

**ACTIVITES BIOLOGIQUES DES ANALOGUES SYNTHETIQUES
Fe₄S₄(SR)₄ DES SITES ACTIFS DES FERREDOXINES**

Mohamed RZAIGUI⁽¹⁾, David BENLIAN⁽²⁾ et N. ARIGUIB⁽¹⁾

(1) Département de Chimie-Ecole Normale Supérieure
43, Rue de la Liberté - Tunis -

(2) Laboratoire de Chimie de Coordination
Université de Provence⁽¹⁾, Centre de Saint-Jérôme - Aix-Marseille - FRANCE -

RESUME : Un complexe organométallique hydrosoluble

$[\text{Fe}_4\text{S}_4(\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{OH})_4]^{2-}$ a été préparé. L'état d'oxydation (2-) de ce complexe peut-être réduit aux états (3-) et (4-). Les états rédox (2-) et (3-) présentent une similitude électronique nette avec les états physiologiques de la ferredoxine (Fdl) de desulfobriogigas. Le cluster, préparé dans l'état d'oxydation (2-) est stable en solution aqueuse appropriée et dans des conditions strictement anaérobiques. Il peut se substituer, in vitro, à la F.d.I de D. gigas, en tant qu'accepteur final d'électrons dans la chaîne enzymatique :

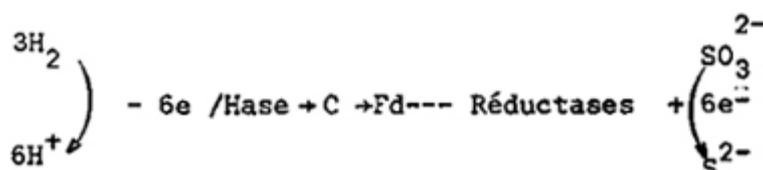
H₂ Hydrogénase Cytochrome C₃ Fd. de D.gigas

I. - INTRODUCTION :

De nombreuses études spectroscopiques, confirmées par une analyse cristallographique aux R-X montrent que les complexes synthétiques du type Fe₄S₄(SR)₄ constituent de bons modèles électroniques des sites actifs Fe₄S₄(Cys)₄ des protéines à 4Fe-4S et 8Fe-8S(1).

Il serait donc très intéressant de voir si cette analogie peut s'étendre à une similitude d'activité biologique. Une telle étude n'était pas possible avec les premiers clusters de Holm et Coll(2) à cause de leur insolubilité en milieu aqueux ne touchant en rien les structures et l'activité des protéines. Dans une récente contribution(3), Bruce apporte l'extension, à la solution aqueuse de la chimie des modèles Fe₄S₄(SR)₄ développée essentiellement en milieux organiques.

Dans la présente contribution nous apportons les premières tentatives de substitution de la Fdl de D.gigas par le cluster préparé, dans un système biologique impliqué dans la réduction du sulfite en sulfure chez D.gigas :



Les détails de cette substitution ainsi que quelques propriétés électroniques comparées du produit de synthèse et de l'espèce naturelle (Fdl) sont donnés dans ce texte.

II. - PARTIE EXPERIMENTALE

1 - Préparation des produits

- **Le cluster** : $\text{Fe}_4\text{S}_4(\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{OH})_4[\text{N}(\text{CH}_3)_4]_2$, qu'on désigne dans tout ce qui va suivre par le symbole A^{2-} , est préparé comme il a été indiqué par Holm et Coll(4).

- **Les protéines** : Hydrogenase (Hase), cytochrome (cyto. C₃) et la ferredoxine (Fdl) de *D. gigas* ont été fournies par le laboratoire de chimie bactérienne (C.N.R.S. Marseille, FRANCE).

2 - Mesures Physiques

- Spectroscopie d'absorption Mossbauer

Le spectre du cluster A^{2-} (fig. 1-a) a été relevé sur un échantillon en poudre à la température de l'azote liquide avec un sépectromètre à accélération constante mettant en œuvre un analyseur multicanaux travaillant en temps de vol, sur 256 canaux.

- Résonance paramagnétique électronique (R.P.E.)

