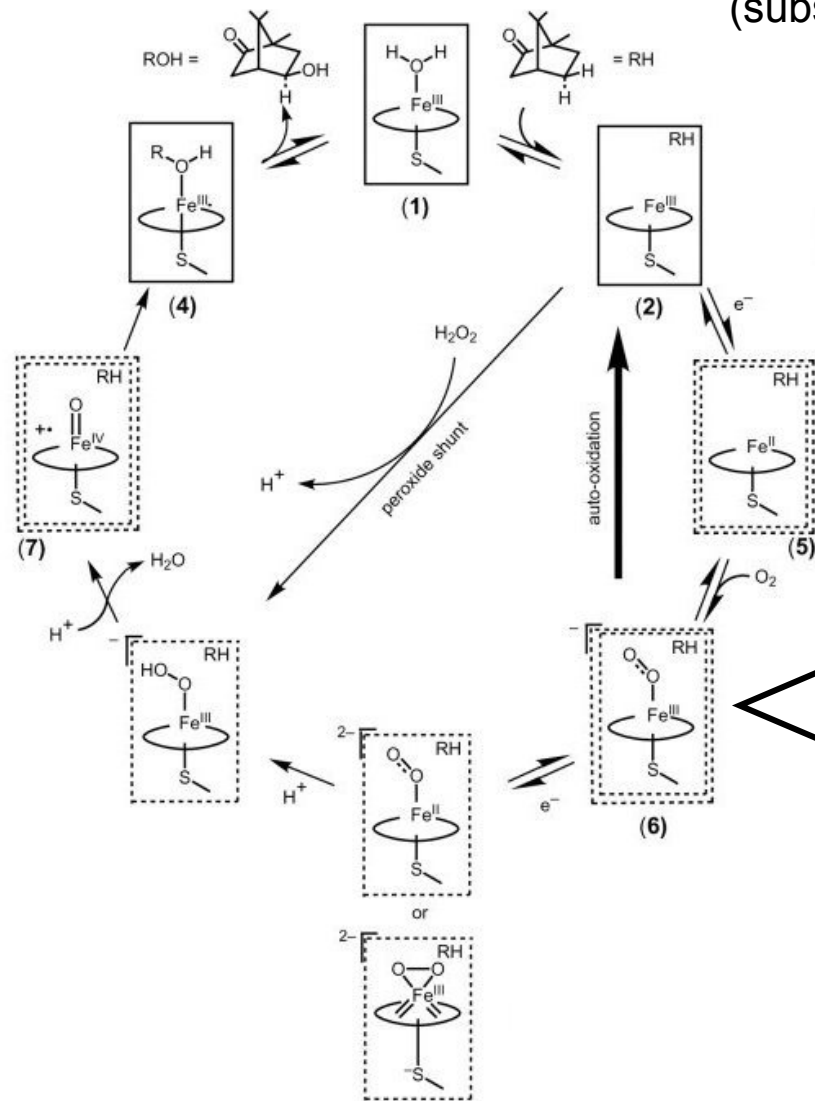
Réduction du Fer

- Classe I-II: Réduction à 1 électron du Fe(III) par une réductase (bactéries, mitochondrie...P450cam, CYP11A1, CYP11B1, CYP11B2, CYP24, CYP27A1, CYP27B1, CYP27C1)
- Classe III-IV: P450 BM3, *Rhodococcus*: Fonctionnent avec NADH directement

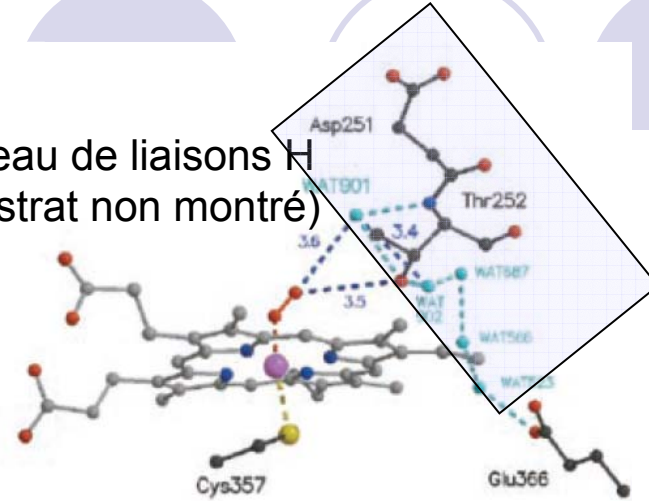


Au niveau structural: P450cam, quasi pas de modifs ($d_{\text{CysS-Fe}} = 2.2 \pm 0.2 \text{ \AA}$) alors que pour P450BM3, le substrat se rapproche (7.5 vs 3 Å du fer)

