

AIX-MARSEILLE UNIVERSITÉ
École Doctorale des Sciences Chimiques

THÈSE
présentée par
Julien JACQUES
pour obtenir le grade de

DOCTEUR D'AIX-MARSEILLE UNIVERSITÉ

**RÉACTIVITÉ DE LA NITRATE RÉDUCTASE
PÉRIPLASMIQUE ÉTUDIÉE PAR
SPECTROSCOPIE RPE
ET ÉLECTROCHIMIE DIRECTE**

Soutenance prévue le **11 avril 2014**
devant le jury composé de

M^{me} Bénédicte BURLAT (Co-directrice de thèse)
M. Vincent FOURMOND
M. Serge GAMBARELLI (Rapporteur)
M. Bruno GUIGLIARELLI (Directeur de thèse)
M. Benoît LIMOGES (Rapporteur)
M. Marius RÉGLIER
M. Jérôme SANTOLINI

Remerciements

En tout premier lieu je tiens à remercier messieurs Serge GAMBARELLI et Benoît LIMOGES pour avoir accepté la lourde tâche d'évaluation et de critique de ce travail de thèse, comme rapporteurs. Je remercie également messieurs Jérôme SANTOLINI, Marius RÉGLIER et Vincent FOURMOND, qui me font l'honneur d'apprécier ce travail.

J'adresse toute ma reconnaissance à M. Bruno GUIGLIARELLI, mon directeur de thèse, pour la confiance qu'il m'a accordée pour mener à bien ce travail, pour m'avoir accueilli dès septembre 2010 au laboratoire de Bioénergétique et Ingénierie des Protéines qu'il dirigeait alors, au sein de l'équipe de Biophysique des Métalloprotéines. Je lui sais gré de la grande liberté qu'il m'a laissé dans mon travail et de son appui pour ma participation à des congrès internationaux. Je le remercie pour sa haute exigence et pour sa rigueur scientifique. Puissent-elles se refléter dans ce manuscrit et dans les suivants ! Je tiens également à reconnaître ici les efforts qu'il fait, tous les jours, pour financer nos équipements, grâce à quoi j'ai eu le privilège de travailler avec des appareils de pointe.

Je tiens également à remercier M^{me} Marie-Thérèse GUIDICI-ORTICONI, actuelle directrice du BIP, de faire en sorte que ce laboratoire soit toujours aussi bien doté.

À M^{lle} Bénédicte BURLAT, ma co-directrice de thèse, j'adresse toute ma gratitude, pour avoir fait preuve d'autant de patience avec moi, pour toute la pédagogie dont elle a su user, pour l'énergie qu'elle a insufflé à ce projet, pour la ténacité avec laquelle elle a porté l'écriture de notre premier article, pour avoir tenu le cap pour m'éviter de m'éparpiller. M'encadrer n'est pas chose facile, aussi je lui dois beaucoup. Je tiens à lui témoigner également mon admiration face à son aptitude à conjuguer sa vie personnelle et sa vie professionnelle.

Une grande partie de mes travaux s'est faite au sein de l'équipe de Dynamique Réactionnelle des Enzymes Redox Multicentres, sous la direction de M. Christophe LÉGER. Je le remercie pour sa rigueur scientifique, pour son souci du détail et son pragmatisme scientifique, pour l'aide précieuse qu'il m'a apporté dans l'analyse de mes données (et pas seulement grâce au programme SOAS), et aussi pour les fonds obtenus grâce au projet ANR MC², qu'il porte depuis le début ma thèse. Les réunions MC² m'ont donné le sentiment exaltant de contribuer à un grand projet rassemblant les spécialistes français des enzymes à molybdène !

Un grand merci à M. Vincent FOURMOND, qui, lors de son premier passage au BIP, a obtenu nombre de résultats sur lesquels ma thèse s'est appuyée, et est réapparu au cours de ma thèse. Sa pédagogie, sa disponibilité, son implication dans mes travaux m'ont été d'une aide précieuse et ont permis des avancées décisives et fécondes. Puisse-t-il apporter toujours autant à l'étude des nitrate réductases !

Ce travail est le fruit d'une collaboration avec David PIGNOL, Monique SABATY

et Pascal ARNOUX, chercheurs au Laboratoire de Bioénergétique Cellulaire du CEA de Cadarache. Je tiens à les remercier pour leur soutien et pour leur regard sur mes résultats. Je remercie en particulier David PIGNOL pour m'avoir accueilli dans son équipe pour de courtes périodes. La production de la nitrate réductase périplasmique est une tâche très délicate. C'est une chose que je dois essentiellement à M^{mes} Sandrine GROSSE, Séverine BOIRY, et Josabel MURILLO, techniciennes au LBC, et qui m'ont appris à extraire et purifier cette protéine. Je veux ici reconnaître le temps et l'énergie qu'elles ont passé pour nous fournir le matériel biologique.

Tous les résultats de spectroscopie qui sont présentés ici n'auraient pas été possible sans l'implication des deux ingénieurs responsables de la plate-forme RPE : messsieurs Emilien ETIENNE et Guillaume GERBAUD, que je ne remercierais jamais assez. Je veux ici rendre hommage à leur travail de maintenance, ainsi qu'à leur participation active à ma thèse grâce aux calculs de spectres et de courbes de saturation qu'ils ont fait, et à la grande disponibilité dont ils ont fait preuve. Je remercie particulièrement Guillaume GERBAUD pour m'avoir initié au fonctionnement du spectromètre impulsional et à la dynamique des spins.

Je veux aussi rendre hommage à M. Patrick BERTRAND pour l'intérêt qu'il a porté à mes travaux, pour avoir apporté son expertise dans l'interprétation des données cinétiques, et pour avoir stimulé la recherche du couplage intercentres.

Je remercie également M. Frédéric BIASO, dont les calculs DFT nous ont permis de comprendre que les modification que nous observions ne concernaient pas la première sphère de coordination de molybdène, et permettront à l'avenir d'identifier les noyaux que nous avons détecté au cours de mes travaux, pour le regard porté sur mes travaux a cours de ces trois ans.

Je tiens à reconnaître ici le travail de M^{me} Laure AZZOPARDI, secrétaire du BIP, de M^{me} Christiane HOROYAN, disparue prématurément, et M^{me} Isabelle PINET, gestionnaires financières, qui nous dégagent des tracas administratifs.

J'ai eu le privilège, pendant cette thèse, d'encadrer M^{elles} Sarah SAYED et Solène DESCHAMPS, lors de leur stage au sein l'équipe de Biophysique des Métalloprotéines. Je les remercie pour leur implication et leur détermination, qui ont mené à des résultats décisifs.

Je tiens à remercier tous les membres de l'équipe et du laboratoire, avec qui j'ai eu des échanges tout autant scientifiques que personnels, pour leurs réponses à mes questions naïves, leur aide ponctuelle, leur *sympathie* et leurs encouragements. Je n'ai pas la place de tous les citer, mais je pense en particulier à Stéphane GRIMALDI, Carole BAFFERT et Sébastien DEMENTIN, et aux jeunes chercheurs : Pierre CECCALDI, Nolwenn LE BRETON, Elisabetta MILEO, Vivianne HAJJ, Julia RENDON et Jessica HADJ-SAÏD. Je remercie tous les membres du BIP, qui m'ont toujours donné le sentiment d'appartenir à une communauté.

Enfin, je remercie du fond du cœur ma famille, pour son soutien et son écoute permanents.

Sommaire

1	Introduction générale	10
1.1	Présentation générale des enzymes à molybdène	10
1.1.1	Place du molybdène et du tungstène en biologie	10
1.1.1.1	Les nitrogénases à molybdène	12
1.1.1.2	Les enzymes mononucléaires	13
1.1.2	Structures des enzymes à molybdène mononucléaires	13
1.1.2.1	Structure du cofacteur à molybdène	13
1.1.2.2	Structure des autres cofacteurs	15
1.1.2.3	Classe de la xanthine oxydase	17
1.1.2.4	Classe de la sulfite oxydase	19
1.1.2.5	Classe de la DMSO réductase	20
1.1.3	Activité catalytique, fonction biologique, impact écologique	24
1.1.3.1	Activités enzymatiques	24
1.1.3.2	Fonctions physiologique et physiopathologique	28
	Catabolisme et détoxification	28
	Assimilation	29
	Rôle bioénergétique	30
1.1.3.3	Impact écologique des enzymes à molybdène	31
	Le cycle de l'azote	31
	Composés du soufre	32
	Métalloïdes et halogènes	32
1.2	Méthodes biophysiques pour l'étude des enzymes à molybdène et tungstène	33
1.2.1	Cristallographie	33
1.2.2	Spectroscopies d'absorption des rayons X	35
1.2.3	Spectroscopies d'absorption électronique	36
1.2.4	Spectroscopies de résonance paramagnétique électronique	36
	1.2.4.1 Apports	36
	1.2.4.2 Spectroscopies hyperfines	37
1.2.5	Méthodes électrochimiques	37
1.3	Mécanismes enzymatiques	38
1.3.1	Xanthine oxydase	38
1.3.2	Sulfite oxydase	40
1.3.3	DMSO réductase	40
1.4	Les nitrate réductases périplasmiques	41
1.4.1	Organisation génomique des nitrate réductases périplasmiques	42
	1.4.1.1 Chaperones et régulateurs	43

1.4.1.2	Unités de transfert d'électrons	43
1.4.1.3	Propriétés enzymatiques	44
1.4.2	Structures cristallographiques	45
1.4.2.1	Structure de la sous-unité catalytique	46
1.4.2.2	Structure de la sous-unité de transfert d'électrons	46
1.4.2.3	Structures du site actif vues par cristallographie	46
1.4.2.4	Études du site actif par EXAFS	47
1.4.2.5	Propriétés spectroscopiques des centres à fer	48
	UV – visible	48
	Signatures RPE	48
1.4.3	Description du mécanisme catalytique	48
1.4.3.1	Place du Mo ^V dans le cycle catalytique	48
1.4.3.2	Les apports de la chimie théorique	50
1.4.4	Propriétés spectroscopiques du cofacteur à molybdène	51
1.4.4.1	Espèces « high <i>g</i> »	51
	Forme <i>resting</i>	53
	Formes azoture et thiocyanate	53
	Formes <i>nitrate</i> et <i>turnover</i>	54
1.4.4.2	Espèces « very high <i>g</i> »	55
1.4.4.3	Espèces « low <i>g</i> »	55
1.4.4.4	Structure des espèces Mo ^V	55
1.4.5	Positionnement de ce travail de thèse	58
2	Matériel et méthodes	61
2.1	Spectroscopie de résonance paramagnétique électronique	61
2.1.1	Principe de la résonance paramagnétique électronique	61
2.1.2	Niveaux d'énergie	63
	Couplages hyperfins	64
	Spectroscopie HYSCORE	65
	Couplages électron-électron	66
	Cas d'un centre paramagnétique en solution fluide	67
	Cas des espèce Mo ^V	67
	RPE en mode impulsionnel	68
	Spectre en absorption	69
	Traitement du signal ESEEM – HYSCORE	70
2.1.3	Instrumentation	70
2.1.3.1	Mode continu	70
	Mesures à températures cryogéniques	70
	Mesures à température ambiante	70
2.1.3.2	Mode impulsionnel	70
	Bande X	71
	Bande Q	71
2.2	Électrochimie des protéines	72
2.2.1	Éléments de cinétique enzymatique	72
	Cinétique enzymatique	72
	Inhibition réversible	72
	Inhibition réversible par le substrat	74

2.2.2	Principes de l'électrochimie sur film de protéines	75
	Mode opératoire	76
	Types de mesures	76
2.2.3	Instrumentation	77
2.3	Théorie des transferts d'électrons	78
3	Étude du mécanisme de l'activation irréversible de Nap	80
3.1	Introduction	80
3.1.1	L'hétérogénéité du site actif dans l'état « as prepared » . . .	81
3.1.2	L'hétérogénéité d'activité enzymatique dans l'état « as prepared »	81
3.1.2.1	Observation d'une activation irréversible par voltampérométrie cyclique	81
3.1.2.2	Étude de l'activation irréversible par chronoampérométrie	82
3.1.3	Recherche du mécanisme de l'activation	85
	L'activation résulterait – elle d'une réduction ?	85
	Paramètres déterminant la vitesse d'activation	86
	Irréversibilité du processus d'activation	86
3.1.4	Modélisation de l'activation	87
3.1.5	Corrélation à l'espèce « high g resting »	88
	Position du problème et objectif du travail	89
3.2	Résultats	89
3.2.1	Persistance de l'espèce « high g resting » en réduction . . .	89
	Mode opératoire :	90
3.2.1.1	Réduction de NapAB suivie par RPE à basse température	90
3.2.1.2	Réduction de NapA suivie par RPE à basse température	92
3.2.2	Étude cinétique par RPE à température ambiante de la réduction de l'espèce « high g resting »	93
3.2.2.1	Caractérisation du signal Mo^{V} « high g resting » à température ambiante	93
	Effets du mouvement brownien	94
3.2.2.2	Évolution du signal au cours du temps dans NapAB	96
	Mode opératoire	96
3.2.2.3	Évolution du signal Mo^{V} au cours du temps dans NapA	97
3.2.3	Recherche des déterminants	98
3.2.3.1	Influence de NapB	98
	Formation du complexe NapA+B <i>in vitro</i>	98
	Vitesse de réduction du Mo^{V} dans NapA+B	100
3.2.3.2	Influence des médiateurs électrochimiques	101
3.2.3.3	Influence de la température sur la vitesse de réduction du Mo^{V}	102
3.2.4	Étude par chronoampérométrie de l'influence de la température sur la vitesse d'activation	104

3.3	Discussion	107
3.3.1	Mécanismes proposés pour l'activation par réduction	108
3.3.1.1	Modèle impliquant le transfert d'électrons	108
	Calcul de la vitesse de réaction	109
	Vitesse d'apparition de la forme active	111
3.3.1.2	Modèle avec transfert d'électrons « gated »	111
	Calcul de la vitesse de réduction	112
	Vitesse de disparition du Mo ^V	112
	Vitesse d'activation	113
3.3.2	Confrontation des deux modèles	113
	Typologie de DAVIDSON pour les transferts d'électrons en biologie	113
3.3.3	Résumé et Perspectives	115
4	Caractérisation spectroscopique des espèces Mo^V « high g »	116
4.1	Introduction	116
4.2	Conditions de formation et propriétés spectroscopiques de l'espèce Mo ^V « high g nitrate »	117
4.2.1	Formation par oxydation au nitrate	117
4.2.2	Formation de l'espèce Mo ^V « high g nitrate » en absence de nitrate	120
4.2.3	Caractérisation du signal Mo ^V « high g nitrate »	122
4.3	Étude des interactions magnétiques intercentres dans la sous-unité catalytique	124
4.3.1	Mise en évidence et étude d'une interaction magnétique sur les formes « high g resting » et « high g nitrate »	124
4.3.1.1	Influence de l'état d'oxydation du centre fer – soufre sur la forme du spectre RPE Mo ^V « high g resting » à haute température	124
	Obtention de l'état Mo ^V – [Fe ₄ S ₄] ⁺ dans le cas de l'espèce « high g resting »	124
	Cas de l'espèce « high g nitrate »	125
4.3.1.2	Spectres RPE des espèces Mo ^V « high g resting » et « high g nitrate » en interaction avec le centre [Fe ₄ S ₄] ⁺	125
	Espèce « high g nitrate »	125
	Espèce « high g nitrate »	127
4.3.1.3	Effets de la température sur les spectres en inter- action des espèces « high g resting » et « high g nitrate »	127
4.3.2	Étude en bande Q de l'espèce « high g resting » en interaction et hors interaction	128
	Préparation des échantillons	128
4.3.2.1	Étude des signaux hors interaction à 80 K	128
	Éclatements dus au couplage hyperfin avec les noyaux ¹ H	131

	Éclatements dus au couplage hyperfin avec les noyaux ^{95}Mo et ^{97}Mo	131
	Élargissement par g -strain en général (et dans les Mo-enzymes en particulier)	132
4.3.2.2	Étude du signal en interaction en bande Q à basse température	135
4.3.2.3	Bilan de l'étude en bande Q	135
4.4	Caractérisation quantitative du couplage intercentre par simulation numérique	135
4.4.1	Simulation du spectre de l'espèce « high g resting » en interaction	138
4.4.2	Simulation du spectre de l'espèce « high g nitrate » en interaction	139
4.5	Étude de la relaxation des espèces paramagnétiques dans NapA	145
4.5.1	Étude de la relaxation des espèce Mo^{V} « high g »	145
4.5.1.1	Mesures des temps de relaxation par RPE impul- sionnelle	145
	Mesure des temps de relaxation longitudinale	145
	Mesure du temps de relaxation transverse T_2	147
4.5.1.2	Étude de la relaxation des signaux Mo^{V} « high g » par saturation continue	149
	Modification du signal par saturation	149
4.5.2	Propriétés de relaxation du centre fer-soufre	154
4.5.2.1	Étude de l'élargissement des raies avec la température	154
4.5.2.2	Étude de la relaxation par saturation continue à 15 K	154
4.6	Mise en évidence de l'espèce Mo^{V} « high g turnover »	157
4.7	Discussion	160
	Structure des ptérides dans les enzymes à molybdène et tungstène	162
5	Étude électrochimique de l'inhibition par le substrat	166
5.1	Introduction	166
5.2	Approche par échelons de concentration	168
5.2.1	Chronoampérogrammes bruts	169
5.2.2	Activité à l'état stationnaire	173
	Constante de MICHAELIS	174
	Constante d'inhibition	174
5.2.3	Régimes transitoires	178
5.2.4	Cohérence du modèle	179
5.3	Approche par échelons de potentiel	183
5.4	Discussion	203
6	Étude des espèces Mo^{V} « high g » par spectroscopie hyperfine à haute résolution	205
6.1	Introduction	205
6.2	Étude de la forme « high g resting » par spectroscopie HYSORE	207
6.2.1	État « as prepared »	207
6.2.1.1	Examen du secteurs de hautes fréquences	207

6.2.1.2	Examen du secteur de basses fréquences	209
6.2.2	État « centre fer–soufre réduit »	209
6.3	Étude de l'espèce « high g nitrate »	214
6.3.1	Effet de la substitution isotopique	214
6.3.2	Étude du secteur des hautes fréquences	214
6.3.3	Étude du secteur des basses fréquences	219
6.4	Discussion	223

Chapitre 1

Introduction générale

Sommaire

1.1	Présentation générale des enzymes à molybdène	10
1.1.1	Place du molybdène et du tungstène en biologie	10
1.1.2	Structures des enzymes à molybdène mononucléaires . . .	13
1.1.3	Activité catalytique, fonction biologique, impact écologique	24
1.2	Méthodes biophysiques pour l'étude des enzymes à molybdène et tungstène	33
1.2.1	Cristallographie	33
1.2.2	Spectroscopies d'absorption des rayons X	35
1.2.3	Spectroscopies d'absorption électronique	36
1.2.4	Spectroscopies de résonance paramagnétique électronique	36
1.2.5	Méthodes électrochimiques	37
1.3	Mécanismes enzymatiques	38
1.3.1	Xanthine oxydase	38
1.3.2	Sulfite oxydase	40
1.3.3	DMSO réductase	40
1.4	Les nitrate réductases périplasmiques	41
1.4.1	Organisation génomique des nitrate réductases périplasmiques	42
1.4.2	Structures cristallographiques	45
1.4.3	Description du mécanisme catalytique	48
1.4.4	Propriétés spectroscopiques du cofacteur à molybdène .	51
1.4.5	Positionnement de ce travail de thèse	58

1.1 Présentation générale des enzymes à molybdène

1.1.1 Place du molybdène et du tungstène en biologie

Les métaux de transition sont indispensables à toute forme de vie. Le fer, le zinc, le manganèse, le cuivre, et le cobalt sont des éléments trace indispensables

(oligoéléments) chez l'homme. Certaines espèces ont besoin aussi de nickel ou de vanadium. La plus grande partie de ces métaux se trouve au sein de métallopoteines, qui ont le plus souvent une fonction de transfert d'électrons (ferrédoxine, cuprédoxines), ou une fonction de catalyse (métalloenzymes).

Dans les métallopoteines, les ions métalliques peuvent être coordonnés directement aux résidus de la chaîne polypeptidique, ou bien être complexés par des ligands qui sont eux-même incorporés dans la protéine. Le premier cas est illustré par les rubrédoxines. Dans ces protéines, un ion fer est tétracoordiné par les fonctions thiolate de quatre résidus cystéine. Le deuxième cas peut être illustré par les protéines à hème, appelées couramment *cytochromes*. Dans ces dernières, l'ion fer est complexé par un macrocycle tétrapyrrolique tétradente, ainsi que par des résidus protéiques. Enfin, le site métallique peut être mono- ou polynucléaire, jusqu'à former des *agrégats*. Les centres fer-soufre (Fe_2S_2 , Fe_3S_4 , Fe_4S_4) des ferrédoxines, ou le centre CaMn_4 du centre de dégagement d'oxygène du photosystème II sont des exemples de tels édifices. Souvent un ou plusieurs résidus de la chaîne polypeptidique sont coordonnés au métal.

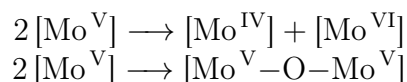
Tableau 1.1 – Tableau périodique des éléments (bloc *f* omis)

H																	He
Li	Be											B	C	N	O	F	Ne
Na	Mg											Al	Si	P	S	Cl	Ar
K	Ca	Sc	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Ga	Ge	As	Se	Br	Kr
Rb	Sr	Y	Zr	Nb	Mo	Tc	Ru	Rh	Pd	Ag	Cd	In	Sn	Sb	Te	I	Xe
Cs	Ba	Ln	Hf	Ta	W	Re	Os	Ir	Pt	Au	Hg	Tl	Pb	Bi	Po	At	Rn
Fr	Ra	An															

Tous les métaux sus-cités appartiennent à la première ligne du bloc *d*. Le molybdène (Mo, $Z = 42$) est un élément de la deuxième ligne du bloc *d*. Le tungstène (W, $Z = 74$), lui, est sur la troisième ligne du bloc *d*, en-dessous du molybdène. Ce sont les seuls métaux de transition « lourds » ayant un rôle essentiel en biologie. Dans les cellules vivantes, ces métaux sont incorporés au site actif d'enzymes. Ils sont utilisés de façon complémentaire. Le tungstène se substitue au molybdène chez certains procaryotes vivant à haute température (Bever *et al.*, 2009). Cette place particulière va de pair avec leur ubiquité : les métallopoteines à molybdène ou tungstène sont présentes dans les trois domaines du vivant que sont les bactéries, les archées, et les eucaryotes. Ces métalloenzymes à molybdène ou tungstène catalysent majoritairement des réaction d'oxydoréduction, couplées le plus souvent à un transfert d'oxygène. Leurs substrats sont des oxydes organiques ou inorganiques de soufre, d'azote ou de carbone, mais aussi des oxydes de métalloïdes et d'halogènes (arsenic, sélénium, chlore). Ces réactions sont des processus vitaux pour de nombreuses espèces, et pour l'homme en particulier. Chez les bactéries, elles ont souvent une fonction bio-énergétique. Les enzymes à molybdène et tungstène ont ainsi un rôle essentiel dans la spéciation de ces éléments, et par là même un intérêt pour la bio-remédiation d'environnement pollués. Ce sont des acteurs parfois incontournables dans les cycles bio-géochimiques du carbone, de l'azote et

du soufre.

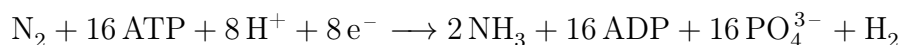
Dans l'environnement, le métal n'est pas trouvé à l'état natif. Dans l'eau de mer, le molybdène est présent principalement sous forme de molybdate (VI) MoO_4^{2-} , et est le métal de transition le plus abondant, la concentration massique en molybdate étant de 10 ppb (Emsley, 2001). Dans les sols, le molybdène et le tungstène sont rencontrés sous forme minérale à l'état d'oxydation +IV (MoS_2 , molybdénite) ou +VI (MoO_3 , CaMoO_4 , CaWO_4). Dans les organismes vivants, molybdène et tungstène sont présents dans les états d'oxydation IV, V et VI. En solution, les complexes oxygénés de Mo^V tendent à se dismuter ou à dimériser (Holm *et al.*, 2011) :



On distingue les enzymes à molybdène selon la nucléarité de leur site à molybdène. Chez la plupart des organismes, les enzymes à molybdène sont *mononucléaires*. Les micro-organismes fixateurs d'azote, eux, utilisent aussi le molybdène dans une enzyme *polynucléaire* : la nitrogénase, qui héberge un agrégat fer – molybdène – soufre. La présence de molybdène est le seul point commun entre ces systèmes bien différents. Ce travail de thèse concernant une enzyme mononucléaire, la nitrate réductase périplasmique, le paragraphe suivant décrit brièvement les nitrogénases pour ne plus y revenir par la suite.

1.1.1.1 Les nitrogénases à molybdène

Les nitrogénases ne sont présentes que dans certains micro-organismes, qui sont trouvés dans les sols à proximité des racines des plantes. Leur fonction est de *réduire* le diazote en ammoniac, afin de *fixer* l'azote atmosphérique dans la matière organique. Ces enzymes sont les seuls systèmes capables de prélever l'azote atmosphérique pour l'introduire dans la chaîne alimentaire, ceci à température ambiante, et pression atmosphérique. Pour comparaison, la réduction industrielle du diazote en ammoniac (procédé HABER – BOSCH) utilise un catalyseur à base de Fe^0 , à 200 mol, 500 °C. Le processus biologique est, malgré tout, très demandeur en énergie (sous forme d'ATP) pour la cellule, et génère du dihydrogène comme sous-produit, ainsi que résumé par l'équation – bilan suivante :



Les nitrogénases sont des complexes multi-protéiques abritant plusieurs sites polynucléaires sensibles au dioxygène. Le cofacteur fer-molybdène (FeMo-co), de formule $\text{MoFe}_7(\mu^3\text{-S})_6(\mu\text{-S})_3\mu^4\text{-C}$ est le site de réduction de N_2 , successivement en N_2H_2 , N_2H_4 et finalement 2NH_3 . Le molybdène y est hexacoordiné par un ion homocitrate bidente, un résidu histidine et trois sulfures pontants (figure 1.1). Le molybdène semble avoir un rôle important dans la liaison entre le cofacteur et la protéine, et dans le transfert des protons (Dance, 2013). Dans certaines nitrogénases, cet ion molybdène est remplacé par un ion vanadium ou encore un ion fer.

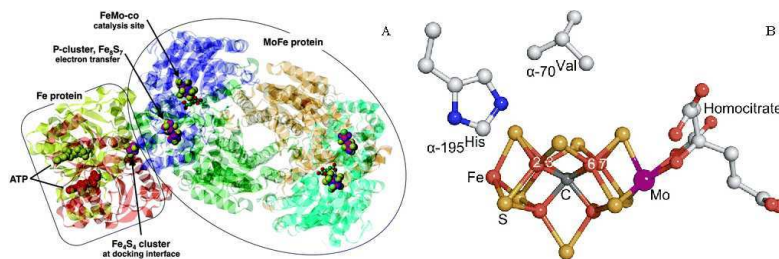


Figure 1.1 – Structure (A) et cofacteur Fe – Mo (B) de la nitrogénase d’*Azotobacter vinelandii* (Hoffman *et al.*, 2013; Dance, 2013)

1.1.1.2 Les enzymes mononucléaires

À l’exception de la CO-déshydrogénase qui possède un site dinucléaire à Cu–Mo (Dobbek *et al.*, 2002), les enzymes à molybdène et tungstène possèdent un site actif mononucléaire. La majorité des enzymes connues possède un atome de molybdène en son site actif, et nous nous focaliserons sur ce métal. La chimie du tungstène est très proche de celle du molybdène, mais les différences — dans l’énergie de dissociation des liaisons W=O — peuvent avoir un impact non négligeable en biologie (Bever *et al.*, 2009; Holm *et al.*, 2011).

La première enzyme à avoir été identifiée comme contenant du molybdène indispensable à son activité est la *xanthine oxydase* de lait de vache (*Bos taurus*). Plus tard débiteront la caractérisation de la *sulfite oxydase* de poulet (*Gallus gallus*), et de la *nitrate réductase* respiratoire de la bactérie *Escherichia coli*.

De manière générale, la sphère de coordination du métal est composée d’éléments chalcogènes (O, S, Se). Le métal est stabilisé dans la protéine grâce à un ligand spécifique aux enzymes à molybdène, qui porte une fonction bidente *cis*-ène-1,2-dithiol, plus couramment appelé « dithiolène » (schéma 1.1). Le complexe formé est appelé *cofacteur à molybdène*. Nous allons voir que cette appellation est très générale et recouvre plusieurs types de structures. Outre le dithiolène, le métal peut être coordonné par la fonction thiolate, carboxylate, alcoolate, ou encore sélénoate de la chaîne latérale d’un résidu de la chaîne polypeptidique (respectivement cystéine, aspartate, sérine, séléno-cystéine). C’est alors la seule liaison chimique entre le métal et la protéine. Enfin, des ligands inorganiques complètent la sphère de coordination. Les enzymes à molybdène sont souvent des systèmes composés de plusieurs sous-unités : la sous-unité catalytique proprement dite est associée à une ou plusieurs sous-unité de transfert d’électrons, le tout pouvant être purifié sous forme de multimère, être soluble ou bien encore ancré à une membrane.

1.1.2 Structures des enzymes à molybdène mononucléaires

1.1.2.1 Structure du cofacteur à molybdène

Le ligand dithiolène est spécifique aux enzymes mononucléaires à molybdène. Le schéma 1.1 montre la structure du ligand du molybdène. C’est une molécule tricyclique, comportant un motif *ptérine*, auquel est accolé un cycle pyrane qui porte la fonction dithiolène et un groupement phosphate. Un nucléotide peut être lié au pyrane *via* une liaison pyrophosphate. Il s’agit le plus souvent de la guanosine phosphate ou de la cytidine phosphate. Chez les eucaryotes on retrouve uniquement

la forme mononucléotidique (molybdoptérine, MPT). Les formes dinucléotides (PGD, PCD) sont retrouvées chez les procaryotes seulement (schéma 1.1). Cette molécule est fixée dans la protéine grâce à de nombreuses liaisons faibles de type liaison hydrogène ou π -stacking.

La nomenclature de ces composés n'est pas consensuelle. Les termes *pyranoptérine*, *molybdoptérine*, ou encore *tétrahydropyranoptérine* sont les plus employés. Les tentatives de nomenclature systématique et rigoureuse n'ont pas eut l'impact escompté (Fischer *et al.*, 1998). Sur le schéma 1.1, nous avons adopté une numérotation qui se veut cohérente entre les différentes formes tautomères (schéma 1.2) (la numérotation systématique est bouleversée si la structure tricyclique est rompue).

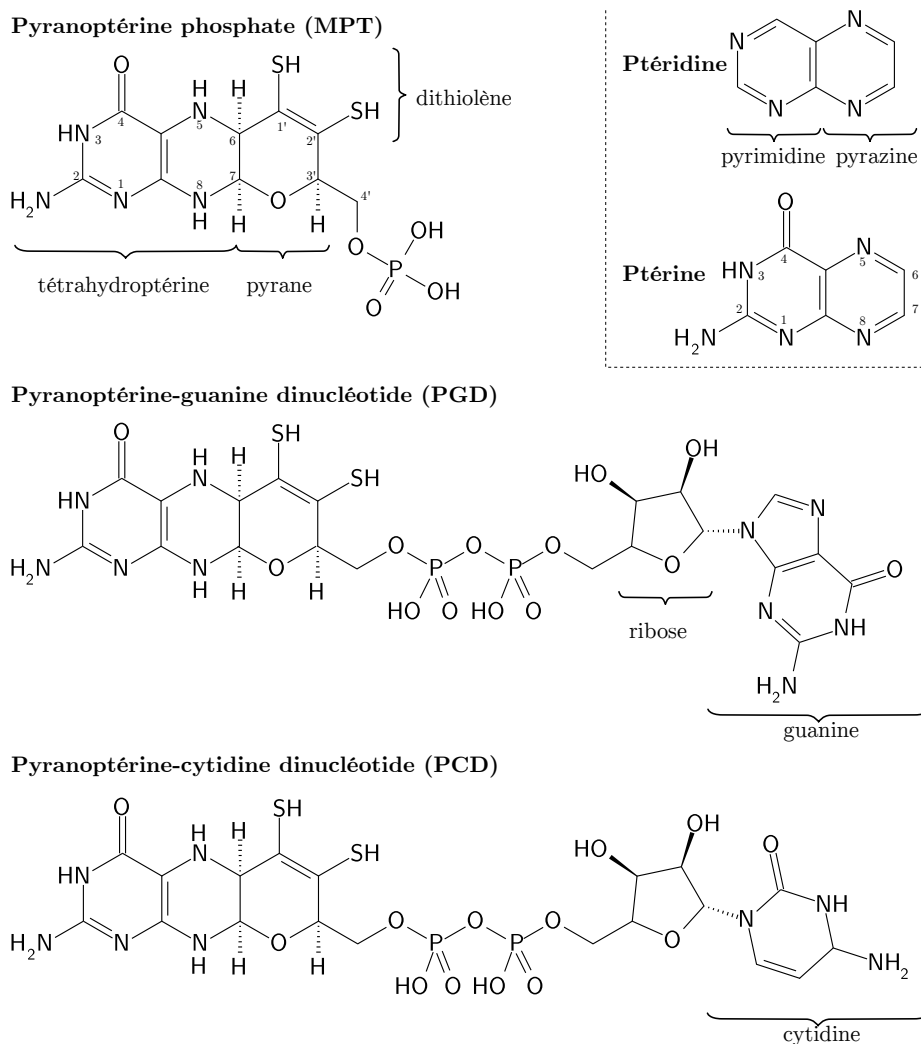


Schéma 1.1 – Structures des principales formes des pyranoptérines. La fonction dithiolène est le site de coordination au molybdène.

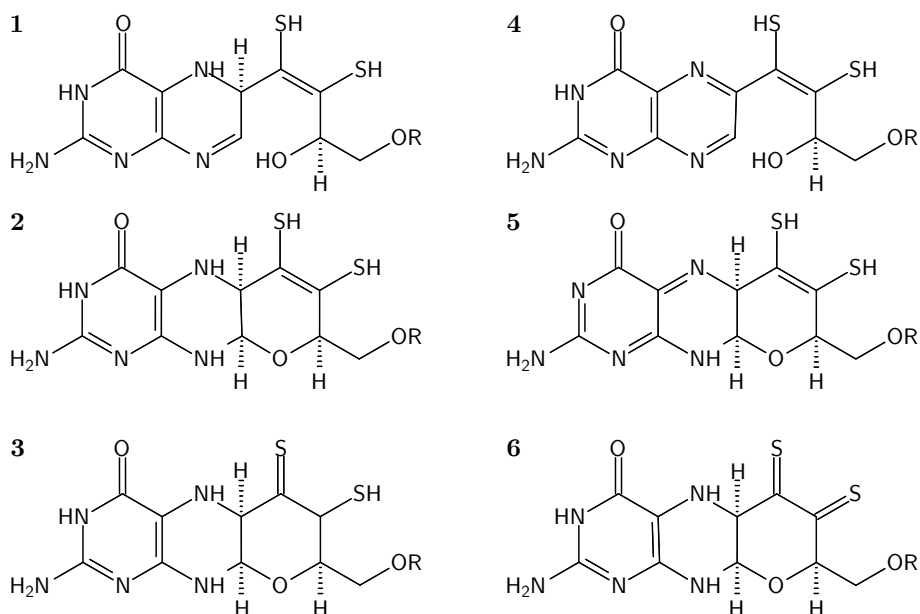


Schéma 1.2 – Structure de certaines formes tautomères envisageables pour les pyranoptérines à l'état réduit (1, 2, 3) et à l'état oxydé à deux électrons, deux protons (4, 5, 6). **1** : forme « ouverte », **2** : forme « fermée », **3** : forme thiol – thione. **4** : forme « ouverte », **5** : forme « quinonoïde », **6** : forme dithione

La structure de la pyranoptérine laisse entrevoir une chimie riche. De nombreux tautomères sont envisageables et plusieurs fonctions sont susceptibles d'être oxydées ou réduites (Hine *et al.*, 2010; Basu et Burgmayer, 2011). Le schéma 1.2 illustre cette variabilité de structures. Les structures cristallographiques sont souvent insuffisamment précises pour identifier une forme tautomère ou un état rédox en particulier. Cependant, certaines structures montrent clairement l'ouverture du cycle pyrane (Bertero *et al.*, 2003; Kloer *et al.*, 2006), sans que la pertinence de ces états dans le cycle catalytique ne soit établie. Le passage d'un tautomère à l'autre nécessite une catalyse acide et certains auteurs ont proposé que l'ouverture du cycle pyrane soit associée au transfert de protons au site actif (Enemark et Garner, 1997), ce qui ne pas été démontré. Les dithiolènes sont des ligands qualifiés de « non-innocents » (Samuel *et al.*, 2011; Hine *et al.*, 2010). Cela signifie qu'il peuvent potentiellement être oxydés en 1,2-dithione à la place du métal coordonné.