Les spectres R.P.E du cluster A^{2-} et de la Fdl (fig. 1-b,c) ont été enregistrés à l'aide d'un spectromètre travaillant en bande X à la fréquence fixe 9375 MHz, dans les conditions expérimentales suivantes :

	A^{2-}	Fdl
Puissance hyperfréquence	675 w	20 mw
Amplitude de la modulation	2,3 G	10 G
Température	9 K	18 K

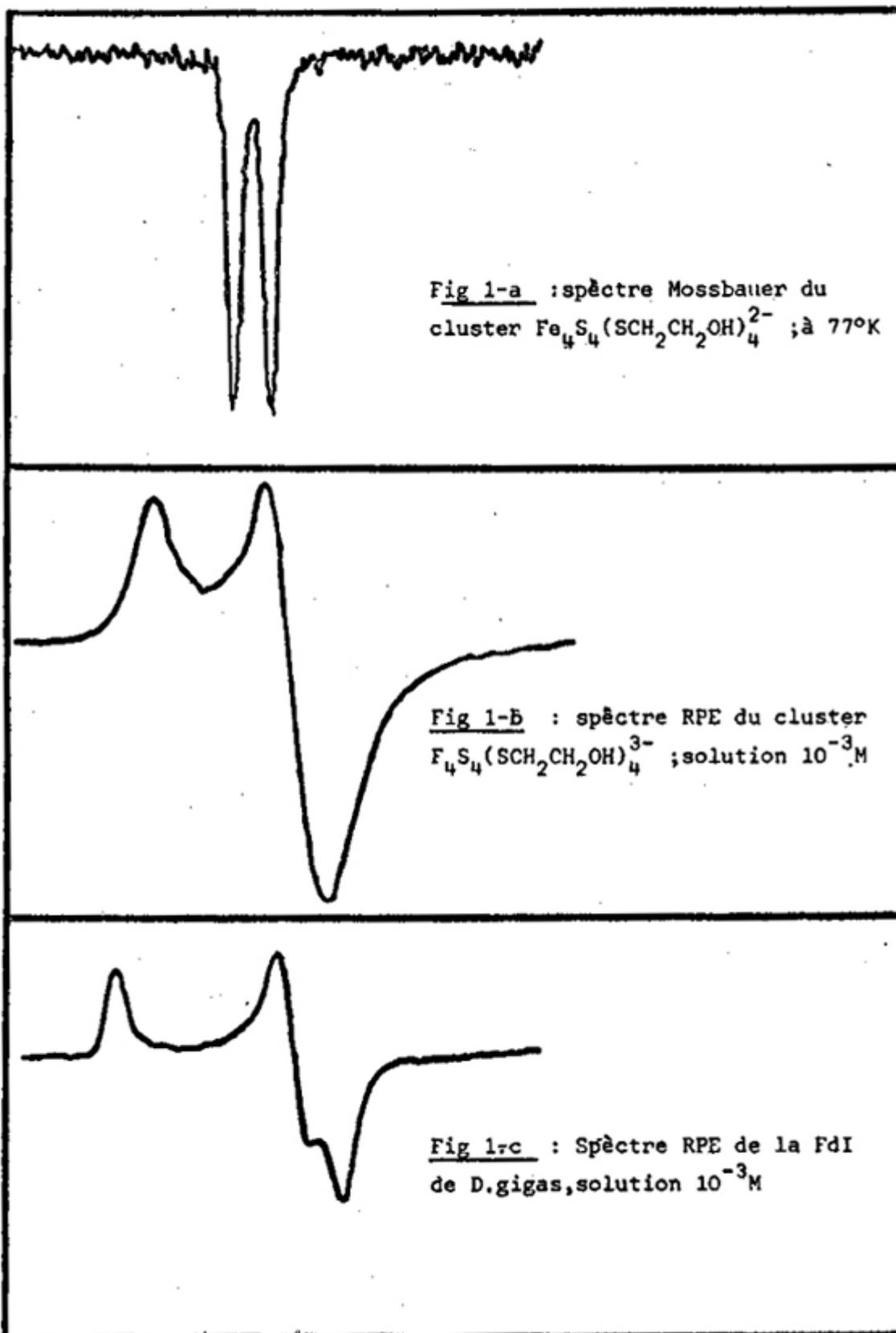
Le cluster A^{2-} et la Fdl sont réduits par le dithionite, en solution aqueuse (Tampon tris Hcl pH = 7,6).

