

Les métaux et la vie :

INTERACTIONS METAL-PROTEINE

par Michèle DUBUSC,

Chimie des Matériaux (équipe de Corrosion),

et Pierre BIANCO,

Laboratoire de Chimie et Electrochimie
des Complexes,

Laboratoire de Chimie Bactérienne
Université de Provence, 13331 Marseille Cedex 3.

INTRODUCTION.

Bien que les éléments minéraux ne constituent qu'une fraction très faible des tissus (à peine 3 % en poids), ils sont cependant essentiels au maintien de la vie. Par exemple, une ossification normale exige des apports équilibrés de CALCIUM et de PHOSPHORE, l'activité musculaire nécessite du POTASSIUM et du CALCIUM.

Certains métaux, comme le SODIUM et le POTASSIUM sont des facteurs importants dans le métabolisme de l'eau. D'autres éléments font parties intégrantes de composés physiologiques importants : l'IODE (thyroxine), le FER (hémoglobine, cytochromes), le ZINC (insuline), le COBALT (vitamine B₁₂), le SOUFRE (thiamine, coenzyme A, etc.).

A côté des sept éléments principaux (CALCIUM, MAGNÉSIUM, SODIUM, POTASSIUM, PHOSPHORE, SOUFRE et CHLORE), d'autres éléments sont utilisés par l'organisme à l'état de traces : le FER, le CUIVRE, le MANGANÈSE, le COBALT, le ZINC, le MOLYBDÈNE et l'IODE. Il existe encore d'autres éléments dans les tissus dont la fonction n'est pas connue avec précision : ALUMINIUM, CADMIUM, CHROME, BORE, SÉLÉNIUM et FLUOR.

Certains organismes vivants, autres que le corps humain, contiennent aussi des éléments tels que : SILICIUM, STRONTIUM, VANADIUM...

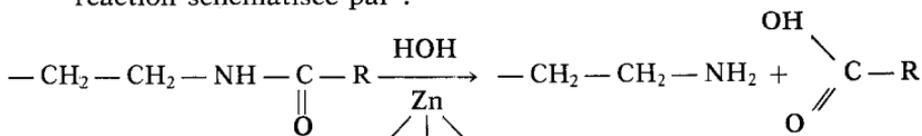
CLASSIFICATION.

On peut classer les cations métalliques, compte tenu de leur rôle *in vivo* en cinq grandes catégories :

- 1) Les ions régulateurs de potentiels comme Na(I) et K(I). Il s'agit de cations en principe peu ou pas complexés, qui

s'échangent très rapidement en traversant les membranes. Ils jouent un rôle primordial dans la régulation de la pression osmotique. On connaît toutefois certains complexes très stables du cation K^+ (par exemple avec la valinomycine).

- 2) Les ions qui stabilisent les structures, comme $Mg(II)$ et $Ca(II)$. Ils donnent des complexes de stabilité moyenne. $Ca(II)$ assure par exemple le maintien de sous-unités ensemble, $Mg(II)$ est complexé par les acides nucléiques.
- 3) Les catalyseurs acides, comme $Zn(II)$ qui donne des complexes très stables. Ce cation intervient notamment dans la coupure et l'hydrolyse des chaînes peptidiques, le site actif de la réaction étant $Zn(II)$ complexé (carboxypeptidase-A), selon la réaction schématisée par :

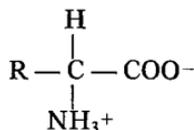


- 4) Les métaux qui interviennent dans les réactions d'oxydo-réduction. Il s'agit alors de complexes très stables (cytochromes par exemple) qui servent de catalyseurs d'oxydo-réduction (oxydoréductases).
- 5) Les éléments, le fer en particulier, qui servent au transport d'autres éléments (oxygène par exemple). C'est le cas de l'hémoglobine, de l'hémocyanine (transporteur d'oxygène contenant du cuivre et rencontré dans des organismes marins) ou de l'hémovanadine qui contient du vanadium.

LES LIGANDS IN VIVO.

Acides aminés.