1.1.2.2 Structure des autres cofacteurs

Les enzymes à molybdène sont pour la plupart des systèmes contenant plusieurs centres redox qui assurent le transfert des électrons et/ou la conversion du partenaire redox (dioxygène, quinols, etc). Ces centres ne sont pas exclusivement présents dans les enzymes à molybdène, mais il peut être utile de rappeler ici leurs structures (schéma 1.3).

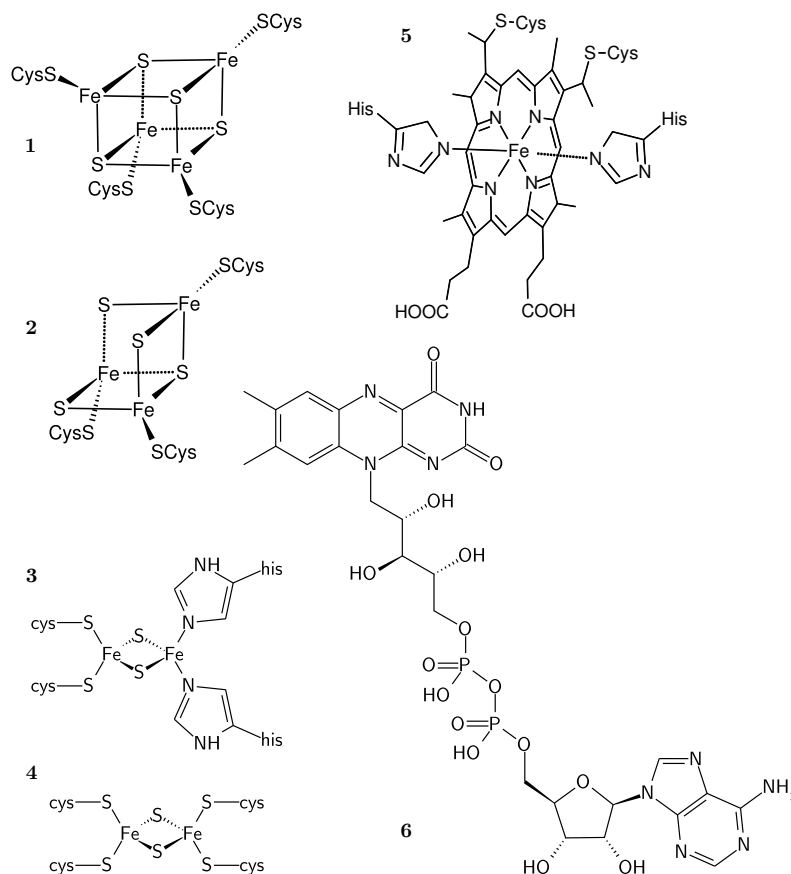


Schéma 1.3 – Cofacteurs redox trouvés dans les enzymes à molybdène. 1 : agrégat Fe_4S_4 ; 2 : agrégat Fe_3S_4 ; 3 : agrégat Fe_2S_2 type RIESKE ; 4 : agrégat Fe_2S_2 type ferrédoxine ; 5 : hème de type c ; 6 : flavine adénine dinucléotide (FAD).

On trouve ainsi des agrégats fer-soufre $[\text{Fe}_2\text{S}_2]^{2+/+}$, $[\text{Fe}_3\text{S}_4]^{+/0}$ et $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{2+/+}$. La particularité des centres de type RIESKE est leur coordination par deux histidines. Les hèmes sont composés d'un ion $\text{Fe}^{3+/2+}$ coordiné par un macrocycle porphyrine tétradente et deux résidus de la protéine. Nous avons représenté ici uniquement un hème c, dont une particularité est d'être covalamment lié au polypeptide *via* deux cystéines. La sphère de coordination du fer y est fixe et ne permet pas la coordination du dioxygène. Tous ces centres transfèrent les électrons un par un, et, dans les enzymes à molybdène, n'ont pas de fonction catalytique. Le dernier cofacteur trouvé dans les enzymes à molybdène est le flavine – adénine dinucléotide (FAD). C'est un centre à deux électrons ($\text{FAD} + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightleftharpoons \text{FADH}_2$), susceptible de réduire le dioxygène en superoxyde (O_2^-) et peroxyde H_2O_2 .

Les enzymes mononucléaires sont classées en *familles* selon la composition de leur centre à molybdène. On distingue trois familles, qui portent le nom d'un archétype bien caractérisé : la famille de la xanthine oxydase, la famille de la sulfite oxydase et la famille de la DMSO réductase. La plupart des enzymes à tungstène sont classées dans la famille de la DMSO réductase (Romão, 2009). Certains auteurs proposent une quatrième famille d'enzymes à tungstène uniquement, et dont l'archétype est une aldéhyde oxydoréductase (Bever *et al.*, 2009). Nous décrivons ci-dessous les caractéristiques structurales de chacune de ces familles.

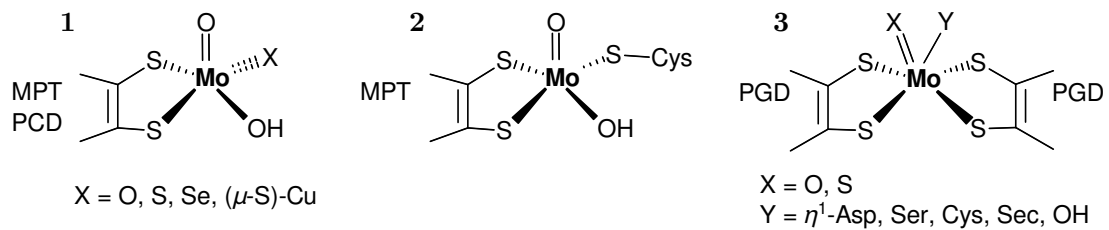


Schéma 1.4 – Sphère de coordination du molybdène dans les trois familles d'enzymes à molybdène mononucléaires. **1** : type xanthine oxydase ; **2** : type sulfite oxydase ; **3** : type DMSO réductase (Dobbek, 2011).

1.1.2.3 Classe de la xanthine oxydase

Les enzymes à molybdène oxydant la xanthine sont très largement distribuées dans le vivant. Elles ont une fonction essentielle de dégradation des bases puriques (schéma 1.5).

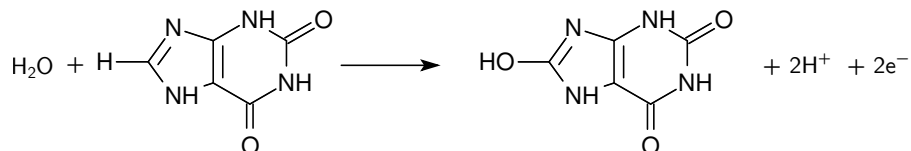


Schéma 1.5 – Oxydation de la xanthine en acide urique par la xanthine oxydase.

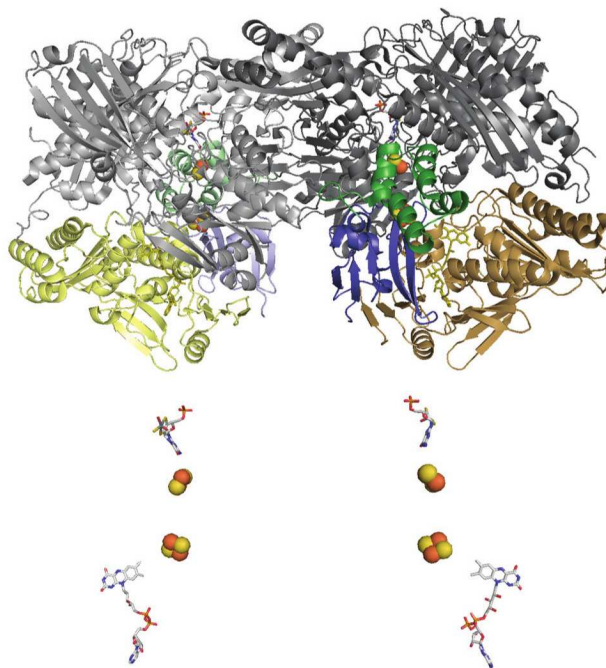


Figure 1.2 – Représentation du dimère et des cofacteurs de la xanthine oxydase bovine (*Bos taurus*) (Hille, 2013).

La classe de la xanthine oxydase¹ regroupe les enzymes d'oxydation des bases puriques, des aldéhydes oxydases, ainsi que diverses enzymes d'oxydation d'hétérocycles aromatiques. Ces dernières sont retrouvées chez les procaryotes. La caractéristique de cette classe d'enzymes est un cofacteur à molybdène comportant une seule ptérine, et où le métal n'est pas directement lié à la chaîne polypeptidique. Outre le dithiolène, les ligands du molybdène sont des atomes de soufre et d'oxygène (Hille, 2005; Dobbek, 2011).

Dans la xanthine oxydase (figure 1.2), l'archétype de la famille, le centre à Mo possède à l'état oxydé un ligand thio, ainsi qu'un ligand oxo et un ligand hydroxo (schéma 1.6). La géométrie du centre est approximativement celle d'une pyramide

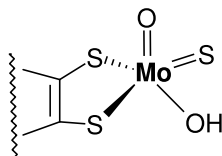


Schéma 1.6 – Coordination du Mo dans la xanthine oxydase

à base carrée. Les atomes de soufre définissent le plan équatorial, et le ligand oxo est en position apicale. Le ligand hydroxo, en position équatoriale, est celui qui est transféré au substrat pendant la catalyse. Le sulfure est labile en présence de cyanure. L'enzyme ainsi désulfurée est inactive (Massey et Edmondson, 1970). Cette sphère de coordination, qui est retrouvée dans les xanthine déshydrogénases et les aldéhyde oxydases eucaryotes et procaryotes, est modifiée dans certains systèmes. L'atome de soufre est remplacé par un atome de sélénium dans la nicotinate déshydrogénase de *Clostridium barkeri* (Wagener *et al.*, 2009). Dans la CO déshydrogénase d'*Oligotropha carboxidovorans*, l'atome de soufre est pontant entre le molybdène et un atome de cuivre (Dobbek *et al.*, 2002). Le site actif de cette enzyme est en fait binucléaire. Enfin, dans la 4-hydroxybenzoyl-CoA réductase de *Thauera aromatica*, le soufre est remplacé par un oxygène (Boll *et al.*, 2001).

Les enzymes de la famille de la xanthine oxydase sont des *molybdo-flavo-protéines* dimériques pour la plupart. Outre le cofacteur à molybdène, deux agrégats Fe_2S_2 sont présents, ainsi qu'un cofacteur FAD. Les centres sont disposés de telle sorte que les électrons sont transférés du cofacteur à molybdène vers la flavine en transitant par les centres fer-soufre. Dans la xanthine déshydrogénase mammalienne, ces quatre cofacteurs sont incorporés dans une seule protéine, tandis que chez la bactérie *Rhodobacter capsulatus*, le monomère est composé de deux sous-unités. La première héberge le cofacteur à molybdène, et la seconde contient les centres Fe_2S_2 et la flavine. Chez les procaryotes, la variabilité se retrouve aussi dans la composition en cofacteurs : le domaine flavinique est absent dans les aldéhyde oxydoréductases (Romão *et al.*, 1995), tandis qu'on trouve un centre Fe_4S_4 additionnel dans la 4-hydroxybenzoyl-CoA réductase (Boll *et al.*, 2001).

1. le terme d'*oxydase* désigne une enzyme d'oxydation qui réagit préférentiellement avec le dioxygène. Si la réaction est plus rapide avec un autre accepteur d'électrons, le terme de *déshydrogénase* est plus approprié

1.1.2.4 Classe de la sulfite oxydase

La sulfite oxydase catalyse l'oxydation du sulfite en sulfate, en transférant les électrons au cytochrome *c* :



Cette réaction est la dernière étape dans la dégradation oxydative des acides aminés soufrés, et évite l'accumulation de sulfite, toxique. Leur cofacteur est composé d'une pyranoptérine, le molybdène étant lié à une cystéine de la chaîne polypeptidique. Là aussi, la géométrie du centre à Mo est pyramidale à base carrée. Un ligand oxo/hydroxo équatorial et un ligand oxo axial (schéma 1.7) complètent la première sphère de coordination. Cette famille d'enzymes est homogène concernant la coordination du molybdène. (Kappler, 2011).

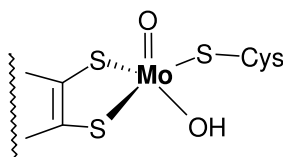
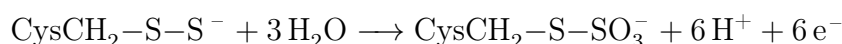


Schéma 1.7 – Coordination du molybdène dans la sulfite oxydase

Ce type d'enzyme est présent dans tous les règnes du vivant. On trouve dans cette famille les sulfite déshydrogénases animales, les sulfite oxydases végétales, ainsi que les nitrate réductases végétales. S'y adjoignent les sulfite déshydrogénases des procaryotes, qui sont encore mal connues, et dont les activités sont plus variées. Dans cette dernière catégorie, on recense par exemple la *sulfane déshydrogénase* SoxCD de la bactérie *Paracoccus pantotrophus* (anciennement *Thiosphaera pantotropha*), qui catalyse l'oxydation d'une cystéine persulfurée en *S*-sulfocystéine (Zander *et al.*, 2011) :



Chez *E. coli*, une protéine (YedYZ) de fonction inconnue, a été identifiée grâce à des méthodes bioinformatiques, purifiée, et caractérisée en détail, sans que son substrat ni sa fonction physiologique n'aient pu être établis (Brokx *et al.*, 2005; Havelius *et al.*, 2011; Kappler, 2011).

Chez les animaux, la sulfite déshydrogénase (qui réagit plus vite sur le cytochrome *c* que sur le dioxygène) est trouvée dans l'espace intermembranaire des mitochondries. Chez les végétaux (comme *Arabidopsis thaliana*), la sulfite oxydase est localisée dans les peroxysomes, et réagit préférentiellement sur le dioxygène pour donner du peroxyde d'hydrogène.

Les enzymes de cette famille sont pour la plupart des *molybdo-hémo-protéines*. La première sulfite oxydase à avoir été cristallisée est l'enzyme aviaire (de *Gallus gallus*). Celle-ci est isolée sous forme d'un dimère, et composée de trois domaines. Le premier fixe un hème *b*₅, le deuxième domaine est le domaine catalytique, qui contient le cofacteur à molybdène, et est relié au domaine hémique par une boucle flexible. Le troisième domaine est impliqué dans la formation du dimère (figure 1.3). Le domaine catalytique a une structure secondaire caractéristique très conservée parmi toutes les enzymes de la famille, baptisée « SUOX fold ».

Dans la structure cristallographique de la sulfite oxydase aviaire, l'ion fer de l'hème est séparé de 32 Å de l'ion molybdène. Or, il est couramment admis qu'un transfert d'électron biologique ne peut pas se faire efficacement sur plus de ~ 14 Å. Dans la conformation qui a été cristallisée, le transfert d'électrons du molybdène vers l'hème ne peut donc pas avoir lieu directement. Un mouvement de domaines important permet le rapprochement des cofacteurs et ainsi un transfert d'électrons efficace (Kisker *et al.*, 1997; Kisker *et al.*, 1998).

Chez les plantes, la sulfite oxydase ne possède pas de domaine hémique. La nitrate réductase végétale s'organise en trois domaines reliés par des boucles flexibles : le domaine catalytique, le domaine hémique, et un domaine de liaison du FAD.

Les sulfite oxydases des procaryotes sont moins bien connues à ce jour, mais montrent une plus grande diversité de structures. La sulfite déshydrogénase SorAB de la bactérie *S. novella* est un hétérodimère dont une sous-unité contient le cofacteur à molybdène tandis que l'autre sous-unité héberge un hème *c*. L'enzyme SoxCD de *P. pantotrophus*, elle, fixe le cofacteur à molybdène dans la sous-unité SoxC, et deux hèmes *c* dans la sous-unité SoxD. Dans le cycle d'oxydation du soufre, cette enzyme oxyde à six électrons. L'enzyme YedY de *E. coli*, elle, est formée d'un unique domaine SUOX.

1.1.2.5 Classe de la DMSO réductase

Les enzymes de cette dernière classe sont exclusivement retrouvées chez les procaryotes. Elles catalysent la réduction ou la production d'oxydes d'azote, de soufre, mais aussi d'arsenic, de chlore ou de sélénium. Leur rôle principal est bioénergétique : elles permettent entre autres la respiration sur des substrats autres que le dioxygène. Elles jouent un rôle important dans la spéciation de ces éléments au sein de la biosphère. Les bactéries qui métabolisent des éléments toxiques présentent donc un intérêt biotechnologique et environnemental évident. Cette famille d'enzymes est celle qui présente la plus grande diversité, tant en termes de composition du site actif, que de structure quaternaire, de substrats ou encore de réactions catalysées.

Les enzymes de type DMSO réductase sont caractérisées par un cofacteur à molybdène comportant deux pyranoptérines, chacune coordonnant le molybdène en mode η^2 . Les ptérines sont présentes sous la forme d'un dinucléotide avec la guanine (PGD). L'édifice Mo-*bis*(PGD) (voir schéma 1.8) a ainsi un poids moléculaire de plus de 1,5 kDa, et s'étend dans la protéine sur une distance de 30 Å. Dans la DMSO réductase soluble, qui est l'archétype de la famille, le cofacteur à molybdène est le seul groupe prosthétique présent dans la protéine, qui n'est composée que d'une sous-unité.

Outre les atomes de soufre des dithiolènes, le molybdène est coordonné par la chaîne latérale d'un résidu protéique, qui peut être une sérine, un aspartate, une cystéine, ou encore une sélénocystéine. Dans le cas de l'arsénite oxydase, le métal n'est pas relié directement à la chaîne polypeptidique (Ellis *et al.*, 2001). Un ligand inorganique oxygéné (O^{2-} , HO^- , H_2O) ou soufré (S^{2-} , HS^-) complète la sphère de coordination dans l'état oxydé. Le schéma 1.9 montre les combinaisons de ligands trouvées dans cette classe d'enzymes.

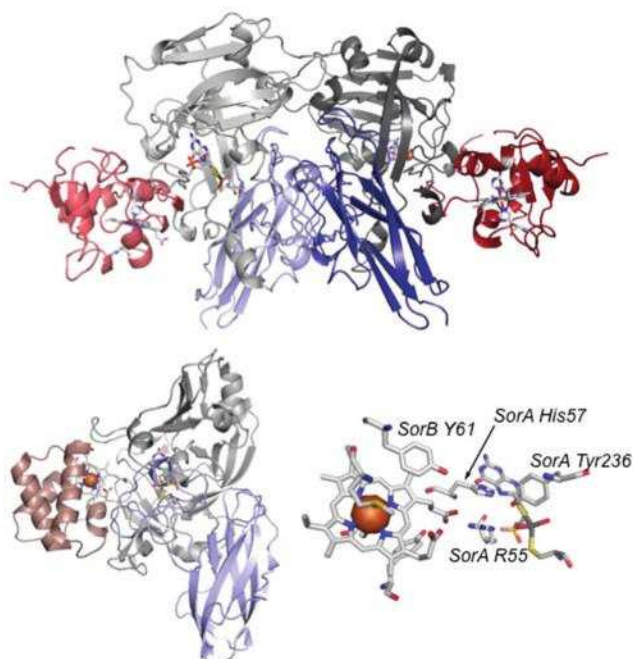


Figure 1.3 – Haut : sulfite oxydase aviaire ; Bas : sulfite déshydrogénase SorAB de *Starkeya novella*, et détail des cofacteurs. En rouge : domaine héminique ; en bleu : domaine de dimérisation ; en gris : domaine du cofacteur à Mo (Hille, 2013).

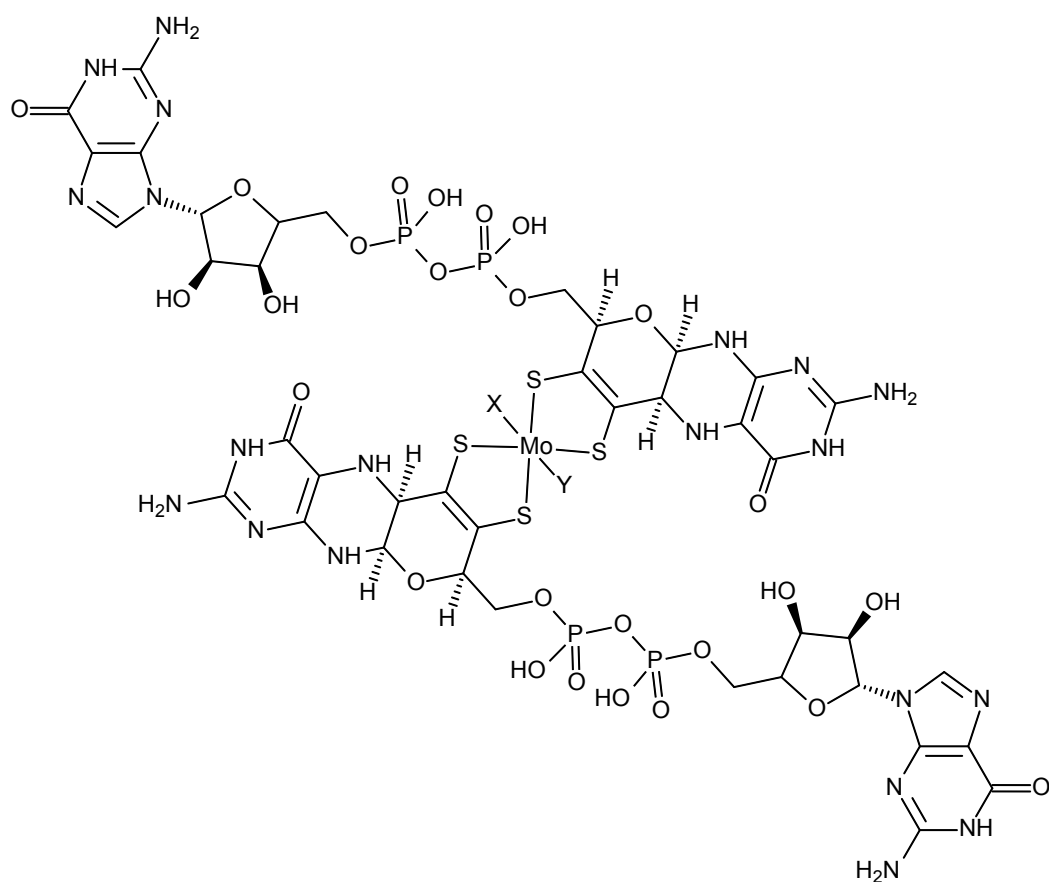


Schéma 1.8 – Représentation du complexe Mo-*bis*(PGD) présent dans les enzymes de la famille de la DMSO réductase. Les ligands X et Y sont variables.

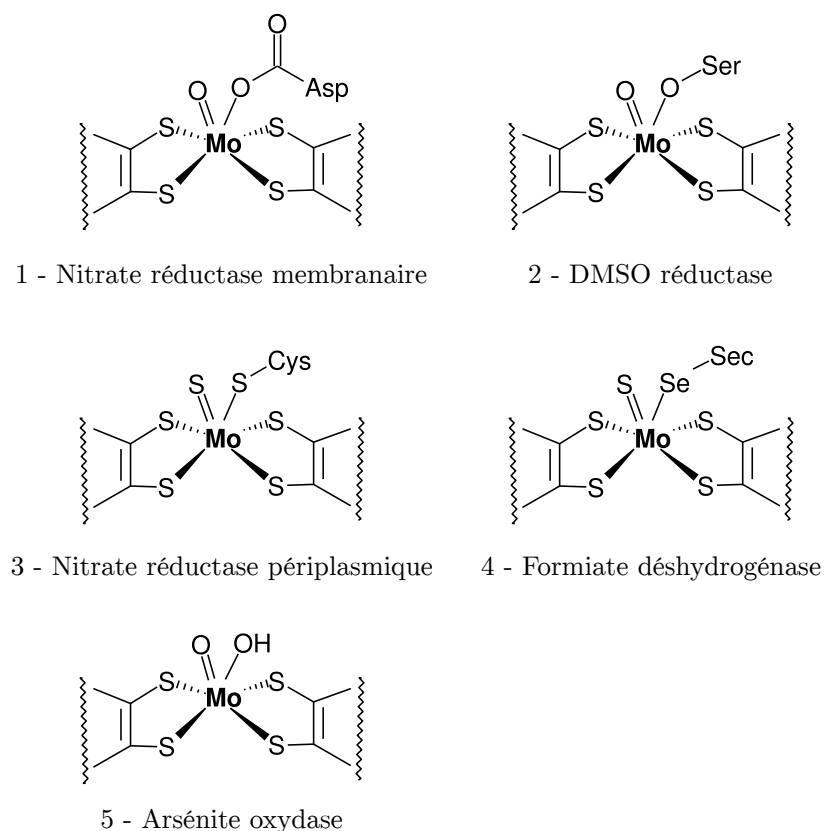


Schéma 1.9 – Coordination du Mo(VI) dans les enzymes de la famille de la DMSO-réductase

Toutes ces enzymes présentent des structures composées de différents *modules* qui peuvent se combiner différemment. La dénomination CISM, pour complexe iron-sulfur-molybdène, a été introduite pour désigner les assemblages de trois sous-unités (catalytic protein, four-cluster protein, membrane-anchored protein) fréquemment retrouvés dans les chaînes respiratoires des procaryotes (Rothery *et al.*, 2008). Cependant, cette nomenclature ne tient pas compte des autres combinaisons possibles. Le seul motif commun qui ressort de cette famille est le cofacteur à molybdène de type Mo-*bis*(PGD). Trois types de sous-unités peuvent participer à l'édifice complexe qu'est *in vivo* une enzyme à W/Mo-*bis*(PGD). Tous ces différents modules sont représentés sur la figure 1.5. À une sous-unité catalytique (α), motif de base, peut s'associer une sous-unité de transfert d'électrons (β), qui peut être associée à une sous-unité membranaire (γ) interagissant avec les quinol (respectivement les quinones) présents dans la membrane plasmique 1.5. La DMSO réductase soluble, l'archétype de la famille, représente plus une exception que la règle générale (*cf* figure 1.5) (Grimaldi *et al.*, 2013).

La sous-unité catalytique s'organise en quatre ou cinq sous-domaines (I – V). Ces sous-domaines sont formés de zones non contiguës de la chaîne polypeptidique malgré une grande divergence des séquences primaires. Cette conservation du repliement suggère l'importance cruciale de celui-ci (Schoepp-Cothenet *et al.*, 2012). Nous décrivons plus loin la structure de la nitrate réductase périplasmique. Entre les domaines II et III, un canal en forme d'entonnoir permet au substrat d'accéder au site actif et au produit d'en sortir. Ce canal est plus ou moins évasé et/ou chargé

selon l'enzyme, influant ainsi sur la sélectivité (figure 1.4) (Rothery *et al.*, 2008).

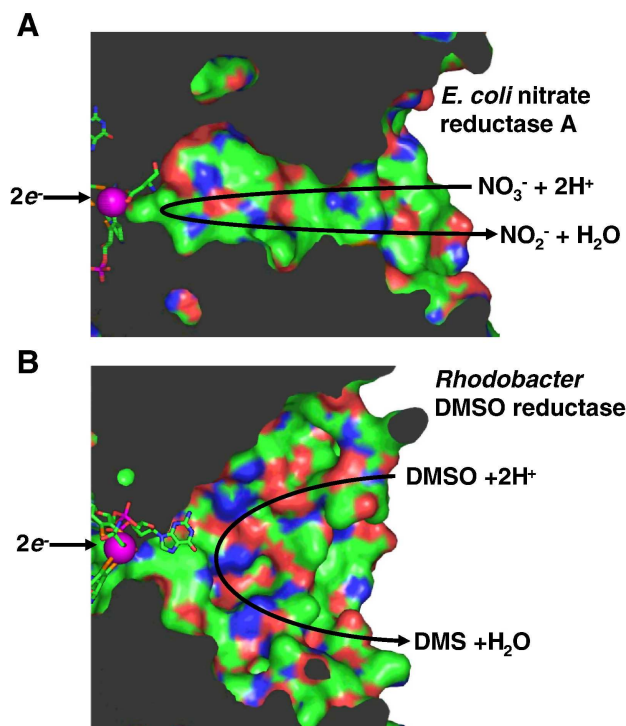


Figure 1.4 – Comparaison de l'exposition du site actif au solvant dans la nitrate réductase membranaire et la DMSO réductase périplasmique. (Rothery *et al.*, 2008)

Dans la sous-unité catalytique, on trouve également un centre fer-soufre (sauf dans les DMSO et TMAO réductases périplasmiques). La coordination de cet agrégat est assurée soit par quatre cystéines, soit par une histidine et trois cystéines. Lorsqu'une histidine coordine le cluster, ses propriétés spectroscopiques de celui-ci sont modifiées. L'état fondamental du cluster réduit possède un spin total $S = 3/2$, ce qui rend sa détection par RPE plus délicate (Rothery *et al.*, 2008; Lanciano *et al.*, 2007). La présence de cette histidine est corrélée à la coordination du molybdène par un aspartate (Trieber *et al.*, 1996). Le tableau 1.2 résume les types de coordinations retrouvées au sein de la famille.

Tableau 1.2 – Corrélation de la coordination du molybdène à celle du centre fer-soufre dans les enzymes à Mo-*bis*(PGD)

Site actif	Fer – soufre	Exemple
Asp	$\text{Fe}_4\text{S}_4\text{HisCys}_3$	nitrate réductase membranaire (NarG)
Ser	$\text{Fe}_4\text{S}_4\text{Cys}_4$	DMSO réductase membranaire (DmsA)
Ser	\emptyset	DMSO réductase périplasmique (Dor)
Cys	$\text{Fe}_4\text{S}_4\text{Cys}_4$	nitrate réductase périplasmique (NapA)
Sec	$\text{Fe}_4\text{S}_4\text{Cys}_4$	formiate déshydrogénase membranaire (Fdn)
HO^-	$\text{Fe}_3\text{S}_4\text{Cys}_3$	arsénite oxydase périplasmique (AioA)

Dans cette troisième famille d'enzymes à molybdène, il s'agit de distinguer entre les deux pyranoptérines présentes, dont la structure est le plus souvent

identique, et qui sont disposées autour du Mo selon une géométrie pseudo- C_2 . L'une des deux ptérines est positionnée *entre* le centre fer-soufre et le molybdène : elle est dite *proximale*. La ptérine symétrique est dite *distale*. La dénomination des pyranoptérines ainsi que la désignation des domaines qui les fixent sont une source de confusion parfois uniquement sémantique. Les deux ptérines sont désignées arbitrairement par les lettres P et Q. Ceci vient des premières structures de DMSO réductases solubles, qui ne contiennent pas de centre fer-soufre (Schindelin *et al.*, 1996). Dans les autres systèmes, la PGD Q est proximale, et est stabilisée le domaine III, tandis que le dinucléotide P interagit avec le domaine II. Dans le cas de la DMSO réductase soluble DorA de *Rhodobacter*, ou de la TMAO réductase soluble TorA de *Shewanella massilia*, le molybdène est le seul métal présent (Schindelin *et al.*, 1996; Schneider *et al.*, 1996; Czjzek *et al.*, 1998), et ces protéines sont trouvées sous forme monomérique dans le périplasme de la bactérie.

D'autres enzymes sont purifiées sous forme d'un hétérodimère $\alpha\beta$. On recense trois types de protéine associée à la sous-unité catalytique. Ce peut être soit un cytochrome possédant deux hèmes *c*, soit une protéine de type RIESKE, soit une « four cluster protein ». Cette dernière catégorie désigne des protéines contenant, selon le système considéré, quatre agrégats Fe_4S_4 , trois Fe_4S_4 et un Fe_3S_4 , ou encore *trois* agrégats Fe_4S_4 .

Cette « four cluster protein » peut être associée à un polycytochrome *b* membranaire ou non. L'association de sous-unités α , β à quatre agrégats et γ crée un édifice protéique de taille importante (typiquement 100 Å) où les cofacteurs redox sont disposés de manière à permettre le transfert efficace des électrons entre le site à molybdène et le site d'oxydoréduction des quinones (*cf* figure 1.6 p. 26).

1.1.3 Activité catalytique, fonction biologique, impact écologique

1.1.3.1 Activités enzymatiques

Pour décrire de façon schématique la fonction catalytique des enzymes à molybdène, nous pouvons dire qu'elles catalysent des réactions de transfert d'atome d'oxygène (OAT), mais là-aussi, de nombreuses exceptions sont connues, et la diversité des substrats est très large : (Stolz *et al.*, 2006; Coates et Achenbach, 2004; Krompholz *et al.*, 2012; Grimaldi *et al.*, 2013).

La plupart des réaction catalysées par les enzymes à molybdène sont des oxydations ou des réductions, avec transfert d'un atome d'oxygène entre le substrat et le molybdène. Cet atome est échangé avec une molécule d'eau (du solvant) pendant le cycle catalytique. Dans l'oxydation des hétérocycles et des aldéhydes, l'atome d'oxygène est inséré dans une liaison C–H. Cette réaction résulte formellement en l'ajout d'un atome d'oxygène sur le substrat, et on parle plus généralement de *transfert d'atome d'oxygène*. Le même métal est capable de catalyser aussi bien la réduction du séléniate ($E'_{SeO_4^{2-}/SeO_3^{2-}} = +475$ mV) que l'oxydation du formiate en CO_2 ($E'_{CO_2/HCOO^-} = -430$ mV).