- Spectroscopie optique

Un spectrophotomètre Beckman, modèle 25, a été utilisé avec des cuves de 1 cm de trajet optique. Les spectres de la fig.(2) correspondent à :

- une solution $6,6 \cdot 10^{-5}$ M en A^{2-}
- une solution $3,8 \cdot 10^{-5}$ M en Fdl

3 - Activité biologique



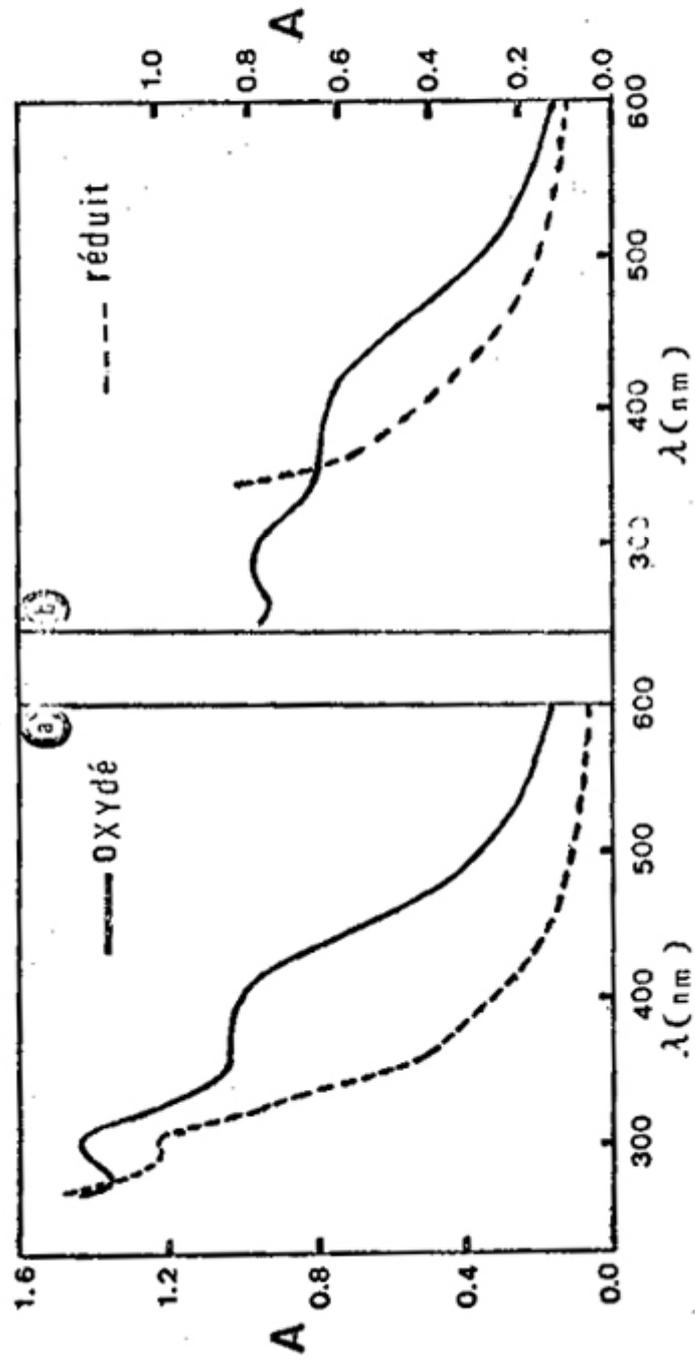


Fig 2 : Réduction par le dithionite :
(a) du cluster $\lambda = 375$; 300 nm ; $\epsilon = 15 \cdot 500$; 20 800)
(b) de la Pdl de D.gigas, état oxydé ($\lambda = 405$; 300 nm ; $\epsilon = 16 \cdot 000$; 20 600)

- Expériences suivies par spectroscopie optique

Toutes ces expériences ont été effectuées dans une cuve de 1 cm de trajet optique, en absence de toute trace d'oxygène.

a) A 2,88 n. mole d'Hase on ajoute 0,688 n. mole de cytochrome C_3 sous une atmosphère d'argon. Après enregistrement du spectre on envoie de l'hydrogène dans la cuve pendant 5 mn. On enregistre de nouveau le spectre (fig. 3) sur lequel apparait la bande à 553 nm du cyto C_3 et un déplacement vers le rouge de sa bande de solet. Cette variation spectrale indique que le cyto C_3 est réduit par l'Hase en présence de H_2 gazeux.