Les organismes vivants contiennent des millions de protéines aux multiples fonctions mais ces protéines ne sont formées que par 26 molécules élémentaires, les acides aminés, de formule générale :



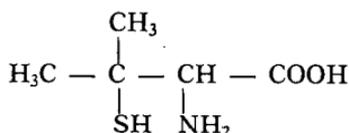
cette formule (zwitterion) correspondant à leur état de protonation aux pH physiologiques. Le groupement amine et le groupement carboxylate sont en mesure de complexer un cation métallique, mais un certain nombre d'acides aminés sont en outre porteurs de fonctions latérales susceptibles de servir elles aussi de ligand : $-\text{OH}$, COO^- , $-\text{SH}$.

Un certain nombre d'acides aminés sont considérés comme « essentiels », les autres pouvant être synthétisés par l'organisme si nécessaire ; les acides aminés sont décomposés dans le foie pour donner de l'urée qui est ensuite éliminée.

Dérivés des acides aminés.

Ce sont des molécules relativement simples comprenant des hormones, des antibiotiques, etc.

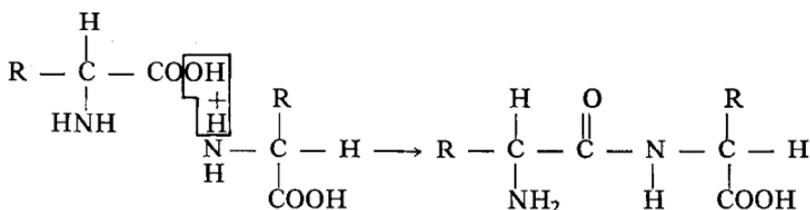
Exemple : la pénicillamine, dérivée de la cystéine :



Ces molécules possèdent des propriétés complexantes.

Peptides.

Ils sont formés par élimination d'une molécule d'eau entre deux ou plusieurs molécules d'acides aminés, ce qui conduit à la formation d'une chaîne polypeptidique polymère.



Des interactions peuvent se produire entre les chaînes polypeptidiques : liaisons électrostatiques, liaisons hydrogène, liaisons hydrophobes, ponts disulfure, liaisons ester, liaisons par complexation d'un cation métallique, ce cation étant alors complexé par plusieurs chaînes différentes.

Protéines.

On distingue :

- les protéines qui « travaillent » (transport, digestion, etc.) et dont le « travail » est contrôlé par les acides nucléiques, ou leurs dérivés,
- les protéines agissant comme catalyseurs (enzymes) qui font intervenir d'autres systèmes protéiques, par exemple les chaînes de transporteurs d'électrons (chaîne respiratoire, etc.).

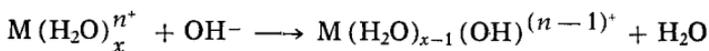
Leurs masses moléculaires vont de 5 000 à plusieurs millions. Leurs formules peuvent être assez complexes ; les protéines sont

formées par des enchaînements d'acides aminés, elles contiennent souvent un ou plusieurs atome(s) métallique(s). De par leur formule, leur pouvoir complexant vis-à-vis des cations métalliques peut être important et les sites de fixation nombreux.

AUTRES LIGANDS.

Ils ne seront que mentionnés. Ce sont les acides nucléiques et les nucléotides, les sucres, les acides carboxyliques, les lipides et divers anions (carbonates, phosphates, sulfates, chlorures, etc.).

Il ne faudrait pas oublier non plus cette molécule indispensable à la vie et présente dans tout organisme vivant qu'est l'EAU. La simple réaction d'hydrolyse constitue en elle-même une réaction de complexation.



que peut subir n'importe quel cation métallique « libéré » dans l'organisme (formation d'hydrocomplexes, en liaison avec la valeur des produits de solubilité).

INTERACTIONS METAL-LIGAND.

Aspect théorique.

Lorsqu'on place face à face la liste des cations métalliques et celle des ligands présents dans les organismes vivants, on peut se poser plusieurs questions :

- 1) Pourquoi tel métal préfère-t-il tel type de ligand ? Quel groupe appartenant à un enzyme donné sera-t-il plus probablement attaché à un ion métallique donné ?
- 2) Si, pour des raisons médicales, on désire séparer un ligand d'un ion métallique complexé ou extraire un excès d'un certain type d'ion métallique libre dans le sang, comment doit-on choisir le ligand complexant pour qu'une compétition suffisamment efficace soit assurée ?