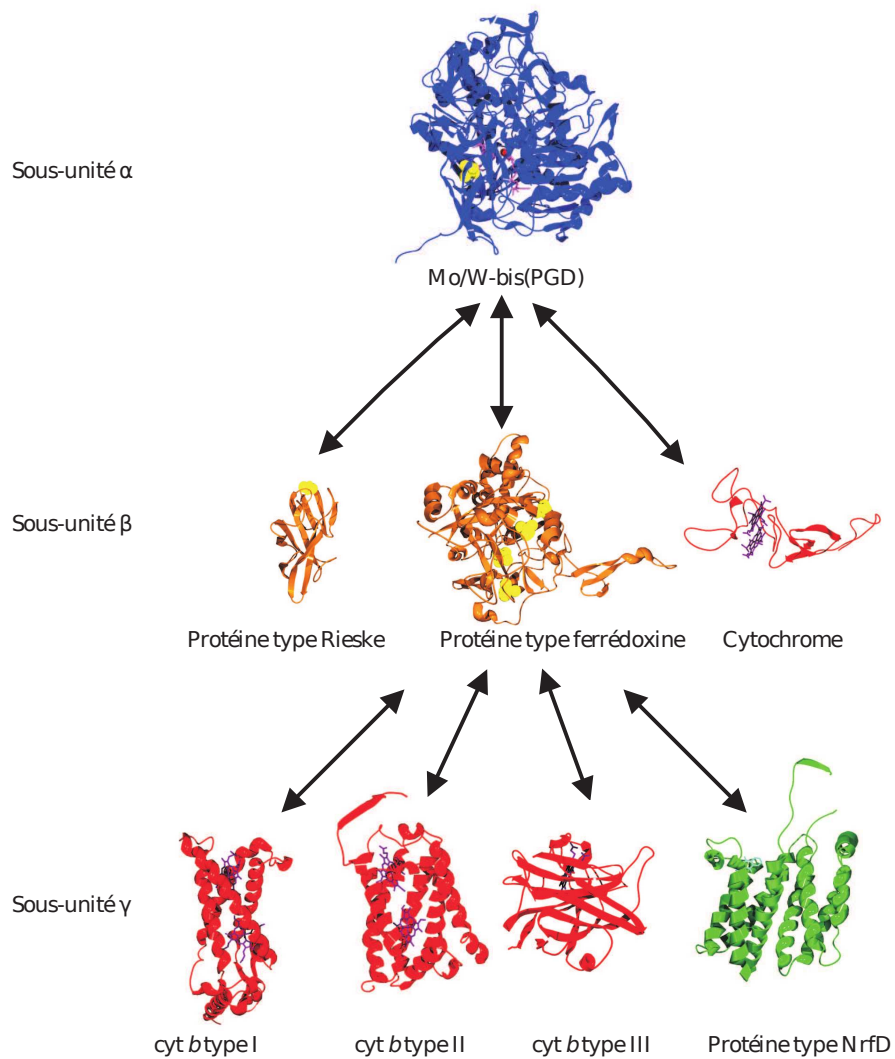


Figure 1.5 – Modularité des structures dans la famille d’enzymes à Mo-*bis*(PGD). Selon le système considéré, la sous unité catalytique (en bleu) peut s’associer à une protéine RIESKE, une ferrédoxine ou un cytochrome à deux hèmes *c*. La ferrédoxine peut s’associer à une protéine transmembranaire portant des hèmes de type *b*, ou dépourvue de cofacteur (type NrfD) (Grimaldi *et al.*, 2013).

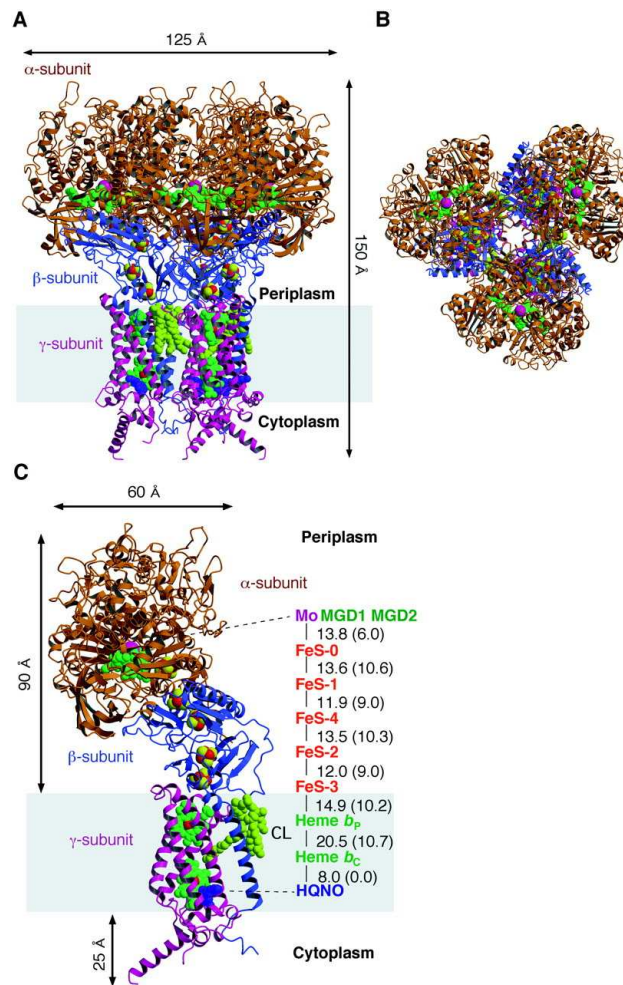


Figure 1.6 – Structure globale de la formiate déshydrogénase N d'*E. coli* (Jormakka *et al.*, 2002)

Tableau 1.3 – Réaction catalysées par les enzymes à Mo et W, et substrats connus

Réaction	Type de substrat	Exemples
Transfert d'atome d'oxygène	Oxyanions	Nitrate réductase Sulfite oxydase Arsénite oxydase Arséniate réductase Séléniate réductase [Per]chlorate réductase
	Oxydes organiques	TMAO réductase DMSO réductase Biotine sulfoxyde réductase
Hydroxylation	Oxydes de carbone	Complexe mitochondrial de réduction d'amidoximes Formylméthanolurane déshydrogénase CO déshydrogénase
	Hétérocycles aromatiques	Xanthine oxydase Isoquinoline-1-oxydoréductase Nicotinate déshydrogénase
Transfert d'atome de soufre	Aldéhydes	Aldéhyde oxydoréductase
	Hydrocarbures	Éthylbenzène déshydrogénase
Autres	Polysulfure	Polysulfure réductase
	Oxydes de soufre	Thiosulfate réductase Tétrathionate réductase
Hydratation		Acétylène hydratase
Abstraction d'hydrure		Formiate déshydrogénase
Transhydroxylation		Pyrogallol – phloroglucinol transhydroxylase
Réduction de BIRCH		Benzoyl-CoA réductase

1.1.3.2 Fonctions physiologique et physiopathologique

Catabolisme et détoxification

Chez les animaux, les enzymes à molybdène ont essentiellement un rôle catabolique et de détoxification : elles participent à la dégradation de molécules endogènes ou exogènes avant leur excrétion, pour éviter leur accumulation.

Chez tous les être vivants, la xanthine déshydrogénase (XDH) catalyse la transformation de l'hypoxanthine en xanthine, puis de la xanthine en acide urique. Chez l'homme, la xanthine déshydrogénase est surtout active dans le foie et les poumons. Sa localisation subcellulaire n'est pas complètement élucidée (Mendel et Bittner, 2006). Plus récemment, il a été montré que la XDH peut produire de l'oxyde nitrique par réduction du nitrite, ce qui pourrait donner un rôle supplémentaire à cette enzyme, étant donnée l'importance physiologique du NO (Maia et Moura, 2011).

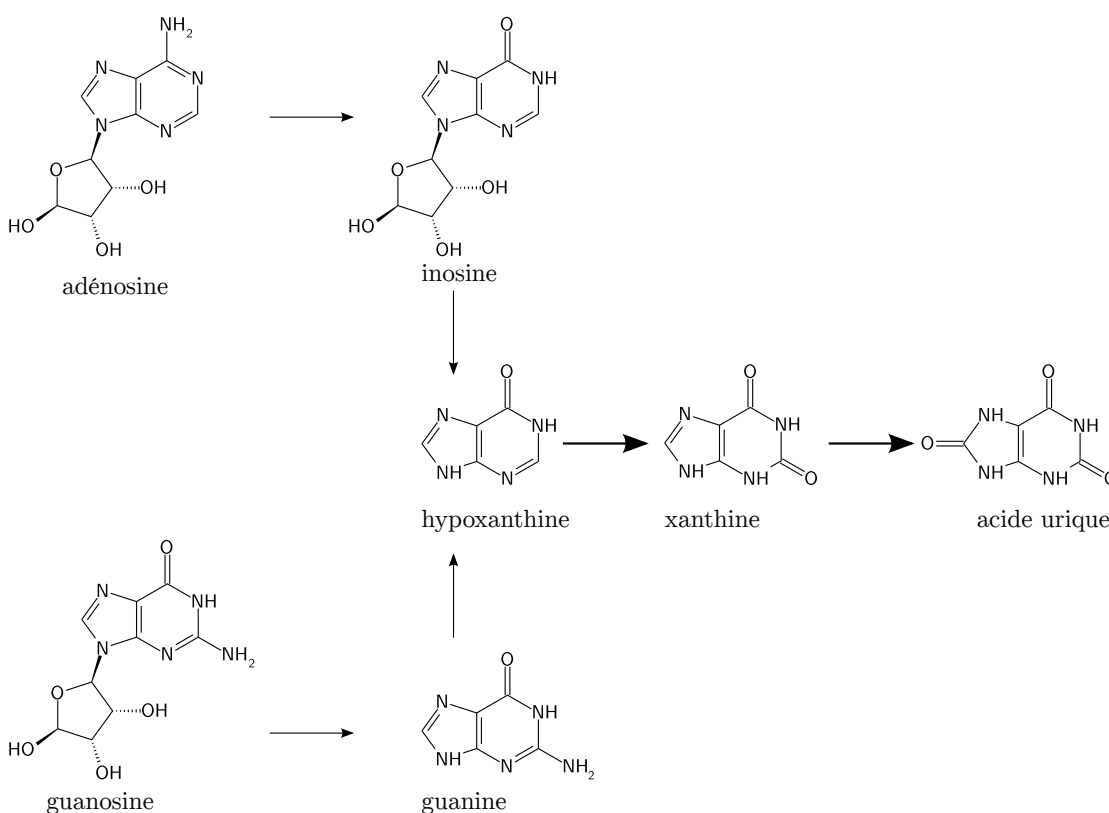


Schéma 1.10 – Voies de dégradation de l'adénosine et de la guanosine. Les flèches en gras montrent les réactions catalysées par la xanthine déshydrogénase

Récemment a été identifié chez l'homme une enzyme appelée complexe mitochondrial de réduction d'amidoximes (mARC) (Wahl *et al.*, 2010). Le rôle de cette protéine semble être de réduire les bases nucléiques N-hydroxylées, potentiellement mutagènes (schéma 1.11), mais elle semble également réguler la production de NO, par réduction de la N^{ω} -hydroxy-L-arginine, qui est un intermédiaire de la biosynthèse du NO. L'activité de cette enzyme a aussi un impact pharmacologique, car certains médicaments portent une fonction amidoxime (Mendel et Bittner, 2006).

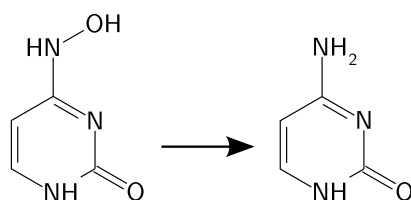


Schéma 1.11 – Exemple de réaction catalysée par les mARC : réduction de la N-hydroxycytosine en cytosine

L'oxydation du sulfite en sulfate est la dernière étape du catabolisme des acides aminés soufrés. Chez les animaux, l'enzyme est localisée dans l'espace intermembranaire des mitochondries. Chez les plantes, la sulfite oxydase est retrouvée dans les peroxysomes, et pourrait avoir un rôle de détoxication en cas d'excès de composés soufrés ou de SO_2 atmosphérique (Mendel et Bittner, 2006). La sulfite oxydase aviaire (*G. gallus*), végétale (*A. thaliana*) et humaine sont les mieux caractérisées, mais l'enzyme est également retrouvée chez de nombreux procaryotes (*S. novella*). Une déficience génétique en sulfite oxydase est létale au bout de quelques semaines de la vie du nouveau-né.

Chez les eucaryotes, d'autres molybdo-flavo-enzymes sont présentes en plus de la xanthine oxydase. Ces enzymes sont dénommées « aldéhyde oxydases », mais elles possèdent un large spectre de substrats, et leur fonction biologique est encore débattue. À l'instar de la xanthine oxydase, elles insèrent un atome d'oxygène dans la liaison $\text{C}^\alpha\text{-H}$ d'aldéhydes et d'hétérocycles aromatiques. L'enzyme, de par la présence de FAD, possède également une activité NADH oxydase qui génère du superoxyde (Kundu *et al.*, 2012). Le rétinol est un substrat endogène connu chez l'homme. De nombreux médicaments et autres xénobiotiques sont des substrats ou des inhibiteurs de la seule isoforme présente chez l'homme.

Chez les procaryotes, l'oxydation des aldéhydes permet de générer du NADH, et est assurée par des enzymes d'où le domaine FAD est parfois absent, comme chez *Desulfovibrio gigas* (Romão *et al.*, 1995). Chez les procaryotes, on trouve des enzymes de type aldéhyde oxydase qui hydroxylent des hétérocycles aromatiques : par exemple, la quinoline 2-oxydase de *Pseudomonas putida* 86 catalyse la première étape qui permet à la bactérie de croître avec la quinoline comme seule source de carbone (Bonin *et al.*, 2004).

Assimilation

Les substrats carbonés des enzymes à molybdène et tungstène sont des composés à un C (HCOO^- et CO_2), l'acétylène (C_2H_2), ou des hydrocarbures aromatiques (hydroxybenzoate) qui sont souvent rejetés dans l'environnement par les activités humaines.

Le formiate est utilisé comme donneur d'électrons dans le métabolisme anaérobie chez les micro-organismes. Son oxydation donne du CO_2 . Dans cette filière énergétique, le formiate ne sert pas de source de carbone mais seulement d'électrons.

Plusieurs enzymes à molybdène et tungstène impliquées dans l'assimilation de composés hydrocarbonés sont connues et ont été caractérisées ou cristallisées : acétylène hydratase (Seiffert *et al.*, 2007), monoxyde de carbone déshydrogénase (Dobbek *et al.*, 2002), 4-hydroxybenzoyl-CoA réductase (Boll *et al.*, 2001), éthyl-

benzène déshydrogénase (Kloer *et al.*, 2006), etc. Si ces protéines sont classées dans les familles de la xanthine oxydase ou de la DMSO réductase, elles possèdent des caractéristiques structurales assez singulières (cofacteur supplémentaire, canal de diffusion additionnel, etc). Les micro-organismes dont ont été isolées les enzymes décrites ci-après peuvent souvent croître avec ces seuls composés comme source d'électrons et de carbone, par respiration anaérobie ou fermentation.

Rôle bioénergétique

Chez les bactéries et les archées, les enzymes à molybdène sont impliquées dans des processus dissimilatoires, assimilatoires et respiratoires². Elles jouent ainsi un rôle bio-énergétique.

Les filières de synthèse de l'ATP Toutes les cellules vivantes doivent produire de l'ATP (adénosine triphosphate) pour vivre. L'hydrolyse de l'ATP en ADP (adénosine diphosphate) est la réaction exergonique qui permet de rendre thermodynamiquement possible des réactions biochimiques vitales, de sorte que la phosphorylation continue de l'ADP est requise pour la vie d'une cellule. Trois filières énergétiques permettent de régénérer l'ATP : la *respiration*, la *photosynthèse* et la *fermentation*. Ces filières peuvent coexister chez une espèce donnée.

La fermentation est la moins efficace des trois. La production d'ATP y est couplée à la dégradation de composés réduits du carbone (sucres, lipides) en composés moins réduits (éthanol, acide lactique, acétique) et CO₂. Dans la respiration et la photosynthèse, la phosphorylation de l'ADP est assurée par une ATP synthase. Il s'agit d'une grande protéine membranaire dont la force motrice est un différentiel de pH de part et d'autre d'une membrane. La phosphorylation y est couplée à l'efflux d'ion H⁺ du côté le plus concentré vers le côté le moins concentré.

Chez l'homme, la respiration est dite *oxygénique* : elle couple l'oxydation des sucres à la réduction du dioxygène. La respiration oxygénique est très « rentable » : En effet, le nombre de phosphorylations possibles par électron transféré dépend de la différence entre les potentiels standard des donneurs et accepteurs d'électrons ($E'_{\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}} = +820 \text{ mV}$; $E'_{\text{NAD}^+/\text{NADH}} = -330 \text{ mV}$).

Substrats respiratoires Chez les micro-organismes, de nombreux autres accepteurs d'électrons, peuvent être exploités pour respirer en l'absence d'oxygène. Parmi ceux-ci, on trouve de nombreux *oxydes*. Les plus courants sont des oxydes d'azote et de soufre : triméthylamine-*N*-oxyde, diméthylsulfoxyde, nitrate, nitrite, sulfate, et sulfite ; mais la réduction du nitrite, du sulfate et du sulfite ne sont pas catalysées par des enzymes à molybdène. Le TMAO est un composé présent chez animaux aquatiques. Son rôle présumé est de servir comme osmolyte et de stabiliser les protéines. Il permettrait ainsi la vie à des pressions importantes. Le DMSO aurait un rôle de cryoprotection chez les algues et le phytoplancton. Une autre source de DMSO est l'atmosphère, où le DMS est photo-oxydé. Le DMS provient en partie de la dégradation du DMSP (diméthylsulfonium propionate), qui est également un osmoprotectant et cryoprotectant chez les algues.

2. Un processus est dit *respiratoire* lorsqu'il couple la réduction d'un composé à la translocation de proton du cytoplasme vers le périplasme, et *dissimilatoire* lorsqu'une telle translocation n'a pas lieu, la réaction ayant pour effet de dissiper des équivalents réducteurs.

Le dioxyde de carbone, lui, sert d'accepteur d'électrons seulement chez les archées méthanogènes, et sa réduction peut être par des enzymes à molybdène ou tungstène (Karrasch *et al.*, 1990). On trouve également parmi les accepteurs d'électrons l'arséniate (AsO_4^{3-}), le séléniate (SeO_4^{2-}), le perchlorate (ClO_4^-) et le chlorate (ClO_3^-) qui peuvent se trouver en quantité non négligeable dans certains milieux, du fait ou non d'activités humaines.

Donneurs d'électrons Les enzymes à molybdène jouent aussi un rôle essentiel du côté oxydatif de la chaîne de transfert d'électrons. Ainsi le formiate, les aldéhydes et des oxydes comme le nitrite (NO_2^-), l'arsénite (H_3AsO_3) ou le sulfite (HSO_3^-) peuvent servir de source d'électrons.

1.1.3.3 Impact écologique des enzymes à molybdène

Le cycle de l'azote

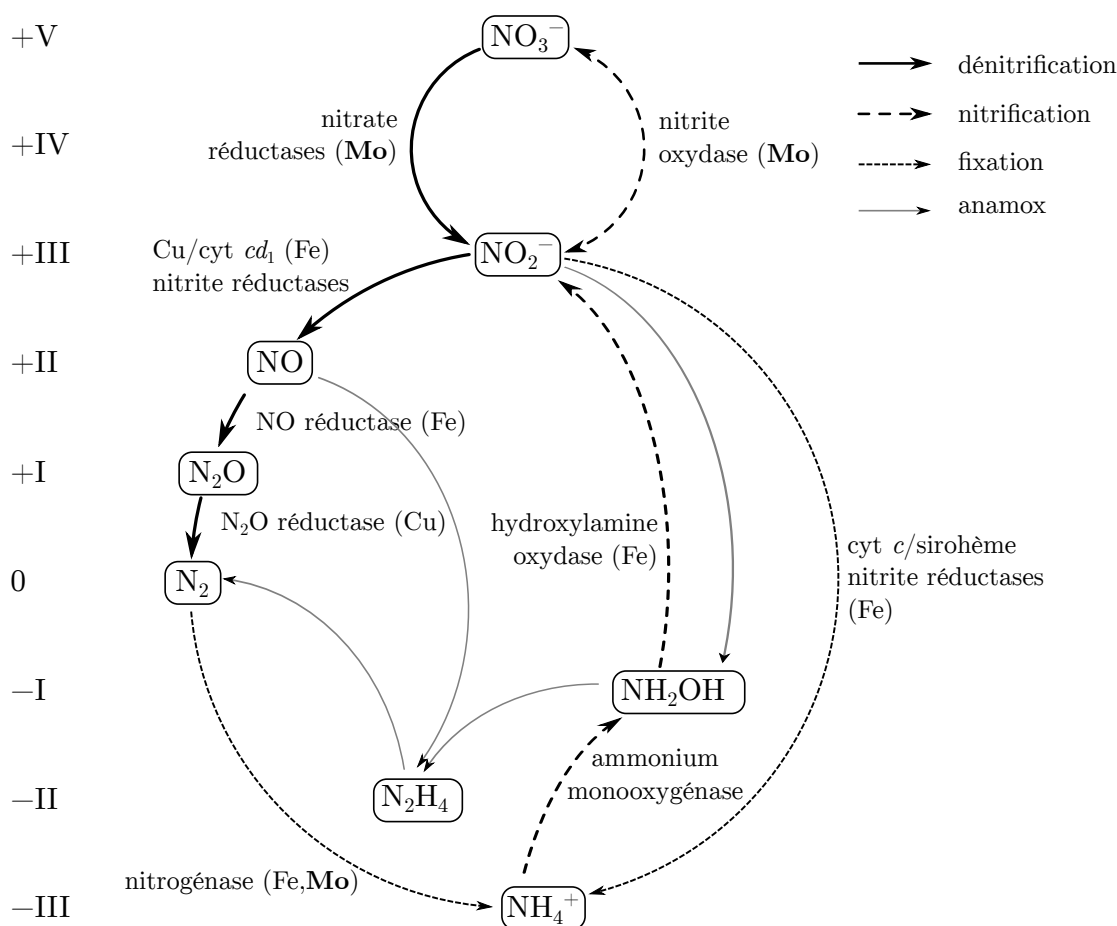


Schéma 1.12 – Cycle de l'azote montrant les transformations catalysées par voie enzymatique. Les enzymes des voies de la respiration anaérobie du nitrite (anamox), encore mal caractérisées, ne sont pas indiquées. Les autres espèces et transformations abiotiques (atmosphériques) ne sont pas montrées.

Le cycle bio-géochimique de l'azote désigne l'ensemble des transformations que subissent les composés de l'azote, du degré d'oxydation -III (ammoniac, azote

« organique ») au degré +V (nitrate). Les espèces les plus stables de ce cycle sont le diazote, l'azote organique, et le nitrate.

Le schéma 1.12 montre les flux des espèces azotées inorganiques générés par les êtres vivants. Schématiquement, les animaux n'assimilent et n'excrètent que l'azote -III. Les végétaux, les micro-organismes sont capables d'assimiler aussi l'azote à partir du nitrate. Les bactéries et les archées assurent l'essentiel des flux dans le cycle bio-géochimique de l'azote. La fixation de l'azote atmosphérique est l'œuvre exclusive des fixateurs d'azote (*Azotobacter*). Les enzymes à molybdène interviennent à deux étapes du cycle de l'azote : dans les nitrogénases pour la fixation du diazote atmosphérique, dans les nitrate réductases, ainsi que dans les nitrite oxydoréductases.

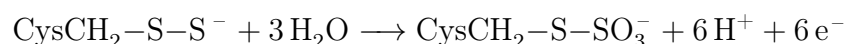
Sur le schéma 1.12, on voit que l'ion *nitrite* est une sorte de plaque tournante des espèces azotées en milieu biologique. Il est le substrat des processus de dénitrification (conversion en diazote), d'assimilation et de respiration.

Le nitrate est le précurseur de la chaîne de dénitrification et d'assimilation, et le produit final des processus de nitrification. Sa particularité est sa mobilité. L'ion nitrate est très soluble et relativement inerte. En solution diluée à pH neutre, sa réduction ou sa précipitation par des procédés chimiques représentent encore un défi (Fanning, 2000) bien qu'il soit un oxydant de haut potentiel ($E'_{\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-} = 420 \text{ mV}$ à pH 7).

L'acide nitrique est produit dans l'atmosphère à partir notamment de la dismutation du NO_2 . Industriellement, il est préparé par oxydation de l'ammoniac par le dioxygène, sur un catalyseur au platine (procédé OSTWALD). Les nitrates entrent dans la composition d'engrais, de conservateurs alimentaires, d'explosifs. L'acide nitrique sert massivement dans le cycle des combustibles nucléaires. La nocivité du nitrate est due à sa réduction en nitrite *in vivo*. Le nitrite est responsable de l'oxydation de l'hémoglobine en méthémoglobine, qui ne peut plus transporter le dioxygène, ainsi que de la formation d'espèces réactives carcinogènes (nitrosamines, peroxydite, NO.)

Composés du soufre

Le cycle bio-géochimique du soufre est plus complexe que celui de l'azote. Le soufre oscille entre l'état -II (sulfures) et l'état +VI (sulfates). On trouve des enzymes à molybdène dans l'oxydation du sulfite (sulfite déshydrogénase), et dans la conversion entre $\text{S}^{-\text{II}}$ et S^0 (thiosulfate réductase, polysulfure réductase, tétrathionate réductase). À noter que chez la bactérie *P. pantotrophus* SoxCD oxyde son substrat (une cystéine persulfurée) de six électrons, en transférant trois atomes d'oxygène :



Métalloïdes et halogènes

Plusieurs éléments métalloïdes toxiques sont trouvés dans certains sols pollués. Il s'agit principalement du sélénium, du tellure et de l'arsenic. Ceux-ci sont retrouvés sous forme d'oxyanions ou hydroxydes.

Quelques micro-organismes sont capable de tirer de l'énergie de ces anions. La bactérie *Thauera selenatis* produit une séléniate réductase périplasmique (Dridge

et al., 2007; Kengen *et al.*, 1999). Chez les bactéries dénitrifiantes, la nitrate réductase périplasmique est responsable de la résistance au séléniate (Sabaty *et al.*, 2001). Elle permet de réduire celui-ci en sélénite, qui est à son tour réduit en sélénium élémentaire, mais par une voie qui reste à élucider.

1.2 Méthodes biophysiques pour l'étude des enzymes à molybdène et tungstène

1.2.1 Cristallographie

La cristallographie est une technique reine en biologie structurale. Dans le cas des protéines, elle révèle des éléments souvent impossible à prédire, comme la structuration de la chaîne polypeptidique en hélices, feuilletts et boucles, le repliement de ces éléments et la connexion spatiale entre des domaines disjoints de la chaîne. Elle permet de repérer les résidus qui composent le site actif, ainsi que les résidus périphériques, impliqués dans les interactions entre biomolécules. La structure cristallographique est un important point de départ pour la compréhension du fonctionnement d'une enzyme, pour orienter la mutagenèse dirigée, pour l'interprétation des observations spectroscopiques. Le repliement (fold) d'une protéine est également un élément de comparaison et/ou classification entre divers systèmes, qui complète la simple donnée de la séquence primaire (Workun *et al.*, 2008; Schoepp-Cothenet *et al.*, 2012; Rothery *et al.*, 2012).

La première structure aux rayons X d'une enzyme à W/Mo fut celle d'une enzyme à tungstène qui a permis, entre autres, de déterminer la structure tricyclique de la pyranoptérine trouvée dans les enzymes à molybdène, là où les études des produits de dégradation concluaient à une structure bicyclique (Chan *et al.*, 1995; Rajagopalan et Johnson, 1992). La diffraction des rayons X a permis d'exhiber le centre fer-soufre proximal (FS0) de la nitrate réductase membranaire. La coordination de cet agrégat comprend une histidine à la place d'une cystéine, ce qui modifie son état de spin. Il n'avait ainsi pas été repéré auparavant par spectroscopie RPE (Bertero *et al.*, 2003; Rothery *et al.*, 2004).

Limitations de la cristallographie des protéine à molybdène Le premier problème du biologiste structural est de trouver des conditions pour la croissance des cristaux de protéine. Le monocristal isolé, la qualité des données de diffraction n'est pas assurée. Plusieurs caractéristiques du système étudié peuvent limiter la résolution globale ou locale.

Les métalloprotéines sont des assemblages de dizaines de milliers d'atomes, dont la structure est intrinsèquement plastique, même pour une métalloprotéine. Certains domaines ou boucles, peuvent être intrinsèquement désordonnés, c'est à dire qu'ils ne gardent pas une conformation figée au cours du temps. La figure de diffraction est très sensible à la dispersion des conformations. La résolution globale d'une protéine est rarement meilleure que 1 Å, qui est un niveau de détail atomique. En deçà, distinguer entre deux atomes de numéro atomique proche (C, N, O) devient plus délicat.

Les positions des atomes d'hydrogène ne sont pas connues par cristallographie,

parce que la faible densité électronique de ces atomes les rend quasiment indétectables. Leurs positions peuvent être déduites grâce à la géométrie des liaisons, et l'arrangement relatif des molécules pour le cas des liaisons hydrogène.

Les métalloprotéines possèdent leur propres atomes lourds, ce qui peut faciliter l'analyse des données de diffraction. Mais des données de diffraction incomplètes peuvent entraîner des artefacts dans la carte de densité électronique. L'identification des atomes liés au métal et la détermination des longueurs de liaison est alors délicate.

Les rayons X interagissent avec les électrons de cœur des atomes. La quantité de photons absorbée est faible, mais ceux-ci ionisent la matière, ce qui résulte en une photoréduction ou photooxydation des centres. Des modifications structurales sont alors susceptibles d'apparaître à mesure que le cristal est irradié (Weik *et al.*, 2000; Yano *et al.*, 2005).

Le cas de la DMSO réductase soluble est un exemple d'une succession de méprises et révisions, dues à la superposition de signaux ou à la faible résolution des structures cristallographiques : Les trois premières structures cristallographiques des DMSO réductases de *Rhodobacter sphaeroides* (anciennement *Rhodospseudomonas sphaeroides*) et *R. capsulatus* donnent à voir plusieurs structures différentes, représentées sur le schéma 1.13.

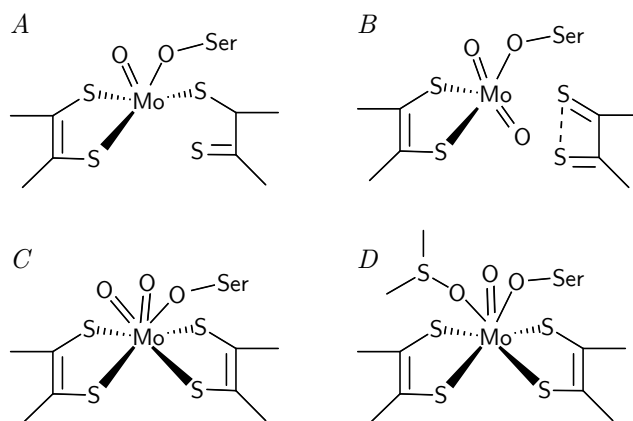


Schéma 1.13 – Représentations de la coordination du Mo déterminées par cristallographie. *A* : Mo^{VI} hexacoordiné avec la ptérine Q est sous la forme thiol–thione, partiellement décoordinée (Schindelin *et al.*, 1996) ; *B* : Mo^{VI} coordonné par deux oxo, avec la ptérine Q dissociée et une liaison partielle entre les atomes de soufre (Schneider *et al.*, 1996) *C* : Le Mo^{VI} heptacoordiné, avec deux oxo (McAlpine *et al.*, 1997). *D* : Le Mo^{IV} heptacoordiné, en complexe avec le DMSO (McAlpine *et al.*, 1998).

L'hétérogénéité du site actif a finalement été révélée grâce à une structure à haute résolution (1,3 Å), qui a été interprétée comme la superposition d'une forme hexacoordinée et d'une forme pentacoordinée, où le dithiolène Q (η^2) est remplacé par un oxo (η^1). Ces travaux ont mis en lumière les problèmes posés par l'hétérogénéité de structures et ont permis de résoudre les questions en suspens sur la structure du site *actif* (Li *et al.*, 2000).

1.2.2 Spectroscopies d'absorption des rayons X

Cette famille de spectroscopies repose non pas sur la diffusion des rayons X, mais sur leur absorption par les atomes, impliquant les électrons de cœur ($n = 1, 2$). Si l'énergie du rayonnement est suffisante, un électron peut être éjecté de l'atome et être diffusé par les atomes voisins. Ce phénomène donne lieu à un seuil, dans l'absorption de l'échantillon. La *position* de ce seuil correspond à l'énergie de l'orbitale qu'occupait l'électron éjecté, et dépend de la valence du métal.

Le signal obtenu pour des énergies proches du seuil (XANES, X-ray absorption near-edge structure) reflète les transition internes à l'atome et renseigne sur l'énergie des orbitales de cœur, et sur le degré de covalence des liaisons. Les modulations observées pour des énergies supérieures au seuil (EXAFS : extended X-ray absorption fine structure) sont dues aux atomes voisins qui rétrodiffusent le photo-électron. Cette structure post-seuil donne des indication sur ces atomes proches (première, voire seconde sphère de coordination) (*cf* figure 1.7).

La technique est applicable sur un échantillon désordonné, en solution, et est sélective d'un élément donné. L'absorption des rayons X donne des indications sur la structure électronique globale de l'atome et permet de déterminer sans ambiguïté le degré d'oxydation d'un métal. L'EXAFS peut donner les distances métal – ligand avec une précision de $0,1 \text{ \AA}$. Elle ne donne cependant pas d'information sur les angles. Le molybdène se prête bien à ce type de spectroscopie, ses énergies étant bien séparées de celles des éléments légers. Son seuil K se situe vers 20 keV .

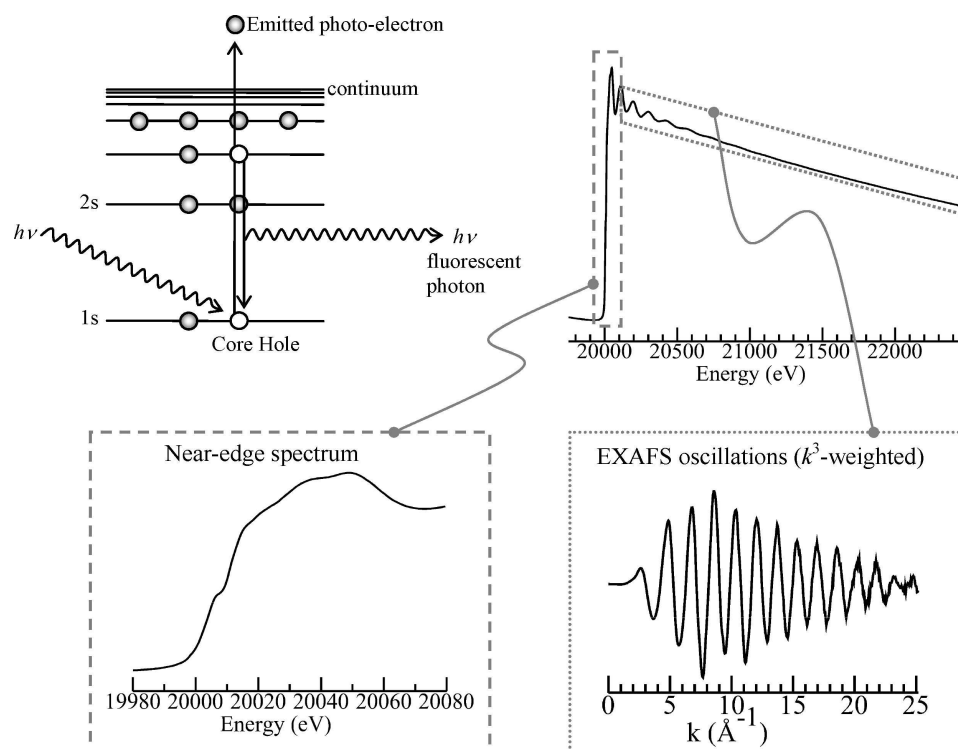


Figure 1.7 – Principes de la spectroscopie d'absorption des rayons X appliquée au molybdène (Pushie, 2011)

L'élargissement du seuil K du molybdène, dû au temps de vie de l'état excité, ainsi que le mélange de plusieurs espèces (états d'oxydation, coordination différente)

dont les signaux se superposent, brouillent les spectres. La difficulté réside alors dans l'interprétation des données expérimentales. Les seuils d'absorption des états Mo^{IV} , Mo^{V} et Mo^{VI} sont très proches. Avec cette méthode, distinguer entre deux ligands de numéro atomique proche (O/N/C ou S/Cl) est délicat. Il faut enfin garder à l'esprit les énergies et les processus mis en jeu : la photo-oxydation du centre est envisageable pour des temps d'irradiation longs. Le contrôle de l'intégrité de l'échantillon par une autre méthode (RPE, UV-visible, activité enzymatique) est rarement rapporté dans ces études.

