

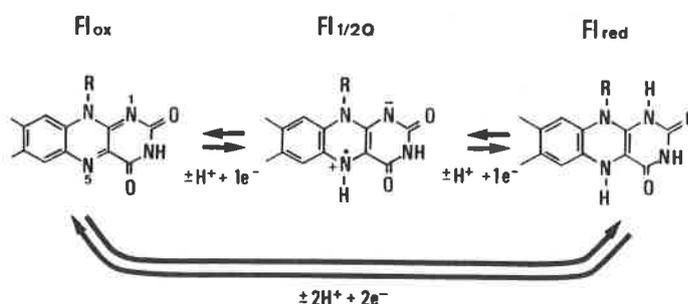
La base catalytique d'une lactate déshydrogénase à flavine : sur l'origine possible du déplacement extrême de son pK

Florence Lederer

Un certain nombre de chaînes latérales d'acides aminés portent des groupements ionisables. Lorsque ces acides aminés sont inclus dans une protéine native, il n'est pas rare de constater que leur pK est modifié par rapport à celui de l'acide aminé libre. L'exemple le plus fréquemment cité en est celui de la lysine du site actif de la décarboxylase acétoacétique, dont le pK - de 5,9 - est abaissé de 4 unités de pH par rapport à celui de l'acide aminé libre [1]. Les modifications de pK peuvent aussi affecter des résidus situés ailleurs qu'au site actif. C'est bien évidemment le repliement de la chaîne peptidique qui, en induisant des microenvironnements différents de celui imposé par le solvant, est responsable des variations observées ; mais même la connaissance de la structure cristallographique d'une protéine ne permet pas toujours de comprendre les facteurs qui entrent en jeu dans les phénomènes observés. Les méthodes les plus courantes pour évaluer le pK de chaînes latérales consistent à étudier, en fonction du pH, les variations de la cinétique enzymatique, de la cinétique de marquages chimiques, les modifications spectrales du chromophore tyrosine ou le déplacement chimique de signaux de l'histidine en RMN (proton, ^{15}N , ^{13}C).

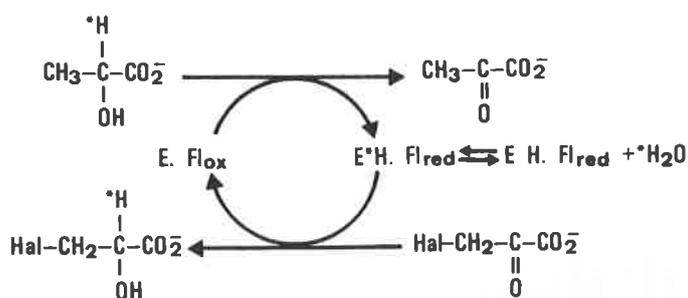
Le travail des dernières années dans mon laboratoire a permis de mettre en évidence le cas spectaculaire de l'histidine 373 du flavocytochrome b_2 (ou L-lactate déshydrogénase) dont le pK apparent se situe autour de 15 dans l'enzyme réduit, soit environ 8 unités de pH plus haut qu'une histidine normale. La méthode utilisée pour déterminer ce pK est fondée sur la mesure de la vitesse d'échange d'un atome de tritium entre l'enzyme et le solvant. La connaissance de la structure tridimensionnelle de l'enzyme nous permet de formuler des hypothèses raisonnables sur l'origine de ce déplacement de pK.

Le flavocytochrome b_2 de levure possède deux cofacteurs : une flavine (FMN) et un hème de type b. La flavine oxyde le lactate en pyruvate dans une réaction impliquant le transfert de deux équivalents réducteurs. Ceux-ci sont cédés un à un lors d'une réaction intramoléculaire à l'hème b_2 qui les transmet à son tour à un accepteur externe monoélectronique (le cytochrome c dans la cellule, le ferricyanure par exemple dans le tube à essais). Les flavines sont capables d'une chimie rédox à la fois biélectronique et monoélectronique :



On pouvait donc a priori envisager plusieurs mécanismes, homolytiques et hétérolytiques, pour l'oxydation d' α -hydroxyacides par le flavocytochrome b_2 et d'autres enzymes apparentées. De nombreuses études, chez nous et dans d'autres laboratoires, ont permis de définir la séquence d'étapes suivante : l'enzyme arrache le proton en α du carboxylate, puis le carbanion ainsi formé cède ses électrons à la flavine [2,3]. La nature de cette deuxième étape reste encore sujette à controverse, par contre un consensus existe sur la formation intermédiaire d'un carbanion au cours du cycle catalytique.

Nous avons pu apporter des arguments décisifs qui excluent un transfert d'hydrure ou une rupture homolytique de la liaison $\text{C}_\alpha\text{-H}$ grâce à l'étude d'une réaction non physiologique catalysée par le flavocytochrome b_2 . En absence d'accepteur monoélectronique, l'enzyme mélangé avec un hydroxyacide et un cétoacide effectue une réaction de transhydrogénation entre les deux substrats [4]. Si, de plus, on met en présence du $[2\text{-}^3\text{H}]\text{lactate}$ et, par exemple, du fluoropyruvate, on observe la formation de $[2\text{-}^3\text{H}]\text{fluorolactate}$ ainsi que d'eau tritiée. Si l'enzyme peut ainsi catalyser une réaction de transfert intermoléculaire d'hydrogène, c'est que le proton α du substrat, une fois arraché par l'enzyme, ne s'échange que lentement avec le solvant. Divers éléments nous ont conduits à postuler que l'échange n'a lieu que lorsque le site actif de l'enzyme réduit est libre, c'est-à-dire après dissociation du pyruvate et avant fixation du fluoropyruvate. Une étude du taux de transfert de tritium au fluoropyruvate en fonc-



tion de la concentration initiale en fluoropyruvate nous a permis de construire un graphique reliant l'inverse du taux de transfert à l'inverse de la concentration en fluoropyruvate. Une équation cinétique dérivée du schéma réactionnel montre que la pente de cette droite est proportionnelle à la vitesse d'échange du tritium avec le solvant. Connaissant l'effet isotopique sur la réaction, nous avons pu calculer une vitesse d'échange du proton avec le solvant de l'ordre de $100 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Sachant que les expériences sont effectuées en tampon phosphate 100 mM , $\text{pH } 7$, on peut calculer grâce à l'équation de Eigen [5] un pK de 15 pour l'ionisation de la liaison Enzyme-X-H_a [3].