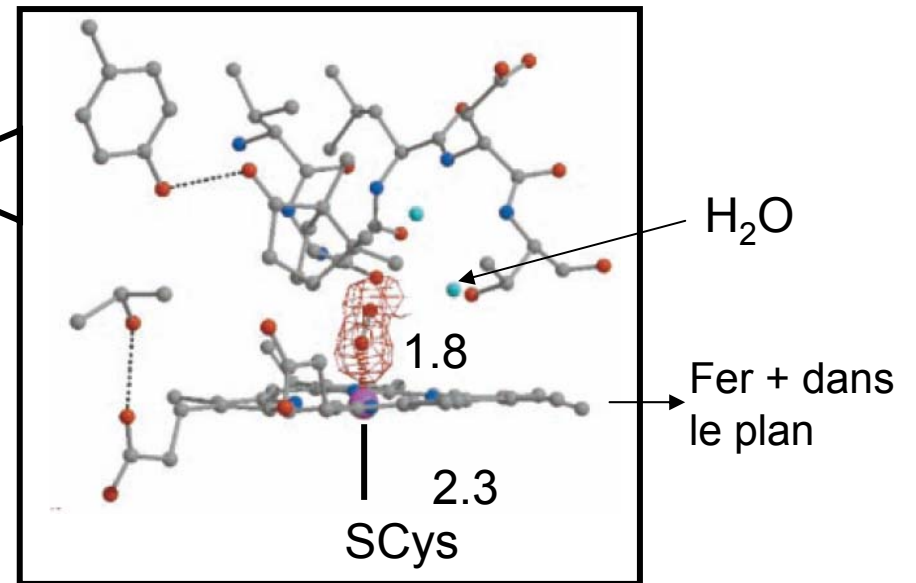
Cycle catalytique



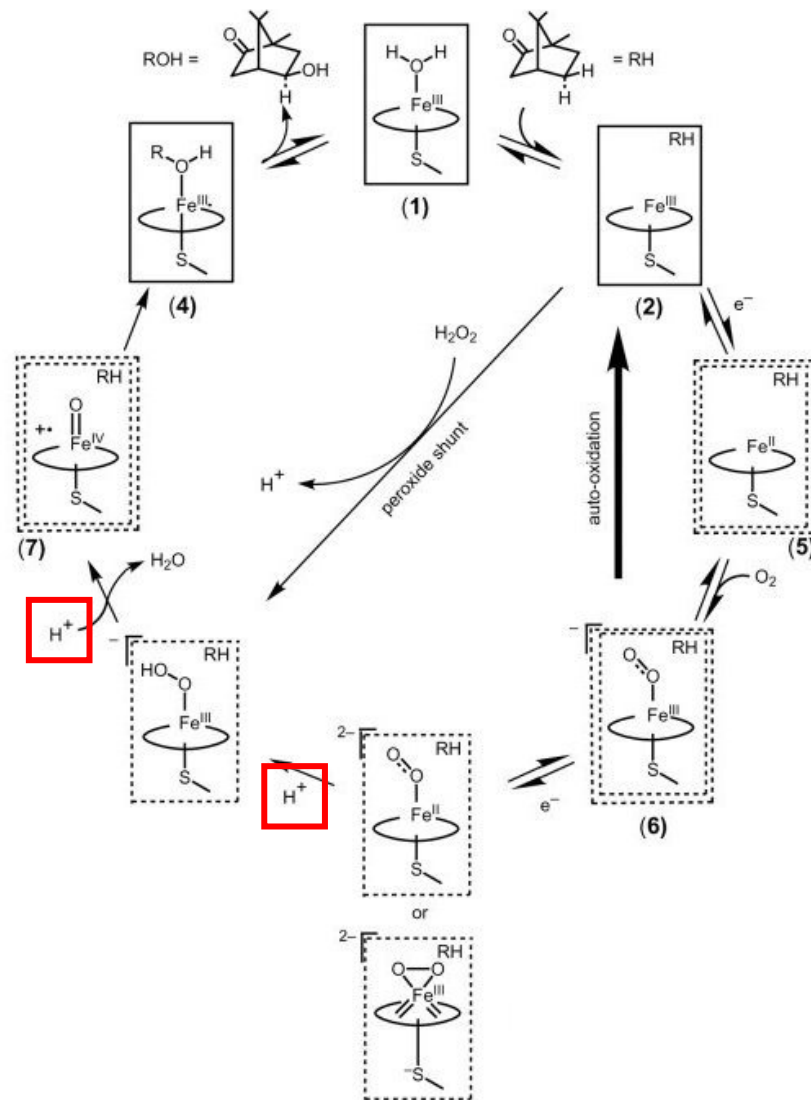
Réseau de liaisons H
(substrat non montré)