1.2.3 Spectroscopies d'absorption électronique

La spectrophotométrie UV-visible ainsi que la spectroscopie de dichroïsme circulaire sont utilisées classiquement pour doser les protéines, contrôler leur pureté, leur structuration et identifier leurs cofacteurs. Le dichroïsme circulaire couplé à la potentiométrie peut être appliqué à la caractérisation des centres fer-soufre (Porras et Palmer, 1982) Les hèmes sont intensément colorés et peuvent être caractérisés par leur absorption UV-visible. La sensibilité de la technique permet des application en cinétique enzymatique. Les spectroscopies UV-visible sont délicates à appliquer aux centres à molybdène mononucléaires. Les nombreux centres redox — agrégats fer-soufre notamment — ont des coefficients d'extinction plus élevés ($\simeq 20\,000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ contre $2000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$) que ceux des centres à molybdène, dont les bandes sont masquées. Seuls les systèmes où le cofacteur à molybdène est le seul chromophore présent se prêtent aux études par spectrophotométrie. Il s'agit, par exemple, de la DMSO réductase périplasmique de *R. capsulatus* (Benson *et al.*, 1992).

1.2.4 Spectroscopies de résonance paramagnétique électronique

La RPE repose sur l'absorption d'un rayonnement micro-onde par un échantillon paramagnétique placé dans un champ magnétique. Le champ magnétique provoque une levée de dégénérescence des niveaux d'énergie des électrons non-appariés, ce qui permet d'observer des transitions. Les cofacteurs redox (métaux de transition, agrégats métalliques, flavines, ptérines, etc) possèdent souvent au moins un degré d'oxydation paramagnétique. Ils sont des centres *magnétiquement dilués*. La spectroscopie RPE va alors donner des informations sur la structure locale de chaque centre. La forme des spectres est très sensible à la géométrie.

1.2.4.1 Apports

La spectroscopie de résonance paramagnétique électronique est une technique de choix pour étudier les métaux de transition dans les protéines. Au degré d'oxydation +V, le molybdène et le tungstène ont une configuration électronique nd^1 et portent donc un spin électronique $S = 1/2$, ce qui rend ces états très facilement détectables par RPE. La technique est apparue en 1945, et les premières études sur la xanthine oxydase datent de 1959 (Bray *et al.*, 1959).

La forme des spectres dépend fortement de la sphère de coordination du métal. Elle donne des informations sur la symétrie locale, le nombre et la nature des

ligands, la covalence des liaisons. La résolution des éclatements de raies dus au couplage avec les noyaux paramagnétiques voisins permet de préciser la structure de l'espèce paramagnétique observée

Enrichir un échantillon avec un isotope est une stratégie permettant d'identifier un atome. L'enrichissement isotopique d'un échantillon peut permettre de préciser une structure. Dans le cas des enzymes à molybdène, l'enrichissement en ^{98}Mo ($I = 0$) est une stratégie pour simplifier un spectre (Luykx *et al.*, 1998), tandis que l'enrichissement en ^{95}Mo ($I = 5/2$) donne des spectres Mo^{V} où les couplages hyperfins sont plus simples à mesurer. Cette dernière stratégie a été appliquée à la xanthine oxydase (Bray et Meriwether, 1966; George et Bray, 1988) ou encore la nitrate réductase membranaire (Vincent et Bray, 1978). Ces deux options sont actuellement exploitées dans l'équipe de Biophysique des Métalloprotéines dans l'étude du site actif de la nitrate réductase membranaire NRA de *E. coli* (Ceccaldi, 2013). L'enrichissement de l'aldéhyde ferrédoxine oxydoréductase à tungstène avec l'isotope ^{183}W ($I = 3/2$) a également été utilisé pour attribuer sans ambiguïté une signature RPE à une espèce W^{V} (Koehler *et al.*, 1996). Les principaux noyaux environnants observés dans les protéines sont les noyaux d'hydrogène ^1H (99,9885 %, $I = 1/2$), d'azote (99,632 % ^{14}N , $I = 1$). Le plus couramment, la substitution de l'eau du solvant par de l'eau lourde (D_2O) permet d'identifier les atomes d'hydrogène « échangeables ». On entend par là un échange avec le solvant, qui se produit pour les atomes d'hydrogène labiles portés par les hétéroatomes. L'abondance naturelle des isotopes magnétiques du soufre (0,76 % ^{33}S , $I = 3/2$) ou de l'oxygène (0,038 % ^{17}O , $I = 5/2$) est trop faible pour pouvoir être détectée et nécessite un enrichissement spécifique.

1.2.4.2 Spectroscopies hyperfines

Lorsque l'amplitude de l'interaction magnétique entre un électron et un noyau est inférieure à la largeur de la raie RPE, on peut avoir recours à des méthodes hyperfines, qui détectent les transitions *nucléaires*. L'ENDOR, « electron–nucleus double resonance », consiste à induire les transitions nucléaires par un rayonnement de radiofréquences, et à détecter cette transition *via* le signal RPE. Si les fréquences de transition nucléaires sont basses (≤ 5 MHz), l'effet ESEEM, « electron spin echo envelope modulation », est plus adapté. Les fréquences nucléaires sont obtenues après transformation de FOURIER du signal temporel obtenu par RPE pulsée. Des techniques bidimensionnelles comme l'ESEEM-HYSCORE (« hyperfine sublevel correlation ») permettent de simplifier l'analyse de systèmes avec plusieurs noyaux.

La limitation évidente de la RPE est qu'elle ne s'applique qu'aux systèmes paramagnétiques. Les états Mo^{IV} ou Mo^{VI} sont silencieux. La détermination de la structure à partir d'un spectre n'est pas immédiate, et demande souvent des informations complémentaires.

1.2.5 Méthodes électrochimiques

Potentiométrie La potentiométrie à courant nul couplée à la spectroscopie est une technique « classique » de caractérisation des protéines redox. Dans un titrage potentiométrique, la protéine est oxydée ou réduite chimiquement, le potentiel de la solution est alors mesuré et les centres sont caractérisés par spectroscopie

(RPE, UV-visible ou CD). Cela permet notamment à attribuer à chaque centre son potentiel de demi-réduction, qui est le potentiel pour lequel la moitié des centres sont réduits, pourvu que celui-ci soit indépendant et discernable ceux des autres centres.

Électrochimie directe et médiée La grande majorité des enzymes à molybdène catalyse une réaction d'oxydoréduction. La réaction peut donc être entraînée par une électrode placée au potentiel adéquat.

La technique conceptuellement la plus simple est l'électrochimie directe, où l'enzyme échange *directement* des électrons avec l'électrode. Cela requiert de l'y adsorber dans une position qui permet le transfert direct, mimant l'interaction avec le partenaire physiologique (Léger et Bertrand, 2008). Le courant enregistré résulte des transferts entre la protéine et le substrat, ce qui permet d'étudier la réactivité du site actif en fonction notamment du temps et du potentiel.

Un obstacle à l'électrochimie des protéines est la vitesse de transfert d'électrons avec ces macromolécules. Dans le cas où les protéines sont immobilisées sur une électrode sans transfert direct d'électrons, ou lorsqu'elles sont en solution, il est nécessaire d'utiliser des médiateurs électrochimiques : on parle d'électrochimie médiée (Limoges *et al.*, 2002).

Microcoulométrie La coulométrie consiste à pratiquer une électrolyse de la solution de protéine et à mesurer la quantité d'électricité consommée. Dans un titrage coulométrique, la quantité d'électricité est mesurée à différents potentiels. Cette méthode permet de compter le nombre d'équivalents réducteurs que peut accepter une protéine, et à quels potentiels ceux-ci sont transférés. Des titrages coulométriques ont été rapportés sur la xanthine oxydase, la nitrate réductase végétale et la sulfite oxydase (Spence *et al.*, 1982; Spence *et al.*, 1988; Spence *et al.*, 1991).

1.3 Mécanismes enzymatiques

1.3.1 Xanthine oxydase

Dans la xanthine oxydase, l'environnement du site à molybdène est composé de résidus très conservés : deux phénylalanines, deux glutamates et une arginine . D'après les structures cristallographiques, le substrat (ou son analogue) est intercalé entre les deux noyaux aromatiques des phénylalanines, tandis que l'un des résidus glutamate et l'arginine le stabilisent par liaison hydrogène. L'autre glutamate fait face au ligand hydroxo. Il sert de base de BRØNSTED dans le cycle catalytique (Okamoto *et al.*, 2004). L'atome d'oxygène incorporé sur le substrat provient d'un ligand du molybdène, et il a été montré que c'est le ligand hydroxo équatorial qui est donné au substrat (Doonan *et al.*, 2005). Le glutamate déprotone le ligand hydroxo, qui va attaquer l'atome de carbone électrophile du substrat (voir schéma 1.14). Il se produit un *transfert d'hydrure* vers le ligand thio, donnant un complexe enzyme réduite – urate (dans le cas où le substrat est la xanthine) (Huber *et al.*, 1996; Stockert *et al.*, 2002). Ce complexe est alors hydrolysé : le produit est remplacé par

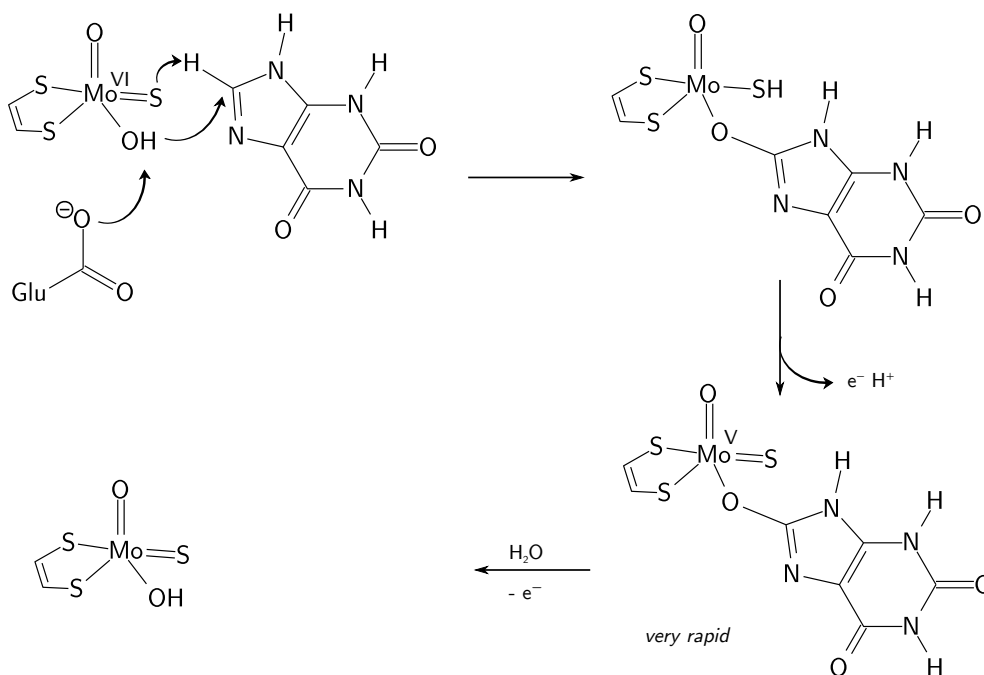


Schéma 1.14 – Mécanisme accepté pour l'oxydation de la xanthine en acide urique, faisant apparaître l'espèce Mo^{V} « very rapid »

un ligand hydroxo. Les électrons sont évacués du site actif vers les autres centres redox.

Historiquement, la xanthine oxydase est la première enzyme à molybdène à avoir été étudiée par RPE, par le groupe de BRAY (Bray *et al.*, 1959). Les études du mécanisme par RPE ont profité sur l'utilisation de techniques de cinétique rapide (rapid-freeze quench) et d'analogues du substrats, qui sont transformés lentement ou qui inhibent l'enzyme (alloxanthine, 2-hydroxy-6-méthylpurine).

L'enzyme « as prepared » est oxydée et ne montre pas de signal RPE. Lors de la réduction de celle-ci par la xanthine, plusieurs espèces Mo^{V} peuvent être observées selon la durée de la réaction. On distingue ainsi le signal Mo^{V} « very rapid » des signaux « rapid », et « slow ». Parmi ces signaux, seul le signal « very rapid » relève d'une espèce du cycle catalytique. L'espèce qui donne ce signal correspond au complexe enzyme – produit oxydé d'un électron, et d'un proton (schéma 1.14). Avec la 2-hydroxy-6-méthylpurine, le signal « very rapid » s'accumule pendant près de trente secondes (McWhirter et Hille, 1991). Les études par ENDOR sur le signal « Very rapid » ont exclu toute liaison entre le Mo et l'atome de carbone (Manikandan *et al.*, 2001). Les espèces Mo^{V} « rapid » se forment lors de la réoxydation du Mo^{IV} en présence du *substrat* non coordonné. Elles présentent des couplages hyperfins avec des protons et correspondent à une sphère de coordination de formule $\text{MPTMoO}(\text{SH})(\text{OH})^3$. Il est supposé que ces espèces émanent d'enzymes ayant déjà oxydé une molécule de substrat. Bien qu'elles n'appartiennent pas au cycle catalytique, elle sont vues comme des analogues du complexe de MICHAELIS enzyme oxydée – substrat (Hille *et al.*, 1993).

L'espèce « slow » apparaît lentement en présence d'oxygène, mais peut être

3. MPT = pyranoptérine

générée quantitativement par exposition de l'enzyme au cyanure. Il en résulte une désulfuration du molybdène avec libération de thiocyanate (Malthouse et Bray, 1980). La forme désulfurée de l'enzyme, où un oxo remplace le ligand thio, est inactive, ce qui montre le rôle essentiel du ligand thio dans l'abstraction de l'hydrure.

1.3.2 Sulfite oxydase

Dans l'enzyme oxydée, les deux centres métalliques sont à l'état hème(Fe^{III}) – Mo^{VI} . L'addition de sulfite réduit le Mo^{VI} en Mo^{IV} . Cette réaction est la « demi-réaction réductrice ». Dans la sulfite oxydase de vertébrés, le domaine hémique est relié au domaine à molybdène par une boucle de 13 ou 14 acides aminés. Le transfert d'électron intramoléculaire est donc piloté par un mouvement de domaines important. Le transfert intramoléculaire d'un électron du molybdène vers l'hème ferrique conduit à l'état Fe^{II} – Mo^{V} . Cet état, où le molybdène est le seul centre paramagnétique, s'accumule au maximum à hauteur de 0,4 spin/molécule. Pour terminer le cycle catalytique, le produit doit être libéré par hydrolyse, et un deuxième transfert électronique intramoléculaire doit avoir lieu, tandis que l'hème cède les équivalents réducteurs à l'accepteur final. *In vivo*, cet accepteur est le cytochrome *c*.

La structure cristallographique montre que le ligand oxo équatorial est celui qui s'échange pendant la réaction. Il est le plus exposé au solvant.

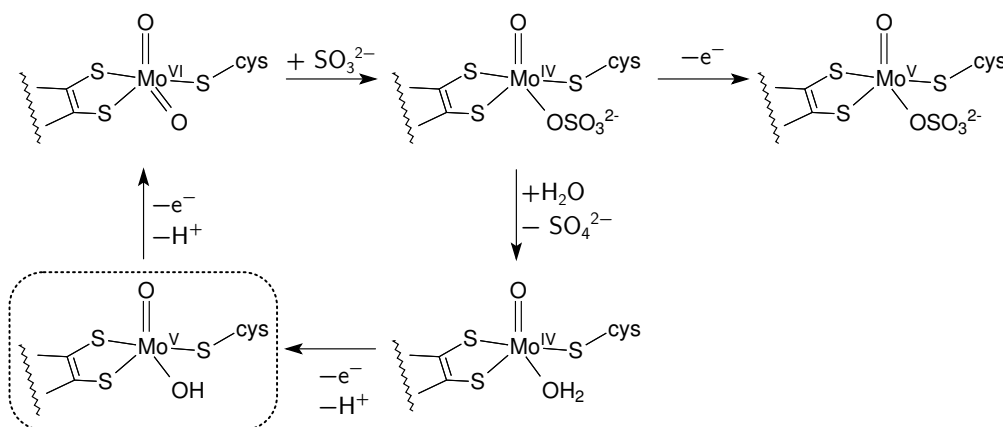


Figure 1.8 – Mécanisme de la sulfite oxydase. L'espèce Mo^{V} encadrée est formée pendant la régénération du site actif. L'espèce Mo^{V} liée au produit est une forme bloquée (Enemark *et al.*, 2008).

1.3.3 DMSO réductase

La DMSO réductase périplasmique de *R. sphaeroides* est le modèle le plus simple d'oxo-transférase à bis(PGD), n'ayant que le cofacteur à molybdène dans une protéine soluble.

Ces enzymes périplasmiques sont réduites *in vivo* par un pentacytochrome ancré à la membrane périplasmique, DorC ou TorC, respectivement. Au vu de la

structure cristallographique de ces enzymes, il a été proposé que la ptérine Q serve de chemin d'échange électronique entre le donneur externe et l'ion molybdène.

Une étude par spectroscopie RAMAN de résonance montre que les deux fonctions dithiolènes restent liées au métal aussi bien dans l'état oxydé $\text{Mo}^{\text{VI}}=\text{O}$ que dans l'état réduit Mo^{IV} . La sérine est liée au métal dans les deux cas. Deux signatures vibrationnelles distinctes sont vues pour les dithiolènes : l'une indique la forme ène-1,2-dithiolate (réduite), l'autre la forme 1,2-dithione (oxydée) (Gar-ton *et al.*, 1997). Une étude EXAFS du site actif montre le Mo^{VI} hexacoordiné ($(\text{MGD})_2\text{MoO}(\text{Ser})$) ; la réduction conduit à un état Mo^{IV} coordonné par trois ou quatre atomes de soufre, et deux ligand O différents attribués à la sérine et une molécule d'eau (George *et al.*, 1999). En 2000, BRAY et coll. montrent que le tampon HEPES déstabilise le site actif vis-à-vis du dioxygène. Il favorise la décooordination de l'un des dithiolènes, ce qui remet en cause la pertinence de la structure trouvée par SCHINDELIN (Schindelin *et al.*, 1996). Ces chercheurs montrent également que l'enzyme est plus active pour l'oxydation du diméthylsulfure (inverse de la réaction physiologique) après une procédure de « cyclage rédox » (réduction – réoxydation). L'enzyme « as prepared » est partiellement inactive, à cause des dommages oxydatifs (Bray *et al.*, 2000).

À l'instar de la sulfite oxydase, le mécanisme catalytique minimal implique une branche oxydative, où le substrat est réduit, suivie d'une branche réductive, où le site actif est réduit à un électron séquentiellement, et libère une molécule d'eau. Comme dans la sulfite oxydase, le site actif de l'enzyme est sensible aux molécules présentes en solution : dans l'une des structures cristallographiques, une molécule d'HEPES est fixée à proximité du site actif, et change la coordinence du molybdène (Bray *et al.*, 2000).

La réduction de l'enzyme avec un équivalent électronique permet d'observer un signal RPE Mo^{V} , appelé « high *g* ». Cette espèce est thermodynamiquement stable à +150 mV (Bastian *et al.*, 1991). La même espèce est obtenue par oxydation au DMSO de l'enzyme totalement réduite, mais dans des proportions sous-stœchiométriques. Lorsque l'enzyme est mise en présence d'un donneur d'électrons et de DMSO, un complexe enzyme-substrat, détecté par UV-visible, se forme très rapidement, puis décline pour faire place à la forme oxydée de l'enzyme, puis à l'espèce Mo^{V} « high *g* ». La structure de cette espèce est encore le sujet d'un vif débat. Les études par RPE et MCD ont suggéré une coordination sérinato-hydroxo (Mtei *et al.*, 2011), alors que des mesures par EXAFS ultérieures montrent un Mo^{V} pentacoordiné, le cinquième ligand étant l'hydroxo. La sérine serait donc dissociée du métal dans cet état (Pushie *et al.*, 2013).

1.4 Les nitrate réductases périplasmiques

Il existe trois types de nitrate réductase parmi les enzymes à molybdène. Chez les eucaryotes (plantes, algues, champignons), la nitrate réductase appartient à la famille de la sulfite oxydase et possède un cofacteur à Mo avec une seule ptérine (*cf* figure 1.4, page 17). Chez les procaryotes (bactéries, archées) les nitrate réductases ont un cofacteur de type Mo-*bis*(PGD). Dans les nitrate réductases membranaires (Nar), le ligand protéique est un aspartate alors que dans les nitrate réductases cytoplasmiques (Nas) et périplasmiques (Nap), le ligand protéique est une cystéine.

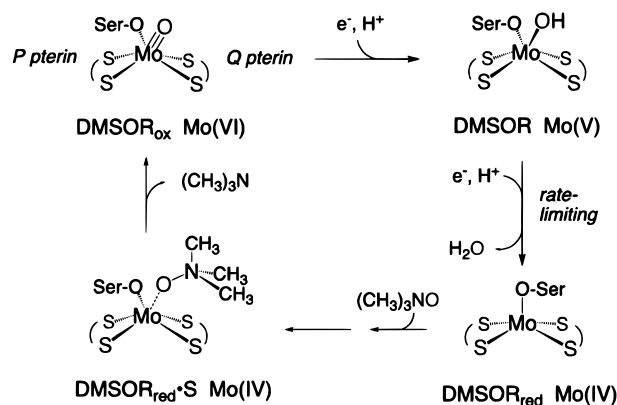
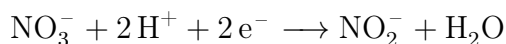


Figure 1.9 – Mécanisme de la DMSO réductase oxydée au TMAO. Une espèce paramagnétique est générée lors de la réduction séquentielle du molybdène (Mtei *et al.*, 2011).

Toutes ces enzymes catalysent la même réaction :



Cependant, leurs propriétés enzymatiques, structurales, spectroscopiques sont différentes. La nitrate réductase membranaire NarGHI de *E. coli* est un système modèle étudié en particulier dans l'équipe de Biophysique de métalloprotéines, en collaboration avec l'équipe d'Axel MAGALON (LCB). C'est une protéine ancrée à la membrane plasmique de la bactérie, orientée vers le cytoplasme. La sous-unité catalytique NarG contient un centre fer-soufre coordonné par une histidine et trois cystéines. La sous-unité NarH contient quatre clusters fer-soufre, et la protéine NarI, associée à la membrane, contient deux hèmes *b*.

Les nitrate réductases cytoplasmiques sont des monomères solubles contenant le cofacteur à molybdène et un centre fer-soufre. Le modèle de ce travail de thèse est la nitrate réductase périplasmique de la bactérie pourpre non-sulfureuse *Rhodobacter sphaeroides* forma specialis *denitrificans* IL106. Plusieurs systèmes de type Nap ont été purifiés et caractérisés à ce jour, avec plus ou moins de détail. Cette section résume les données connues actuellement sur les Nap et introduit le questionnement à l'origine de ce travail.

1.4.1 Organisation génomique des nitrate réductases périplasmiques

La nitrate réductase périplasmique est une enzyme soluble, trouvée dans l'espace situé entre la membrane interne et la membrane externe. Elle est purifiée sous forme monomérique (NapA) ou hétérodimérique (NapAB). La plus grande sous-unité, NapA, contient le cofacteur à molybdène, ainsi qu'un agrégat Fe₄S₄, et est responsable de l'activité catalytique. Chez certains organismes, comme *R. sphaeroides*, NapA est associée à une petite sous-unité de transfert d'électrons, NapB. D'autres protéines nécessaires à la production de cette enzyme sont exprimées concomitamment à NapA et NapB. Les gènes correspondants sont organisés en *opéron*. Chez *R. sphaeroides*, l'*opéron* a pour structure *napKEFDABC* (Liu *et al.*, 1999), mais ceci est plutôt une exception parmi les génomes bactérien connus. En

effet, quatre organisations distinctes se dégagent de l'analyse des génomes des protéobactéries : *napEDABC*, *napDAGHBC*, *napAGHBFLD* et *napCMDAGH*.

1.4.1.1 Chaperones et régulateurs

Les gènes *napD*, *napF* et *napL* codent pour des protéines de maturation. La protéine NapD permet l'export vers le périplasma de protéines correctement maturées et semble être absolument nécessaire à la synthèse d'une enzyme fonctionnelle. NapF, protéine cytoplasmique, contient plusieurs sites de liaison fer-soufre, et permet vraisemblablement l'insertion du cluster fer-soufre dans l'apoprotéine NapA. La fonction de NapL, elle, est inconnue. NapK est une protéine transmembranaire de 6,6 kDa particulière à *R. sphaeroides* de fonction inconnue.

1.4.1.2 Unités de transfert d'électrons

Les protéines NapB, NapC, NapH, NapG, elles, sont impliquées dans le transfert d'électrons depuis le pool des quinols membranaires vers NapA. NapB est une protéine périplasmique soluble, qui est maturée *dans le périplasma* après export par le système *sec* à travers la membrane cytoplasmique. NapC est une quinol oxydase transmembranaire contenant quatre hèmes *c*. NapG et NapH sont supposées être des ferrédoxines (protéines à centre fer soufre). NapH est une protéine membranaire dont les centres fer-soufre sont exposés du côté cytoplasmique, tandis que le domaine ferrédoxine de NapG est exposé dans le périplasma.

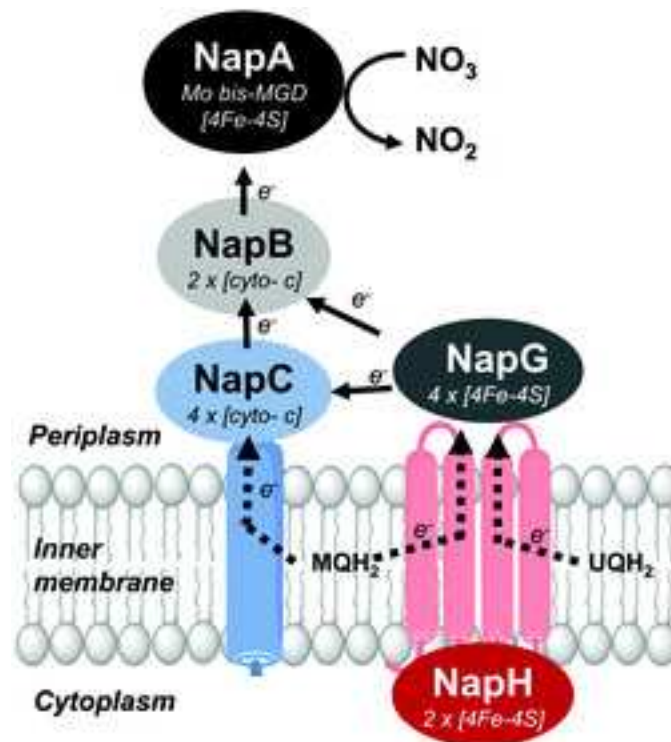


Schéma 1.15 – Chaînes possible de transfert d'électrons dans le système NAP, d'après (Sparacino-Watkins *et al.*, 2014)

La fonction physiologique de la nitrate réductase périplasmique dépend de l'organisme qui l'exprime et des conditions de croissance. Elle peut permettre la

respiration sur nitrate si elle couplée à l'oxydation du formiate. Autrement, la réaction catalysée ne permet pas d'établir un gradient de protons entre le périplasme et le cytoplasme. Lors d'une inflammation, les macrophages produisent du (NO) qui se convertit en nitrate. La respiration anaérobie sur nitrate semble être un facteur de pathogénicité chez des bactéries comme *Helicobacter pylori* ou *Campylobacter jejuni*. Une fonction importante de Nap semble la régulation redox du pool membranaire des quinols : en oxydant les quinols en surplus lors d'une croissance en conditions oxygènes, Nap assure la respiration de dioxygène en maintenant un certain taux de quinones. Leur rôle est donc de dissiper un excès d'équivalents réducteurs (excès de NADH) dans la cellule. Chez les bactérie magnétotactiques, Nap est indispensable à la synthèse de magnétite, sans que le lien moléculaire ne soit encore clairement établi (Li *et al.*, 2012; Siponen *et al.*, 2012).

1.4.1.3 Propriétés enzymatiques

L'enzyme présente une très grande spécificité pour le nitrate. Deux autres substrats ont été identifiés : le séléniate SeO_4^{2-} et le tellurite TeO_3^{2-} , qui sont cependant réduits cent fois plus lentement que le nitrate (Sabaty *et al.*, 2001). L'enzyme ne peut réduire ni le perchlorate, ni le chlorate, ni l'arséniate. Elle est également incapable d'oxyder le formiate ou le nitrite.

In vitro, les viologènes réduits sont les donneurs d'électrons les plus efficaces, et les vitesses de turnover mesurées sont de l'ordre de 200 s^{-1} . Le dithionite de sodium permet d'observer la production de nitrite avec l'enzyme dimérique *P. pantotrophus* ou *R. sphaeroides* (Butler *et al.*, 1999; Dementin *et al.*, 2007) mais pas avec l'enzyme monomérique de *D. desulfuricans* ou de *R. sphaeroides* (González *et al.*, 2006).

Plusieurs inhibiteurs sont connus : le thiocyanate ainsi que l'azoture agissent comme des inhibiteurs compétitifs. Les ions Zn^{2+} et Cd^{2+} agissent comme des inhibiteurs non-compétitifs, probablement par coordination au sulfure de la méthionine 153, située sur le canal d'accès au site actif (Dementin *et al.*, 2007). L'effet du cyanure semble encore complexe, puisqu'il a été trouvé qu'une faible concentration de cyanure pouvait légèrement *activer* l'enzyme de *Desulfovibrio desulfuricans* en tampon phosphate (Bursakov *et al.*, 1997), mais il montre un effet d'inhibition non-compétitive sur l'enzyme de *P. pantotrophus* (Butler *et al.*, 1999).

Tableau 1.4 – Propriétés enzymatiques : Constante de MICHAELIS (K_M) et vitesse de turnover (k_{cat}) en présence de méthylviologène (MV) ou dithionite (DT)

Espèce	Enzyme	K_M	$k_{\text{cat}}^{\text{MV}} (\text{s}^{-1})$	$k_{\text{cat}}^{\text{DT}} (\text{s}^{-1})$	
<i>P. pantotrophus</i>	NapAB	nd	180	nd	(Bennett <i>et al.</i> , 1994)
	NapA	nd	nd	1	(Butler <i>et al.</i> , 1999)
		1,0 mM	250	nd	(Butler <i>et al.</i> , 2000)
<i>R. sphaeroides</i>	NapAB	170 μM	45	nd	(Arnoux <i>et al.</i> , 2003)
	NapA	45 μM	9,1	nd	(Arnoux <i>et al.</i> , 2003)
	NapAB	0,41 mM	24	0,4	(Dementin <i>et al.</i> , 2007)
<i>D. desulfuricans</i>	NapA	32 μM	23	0	(Bursakov <i>et al.</i> , 1997)
<i>Synechococcus</i>	NarB	0,05 mM	80	nd	(Jepson <i>et al.</i> , 2004)
		$(6 \pm 1) \mu\text{M}$	1100	nd	(Srivastava <i>et al.</i> , 2013)

1.4.2 Structures cristallographiques

La première structure cristallographique d'une nitrate réductase périplasmique fut celle de NapA de *D. desulfuricans*, déterminée en 1999 par le groupe de ROMÃO avec une résolution de 1,9 Å.

Tableau 1.5 – Structures cristallographiques de nitrate réductase périplasmique

Organisme	Sous-unités	Résolution (Å)	Référence	
<i>D. desulfuricans</i>	NapA	2NAP	1,90	(Dias <i>et al.</i> , 1999)
		2JIO	2,20	(Najmudin <i>et al.</i> , 2008)
		2JIP	2,30	
		2JIQ	2,44	
		2V45	2,40	
		2V3V	1,99	
		2JIM	2,45	
<i>H. influenzae</i>	NapB	1JNI	1,25	(Brigé <i>et al.</i> , 2002)
<i>R. sphaeroides</i>	NapAB	1OGY	3,20	(Arnoux <i>et al.</i> , 2003)
<i>E. coli</i>	NapA	2NYA	2,50	(Jepson <i>et al.</i> , 2007)
<i>C. necator</i>	NapAB	3ML1	1,60	(Coelho <i>et al.</i> , 2011)
		3O5A	1,72	

Les structures primaires et tertiaires des différentes enzymes Nap sont globalement superposables. Les différences majeures résident dans l'insertion d'hélices en surface de la protéine, le cœur étant conservé. Il existe quelques variations dans le mode de stabilisation du cofacteurs. Les points isoélectriques sont variables d'une protéine à l'autre.

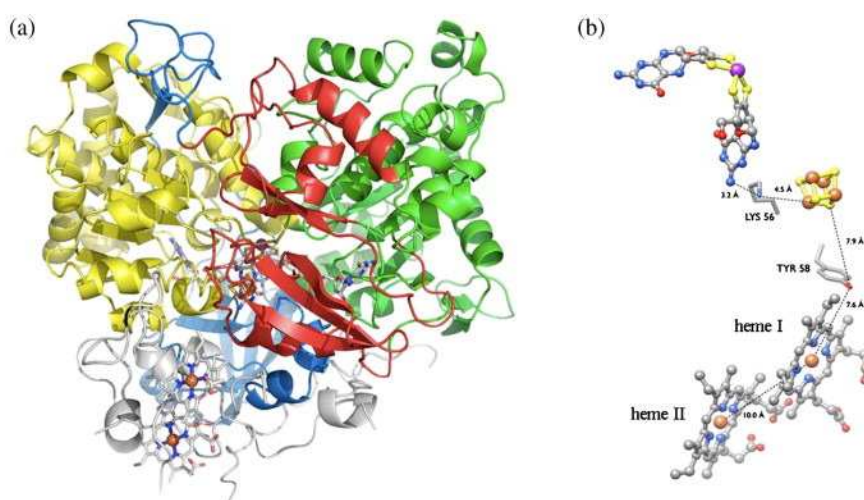


Figure 1.10 – Structure du dimère (a) et arrangement des cofacteurs (b) chez *C. necator*. Domaine I en rouge, domaine II en vert, domaine III en jaune, domaine IV en bleu, NapB en gris. Les guanosine phosphates ont été omis (Coelho *et al.*, 2011)

1.4.2.1 Structure de la sous-unité catalytique

La sous-unité catalytique s'organise en quatre sous-domaines, faits majoritairement d'hélices α . Le molybdène est enfoui au centre de cette protéine globulaire de 91 kDa. Le cofacteur à molybdène est largement déployé dans NapA : la distance entre les deux atomes d'azotes exocycliques des guanines est proche de 35 Å. Le molybdène est au centre de ce large complexe, les deux ptérines étant disposées selon une symétrie pseudo- C_2 . En ligne avec la nomenclature (arbitraire) introduite pour la DMSO réductase, les ptérines sont désignées par les lettres Q et P. Les quatre domaines sont définis comme suit :

- Le domaine I (résidus 12-68, 502-530, 600-640) fixe le centre fer-soufre.
- Le domaine II (69-147, 387-501, 531-599) héberge la Q-MGD, la plus proche du centre Fe_4S_4
- Le domaine III (148-384) stabilise la P-MGD, distale.
- Le domaine IV (641-800) ne participe pas à la liaison du cofacteur mais est impliqué dans la formation du complexe NapA-NapB, au même titre que le domaine I.

L'atome de molybdène est ainsi situé à l'interface des domaines II et III, qui forme une dépression de la surface en forme d'entonnoir. Ce tunnel permet la diffusion de molécules — substrat et produit notamment — entre le site actif et le solvant. La cystéine 152 forme la seule liaison covalente entre la chaîne polypeptidique et le cofacteur à molybdène. Un résidu (l'arginine 694 dans NapA) est en liaison hydrogène avec les deux ptérines, précisément avec les atomes d'azote 5.

