

# Chimie bio-organométallique

- I. Introduction
- II. Cobalt: cobalamines
- III. Mutases
- IV. Transfert de méthyl: Méthionine Synthase
- V. Nickel: Chimie de coordination
- VI. Méthyl Coenzyme M réductase
- VII. CO dehydrogenase/Acétyl CoA synthase
- VIII. Conclusion

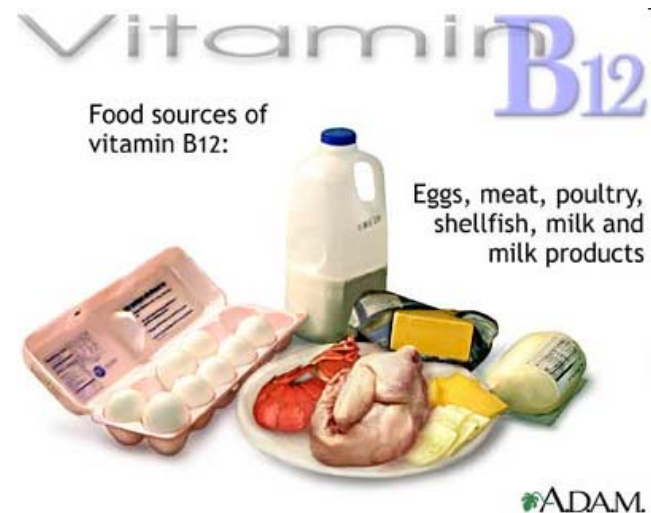
# I. Introduction



- Chimie de coordination:
  - Liaisons métal – hétéroatome essentiellement
  - l'ion métallique a un degré d'oxydation assez élevé.
  - Caractère de la liaison métal-ligand = plutôt ionique
- Chimie organométallique:
  - Liaisons métal – carbone
  - l'ion métallique a souvent un degré d'oxydation faible (0, +I) voire négatif).
  - Liaison fortement covalente
- Le métal (nature et degré d'oxydation) va fortement influencer la formation ou non de liaisons métal – C
- Parmi les métaux « biologiques », le Fe Ni et le Co vont former de telles liaisons

Rem: Chimie organométallique très développée dans le domaine des catalyseurs.

- Liaisons M-C rares dans le domaine du vivant, mais existent et jouent un grand rôle.
- Liaisons M-C avec: Ni, Co et Fe (Fe = hydrogénases, non détaillé ici)



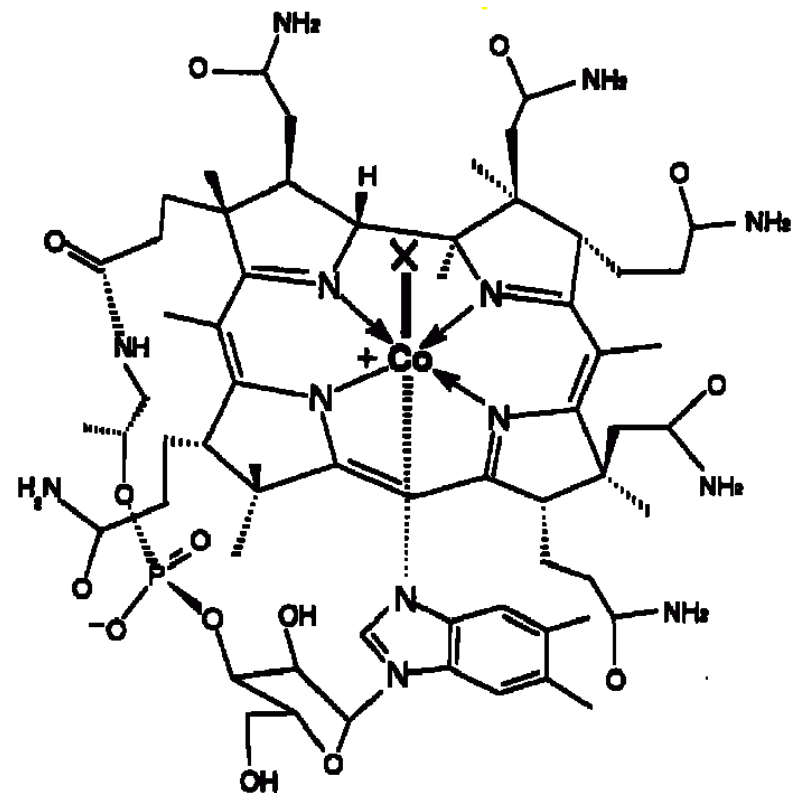
Cas le plus courant: vitamine B12 aussi appelée cobalamine ou coenzyme B12.

## II. Cobalt: cofacteur cobalamine (coenzyme B12)

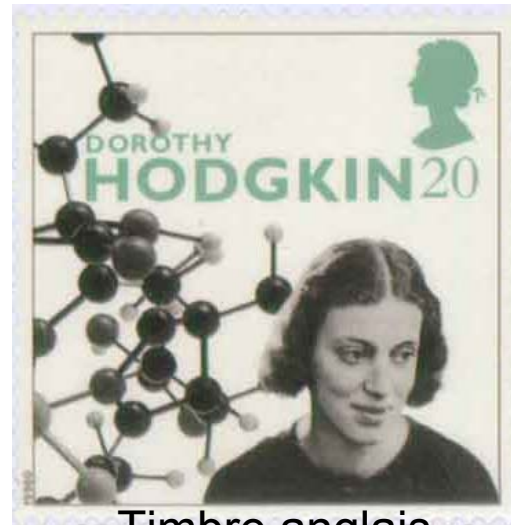
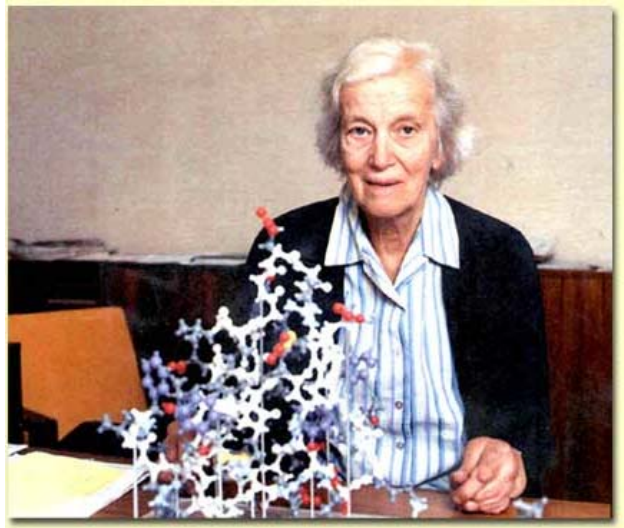
- Vit B12 synthétisée uniquement par certaines bactéries, algues et champignons
- Essentielle pour tous les organismes vivants supérieurs. Ceux-ci ne la trouvent que dans leur nourriture, d'où son appellation vitamine.
- Fonctions en tant que cofacteur:
  - Réactions de biométhylation nécessaires pour la multiplication des cellules humaines à partir d'ADN
  - pour transformer certaines molécules (méthionine).

# Structure des cobalamines

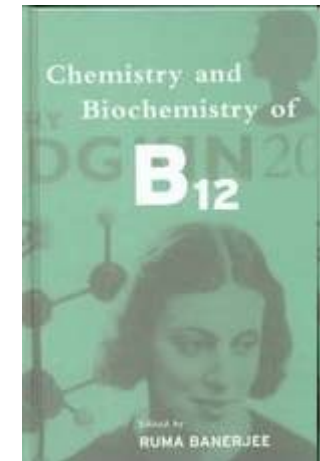
- Cycle corrine ( $\neq$  porphyrine, plus réduit):
  - Moins flexible
  - Moins plat
  - Moins conjugué
- Présence d'un nucléotide
- Cobalt (+I) – (+III) au centre.
- X peut être  $\underline{\text{C}}\text{H}_3$  ,  $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{AdoMet}$  (CN- ou OH- aussi)



# Structures des vit B12: Dorothy Hodgkin (1910-1994) (Cristallographe anglaise)

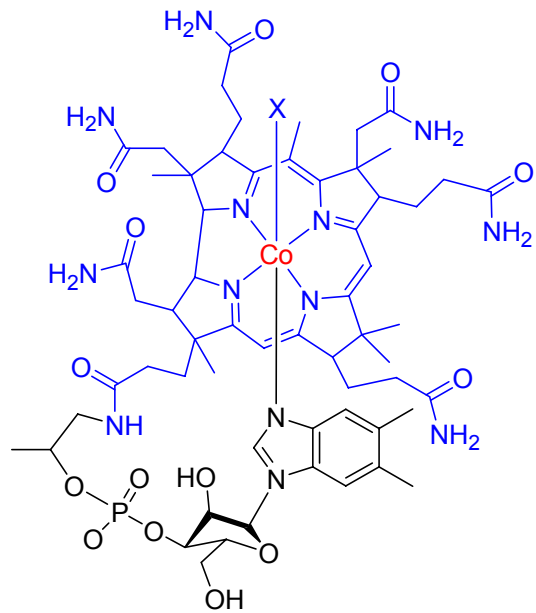


Timbre anglais

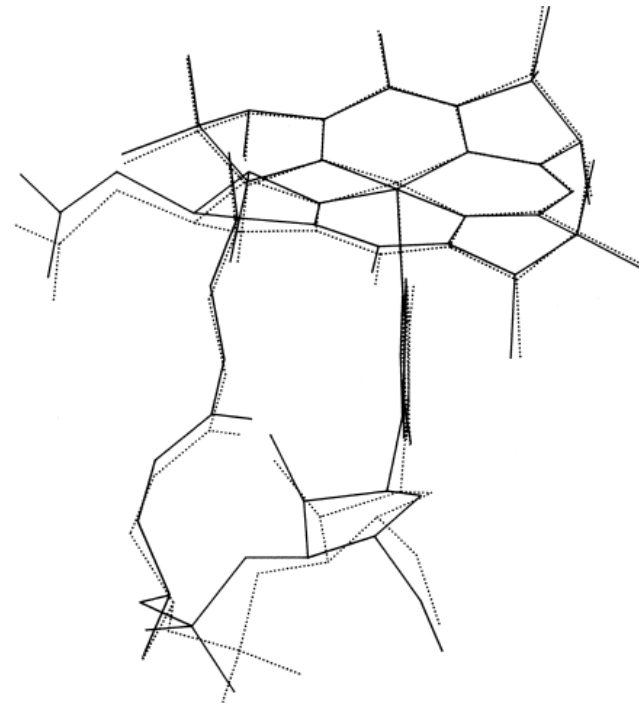
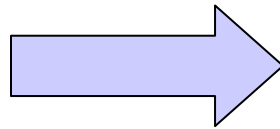


- Réalisa en 1933 la 1ere structure RX d'une protéine
- 2eme femme membre de l'ordre du mérite d'Angleterre
- Militante et ancienne présidente (75-88) de l'association « Pugwash » de scientifiques actant pour la paix ([www.pugwash.org](http://www.pugwash.org))
- Prix Nobel de Chimie en 1964
- Restée le plus longtemps Chancelière à Bristol après Winston Churchill

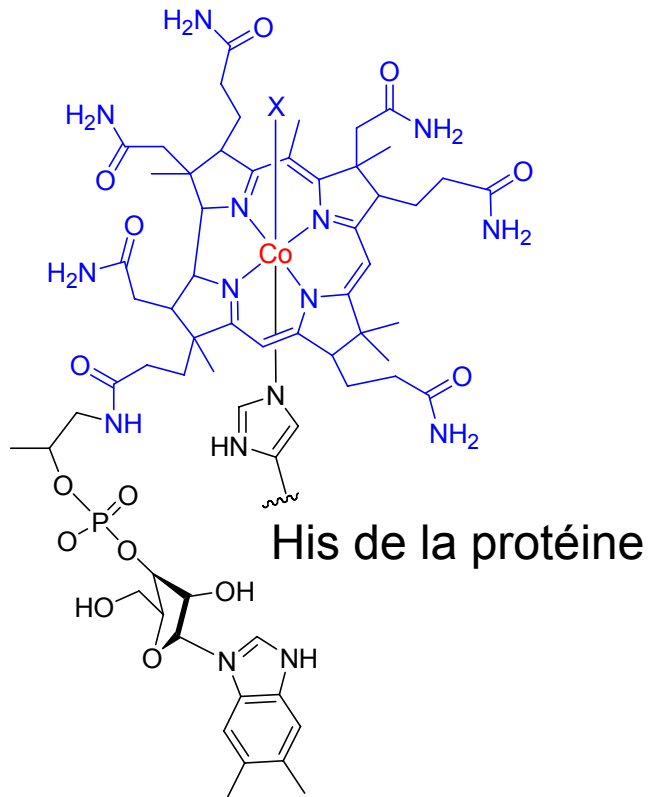
# Structure de la cobalamine en solution



En solution



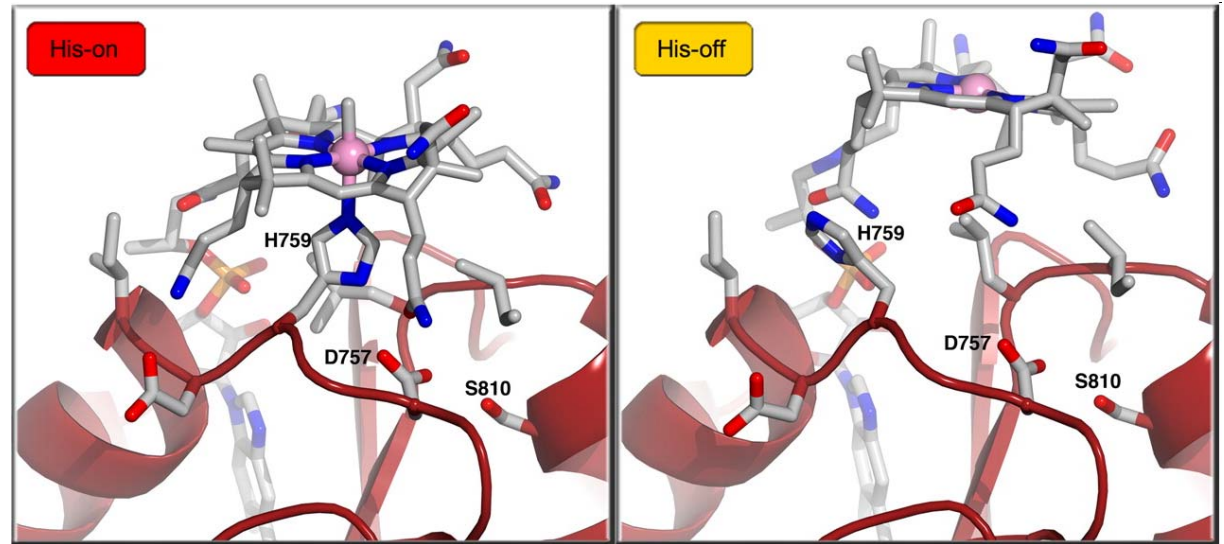
# Structure de la cobalamine liée à une protéine



His de la protéine

Dans la protéine

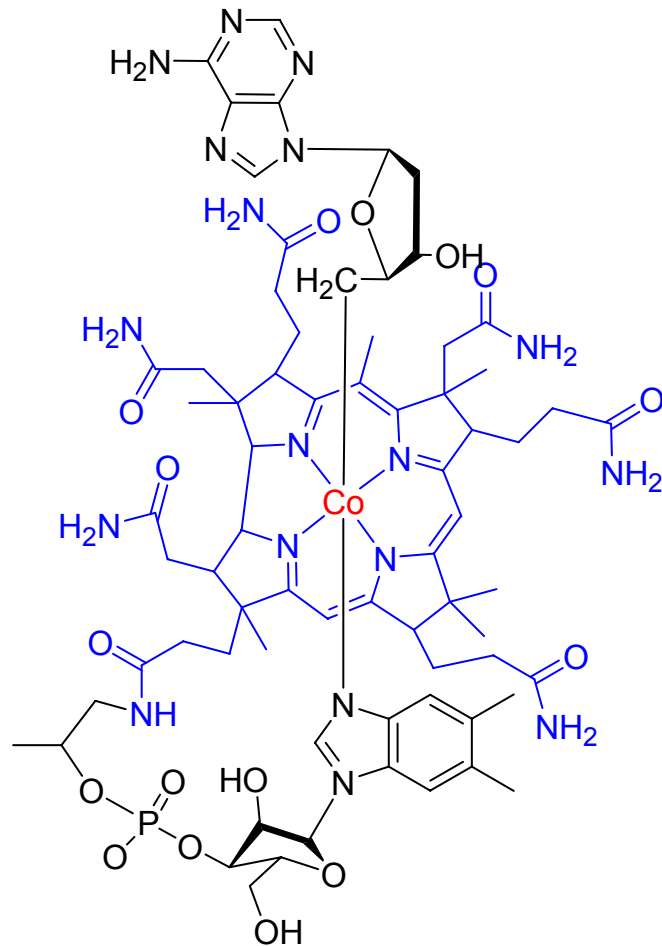
## Méthionine synthase



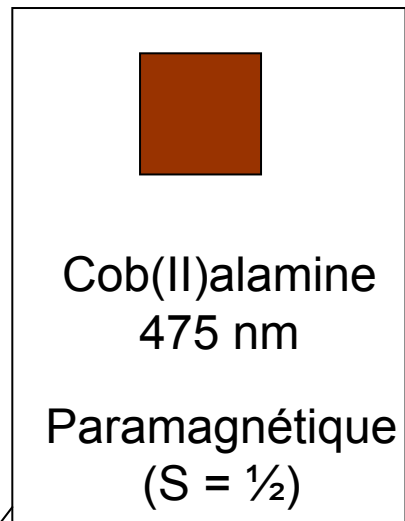
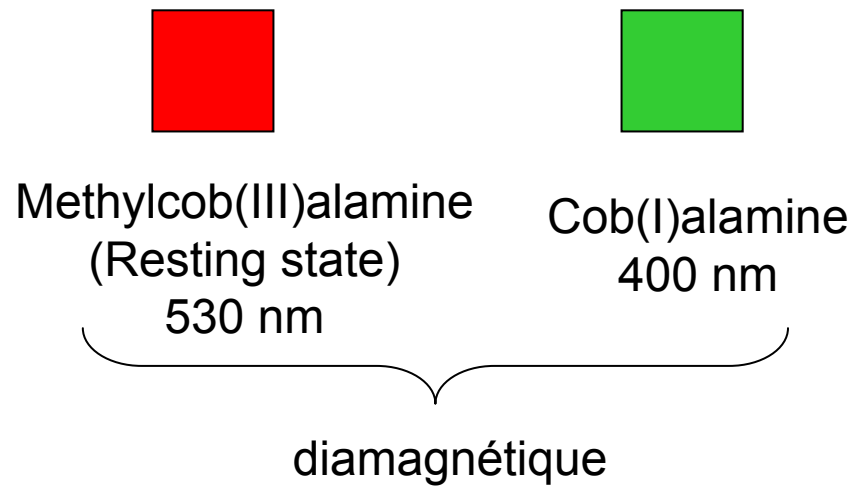
En fonction de l'état de protonation des résidus



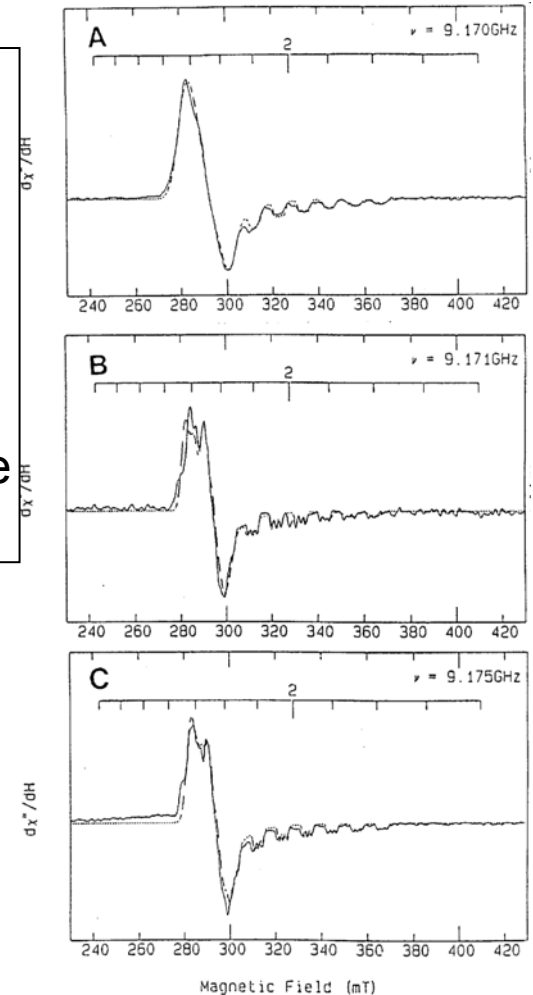
# Déoxyadésonylcobalamine



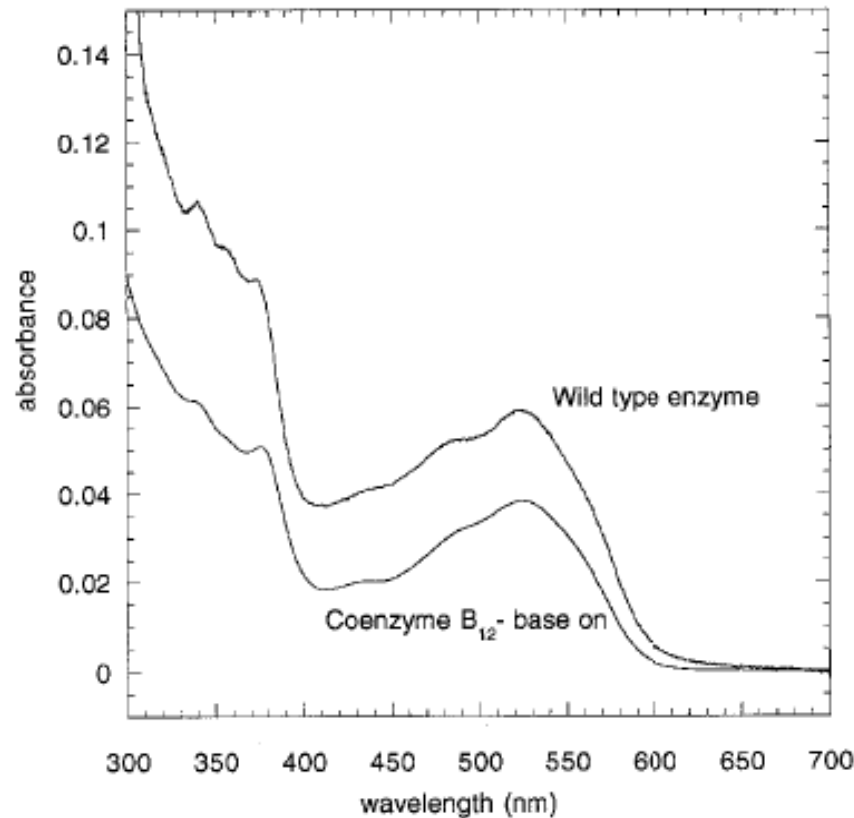
# Couleur et magnétisme des cobalamines



Généralement cette forme est inactive



# Spectroscopie d'une protéine comportant une cobalamine



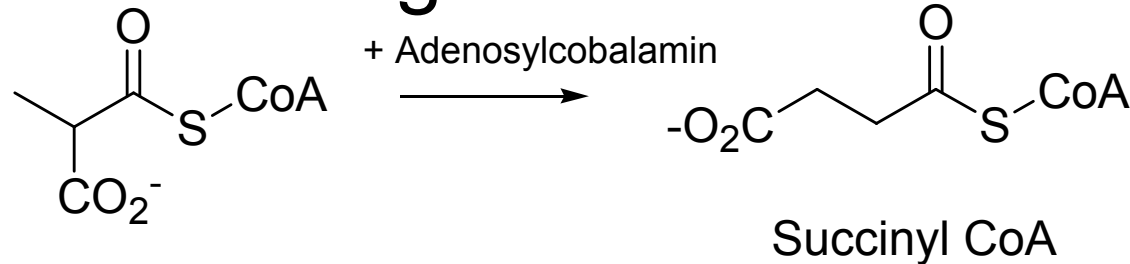
Spectre UV-Vis de la protéine  $\approx$  cofacteur

→ Facile d'étudier par UV-Vis ce qui se passe au niveau du cofacteur au cours du cycle catalytique

→ Ex: Lorsque diminution à 500-580 et augmentation à 390-490 nm = Coupure homolytique de la liaison Co-C

# Réactions des cobalamines

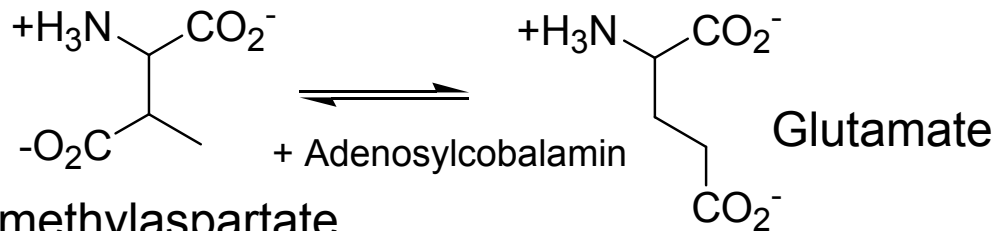
## ● Réarrangements: Mutases



Méthylmalonyl CoA

Methylmalonyl CoA mutase

Succinyl CoA



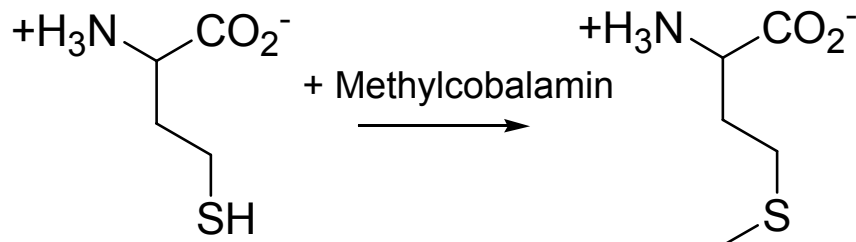
3-méthylaspartate

Glutamate mutase

Glutamate

CO<sub>2</sub><sup>-</sup>

## ● Transfert de méthyl (-CH<sub>3</sub>)



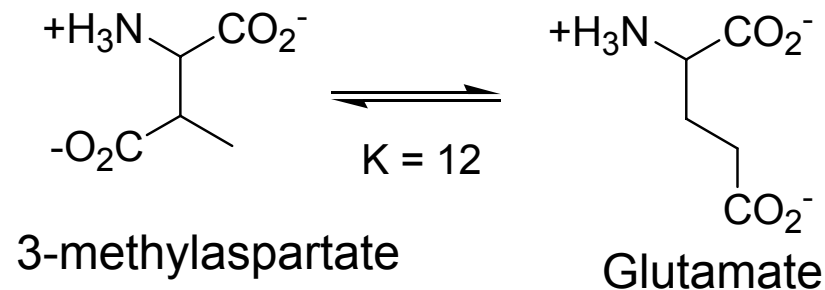
Homocystéine

Methionine Synthase

Méthionine

# III. Mutases:

## 1. Glutamate mutase

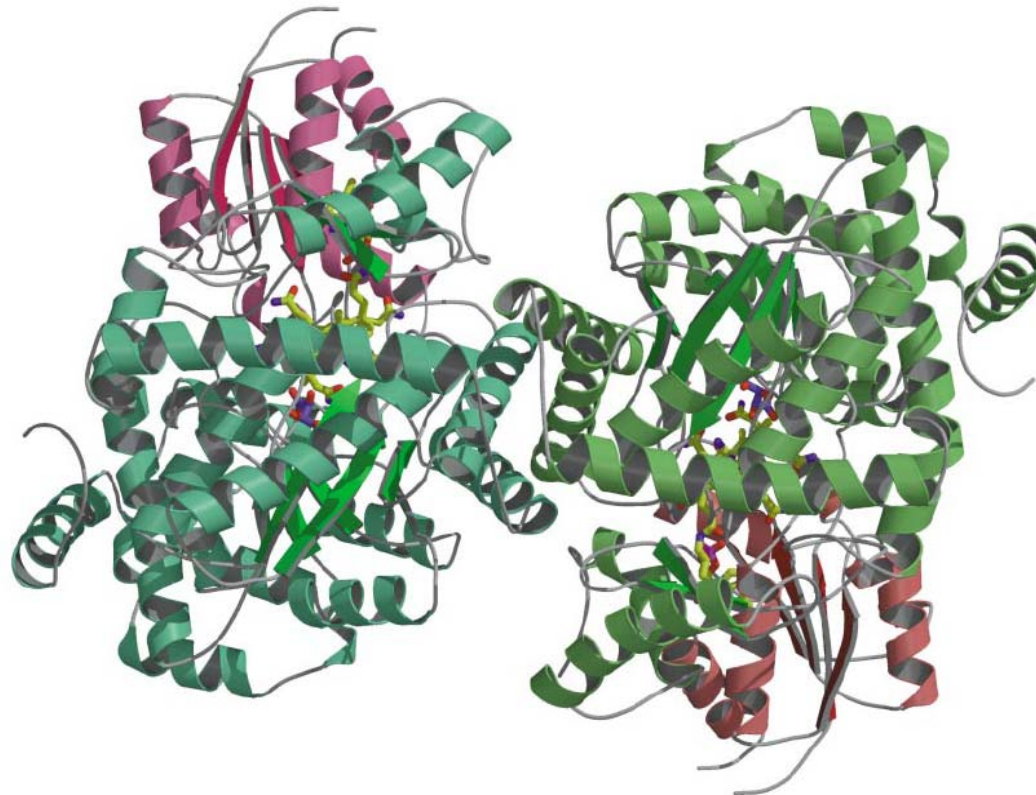


Rôle: fermentation sur glutamate

Dans micro-organismes capables de pousser sur glutamate en conditions anaérobies

Rappel: Passe par Co(I), forme très réduite → Milieu réducteur (anaérobe)