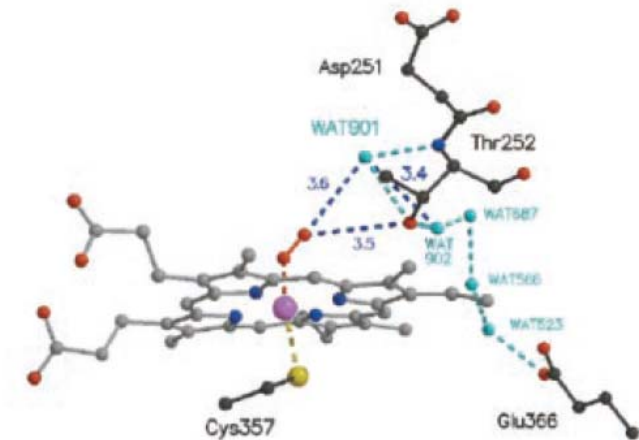
Fixation de O₂
→ Elargissement
de l'hélice I permettant au réseau de
liaisons H de se mettre en place.



Cycle catalytique

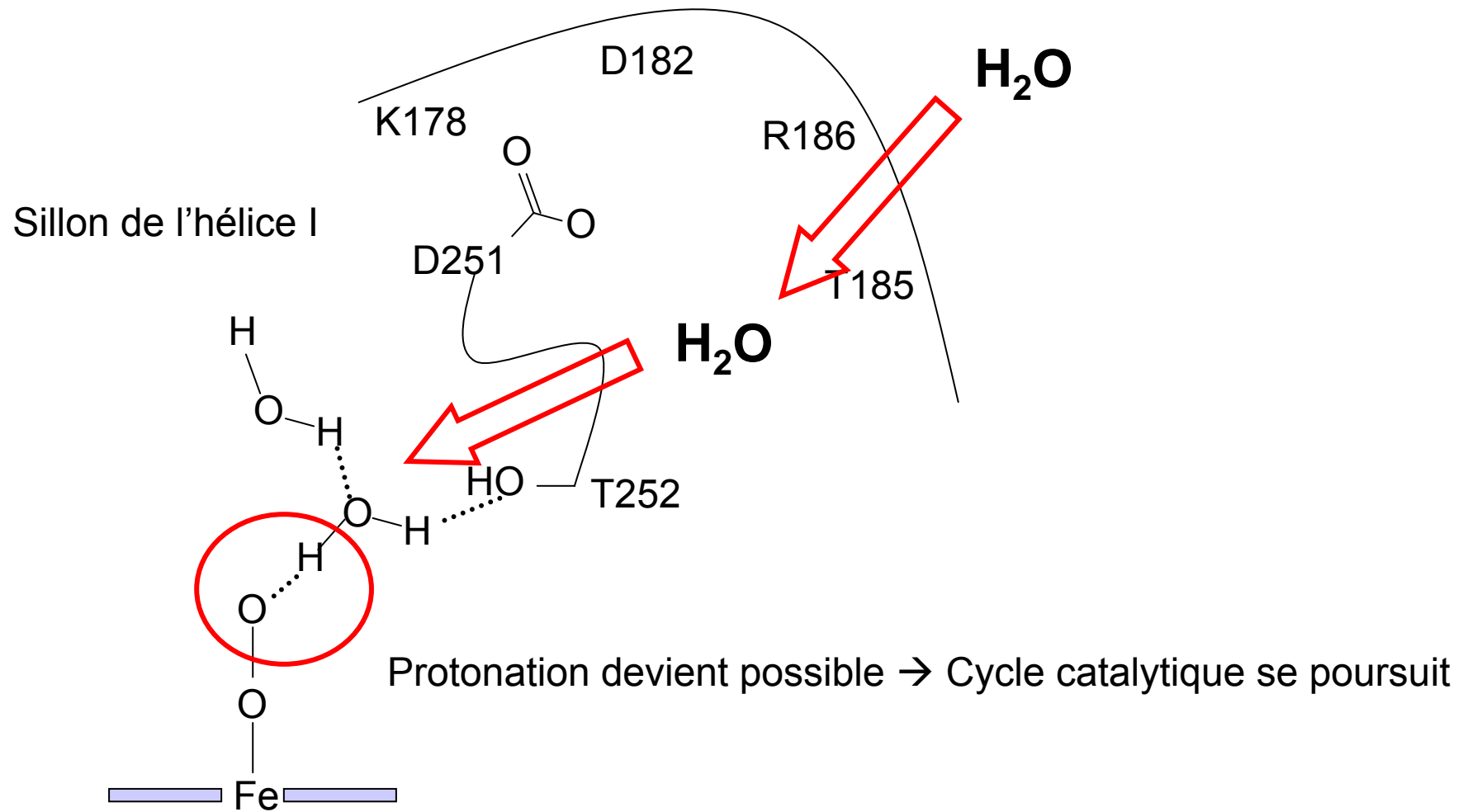


- H⁺ nécessaires, mais le site actif ne doit pas être exposé directement au solvant