Une théorie a été établie en se basant sur le fait que, si une liaison existe entre deux atomes, c'est que l'un d'eux joue le rôle d'un acide et l'autre celui d'une base, c'est-à-dire que A joue le rôle d'accepteur et B celui de donneur d'électrons, soit :



Si A est un ion métallique, B constitue le ligand.

La constante de formation associée à la réaction précédente peut s'écrire, d'après cette théorie :

$$\log K = S_A S_B + \sigma_A \sigma_B$$

S_A et S_B s'appellent les « forces intrinsèques » et σ_A et σ_B sont les paramètres de « mollesse » (théorie des acides et des bases « durs » et « mous »). Le terme de « mollesse » dépend de la mobilité électronique et de la polarisabilité d'une espèce : si les électrons sont mobiles, l'espèce est considérée comme « molle ». Un acide « dur » est de petite taille, avec une densité de charge positive ; une base « molle » sera par contre fortement polarisable, facilement oxydée. Il en résulte une classification des acides et des bases (voir R.-G. PEARSON, J. Chem. Educ. (1963), 45, 581, et 643).

Application : Les cations métalliques tels que Na^+ , Ca^{2+} , Al^{3+} présentent une grande affinité pour une base dure telle que H_2O , d'où leur forte hydratation en solution. Les atomes d'oxygène des groupements —OH, carbonate, phosphate... et les atomes d'azote des amines se combinent aisément avec les acides durs : on explique ainsi la formation des phosphates insolubles (calculs) dans les organismes vivants.

Les acides mous tels que les cations Cd^{2+} , Pb^{2+} se lient solidement aux bases molles comme —SH ou —SR, ce qui rend compte de l'inactivation irréversible par ces métaux des enzymes à groupement thiol.

La plupart des ions métalliques rencontrés dans le milieu vivant à l'état de trace sont des acides mous. Cette propriété leur permet de contracter des liaisons moins stables avec les ligands biologiques actifs qui sont des bases dures.

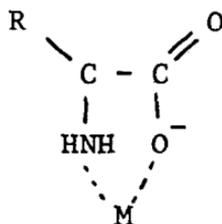
Les éléments considérés comme toxiques sont, soit des acides durs, soit des acides mous qui contractent des liaisons stables avec les ligands fictifs.

Sans entrer dans ces détails théoriques, nous considérerons quelques aspects caractéristiques des liaisons métaux/acides aminés, peptides et protéines.

COMPLEXES DES ACIDES AMINES.

$\text{H}_2\text{N} - \text{CHR} - \text{COO}^-$ comporte trois groupements donneurs : N, O^- et $=\text{O}$, mais ce sont principalement N et O^- qui complexent un ion métallique.

Exemple :



Co, Ni, Cu et Zn(II) préfèrent former des chélates annulaires alors que Mg et Ca(II) donnent plutôt des sels avec le groupement carboxylate.

PEPTIDES SIMPLES.

Les peptides simples se combinent moins fortement aux ions métalliques que les acides aminés qui les constituent.

Exemple :

Cu(II) + glycyglycine avec $\log \beta = 6,0$ (β représente la constante de formation)
 Cu(II) + glycine avec $\log \beta = 8,6$
 ceci étant dû au changement de basicité des atomes d'azote du groupement α -aminé.

ACIDES AMINES A GROUPEMENTS LATÉRAUX.

Ils donnent souvent des complexes très stables polydentates.

Exemple : l'histidine qui peut complexer un ion métallique de quatre manières différentes.

Protéines.

Sept facteurs principaux doivent être pris en considération :

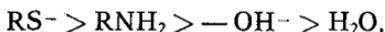
- 1) Les chaînes protéiques sont plus longues que pour les simples peptides, donc les groupements latéraux éventuellement complexants sont plus nombreux.
- 2) Il y a plus de sites de fixation que nécessaire pour complexer un ion métallique, de telle sorte que celui-ci peut choisir les points de fixation qu'il préfère. Une approche statistique doit donc être appliquée aux équilibres dans ce cas.
- 3) La structure tertiaire de la protéine impose certaines contraintes à la molécule, dont les complexes se formeront parfois moins facilement que dans le cas de simples peptides. Certains sites resteront même inaccessibles.
- 4) Une molécule de protéine possède des charges positives et négatives qui donnent naissance à un moment dipolaire. Ces charges peuvent soit aider, soit défavoriser l'approche d'un cation métallique.
- 5) Certains groupements latéraux sont organisés de telle sorte que la liaison avec l'ion métallique est stériquement facile.
- 6) Tout groupement qui peut donner des électrons à un ion métallique peut aussi en donner à un proton, d'où l'importance de la compétition entre ions métalliques et protons, c'est-à-dire du rôle du pH.