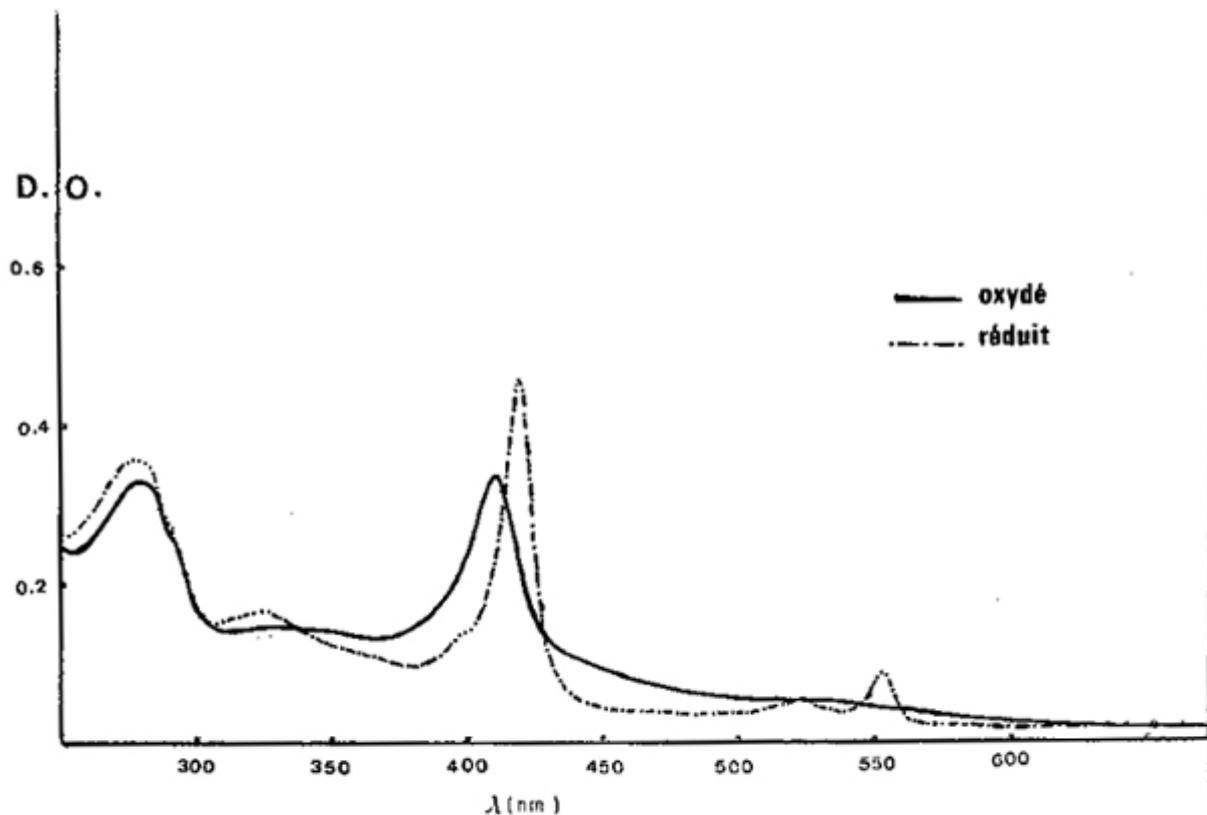


Fig 3 : Réduction enzymatique du cytochrome C_3 .

b) On reprend l'expérience (a) avec 86 n.moles de Fdl en présence de 2,88 n.mole d'Hase et 0,68 n.mole de cyto.C₃.

On constate que la coloration brune et le pic d'absorption à 405 nm, caractéristiques de la Fdl oxydée, diminuent alors que la bande du cyto.C₃ apparait avec un déplacement vers le rouge du pic de solet (fig. 4-a).