- Solution: Utiliser le réseau de liaisons H:



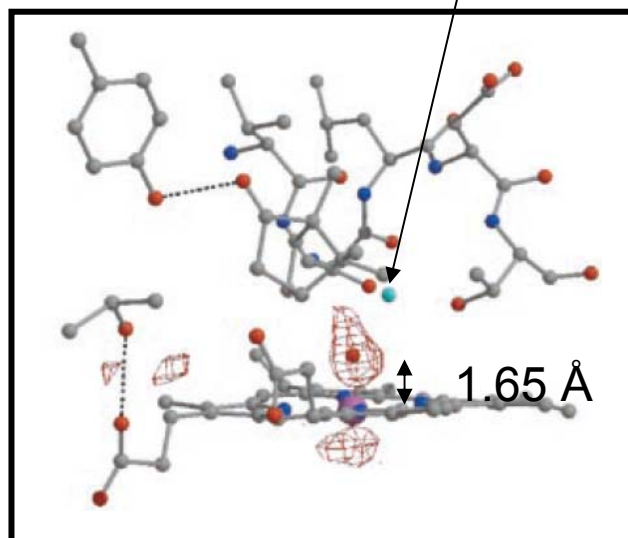
- Mutation D251N: Diminution d'activité catalytique de 2 ordres de grandeur
- Mutations T252A ou T252V: voie d'auto-oxydation très majoritaire sauf pour T252S

Proton « shuttle »