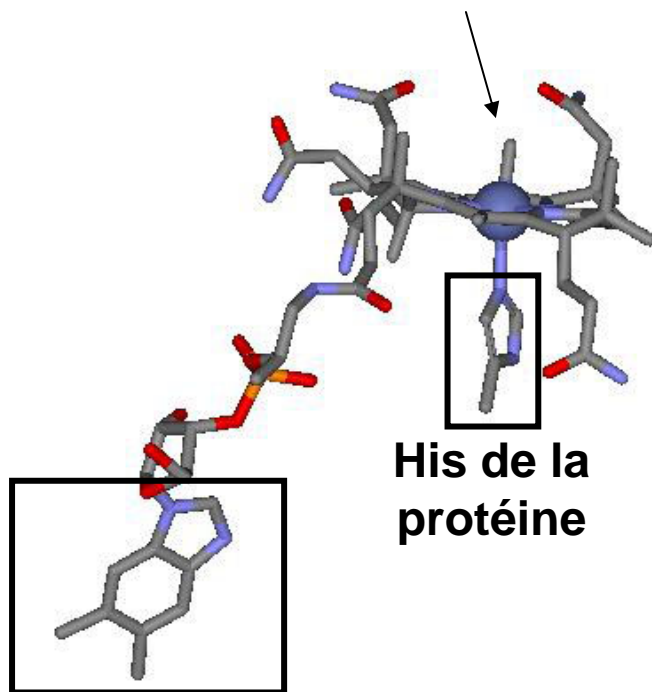
# Structure de la protéine



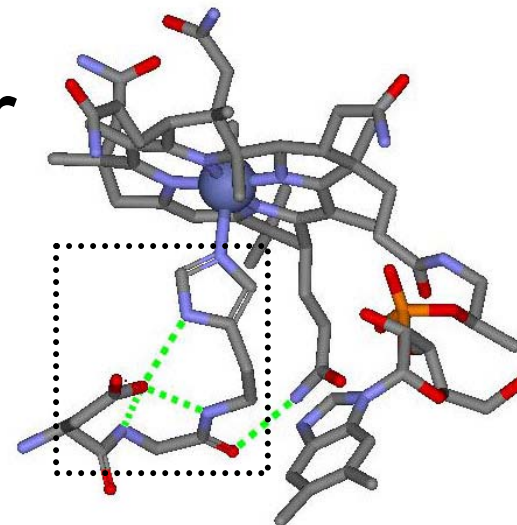
*Clostridium*: Hétérotétramère de 140 kDa avec 2 domaines de fixation pour le cofacteur B12

# Fixation du cofacteur

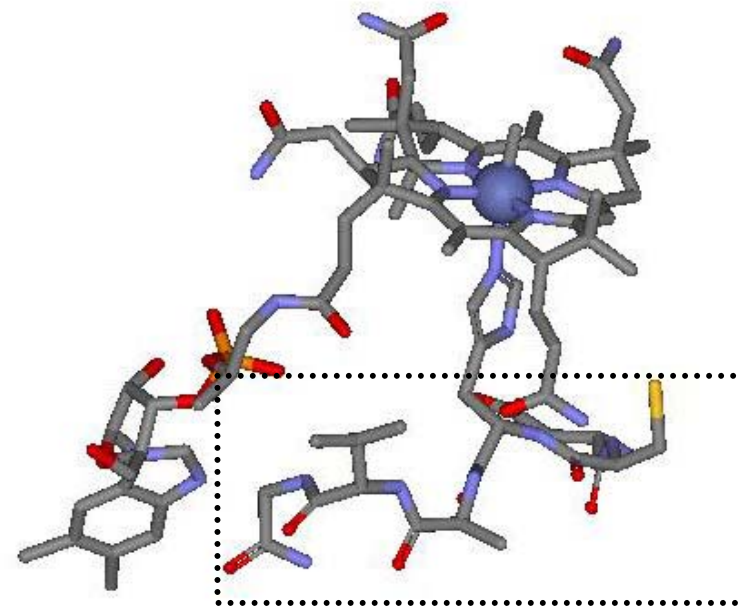
Methyl ici, mais Ado dans la forme active



**Ne coordine pas !**

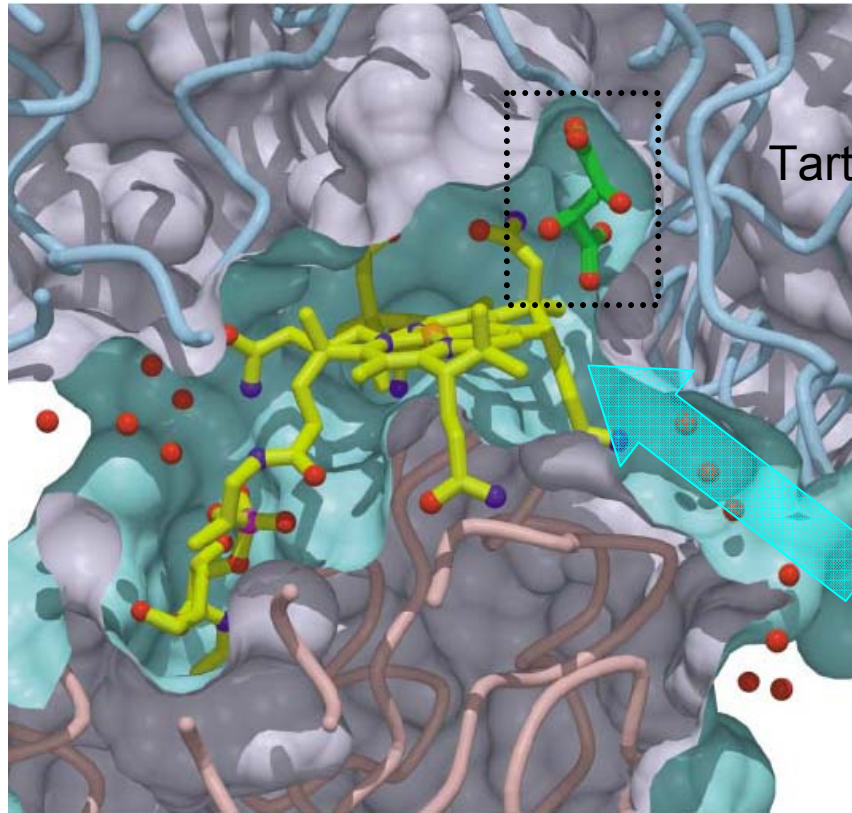


Liaisons H stabilisantes



Consensus: DxHxxG présent dans plusieurs souches de Glutamate mutases

# Fixation du substrat



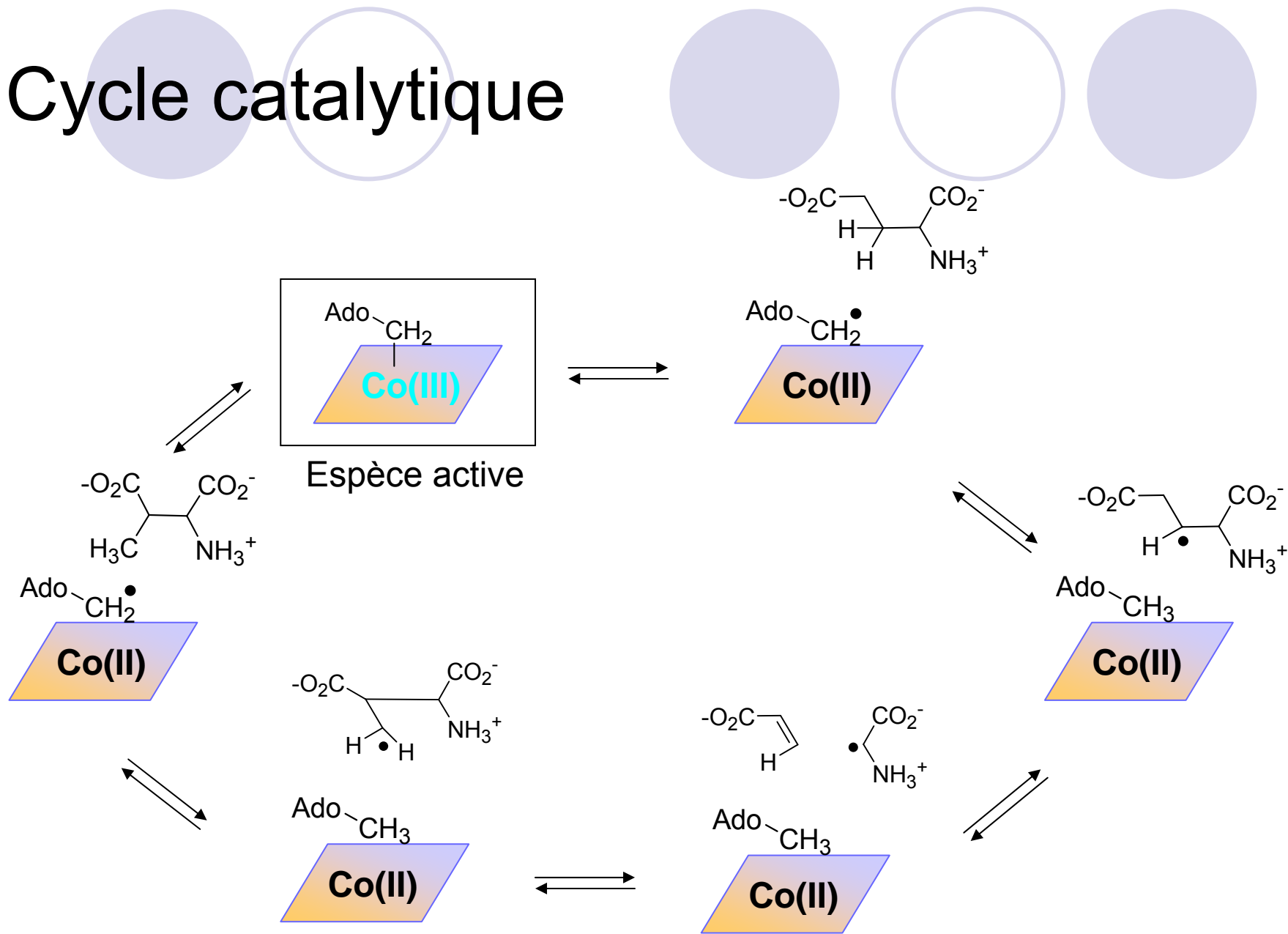
Tartrate mimant le substrat

Canal emprunté par le substrat  
(rempli de molécules d'eau ici)

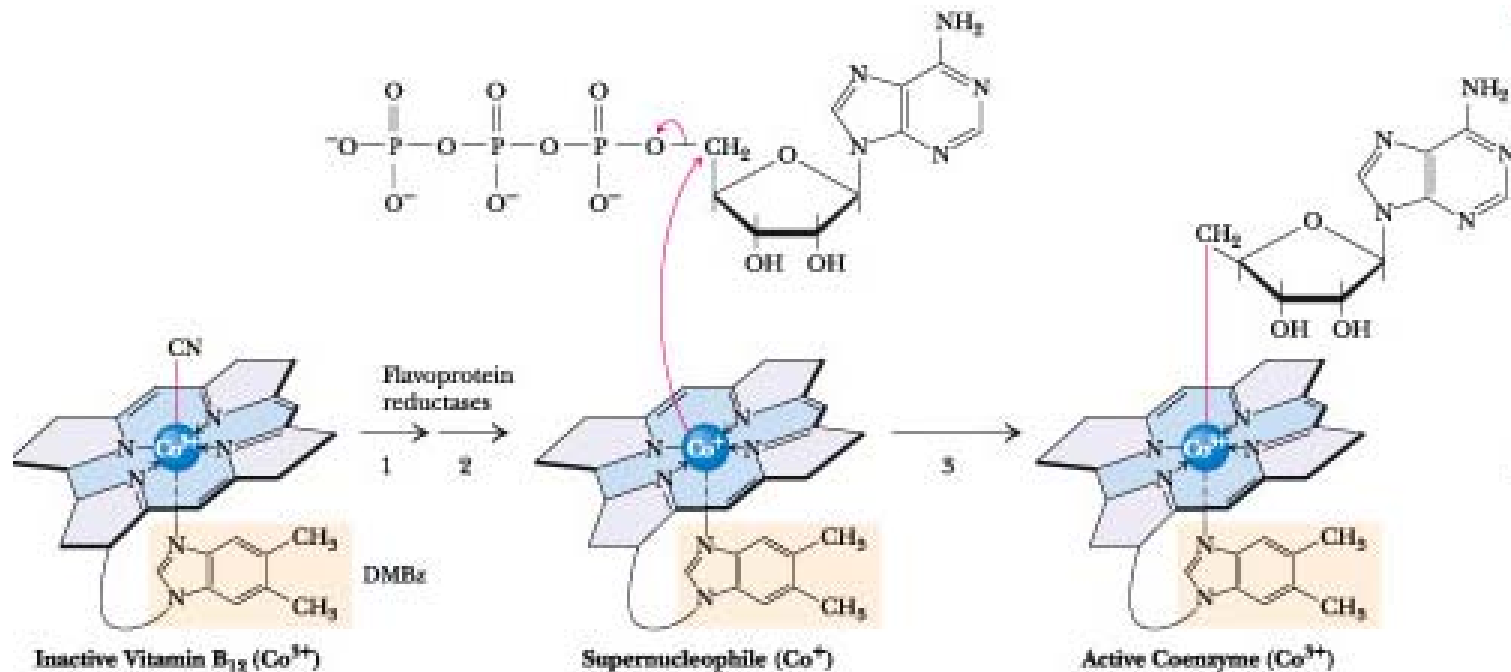
Le site actif est enfoui dans la protéine



# Cycle catalytique

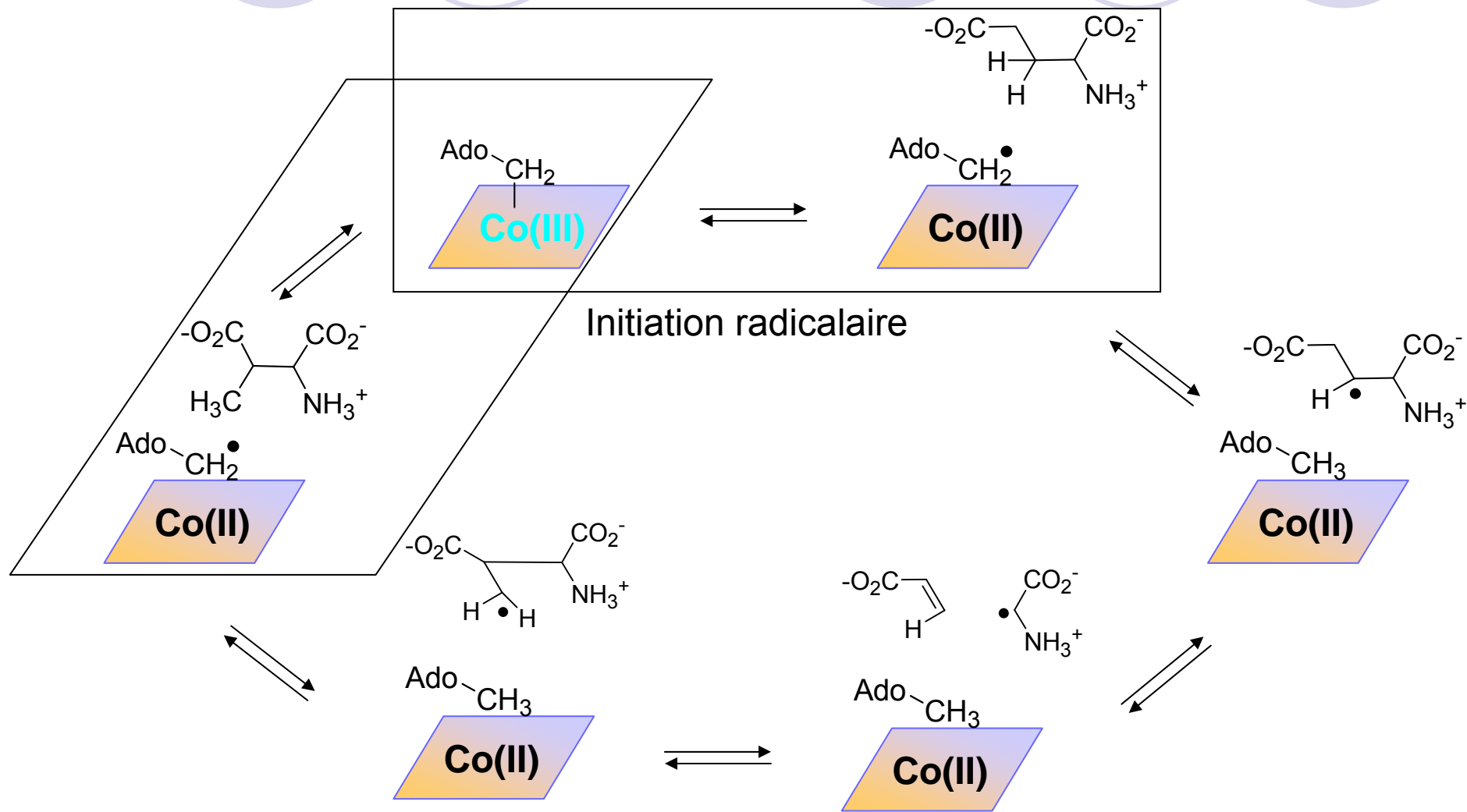


# Activation du coenzyme B12



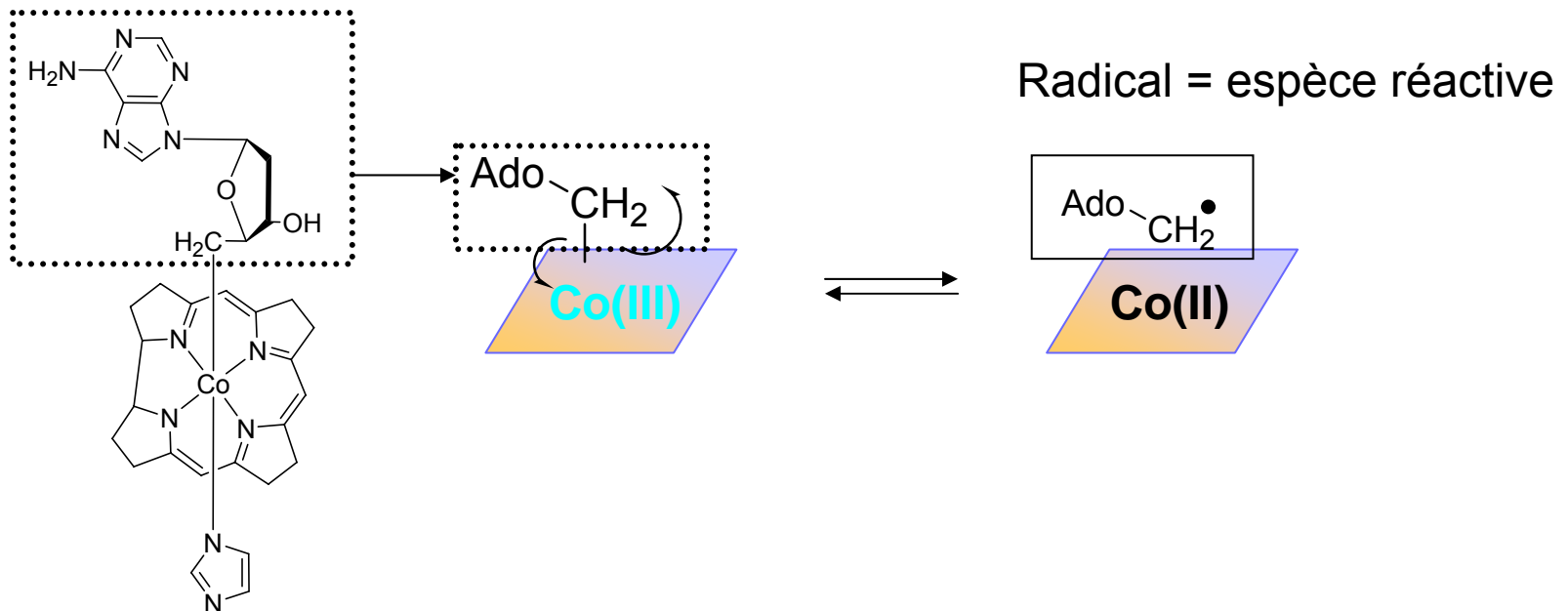
Un des 2 seuls transferts d'adénosyl connus (l'autre est la formation de la S-adenosylmethionine) dans les systèmes biologiques

# Cycle catalytique

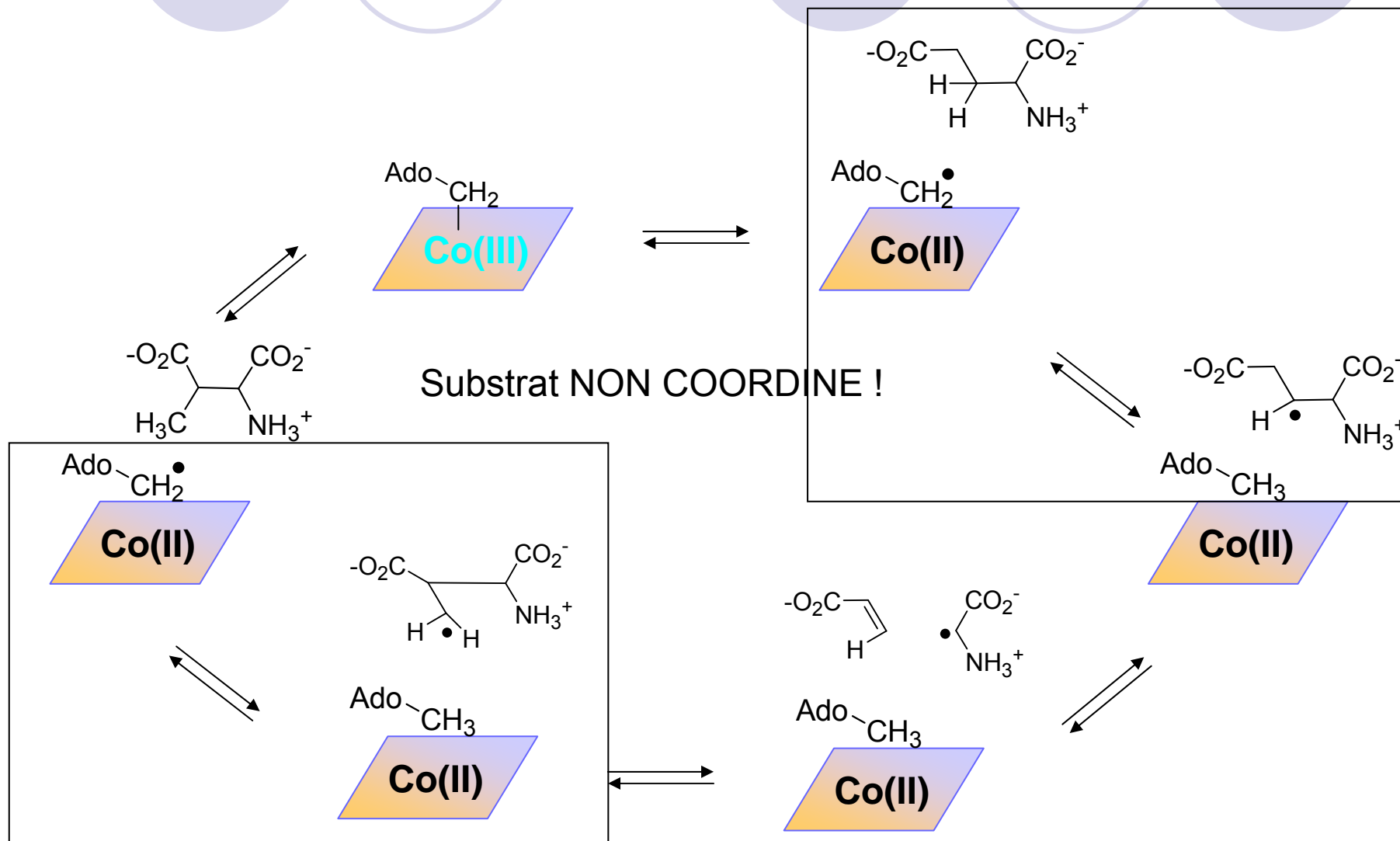


# Mécanisme catalytique

- Radicalaire et commun avec les autres enzymes dépendantes de l'Ado-cobalamine
- Cofacteur = source de radical 5'deoxyadénosyl par coupure homolytique de la liaison Co-C
- Rem: Energie de la liaison Co-C en solution = 30 kcal/mol; 15kcal/mol dans l'enzyme en présence de substrat

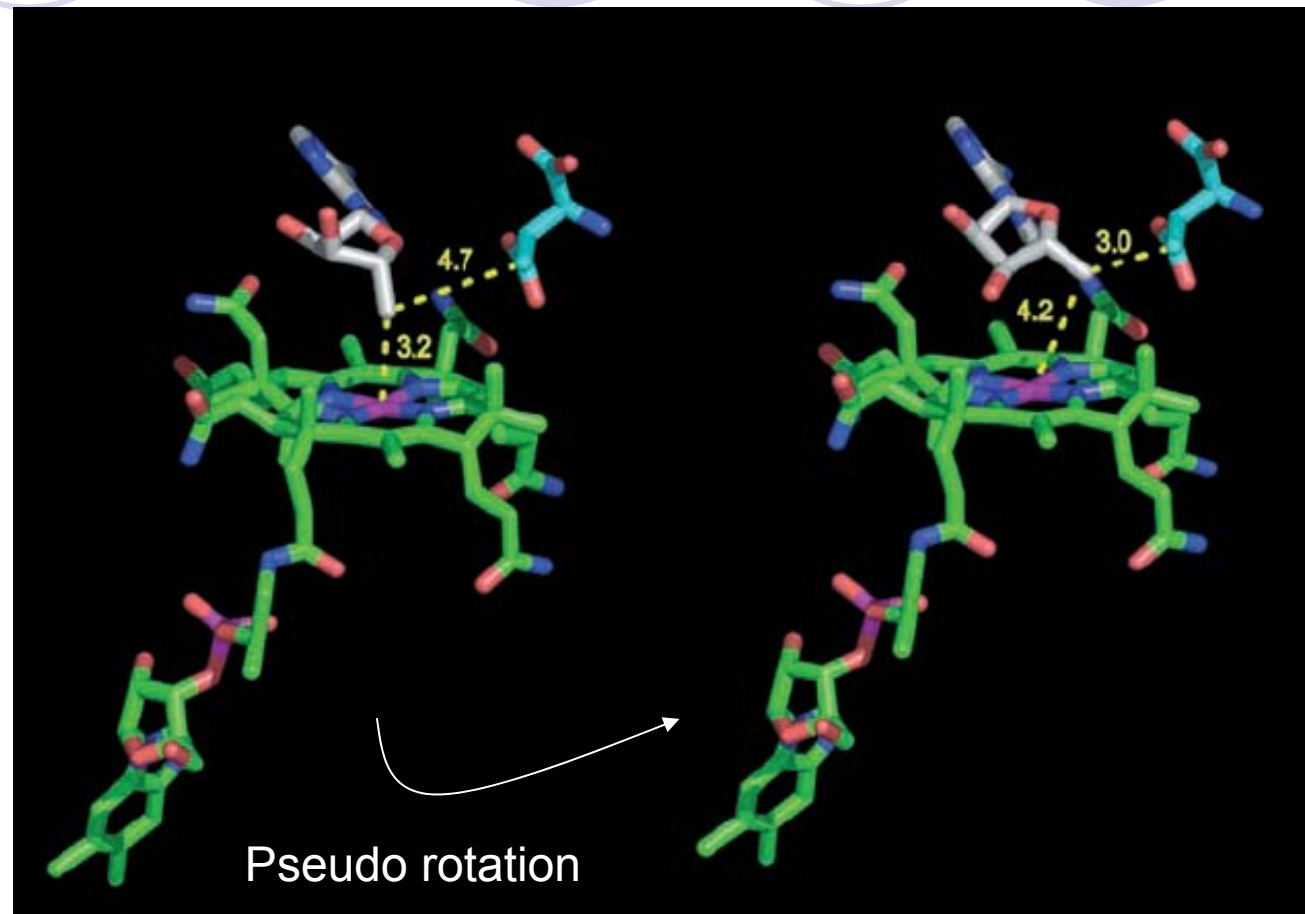
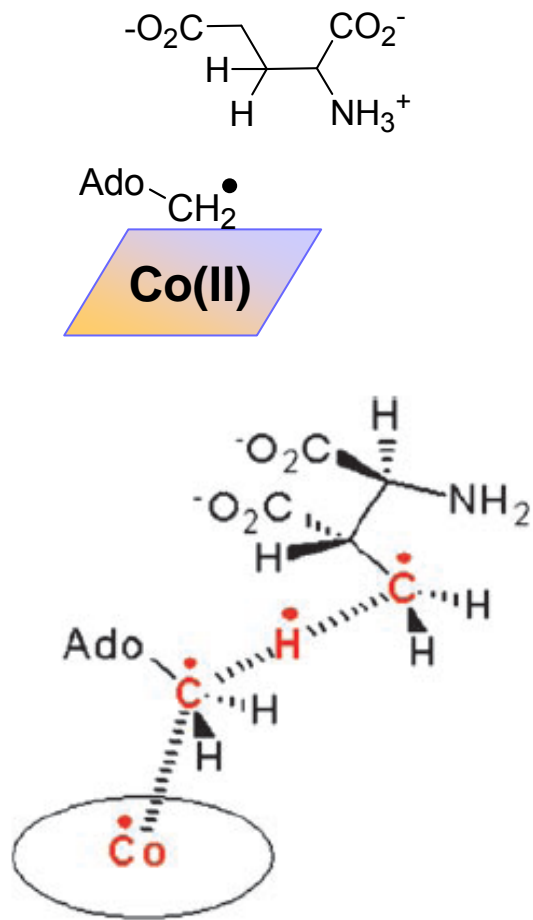


# Cycle catalytique



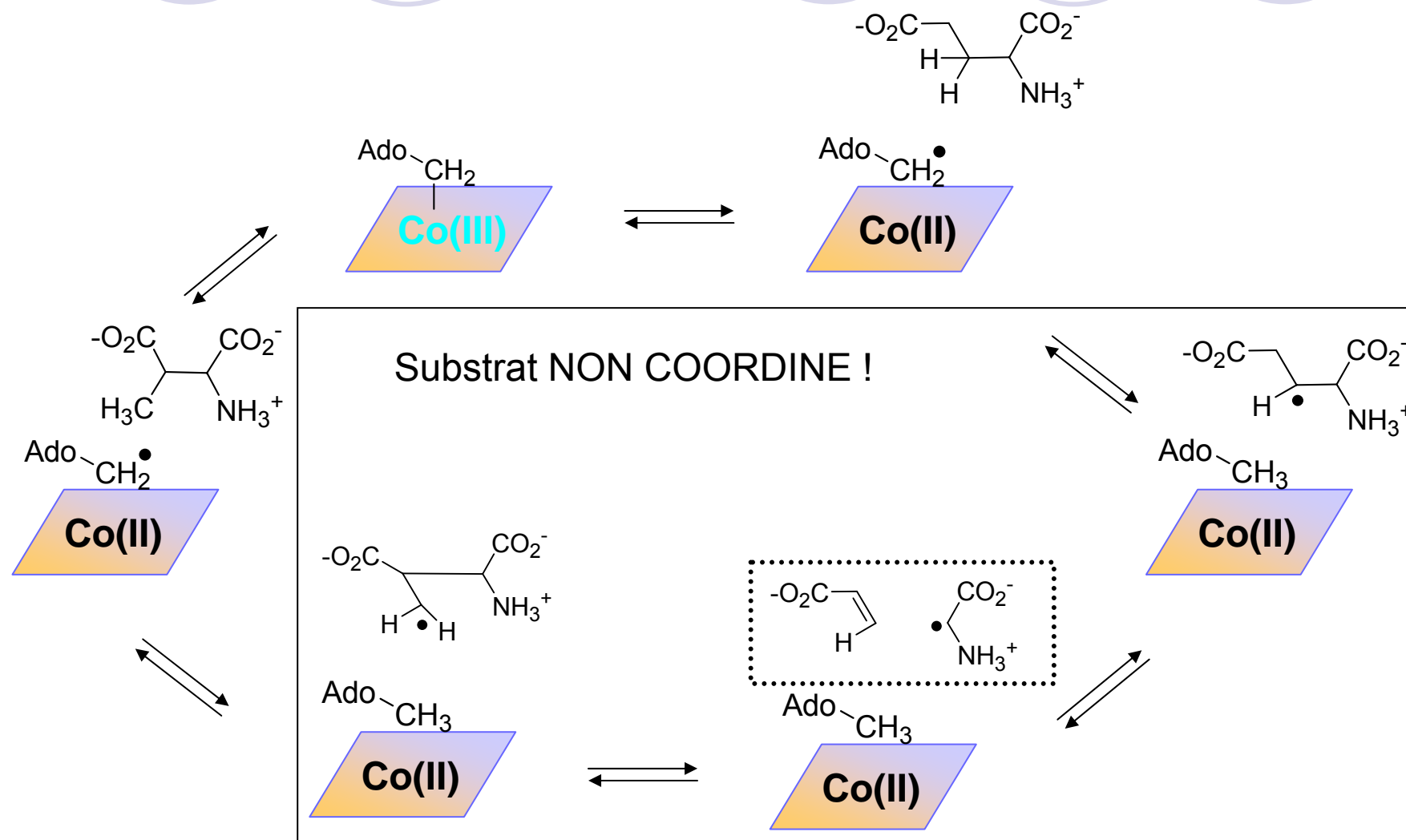
Abstraction d'hydrogène du substrat: Réaction très facile pour un radical !