7) La formation d'une liaison implique la désolvatation du site de fixation et de l'ion métallique.

Des métaux comme le MAGNÉSIUM et le CALCIUM possèdent des orbitales vides, et des métaux comme le MANGANÈSE et le FER qui ont des orbitales *d* à moitié remplies forment des composés de coordination avec les protéines. La stabilité des liaisons est commandée par les attractions électrostatiques ; elle augmente lorsque la charge de l'ion augmente et lorsque la taille de l'ion diminue. Des métaux comme le COBALT, le NICKEL, le CUIVRE, le ZINC donnent des complexes, et la stabilité des liaisons ne dépend pas de la charge ni de la taille des ions métalliques.

Exemples :

— ordre d'affinités du cobalt, du nickel, du cuivre, du zinc pour les ligands suivants :



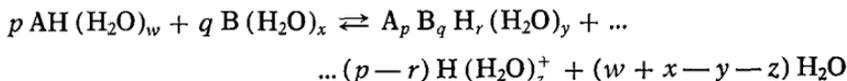
— le mercure se lie à $-SH$, $-NH_2$. Chaque molécule d'albumine complexe 5 ions Hg^{2+} à pH 5 et 45 ions Hg^{2+} à pH 7,5,

— le plomb se rattache aux groupements $-COO^-$ et entraîne la précipitation des protéines par suite de l'insolubilité des complexes formés.

LES MOYENS D'ETUDE.

Détermination et utilisation des constantes de formation.

D'une façon générale, les équations de complexation et d'hydrolyse s'écrivent :



La constante de formation β_{pqr} s'applique à la formation du complexe à partir des espèces individuelles, soit :



La pH-métrie constitue la méthode de base permettant la détermination de la nature des complexes formés ainsi que celle de leur constante de formation respective (voir pour cette question l'utilisation des courbes de titrage et l'exploitation des résultats à l'aide de la fonction de formation) ; on en déduit en outre la distribution des différentes espèces en fonction du pH.

Apports de la calorimétrie.

La calorimétrie peut être utilisée dans les réactions instantanées pour mesurer directement ΔH et les forces de liaisons et indirectement ΔS si ΔG est connu. Elle peut aussi être employée pour suivre la vitesse d'une réaction biologique lente.

METHODES D'ETUDE DES METAUX DANS LES SYSTEMES D'INTERET BIOLOGIQUE.

1) Spectrophotométrie UV et visible.

Les changements électroniques et conformationnels qui résultent de la complexation d'un cation métallique se traduisent par des modifications dans la hauteur et l'emplacement de pics.

2) Dispersion optique et dichroïsme circulaire.

Ces techniques sont appliquées à l'étude des changements conformationnels.

3) Spectrométrie infrarouge.

Les absorptions IR sont liées aux déformations des liaisons et aux vibrations atomiques et moléculaires. Les liaisons où des ions métalliques sont impliquées se traduisent par des bandes d'absorption qui apparaissent dans l'infrarouge lointain; la formation d'une liaison métal-ligand modifie les liaisons organiques de la molécule du ligand, de telles modifications pouvant être mises en évidence dans le proche infrarouge.

4) Méthodes spectroscopiques : RPE, RMN.

Les ions métalliques qui ont les propriétés physiques les plus adaptées à ce type d'étude appartiennent aux séries des métaux de transition. Ces métaux possèdent des électrons non appariés; on peut repérer les changements de leurs spins électroniques par résonance paramagnétique électronique (RPE). De plus, aux mouvements des électrons correspondent des variations des états énergétiques des noyaux des éléments voisins que l'on peut étudier par résonance magnétique nucléaire (RMN). Un certain nombre d'ions métalliques importants en milieu vivant n'appartiennent malheureusement pas aux séries de transition et ne peuvent être étudiés par les méthodes spectroscopiques précédentes. On peut néanmoins contourner cette difficulté en leur substituant des métaux de transition de propriétés voisines.