1.4.2.2 Structure de la sous-unité de transfert d'électrons

La sous-unité NapB de *R. sphaeroides*, de 17 kDa présente une forme allongée et enveloppe la sous-unité NapA sur une surface de 5900 Å², et fixe deux hèmes *c*. Les plans des macrocycles tétrapyrroliques sont quasiment parallèles, les fonctions propionate étant dirigées vers le solvant. La coordination des atomes de fer est assurée par deux noyaux imidazole (de résidus histidine) approximativement coplanaires. L'hème I est le plus exposé au solvant, tandis que l'hème II est en contact direct avec la sous-unité NapA. La chaîne latérale de la tyrosine 58 de NapA est en contact avec un méthyle du macrocycle. Ce résidu est conservé parmi toutes les nitrate réductases périplasmiques exprimées sous forme d'un dimère NapAB, ce qui suggère un rôle clef dans le transfert d'électrons d'une sous-unité à l'autre. Les centres métalliques sont disposés d'une manière qui suggère le chemin de transfert d'électrons suivant : hème I \longrightarrow hème II \longrightarrow Fe_4S_4 \longrightarrow Mo. Ceci dit, on constate que la plus courte distance entre le macrocycle de l'hème II et la ptérine Q est de 14 Å, qui est une distance autorisant les transferts d'électrons biologiques.

1.4.2.3 Structures du site actif vues par cristallographie

À partir de la première structure, DIAS et coll. ont conclu que l'ion Mo^{6+} était coordiné par les deux dithiolènes bidentes, le thiolate de la cystéine, et par un ligand hydroxo ou aqua (liaison Mo–O longue de $\sim 2,2$ Å) (Dias *et al.*, 1999). Il faut noter que les cristaux ont été obtenus dans l'état oxydé uniquement (exposé au dioxygène).

Une structure similaire a été admise pour le site actif chez *R. sphaeroides*, car la résolution de 3,2 Å ne permettait pas une analyse détaillée de la densité électronique (Arnoux *et al.*, 2003). De même pour l'enzyme de *E. coli*, les auteurs concluent à une coordination par un ligand aqua (distance Mo – O de 2,6 Å) (Jepson *et al.*, 2007).

En 2008, le groupe de ROMÃO publie une étude rassemblant plusieurs structures de NapA de *D. desulfuricans*, à l'état natif et co-cristallisées avec le substrat ou des inhibiteurs (cyanure, azoture et perchlorate). Par l'examen des facteurs d'agitation thermique, les auteurs proposent que le ligand inorganique du Mo^{VI} est un atome de soufre, et non d'oxygène. La distance entre cet atome et celui de la cystéine suggère l'existence d'une liaison S–S partielle. Les autres structures obtenues montrent, entre autres, que l'exposition au cyanure conduit à l'abstraction *partielle* du ligand thio. Les ions perchlorate se fixent à « l'entrée » du site actif, entre les domaines II et III, de même que les ions nitrate, qui ne sont pas observés dans le site actif (*cf* figure 1.11) (Najmudin *et al.*, 2008).

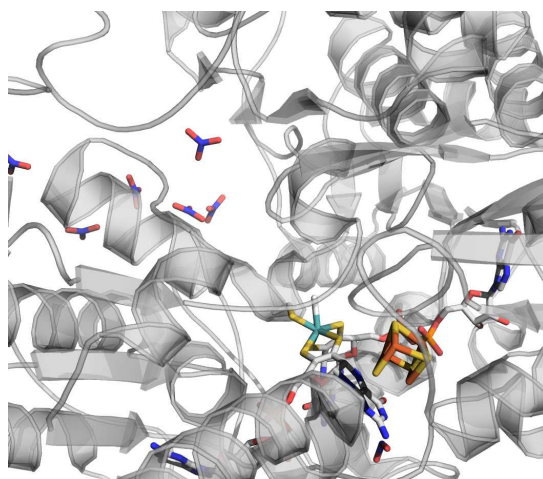


Figure 1.11 – Détail de la structure (1JIQ) de NapA de *D. desulfuricans* résolue en présence de nitrate, montrant la présence d'ions nitrate dans le canal d'accès du substrat mais pas dans le site actif (Najmudin *et al.*, 2008).

Le même groupe a proposé la même coordination pour le Mo^{VI} en 2011, avec une structure à 1,5 Å de NapAB de *Cupriavidus necator* (précédemment *Ralstonia eutropha*). La protéine a été cristallisée à l'état réduit, avec une résolution de 1,7 Å. La densité électronique y suggère le déplacement partiel du thiolate de la cystéine liée au molybdène, dans une position décoordonnée (Coelho *et al.*, 2011).

1.4.2.4 Études du site actif par EXAFS

Des études par EXAFS ont été menées par le groupe de RICHARDSON sur NapAB de *P. pantotrophus*, dans l'état oxydé (Mo^{VI}), dans l'état réduit (Mo^{IV}), et après oxydation au nitrate (30 % Mo^V). Dans une première étude, les meilleurs ajustements donnent une coordination du Mo^{VI} comprenant deux ligands oxo, trois atomes de soufre, et un sixième ligand indéterminé. Pour l'état réduit, les auteurs interprètent les données avec un ligand oxo, un hydroxo et quatre atomes de soufre (Bennett *et al.*, 1996). Dans une seconde étude, les données sur l'enzyme oxydée

suggèrent une coordination par deux ligands oxo, et cinq ligand soufrés, dont quatre équidistants du Mo. Dans l'enzyme réduite, un ligand oxo et trois ligands soufrés persistent dans la sphère de coordination (Butler *et al.*, 1999).

1.4.2.5 Propriétés spectroscopiques des centres à fer

UV – visible

Les hèmes de type *c* présents dans NapB sont caractérisés par leur spectre d'absorption UV-visible. Ils présentent à l'état ferrique une forte absorption ($\sim 200 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) à 408 nm (bande de SORET), qui se déplace à 419 nm à l'état ferreux. Deux autres bandes moins intenses sont visibles à l'état réduit : α (552 nm) et β (525 nm).

L'absorption UV-visible du centre fer-soufre est dominée par une bande large autour de 400 nm, qui apparaît comme un épaulement sur les spectres de la sous-unité NapA ($\epsilon = 21\,200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Jacques *et al.*, 2014)).

Signatures RPE

Chaque centre métallique du complexe NapAB (molybdène, Fe_4S_4 , hèmes) possède une signature RPE bien spécifique, facile à distinguer. Le fort champ de ligands a pour conséquence que les ions Fe^{3+} des hèmes ont un spin $S = 1/2$. Par RPE, ils donnent un unique signal rhombique très anisotrope ($g_{1,2,3} = 2,92, 2,28, 1,50$). L'état réduit $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^+$ possède un spin $S = 1/2$, et donne un signal RPE rhombique ($g_{1,2,3} = 2,04, 1,96, 1,90$).

1.4.3 Description du mécanisme catalytique

Les premières propositions de mécanisme catalytique reposaient sur les études spectroscopiques, par analogie avec les systèmes connus. Un mécanisme de transfert d'oxo sphère interne est alors favorisé. Avec les structures cristallographiques publiées en 2008 et 2011, le débat a été relancé, notamment sur la base de calculs de fonctionnelle densité. Des mécanismes procédant par sphère externe ont été proposés (voir schéma 1.18, p. 51). Parallèlement, les études électrochimiques ont montré la complexité du comportement de l'enzyme vis-à-vis du potentiel et de la concentration en substrat.

1.4.3.1 Place du Mo^{V} dans le cycle catalytique

Un modèle minimal de cycle catalytique (schéma 1.16) implique l'oxydation de l'état Mo^{IV} en Mo^{VI} par le substrat (branche oxydative du cycle), suivie de la réduction *séquentielle* du molybdène par les cofacteurs de la protéine. Ce modèle ne prend en compte que le nombre d'électrons au site actif. Il ne tient pas compte de la coordination du Mo, des états de protonation, et de l'ordre précis des étapes menant d'une espèce oxo à la libération d'une molécule d'eau. Il fait apparaître nécessairement un état Mo^{V} , paramagnétique. L'étude spectroscopique de cette espèce doit apporter des indices essentiels sur la structure du site actif et le mécanisme catalytique.

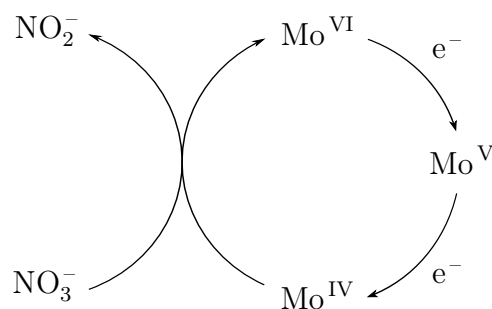


Schéma 1.16 – Cycle catalytique minimal. Les transferts séquentiels d'électrons impliquent l'apparition d'un état Mo^{V} pendant la régénération du site actif.

L'électrochimie directe de NapAB montre que l'activité est maximale dans une fenêtre intermédiaire de potentiels d'électrode. Ceci a été observé chez *R. sphaeroides* avec la forme sauvage de l'enzyme, mais également avec des formes où un résidu proche du site actif a été muté : R392A, M153A, Q384N, le phénomène étant présent mais moins marqué pour ces deux derniers mutants (Fourmond *et al.*, 2010a). Le même comportement a été reporté pour l'enzyme de *P. pantotrophus* en réduction du nitrate et du séléniate (Gates *et al.*, 2011). Cette réponse complexe au potentiel suggère qu'à l'état stationnaire le site actif de l'enzyme est en équilibre entre deux ou trois états d'oxydation, quelle que soit sa coordination. Pour NapAB, le modèle qui a été proposé suppose que le substrat se fixe plus rapidement à l'ion Mo^{5+} qu'à l'ion Mo^{4+} (schéma 1.17). Cette hypothèse se justifie par une moindre répulsion électrostatique. Ainsi, le cycle catalytique est plus rapide dans une gamme de potentiels intermédiaire où la liaison du substrat sur le Mo^{V} est plus rapide que la réduction de celui-ci (Frangioni *et al.*, 2004). Ce modèle suggère donc que le cycle catalytique optimal passe par un état $\text{Mo}^{\text{V}}:\text{NO}_3^-$ avant le transfert d'oxo.

L'étude de l'activité catalytique de NapAB de *R. sphaeroides* en solution a permis de montrer que la forme particulière du voltampérogramme n'est pas un artefact dû à l'adsorption de la protéine sur une électrode. En effet, il a pu être montré que la vitesse de turnover accélère à mesure que le donneur d'électrons (le radical méthylviologène) est consommé. Ce phénomène, qui peut être vu comme une inhibition par un excès de radical méthylviologène, reflète la plus faible activité de l'enzyme en deçà d'un certain potentiel (E_{sw} sur la figure 1.12), et l'extremum d'activité à potentiel intermédiaire. La forme du voltampérogramme reflète donc une propriété intrinsèque au site actif de l'enzyme (Fourmond *et al.*, 2010a).

La modélisation de la « vague » catalytique (figure 1.12) ne permet de rendre compte précisément de la forme de la vague, de son évolution avec le pH et la concentration en substrat, que dans la limite haut pH et basse concentration en substrat (Bertrand *et al.*, 2007). Cette modélisation n'est pas abordée plus avant dans ce travail de thèse.

Outre la forme complexe du voltampérogramme, les travaux de l'équipe de Dynamique Réactionnelle des Enzymes Redox Multicentres ont mis en évidence des processus d'activation et d'inactivation de l'enzyme. Le premier est un phénomène d'activation irréversible de l'enzyme dans l'état « as prepared » (c'est à dire à l'issue de la purification en aérobie), qui a été caractérisé par chronoampérométrie (Fourmond *et al.*, 2008). Les principales observations faites alors sont reprises dans

le chapitre 1.

Le deuxième se manifeste par une inactivation à haut potentiel, bas pH, et haute concentration en substrat, et déforme les voltampérogrammes dans ces conditions. Ce processus, contrairement au premier, est réversible dès que le potentiel (par exemple) est ramené à une valeur basse (Fourmond *et al.*, 2010b). Le chapitre 3 continue l'étude de ce phénomène, en fonction du potentiel et de la concentration en substrat.

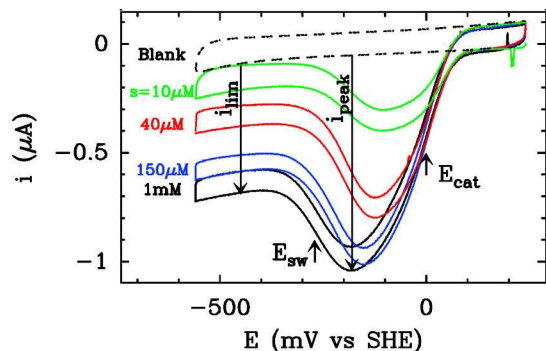


Figure 1.12 – Voltampérogrammes cycliques montrant la réponse de NapAB au potentiel d'électrode. Le courant est maximal entre deux potentiels appelés E_{cat} et E_{sw} (switch) (Bertrand *et al.*, 2007)

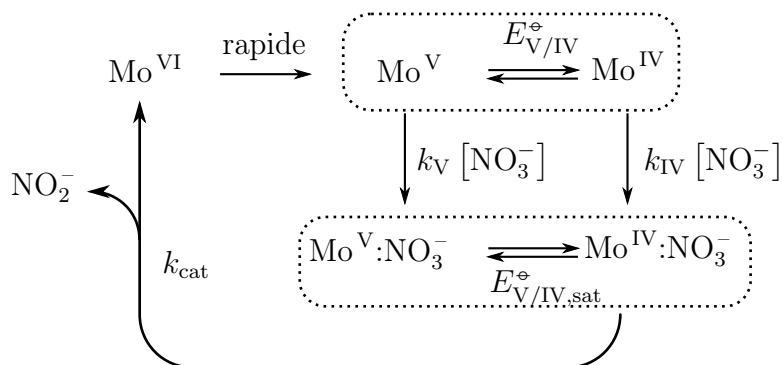


Schéma 1.17 – Cycle catalytique faisant intervenir un état $\text{Mo}^{\text{V}}:\text{NO}_3^-$. Le modèle suppose que les transitions redox entre les états V et IV sont à l'équilibre (cadre pointillé). $E_{\text{V/IV}}^{\circ}$ et $E_{\text{V/IV,sat}}^{\circ}$ sont les potentiels de réduction respectifs des formes libres et saturées en substrats du site actif. Seul l'état $\text{Mo}^{\text{IV}}:\text{NO}_3^-$ peut conduire à la formation du produit, avec une vitesse k_{cat} . Les constantes de vitesses k_V et k_{IV} sont supposées vérifier $k_V \geq k_{IV}$, de sorte que la catalyse est plus rapide à des potentiels intermédiaires (Frangioni *et al.*, 2004).

1.4.3.2 Les apports de la chimie théorique

Les études de chimie théorique reposent essentiellement sur des calculs de la fonctionnelle densité. La structure du site actif des nitrates réductases périplasmiques élucidée par cristallographie a stimulé les études théoriques du mécanisme du transfert d'oxo. Les mécanismes proposés procèdent par sphère interne ou par

sphère externe (schéma 1.18). Le mécanisme par sphère interne implique que la cystéine persulfurée η^2 passe dans un mode η^1 pour permettre la coordination du nitrate au métal (Cerqueira *et al.*, 2009; Xie et Cao, 2010; Metz, 2011). Cette transformation a été baptisée « sulfur shift ». Le mécanisme par sphère externe impliquerait la formation d'un oxyde de persulfocystéine ($\text{CysCH}_2\text{SSO}^-$).

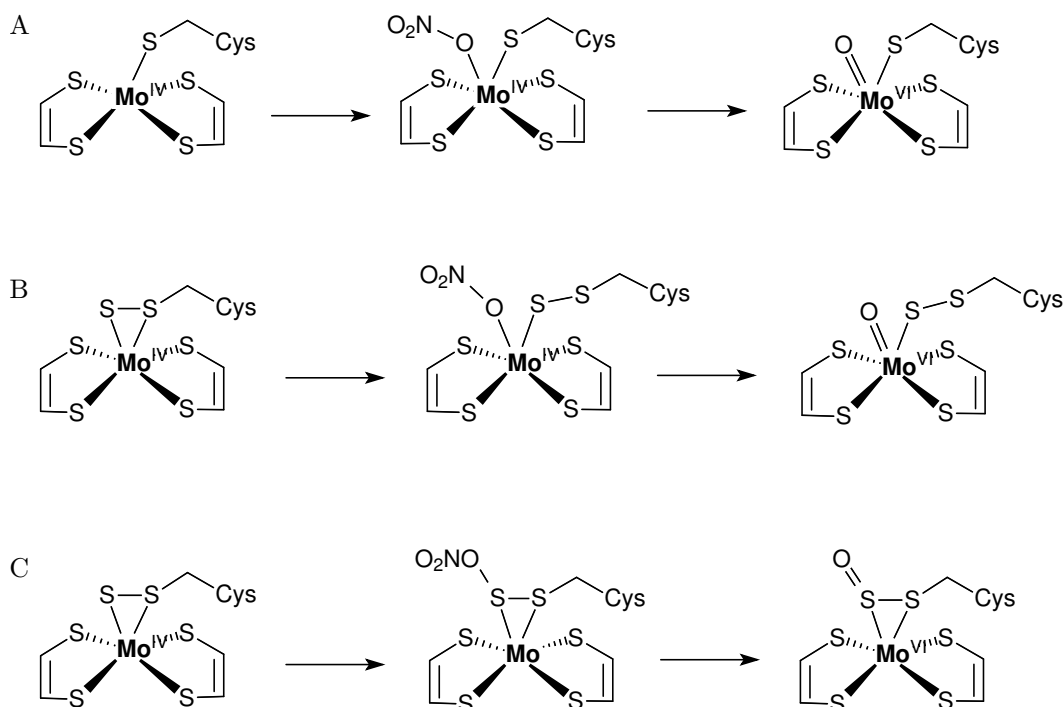


Schéma 1.18 – Types de mécanismes proposés pour le transfert d'oxo dans Nap. A et B : mécanismes par coordination sur le Mo⁴⁺. Le mécanisme A était favorisé avant la réinterprétation des données cristallographiques indiquant la présence d'un sixième atome de soufre. B illustre le mécanisme de « sulfur shift ». C : mécanisme par fixation du substrat sur le soufre

1.4.4 Propriétés spectroscopiques du cofacteur à molybdène

L'étude des nitrate réductase périplasmique par spectroscopie RPE et spectrophotométrie a débuté avec les travaux sur NapAB de *P. pantotrophus*, dans les années 1990. Les études du cofacteur à molybdène dans les différentes NAP caractérisées jusqu'ici mettent en évidence plusieurs types de signaux RPE. La nomenclature des formes spectroscopiques classe celles-ci selon la valeur moyenne de leur matrice \tilde{g} . On distingue trois classes d'espèces Mo^V, d'après leur facteur g : « high g », « low g » et « very high g ».

1.4.4.1 Espèces « high g »

Les signaux de type « high g » sont caractérisés par une matrice \tilde{g} rhombique, de valeur moyenne proche de 1,99 et de faible anisotropie : $g_{\max} - g_{\min} \simeq 0,02$. Ils ont été observés dans aussi bien dans les Nap que dans la polysulfure réductase (Psr) ou la formiate déshydrogénase (Fdh), mais dans des conditions diverses, ce

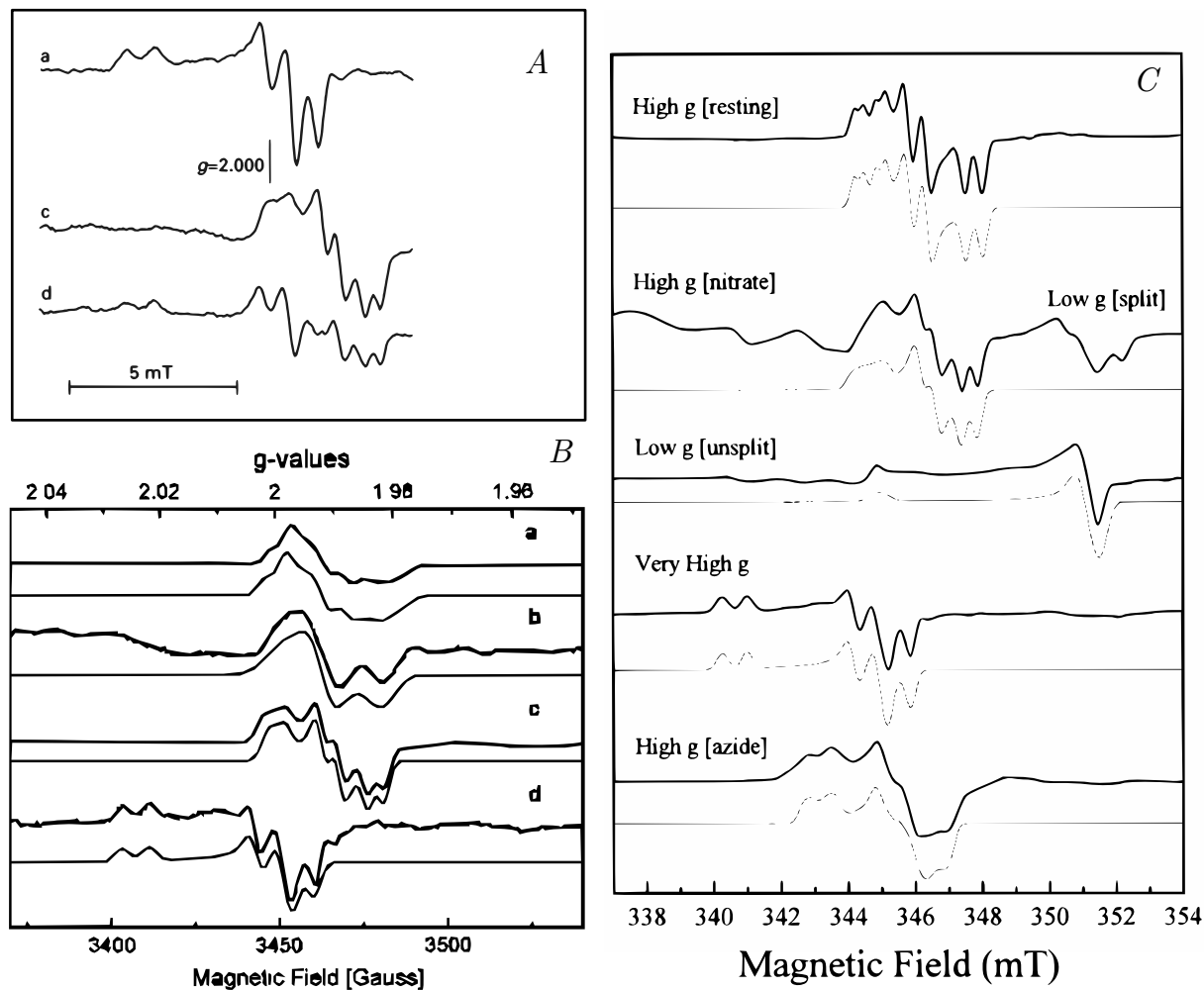


Figure 1.13 – Signaux Mo^{V} du cofacteur à molybdène observés dans plusieurs nitrate réductases. *A* : Nas d'*A. vinelandii* (Gangeswaran *et al.*, 1993) (a) État « as prepared », signal « very high g », (b) Après réduction en présence de nitrate, signal « high g nitrate », (c) Après réoxydation au nitrate, superposition des deux formes. *B* : NapA de *D. desulfuricans* (Najmudin *et al.*, 2008) (a) signal high g turnover (b) signal high g turnover dans $^2\text{H}_2\text{O}$ (c) signal high g nitrate obtenu par réduction en présence de nitrate (d) signal very high g obtenu en présence de cyanure. *C* : NapAB de *P. pantotrophus* (Butler *et al.*, 1999)

qui ne facilite pas leur compréhension. Il faut noter que le terme « high g » est utilisé dans la littérature pour désigner des signaux Mo^{V} d'autres enzymes, comme la DMSO réductase, ou la nitrate réductase membranaire. Cependant, les signaux en question ont une valeur moyenne de g plus basse et une anisotropie plus élevée. Cette appellation est également incomplète, puisque, comme nous allons le montrer, il existe plusieurs formes spectrales *distinctes* dans la catégorie « high g ».

Forme *resting*

Cette forme a été reportée pour la première fois dans l'enzyme de *P. pantotrophus* (Bennett *et al.*, 1994), et elle est observée chez *R. sphaeroides*, dans l'état « as prepared » dans les deux cas. Les raies sont éclatées par des couplages hyperfins, de sorte que la raie g_1 est un quadruplet, et les raies g_2 et g_3 donnent des doublets, ce qui indique un couplage avec deux noyaux de spin $I = 1/2$. Le signal est insensible à l'échange H/D, et a été attribué aux protons β de la cystéine coordonnée au métal sur la base d'études par ENDOR (Butler *et al.*, 2002). De plus, la forme est insensible à la présence d'halogénures ou d'oxyanions divers, ainsi qu'au pH. BENNETT et coll. indiquent que le signal croît lors d'une réduction par un léger excès de dithionite de sodium. Les bactéries du genre *Shewanella* possèdent deux opérons *nap*. L'isoforme NapA- α de *S. gelidimarina* présente également une signature RPE Mo^{V} de type « high g resting », mais la stœchiométrie du signal n'est pas rapportée (figure 1.13, panneau 4)

Chez *R. sphaeroides*, on observe cette forme dans les préparations du complexe NapAB, ou de la sous-unité NapA. Les titrages potentiométriques effectués en 2003 ont montré que le signal disparaît lors d'une réduction, mais ne réapparaît pas lors de la réoxydation (Arnoux *et al.*, 2003). La fraction de cette forme est plus importante dans NapA (jusqu'à 70%) que dans NapAB (moins de 20%). L'étude de l'enzyme par chronoampérométrie a montré l'existence d'une *fraction inactive* dans l'enzyme « as prepared » (gardée oxydée à l'air), laquelle s'active irréversiblement à bas potentiel. La comparaison du comportement de différentes préparations, incluant celles de formes mutées, a permis de corrélérer la fraction inactive à l'espèce donnant la forme Mo^{V} « high g resting » (Fourmond *et al.*, 2008).

Formes azoture et thiocyanate

L'azoture et le thiocyanate sont des inhibiteurs compétitifs de la nitrate réductase périplasmique. Par traitement de NapAB de *P. pantotrophus* à l'azoture ou au thiocyanate, BUTLER et coll. ont observé des signaux de type « high g » modifiés. La forme thiocyanate a des valeurs de g plus élevées, est plus anisotrope et sa rhombicité a diminué. Les couplages hyperfins sont conservés mais légèrement modifiés. L'étude par EXAFS de l'enzyme traitée au thiocyanate suggère la présence d'un atome de soufre supplémentaire dans la sphère de coordination du Mo^{4+} , que les auteurs corrèlent à l'élévation des valeurs de g . Lorsque l'enzyme est traitée à l'azoture, le signal Mo^{V} est également déplacé vers les bas champs. Les couplages hyperfins ne sont plus aussi bien résolus (Butler *et al.*, 2000; Butler *et al.*, 1999).

Formes *nitrate* et *turnover*

La forme « high *g* nitrate » a été observée dans toutes les études par RPE de Nap et Nas. Spectroscopiquement, elle se différencie de la forme « high *g* resting » par sa rhombicité (0,53 contre 0,46) et par le couplage hyperfin en g_1 moins résolu (perte du quadruplet) (voir les deux spectres sur le panneau *C*, figure 1.13). Elle a été observée en présence de nitrate, ou en son absence, ce qui rend cette dénomination déroutante.

La première observation de cette forme est faite sur la nitrate réductase cytoplasmique d'*A. vinelandii*, après trente secondes d'oxydation au nitrate (5 mM) de l'enzyme préalablement réduite (figure 1.13). L'espèce est sous-stœchiométrique (0,07 spin/molécule) et est encore présente après 90 minutes d'incubation (Gangeswaran *et al.*, 1993)

Avec la nitrate réductase périplasmique de *P. pantotrophus*, les chercheurs du groupe de RICHARDSON observent un signal « high *g* nitrate » après cinq minutes d'oxydation avec KNO_3 (100 mM), l'enzyme ayant été réduite par le dithionite de sodium pendant trente minutes (la fraction de Mo^{V} obtenue n'est pas précisée) (Bennett *et al.*, 1994).

Puis, dans une étude suivante, ils observent, après dix secondes d'oxydation de l'enzyme au KNO_3 un signal qui est une superposition des formes « high *g* resting » et « high *g* nitrate ». Ils attribuent alors le signal « high *g* nitrate » à un intermédiaire catalytique de longue durée de vie (Butler *et al.*, 1999). Dans une troisième étude, grâce à des expériences de cinétique rapide, l'enzyme est mélangée au nitrate (10 mM) en présence de méthylviologène (médiateur), puis gelée, sur des temps inférieurs à une seconde. Ceci conduit au développement de l'espèce « high *g* resting », sans que l'espèce « high *g* nitrate » ne soit détectable. La forme « high *g* resting » est donc l'intermédiaire recherché dans le cycle catalytique, d'après les auteurs (Butler *et al.*, 2002).

Dans NapA de *E. coli*, aucune espèce Mo^{V} n'est observée dans à l'état « as prepared », mais un signal « high *g* resting » apparaît lorsque l'enzyme est réduite par le dithionite de sodium (Jepson *et al.*, 2007). La rhombicité de ce signal (0,59) le rapproche plus du type « high *g* nitrate ».

Chez la cyanobactérie *Synechococcus* sp. PCC 7942, un signal de type « high *g* » est observé lors de la réduction de la nitrate réductase cytoplasmique ferrédoxine-dépendante (figure 1.13, panneau 1,B), et se développe jusqu'à près de 1 spin/molécule (Jepson *et al.*, 2004).

Une autre nitrate réductase cytoplasmique cyanobactérienne a été étudiée par RPE. NarB de *Cyanothece* sp. PCC 8801 donne un signal RPE Mo^{V} de type « high *g* » après réduction par le dithionite (0,2 spin/molécule). Ce signal persiste lors d'une oxydation au nitrate.

Dans le cas de NapA de *D. desulfuricans*, qui est étudiée dans le groupe de MOURA, la forme « high *g* nitrate » apparaît lorsque l'enzyme est réduite par le dithionite de sodium en présence de nitrate (Bursakov *et al.*, 1995; González *et al.*, 2006). En présence de nitrate et d'un donneur d'électrons comme le dithionite de sodium ou le méthylviologène réduit, GONZÁLEZ et coll. (González *et al.*, 2006) ont observé deux signaux de type « high *g* » dans NapA de *D. desulfuricans* : « high *g* nitrate » et « high *g* turnover », ce dernier n'étant obtenu qu'avec du méthylviologène. Les auteurs distinguent ces deux donneurs d'électrons par la

vitesse de turnover qu'ils permettent avec NapA. Le signal « high g turnover » diffère des deux premiers : les couplages hyperfins détectés sont attribués par les auteurs à l'interaction avec deux protons labiles équivalents. Aucune preuve de l'interaction avec un ion nitrate n'a été trouvée. D'après eux, le signal « high g nitrate » ne serait pas une espèce active, alors que l'espèce « high g turnover » serait un intermédiaire du cycle catalytique.

1.4.4.2 Espèces « very high g »

Le signal « very high g » a pour valeurs principales de \tilde{g} : 2,02, 2,00 et 1,99. Il est observé, selon l'espèce étudiée, soit dans l'enzyme « as prepared », oxydée à l'air, soit en présence de cyanure.

Dans les nitrate réductases cytoplasmiques de *Synechococcus* sp. PCC 7942, *A. vinelandii* et *Cyanothece* sp. PCC 8801, le signal « very high g » est observé dans l'état « as prepared », dans des proportions sous-stœchiométriques (moins de 0,2 spin/molécule) (Gangeswaran *et al.*, 1993; Jepson *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2011). Dans les nitrate réductases périplasmiques de *P. pantotrophus* et de *D. desulfuricans* ATCC 27774, l'espèce « very high g » est observée lors d'une réduction de l'enzyme en présence de cyanure suivie d'une oxydation au nitrate. Elle disparaît une fois le cyanure éliminé par dialyse (Bennett *et al.*, 1994; González *et al.*, 2006).

Dans NapAB de *R. sphaeroides*, l'espèce « very high g » est détectée dans l'état « as prepared », en mélange variable avec le signal « high g resting », et dans des proportions plus faibles (moins de 0,1 spin/molécule). Elle n'a jamais été observée dans la sous-unité NapA seule. Elle disparaît lors d'une réduction et réapparaît lors de la réoxydation, sans qu'un potentiel de réduction n'ait pu être déterminé (Frangioni, 2006).

1.4.4.3 Espèces « low g »

Ces espèces ont été décrites par BENNETT et coll dans l'étude de la nitrate réductase périplasmique de *P. pantotrophus*. Le signal RPE apparaît lors d'une incubation prolongée de l'enzyme avec un excès de dithionite de sodium. La matrice \tilde{g} est quasi-axiale : $g = 1,99, 1,96, 1,97$. Chez *P. pantotrophus*, le spectre RPE montre un couplage hyperfin avec un spin $1/2$ nucléaire, qui disparaît dans l'eau lourde, ce qui indique qu'il provient d'un noyau d'hydrogène labile (Bennett *et al.*, 1994).

Ces signaux sont proches des signaux Mo^{V} « rapid type I », observés dans la xanthine oxydase, ou encore des signaux Mo^{V} « low pH », observés dans les sulfite oxydases. Dans ces deux systèmes, le cofacteur à molybdène ne contient qu'une seule ptérine. Le signal « low g » des NAP est donc attribué à des espèces Mo^{V} où un seul ligand dithiolène est lié au métal. Ces espèces seraient inactives, à cause de la dénaturation du site actif.

1.4.4.4 Structure des espèces Mo^{V}

Les espèces Mo^{V} peuvent être regroupées grâce à des corrélations empiriques, qui relient les valeurs $g_{1,2,3}$ à l'anisotropie de la matrice \tilde{g} . Ces corrélations indiquent une proximité de structures. La premières sphères de coordination des

espèces corrélées sont identiques, les différences se jouant dans de petites variations d'angles et de longueur de liaison. Les nitrate réductase périplasmiques, les formiate déshydrogénases et les polysulfure réductases forment une sous-famille d'enzymes où le molybdène est lié à la protéine *via* la chaîne latérale d'une cystéine ou d'une sélénocystéine et où le ligand inorganique est un atome de soufre. L'environnement du molybdène y est donc similaire, et les signaux RPE Mo^V sont assez semblables.

La figure 1.14 donne les valeurs principales de \tilde{g} pour les signaux « high g » et « very high g », reportées en fonction du paramètre d'anisotropie $g_{\max} - g_{\min}$. La corrélation obtenue montre que la première sphère de coordination de l'ion Mo⁵⁺ est la même pour toutes ces espèces, les différences provenant de distorsions géométriques légères, résultant de l'environnement plus distant du métal.

Des signaux de type « very high g » sont également observés dans la polysulfure réductase de *Wolinella succinogenes* réduite au tétraborohydrure, et dans la formiate déshydrogénase de *Methanobacterium formicicum* réduite par le formiate (Prisner *et al.*, 2003; Barber *et al.*, 1986).

Dans l'équipe de Biophysique des métalloprotéines (BIP), les travaux menés par Frédéric BIASO visent à attribuer une structure aux espèces paramagnétiques observées dans la nitrate réductase périplasmique. Par des calculs de la fonctionnelle densité sur des modèles optimisés du site actif, ces études ont conduit à attribuer une sphère de coordination du Mo^V pour chacune des trois classes de signaux : « high g », « low g » et « very high g ». La structure attribuée aux espèces « high g » contient six ligands soufrés, dont une cystéine persulfurée. Dans le cas des espèces « very high g », celle-ci est dissociée entre une cystéine et un soufre. Pour les espèces, « low g » les calculs indiquent une structure où l'un des dithiolène est dissocié du métal (*cf* figure 1.15, p. 59).