# Abstraction d'hydrogène



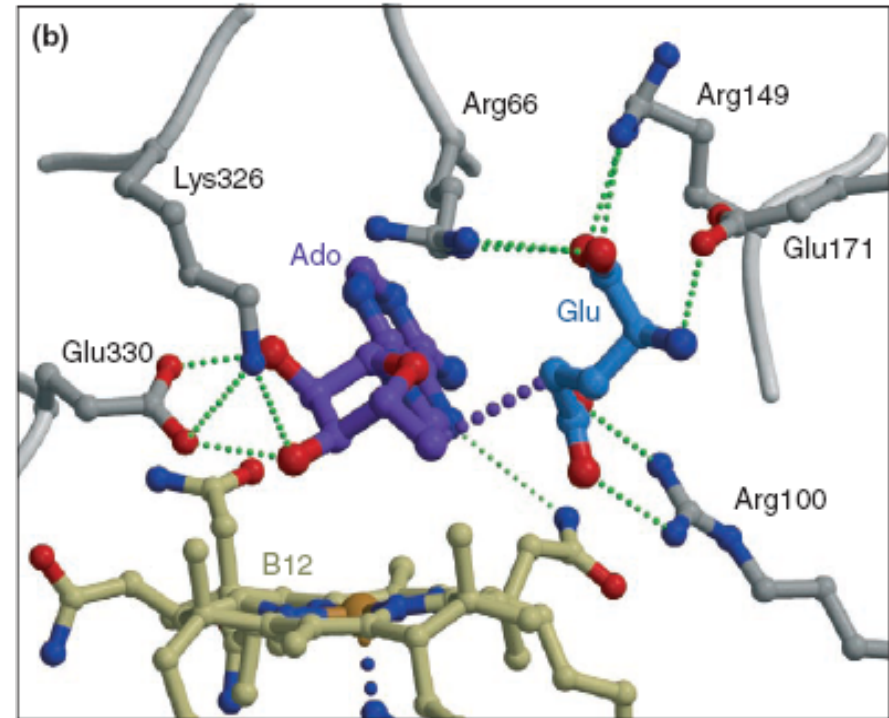
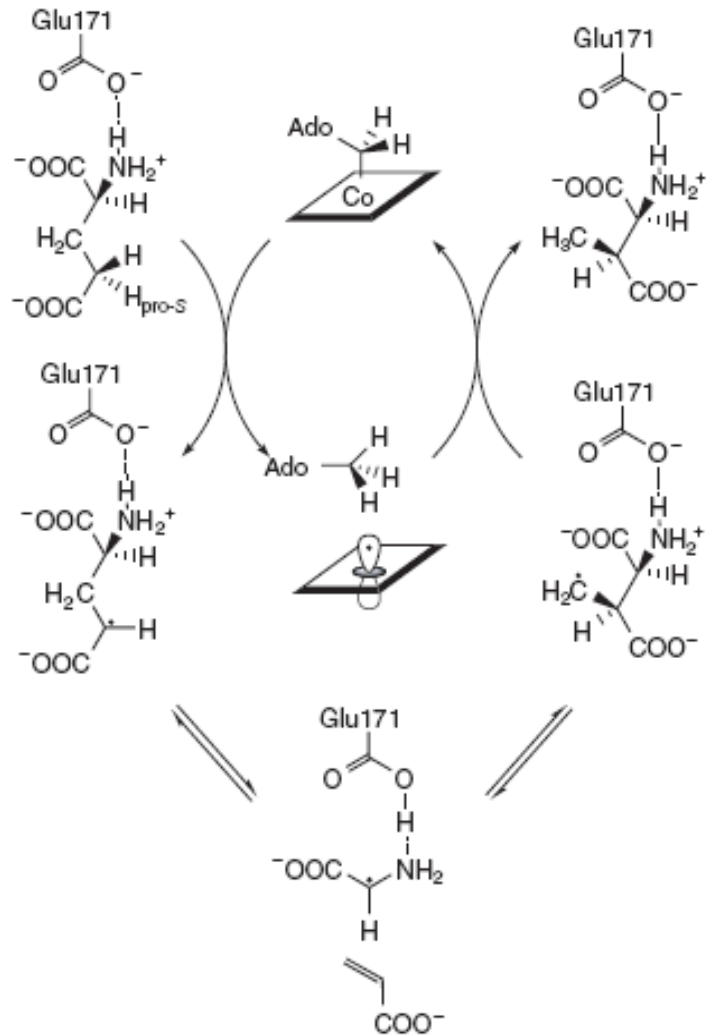
Transfert d'un  $\text{H}^\bullet$  vers l'AdoMet

# Cycle catalytique



Liaisons H entre la protéine, H<sub>2</sub>O et les CO<sub>2</sub><sup>-</sup> maintient les fragments proches

# Maintient du substrat par liaisons H





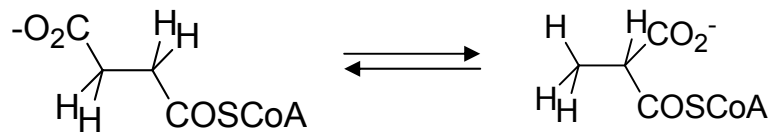
# Bilan



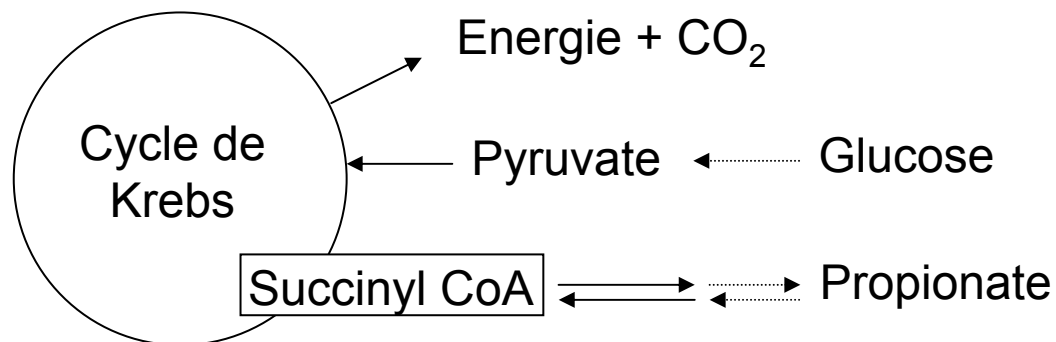
- « Activation » de la cobalamine-Co(I) par l'ATP
- Espèce réactive  $\approx$  radical masqué (Co(III)-CH<sub>2</sub>-R)
- Coupure HOMOLYTIQUE de la liaison Co-C
- Abstraction d'hydrogène par  $\cdot$ CH<sub>2</sub>-R
- Réarrangement radicalaire du substrat maintenu dans le site actif mais non coordonné.

## 2. Méthylmalonyl CoA mutase

Succinyl CoA      Méthylmalonyl CoA

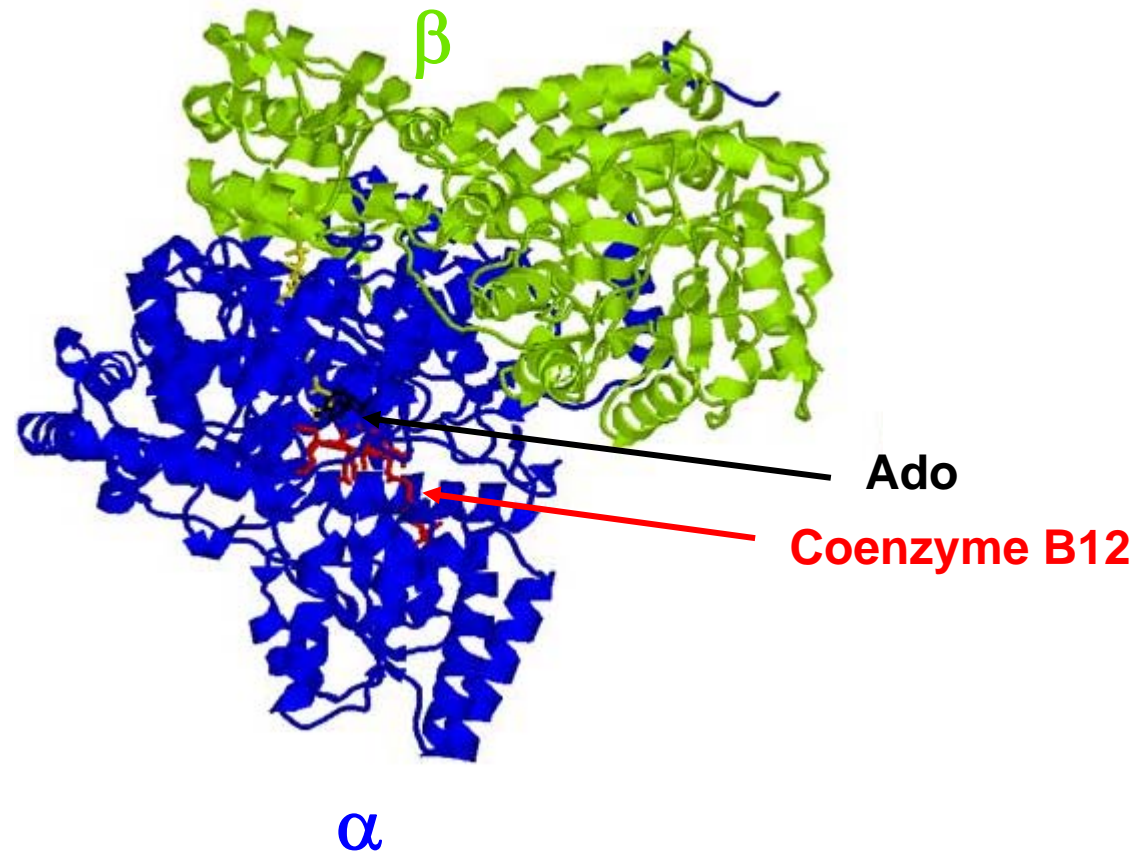


K = 20-30 en faveur du Succinyl CoA mais évolue selon l'organisme:

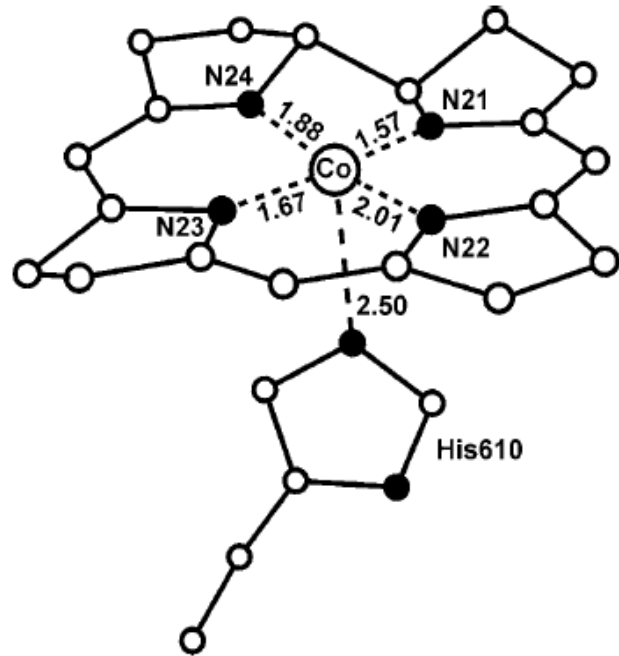


- Humains: métabolisme du propionate (matrice mitochondriale) pour le faire entrer dans le cycle de Krebs
- Procaryotes: Flux métabolique inverse: Synthèse du propionate à partir d'intermédiaires du cycle de Krebs par fermentation et synthèse d'antibiotiques (streptomyces)

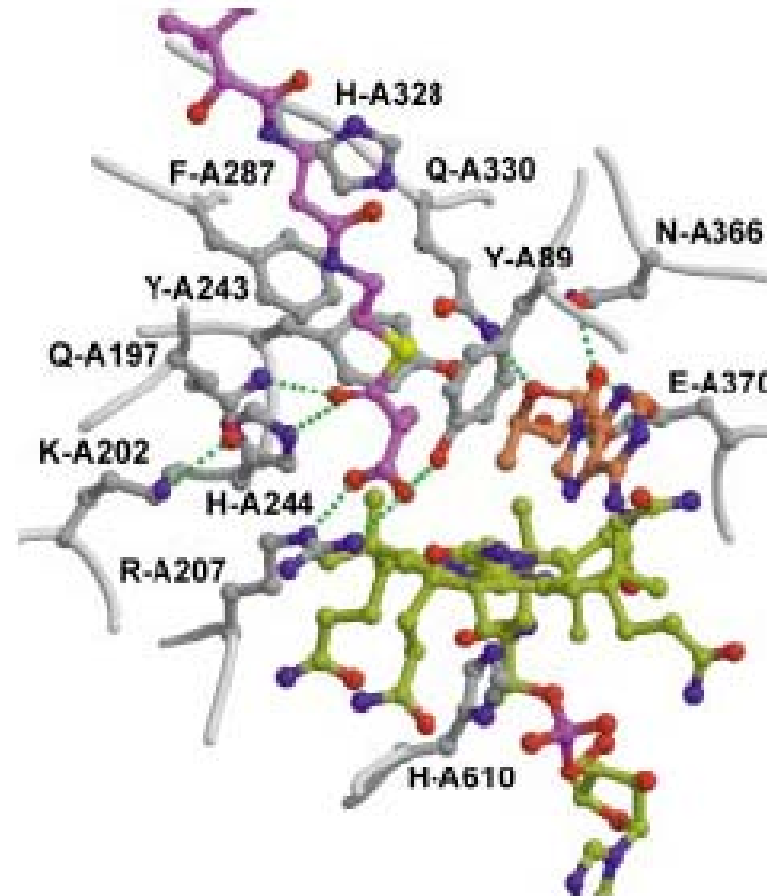
# Structure de l'enzyme



# Structure de la cobalamine $\approx$ Glutamate Mutase → Mécanismes catalytiques similaires ?



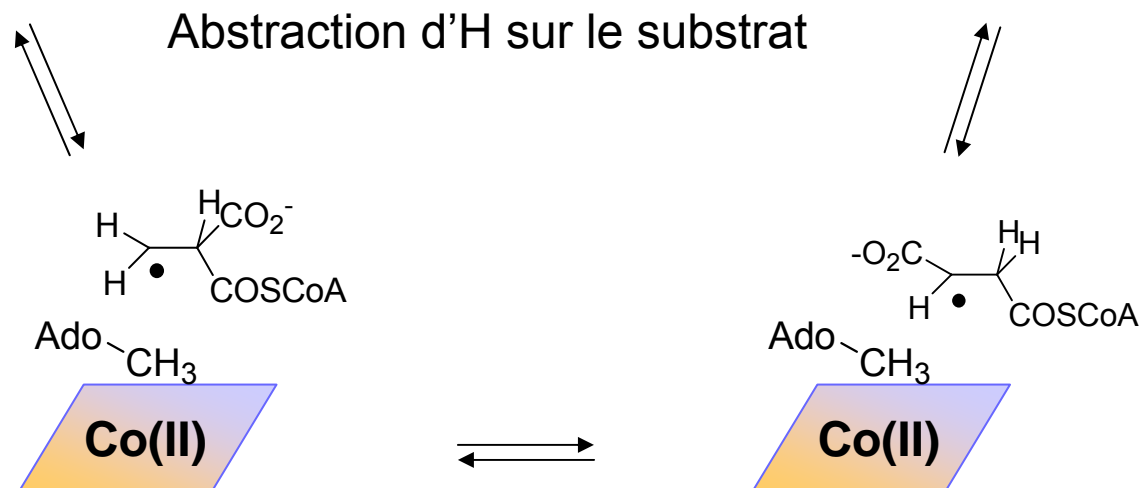
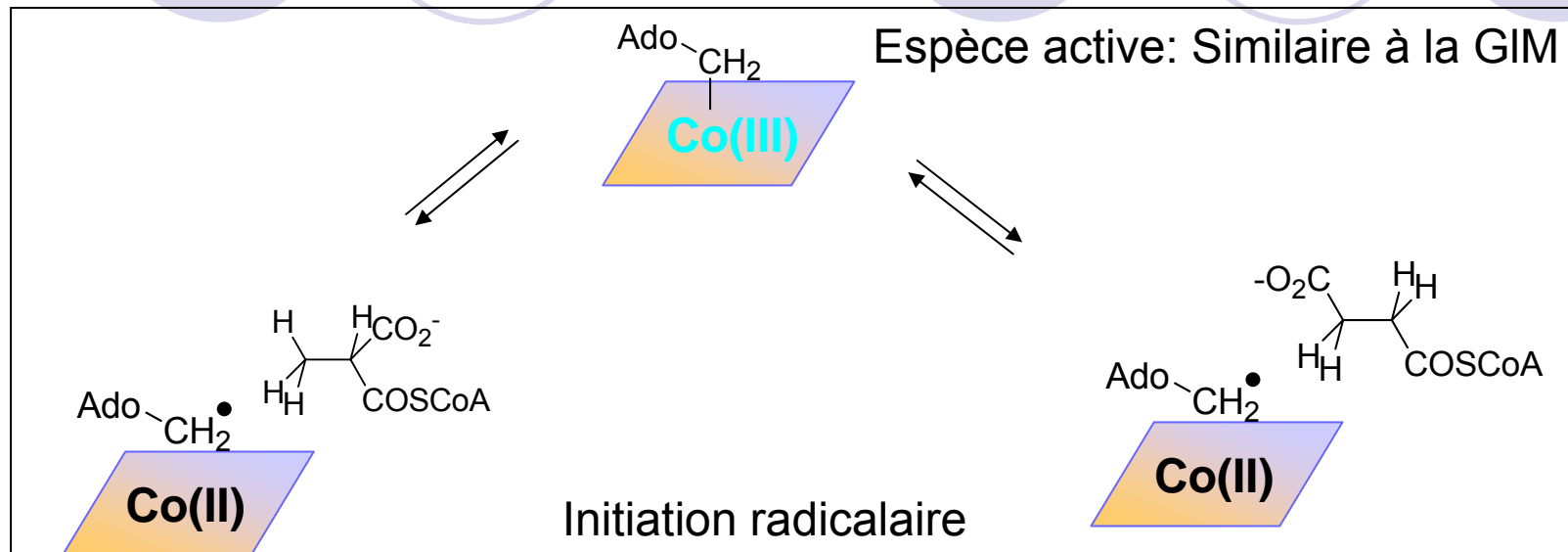
dCo-N(His610) > GIM  
(semble du au moins  
partiellement à des  
artefacts de cristallisation)



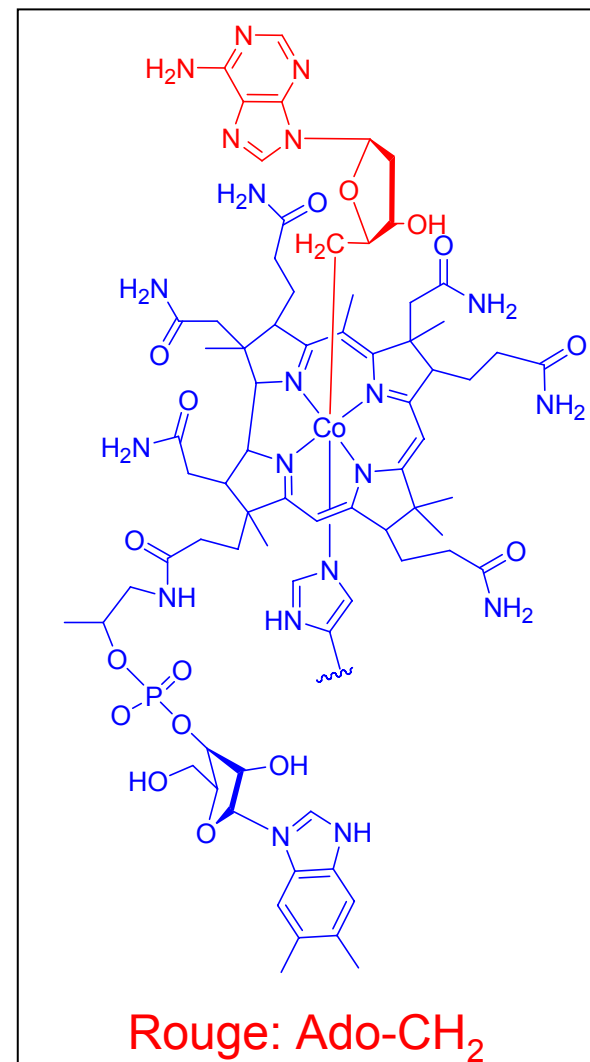
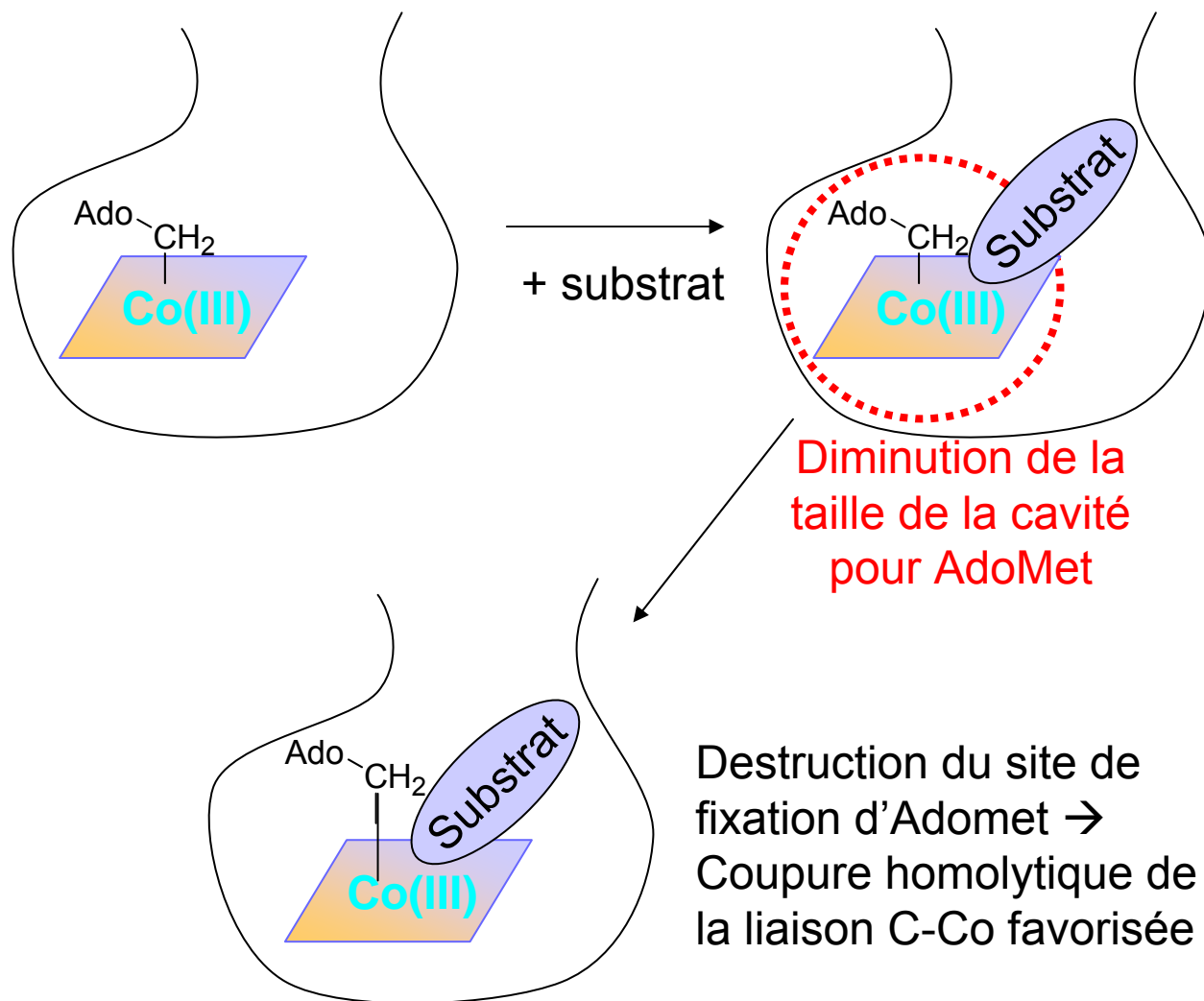
+ substrat methylmalonylCoA (rose)

Autres structures en présence de produits ou d'inhibiteurs sont très similaires

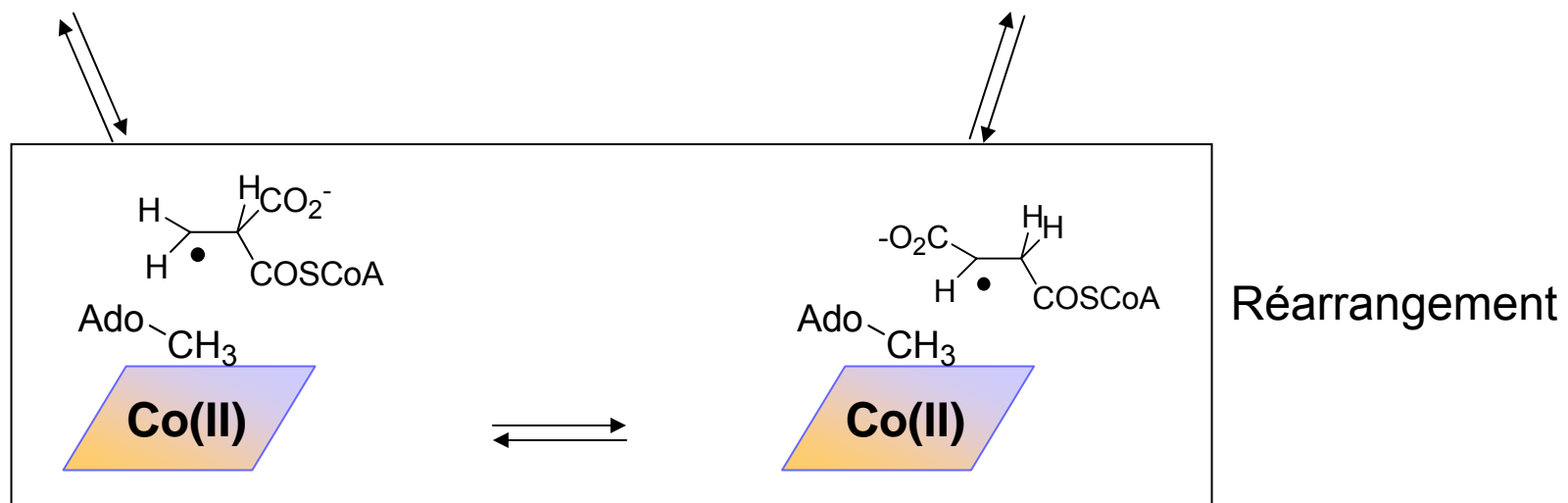
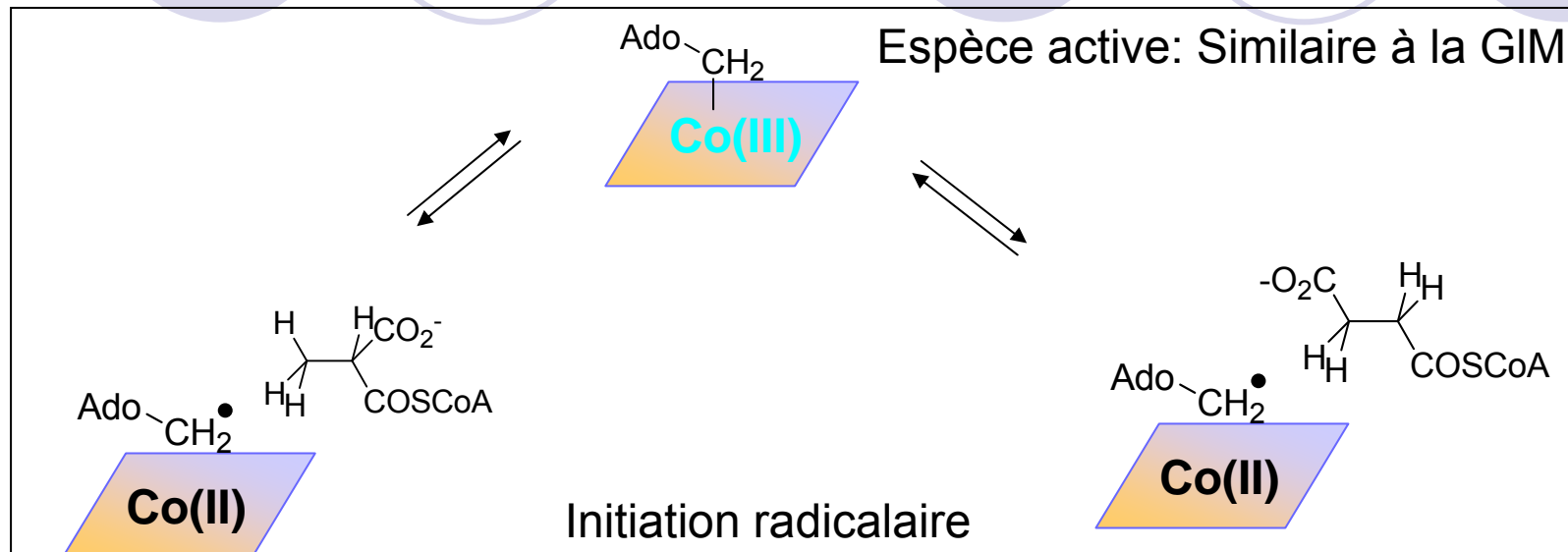
# Mécanisme catalytique