Exemple :

K (I)	remplacé par	Rb (I)	ou	Cs (I)
Mg (II)		Mn (II)		
Zn (II)		Co (II)		

5) Etude cristallographique par diffraction des rayons X.

Elle consiste en l'étude des métallo-protéines solides cristallisées, ce qui permet de préciser la structure de la molécule : position des atomes, forme des boucles de la chaîne polypeptidique, existence de crevasses, etc.

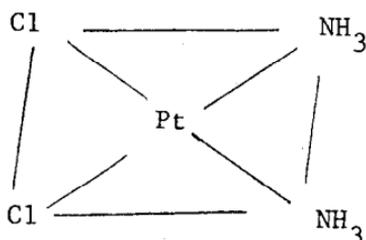
6) Absorption atomique.

C'est la méthode la mieux adaptée et la plus sensible pour étudier les éléments métalliques à l'état de traces dans les liquides biologiques. Il est possible d'atteindre dans les organismes quelques $\mu\text{g/l}$ (ppm et même le ppb). Après attaque de l'échantillon et dissociation dans la flamme (ou au four) le métal absorbe la lumière monochromatique à la longueur d'onde caractéristique du métal. Cette absorption est proportionnelle au nombre d'atomes présents et permet un dosage précis.

ASPECTS APPLIQUES

I. UTILISATION DE DERIVES DU PLATINE DANS LE TRAITEMENT D'AFFECTIONS CANCEREUSES.

A titre d'exemple, on peut examiner quelques travaux relatifs au problème du traitement du cancer. Le point de départ de ces recherches résulte d'une observation faite en 1969 par ROSENBERG et Coll. [ROSENBERG B., VAN CAMP L., TROSKO J.-E., MANSOUR V.-H., Nature 222, 385 (1969)] à propos de dérivés du platine qui ont la propriété d'inhiber la croissance de diverses tumeurs malignes, par exemple le complexe cis suivant :



(alors que le dérivé trans correspondant est totalement inactif sur le plan curatif).

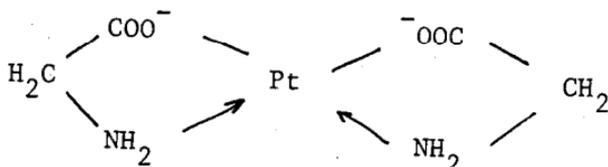
Pour essayer de comprendre le mode d'action de ces dérivés, on peut considérer de plus près les interactions des complexes « actifs » avec les partenaires qu'ils peuvent rencontrer dans l'organisme. On vient de voir que ceux-ci sont nombreux (acides nucléiques, acides aminés, peptides, etc.) et on peut se limiter ici seulement au cas des acides aminés et des protéines.

1) Acides aminés.

Les positions occupées par les ions chlorure dans les complexes $(PtCl_4)^{2-}$, *cis* $(Pt(NH_3)_2Cl_2)$ etc., peuvent être liées après substitution à des groupements, $-NH_2$, $-COO^-$, $-SCH_3$ présents dans les acides aminés.

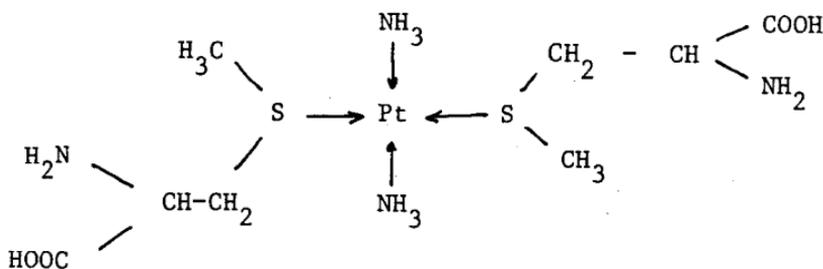
Exemple : Réaction avec la glycine.

On obtient le complexe :



qui peut même conduire après traitement par l'hydroxyde de potassium en présence d'un excès de glycine à $Pt(Gly)_4$.

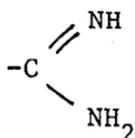
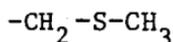
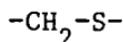
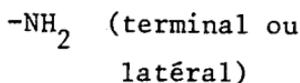
L'alanine, la valine et la leucine se comportent de la même manière. L'histidine interagit lentement, même en attendant plusieurs jours. Par contre, la méthionine réagit rapidement en donnant :



qui est stable, par suite de la solidité des liaisons Pt-S.