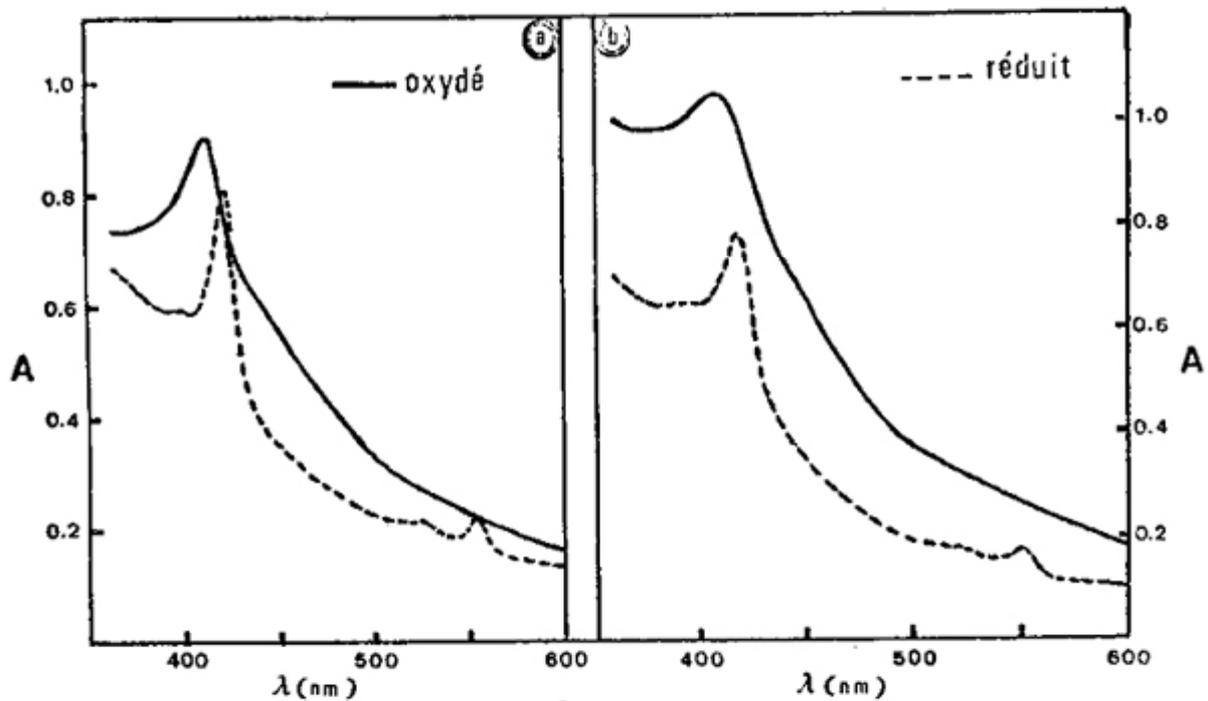


Fig 4 : Réduction enzymatique, en solution aqueuse :

(a) du cluster A²⁻

(b) de la Fdl de *D.gigas*

Ceci indique la réduction du cyto C₃ et de la Fdl.

c) A 0,72 n.mole d'Hase on ajoute, sous un courant d'argon, 0,34 n.mole de cyto.C₃ puis 180 n.moles de cluster A²⁻. On enregistre un spectre de la solution, puis on refroidit cette dernière dans un bain de glace et on introduit dans la cuve une très faible quantité d'H₂. Ce dernier entraîne une diminution évidente de la coloration brune de la solution et un changement spectral net (fig. 4-b). Ceci s'interprète comme le cas de la

Fdl, par une réduction du cyto.C3 et du cluster A²⁻.

d) On reproduit les expériences (b) et (c) sans cyto.C₃ on n'observe aucun changement de coloration ou de spectre, aussi bien avec la Fdl qu'avec le cluster A²⁻. Ceci exclut toute réaction de ces deux dernières espèces en l'absence de cyto.C₃.

- Expérience suivie par la méthode de Warburg

Nous avons suivi la réduction du cluster A²⁻ par la méthode manométrique de Warburg en mesurant l'hydrogène consommé. Ces mesures, pour être significatives, nécessitent des quantités appréciables d'accepteur final d'électrons, nous les avons effectuées seulement pour le cluster A²⁻.

La réaction se fait dans une coupe de Warburg, sous une atmosphère d'hydrogène et à une température de 37°C. Chaque coupe de Warburg contient :

- dans le compartiment principal : 2,9 n.mole d'Hase ; 1,72 n.mole de C3 et du tampon tris HCl 50 m, SHCH₂CH₂OH 50 m H. pH = 7,6

dans le diverticule latéral 0,25 ml d'une solution du cluster A²⁻ (la quantité correspondante à chaque coupe est indiquée au tableau I).

Tableau I : Réduction de C3, Fdl et A²⁻ par l'H₂ Hase

	Hase*	Cyto.C3	Fdl	A ²⁻	Réduction
ESPECES EN REACTION	×	×	.	.	+
	×	.	×	.	-
	×	.	.	×	-
	×	×	×	.	+
	×	×	.	×	+

Le volume total du mélange réactionnel est 3 ml. Après homogénéisation et équilibration sous H_2 , on met le cluster en réaction et on suit la consommation de H_2 au cours du temps.

III. RESULTATS ET DISCUSSION

1 - Comparaison des propriétés électroniques

Le spectre Mossbauer (fig. 1-a) du cluster A^{2-} est constitué d'un doublet quadripolaire unique indiquant la présence d'un seul type de fer absorbant. Ceci montre que, dans le complexe $4Fe\ 4S$, les atomes de fer ont le même environnement électronique où ils sont pratiquement indiscernables. On n'apporte pas ici le spectre de la Fdl, car nos solutions ne sont pas suffisamment concentrées et nécessitent en conséquence un enrichissement préalable.