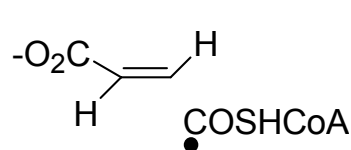
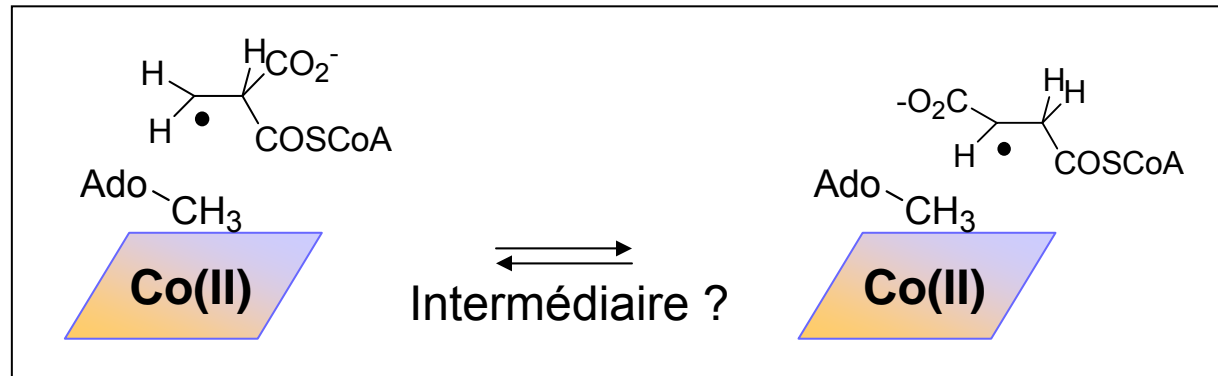
Fixation du substrat: Accélération de la rupture de la liaison Co-C par un facteur  $10^{12}$  !! et affaiblissement de la liaison Co-C de 15kcal/mol. Explication:



# Mécanisme catalytique

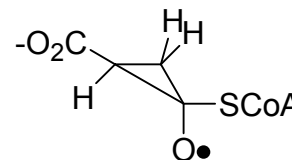


# Réarrangement



« Mécanisme dissociatif »

Ou

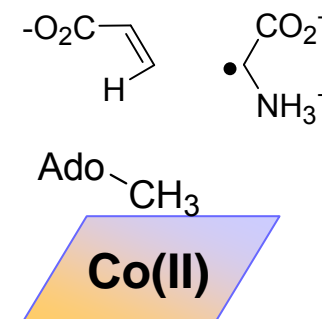


« Mécanisme associatif »

D'après DFT

De plus, rappel de l'intermédiaire clé dans le cas de la GIM:

Liaisons H entre la protéine, H<sub>2</sub>O et les CO<sub>2</sub><sup>-</sup> pour maintenir les fragments proches





# Bilan

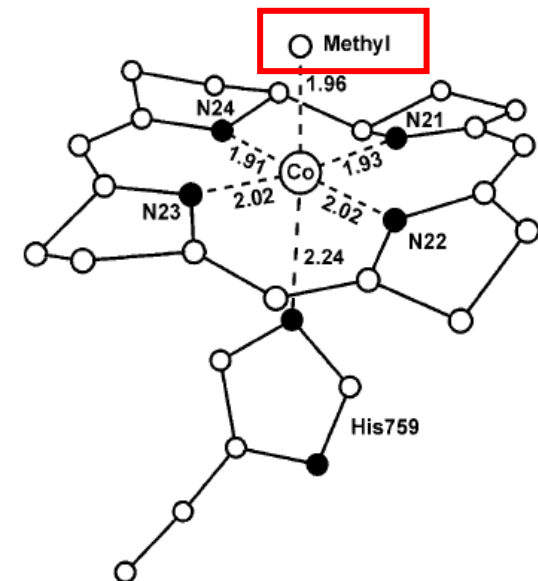
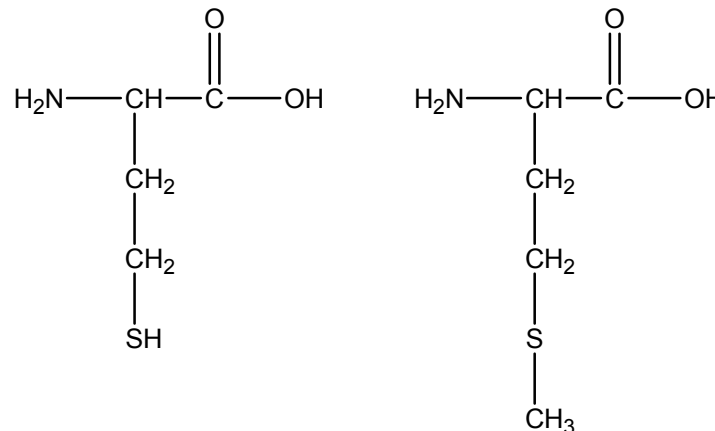


- Mécanisme similaire à celui observé pour la GIM avec une espèce active Co(III)-AdoMet
- Coupure HOMOLYTIQUE de la liaison Co-C
- Substrat différent, donc c'est la poche protéique qui va définir l'accès au site actif.
- Le substrat doit être moins « tenu » que pour la GIM car il ne se scinde pas au cours du processus catalytique (MAIS mécanisme radicalaire)

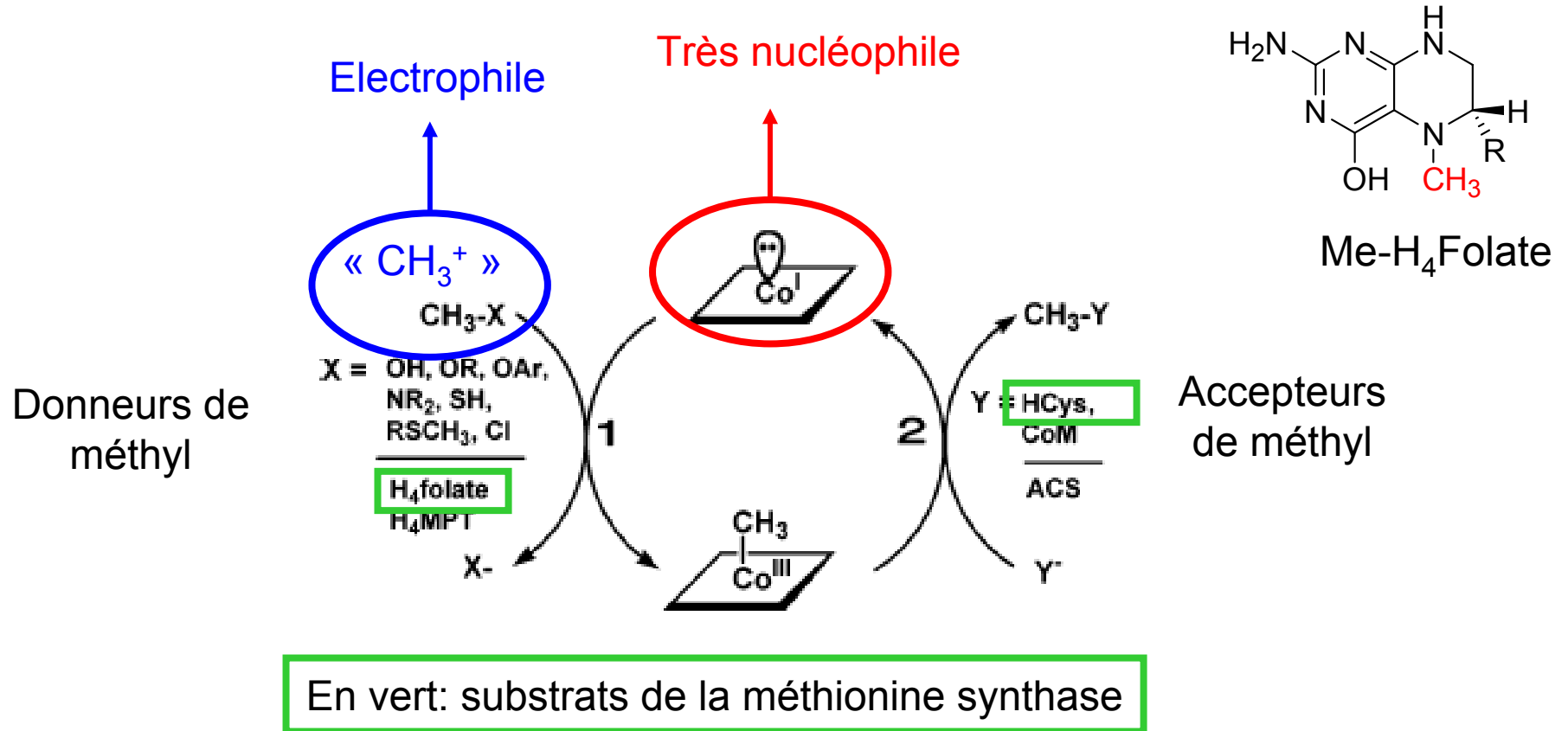
# IV. Transfert de méthyl: Méthionine synthase

- 2 types: cobalamine-dépendant et cobalamine indépendant.
- *Archae*: cobalamine indépendant
- *Eubactéries*: cobalamine-dépendant et cobalamine indépendant
- *Mammifères*: cobalamine-dépendant

« Me<sup>+</sup> » + Hcy (homocystéine) → Met

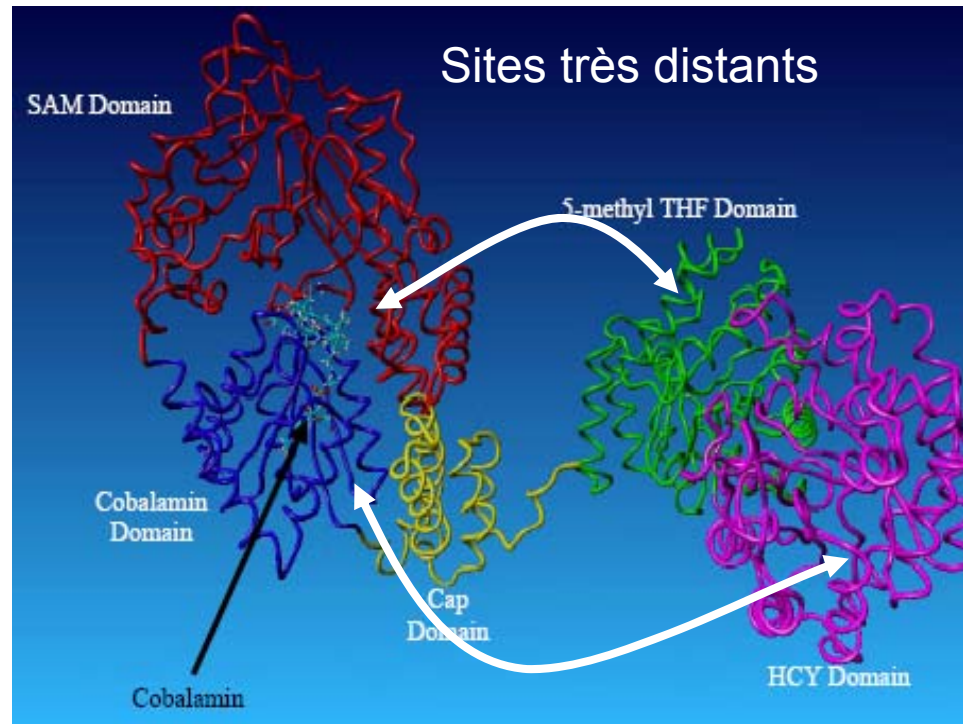


# Stratégie transfert de méthyl en utilisant la cobalamine



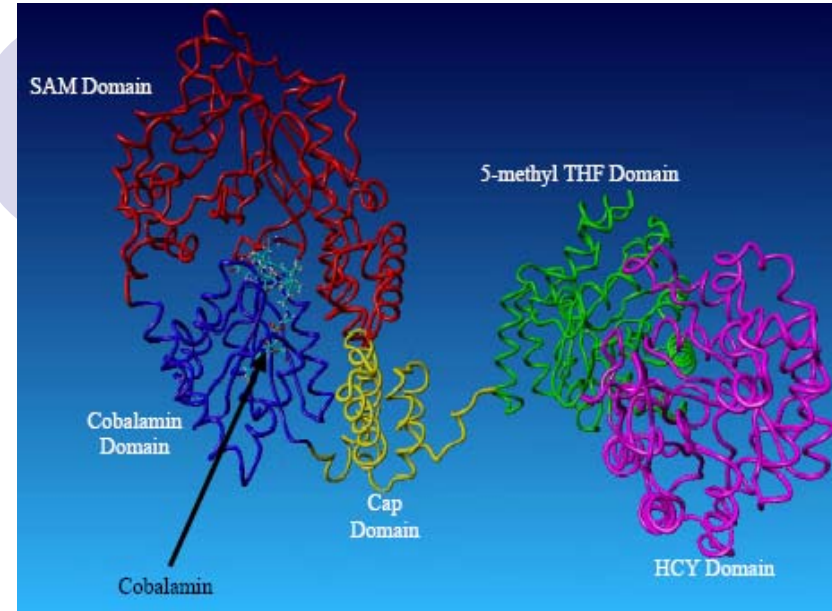
Mécanisme: SN → Coupure HETEROLYTIQUE de liaison Co-C cette fois-ci (coupure homolytique dans les mutases)

# Enzyme multi-domaine pour fixer tous les acteurs de la réaction

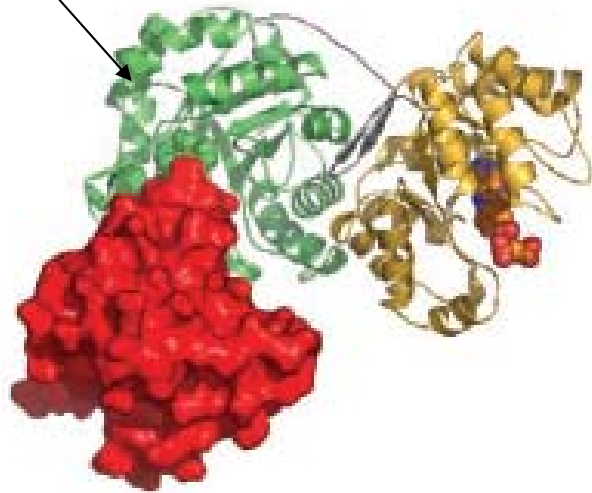


Monomère de 1227 résidus divisé en 2 domaines: N-term: activation (SAM) et C-term: fixation de substrat

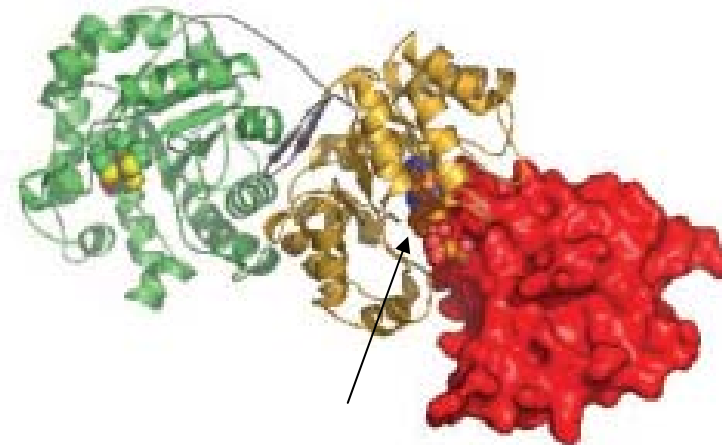
Gros mouvements de la protéine au cours du cycle catalytique: Constituent l'étape limitante



Hcy domain

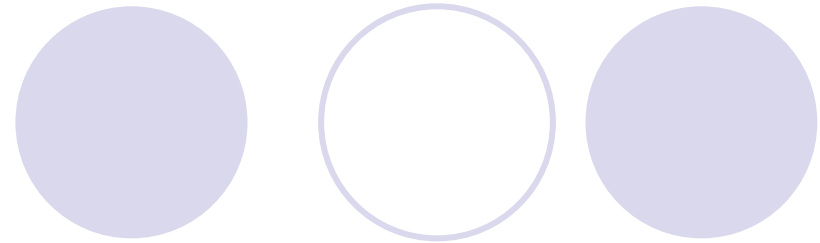


**Cobalamin domain**

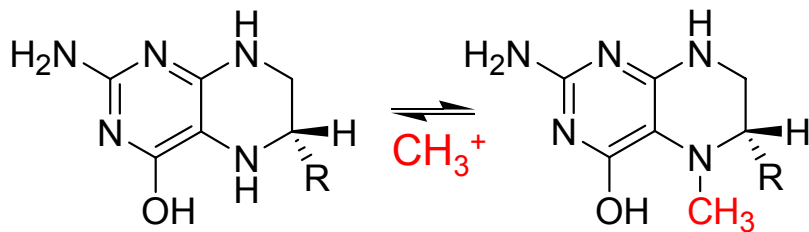


Folate domain

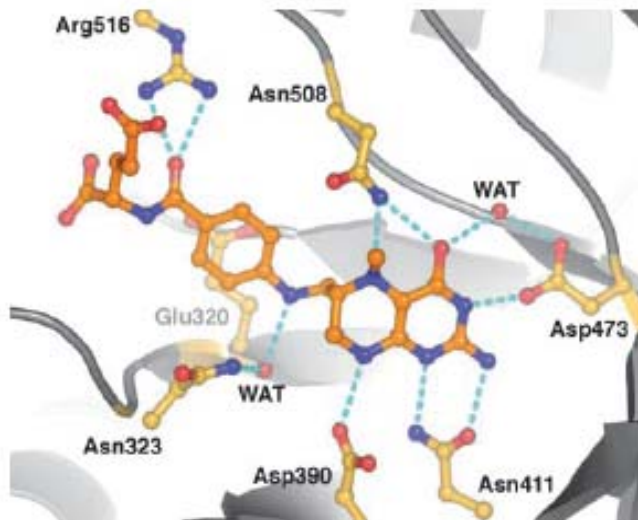
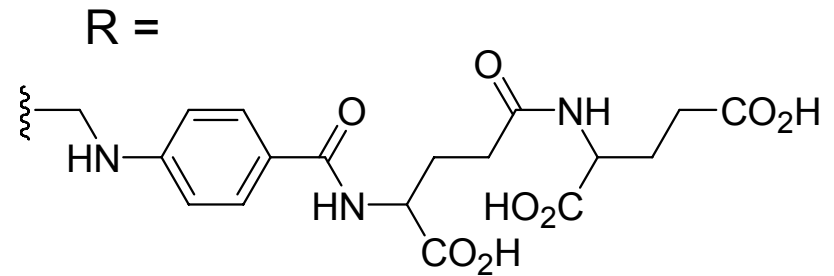
Domaine «  $\text{CH}_3^+$  »:



- Cofacteur tétrahydrofolate (Vit B9)



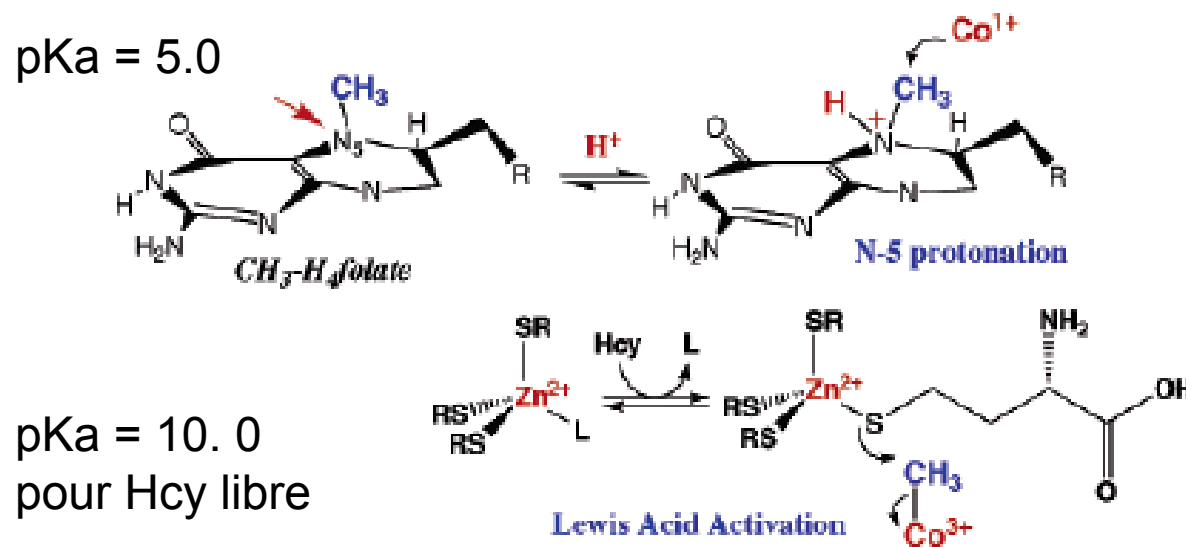
Tétrahydrofolate (THF)



Domaine «  $\text{CH}_3\text{-H}_4$  folate » de la Méthionine Synthase

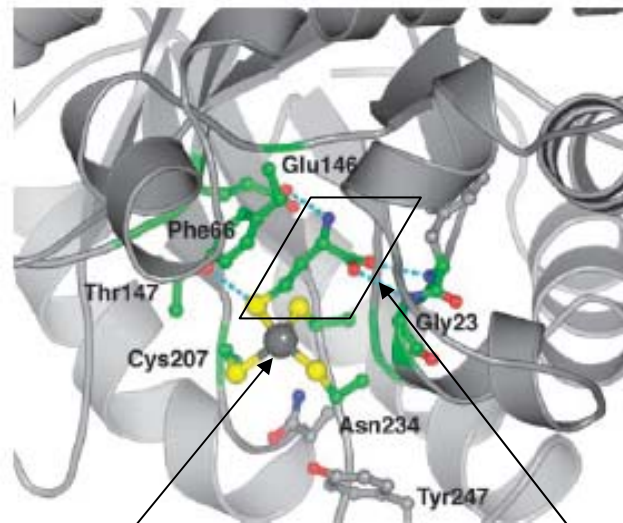
# Activation des substrats

- Me-H<sub>4</sub>Folate: Pas suffisamment électrophile (pas plus que les autres donneurs CH<sub>3</sub>-X biologiques) pour donner lieu à une SN du Co(I): « activé » par protonation
- HCY: Activé par complexation avec un Zn



Activation des thiols  
différente: Permet de  
stocker des thiolates pour  
les faire réagir

# Domaine « Homocystéine »



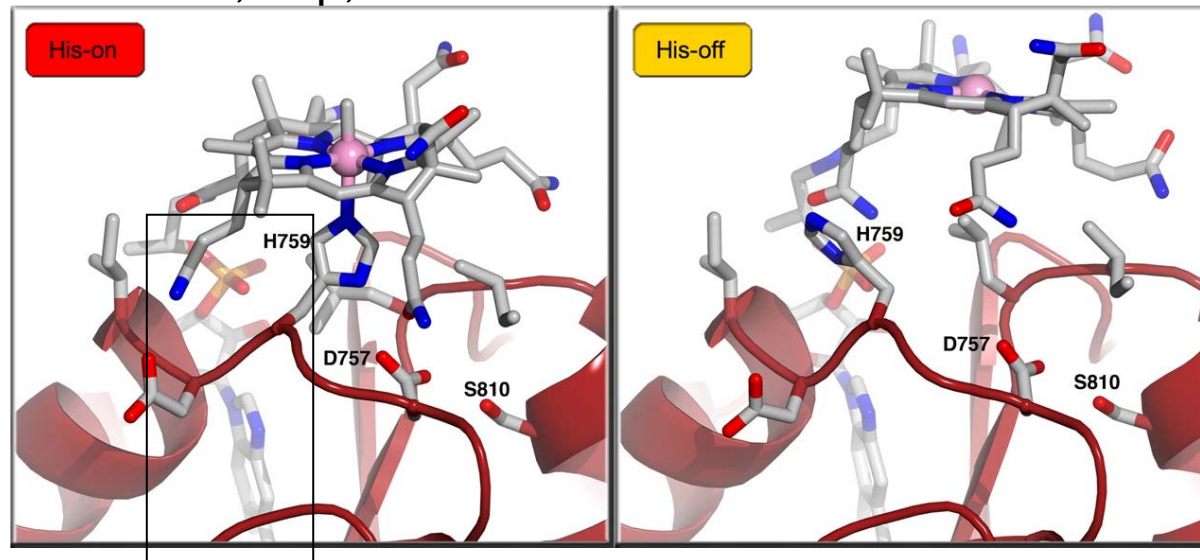
$Zn^{2+}$

Homocystéine



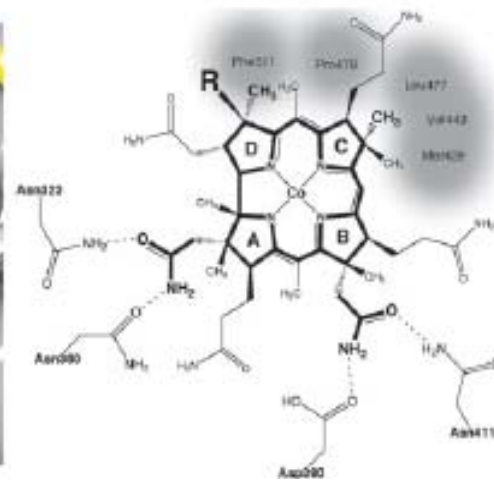
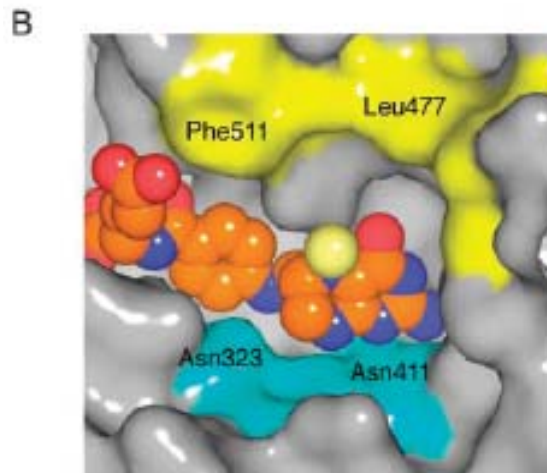
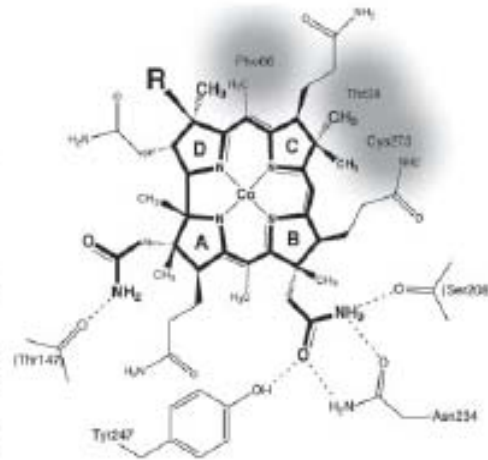
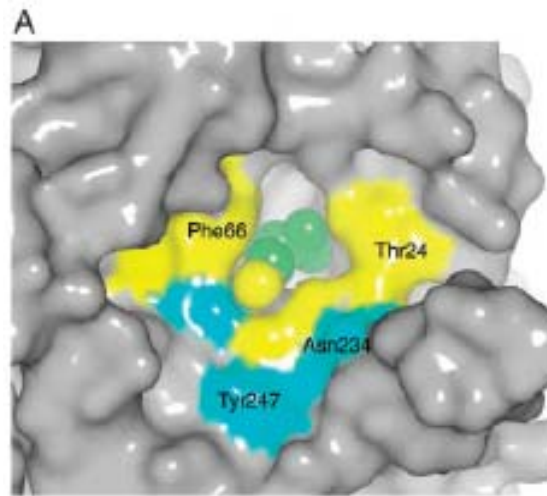
# Domaine « cobalamine »

Selon l'état de protonation de l'His  
Triade His, Asp, Ser conservée



Rentre dans le cœur de la protéine

# Modèles pour l'interaction entre domaines

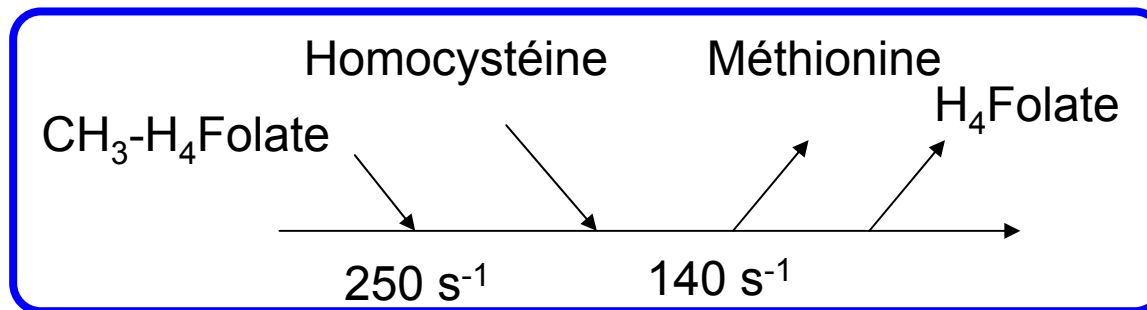
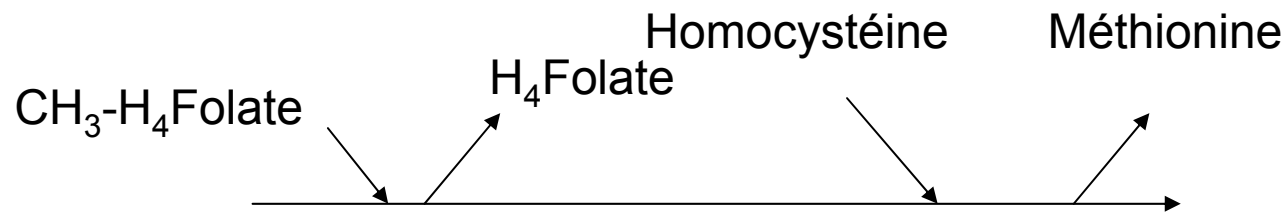