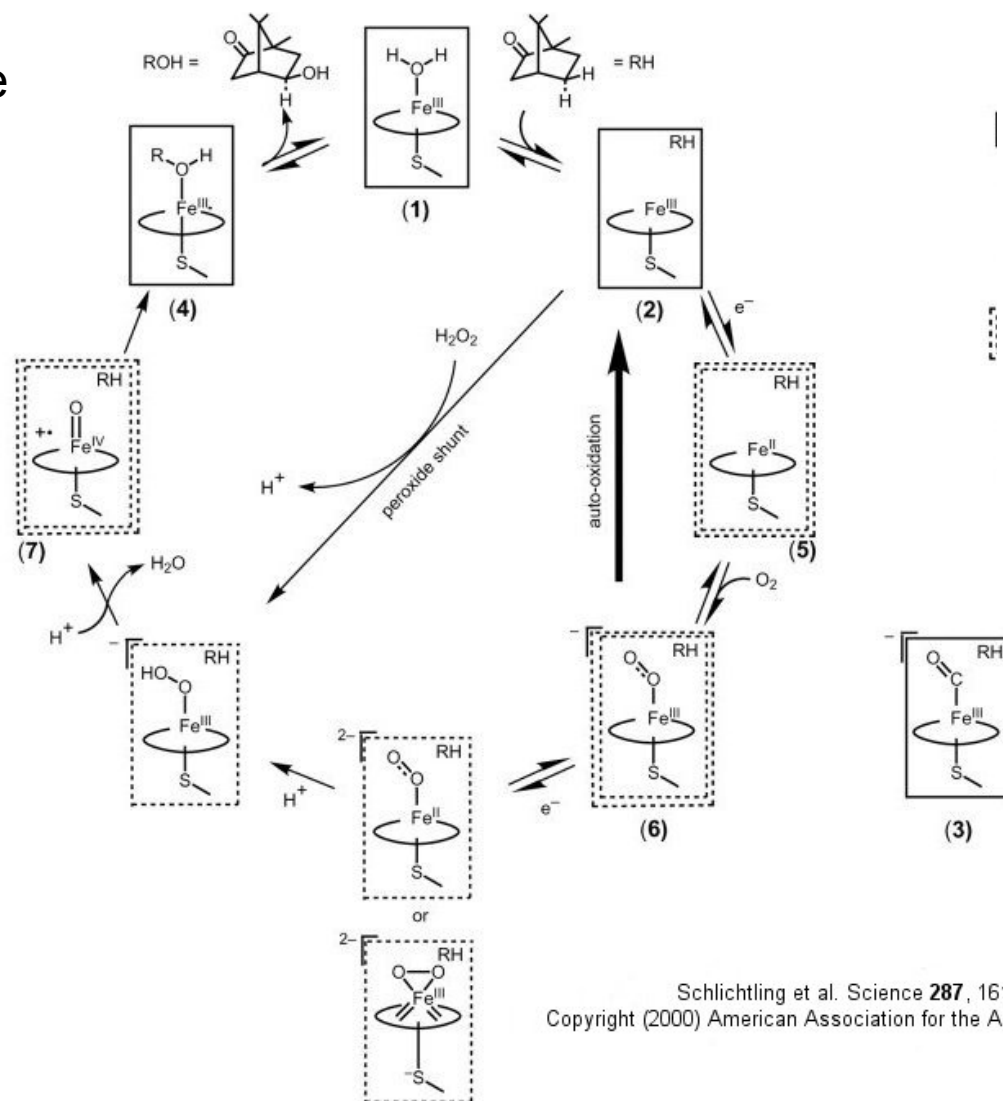


Cycle catalytique

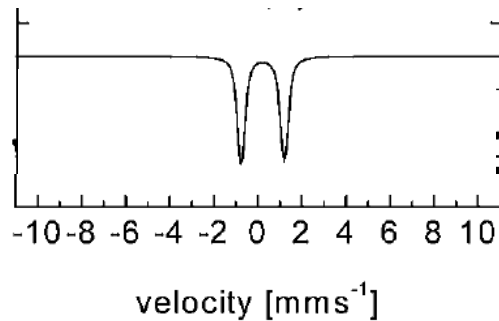
H₂O provenant de la scission de OO



Camphre bouge de 0.2 Å en direction de l'hème
dC5-O = 3.1 Å



Espèce oxydante: Fe^{IV}=O radical ou Fe^V ?