Allure du spectre et valeurs des paramètres Mossbauer : déplacement isomérique $\delta = 0,48$ nm/s, séparation quadripolaire $\Delta E = 1,15$ nm/s du cluster A^{2-} sont en bon accord avec ceux d'autres protéines du même type dont les spectres sont formés d'un seul doublet quadripolaire avec un déplacement isomérique $1,32$ nm/s $\delta < 0,46$ nm/s et une séparation quadripolaire $1,0$ nm/s ΔE $1,3$ nm/s.

Cette similitude spectrale révèle une relation électronique étroite entre les sites actifs des protéines et le cluster synthétique à l'état d'oxydation (2-). Nous montrons par résonance paramagnétique électronique que cette similitude s'étend également à l'état réduit (3-).

Le spectre RPE (fig. 1-b) du cluster A^{2-} réduit correspond à un tenseur g axial de $g_{moy} = 1,96$ ($g = 1,192$ et $g = 2,04$). A l'état réduit la Fdl donne un spectre rhombique fig. (1-c) de $g_{moy} = 1,97$ ($g_x = 1,92$; $g_y = 1,94$; $g_z = 2,07$).

Les valeurs voisines (1,96 et 1,97) des g moyens indiquent de nouveau que les agrégats tetramériques ont probablement dans les deux espèces des structures semblables. Ceci est confirmé aussi par la spectroscopie optique.

Spéctres optiques (fig. 2) du cluster A^{2-} et de la Fdl de *D. gigas* : à l'état oxydé sont caractérisés par deux bandes d'absorption principales au voisinage de 300 et 400 nm. Le traitement des produits par une quantité limitée de dithionite fait disparaître, dans les deux cas et presque totalement, la bande basse fréquence. Une oxydation douce par une quantité limitée d'oxygène restitue les spectres de départ. Les excitations de transfert de charge qui sont à l'origine de ces bandes d'absorption sont donc les mêmes et sont caractéristiques de ces chromophores Fe-S. Ceci confirme encore la similitude, déjà signalée, des configurations électroniques des agrégats $4Fe-4S$ synthétiques et naturels aussi bien à l'état oxydé (2-) qu'à l'état réduit (3-). En

tant qu'analogues électroniques, le cluster A^{2-} et la Fdl pourraient donc jouer le même rôle de transporteur d'électron en fonctionnant entre ces deux états rédox (2-) et (3-), formant un couple réversible en solution aqueuse.

2 - Activité biologique

L'analyse des spectres électroniques des figures 3 et 4 montre que le donneur d'électrons formé par

le système H_2 Hase réduit :

- le cytochrome C3
- la FdI et le cluster A^{2-} uniquement en présence de cyto.C3

Nous regroupons ces résultats dans le tableau I

Les quantités d'hydrogène consommées par la réduction du cluster A^{2-} dans la coupe de Warburg ont été mesurées. La fig. 5 donne l'évolution de la consommation avec le temps.