Régions:  
Hydrophobes: Jaune  
Hydrophiles: Bleu

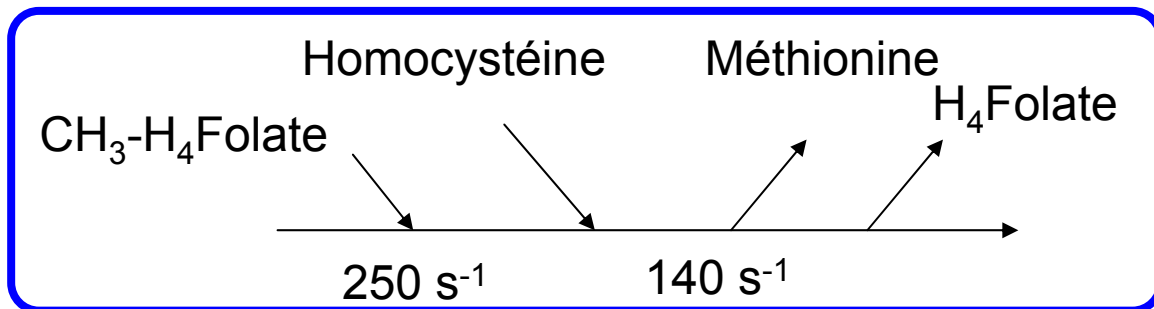
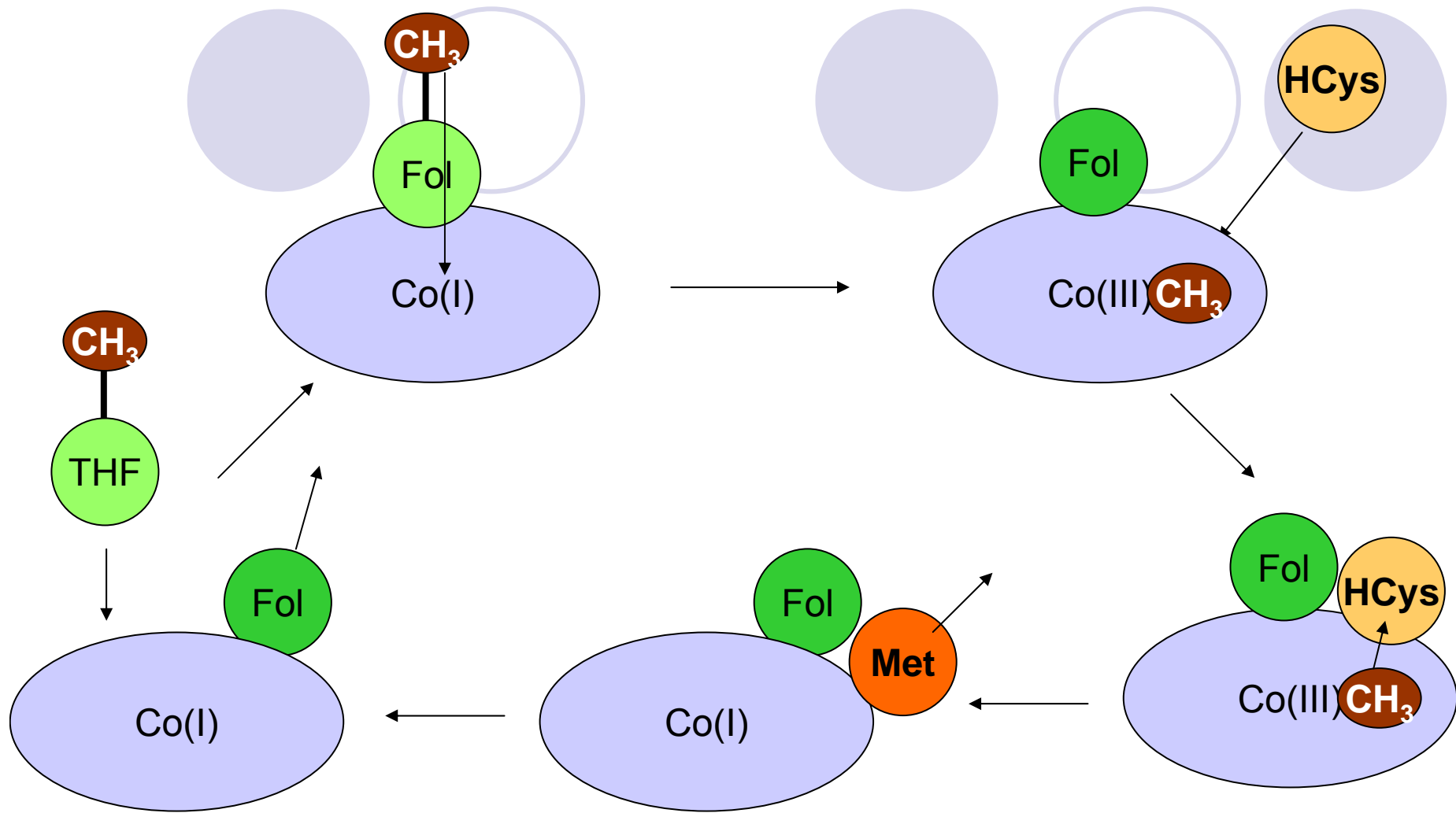
- (A) Domaine Hcy : Soufre de Hcy en jaune (ball and stick).  
(B) Domaine CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>folate ( van der Waals) : 5N-methyl en jaune.

# Mécanisme catalytique

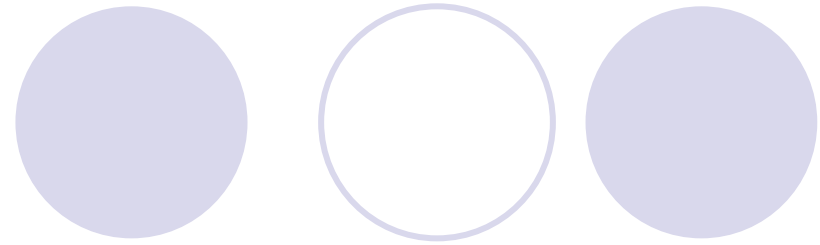
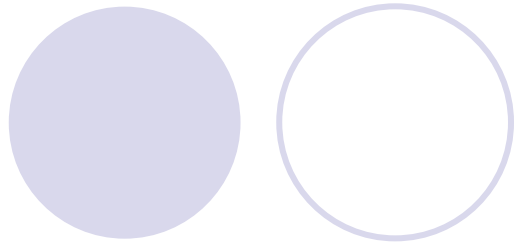
- Ordre des réactions ?



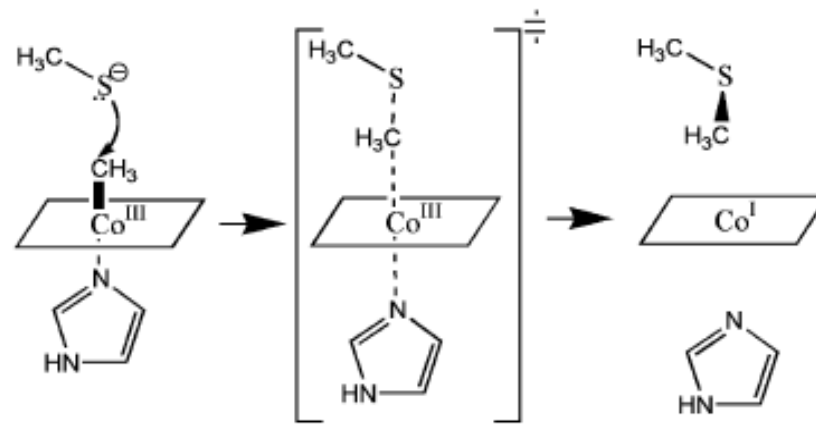
Réaction 35 000 000 de fois plus rapide avec l'enzyme que sans



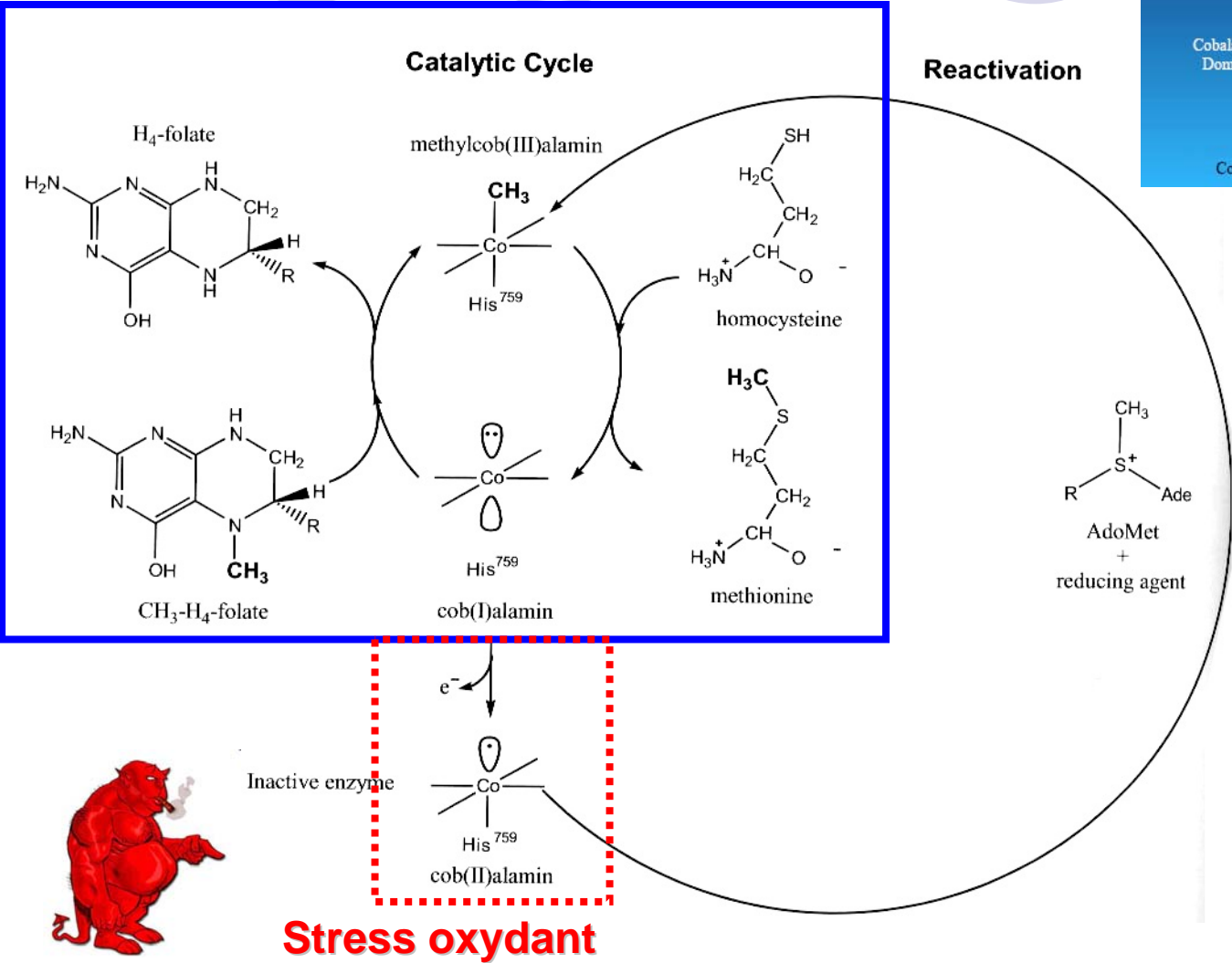
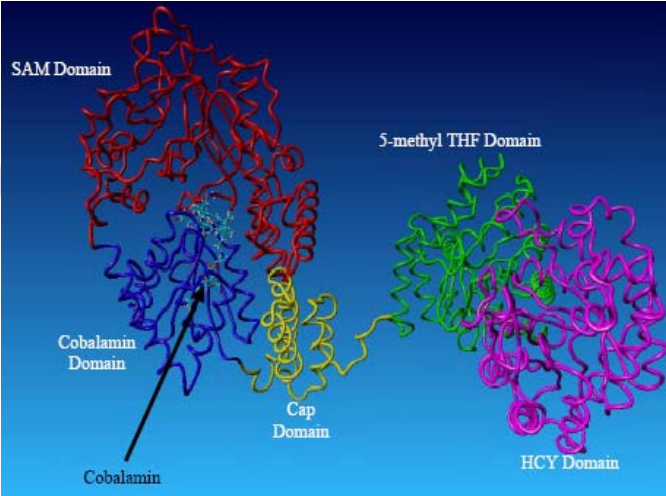
Réaction 35 000 000 de fois plus rapide avec l'enzyme que sans

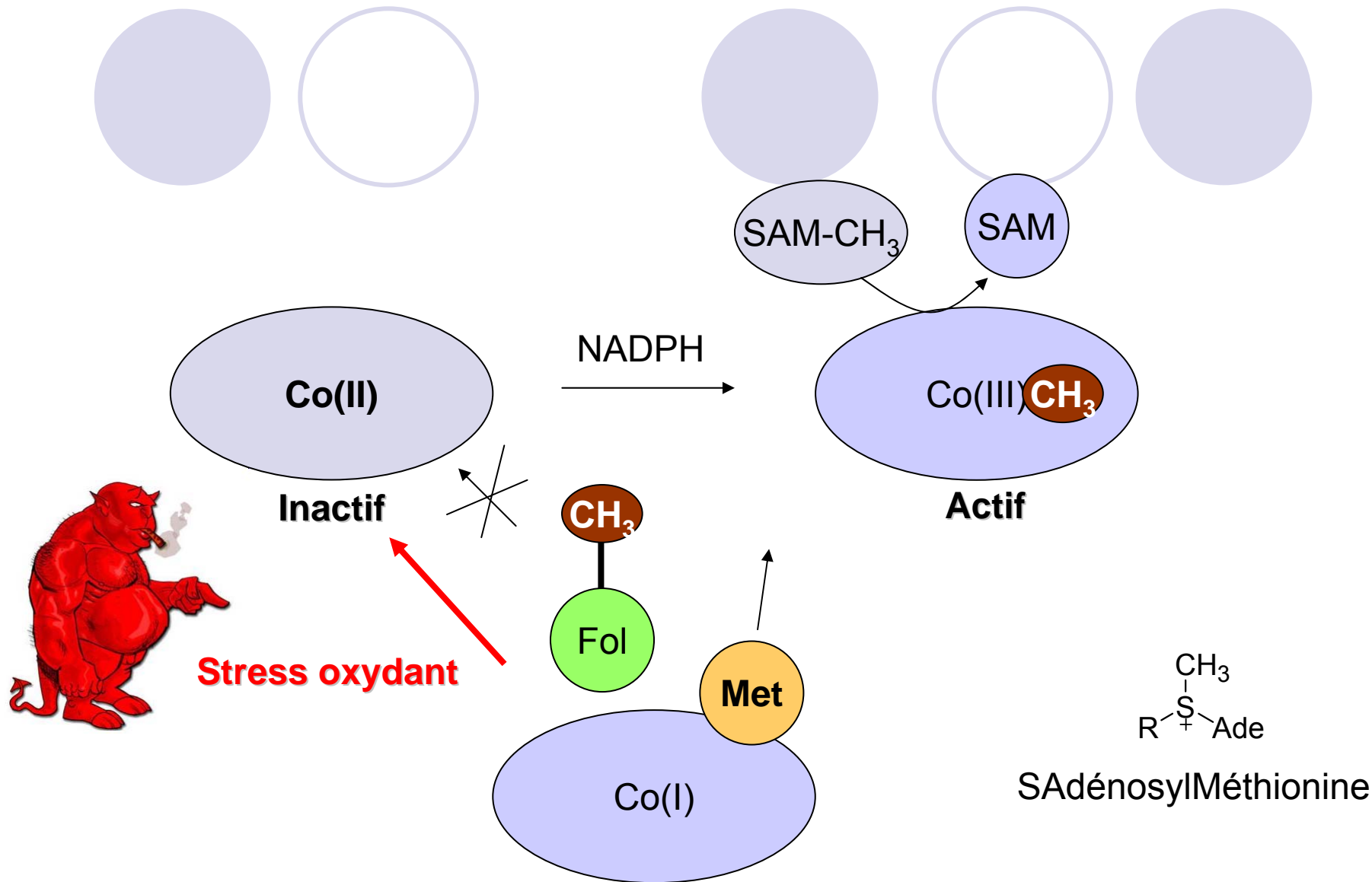


Etape clé: Transfert du méthyl



# Rôle du domaine SAM ?

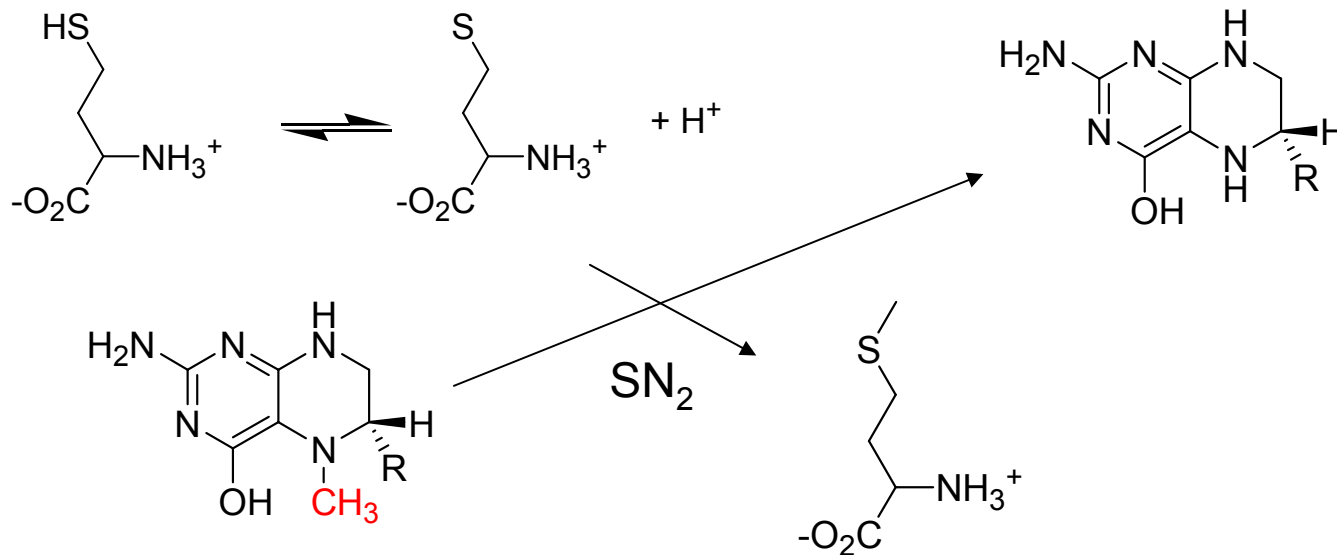




Cette enzyme est une « sentinelle » rédox dépendante de la SAM

# Stratégie adoptée par le système indépendant de la cobalamine est identique !!!

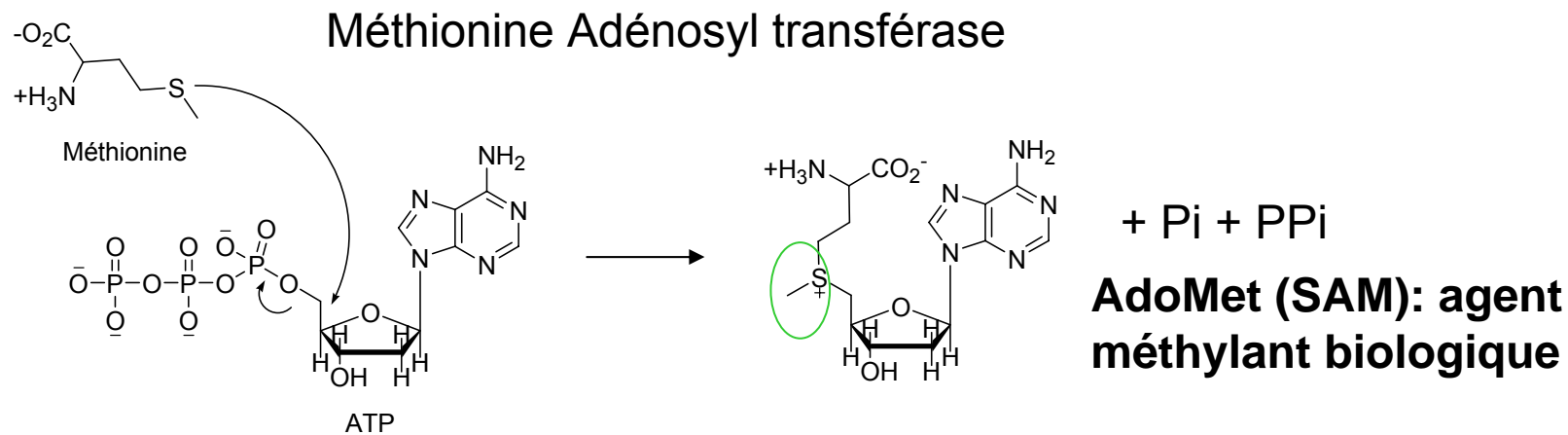
Transfert DIRECT du méthyle par SN sans passer par une cobalamine; Transfert facilité par déprotonation (résultant de la coordination à un atome de zinc)



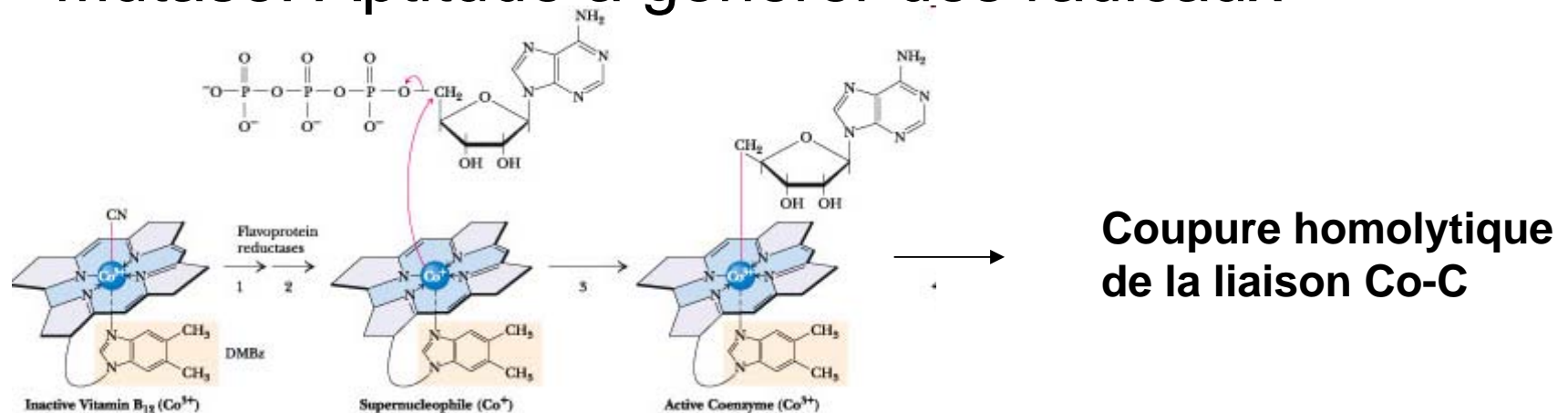


# Réactivité des dérivés de l'Adénosyl

- Méthionine Synthase: Pouvoir méthylant



- Mutase: Aptitude à générer des radicaux



# Bilan



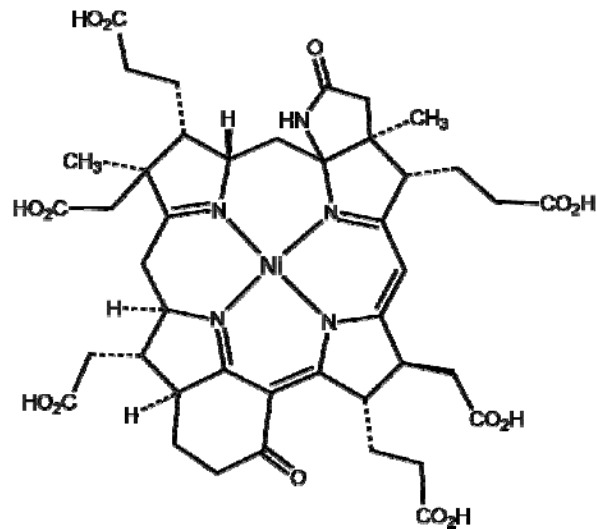
- Enzyme multidomaine flexible qui bougent énormément au cours de la catalyse (mouvements limitent la réaction)
- Méthyl fixé à la cobalamine  $\neq$  AdoMet
- Coupure HETEROLYTIQUE ( $\neq$  homolytique)
- SN au lieu d'abstraction d'H
- Mécanisme séquentiel  $\neq$  pinpong

## V. Ion nickel:

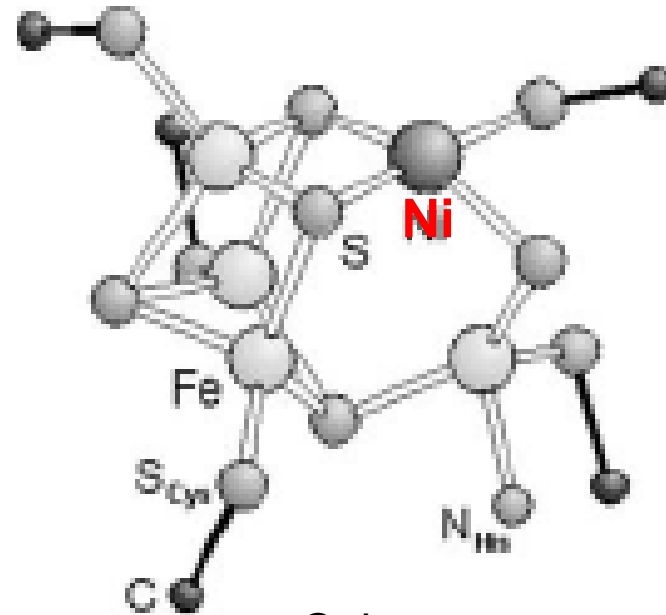


- Type de coordination beaucoup plus variée que le Co
- Peut faire de la chimie non-organométallique facilement
- Le nickel est un élément ancien (Ni provient de l'activité volcanique au début de la vie sur terre): Se trouve dans les organismes primitifs.
- Ni(III), Ni(II), Ni(I), « Ni(0) » (forme hypothétique stabilisée par délocalisation de charge sur un centre rédox voisin, comme un centre Fe-S)

# Cofacteurs et clusters particuliers au Ni

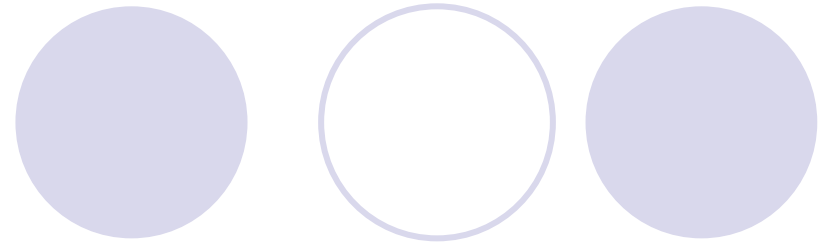


Dérivé de porphyrine: F430  
Méthyl Coenzyme M réductase



Cubanes  
CO dehydrogenase

# Ligand du Ni: CO



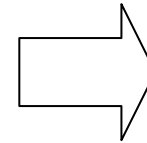
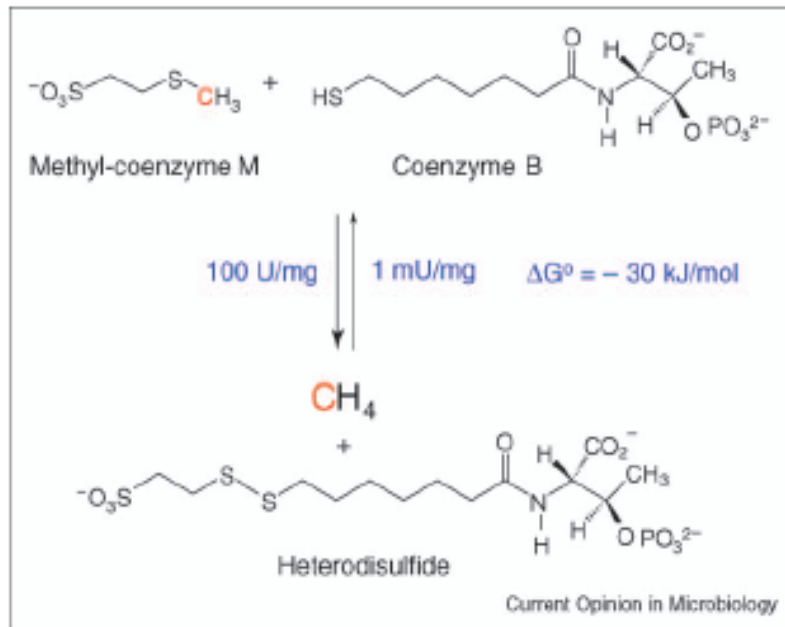
- Propriétés :
  - Base de Lewis très faible
  - Ligand mou (triple liaison)
  - $\pi$  accepteur fort (« back bonding ») et  $\sigma$  donneur: Ligand donc très fort
- Réactivité :
  - Insertions, éliminations, additions nucléophiles ... en fonction de la polarisation de CO, donc de la polarisabilité de la liaison M-L et finalement des coligands
  - Ex: Additions nucléophiles et insertion favorisées en augmentant l'électrophilie du carbone de CO; Réactions impliquant une attaque électrophile à l'O: Augmentation de sa nucléophilie
- CO dans l'industrie: carbonylation, réaction de Fischer-Tropsch, hydroformylation, hydrogenation (en utilisant H<sub>2</sub>O comme source d'hydrogène)...