2) Protéines.

A pH 7, on sait que les groupements protéiques susceptibles de réagir avec les ions métalliques sont les suivants :



Les études cristallographiques des protéines montrent que ces groupements se lient avec les cations Pt(II), Hg(II), Au(III). La présence d'ions chlorure peut modifier le résultat. (On notera que les conclusions obtenues à l'état solide ne peuvent qu'être indicatives, car le milieu vivant est complexe, l'environnement protéique et les sels minéraux dissous dans les fluides biologiques jouant eux aussi un rôle fondamental.)

Il semble que les complexes de Pt(II) soient aptes à attaquer de préférence les groupements présents à la surface des protéines et qu'ils ne s'introduisent pas facilement dans les régions internes plus hydrophobes.

Si on prend l'exemple du lysozyme, une protéine assez répandue (sérum, tissus animaux, blanc d'œuf, etc.), on a pu montrer que son interaction avec le complexe $(PtCl_4)^{2-}$ était de nature électrostatique, et que la liaison n'était pas très forte. Par contre, l'interaction avec une autre protéine, la ribonucléase, (bœuf, mouton, porc...) qui fait intervenir l'atome de soufre d'une méthionine, est beaucoup plus forte et conduit à un complexe stable.

En raison des nombreuses possibilités d'interaction, la réponse quant au mode d'action des complexes du platine dans le traitement du cancer est loin d'être entièrement trouvée.

II. METAUX ET TOXICITE.

La chélation dans les systèmes biologiques a de larges implications, elle intervient dans un grand nombre de fonctions essentielles, la plus importante étant la régulation de la concentration en métal.

On a vu que, même à l'état de traces (par exemple 0,01 % de la masse de l'organisme), les métaux restent indispensables au déroulement normal des processus métaboliques, croissance et développement : le *cuivre* entre dans la composition de divers pigments respiratoires, le *manganèse* dans le fonctionnement de plusieurs systèmes enzymatiques, le *chrome* se trouve dans les β globulines jouant un rôle essentiel dans le métabolisme du glucose, etc.

Ainsi les éléments métalliques introduits dans un milieu biologique peuvent soit maintenir les équilibres thermodynamiques liés aux processus qu'assurent la conservation de la vie, soit provoquer des changements parfois irréversibles.

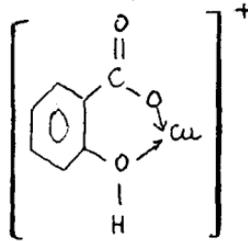
Les effets dans l'organisme de ces divers cations se traduisent par exemple de la façon suivante :

— sur le *plan curatif*, le permanganate de potassium est utilisé comme antiseptique, les sels de magnésium et d'aluminium

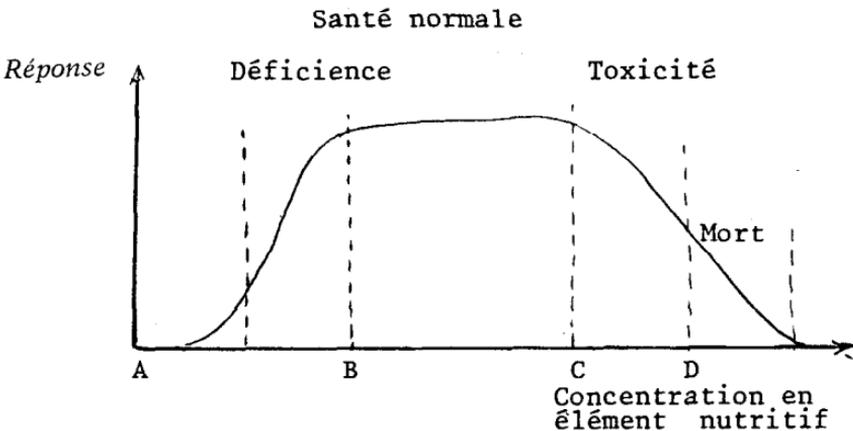
sont employés comme antiacides, ceux du cuivre comme stimulants ou astringents, ceux du mercure comme désinfectants, certains dérivés du platine pour le traitement du cancer (voir précédemment), etc.,

— sur le *plan toxique*, nombreux sont les cas conduisant à une déformation ou à la mort.