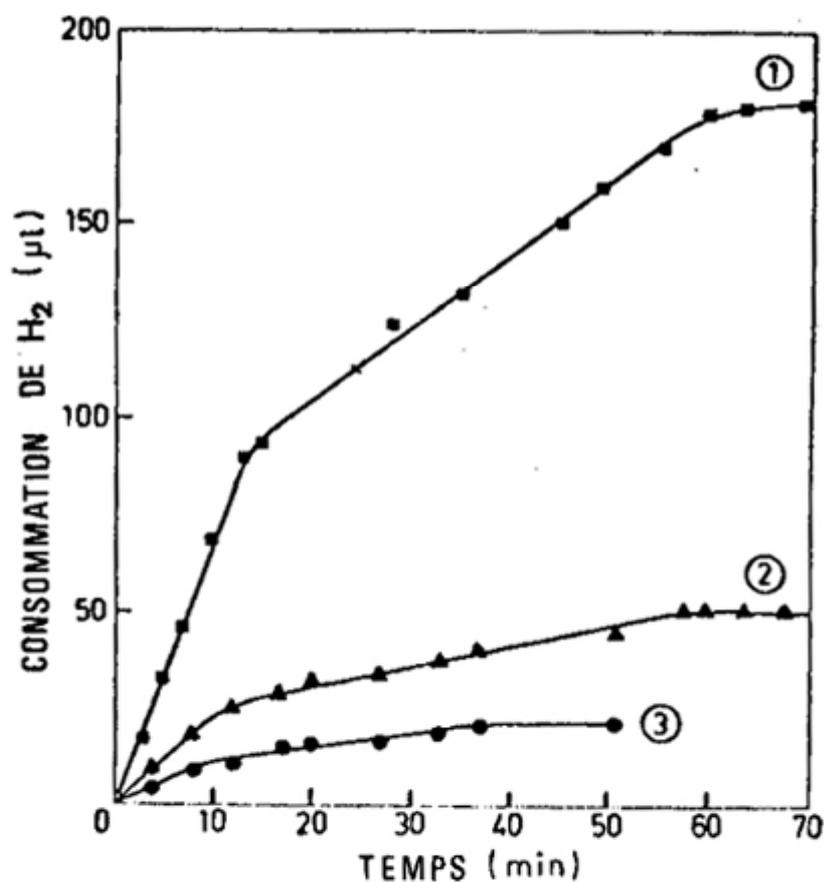


Fig 5 : Activité biologique du cluster A^{2-} :
Evolution de la consommation de H_2
avec le temps.

Le tableau II rassemble la totalité de l' H_2 consommé dans chaque coupe.

Tableau II : Quantité totale de l'hydrogène consommé par une réduction complète du cluster A^{2-} .

Cluster A^{2-} (en μ mole)		Totalité de H_2 consommé	
		en μ l	en μ mole
(1)	8	$96 + 84 = 180$	8
(2)	2,5	$26 + 25 = 51$	2,5
(3)	1,0	$10 + 11 = 21$	0,9

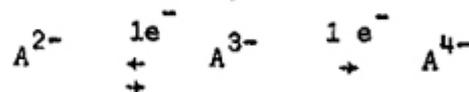
On constate que :

- les quantités de A^{2-} utilisées et de H_2 consommées sont comparables, ceci est compatible avec la consommation d'une mole de H_2 par mole de A^{2-} .

- la réaction évolue avec le temps en changeant de cinétique (deux pentes différentes).

- A chaque phase correspond la moitié de l'hydrogène consommé.

Ces résultats peuvent suggérer une réduction biphasique du cluster A^{2-} .



Dans une première étape le cluster A^{2-} est réduit en A^{3-} . Dans une deuxième étape ce dernier est réduit en A^{4-} .

De l'ensemble de ces expériences ressortent deux évidences :

- Le système H_2 Hase reconnaît de la même façon et dans les mêmes conditions le cluster A^{2-} et la Fdl, comme accepteur d'électrons.

- Le cyto.C3 est indispensable pour cette réaction.

Celles-ci peuvent être interprétées sous deux rubriques différentes :

a) Analogie réactionnelle de Fdl et du cluster A^{2-}

Dans les processus biologiques, les transporteurs d'électrons non hémiques tels que la Fdl, possèdent deux groupes de propriétés :

- Le premier groupe est lié absolument au centre actif et détermine la nature du travail exigé de la protéine.

- Le second est lié à l'environnement du centre actif. Il limite le travail de la protéine à un domaine donné des états d'oxydation bien déterminés.

En effet, on a constaté expérimentalement que le cluster A^{2-} libéré des effets stériques et stabilisant d'une apoprotéine, peut subir la même réduction que Fdl à cause de leur analogie électronique ; mais en présence d'excès de réducteur, le cluster A^{2-} passe à un état super réduit (4). Cet état n'a pas été constaté, dans le même milieu, avec la Fdl car l'apoprotéine de celle-ci protège le centre actif d'une nouvelle réduction et limite par conséquent son fonctionnement aux deux états d'oxydation (2-) et (3-). On peut dire donc, que le cluster A^{2-} peut se substituer à la Fdl pour jouer son rôle, mais un rôle privé de la spécificité imposée par la chaîne d'acides aminés.

Dans une prochaine contribution nous apporterons de nouveaux éléments sur les rôles distincts des deux parties principales de la protéine et sur les possibilités de substitution de la Fdl par le cluster A^{2-} .

- En tant que donneur d'électrons à d'autres enzymes.