Tableau 1.6 – Caractéristiques de la matrice \tilde{g} des espèces Mo^V de type « high g » et « very high g » trouvées dans les nitrate réductases périplasmiques (Nap), cytoplasmique (Nas), polysulfure réductases (Psr) et formiate déhydrogénases (Fdh); $\Delta g \equiv g_{\max} - g_{\min}$ (anisotropie), $\rho \equiv \frac{g_{\max} - g_{\text{mid}}}{g_{\max} - g_{\min}}$ (rhombicité), $\langle g \rangle \equiv \frac{g_{\max} + g_{\text{mid}} + g_{\min}}{3}$ (moyenne).

Index	Enzyme – signal	Δg	g_{\max}	g_{mid}	g_{\min}	ρ	$\langle g \rangle$	Référence
1	<i>Cyanothece</i> NarB	0,0145	1,9975	1,9908	1,983	0,462	1,990	(Wang <i>et al.</i> , 2011)
2	<i>S. symeochococcus</i> NarB	0,015	1,997	1,9902	1,982	0,453	1,989	(Jepson <i>et al.</i> , 2004)
8	<i>R. sphaeroides</i> NapA « resting »	0,0174	1,9984	1,9907	1,981	0,442	1,990	(Frangioni, 2006)
9	<i>R. sphaeroides</i> NapAB « resting »	0,0177	1,9987	1,9907	1,981	0,451	1,990	(Dementin <i>et al.</i> , 2007)
11	<i>P. pantotrophus</i> « resting »	0,018	1,999	1,9905	1,981	0,472	1,990	(Bennett <i>et al.</i> , 1994)
3	<i>Cyanothece</i> R352A NarB	0,0159	1,9979	1,9897	1,982	0,515	1,989	(Wang <i>et al.</i> , 2011)
4	<i>E. coli</i> NapA	0,016	1,9971	1,9883	1,9811	0,55	1,988	(Jepson <i>et al.</i> , 2007)
5	<i>P. pantotrophus</i> « nitrate »	0,0168	1,9988	1,9892	1,982	0,571	1,990	(Bennett <i>et al.</i> , 1994)
6	<i>A. vinelandii</i> Nas « nitrate »	0,017	1,998	1,989	1,981	0,529	1,989	(Gangeswaran <i>et al.</i> , 1993)
7	<i>D. desulfuricans</i> « turnover »	0,017	1,999	1,99	1,982	0,529	1,990	(Najmudin <i>et al.</i> , 2008)
10	<i>D. desulfuricans</i> « nitrate »	0,018	2,00	1,99	1,982	0,555	1,990	(Bursakov <i>et al.</i> , 1995)
12	<i>Cyanothece</i> NarB R352A réduite	0,0191	2,002	1,9927	1,9829	0,486	1,992	(Wang <i>et al.</i> , 2011)
13	<i>R. sphaeroides</i> Q384N NapAB	0,0191	1,9988	1,9901	1,9797	0,455	1,989	(Fourmond <i>et al.</i> , 2010a)
14	<i>R. sphaeroides</i> M153A NapAB	0,0191	1,9917	1,9818	1,9726	0,518	1,982	(Dementin <i>et al.</i> , 2007)
15	<i>P. pantotrophus</i> « azide »	0,0195	2,0074	1,994	1,9879	0,687	1,996	(Butler <i>et al.</i> , 1999)
16	<i>P. pantotrophus</i> « thiocyanate »	0,023	2,008	1,991	1,985	0,739	1,994	(Butler <i>et al.</i> , 2000)
*	<i>R. sphaeroides</i> DorA + $(\text{H}_3\text{C})_3\text{NO}$	0,0266	1,9988	1,9885	1,9722	0,387	1,986	(Bastian <i>et al.</i> , 1991)
17	<i>D. desulfuricans</i> Mo-Fdh + HCO_2^-	0,027	2,012	1,996	1,985	0,592	1,997	(Rivas <i>et al.</i> , 2007)
18	<i>W. succinogenes</i> Psr + S_n^- + Sud	0,028	2,0152	2,0049	1,9872	0,367	2,002	(Prisner <i>et al.</i> , 2003)
19	<i>W. succinogenes</i> Psr S_n^-	0,0291	2,0165	2,0025	1,9874	0,481	2,002	(Prisner <i>et al.</i> , 2003)
20	<i>M. formicicum</i> « as prepared »	0,023	2,02	2,006	1,997	0,608	2,007	(Barber <i>et al.</i> , 1986)
21	<i>Cyanothece</i> NarB « as prepared »	0,027	2,0221	2,00	1,9945	0,800	2,005	(Wang <i>et al.</i> , 2011)
22	<i>P. pantotrophus</i> « cyanide »	0,0287	2,0222	1,9993	1,9935	0,797	2,005	(Bennett <i>et al.</i> , 1994)
23	<i>D. desulfuricans</i> « cyanide »	0,029	2,024	2,001	1,995	0,793	2,006	(González <i>et al.</i> , 2006)
24	<i>S. symeochocystis</i> NarB « as prepared »	0,0298	2,0228	1,9983	1,993	0,822	2,004	(Jepson <i>et al.</i> , 2004)
25	<i>A. vinelandii</i> « as prepared »	0,030	2,023	1,998	1,993	0,833	2,004	(Gangeswaran <i>et al.</i> , 1993)

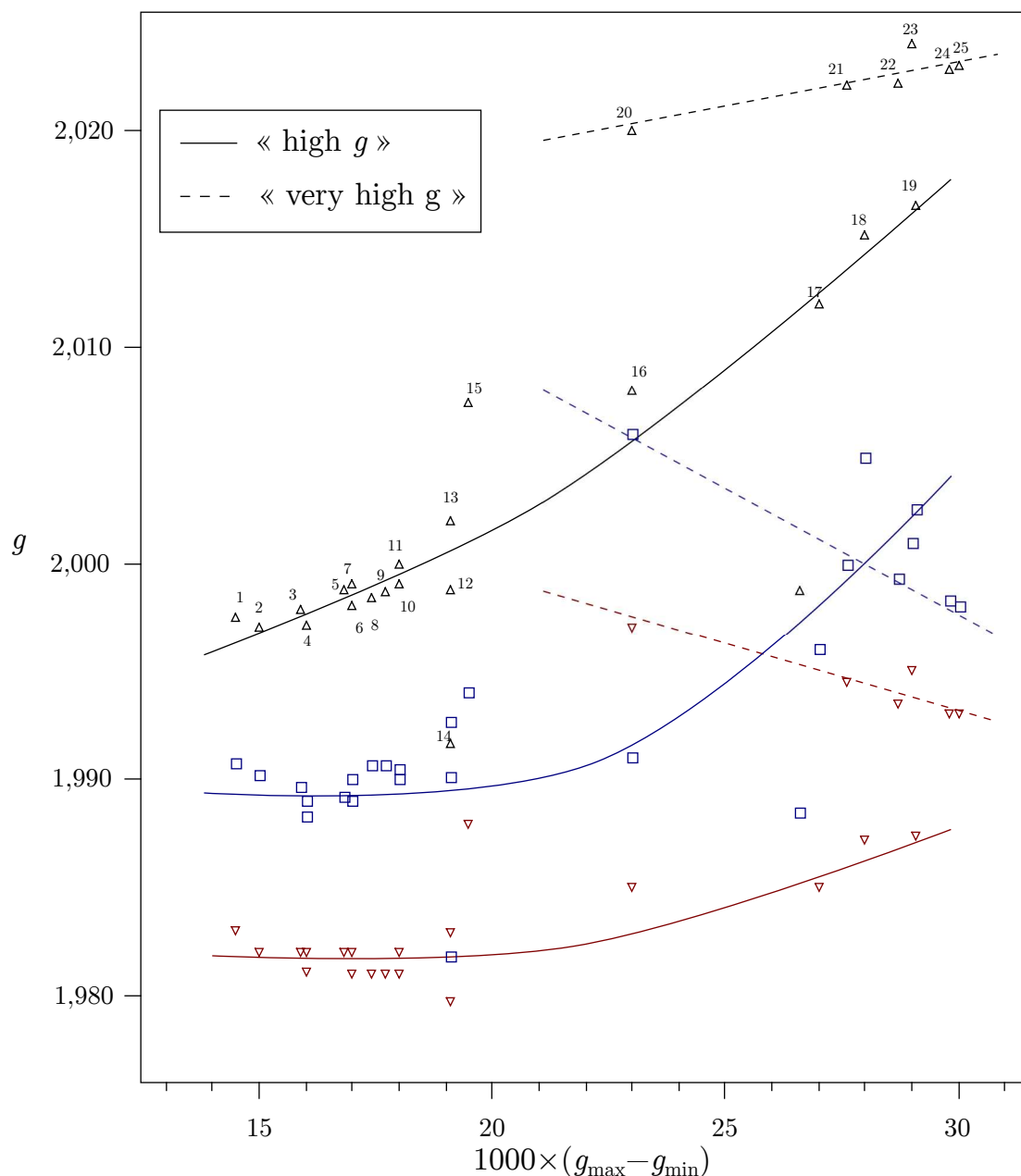


Figure 1.14 – Diagramme de corrélation des valeurs de g en fonction du paramètre d’anisotropie pour les signaux de type « high g » (trait plein) et « very high g » (pointillés). Les signaux « high g » trouvés dans les Nap se concentrent sur la gauche du diagramme. Les signaux plus anisotropes (à droite), qui ne sont pas corrélés aux signaux « very high g », sont trouvés dans les formiate déshydrogénases et polysulfure réductases.

1.4.5 Positionnement de ce travail de thèse

Actuellement (2013), les déterminants de la réactivité et de la sélectivité des enzymes à Mo-*bis*(PGD) ne sont pas clairement identifiés. Comme le montre le cas des nitrate réductases, des sites actifs semblables catalysent des réactions radicalement différentes, et la même réaction peut être catalysée par des sites actifs différents. Le cycle catalytique de la DMSO réductase est encore vivement débattu. La compréhension du mécanisme catalytique des enzymes à Mo-*bis*(PGD)

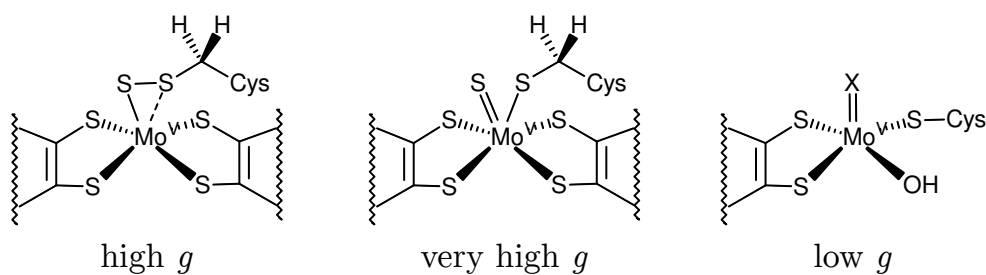


Figure 1.15 – Coordination du Mo^{V} pour les trois types de signaux RPE observés (Biaso *et al.*, 2012).

est encore limitée, en comparaison de la xanthine oxydase ou de la sulfite oxydase. Mais une vision détaillée au niveau atomique est nécessaire pour procéder ensuite à des comparaisons. Les problèmes d'hétérogénéité des échantillons et de plasticité du cofacteur à molybdène, qui sont communément observés, compliquent les études de ces systèmes.

La littérature des enzymes à molybdène montre que l'étude de ces systèmes est délicate, notamment parce que les centres à molybdène montrent une grande *plasticité* et sont sensibles à de nombreux agents. La diversité et la variabilité des signatures RPE Mo^{V} fait toute la richesse mais aussi la complexité de ces enzymes. La sensibilité de la technique à des fines variations structurales en fait un outil précieux.

Les études spectroscopiques et cinétiques sur les systèmes de type Nap ont montré que plusieurs espèces Mo^{V} peuvent être observées. L'espèce « high g resting » est observée chez certaines espèces seulement. Elle est associée à un état inactif de l'enzyme (Fourmond *et al.*, 2008). Chez *R. sphaeroides*, la conversion en une forme active demande une réduction. Cette activation est irréversible et le mécanisme sous-jacent était obscur au début de ce travail de thèse. D'un autre côté, l'espèce « high g nitrate », elle, a été systématiquement observée en présence de nitrate et d'un réducteur. Mais cette dernière est aussi observée en l'absence de nitrate. Une troisième espèce de type « high g », appelée « high g turnover » est générée par réaction avec un viologène (donneur d'électron rapide) et en présence de nitrate. Les études électrochimiques ont cependant montré que les hautes concentrations en nitrate utilisées pour ce type d'expériences favorisent l'apparition d'autres formes inactives (Fourmond *et al.*, 2010b).

Il devient donc essentiel de déterminer ce qui fait la différence entre les formes Mo^{V} de type « high g » : « high g resting », « high g nitrate » et « high g turnover », et si l'une ou l'autre de ces formes relève d'une forme active du cycle catalytique, ou bien d'une forme inhibée de l'enzyme.

Les études combinant spectroscopie RPE et spectroscopie d'absorption des rayons X, les corrélations magnéto-structurales avec d'autres enzymes à molybdène, et les données cristallographiques ont progressivement apporté des éléments sur la structure des espèces Mo^{V} . Aujourd'hui, la sphère de coordination du métal au repos et pendant la catalyse est encore débattue. La nitrate réductase périplasmique représente probablement un nouveau paradigme en termes de mécanisme catalytique. L'étude de cette enzyme est relativement récente, et n'a pas encore eu toute l'attention qu'elle mérite. Des revirements et contradictions sont déjà apparus dans

la littérature.

Plusieurs études de chimie théorique ont avancé des mécanismes catalytiques, sur la base des structures cristallographiques. Mais le lien indispensable avec l'expérience manque cruellement dans ces études. L'objectif de cette thèse est d'apporter de nouvelles données précises sur la réactivité et la structure de l'enzyme, en se focalisant sur le cofacteur à molybdène. Notre approche combine l'électrochimie directe la spectroscopie RPE en mode continu et impulsional, dans le but de caractériser les espèces Mo^{V} dont la pertinence catalytique est actuellement débattue.

Le système sur lequel porte ce travail de thèse est la nitrate réductase périplasmique NapAB de la bactérie pourpre non-sulfureuse *Rhodobacter sphaeroides* forma specialis *denitrificans* IL106. Cette protéine est étudiée dans une collaboration entre l'équipe de Biophysique des Métalloprotéines (BIP) dirigée par Bruno GUIGLIARELLI, l'équipe de Dynamique Réactionnelle des Enzymes Redox Multi-centres (BIP) dirigée par Christophe LÉGER et le Laboratoire de Bioénergétique Cellulaire (IBEB, CEA Cadarache), dirigé par David PIGNOL. Les principales méthodes biophysiques qui y sont mises en œuvre sont la spectroscopie de résonance paramagnétique électronique en mode continu et en mode impulsional, en bande X (9,5 GHz) et en bande Q (34 GHz), et l'électrochimie directe sur film de protéines.

Le premier chapitre 3 présente les résultats sur la cinétique d'activation de l'enzyme, obtenus en combinant l'électrochimie directe et une approche inédite de RPE du Mo^{V} en solution fluide. Les données sont ensuite discutées en faisant appel à la théorie des transferts d'électrons.

Le chapitre 4 est une investigation poussée des espèces paramagnétiques qui sont observées avant, pendant, et après l'activation de l'enzyme. Nous y analysons les signatures RPE en onde continue, leurs propriétés de relaxation, ainsi que leurs couplages hyperfins et intercentres. Nous y proposons un mécanisme moléculaire de l'activation par réduction de l'enzyme, supportée par les données de cinétique et de spectroscopie.

Dans le chapitre 5, nous rassemblons les travaux d'électrochimie directe portant sur l'inactivation de l'enzyme par son substrat, phénomène qui jette un doute sur de nombreuses expériences de piégeage d'intermédiaire suivies par spectroscopie RPE. Deux approches complémentaires de chronoampérométrie ont été mises en œuvre : saturation par le substrat, et échelons de potentiel. La modélisation de l'interconversion entre les formes actives et inactives de l'enzyme nous donne des indices sur l'existence de formes inhibées dans lesquelles le site actif serait paramagnétique.

Le chapitre 6 est une étude prospective de la structure du site actif dans les différents états Mo^{V} de l'enzyme, par spectroscopie hyperfine (ESEEM-HYSCORE). Certains de couplages détectés ont pu être attribués sans ambiguïté.

Chapitre 2

Matériel et méthodes

Sommaire

2.1	Spectroscopie de résonance paramagnétique électronique	61
2.1.1	Principe de la résonance paramagnétique électronique	61
2.1.2	Niveaux d'énergie	63
2.1.3	Instrumentation	70
2.2	Électrochimie des protéines	72
2.2.1	Éléments de cinétique enzymatique	72
2.2.2	Principes de l'électrochimie sur film de protéines	75
2.2.3	Instrumentation	77
2.3	Théorie des transferts d'électrons	78

2.1 Spectroscopie de résonance paramagnétique électronique

2.1.1 Principe de la résonance paramagnétique électronique

Soit un électron (spin $s = 1/2$) non apparié. Son moment magnétique est relié à son spin \hat{s} par la relation de proportionnalité :

$$\hat{\mu} = -g\beta\hat{s} \quad (2.1)$$

La constante fondamentale notée β est le magnéton de BOHR de l'électron, notée également μ_B dans d'autres contextes. Elle est définie par :

$$\beta \equiv \frac{e\hbar}{2m_e} \simeq 9,274\,015\,4(31) \cdot 10^{-24} \text{ J T}^{-1} \quad (2.2)$$

Un électron non apparié placé dans un champ magnétique B subit une levée de dégénérescence de ses niveaux d'énergie : c'est l'effet ZEEMAN, qui est à la base de la spectroscopie RPE. Les deux niveau d'énergie sont séparés par :

$$\Delta W = g\beta B \quad (2.3)$$

Ainsi, l'irradiation du système par une onde de fréquence ν telle que :

$$h\nu = g\beta B \quad (2.4)$$

va induire des transitions entre les deux états. En RPE CW (continuous wave, mode continu), on utilise une fréquence fixe, et le spectre est enregistré en balayant le champ magnétique (schéma 2.1). Pour des raisons de sensibilité, on utilise une modulation du champ magnétique couplée à une détection synchrone. Ceci donne des spectres qui ont une allure de spectre dérivé, tant que l'amplitude de modulation ne dépasse pas la largeur de raies (*sumodulation*). En mode impulsif, le spectre est enregistré en mesurant l'amplitude de l'écho de spin en fonction du champ magnétique. Cela donne directement le spectre d'absorption (electron spin echo-detected field sweep spectrum). Le facteur g est caractéristique du système. Le

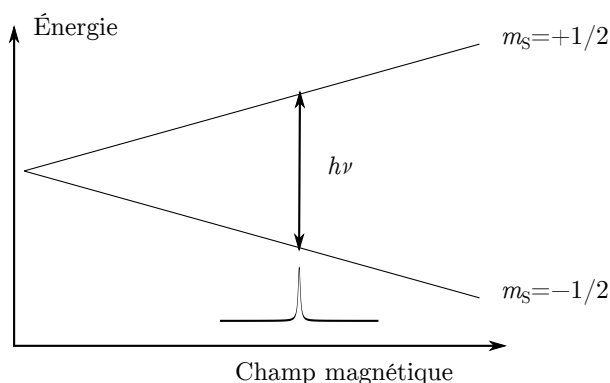


Schéma 2.1 – Niveaux d'énergie d'un spin 1/2, et allure du spectre RPE correspondant.

facteur g de l'électron libre vaut :

$$g_e \simeq 2,002\,319\,304\,386(20) \quad (2.5)$$

Dans le cas le plus général, g est une grandeur tensorielle, c'est à dire que sa valeur dépend de l'orientation du centre paramagnétique par rapport au champ magnétique appliqué. Les *axes magnétiques* du centre sont les axes propres de la matrice \tilde{g} , qui sont orthogonaux. On caractérise une espèce par les valeurs principales de g , qui sont les valeurs propres de cette matrice. La matrice \tilde{g} est dite *rhombique* si ces trois valeurs sont différentes. Le seul cas qui nous concerne dans ce travail est celui où les molécules sont orientées de manière aléatoire dans le champ magnétique, ce qui est le cas d'une *solution gelée* de métalloprotéines. Les spectres obtenus sont appelés *spectres de poudre*. Le schéma 2.2 montre un exemple de spectre rhombique en absorption et en dérivée où sont pointées les valeurs principales de la matrice \tilde{g} . Dans ce manuscrit, nous avons adopté la convention d'écriture suivante :

$$\begin{aligned} g_1 = g_{\max} &= \text{valeur maximale (à bas champ)} \\ g_2 = g_{\text{mid}} &= \text{valeur médiane} \\ g_3 = g_{\min} &= \text{valeur minimale (à haut champ)} \end{aligned}$$

On définit l'*anisotropie* d'une matrice \tilde{g} par :

$$g_1 - g_3 \quad (2.6)$$

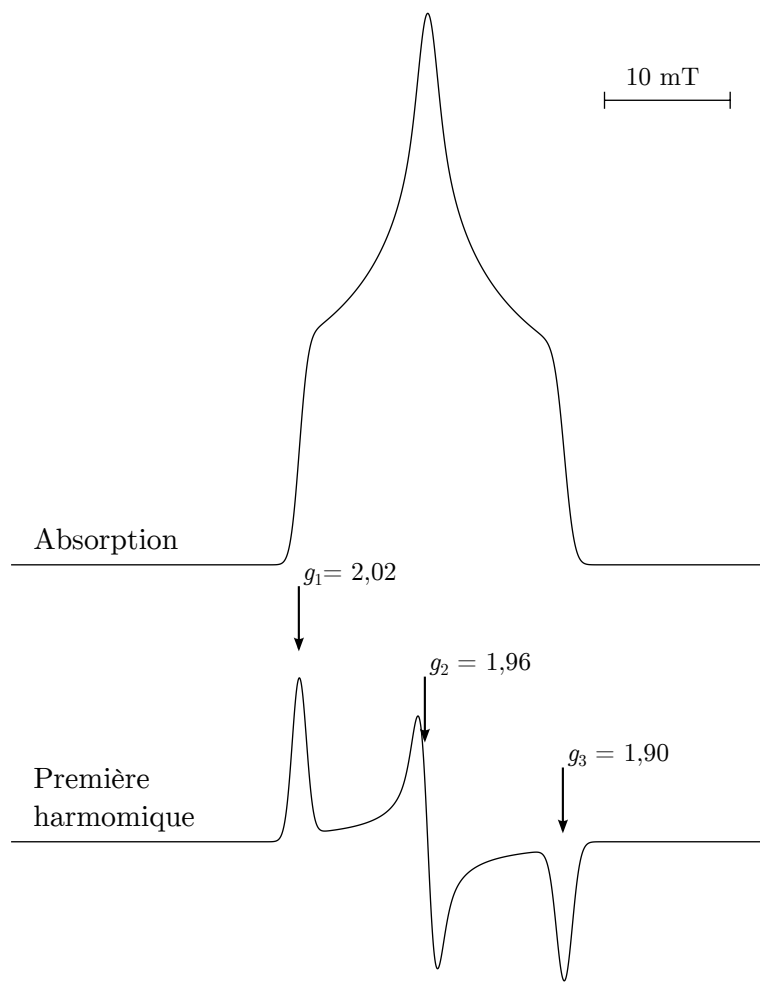


Schéma 2.2 – Allure théorique d'un spectre d'absorption et de sa première harmonique pour un centre à géométrie rhombique en milieu désordonné (poudre ou solution gelée). Spectre simulés pour une fréquence micro-onde de 9,41 GHz

et sa *rhombicité* par :

$$\frac{g_1 - g_2}{g_1 - g_3} \quad (2.7)$$

Dans le cas où le centre paramagnétique présente une symétrie axiale, deux valeurs de g sont égales, et la matrice \tilde{g} est dite *axiale*. Si les trois valeurs de g ne sont pas distinguables, la matrice est dite *isotrope*.

2.1.2 Niveaux d'énergie

Dans un site paramagnétique, le spin de l'électron est couplé aux spins des noyaux environnants (couplage hyperfin), ainsi qu'aux spins des électrons non appariés qui peuvent se trouver à plus grande distance (jusqu'à plusieurs nanomètres).

Les centres paramagnétiques dans la nitrate réductase périplasmique possèdent tous un spin $S = 1/2$. En ignorant les termes de structure fine (qui concernent les spins plus grands) l'hamiltonien le plus général que nous aurons à considérer prend la forme :

$$\hat{H} = \hat{H}_{ZE} + \hat{H}_{HF} + \hat{H}_{NQ} + \hat{H}_{ZN} + \hat{H}_{EE} \quad (2.8)$$

où la signification ainsi que les valeurs typiques des différents termes sont :

$$\begin{aligned}
 \hat{H}_{ZE} &= \beta \vec{B} \cdot \tilde{g} \cdot \hat{S} && \text{terme ZEEMAN électronique} \\
 \hat{H}_{HF} &= \hat{I} \cdot \tilde{A} \cdot \hat{S} && \text{terme hyperfin et superhyperfin} \\
 \hat{H}_{NQ} &= \sum \hat{I}_k \cdot \tilde{P} \cdot \hat{I} && \text{terme quadrupolaire nucléaire} \\
 \hat{H}_{ZN} &= \beta_N \vec{B} \cdot \tilde{g}_N \cdot \hat{I} && \text{terme ZEEMAN nucléaire} \\
 \hat{H}_{EE} &= \hat{S} \cdot \tilde{D} \cdot \hat{S} && \text{terme de couplage électron-électron}
 \end{aligned}$$

Les termes ZEEMAN électronique, ainsi que les couplages hyperfin supérieurs à $\simeq 5$ MHz et les couplages électron-électron sont visibles sur un spectre RPE en mode continu. Les couplages hyperfins inférieurs à 30 MHz, les termes ZEEMAN nucléaire et quadrupolaire sont essentiellement visibles sur les spectres hyperfins obtenu par RPE impulsionnelle.

Couplages hyperfins

Dans la limite haut champ ($A \ll g\beta B$), le terme de couplage électron – noyau peut être traité comme une perturbation du terme ZEEMAN électronique. Un cas simple est celui du couplage avec un noyau de spin $I = 1/2$. La raie RPE est éclatée en un doublet dont les raies sont séparées en champ magnétique de la quantité $A/g\beta$ (schéma 2.3) On donne généralement cet écart en mT, ou la valeur de $|A_{ii}|$ convertie en fréquence (MHz ou cm^{-1}).

Dans le cas d'un spin nucléaire I arbitraire, on observe, dans la limite de haut champ et dans l'hypothèse où les axes propres de \tilde{g} et \tilde{A} sont alignés, un éclatement des raies RPE en $2I + 1$ raies équidistantes, séparées en champ magnétique de la quantité :

$$\Delta B_i = \left| \frac{A_{ii}}{g_i \beta} \right| \quad (2.9)$$

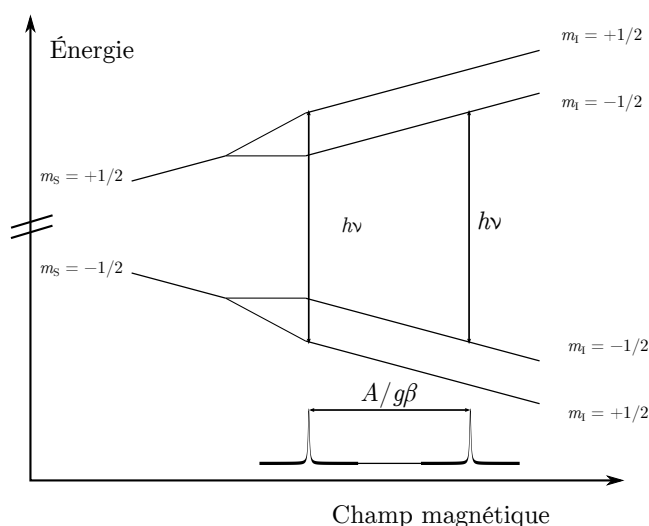


Schéma 2.3 – Niveaux d'énergie et spectre résultant dans le cas d'un couplage avec un spin $I = 1/2$

Spectroscopie HYSCORE

La RPE impulsionnelle repose essentiellement sur la génération d'*échos de spin* grâce à des séquences d'impulsion micro-ondes appropriées, séparées par des durées déterminées, pendant lesquelles le système n'est pas irradié et évolue librement. L'effet d'ESEEM (electron-spin-echo envelope modulation) correspond à une *modulation périodique* de l'*amplitude* de l'écho de spin, en fonction du temps d'évolution entre deux impulsions. Ces modulations ont pour origine le couplage avec les noyaux magnétiques. Le signal ESEEM brut est une fonction d'une variable temporelle. Après transformation de FOURIER, on obtient un spectre en fréquence, qui donne les fréquences de transition nucléaires.

La technique désignée par l'acronyme HYSCORE, pour hyperfine sublevel correlation, est une technique spectroscopique bi-dimensionnelle reposant sur l'effet d'ESEEM. Elle permet de corrélérer les sous-niveaux hyperfins niveaux de nombre M_S différents ($\pm 1/2$) pour des noyaux magnétiques, et est utilisée en particulier pour résoudre les spectres ESEEM compliqués par la présence de plusieurs noyaux.

Dans le cas de NapAB, seuls les couplage avec des noyaux de spin $1/2$ (^1H , ^{13}C , ^{15}N) ou 1 (^{14}N) seront considérés. Le schéma 2.4 donne les niveaux d'énergies au premier ordre et les fréquences observables par HYSCORE dans le cas $\kappa \ll A \ll g_N \beta_N$. Dans ce cas particulier, la valeur de l'interaction hyperfine peut être retrouvée par la relation :

$$A = \frac{1}{8\nu_I} (\nu_{dq+}^2 - \nu_{dq-}^2) \quad (2.10)$$

et les paramètres quadropolaires κ et η (paramètre d'asymétrie) obéissent à (Maryasov et Bowman, 2004) :

$$\kappa^2 (3 + \eta^2) = \left(\frac{\nu_{dq+}}{2}\right)^2 - \nu_I^2 - A\nu_I - \left(\frac{A}{2}\right)^2 \quad (2.11)$$

Sauf précision contraire, la position du champ choisie pour acquérir les spectres est celle correspondant à l'écho primaire maximal. Cette valeur est proche de g_2 . Cela dit, avec une impulsion de 16 ns, la bande de fréquences excitée a une largeur de 63 MHz, ou encore 2,3 mT, ce qui signifie que les transitions en g_1 et g_3 sont aussi excitées en bande X.

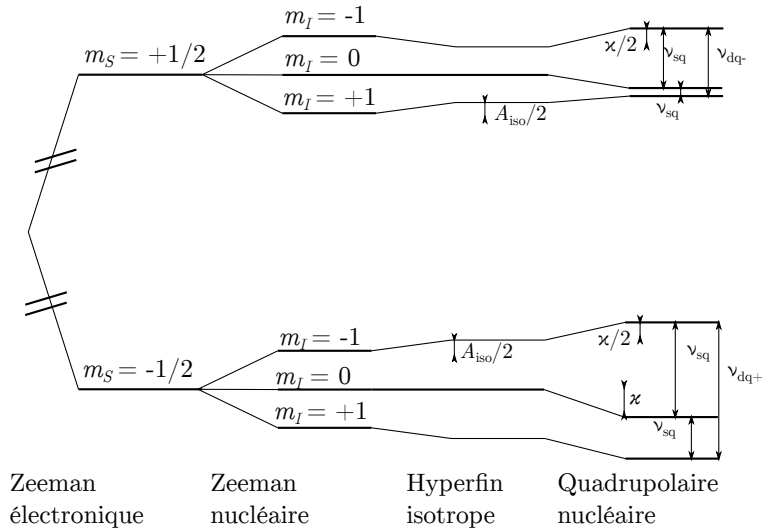
La séquence HYSCORE standard à quatre impulsions est la suivante :

$$\frac{\pi}{2}|y\rangle - \tau - \frac{\pi}{2}|y\rangle - t_1 - \pi_y - t_2 - \frac{\pi}{2}|y\rangle - \text{écho}/x$$

La séquence à six impulsions permet d'atténuer l'effet de suppression croisée de la modulation qui peut se produire dans les systèmes à plusieurs noyaux (Kasumaj et Stoll, 2008) :

$$\frac{\pi}{2}|y\rangle - \tau_1 - \pi_y - \tau_1 - \frac{\pi}{2}|x\rangle - t_1 - \pi_x - t_2 - \frac{\pi}{2}|x\rangle - \tau_2 - \pi_x - \tau_2 - \text{écho}/x$$

Le temps d'évolution, τ , est un paramètre que choisit l'expérimentateur. Cependant, l'instrumentation impose une limite inférieure de 96 ns. Le choix de cette valeur maximise l'intensité de l'écho. Les valeurs plus hautes permettent d'améliorer la résolution sur les basses fréquences (de modulation), au détriment du rapport



dans les deux multiplicités $m_S = -1/2$ et $m_S = +1/2$.

Schéma 2.4 – Niveaux d'énergie au premier ordre et fréquences observables pour un système $S = 1/2, I = 1$ dans le cas d'un couplage faible ($A \ll g_N \beta_N B$) et d'une interaction quadrupolaire faible ($\kappa \ll A$)

signal/bruit. Pour rejeter le signal des protons faiblement couplés, qui est d'environ 15 MHz (fréquence de LARMOR pour un champ 0,35 T), on choisit de valeurs de τ multiples de $\frac{1}{15 \cdot 10^6} \text{ Hz} = 68 \text{ ns}$, soit 136 ns ou 204 ns. Une valeur de τ élevée donne une meilleure *résolution* sur les basses fréquences.

Couplages électron-électron

Lorsque deux centres paramagnétiques sont en interaction, il faut additionner les termes décrivant l'interaction électron-électron à la somme des hamiltoniens des deux centres pris séparément. L'interaction électron – électron est décrite par la superposition de :

- l'interaction dipolaire, qui dépend uniquement de l'éloignement et de l'orientation relative des deux centres
- l'interaction d'échange, qui est une manifestation du principe de PAULI pour les deux électrons non-appariés qui sont soumis à une répulsion coulombienne.

L'interaction magnétique entre deux spins $1/2$ électroniques \hat{S}_A et \hat{S}_B , *supposés ponctuels*, séparés d'une distance r , et caractérisés par les matrices \tilde{g}_A et \tilde{g}_B . L'interaction dipolaire a pour expression :

$$\hat{H}_{\text{dip}} = \frac{\mu_0 \beta^2}{4\pi r^3} \left((\tilde{g}_A \cdot \hat{S}_A) (\tilde{g}_B \cdot \hat{S}_B) - 3 (\vec{u} \cdot \tilde{g}_A \cdot \hat{S}_A) (\vec{u} \cdot \tilde{g}_B \cdot \hat{S}_B) \right) \quad (2.12)$$

où $\vec{u} = \frac{\vec{AB}}{AB}$ est le vecteur unitaire reliant A à B. Au premier ordre, l'interaction dipolaire entre deux centres isotropes a pour conséquence un dédoublement des raies de chaque centre, l'éclatement en champ magnétique valant :

$$\Delta B = \frac{\mu_0 \beta}{4\pi r^3} g_A g_B (1 - 3 \cos^2 \gamma) \quad (2.13)$$

où γ est l'angle entre \vec{u} et \vec{B} . Lorsque deux électrons non appariés sont suffisamment proches, une interaction coulombienne apparaît entre eux. On modélise cette

interaction par un terme d'échange, l'hamiltonien de HEISENBERG. Différentes définition existent. Celle que nous avons utilisé pour les simulations de spectres est la suivante :

$$\hat{H}_{\text{ech}} = \hat{S}_A \cdot \tilde{J} \cdot \hat{S}_B \quad (2.14)$$

Le plus souvent, l'anisotropie de \tilde{J} est négligeable, et la matrice se réduit à un scalaire :

$$\hat{H}_{\text{ech}} = +J\hat{S}_B \cdot \hat{S}_B \quad (2.15)$$

Cette interaction peut avoir un effet complexe sur les spectres. À la limite $J \ll g\beta B$, les raies des deux centres sont éclatées de $J/g\beta$ en champ magnétique.