Ligands du Ni: CO<sub>2</sub>

- Inerte (grande barrière d'activation pour les réactions avec CO<sub>2</sub>): Complexation avec des métaux (complexe de Wilkinson (RhCl(PPh<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) par ex) diminue cette barrière.
- C = acide de Lewis (électrophile), O = faibles bases de Lewis (nucléophile)

# VI. Méthyl Coenzyme M réductase

- Réaction:

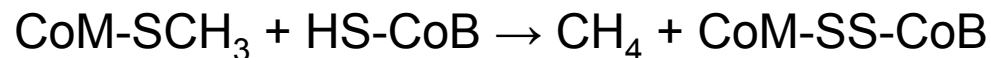


Transfert d'un  
groupement méthyl

Peut s'apparenter dans ce sens à  
la Méthionine Synthase

# Méthyl Coenzyme M réductase

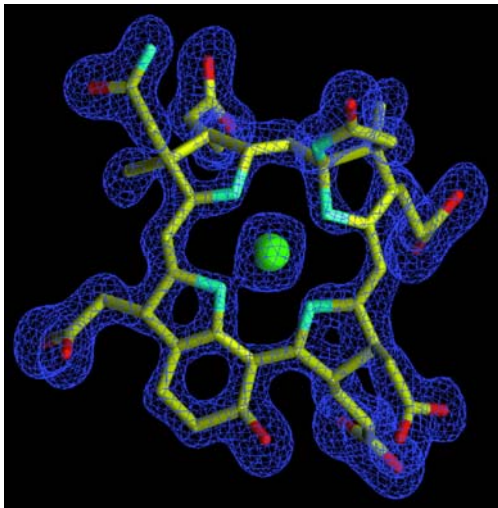
- Dans *archae méthanogènes* (anaérobies stricts) majoritairement (organismes primitifs)
- 10 milliards de tonnes de méthane produites / an grâce à cette enzyme. Efficacité = 100 cycles catalytiques / sec.
- Le disulfure migre dans la membrane cytoplasmique où il est réduit dans une réaction qui produit de l'ATP: Production d'énergie !!
- Peut aussi être impliquée dans l'oxydation du méthane (réaction inverse)
- Peut représenter jusqu'à 10% de la concentration totale en protéines extraites



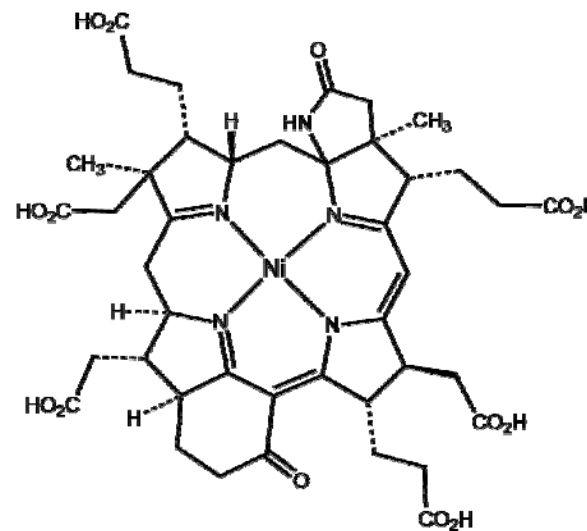


# Structure de l'enzyme

- Hexamère  $\alpha_2\beta_2\gamma_2$  de 300kDa
- 2 sites actifs Ni-porphynoïde ( $F_{430}$ ) séparés de 50 Å.



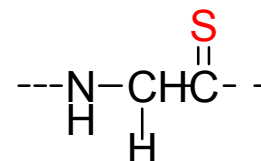
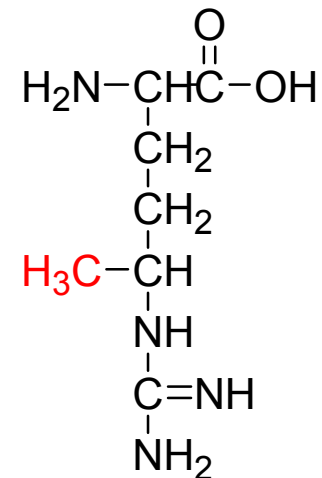
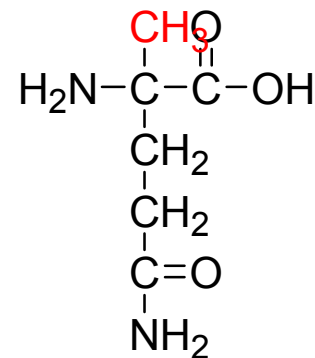
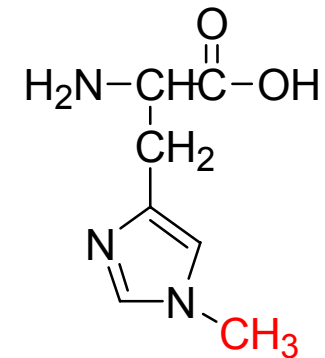
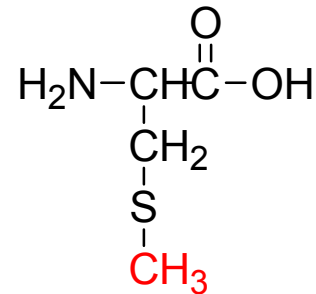
Ni-porphynoïde (F430)



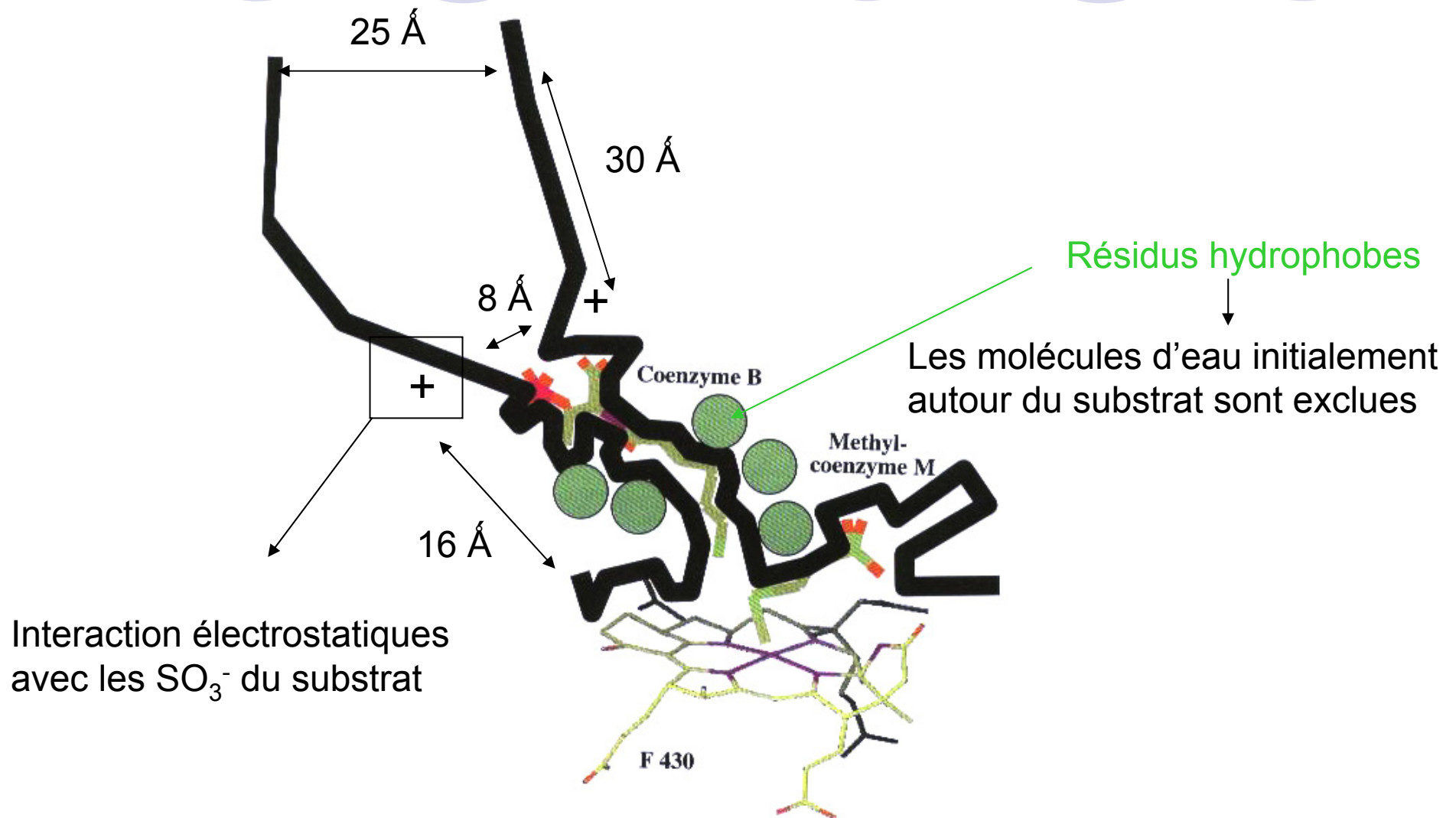
Forme la plus réduite de porphyrine qui puisse être trouvée. La seule contenant du nickel

# Particularité des environs du site actif

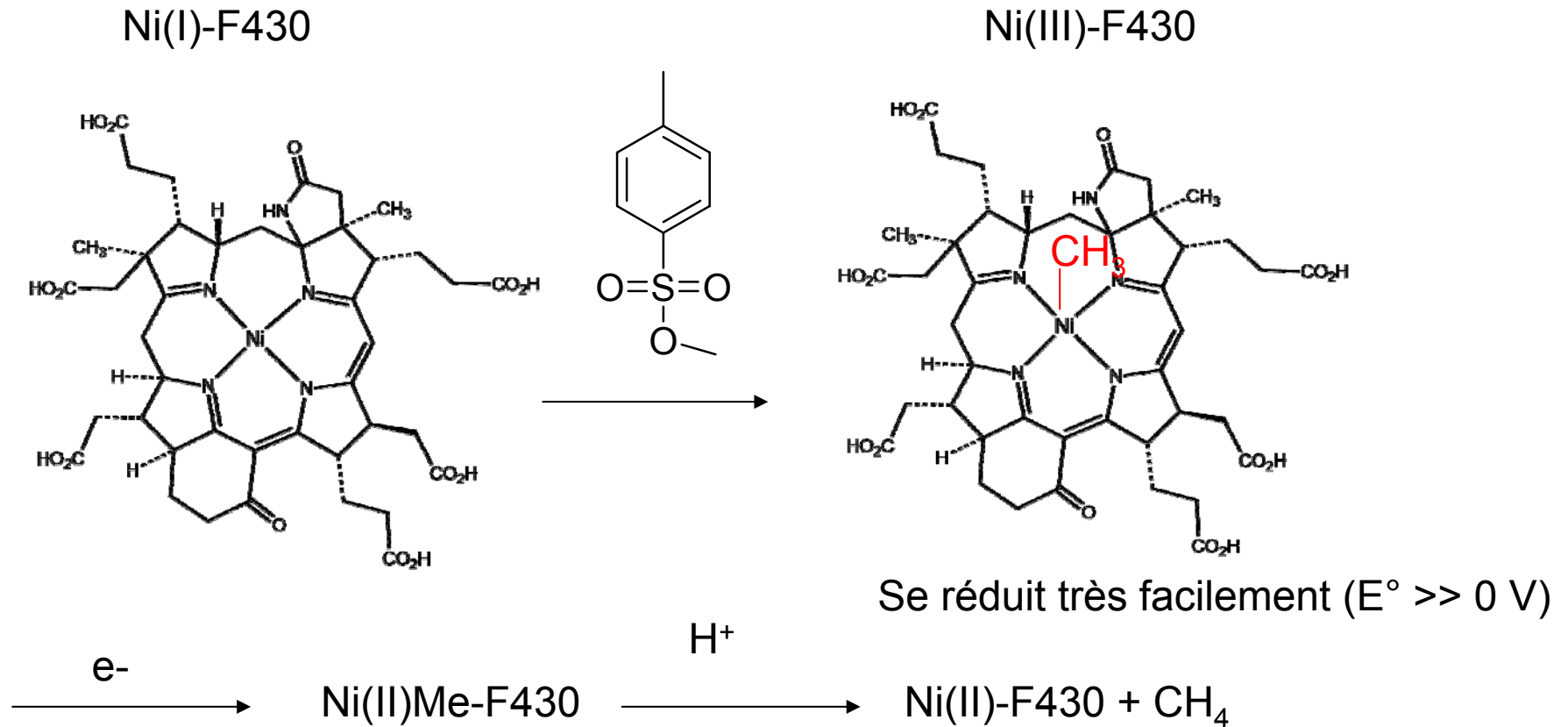
- A côté du site actif: thioglycine, N-methyl-histidine, S-methyl cysteine, 5-(S)-methyl arginine et 2-(S)-methyl glutamine !!
- Methyl provient toutefois de méthionines et pas de méthyl coordiné au nickel



# Accès au site actif



# Réactivité de Ni(I)-F430 en solution

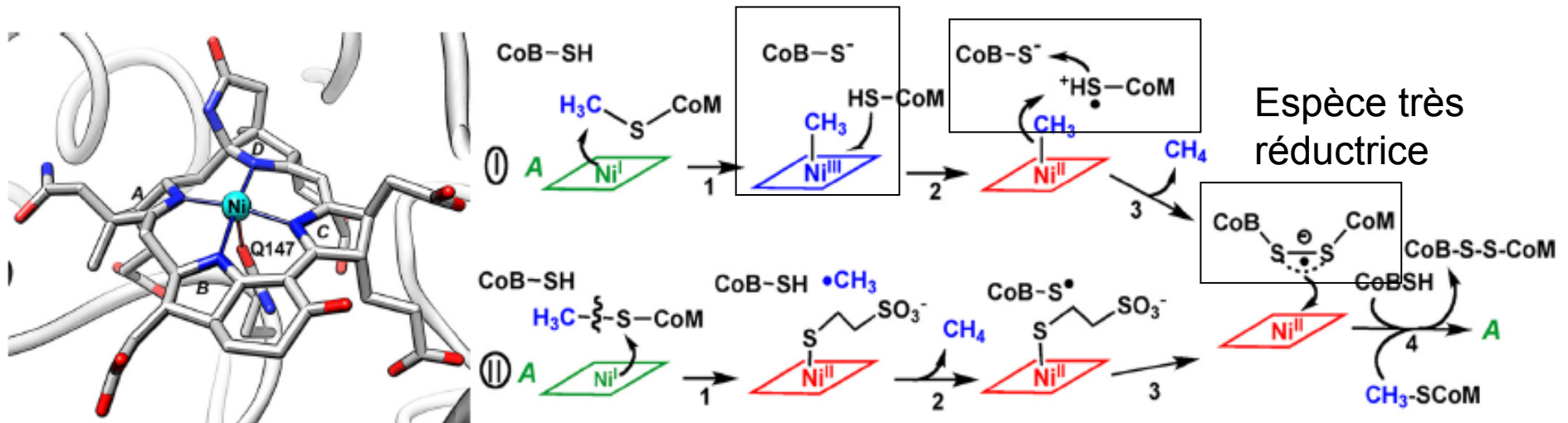


Remarquer l'analogie avec la cobalamine dans la Méthionine Synthase

# 2 Mécanismes proposés pour l'enzyme

≈ Méthionine synthase

Protonation comme dans Ni(II)Me-F430 en solution



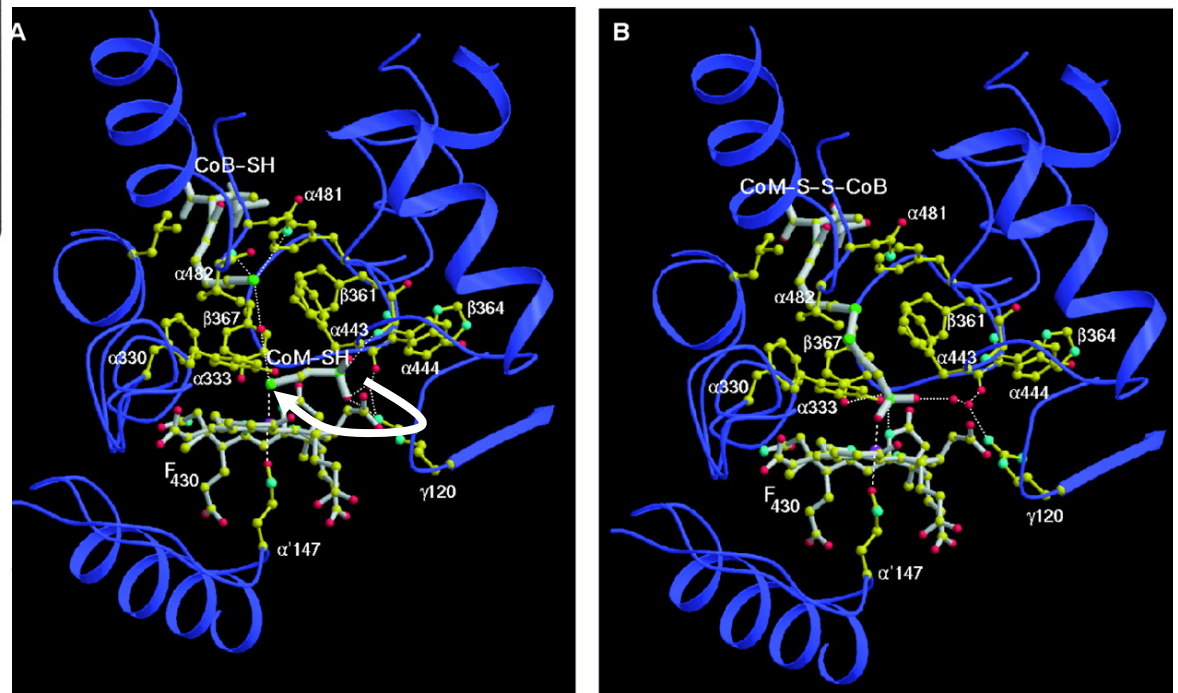
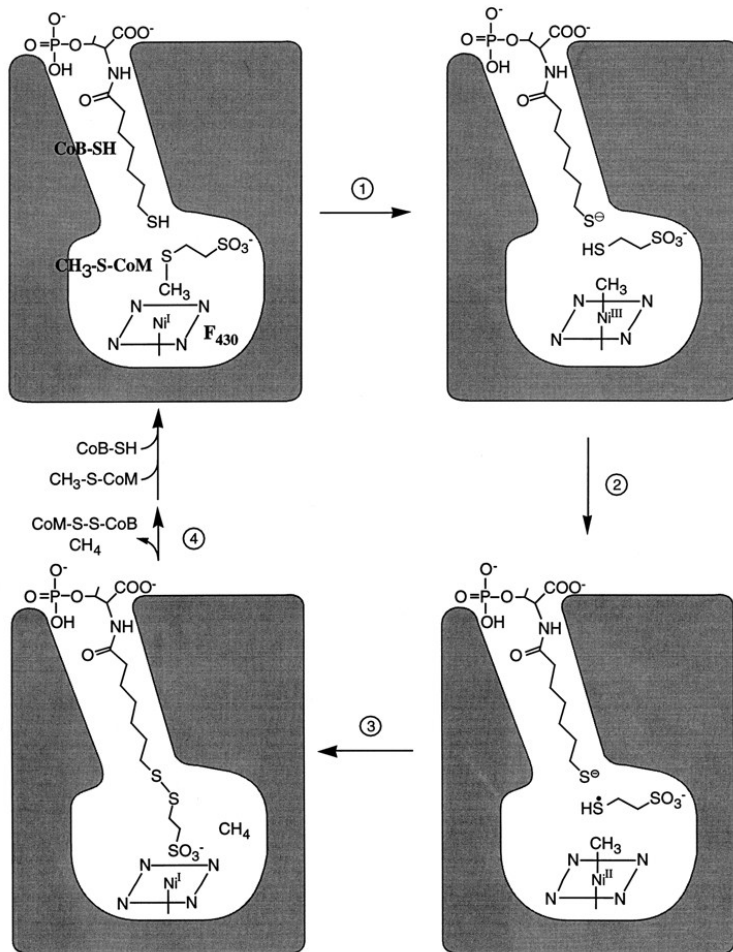
Attaque nucléophile du Ni(I)  
sur le coenzyme M:

Sur C:  
Coupure hétérolytique

Sur S:  
Coupure homolytique de la liaison C-S

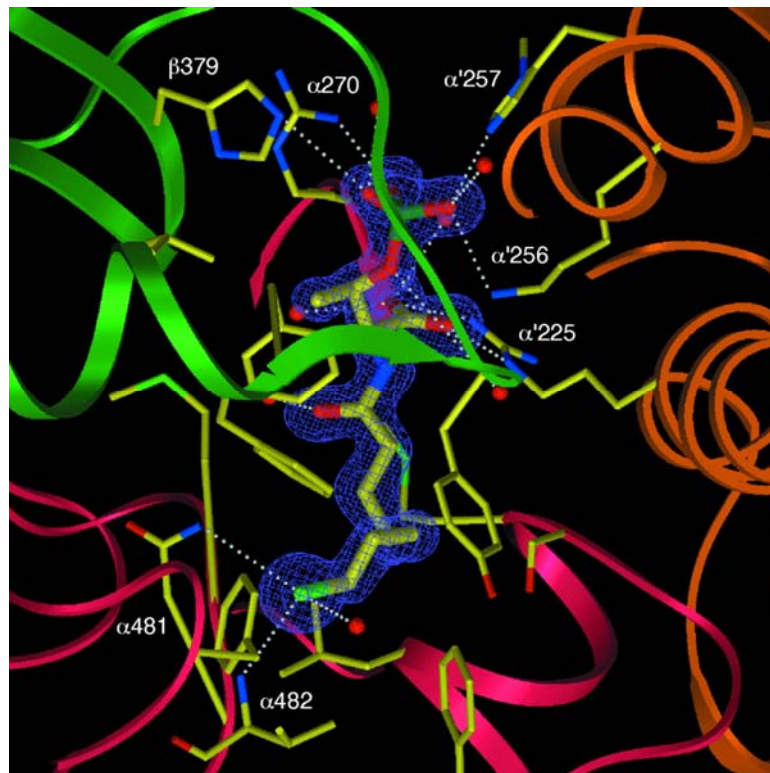
Rem: Enzyme très spécifique (très sensible aux variations structurales du Coenzyme B)

# Changements structuraux induits

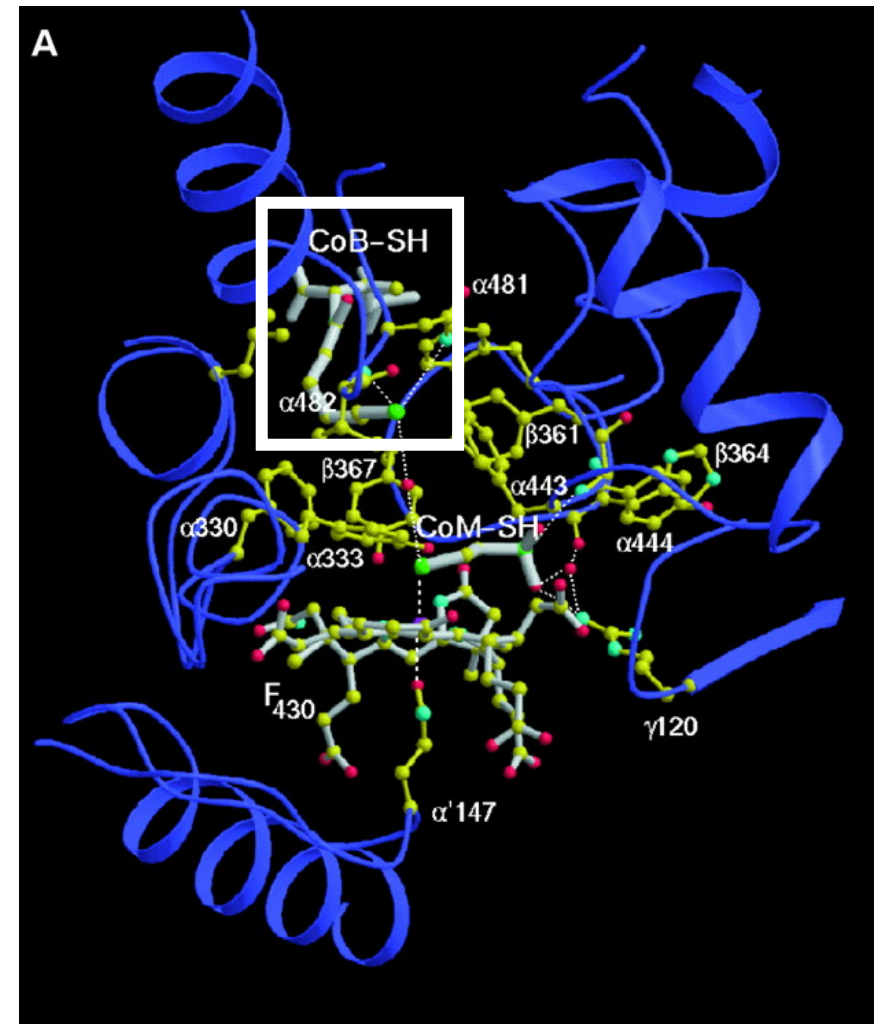


Retournement du SO<sub>3</sub><sup>-</sup> très polaire au cours de la réaction!

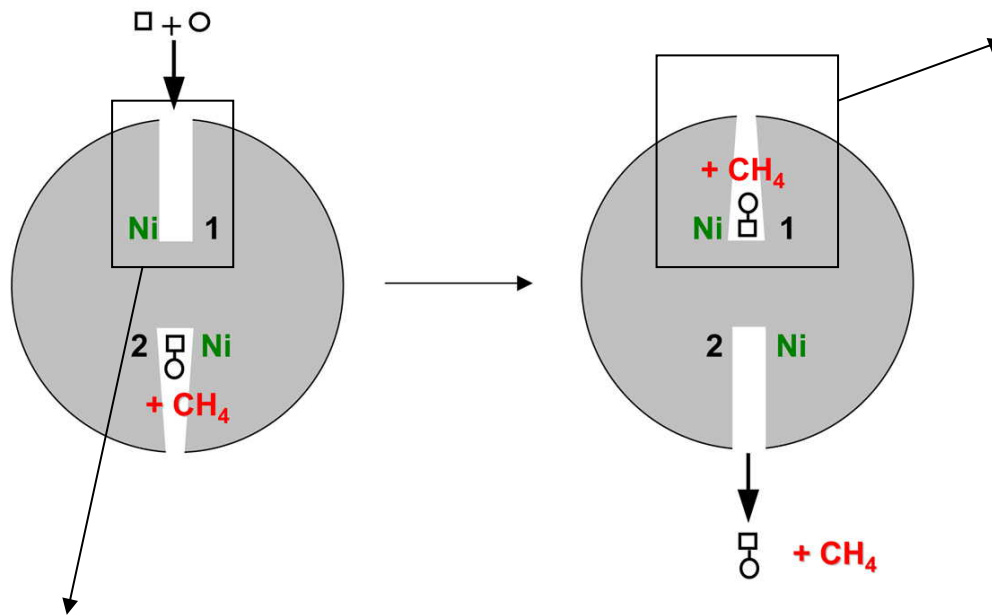
# Positionnement du substrat



coenzymeB maintenu en place par liaisons ioniques (ne pas se fier aux numérotations)



# Fonctionnement en synergie des 2 sites



Réaction initiée par un changement de conformation (lui-même induit par fixation du coenzyme B)

Canal hydrophobe de 50 Å

Interconnexion entre les deux sites: permet un meilleur fonctionnement (couplage de processus ender- et exergoniques pour diminuer l'énergie d'activation)



# Bilan



- Mécanisme globalement proche de celui adopté par la Méthionine Synthase.
- Donneur de  $\text{CH}_3^+$  : CoM-S $\text{CH}_3$  au lieu de du Me- $\text{H}_4$ Folate
- Le  $\text{CH}_3$  n'est pas incorporé dans une biomolécule, mais rejeté sous forme de  $\text{CH}_4$
- Un seul site réactionnel au lieu de trois + mouvement de la protéine

# VII. CO dehydrogenase (COdH)/ Acetyl-CoA Synthase (ACS)

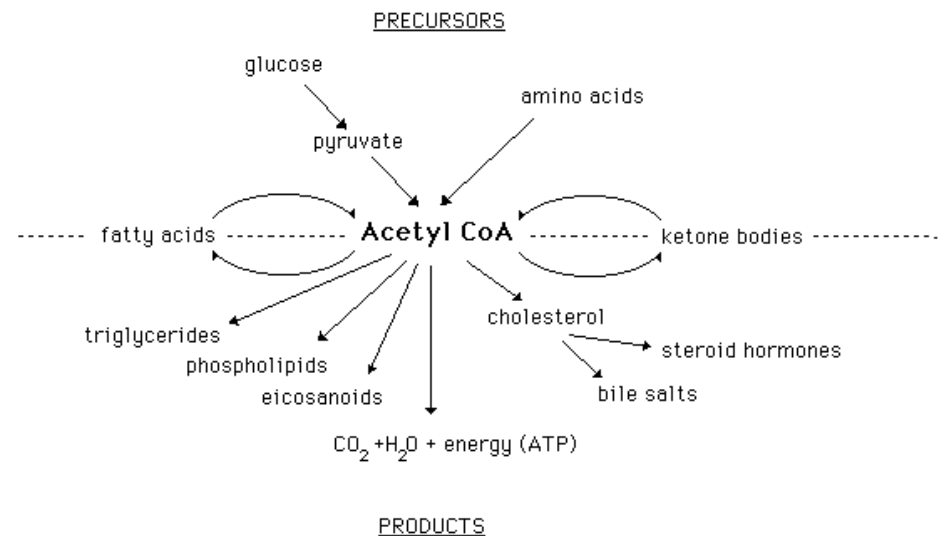
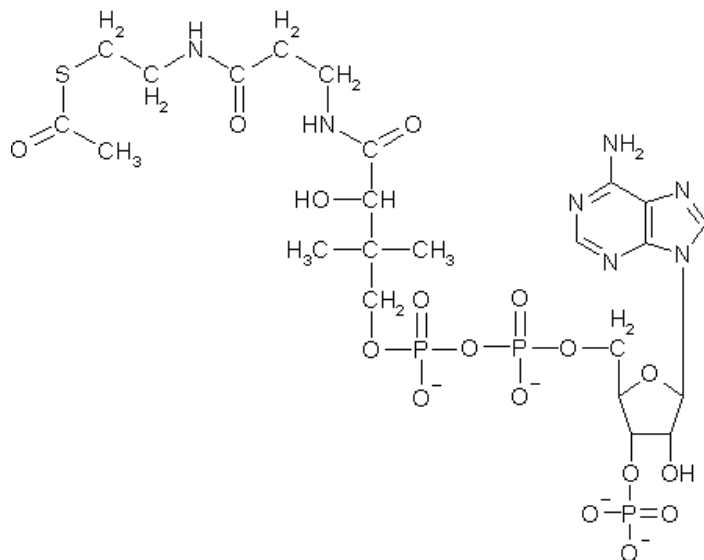
## 1. Présentation

- Réactions:
  - CODH:  $\text{CO} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{CO}_2 + 2 \text{H}^+ + 2 \text{e}^-$
  - ACS:  $\text{CH}_3\text{CFeSP} + \text{CO} + \text{CoA} \rightleftharpoons \text{Acetyl-CoA} + \text{CFeSP}$
- CODH unifonctionnelle: bactéries anaérobies utilisant CO pour leur croissance (couplé à une hydrogénase pour la production d'énergie). Sens  $\text{CO} \rightarrow \text{H}_2 + \text{CO}_2$
- CODH/ACS (bifonctionnelle):
  - Bactéries acétogènes autotrophes sur CO et CO<sub>2</sub> (catalyse la formation d'Acétyl-CoA). Sens  $\text{CO} + \text{CoA} \rightarrow \text{Acetyl-CoA}$
  - Archaeas méthanogènes (omniprésente): utilisent l'acétyl-CoA comme matière première pour leur métabolisme. Catalyse la première étape de réduction de CO<sub>2</sub>. Sens  $\text{Acetyl-CoA} \rightarrow \text{CO} + \text{CoA}$

Chez les organismes les plus primitifs

# Formation de l'acétylCoA

- Acétyl CoA est au centre de tous les métabolismes
- La cellule couple l'hydrolyse de la liaison thioester à la formation d'ATP
- La cellule utilise l'acétyl CoA comme brique pour synthétiser un grand nombre de composés essentiels.