Les pK normaux des chaînes latérales envisageables comme base catalytique étant situés entre 3 et 10, et le pK probable du N 5 du noyau isoalloxazine (sommet par où entrent les équivalents réducteurs) étant compris entre 20 et 25 (6,7), un pK de 15 pose un problème d'attribution. Il aurait pu résulter d'une élévation de pK de la base catalytique dans l'enzyme réduit par rapport à l'enzyme oxydé. Ou alors il aurait pu appartenir à la flavine réduite, dont le pK aurait été abaissé par rapport à celui de la flavine libre. Ceci supposerait que la base catalytique serait capable de transférer le proton du substrat au sommet N 5 de la flavine, hypothèse qui ne pouvait être écartée a priori.

La structure tridimensionnelle du flavocytochrome b_2 [8,9] nous a apporté l'image du site actif, la connaissance de la nature des chaînes latérales qui participent à la catalyse ainsi que le mode de fixation d'un ligand, le pyruvate. A partir de ces données, un rôle a été attribué à divers acides aminés dans la fixation du substrat et dans la catalyse d'une réaction par carbanion, rôle qui est étayé par des expériences de modélisation sur un appareil de graphisme moléculaire [10,11].

La structure indique ainsi clairement que :

1. la base chargée d'arracher le proton α du substrat est l'imidazole de l'histidine 373 ;
2. il n'y a pas de liaison hydrogène possible entre l'histidine 373 et le sommet N 5 flavinique, donc aucun transfert de proton ne peut se produire entre les deux groupes.

On est donc obligé de conclure que le pK de 15 appartient à l'histidine 373 de l'enzyme réduite.

Un examen minutieux de la structure cristallographique suggère deux hypothèses pour expliquer l'élévation du pK de l'histidine dans l'enzyme réduite [11]. Tout d'abord la configuration particulière d'un réseau de molécules d'eau fixes présentes dans le cristal au site actif réduit suggère que, même pour l'enzyme en solution, certaines de ces molécules pourraient rester attachées par des liaisons hydrogène à des résidus critiques du site actif, en particulier l'histidine 373. Ainsi pourrait se produire une dissipation partielle du potentiel électrostatique de l'ion imidazolium, et surtout l'approche des ions du solvant responsables de l'échange de proton ne pourrait se faire normalement ; en d'autres termes, la composition du solvant au voisinage immédiat de l'histidine 373 ne serait pas la même que celle de la solution globale. La deuxième hypothèse, qui n'exclut pas la première, est celle d'une interaction électrostatique entre le noyau de l'imidazolium et le noyau isoalloxazine de la flavine réduite, dont on sait que le sommet N 1 est anionique dans le flavocytochrome b_2 . En effet, les plans des deux systèmes aromatiques sont presque parallèles et quasiment en contact de Van der Waals, quoique légèrement décalés. La distance entre les deux azotes de l'ion imidazolium et le N 1 anionique de la flavine est de 3.5 \AA . Certains éléments de la structure tridimensionnelle, combinés aux caractéristiques cinétiques de la réaction, suggèrent même que le sommet N 5 de la flavine réduite pourrait rester anionique en cours de catalyse, ce qui fournirait un autre exemple de pK fortement déplacé au site actif du flavocytochrome b_2 [11].

Références

- [1] Schmidt D.E., Westheimer F.H., *Biochemistry*, **1971**, *10*, 1249-1253.
- [2] Ghisla S. in *Flavins and Flavoproteins* (Massey V., Williams C.H., eds), Elsevier, Amsterdam, **1982**, p. 133-142.
- [3] Urban P., Lederer F., *J. Biol. Chem.*, **1985**, *260*, 11115-11122.
- [4] Urban P., Alliel P.M., Lederer F., *Eur. J. Biochem.*, **1983**, *134*, 275-281.
- [5] Eigen M., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1964**, *3*, 1-19.
- [6] Venkataram U.V., Bruice T.C., *J. Am. Chem. Soc.*, **1984**, *106*, 5703-5709.
- [7] Massey V., Ghisla S., in *Chemistry and Biochemistry of Flavoenzymes* (Müller F., ed), Vol. 2, CRC Press, in press, **1991**.
- [8] Mathews F.S., Xia Z.x., in *Flavins and Flavoproteins* (Edmondson D. and McCormick D.B., eds) Walter de Gruyter, Berlin, **1987**, p. 123-132.
- [9] Xia Z.x., Mathews F.S., *J. Mol. Biol.*, **1990**, *212*, 837-863.
- [10] Lederer F., Mathews F.S., in *Flavins and Flavoproteins* (Edmondson D. and McCormick D.B., eds) Walter de Gruyter, Berlin, **1987**, p. 133-142.
- [11] Lederer F., in *Flavins and Flavoproteins* (Curti B., Ronchi S., Zanetti G., eds), Walter de Gruyter, Berlin, in press, **1991**.