Cas d'un centre paramagnétique en solution fluide

Le chapitre 1 présente des spectres Pour un centre paramagnétique rhombique en mouvement, la matrice \tilde{g} et la matrice de couplage hyperfin \tilde{A} peuvent s'écrire comme la somme d'un terme indépendant du temps et d'un terme variable à valeur moyenne nulle :

$$\begin{aligned} \tilde{g} &= g_{\text{iso}} + \tilde{g}'(t) & g_{\text{iso}} &= \frac{g_x + g_y + g_z}{3} & \langle \tilde{g}'(t) \rangle_t &= 0 \\ \tilde{A} &= A_{\text{iso}} + \tilde{A}'(t) & A_{\text{iso}} &= \frac{A_x + A_y + A_z}{3} & \langle \tilde{A}'(t) \rangle_t &= 0 \end{aligned}$$

L'échelle de temps τ_c de la variation des termes $\tilde{g}'(t)$ et $\tilde{A}'(t)$ s'appelle le temps de corrélation rotationnelle. Pour une molécule sphérique, on peut estimer sa valeur par la relation :

$$\tau_c = \frac{4\pi\eta R^3}{3k_B T} \quad (2.16)$$

où η est la viscosité dynamique du solvant et R le rayon hydrodynamique de la molécule.

En solution gelée, les molécules sont figées dans des orientations uniformément distribuées : les observables sont indépendantes du temps, et on a un spectre de poudre. Pour une vitesse de rotation infinie, les termes dépendant du temps sont nuls et l'on observe une unique raie en g_{iso} , avec un éclatement hyperfin valant $A_{\text{iso}}/\beta g_{\text{iso}}$. C'est le régime de haute mobilité, ou régime isotrope. Entre ces deux cas limites, deux niveaux d'énergies différentes vont être résolus si l'écart en fréquence entre ceux-ci est prépondérant devant la fréquence $1/\tau_c$.

Cas des espèce Mo^V

Le Mo⁵⁺ est un ion de transition d¹ paramagnétique ($S = 1/2$) qui contient moins de 5 électrons d. Son facteur g est donc inférieur au facteur g de l'électron libre, g_e :

L'attribution non-ambiguë d'une signature RPE à une espèce Mo^V se fait par l'examen des raies satellites du spectre, dues au couplage hyperfin entre l'électron et les noyaux ⁹⁷Mo et ⁹⁵Mo qui possèdent un spin $I = 5/2$. L'abondance naturelle cumulée de ces isotopes est voisine de 25% (tableau 2.1). Puisque les facteurs g nucléaires des deux isotopes paramagnétique du molybdène sont très proches, ils donnent des éclatements de raies quasiment identiques, et il n'est pas possible de distingues les contributions de chaque isotope sur un spectre.

Tableau 2.1 – Caractéristiques magnétiques nucléaires des isotopes stables du molybdène (Emsley, 2001)

Isotope	Abondance naturelle (%)	Spin nucléaire	Facteur g nucléaire	Moment quadrupolaire (barn)
^{92}Mo	14,84	0		
^{94}Mo	9,25	0		
^{95}Mo	15,92	$5/2$	-0,9142	-2,2
^{96}Mo	16,68	0		
^{97}Mo	9,55	$5/2$	-0,9335	25,5
^{98}Mo	24,13	0		
^{100}Mo	9,63	0		

Sauf mention contraire, la fréquence de modulation utilisée est égale à 100 kHz. La calibration du champ magnétique est faite grâce au « weak pitch » Bruker ($g = 2,0028$). La quantification du nombre de spin présents dans la cavité est faite par double intégration et comparaison avec un échantillon standard contenant 1,0 mM de CuSO_4 dans 10 mM EDTA, 100 mM TRIS HCl, pH=8,0 et stocké dans l'azote liquide. Le spectre enregistré $s(B)$ est d'abord normalisé vis-à-vis du nombre de points, du gain récepteur, du temps de conversion et de la plage de champ, puis on détermine la valeur de la double intégrale. La quantité de spins présents dans la cavité est proportionnelle, hors saturation, à

$$N_{\text{spin}} \propto \left(\iint s_N(B) dB \right) \frac{T}{g_P B_m \sqrt{P_{\text{mw}}}} \quad (2.17)$$

où s_N est le spectre normalisé, B_m est l'amplitude de la modulation, P_{mw} est la puissance micro-ondes, et g_P est le facteur d'amplitude de raie, approché par l'expression (Aasa et Vännngård, 1975) :

$$g_P \propto \frac{2}{3} \sqrt{\frac{g_1^2 + g_2^2 + g_3^2}{3}} + \frac{1}{3} \frac{g_1 + g_2 + g_3}{3} \quad (2.18)$$

Les valeurs de g_P que nous avons utilisé sont regroupées dans le tableau suivant :

	g_1	g_2	g_3	g_P
Mo^{V} « high g »	1,998	1,990	1,980	1,989
$[\text{Fe}_4\text{S}_4]^+$	2,04	1,945	1,900	1,964
hèmes Fe^{III}	2,935	2,277	1,506	2,289
Cu(II)(EDTA)	2,292	2,063	2,063	2,141

RPE en mode impulsionnel

Le réglage de la chaîne d'excitation et de détection se fait en se plaçant au champ magnétique donnant l'écho maximal. La puissance délivrée par l'amplificateur TWT est réglée grâce à un atténuateur. L'atténuation est ajustée pour obtenir un écho maximal. Une puissance d'impulsion trop élevée peut diminuer l'amplitude de l'écho. La phase de détection est ajustée en minimisant la partie imaginaire. Le gain vidéo (VG) est le gain de l'amplificateur avant numérisation du signal. Il est

faut l'ajuster pour maintenir l'écho dans un intervalle donné. Un gain vidéo trop faible peut donner un *bruit de quantification*, alors qu'un gain vidéo trop important donne un effet de saturation du signal.

Les séquences d'impulsion simples peuvent être entrées manuellement. Les séquences complexes à intervalles incrémentés de type HYSCORE sont entrées dans un fichier texte qui est ensuite compilé pour le spectromètre (langage PulseSpel).

Spectre en absorption

Pour enregistrer le spectre d'absorption RPE, on applique une séquence

$$\frac{\pi}{2} - t_1 - \pi - \text{écho}$$

et on intègre l'écho primaire entre les deux points à mi-hauteur. On utilise :

$$\begin{aligned} \frac{\pi}{2} &\longrightarrow 16 \text{ ns} \\ \pi &\longrightarrow 32 \text{ ns} \\ t_1 &= 200 \text{ ns} \end{aligned}$$

Nous avons enregistré les spectres ESEEM-HYSCORE en bande X avec un temps d'évolution τ égal à 96 ns, 136 ns, ou 204 ns. 96 ns est la plus courte valeur accessible avec notre spectromètre. La valeur de 136 ns permet d'éliminer la contribution des protons faiblement couplés, à 15 MHz. À 204 ns, on élimine également cette contribution tout en gagnant en résolution sur les fréquences de modulation basses.

Dans un premier temps, on enregistre le signal temporel après la séquence d'impulsion pour repérer la position de l'écho inversé. Puis, on optimise l'inversion de l'écho en enregistrant l'intensité de l'écho en incrémentant la durée de l'impulsion π . On choisit la plus petite valeur qui permet d'obtenir l'écho inversé maximal. L'acquisition du spectre est ensuite lancée. Nous avons utilisé un cyclage de phase à 8 étapes :

	1	2	3	4	5	6	7	8
	+x	-x	+x	-x	+x	-x	+x	-x
	+x	+x	-x	-x	+x	+x	-x	-x
	+x	+x	+x	+x	+x	+x	+x	+x
	+x	+x	+x	+x	-x	-x	-x	-x
Re	+a	-a	-a	+a	-a	+a	+a	-a
Im	+b	-b	-b	+b	-b	+b	+b	-b

Le grand nombre de points de mesure (256×256 , soit 65 536 dans nos mesures) est la cause d'un temps d'acquisition très long. Celui-ci dépend directement du temps de relaxation longitudinale du centre, du nombre de points, et du nombre de mesures accumulées en un point. Si ce dernier paramètre n'a pas d'incidence sur la *forme* du spectre obtenu, le nombre de points est relié à l'incrément Δt appliqué aux temps t_1 et t_2 . La résolution en fréquence du spectre obtenu après la transformation de FOURIER discrète est égale à $\frac{1}{\Delta t}$.

Le temps de relaxation longitudinale dépend fortement de la température. Une basse température peut être nécessaire pour observer une espèce dont la relaxation est très rapide. Ce n'est pas le cas des signaux Mo^{V} de Nap, mais la présence concomitante du centre fer-soufre paramagnétique demande une température intermédiaire.

Traitement du signal ESEEM – HYSORE

Le signal brut dans le domaine temporel correspond à un tableau de valeurs de dimension 256×256 . Pour obtenir les spectres en domaine fréquentiel présentés au chapitre 4, une transformée de FOURIER à deux dimensions doit être appliquée. Le traitement suivant est appliqué.

1. Sélection de la partie réelle du signal.
2. Élimination de la décroissance de l'écho : sur chaque tranche en t_1 , on ajuste un polynôme de degré 3 que l'on retranche. On répète l'opération sur les tranches en t_2 .
3. Apodisation : pondération par le carré de la fonction de HAMMING, dans les deux directions. La fonction de HAMMING est définie, pour $0 \leq x \leq 1$, par :

$$x \mapsto 0,54 + 0,46 \cos(\pi x) \quad (2.19)$$

Ici, $x = \frac{t_n}{t_{256}}$ correspond à la variable de temps réduite.

4. Zero-filling : prolongation des données par des zéros jusqu'à 1024×1024 .
5. Transformée de FOURIER discrète à deux dimensions.
6. Calcul du module des données.
7. Symétrisation par rapport aux diagonales avec une moyenne arithmétique

2.1.3 Instrumentation

2.1.3.1 Mode continu

Mesures à températures cryogéniques

L'appareil utilisé est un spectromètre Bruker ELEXSYS 500. La source de micro-ondes est une diode GUNN. Le résonateur bande X est une cavité rectangulaire en mode perpendiculaire TE102, type ST, équipée d'un cryostat à flux d'hélium Oxford Instrument ESR900. Le contrôle de la température est assuré par un ITC Oxford Instruments 503S.

En bande Q, cavité est de type ER5106 QT placée dans un cryostat à bain d'hélium Oxford instruments CF935 ; la fréquence est mesurée avec un fréquencemètre Hewlett-Packard 5352B.

Mesures à température ambiante

Pour les mesures sur des échantillons aqueux, nous utilisons un spectromètre Bruker ESP300E. Le résonateur est une cavité cylindrique de type SHQ, équipée au besoin d'un cryostat à flux d'azote avec un contrôleur de température Bruker.

2.1.3.2 Mode impulsionnel

L'appareil utilisé est un Elexsys E-580 de Bruker Biospin. Le résonateur est placé dans un cryostat à bain d'hélium. La température y est réglée grâce à un contrôleur ITC 503S (Oxford Instruments).

Bande X

Le module de mise en forme des signaux est un SpecJet II, qui a une base de temps de 2 ns. Les impulsions sont amplifiées grâce à un amplificateur à tube à onde progressive (TWT, travelling wave tube) modèle 117X de Applied Systems Engineering (Fort Worth, Texas). Le temps mort du spectromètre (temps entre la dernière impulsion et la détection) vaut 80 ns. Le résonateur est de type ER4118X, de 291 MHz de bande passante. Une impulsion $\frac{\pi}{2}$ typique avec 5 dB d'atténuation a une durée de 16 ns, ce qui correspond à une largeur d'excitation de $\frac{1}{16 \text{ ns}} = 62,5 \text{ MHz} \Leftrightarrow 2,2 \text{ mT}$.

Bande Q

Le résonateur est de type EN5107D2

2.2 Électrochimie des protéines

2.2.1 Éléments de cinétique enzymatique

Cinétique enzymatique

La constante de MICHAELIS correspond à la concentration en substrat pour laquelle la vitesse *initiale* est égale à la moitié de sa valeur maximale, obtenue à concentration infinie. Si la vitesse initiale de la réaction peut être modélisée par l'hyperbole d'équation :

$$v = \frac{v_{\infty}}{1 + \frac{K_M}{s}} \quad (2.20)$$

, où s est la concentration molaire en substrat, alors le paramètre K_M correspond à la constante de MICHAELIS (Michaelis et Menten, 1913). Dans ces conditions, la constante de MICHAELIS peut être comprise comme la constante de dissociation du complexe enzyme-substrat. Plus celle-ci est petite, plus l'enzyme a d'affinité pour son substrat.

Inhibition réversible

Un inhibiteur est un facteur qui va ralentir une réaction enzymatique. Là encore, on ne considère que les mesures de vitesse initiale de réaction, où les produits ne se sont pas accumulés. On distingue plusieurs modes d'inhibition *réversible*.

Inhibition compétitive L'inhibition compétitive correspond au cas où l'inhibiteur se lie au site actif, empêchant la liaison du substrat. Ceci va avoir pour effet de déplacer l'équilibre entre les formes de l'enzyme liées au substrat et celles sans substrat, ce qui revient à augmenter la constante de MICHAELIS apparente. L'inhibition peut être levée par une augmentation de la concentration en substrat. La vitesse maximale n'est pas affectée.

$$v = \frac{v_{\infty}}{1 + \left(1 + \frac{i}{K_i}\right) \frac{K_M}{s}} \quad (2.21)$$

$$K_M^{\text{app}} = K_M \left(1 + \frac{i}{K_i}\right) \quad (2.22)$$

Inhibition non-compétitive Un inhibiteur non-compétitif peut se fixer à l'enzyme libre comme au complexe enzyme-substrat. La conséquence est une diminution de la vitesse maximale de la réaction. On ne peut pas lever l'inhibition par une augmentation de la concentration en substrat.

$$v = \frac{v_{\infty}}{\left(1 + \frac{K_M}{s}\right) \left(1 + \frac{i}{K_i}\right)} \quad (2.23)$$

$$v_{\infty}^{\text{app}} = \frac{v_{\infty}}{1 + \frac{i}{K_i}} \quad (2.24)$$

Inhibition incompétitive ou anti-compétitive Un inhibiteur incompétitif ne se fixe que sur le complexe enzyme–substrat, pas sur l’enzyme libre. La vitesse maximale ainsi que l’affinité apparente de l’enzyme sont affectées

$$v = \frac{v_{\infty}}{1 + \frac{K_M}{s} + \frac{i}{K_i}} \quad (2.25)$$

$$v_{\infty}^{\text{app}} = \frac{v_{\infty}}{1 + \frac{i}{K_i}} \quad (2.26)$$

$$K_M^{\text{app}} = K_M \left(1 + \frac{i}{K_i} \right) \quad (2.27)$$

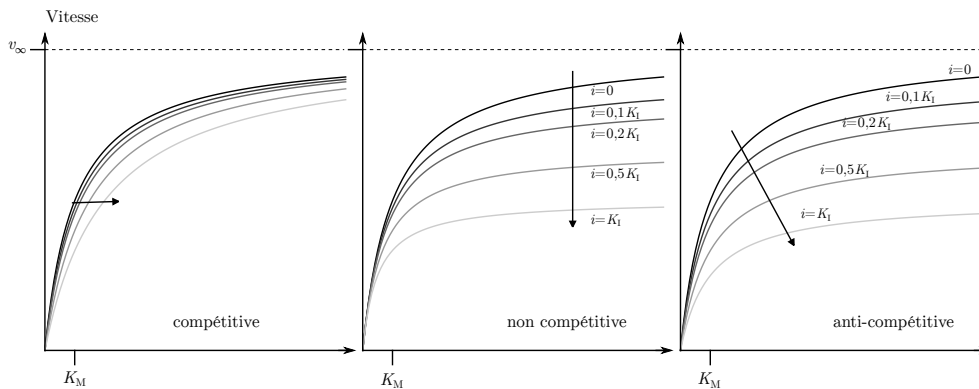


Figure 2.1 – Courbes théorique de l’activité enzymatique en fonction de la concentration en substrat (en unité de K_M) pour les trois types d’inhibition, pour différentes concentration en inhibiteur. On a fixé arbitrairement $K_i = 10K_M$

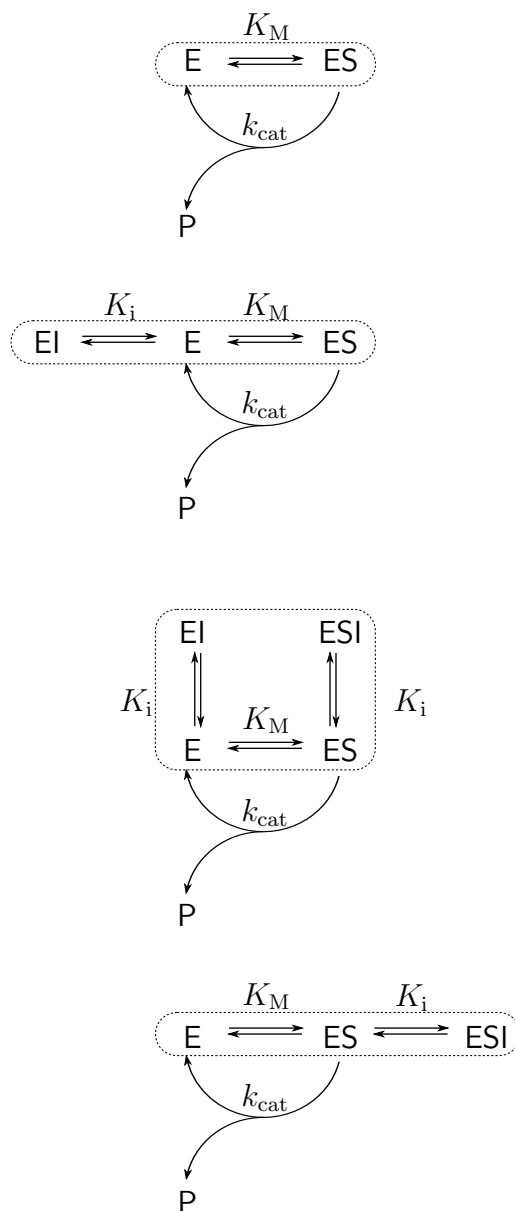


Figure 2.2 – Mécanismes enzymatiques modèles pour la loi de MICHAELIS & MENTEN, inhibition compétitive, non compétitive (K_i a la même valeur sur les deux branches.), anti-compétitive.

Irréversible Dans le cas d'une inhibition irréversible, le complexe enzyme–inhibiteur ne peut pas être réactivé par dissociation de celui-ci. La réaction d'inhibition est donc quantitative jusqu'à épuisement du réactif limitant. Si l'inhibiteur est en excès, il n'y a aucune activité au bout d'un temps suffisamment long. Si l'inhibition est lente, on peut la modéliser par une décroissance lente de la concentration d'enzyme active.

Inhibition réversible par le substrat

Ce cas de figure correspond à une activité enzymatique croissante puis décroissante à mesure que la concentration en substrat augmente. Si on substitue la concentration en substrat s à la concentration en inhibiteur i dans les équations

(2.22), (2.24), et (2.26), nous obtenons successivement :

Pour (2.22) :

$$v = \frac{v_{\infty}}{1 + \frac{K_M}{s} + \frac{K_M}{K_i}} \quad (2.28)$$

pour (2.24) :

$$v = \frac{v_{\infty}}{1 + \frac{s}{K_i} + \frac{K_M}{s} + \frac{K_M}{K_i}} \quad (2.29)$$

pour (2.26) :

$$\boxed{v = \frac{v_{\infty}}{1 + \frac{K_M}{s} + \frac{s}{K_i}}} \quad (2.30)$$

L'inhibition par le substrat n'est donc visible que lorsqu'elle est de type non-compétitive ou anti-compétitive, qui est le cas le plus simple. C'est dans ce cadre que nous nous plaçons dans ce travail, l'équation (2.30) définissant la constante de MICHAELIS et le constante d'inhibition.

2.2.2 Principes de l'électrochimie sur film de protéines

Le courant mesuré correspond au flux d'électrons nécessaires à la réduction du nitrate sur l'électrode. Le courant enregistré est proportionnel au produit de la vitesse de *turnover* v par la couverture électroactive Γ :

$$i = 2\mathcal{F}A\Gamma v$$

où \mathcal{F} est la constante de FARADAY et A est la surface de l'électrode. La couverture électroactive correspond à la concentration surfacique en enzymes actives. Γ est et v est la vitesse de transformation du substrat :

$$v = -\frac{d[\text{NO}_3^-]}{dt}$$

La mesure du courant donne donc directement accès à l'activité des enzymes adsorbées. La quantité d'espèces consommées au cours du temps est négligeable : on parle de *micro-électrolyse*. La force motrice de la réaction est imposée par le potentiel de l'électrode.

Un inconvénient de cette technique est qu'elle ne donne pas une mesure absolue de l'activité d'un échantillon, parce que la couverture électroactive est le plus souvent trop petite pour être mesurable. Les molécules déposées sur l'électrode s'orientent de manière *a priori* aléatoire. Bien que la quantité de protéine déposée soit connue, seule une fraction peut échanger des électrons avec l'électrode, et donner du courant.

Un autre inconvénient est la perte irréversible du catalyseur, qui se traduit par une diminution plus ou moins lente ($k_d \leq 10^{-3} \text{ s}^{-1}$) et irréversible du courant mesuré. Ceci est usuellement attribué à la désorption des enzymes actives.

À la surface de l'électrode, les enzymes actives consomment les substrats (proton et nitrate) et relarguent le produit (nitrite). La concentration locale en substrat est alors inférieure à celle en solution, loin de l'électrode, ce qui est source d'artefacts, notamment à basse concentration en substrat. On parle de limitation par transport de matière. Pour s'en affranchir, on utilise une électrode tournante, qui génère un flux d'électrolyte à la surface de l'électrode. Ceci réduit l'épaisseur de la couche de diffusion. Avec NapAB, les vitesses de rotation sont typiquement de 3 krpm à 5 krpm. Pour des courants supérieurs à 5 μA , la limitation par la diffusion reste présente même avec la vitesse de rotation maximale de 10 krpm.

Mode opératoire

L'enzyme en solution est déposée sur une électrode de graphite pyrolytique « edge plane » préalablement abrasée avec de l'alumine. Ce traitement rend la surface du carbone hydrophile et permet l'adsorption de la protéine, qui forme un *film* sur l'électrode. De l'alumine α (Buehler) 1 μm est déposée sur un coton humidifié, et l'électrode est frottée sur le coton. une fois abrasée, l'électrode est soumise à des ultrasons pendant quelques minutes, puis rincée à l'eau distillée et séchée. De la néomycine (un aminoglycoside) peut être déposée avec l'enzyme pour améliorer la stabilité du film. On dépose habituellement 0,6 μl de sulfate de néomycine (CAS : 1405-10-3) à 0,2 M, puis on laisse sécher l'électrode. Ensuite, 0,6 μl de solution stock d'enzyme est déposée sur l'électrode. Un film de NapAB peut avoir une activité stable sur plusieurs heures. Le tampon utilisé contient :

MES (acide 2-(<i>N</i> -morpholino)ethanesulfonique)	5 mM
HEPES (acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazineéthanesulfonique)	5 mM
AcONa	5 mM
TAPS (acide <i>N</i> -tris(hydroxyméthyl)méthyl-3-aminopropanesulfonique)	5 mM
CHES (acide <i>N</i> -cyclohexyl-2-aminoéthanesulfonique)	5 mM
NaCl	0,1 M
NaOH	qsp pH

Le bras de référence, lui, est rempli d'une solution de NaCl à 0,1 M

L'analyse des données d'électrochimie a été faite avec les programme SOAS et qSOAS, écrits par Christophe LÉGER et Vincent FOURMOND (Fourmond *et al.*, 2009a), et disponibles à l'adresse :

<http://bip.cnrs-mrs.fr/bip06/qsoas/index.html>.

Types de mesures

Deux type d'expériences seront présentés dans ce travail :

en voltampérométrie cyclique le potentiel est balayé d'un point à un autre. On utilise une voltamétrie « en escalier » : le potentiel varie par petits échelons, et la valeur du courant est mesurée juste avant l'échelon suivant. On minimise ainsi la contribution du courant de chargement de l'électrode (courant capacitif). On représente le courant mesuré en fonction du potentiel imposé.

Si la catalyse est à l'état stationnaire à chaque instant, le voltampérogramme obtenu ne dépend ni de la vitesse ni du sens de balayage en potentiel. On obtient alors un « portrait » de l'activité de l'enzyme en fonction du potentiel

en chronoampérométrie on représente le courant en fonction du temps, le potentiel étant stationnaire ou variant par échelons. Ce type de mesure permet d'étudier les variations d'une activité non stationnaire.

La variation du potentiel par échelons donne lieu à de forts courants capacitifs (plusieurs μA), qui peuvent masquer un régime transitoire que l'on veut étudier. Pour éliminer le courant capacitif, l'électrode est abrasée pour ôter l'enzyme une fois les mesures terminées, et la même procédure est appliquée avec l'électrode dépourvue d'enzyme. Le courant obtenu est ensuite retranché du courant enregistré avec l'enzyme.

2.2.3 Instrumentation

Toutes les mesures électrochimiques ont été effectuées en boîte-à-gants sous atmosphère d'azote ($[\text{O}_2] \leq 10 \text{ ppm}$). Le montage électrochimique utilisé comporte trois électrode :

- l'électrode de travail (ET), qui est une électrode tournante en graphite pyrolytique « edge plane ».
- l'électrode de référence (ER), au calomel saturé en KCl,
- la contre-électrode (CE), en platine.

Le système est contrôlé grâce à un potentiostat Autolab commandé par les programmes GPES ou Nova. La cellule électrochimique est constituée d'un compartiment thermostaté, de volume inférieur à 10 ml, relié par un capillaire (diamètre interne $< 1 \text{ mm}$) à un bras de référence étanche, qui héberge l'électrode de référence. Ce système permet d'utiliser une électrode de référence de taille classique, tout en gardant un petit volume de travail. On peut changer la température de l'enzyme sans changer la température (et donc le potentiel) de l'électrode de référence (schéma 2.5). Sauf mention contraire, toutes les mesures avec NapAB ont été faites à $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

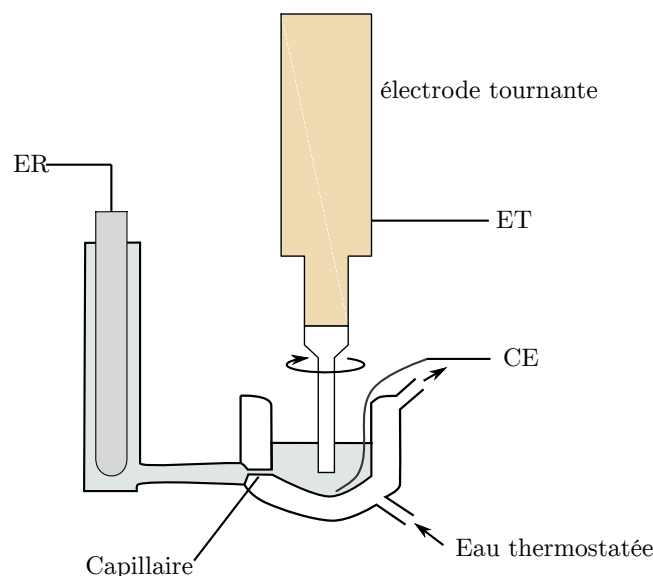


Schéma 2.5 – Cuve électrochimique utilisée. Le bras de référence est déporté pour rester à température ambiante

2.3 Théorie des transferts d'électrons

Nous présentons ici certains concepts repris dans la discussion du chapitre 1. Dans le modèle de MARCUS, les mouvements des noyaux atomiques sont traités classiquement, comme des oscillateurs harmoniques. La vitesse de transfert d'électron prend alors la forme suivante :

$$k_{TE} = \nu \exp \left(-\frac{(\Delta_r G^\circ + \lambda)^2}{4\lambda k_B T} \right) \quad (2.31)$$

Dans cette expression, λ est l'énergie de réorganisation nucléaire, et ν est la fréquence de vibration des liaisons, de l'ordre de 10^{13} Hz. Cette expression s'applique dans le cas où les centres sont fortement couplés ; le régime est dit adiabatique.

En milieu biologique, les centres redox sont faiblement couplés. Le régime est dit non-adiabatique. Dans une approche quantique du transfert d'électron, on note ϕ_A et ϕ_B les orbitales localisées respectivement sur les sites A et B. Le transfert d'un électron de A à B revient à le faire passer de l'état $|\phi_A\rangle$ à l'état $|\phi_B\rangle$. La vitesse de transfert des électrons s'exprime alors avec un facteur électronique T_{AB} , ou élément de matrice de couplage électronique (Hopfield, 1974), et qui dépend du recouvrement entre ϕ_A et ϕ_B :

$$k_{TE} = \frac{2\pi}{\hbar} |T_{AB}|^2 (FC) \quad (2.32)$$

Dans cette expression, le facteur de FRANCK-CONDON (FC) dépend des mouvements des noyaux. Dans la limite de haute température, ce facteur prend une expression semblable à l'équation 3.50 :

$$k_{TE} = \frac{2\pi}{\hbar} \frac{|T_{AB}|^2}{\sqrt{4\pi\lambda k_B T}} \exp \left(-\frac{(\Delta_r G^\circ + \lambda)^2}{4\lambda k_B T} \right) \quad (2.33)$$

Des modèles empiriques (Page *et al.*, 1999) prédisent une décroissance exponentielle de $|T_{AB}|^2$ avec la distance intercentre r , et donc de la vitesse de transfert :

$$|T_{AB}|^2(r) = |T_{AB}|^2(r_0) \exp(-\beta(r - r_0)) \quad (2.34)$$

où r_0 est la distance de contact des sphères de VAN DER WAALS des deux centres considérés. β est ici un coefficient d'atténuation, estimé à $0,9 \text{ \AA}^{-1}$ entre deux centres synthétiques connectés par des liaisons covalentes, et $3,5 \text{ \AA}^{-1}$ dans le vide. La valeur moyenne de $1,4 \text{ \AA}^{-1}$ a été proposée pour les protéines (Moser *et al.*, 1992). Ce modèle empirique est cependant pris en défaut dans certains systèmes, comme les nitrite réductase (Farver *et al.*, 2002).

Chapitre 3

Étude du mécanisme de l'activation irréversible de Nap

Sommaire

3.1 Introduction	80
3.1.1 L'hétérogénéité du site actif dans l'état « as prepared »	81
3.1.2 L'hétérogénéité d'activité enzymatique dans l'état « as prepared »	81
3.1.3 Recherche du mécanisme de l'activation	85
3.1.4 Modélisation de l'activation	87
3.1.5 Corrélation à l'espèce « high g resting »	88
3.2 Résultats	89
3.2.1 Persistance de l'espèce « high g resting » en réduction	89
3.2.2 Étude cinétique par RPE à température ambiante de la réduction de l'espèce « high g resting »	93
3.2.3 Recherche des déterminants	98
3.2.4 Étude par chronoampérométrie de l'influence de la température sur la vitesse d'activation	104
3.3 Discussion	107
3.3.1 Mécanismes proposés pour l'activation par réduction	108
3.3.2 Confrontation des deux modèles	113
3.3.3 Résumé et Perspectives	115

3.1 Introduction

Les travaux menés au BIP en 2008 ont montré que l'espèce Mo^{V} « high g resting », observée dans l'enzyme « as prepared », correspond à un état inactif de l'enzyme, qui devient actif par réduction (Fourmond *et al.*, 2008). Nous présentons dans cette section les principaux résultats obtenus alors. J'ai reproduit certains d'entre eux, et j'ai choisi de montrer les données que j'ai enregistrées.

3.1.1 L'hétérogénéité du site actif dans l'état « as prepared »

La nitrate réductase périplasmique de *Rhodobacter sphaeroides* est produite par surexpression homologue et purification, en aérobie, de l'extrait périplasmique par chromatographie d'affinité (Sabaty *et al.*, 2001). La protéine ainsi purifiée

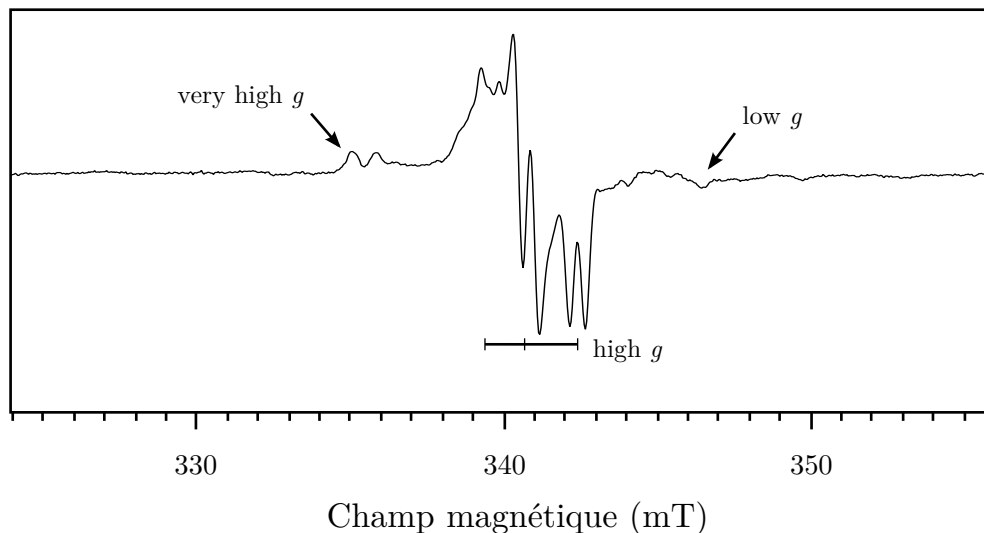


Figure 3.1 – Spectre RPE de NapAB (115 μM) « as prepared » montrant un mélange des espèces « high g resting », « very high g » et « low g ». 55 K, 1 mW, 0,2 mT, 20 scans. $[\text{Mo}^{\text{V}}]_{\text{total}} = 19 \mu\text{M}$

est dans un état appelé « as prepared » : elle n'a subi aucun traitement oxydant ou réducteur. L'étude de cet état par RPE met en évidence l'hétérogénéité du site actif. Plusieurs signaux Mo^{V} peuvent être détectés. Ils sont appelés « high g resting », « very high g » et « low g ». L'espèce « low g » est attribuée à une forme inactive de l'enzyme, où l'un des ligands dithiolène est dissocié du molybdène (Butler *et al.*, 1999; Biaso *et al.*, 2012), tandis que l'espèce « very high g » est associée à une forme modifiée de l'enzyme. Jusqu'ici, l'espèce « very high g » a été observée dans les échantillons de NapAB uniquement. Comme on peut le voir sur la figure 3.1, le spectre RPE d'un échantillon « as prepared » de NapAB présente un mélange de ces trois espèces Mo^{V} . Le spectre présenté est celui d'une préparation que j'ai caractérisé pendant ma thèse. On voit que l'espèce « high g resting » y est majoritaire. Le doublet vers 334 mT correspond à la raie g_1 du signal « very high g », et la raie négative à 346 mT indique la présence d'une petite fraction d'espèce « low g ».