Acetyl CoA is a central intermediate in lipid metabolism.

# Oxydation de CO

- CO est un poison, la CODH est l'enzyme qui permet de maintenir la teneur en CO en dessous du niveau toxique.
- $10^8$  tonnes de CO éliminées/an par cette enzyme
- $\text{CO} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{CO}_2 + 2 \text{H}^+ + 2 \text{e}^-$   $E^\circ = -0.558 \text{ V}$  donc très réducteur !
- Intérêt de canaliser le pouvoir réducteur de CO: L'énergie d'une cellule est l'ATP et elle utilise le pouvoir réducteur de composés pour en synthétiser (via les chaînes respiratoires)
- CO 1000 fois plus puissant que NADH comme réducteur, mais pas utilisable tel quel car non « stockable » et toxique. Il va être utilisé pour réduire des ferredoxines, jouant le rôle de conteneur de pouvoir réducteur.

# CO comme ligand



- Propriétés :

- Base de Lewis très faible
- Ligand mou (triple liaison)
- $\pi$  accepteur fort (« back bonding ») et  $\sigma$  donneur: Ligand très fort

- Réactivité :

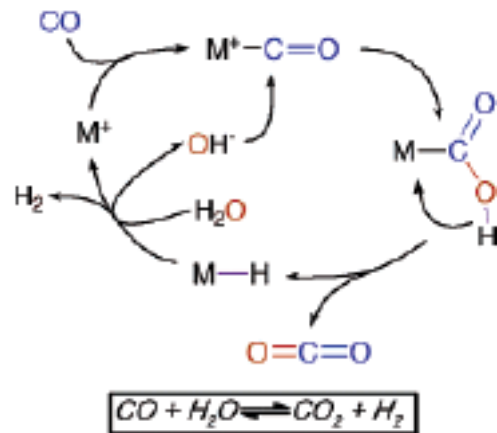
- Insertions, éliminations, additions nucléophiles ... en fonction de la polarisation de CO, donc de la polarisabilité de la liaison M-L et finalement des co-ligands
- Ex: Additions nucléophiles et insertion favorisées en augmentant l'électrophilie du carbone de CO; Réactions impliquant une attaque électrophile à l'O: Augmentation de la nucléophilie de O

- CO dans l'industrie: carbonylation, réaction de Fischer-Tropsch, hydroformylation, hydrogenation (en utilisant H<sub>2</sub>O comme source d'hydrogène)...

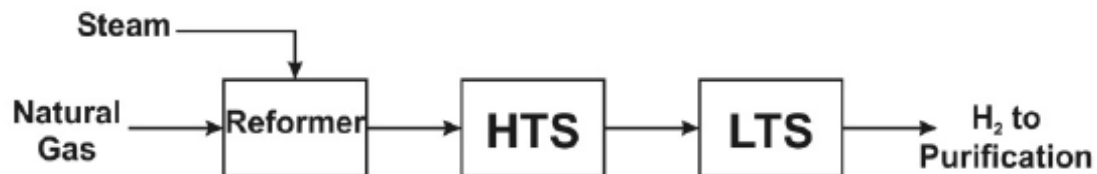


- Inerte (grande barrière d'activation pour les réactions avec CO<sub>2</sub>): Complexation avec des métaux (complexe de Wilkinson (RhCl(PPh<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) par ex) diminue cette barrière.
- C = acide de Lewis (électrophile), O = faibles bases de Lewis (nucléophile)

# CO, CO<sub>2</sub> et industrie: Réaction du gaz à l'eau



- Réaction en 2 étapes: 350°C (HTS, 90% de CO chassé) puis 200° (LTS 90% des 10% restants)
- Catalyseurs à base d'oxydes Fe,Cr (HTS) et Cu,Zn (LTS). Catalyseurs très sensibles à l'oxygène
- Réaction utilisée industriellement pour chasser CO du gaz naturel.



January 2004 • NREL/MP-580-35592

*Milestone Report*

**Biological Water-Gas Shift  
Conversion of Carbon  
Monoxide to Hydrogen**

Milestone Completion Report

Wade A. Amos



National Renewable Energy Laboratory

1817 Cole Boulevard  
Golden, Colorado 80401-3383

NREL is a U.S. Department of Energy Laboratory  
Operated by Midwest Research Institute • Battelle  
Contract No. DE-AC36-99-GO16337

# Répartition CODH uni/bifonctionnelles

**Table 1. Properties of Ni-CODHs and Ni-ACSs**

organism (class <sup>a</sup> )	subunit (gene) size	cofactor content	cluster content	catalytic activities	ref(s)
<i>C. thermoaceticum</i> (A)	$\alpha$ ( <i>acsB</i> ) 78 kDa; $\beta$ ( <i>acsA</i> ) 71 kDa	2 Ni, 11–14 Fe, 14 S <sup>2-</sup> , 1 Zn/149 kDa	ABC	CODH, ACS	16,23
<i>A. woodii</i> (A)	$\alpha$ , 80 kDa; $\beta$ , 68 kDa	1.4 Ni, 9 Fe, 14 S <sup>2-</sup> , ~1 Zn or Mg/148 kDa	ABC	CODH, ACS	12
<i>Ms. barkerii</i> (M)	$\alpha$ , 84–92 kDa; $\beta$ , 63 kDa; $\gamma$ , 53 kDa; $\delta$ , 51 kDa; $\epsilon$ , 20 kDa	0.7 Ni, 8–15 Fe, 0.9 Co, 0.5 Zn/266 kDa	ABC	CODH, ACS	25,28,33
<i>Ms. barkerii</i>	$\alpha$ , 84–92 kDa; $\epsilon$ , 20 kDa	0.7 Ni, 8–15 Fe, 0.5 Zn/100 kDa	ABC	CODH	35
<i>Ms. thermophila</i> (M)	$\alpha$ ( <i>cdhA</i> ) 89 kDa; $\beta$ ( <i>cdhC</i> ) 71 kDa; $\gamma$ ( <i>cdhD</i> ) 60 kDa; $\delta$ ( <i>cdhE</i> ) 58 kDa; $\epsilon$ ( <i>cdhB</i> ) 19 kDa	3.6 Ni, 25 Fe/297 kDa	ABC	CODH, ACS	24,26,39
<i>Ms. thermophila</i>	$\alpha$ , 79 kDa; $\epsilon$ , 19 kDa	0.2 Ni; 7.7 Fe; 2.7 Zn/98 kDa	ABC	CODH, ACS	24,26,39
<i>Mt. soehngenii</i> (M)	$\alpha$ ( <i>cdhA</i> ) 79 kDa; $\epsilon$ ( <i>cdhB</i> ), 19 kDa	2 Ni, 12.5 Fe/98 kDa	ABC	CODH, ACS	31,32,34
<i>Mc. vannielii</i> (M)	$\alpha$ ( <i>cdhA</i> ) 89 kDa; $\epsilon$ ( <i>cdhB</i> ), 21 kDa	1.0 Ni, 8 Fe, 0.2 Zn/110 kDa	ND	CODH	29
<i>R. rubrum</i> (purple nonsulfur bacterium)	62 kDa ( <i>coaS</i> )	1 Ni, 8 Fe	BC	CODH	54

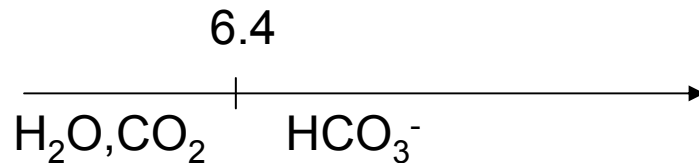
<sup>a</sup> A, acetogen; M, methanogen.

La plupart ont la capacité de catalyser les 2 réactions (elles sont appelé CO dehydrogenase bifonctionnelles)

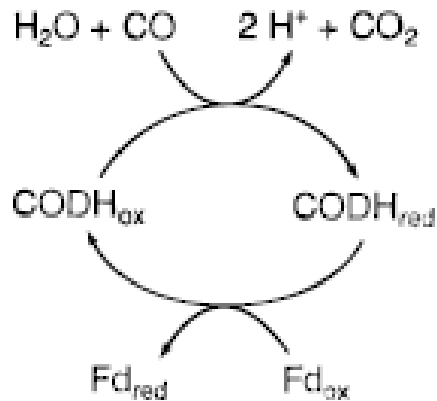


# CODH: Aspect mécanistique

- Réaction observable uniquement à pH acide:



- Mécanisme « ping pong »

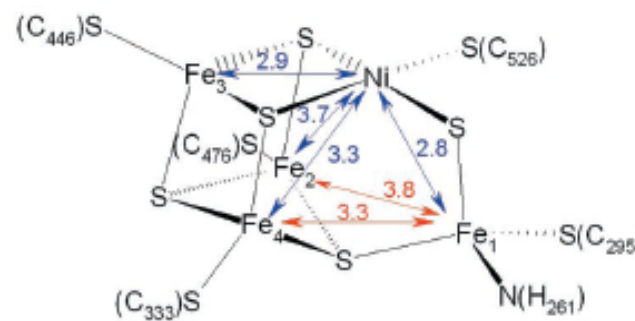
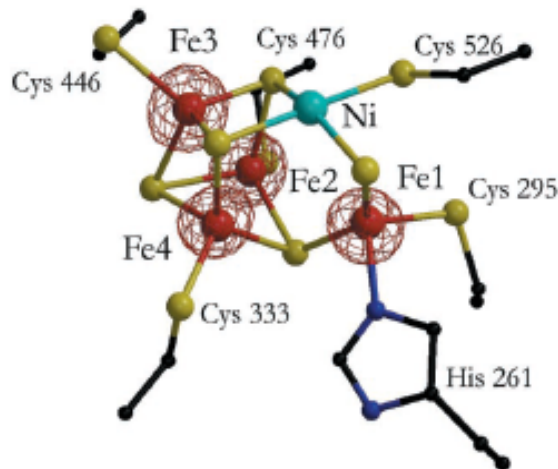


**other acceptors:**  
FMN, FAD, rubredoxin,  
flavodoxin, cytochrome c,  
methylene blue, viologens

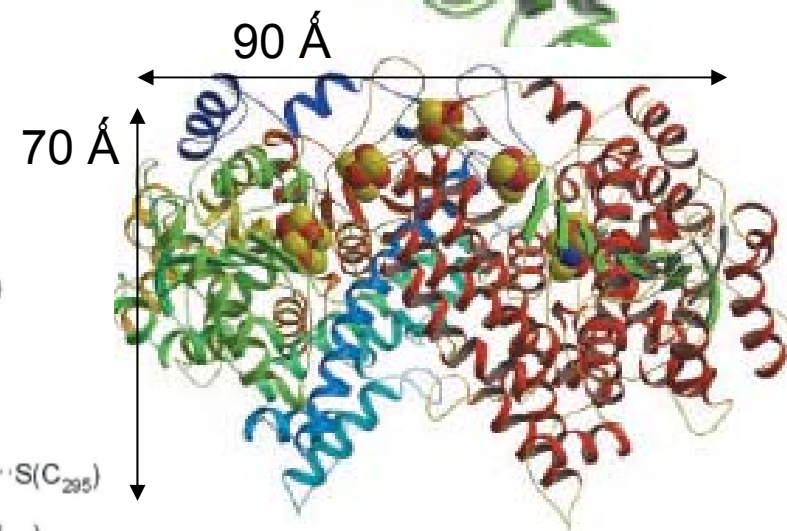
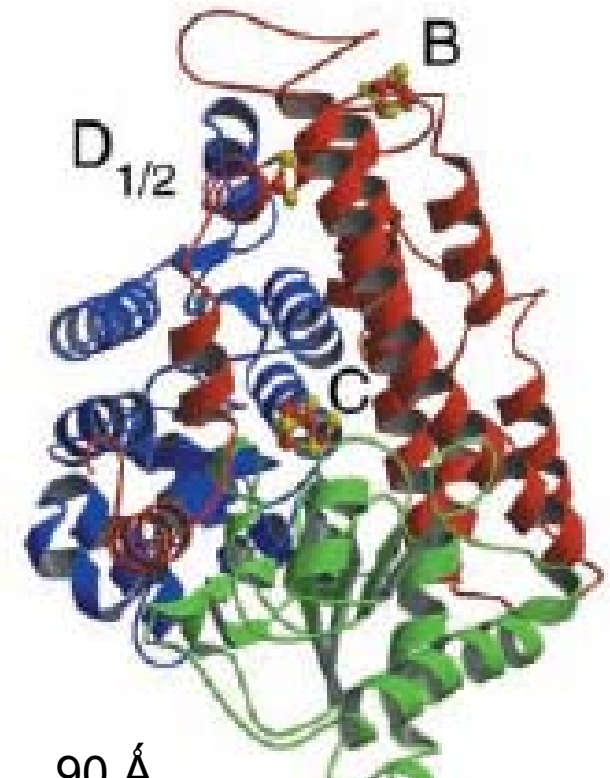
Efficacité:  $k_{\text{cat}} = 40\,000\text{ s}^{-1}$  et efficacité catalytique =  $2 \cdot 10^9\text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$

## 2. CODH unifonctionnelle Structure

- Dimère 130 kDa
- 5 centres métal-soufre:
  - 2 de type B (Cys-X<sub>2</sub>-Cys-X<sub>4</sub>-Cys) donc [4Fe-4S]
  - 1 de type D: jonction entre les 2 monomères
  - 2 de type C: Site actif



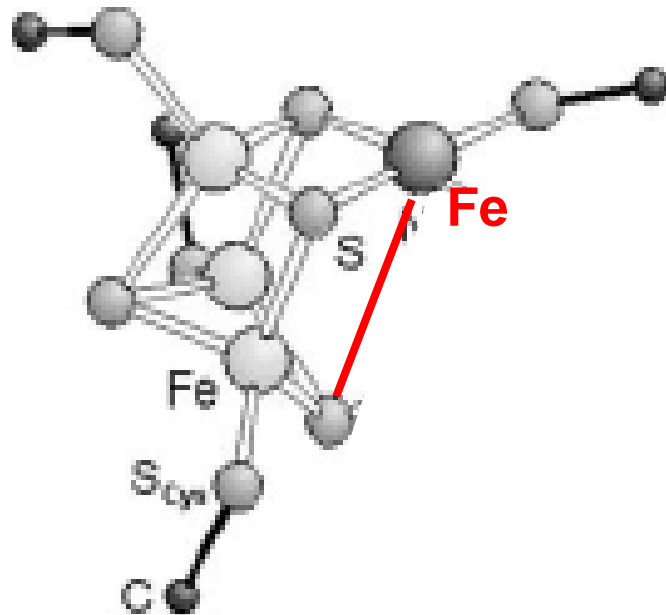
[NiFe<sub>4</sub>S<sub>5</sub>] !!



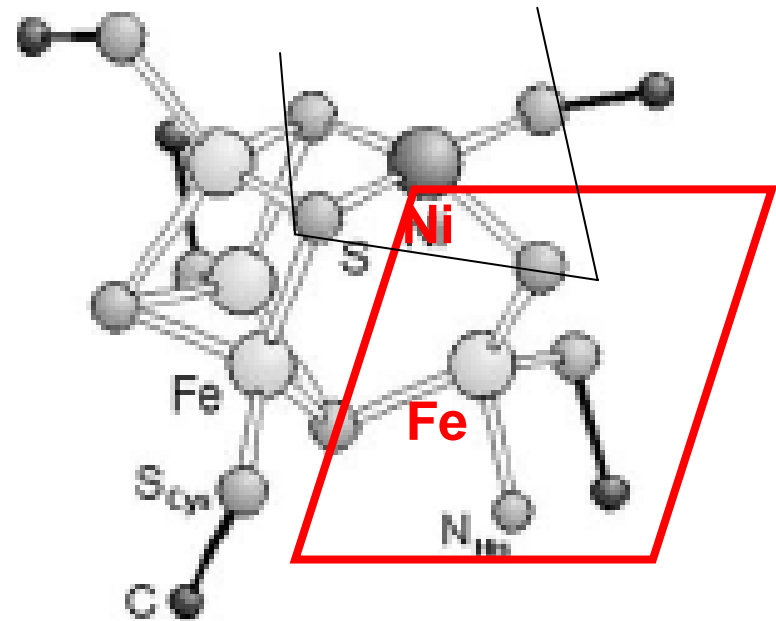
*C. Hydrogenoformans*

# Cubane [4Fe-Ni-5S]

Ni ~ plan carré  
Fe = tétraèdres

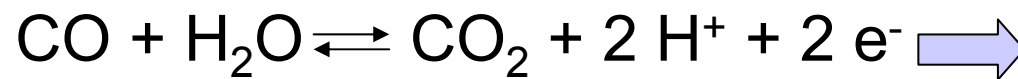


Cubane « classique »  
[4Fe-4S]

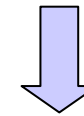


Cubane [4Fe-Ni-5S]

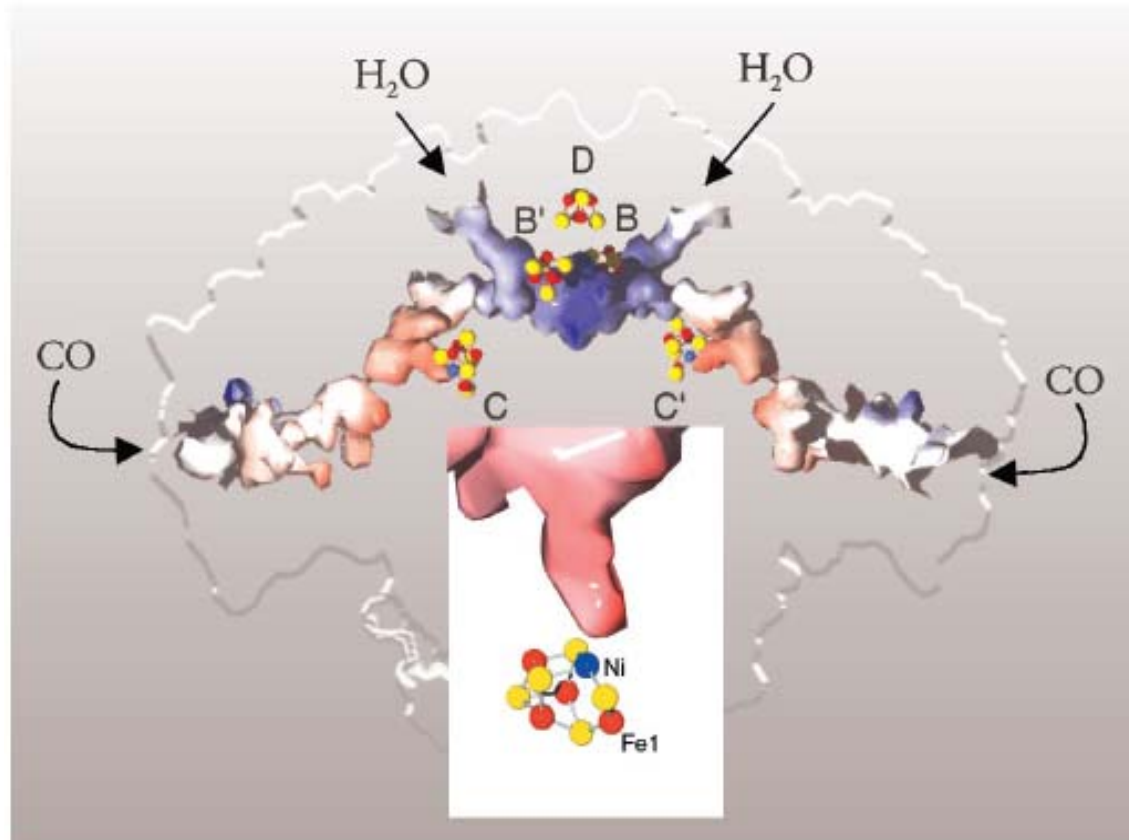
# Canaux traversant la protéine



Gaz (hydrophobe) et  $\text{H}_2\text{O}$  (hydrophile) doivent accéder au site actif enfoui.

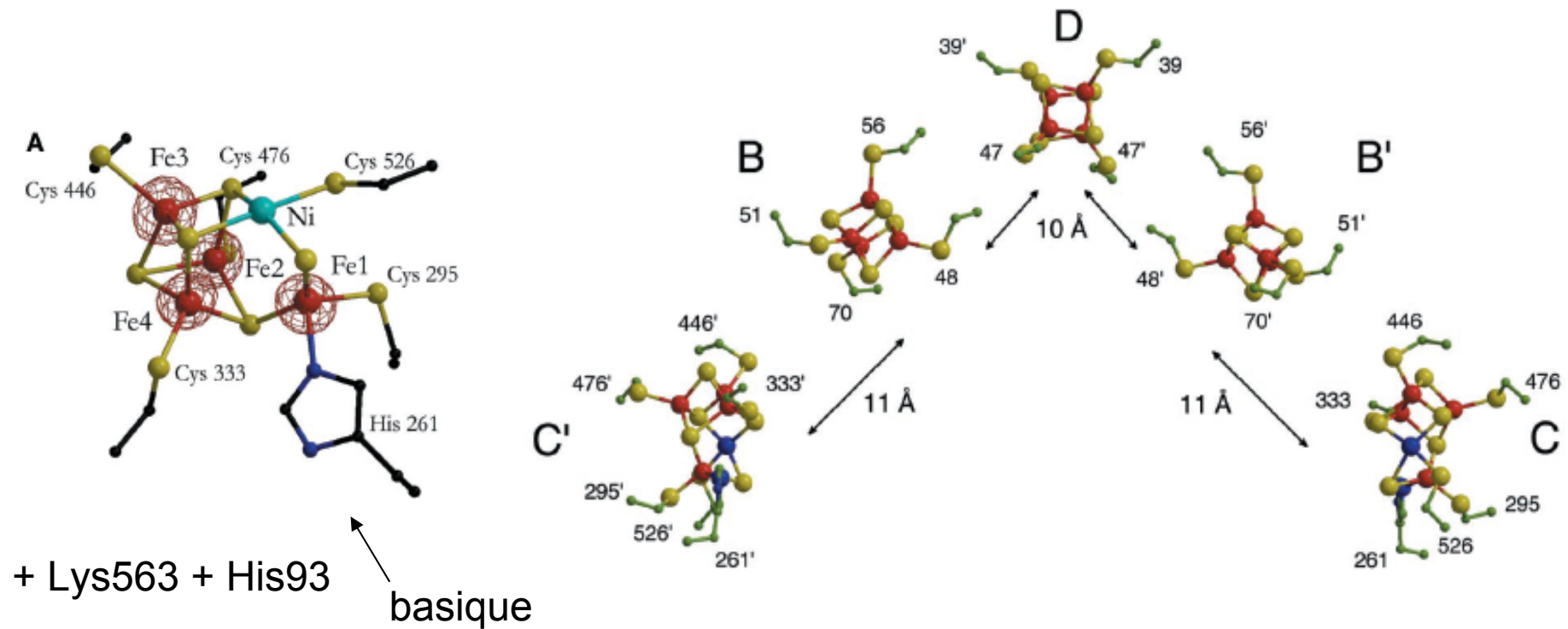


Empruntent deux canaux différents, l'un hydrophile, l'autre hydrophobe.



Rose: hydrophobe  
Violet: hydrophile

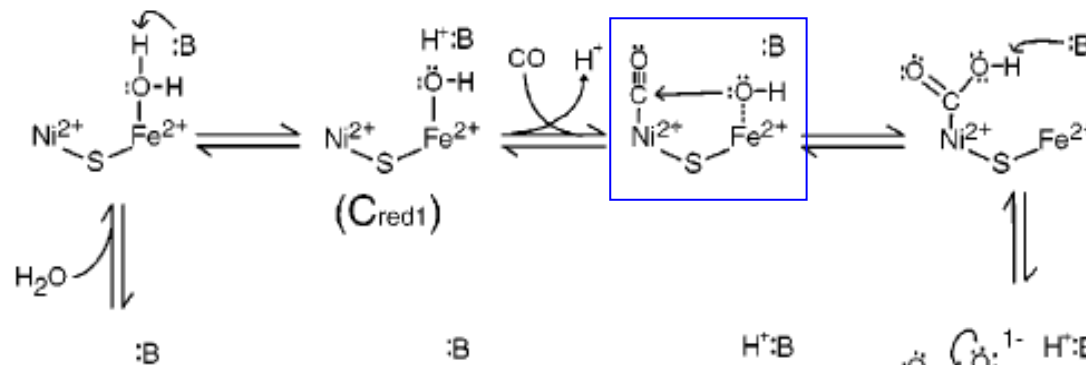
# Transfert de protons et d'électrons



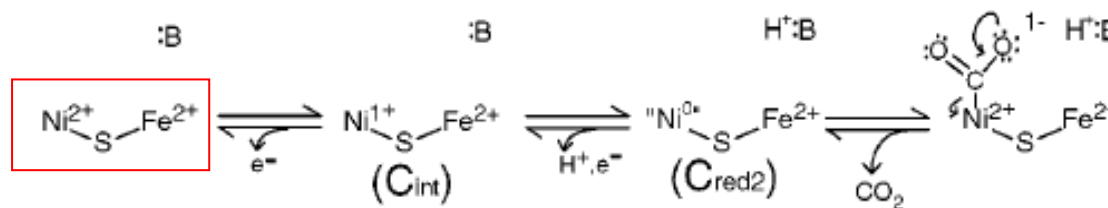
Implication éventuelle dans le transfert de protons

# Mécanisme proposé

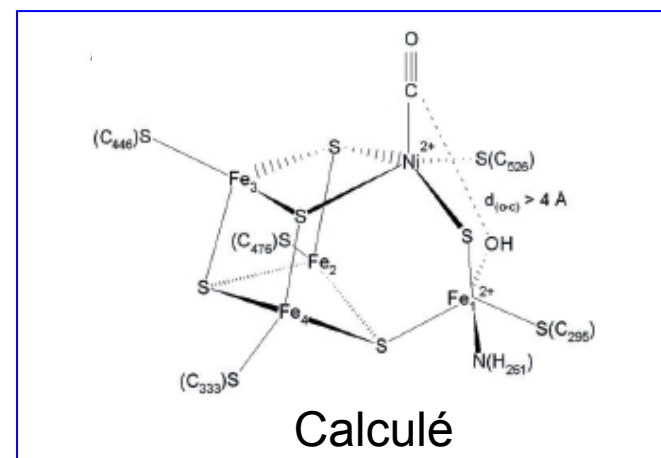
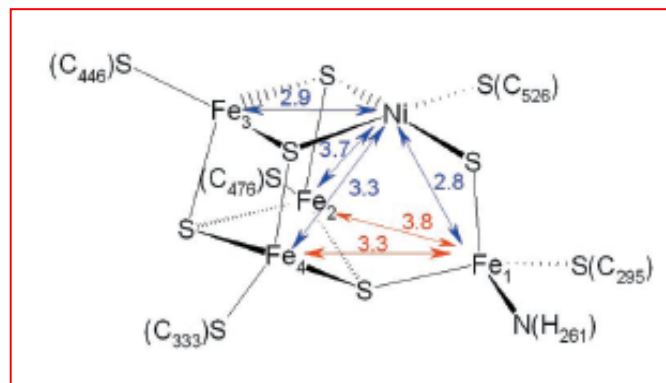
Acidité de Lewis du métal diminue le pKa de la molécule d'eau (Cf enzyme à Zn)



Attaque nucléophile du CO fixé



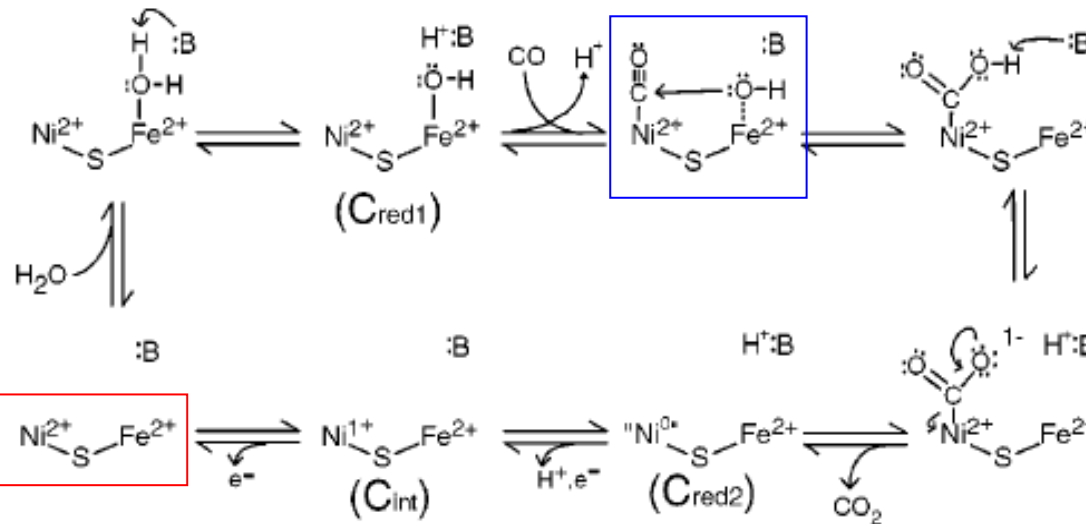
Transfert d'électrons, perte d'affinité de CO<sub>2</sub> par rapport à l'anion ou CO



B: Lys587 ou His113 (*M. Thermoacetica*)

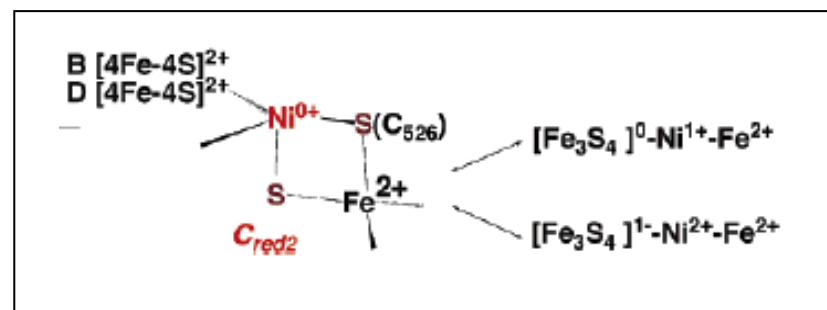
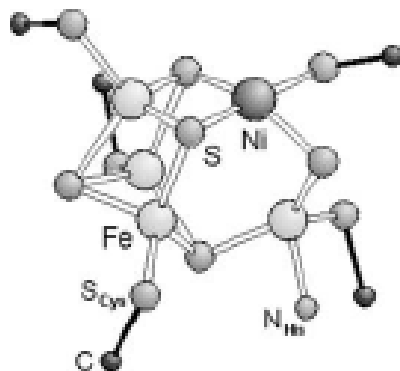
Site de fixation d'après spectro

# Mécanisme proposé



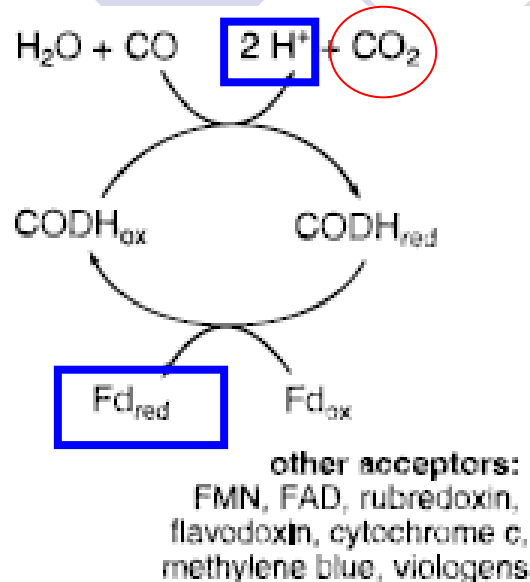
Attaque nucléophile du CO fixé

Transfert d'électrons, perte d'affinité de CO<sub>2</sub> par rapport à l'anion ou CO

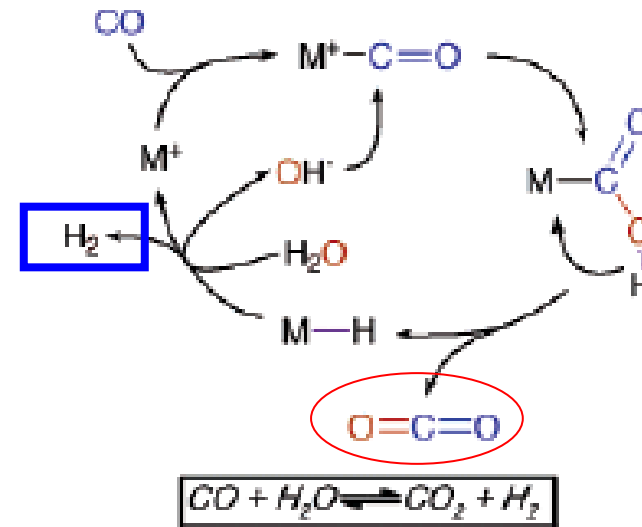


Forme Ni<sup>0</sup> stabilisée par transfert d'électron au cluster [3Fe-4S]

# Conclusion CODH



## Water-gas Shift reaction



Pourquoi la nature ne synthétise pas directement H<sub>2</sub> ?