Cette toxicité du métal dépend de plusieurs facteurs : concentration dans l'organisme, caractère électrochimique, degré d'oxydation [Cr (VI) par exemple est plus toxique que Cr (III)], stabilité et solubilité des composés (phénomène d'accumulation pour le mercure ou le plomb, avec élimination possible par complexation avec l'EDTA), transport au niveau des membranes cellulaires (par exemple pouvoir analgésique de l'aspirine dû à la récupération des ions Cu^{2+} du sang par formation d'un chélate, et retour aux sites cellulaires qui les avaient perdus), réactions avec les autres métaux et organes fonctionnels.



En milieu vivant, la courbe dose-réponse (fig. 1) est un facteur très important. Certains métaux considérés comme toxiques sont en réalité des composants essentiels pour la croissance et la santé, à condition de ne pas dépasser une certaine concentra-



tion. Pour des teneurs $< B$, il y a une déficience qui peut être comblée éventuellement, ce qui permet d'atteindre un palier pour lequel l'activité biologique est maximale et où l'excès de métal est éliminé (BC). Au-delà de C, le métal devient toxique, et au point D on atteint la dose létale ou mortelle (DL).

Dans le cas des métaux « toxiques » (Pb, Hg, Cd) l'effet cumulatif peut être observé : une trace peut devenir toxique car les niveaux de concentration n'étant pas régulés par l'organisme, il y a dépassement de la dose exigée pour une réponse nutritionnelle correcte. On constate que plus le palier est court, plus le métal est toxique.

Il existe donc un équilibre fragile entre les quantités de métal nécessaires aux processus catalytiques et enzymatiques, et les doses toxiques pour l'organisme.

ANNEXE II

FICHES CARACTERISTIQUES DES PRINCIPAUX METAUX

Métal	Caractéristiques	DL ₅₀ (*)
Na et K	essentiels ; transport du signal nerveux	
Cu	essentiel ; s'accumule dans la bile, le foie, provoque dermatoses, anémie	0,05 g/kg
Mg	essentiel ; provoque en excès des diarrhées	30 mg/100 ml de sang
Ba	fortement toxique ; attaque le système nerveux, hémorragies	70 mg/kg
Zn	essentiel ; provoque des diarrhées, des paralysies	2,0 g/kg
Cd	très toxique ; s'accumule dans le foie et les poumons ; agit sur les systèmes pulmonaire et cardiovasculaire.	0,027 g/kg
Hg	très toxique ; s'accumule dans les reins, le cerveau, le foie ; provoque des inflammations	0,027 g/kg
Pb	toxique ; s'accumule dans le foie, les reins, les os ; agit sur les reins en entraînant une perte d'acides aminés	0,15 g/kg
Cr	essentiel ; s'accumule dans les bronches, les poumons ; provoque des congestions ; risque de cancer respiratoire	0,18 g/kg
Mn	affecte le système nerveux	0,21 g/kg
Fe	essentiel	0,9 g/kg
Co	essentiel	0,5 g/kg
Ni	essentiel.	

(*) DL₅₀ = dose minimale toxique, pour une mortalité de 50 % d'individus.

BIBLIOGRAPHIE

- H.-A. HARPER, *Précis de Biochimie* (1973), Armand Colin, Paris.
- D.-R. WILLIAMS, *The Metals of Life* (1971), Van Nostrand Reinhold Company, London.
- R.-J.-P. WILLIAMS, *La Recherche* (1973), 35, 529.
- E.-W. AINSCOUGH et A.-M. BRODIE, *J. Chem. Educ.* (1976), 53, 156.
- F. FRIEDBERG, *Quart. Rev. Biophys.* (1974), 7, 1.
- B. ROSENBERG, L. VAN CAMP, J.-E. TROSKO et V.-H. MANSOUR, *Nature* (1969), 222, 385.
- D.-E. CARTER et O. FERNANDO, *J. Chem. Educ.* (1979), 56, 490.
- B. VENUGOPAL, T.-D. LUCKET, *Metal Toxicity in Mammals*. Tome 1. Plenum Press.
-