- En tant qu'accepteur et donneur d'électrons en même temps dans une chaîne de protéines plus compliquée.

b) Rôle du cytochrome C_3

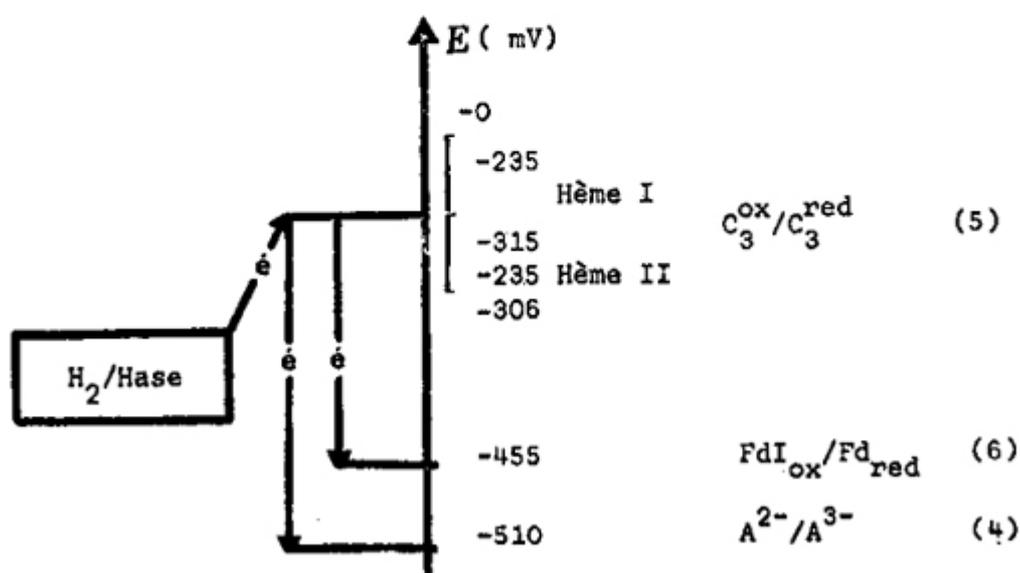
Nos expériences montrent que le cyto.C3 est indispensable pour la réduction enzymatique A^{2-} et de la Fdl.

Le rôle de cette hémoprotéine est encore controversé.

On pense qu'elle pourrait avoir soit un rôle de médiateur, soit un rôle non connu dans une association avec les espèces en réaction :

(i) Le rôle de médiateur au sens électronique (entre H Hase et l'accepteur final) ne semble pas évident, car l'écart important entre les potentiels rédox du cyto.C3 et de la Fdl(2- 3-) ou cluster $A(2- 3-)$ ne permet pas

de comprendre comment le cytochrome C peut donner facilement ses électrons à la FdI ou A^{2-} .



(ii) L'association du cyto.C3 avec l'Hase et/ou avec l'accepteur d'électrons final (FdI, A^{2-}) pourrait conduire à des complexes reconnus l'un par l'autre et compatibles pour des échanges électroniques. Ceci est confirmé par les interactions électrostatiques et rédox entre cyto.C3 et FdI récemment mises en évidence par Mourra et Coll(7).

A présent, nous ne disposons pas de données suffisantes pour discuter ces associations, mais des informations plus précises pourraient être apportées lorsque deux séries de mesures de potentiel sur les espèces associées (Hase C3, $C_3 A^{2-}$, FdI) seront effectuées.

IV. BIBLIOGRAPHIE

1. - T. HERSKOVITZ, B. A. AVERILL, R. H. HOLM, J. A. IBERS, W. D. PHILIPS, J. F. VEIHER : *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 1972, 69, 2437.
2. - B. A. AVERILL, T. HERSKOVITZ, R. H. HOLM and J. A. IBERS : *J. Am. Chem. Soc.* 1973, 95, 3523.
3. - R. C. JOB, T. C. BRUCE : *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 1975, 72, 2478
4. - C. L. HILL, J. RENADU, R. H. HOLM, L. E. MORTENSON : *J. Am. Chem. Soc.* 1977, 99, 2549.
5. - A. V. XAVIER, J. J. MOURRA, J. LE GALLE, D. V. DERVARTANIAN : *Biochim. Biophys. Acta.* 1978
6. - R. CAMMACK, K. K. RAO, D. D. HALL, J. J. G. MOURRA, A. V. XAVIER, M. BRUSCHI, J. LE GALL, A. DEVILLE, J. P. GAYDA : *Biochim. Biophys. Acta.* 1977, 490, 311
7. - J. J. G. MOURRA, A. V. XAVIER, D. J. COOKSON, G. R. MORE, R. J. P. WILLIAMS, M. BRUSCHI, J. LE GALL : *FEBS Lett.* 1977, 81, 275.