→ Vraisemblablement les électrons sont trop rapidement transférés aux centres fer-soufre et éloigné du centre réactionnel  
 Y a-t-il un intérêt?

→ La nature se réserve le choix d'alimenter en électron des ferrédoxines OU de produire H<sub>2</sub> en couplant la CODH avec une hydrogénase

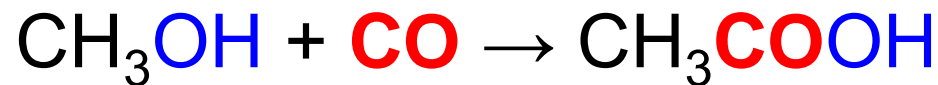


### 3. CODH/ACS (bifonctionnelle)

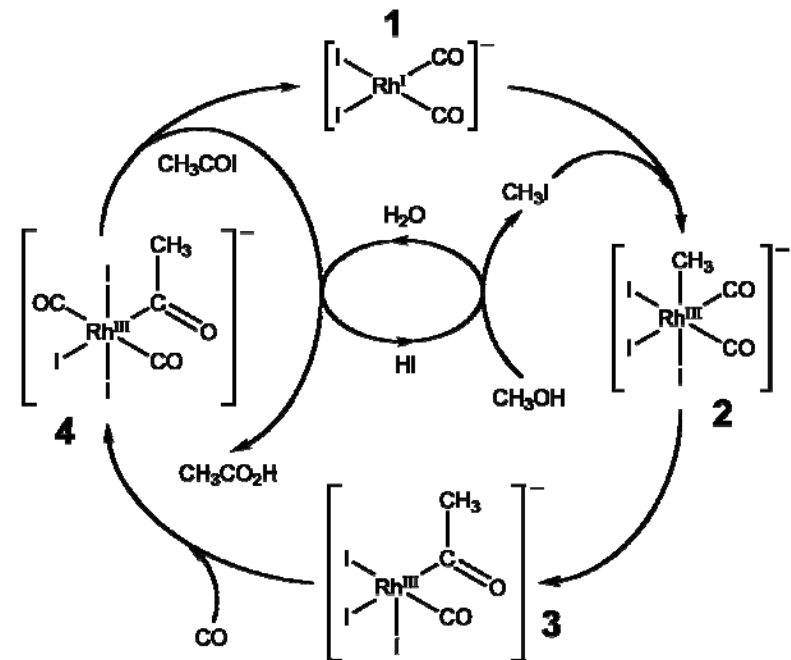


- P et T douces (pression atmosphérique, 40°C)

Réaction apparentée au procédé industriel Monsanto:



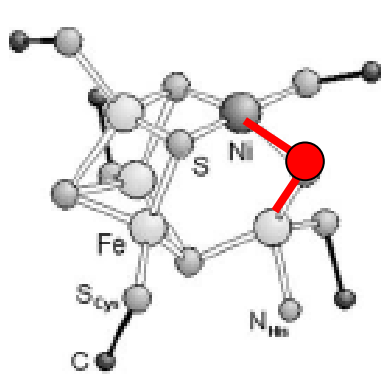
- P = 30-60 bars
- T = 150-200°C
- Catalyseur au Rhodium



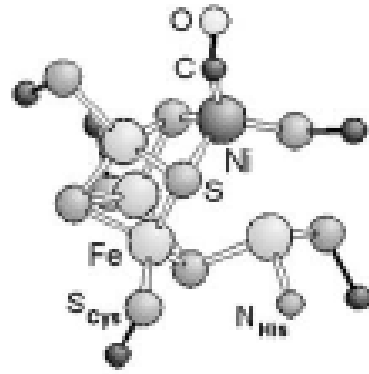
# Clusters essentiels des CODH bifonctionnelles par rapport aux unifonctionnelles :

- CODH unifonctionnelle:
  - Cluster B: Transport d'électrons (4Fe-4S)]
  - **Cluster C: Oxydation du CO**
  - Cluster D: Transport d'électrons (4Fe-4S)]
- CODH bifonctionnelle:
  - **Cluster A: Synthèse de l'acétyl-CoA**
  - Cluster B: Transport d'électrons (4Fe-4S)]
  - **Cluster C: Oxydation du CO**

Cluster C:



unifonctionnelle

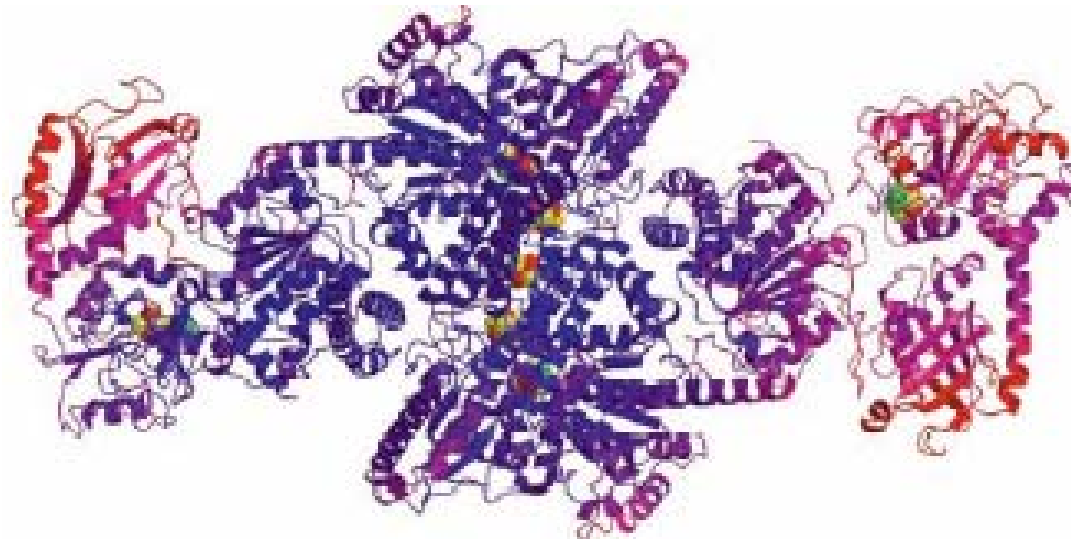


bifonctionnelle

→ Très similaire mais perte d'un **S<sup>2-</sup>**

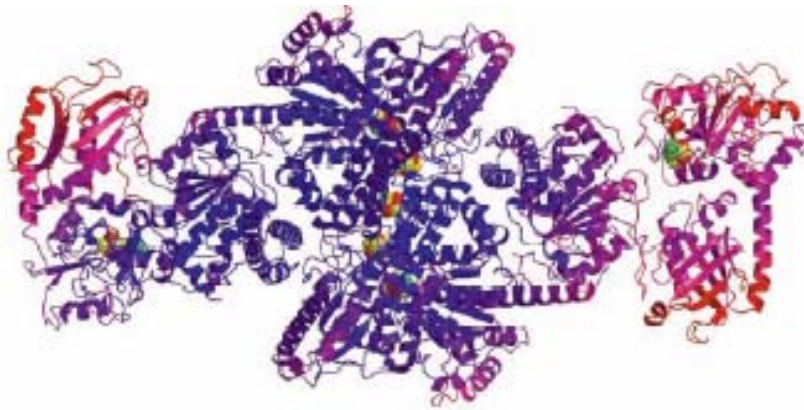
# CODH bifonctionnelles: Structures générales

- Acétogènes: Dimère de dimère  $\alpha\beta$   
 $\alpha$  (78 kDa),  $\beta$  (71 kDa)
- Méthanogènes: pentamère ou hexamère de pentamère  
 $\alpha$  (90 kDa),  $\beta$  (60-70 kDa),  $\gamma$  (60 kDa),  $\delta$  (58 kDa),  $\epsilon$  (20 kDa).

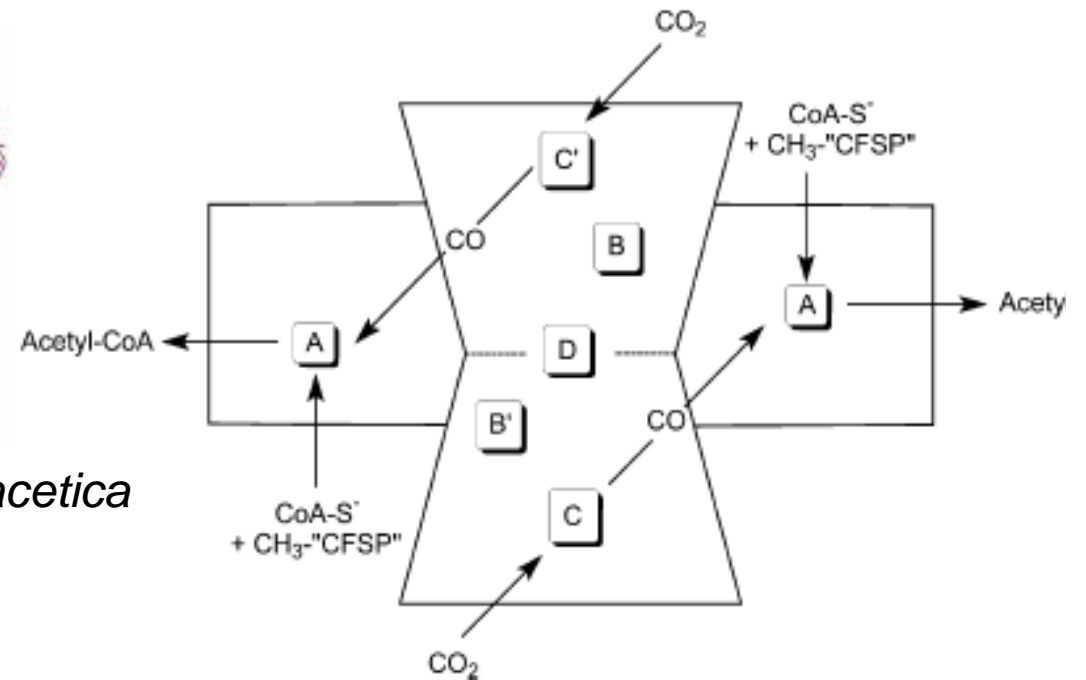


$\alpha$ : rouge  
 $\beta$ : bleu

# Distribution des sous-unités



*M. Thermoacetica*

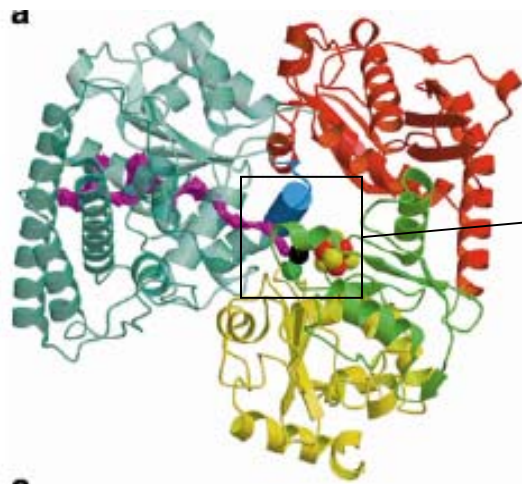
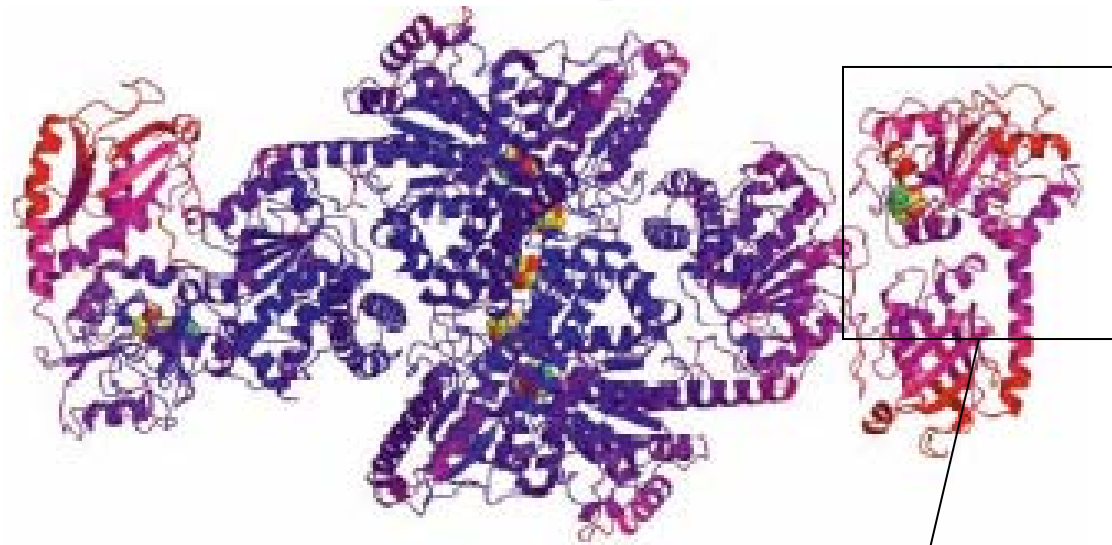


« CFeSP » Corrin iron sulfur protein

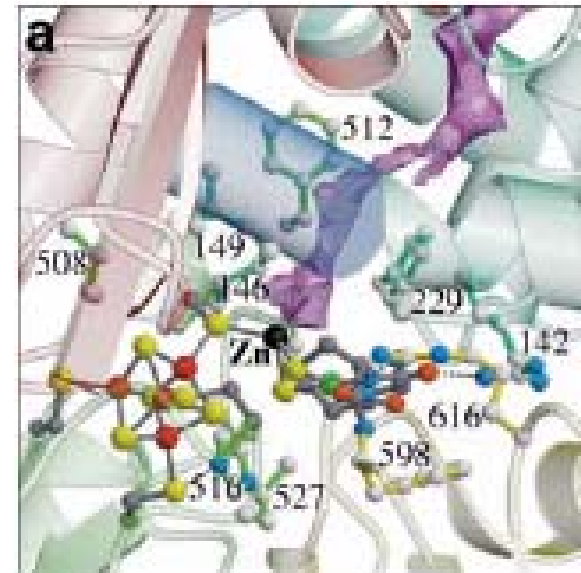
Cluster C: Réduction de  $\text{CO}_2$  (électrons proviennent de Fd)

→ Remarquer que cette réaction est inverse à celle des CODH unifonctionnelles

# Diffusion de CO



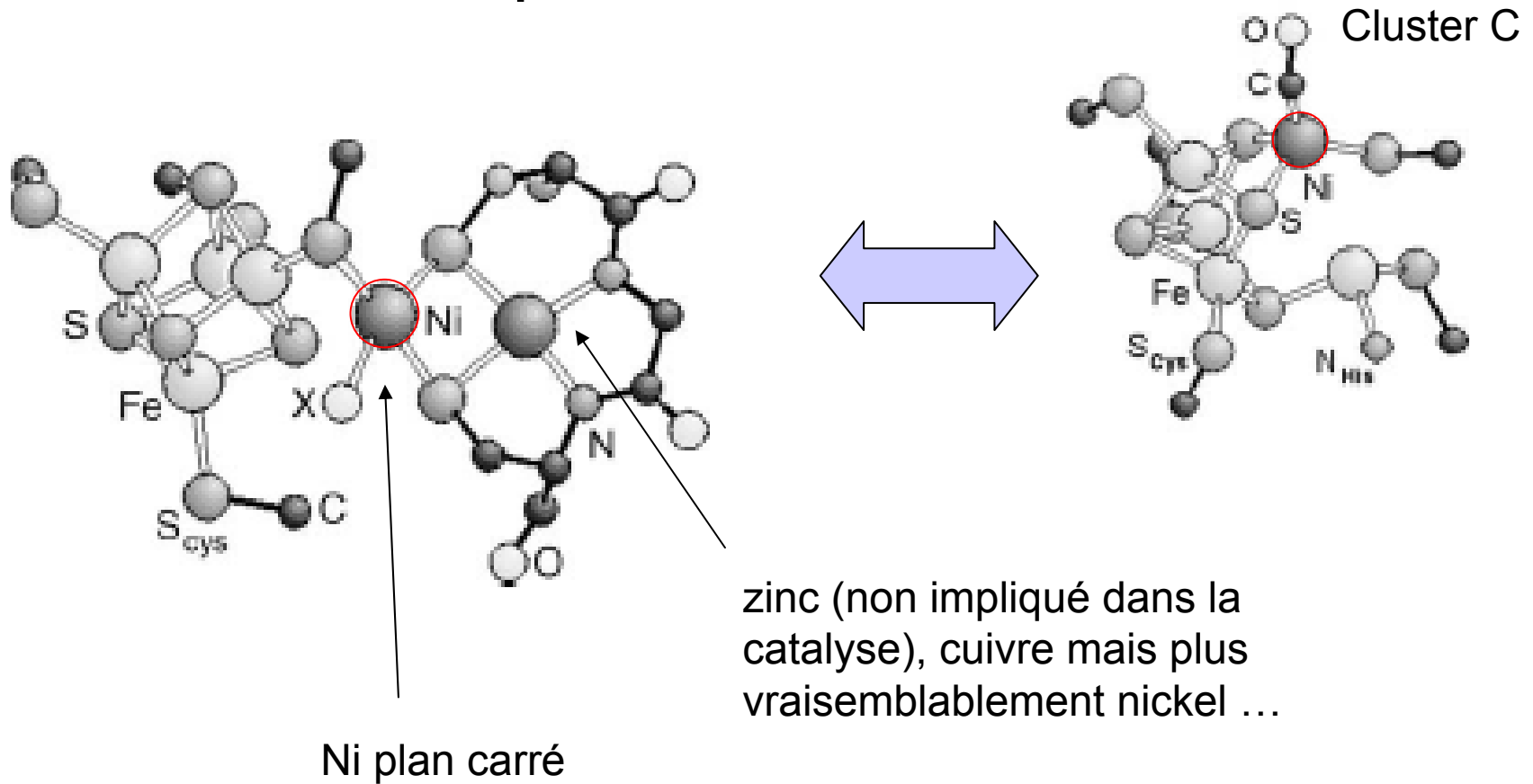
Cluster A



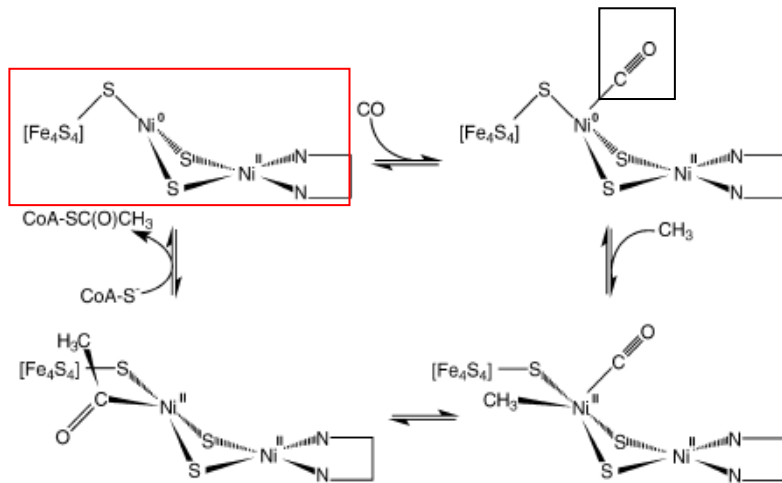


# Lieu de la formation d'acétyl-CoA: Cluster A

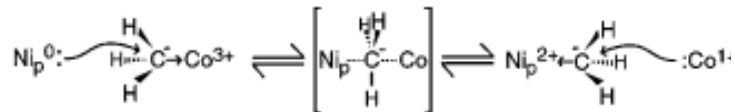
- Nouveau cas particulier:



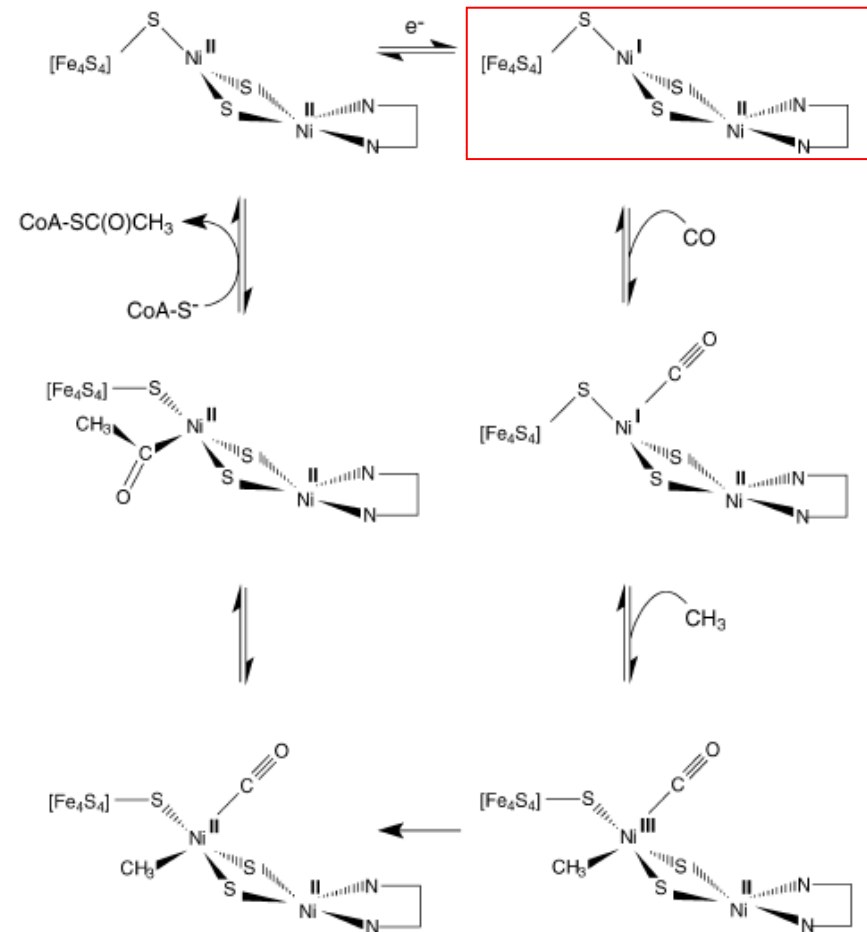
# 2 mécanismes proposés



Fixation de CO: pas de changement de degré rédox du métal

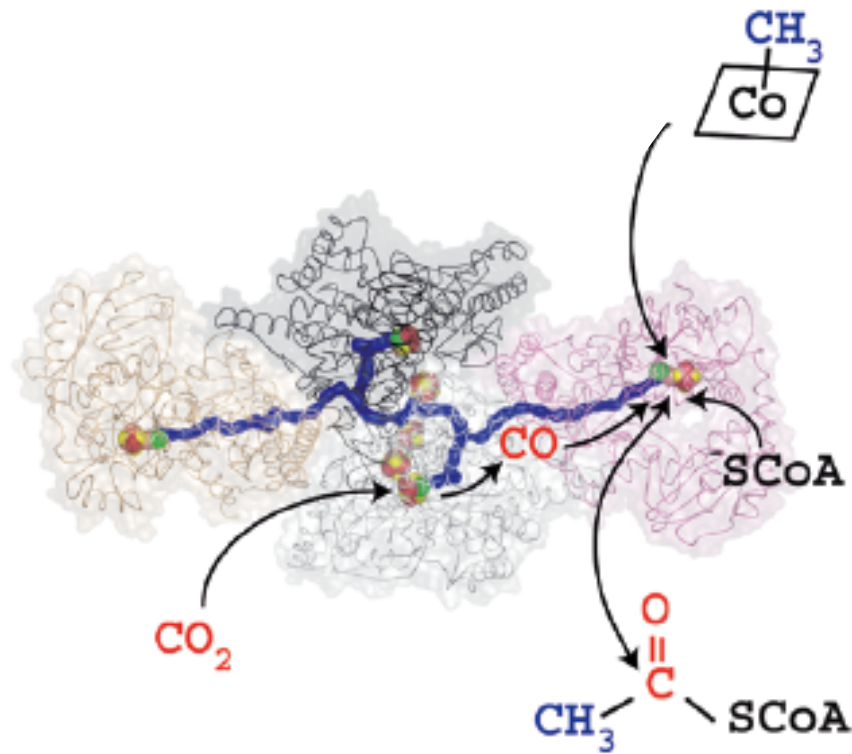


Ni(0): Riche chimie organométallique, mais avec des ligands très  $\pi$ -accepteurs (phosphines, CO) pour le stabiliser: Ligands biologiques pas très  $\pi$ -accepteurs donc implication probable du centre fer-soufre pour délocaliser les charges  $[4\text{Fe-4S}]^+$ ,  $\text{Ni}^+$  au lieu de  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ ,  $\text{Ni}^0$

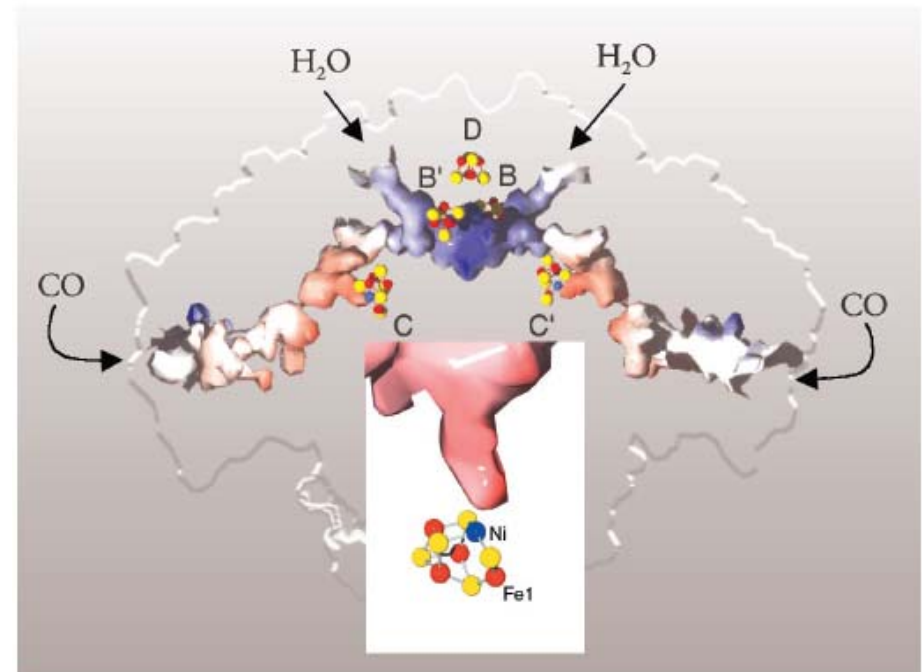
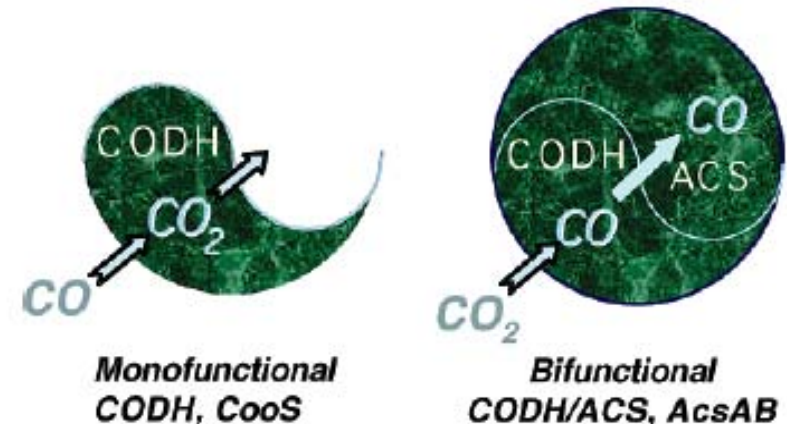




# Activité CODH ou CODH/ACS?



Un canal hydrophobe pour diffuser CO du cluster C au cluster A (et éviter qu'il ne diffuse à l'extérieur de la protéine)



Un canal hydrophobe pour CO (et CO<sub>2</sub>?). L'autre est hydrophile pour entrer de l'eau

## VIII. Conclusion



- Chimie organométallique = chimie des transferts de méthyl et des réarrangements radicalaires.
  - Transfert de méthyl: Indifféremment Ni ou Co.
  - Réarrangements radicalaires avec Co, activité liée à l'AdoMet.
- Réactions souvent réversibles.
- Métabolisme Acétyl-CoA: Enzymes primitives à Ni, très abondant à l'origine de la vie.