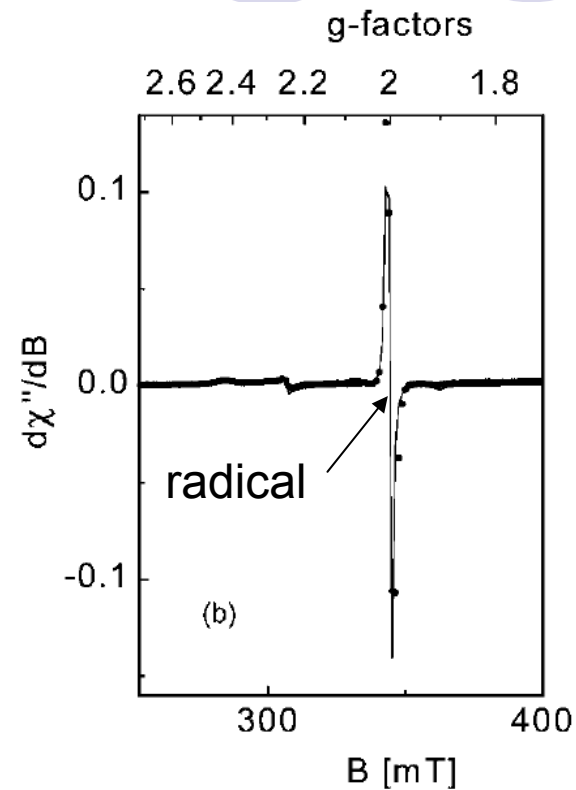
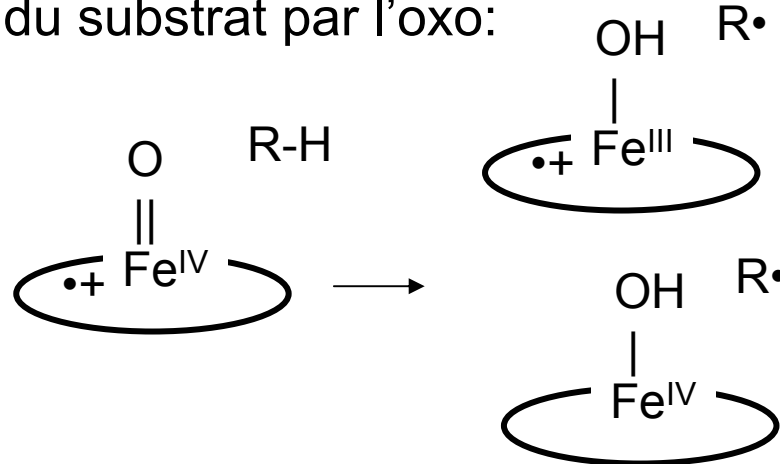


Mössbauer :

$$\delta = 0.13 \text{ mm/s}, \Delta E_q = 1.94 \text{ mm/s}$$

Fe^{IV}=O, comme MMO

- Attaque du substrat par l'oxo:

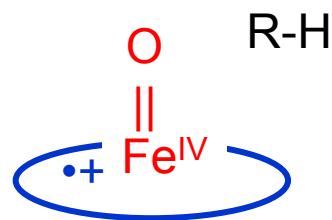


Bilan P450 vs. MMO

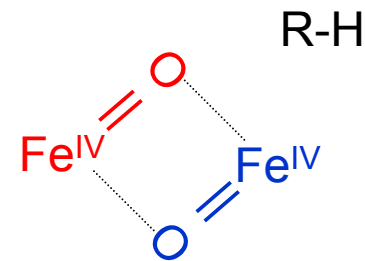
Mécanisme globalement similaire:

- Similitude au niveau du centre $\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$ très oxydant
- Différence au niveau du centre rédox complémentaire (pour compléter la réaction à 2 électrons): Porphyrine radical pour 450, 2^{eme} $\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$ pour MMO.

Centre actif:



P450



MMO

V. Conclusion: Stratégies à retenir

- Substrats faciles à oxyder:
 - Intradriol (Fe^{III}): facilite la localisation de la densité électronique sur le substrat \rightarrow Attaques électrophiles par O_2
 - Extradriol (Fe^{II}): Active O_2 par réduction à $1 e^- \rightarrow$ Localisation de la densité électronique sur O_2 lié \rightarrow Attaque de substrats électropositifs
- Substrats difficiles à oxyder:
 - P450 (hème) et MMO (non hème): Activent O_2 par réduction à $2 e^- \rightarrow$ Formation de $\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$ très déficitaire en électron (fort oxydant) \rightarrow Attaque électrophile du substrat