3.1.2 L'hétérogénéité d'activité enzymatique dans l'état « as prepared »

3.1.2.1 Observation d'une activation irréversible par voltampérométrie cyclique

L'étude de NapAB par voltampérométrie cyclique avait révélé une hystérésis sur les premiers cycles, qui ne sont pas superposables aux cycles ultérieurs. La figure 3.2

montre cinq voltampérogrammes successifs, que Vincent FOURMOND avait obtenu avec un film de NapAB « as prepared ». Au début de cette expérience, le potentiel est à +240 mV. Rappelons que le courant de réduction de NapAB est négatif. Nous parlerons donc implicitement de la *valeur absolue* du courant, pour discuter ses variations. Les deux premiers voltampérogrammes diffèrent des suivants en ce qu'ils présentent une *hystérésis* marquée. Les cycles n° 3, 4 et 5 présentent une forme typique de NapAB, avec un plateau à bas potentiel ($\leq -0,3$ V/ESH). Le scan aller et le scan retour sont superposables. L'écart entre les deux correspond au courant capacitif. Le courant du scan retour est de ce fait inférieur (en valeur absolue) à celui enregistré pendant le scan aller.

Sur le cycle n° 1, on peut observer que le courant augmente durant le scan vers les bas potentiels, notamment en deçà de $-0,3$ V, ce qui déforme le plateau. Sur le scan retour (vers les hauts potentiels), le courant est même supérieur à celui du scan aller, signe que l'activité de l'enzyme a augmenté lors du passage à bas potentiel. Dès le cycle n° 3, le signal est stationnaire et est superposable aux cycles suivants. L'intensité globale du courant décroît cependant légèrement d'un cycle à l'autre à cause de la désorption lente du film d'enzyme.

On conclut de cette expérience que NapAB gagne en activité lors du passage à bas potentiel, et que ce gain d'activité se maintient lors du passage à haut potentiel. C'est donc un processus *irréversible* qui a lieu.

3.1.2.2 Étude de l'activation irréversible par chronoampérométrie

Pour simplifier l'étude du phénomène, on préfère réaliser des expériences dans lesquelles on fait varier le potentiel par pas (Fourmond *et al.*, 2008). La figure 3.3 montre un chronoampérogramme que j'ai obtenu avec une autre préparation de NapAB « as prepared ».

Au début de l'enregistrement ($t_0 = 10$ s), le potentiel d'électrode vaut +240 mV par rapport à l'électrode standard à hydrogène, et on n'observe pas d'activité. À $t_1 = 70$ s, on porte le potentiel à -160 mV. L'enzyme atteint très rapidement une activité stationnaire. La décroissance subséquente du courant est due à la désorption du film. À $t_2 = 250$ s, on applique un potentiel de -460 mV. Ce potentiel est sur le « plateau » d'activité de l'enzyme. Le courant passe alors instantanément à $-0,5$ μ A, puis croît en valeur absolue pour atteindre l'état stationnaire après un régime transitoire d'un quart d'heure environ. À $t_3 = 1245$ s, on porte le potentiel à sa valeur initiale de +240 mV : la protéine est donc ré-oxydée. Puis la séquence de potentiels appliqués est répétée : -160 mV à $t_4 = 1370$ s ; -460 mV à $t_5 = 1550$ s. Le courant est plus élevé que lors du premier passage, signe que le film a été activé à bas potentiel. La diminution lente est attribuée à la désorption du film. Lors du deuxième passage à -460 mV ($t \geq t_5 = 1550$ s), on atteint immédiatement un état stationnaire, avec la même d'activité que pour $t < t_3$, si ce n'est que la désorption du film pendant la période $t_4 - t_5$ donne un courant légèrement plus faible. L'augmentation d'activité est cependant claire : le courant reste plus élevé qu'à $t = t_1$.

La préparation d'enzyme est donc initialement sous forme d'un *mélange* d'espèces : actives et inactives. Les espèces actives donnent le courant enregistré entre t_1 et t_2 (à -160 mV), et immédiatement après t_2 . L'espèce qui donne lieu à l'*augmentation* du courant entre t_2 et t_3 était inactive à -160 mV, mais *s'active* à -460 mV.

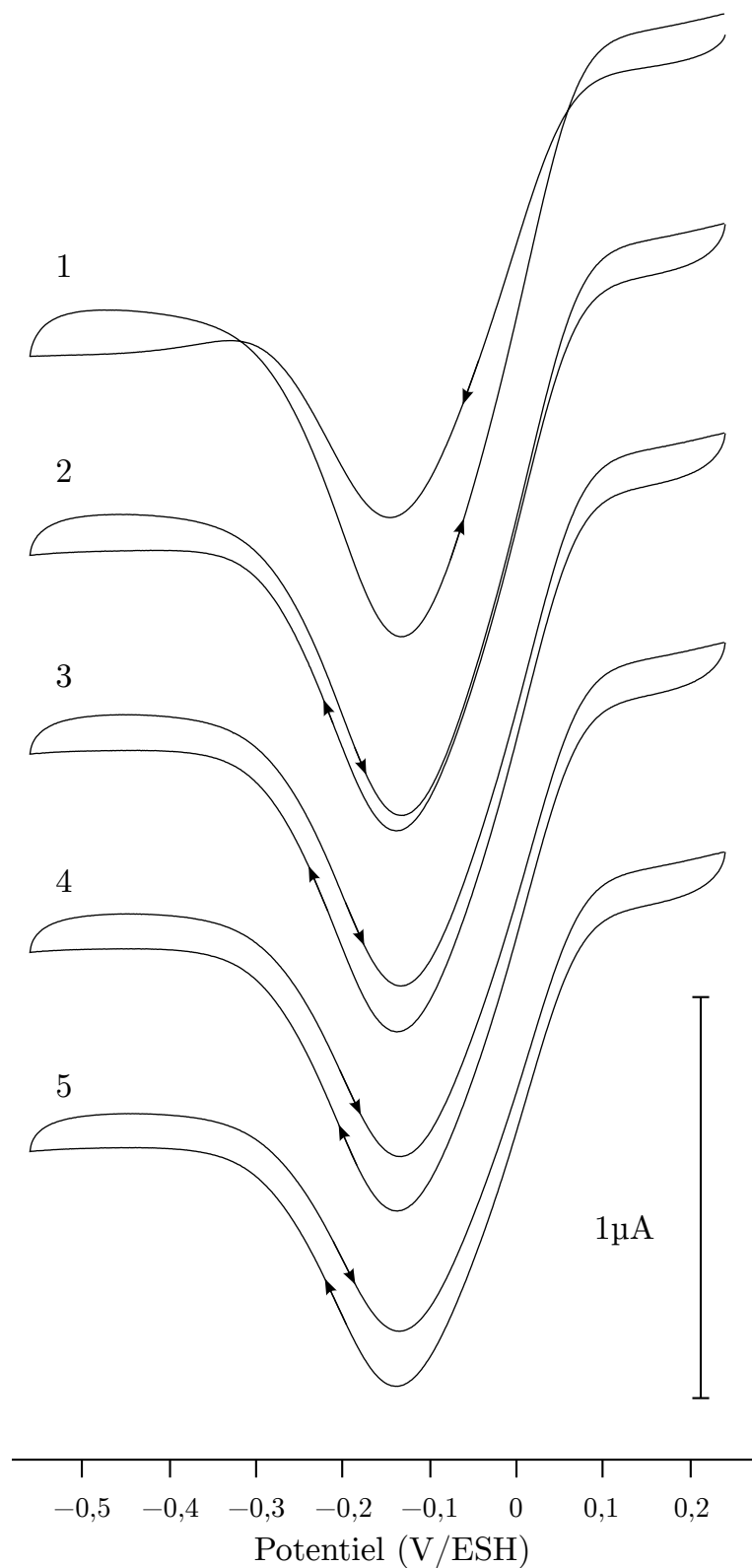


Figure 3.2 – Voltampérogrammes cycliques successifs de NapAB « as prepared ». Les flèches indiquent le sens de balayage du potentiel. 25°C, 4 mV/s, 100 μM KNO₃, pH 7,0, 3 krpm

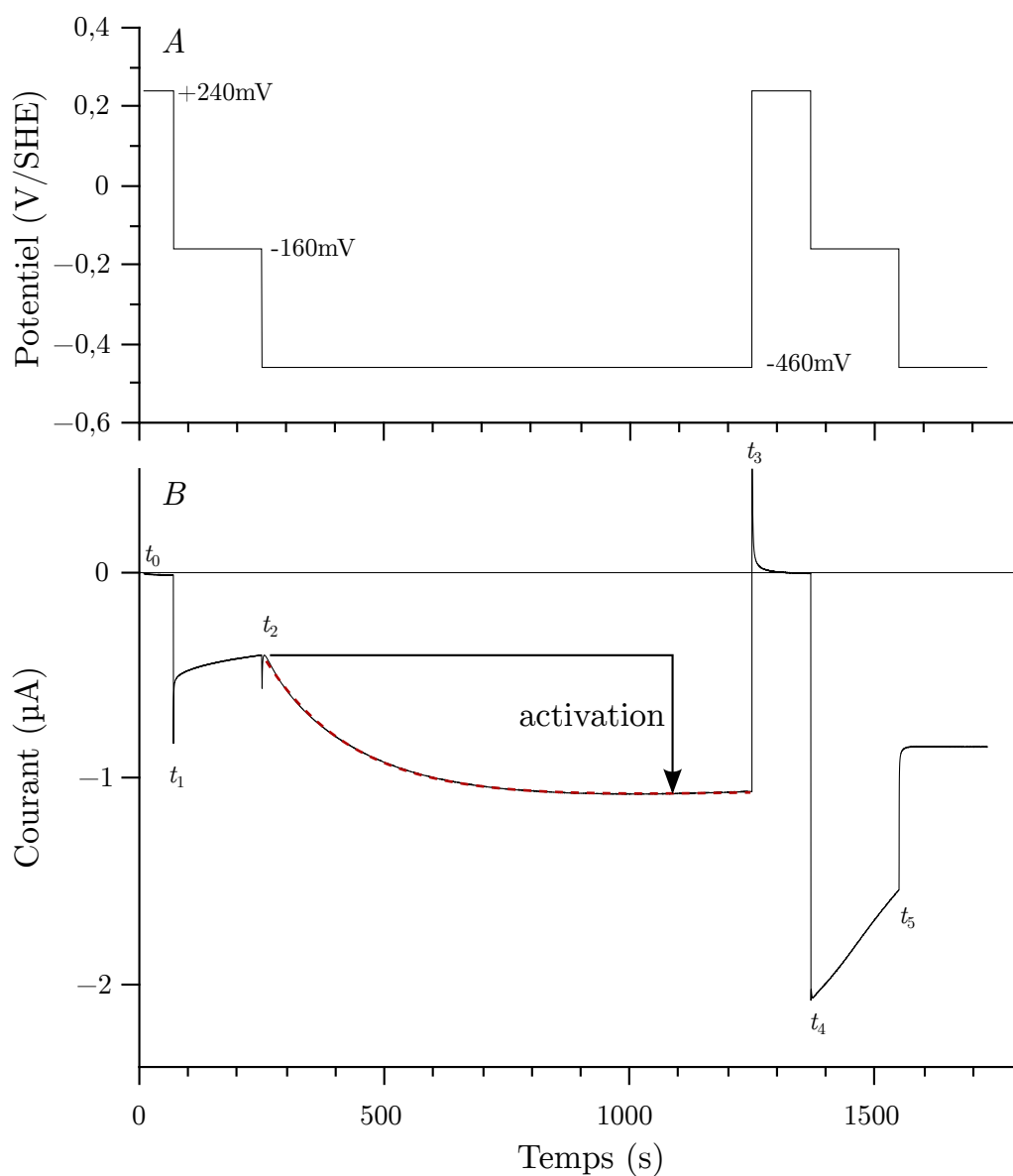


Figure 3.3 – Chronoampérogramme montrant l’activation lente de NapAB à -460 mV. *A* : Potentiel appliqué ; *B* : Courant enregistré. L’activation a lieu sur le premier pas à -460 mV. Le régime transitoire est modélisé par l’équation (3.1) ajustée aux données avec $k_{\text{act}} = 5,33 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$; $i_{\text{act}} = -0,73 \text{ µA}$; $i_{\infty} = -1,13 \text{ µA}$; $k_d = 5,4 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$. pH=6,0, $T = 25 \text{ °C}$, 5 krpm, 100 µM KNO_3 .

La réoxydation de l'enzyme (de t_3 à t_4) n'a pas permis de rétablir l'état initial du système. L'activation qui s'est produite à -460 mV est donc irréversible dans ces conditions. Le premier passage à -460 mV a aboli une hétérogénéité d'activité dans la préparation.

La régime transitoire est modélisé par l'expression suivante (Fourmond *et al.*, 2008) :

$$i = e^{-k_d(t-t_2)} (i_\infty - i_{\text{act}} e^{-k_{\text{act}}(t-t_2)}) \quad (3.1)$$

i_{act} est le courant gagné à bas potentiel. i_∞ est le courant asymptotique (en l'absence de désorption). La constante k_{act} est la constante de vitesse de pseudo premier ordre pour le processus d'activation de la forme inactive. Le terme $e^{-k_d(t-t_2)}$ modélise la désorption du film selon un processus de premier ordre.

L'ajustement des paramètres donne ici

$$1/k_{\text{act}} = 188 \text{ s} \quad (3.2)$$

$$i_\infty = -1,13 \mu\text{A} \quad (3.3)$$

$$i_{\text{act}} = -0,73 \mu\text{A} \quad (3.4)$$

$$1/k_d = 1,84 \cdot 10^4 \text{ s}. \quad (3.5)$$

L'augmentation progressive du courant à -460 mV se fait à une vitesse petite devant la vitesse de *turnover*, mais rapide devant la désorption du film :

$$k_d = 5,4 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1} \ll k_{\text{act}} = 5,33 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1} \ll k_{\text{cat}} \simeq 10^2 \text{ s}^{-1}$$

Dans l'exemple donné ici, le courant gagné à bas potentiel représente $\frac{0,73}{1,13} = 65\%$ du courant final, ce qui signifie que 65% des molécules étaient initialement sous une forme inactive et sont devenue actives au cours de la réduction. C'est donc une part majoritaire de la préparation enzymatique qui était initialement inactive.

3.1.3 Recherche du mécanisme de l'activation

Pour connaître le mécanisme de cette activation, plusieurs test et séries de mesures ont été faits à l'époque par électrochimie.

L'activation résulterait – elle d'une réduction ?

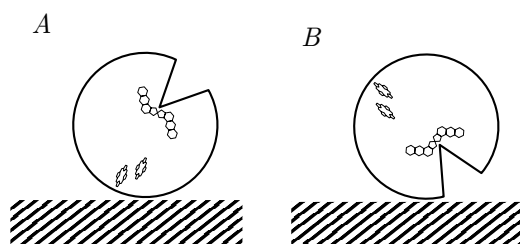


Schéma 3.1 – Représentation de NapAB à la surface d'une électrode. En A, l'orientation des hèmes vers l'électrode permet un transfert d'électrons interfacial rapide. En B, le transfert d'électrons est impossible si les hèmes sont orientés vers le solvant.

Le schéma 3.1 représente l'adsorption de NapAB sur une électrode. Dans l'une des deux configurations, le transfert d'électron n'est pas possible, même si l'enzyme

est elle-même active. Le phénomène observé pourrait être dû à une réorientation des protéines adsorbées, lorsque le potentiel est amené à une valeur suffisamment basse. La réorientation permettrait le transfert d'électrons interfacial et ainsi l'établissement d'un courant catalytique.

Cette hypothèse a été écartée, puisque un film « as prepared » traité préalablement par du dithionite de sodium (10 mM), ne donne pas de phase d'activation, montrant que l'activation est associée à la réduction.

Paramètres déterminant la vitesse d'activation

L'influence du pH, du potentiel de l'électrode, et de l'état d'oligomérisation de l'enzyme ont été étudiés par Vincent FOURMOND. Les données sont résumées sur la figure 3.4, qui montre que :

- la vitesse d'activation est mesurable pour des potentiels inférieurs à -170 mV, maximale en deçà de -250 mV.
- la vitesse d'activation est environ 4 fois plus élevée dans NapA que dans NapAB : $27 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ contre $7 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ dans NapAB à pH 6,0, 25°C
- la vitesse d'activation maximale, à bas potentiel, dépend faiblement du pH.

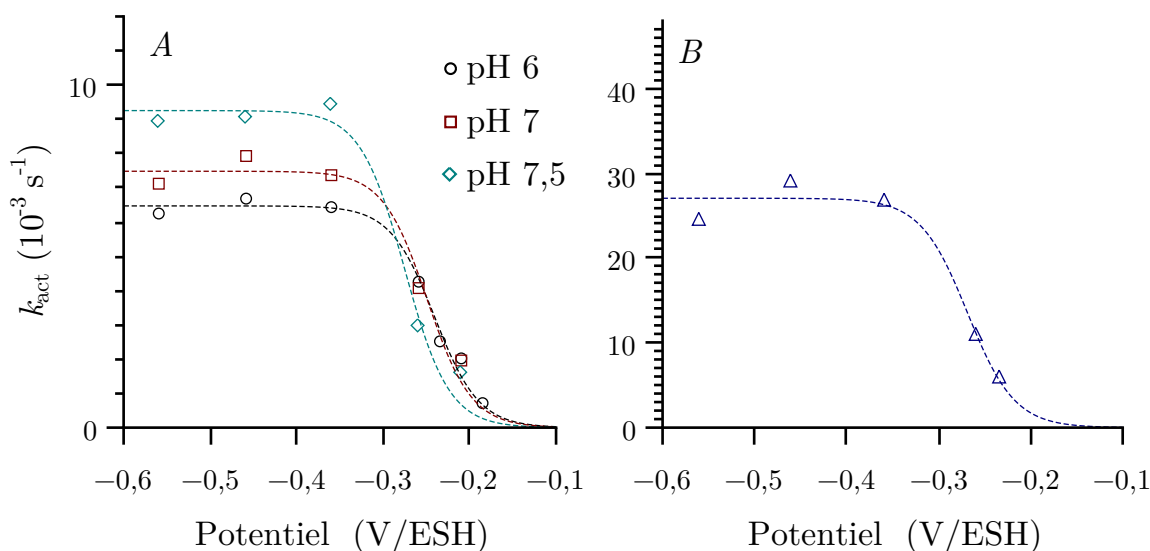


Figure 3.4 – Influence du potentiel sur la vitesse d'activation lente dans NapAB (A) et NapA (B). Les courbes en pointillés représentent l'équation 3.14 (*cf* p. 88) ajustée aux points expérimentaux. Données publiées dans (Fourmond *et al.*, 2008)

Irréversibilité du processus d'activation

Une variété d'espèces chimiques peuvent inhiber ou activer, réversiblement ou non, certaines enzymes à molybdène et à tungstène :

- L'ion S^{2-} ligand du Mo dans Nap, est un ligand labile du Mo dans la formiate déshydrogénase (Thomé *et al.*, 2012) et la xanthine oxydase (Massey et Edmondson, 1970)
- Le tampon HEPES est un inhibiteur de la DMSO-réductase (Bray *et al.*, 2000)
- L'ion SO_3^{2-} est un inhibiteur de la xanthine oxydase (Fish *et al.*, 1990)
- L'ion Zn^{2+} est un inhibiteur compétitif de NapAB (Dementin *et al.*, 2007).

- Le glycérol est un inhibiteur de la DMSO réductase (Garton *et al.*, 1997), de l'AOR à W,Mg-bis(MPT) (Koehler *et al.*, 1996).

Divers traitements ont été tentés pour retrouver l'état initialement inactif de l'enzyme une fois que celle-ci a été activée. Pour savoir si l'inactivité partielle de l'enzyme « as prepared » est une conséquence de l'exposition à une de ces espèces chimiques, l'enzyme préalablement activée à -460 mV a été traitée par l'un de ces produits, puis son activité a été examinée par chronoampérométrie. L'ion Ni^{2+} et l'imidazole, utilisés pour la purification de NapAB, ont également été testés. Aucune de ces espèces n'a permis de retrouver une phase d'activation lente, de même qu'une exposition à l'air ou une oxydation électrochimique à $+640$ mV pendant 5 minutes.

L'activation lente à -460 mV est irréversible dans les conditions testées. Le mécanisme de formation de l'espèce inactive est donc inconnu.

3.1.4 Modélisation de l'activation

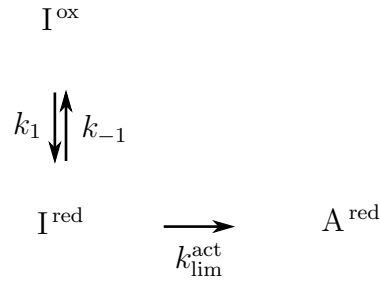


Schéma 3.2 – Modèle initialement proposé pour rendre compte de l'activation lente

Un modèle cinétique a alors été proposé pour rendre compte des données obtenues sur l'activation lente. Dans ce modèle, représenté sur le schéma 3.2, l'état « as prepared » est considéré hétérogène en termes d'activité enzymatique. La fraction inactive de l'enzyme est supposée présente sous deux états redox, notés I^{ox} et I^{red} , en équilibre. La forme réduite peut s'activer, selon une étape irréversible, sans changement de degré d'oxydation, à la vitesse $k_{\text{act}}^{\text{lim}}$. L'espèce réduite notée A^{red} est une forme active de l'enzyme selon ce modèle.

Établissement de la loi de vitesse du modèle 3.2 On suppose que les espèces redox sont en équilibre au potentiel de l'électrode E . $E_{\text{ox/red}}$ est le potentiel standard du couple $\text{I}^{\text{ox}}/\text{I}^{\text{red}}$. Nous cherchons ici l'expression de la vitesse de formation de l'espèce active A^{red} , définie par :

$$\frac{d[\text{A}^{\text{red}}]}{dt} = k_{\text{act}}^{\text{lim}} [\text{I}^{\text{red}}] \quad (3.6)$$

Posons :

$$[\text{I}] = [\text{I}^{\text{ox}}] + [\text{I}^{\text{red}}] \quad (3.7)$$

$$C_0 = [\text{I}] + [\text{A}^{\text{red}}] = \text{Constante} \quad (3.8)$$

$$\epsilon = \exp\left(\frac{\mathcal{F}}{RT}(E - E_{\text{ox/red}})\right) \quad (3.9)$$

L'équation de NERNST nous donne :

$$[I^{\text{red}}] = \frac{[I]}{1 + \epsilon} \quad (3.10)$$

(3.6) donne alors :

$$\frac{d[A^{\text{red}}]}{dt} = k_{\text{act}}^{\text{lim}} \frac{[I]}{1 + \epsilon} \quad (3.11)$$

Posons :

$$k_{\text{act}} = \frac{k_{\text{act}}^{\text{lim}}}{1 + \exp\left(\frac{\mathcal{F}}{RT}(E - E_{\text{ox/red}})\right)}$$

On obtient :

$$\frac{d[A^{\text{red}}]}{dt} + k_{\text{act}} [A^{\text{red}}] = C_0 \quad (3.12)$$

L'intégration de cette équation conduit à :

$$[A^{\text{red}}] = C_0(1 - e^{-k_{\text{act}}t}) \quad (3.13)$$

La constante de vitesse d'activation k_{act} que l'on a posée a pour expression :

$$k_{\text{act}} = \frac{k_{\text{act}}^{\text{lim}}}{1 + \exp\left(\frac{\mathcal{F}}{RT}(E - E_{\text{ox/red}})\right)} \quad (3.14)$$

Cette expression prédit une vitesse d'activation maximale égale à $k_{\text{act}}^{\text{lim}}$ à bas potentiel. Elle permet donc de rendre compte de l'influence du potentiel sur la vitesse d'activation. Les paramètres $E_{\text{ox/red}}$ et $k_{\text{act}}^{\text{lim}}$ sont ajustés aux points expérimentaux (figure 3.4). Les valeurs obtenues sont les suivantes :

Enzyme	pH	$k_{\text{act}}^{\text{lim}}$ en s^{-1}	$E_{\text{ox/red}}$ en V/ESH
NapA	6	$2,7 \cdot 10^{-2}$	-0,269
NapAB	6	$6,5 \cdot 10^{-3}$	-0,240
NapAB	7	$7,5 \cdot 10^{-3}$	-0,249
NapAB	7,5	$9,3 \cdot 10^{-3}$	-0,275

3.1.5 Corrélation de la fraction inactive à la forme Mo^{V} « high g resting »

Suivant l'étude publiée en 2008 par FOURMOND et coll., un faisceau d'indices relie l'espèce inactive qui s'active à bas potentiel et l'espèce donnant le signal RPE désigné « high g resting ». En effet, ces deux entités :

- sont irréversiblement réduites, signe que leur réduction est couplée à une étape chimique irréversible

- ont des potentiels de réduction proches : dans NapAB, le potentiel d’activation $E_{\text{ox/red}}$ déterminé par électrochimie vaut -250 mV à pH=6 (tableau ci-dessus) ; le potentiel de la transition $\text{Mo}^{\text{V}}/\text{Mo}^{\text{IV}}$, titrée par RPE, vaut -225 mV à pH=7.
- apparaissent dans des proportions identiques, pour toutes les préparations étudiées.

Ces observations menaient donc à la conclusion suivante : **l’espèce Mo^{V} « high g resting » est une forme inactive de l’enzyme « as prepared », qui devient active par une réaction irréversible et lente par réduction.**

Dans le modèle 3.2 proposé ci-dessus, I^{ox} correspond donc à la forme Mo^{V} « high g resting », I^{red} désigne l’espèce Mo^{IV} inactive correspondante, et A^{red} une forme Mo^{IV} de l’enzyme catalytiquement compétente.

Position du problème et objectif du travail

Les travaux rappelés dans cette introduction ont pointé le fait que l’espèce Mo^{V} majoritaire dans l’état « as prepared » n’est pas catalytiquement compétente, mais peut le devenir par réduction irréversible. Le mélange de structures et d’états d’oxydation du site actif dans l’état « as prepared », observé par RPE, est donc à mettre en parallèle avec le mélange de formes catalytiquement actives et inactives, observé par électrochimie. Une réduction de l’enzyme abolit cette hétérogénéité de manière irréversible. L’influence du potentiel sur la vitesse d’activation est modélisée par un mécanisme en deux étapes, où une transformation irréversible rend active la forme réduite de l’espèce inactive.

Cependant, ce modèle ne renseigne pas sur la nature de la transformation qui rend l’enzyme active. Et les tests effectués n’ont pas révélé de conditions de formation de l’espèce inactive. Le travail présenté dans ce chapitre a pour but de préciser la structure de l’enzyme dans les états inactif et actif, par une étude plus détaillée du processus d’activation.

3.2 Résultats

3.2.1 Persistance de l’espèce « high g resting » en réduction

Pour analyser l’évolution de l’enzyme au cours de la première réduction, nous avons étudié les signaux RPE des différents centres redox, à basse température.

Il est important de noter ici que le nombre d’observations est conditionné par la quantité de matériel biologique disponible. En effet, les quantités de protéines nécessaires pour la spectroscopie RPE sont importantes (de l’ordre du mg), quand celles demandées par l’électrochimie sur film sont beaucoup plus faibles. Les deux types d’études sont néanmoins nécessaires : le courant donné par un film d’enzyme renseigne sur la dynamique de l’activation, et la RPE donne des information sur les changements qui se produisent au cours de cette activation. L’activation de l’enzyme étant irréversible, une seule observation par RPE présentée ci-après nous a demandé $\simeq 0,3$ mg d’enzyme « as prepared », à $\simeq 60$ μM .

Mode opératoire :

La protéine « as prepared » est placée dans un tube RPE, et dégazée à l'argon. On ajoute alors un excès de dithionite de sodium. Le tube est alors gelé dans l'azote liquide au bout d'une ou deux minutes. Aucun dispositif de cinétique rapide n'est utilisé : la base de temps de l'expérience est la minute. L'état redox de l'échantillon est alors examiné par RPE à basse température. Pour des temps de réaction plus longs, on porte la protéine à température ambiante pendant quelques minutes, sous atmosphère d'argon, avant de congeler à nouveau le tube dans l'azote liquide. Comme le dithionite de sodium est un donneur d'électrons qui donne un turnover lent (Dementin *et al.*, 2007; Butler *et al.*, 1999), pour certains essais du méthylviologène a été ajouté à la protéine avant réduction, à une concentration de 5 μM . Ce médiateur est censé accélérer le transfert d'électrons vers la protéine.

3.2.1.1 Réduction de NapAB suivie par RPE à basse température

La figure 3.5 montre les spectres du Mo^{V} et des hèmes dans l'état « as prepared », c'est-à-dire avant l'ajout du réducteur. Dans la préparation de NapAB utilisée ici, les espèces « very high g » et « low g » sont détectables (doublet à $g = 2,02$ et raie à $g = 1,96$, respectivement). Les spectres à $t = 1$ min montrent l'état du système après ajout de 100 équivalents de réducteur et congélation dans l'azote liquide. On s'attend donc à ce que les cofacteurs de la protéine y soient tous sous forme réduite. À 15 K, le signal des hèmes n'est plus détectable (panneau *C*), alors que le signal du centre $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^+$ est présent (panneau *B*). Sur le panneau *A*, le signal qui apparaît à $g \simeq 2,00$ est dû au radical $\text{MV}^{\cdot+}$. Le potentiel de la solution n'est pas mesuré, mais l'apparition du radical montre que celui-ci est proche du potentiel de réduction du méthylviologène, qui vaut -440 mV. À ce potentiel, la vitesse d'activation de l'enzyme, modélisée par l'équation (3.14), est maximale.

Parmi les espèces Mo^{V} , la forme « very high g » n'est plus détectable. De façon surprenante, le signal « high g resting » persiste dans des proportions quasi-identiques à celles à l'état oxydé.

L'échantillon est alors dégelé et incubé sous argon, à température ambiante, avant d'être à nouveau congelé dans l'azote et examiné par RPE. L'incubation est poursuivie jusqu'à la disparition du signal Mo^{V} « high g resting ». Les spectres obtenus pour des temps d'incubation cumulés de 6, 21, 41 et 61 minutes sont représentés sur la figure 3.5. L'amplitude du signal $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^+$ est stable dans le temps, et l'amplitude du signal « high g resting », mesurée par la hauteur de la raie à haut champ, décroît progressivement. L'évolution temporelle de l'amplitude des différents signaux RPE est résumée dans la figure 3.7,a, (p. 93).

Cette expérience nous montre deux choses : en présence d'un excès de réducteur, les cofacteurs à fer sont immédiatement réduits, alors que l'espèce Mo^{V} « high g resting » n'atteint pas l'état Mo^{IV} instantanément. Inversement, la réduction complète de l'espèce Mo^{V} « high g resting » demande plus d'une heure à température ambiante. De plus, cette cinétique est spécifique de la forme « high g resting » du cofacteur. L'espèce « very high g », elle, réagit comme les autres cofacteurs : elle est réduite dans la première minute après le mélange avec le réducteur.

Le temps de demi-vie de l'espèce « high g resting », à température ambiante, $\text{pH}=7,5$ et avec un excès de réducteur, peut être estimé ici à une vingtaine de

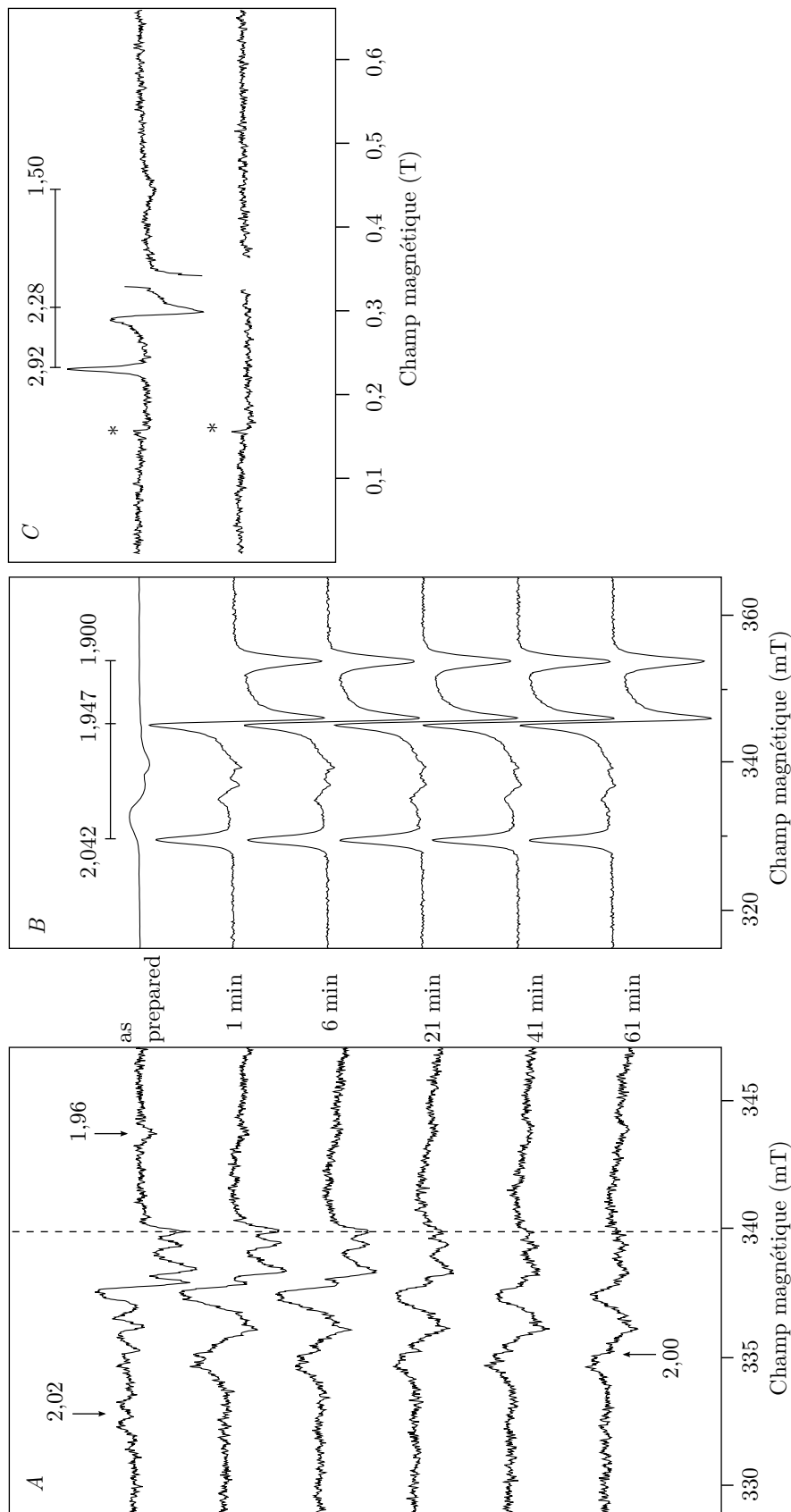


Figure 3.5 – Évolution temporelle des signaux RPE dans NapAB ($60 \mu\text{M}$) après addition de dithionite de sodium (6mM) et de méthylviologène ($5 \mu\text{M}$). *A* : Signal Mo V . Les pointillés indiquent la position de la raie dont l'amplitude a été mesurée. Le doublet à $g = 2,02$ correspond à l'espèce « very high g », la raie à $g = 1,96$ à l'espèce « low g ». Le signal à $g = 2,00$ est dû au radical méthylviologène réduit ; 55 K , $9,407 \text{ GHz}$, 1 mW , $0,2 \text{ mT}$. *B* : $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^+$, 15 K , 1 mW , $0,5 \text{ mT}$ sauf premier spectre : 4 mW , 2 mT . *C* : Signal hémique ; l'astérisque pointe le signal dû aux ions Fe^{3+} contaminants. 15 K , 4 mW , $2,0 \text{ mT}$

minutes.

3.2.1.2 Réduction de NapA suivie par RPE à basse température

Dans nos préparations de NapA, l'espèce « high g resting » est la seule forme Mo^{V} observée jusqu'à présent, et en plus grande proportions que dans NapAB (*cf* Introduction), ce qui rend ce type d'expérience cinétique plus facile.

La figure 3.6 montre le suivi de la réduction de NapA par un excès de réducteur. Comme dans NapAB, le centre fer-soufre de NapA est immédiatement réduit après

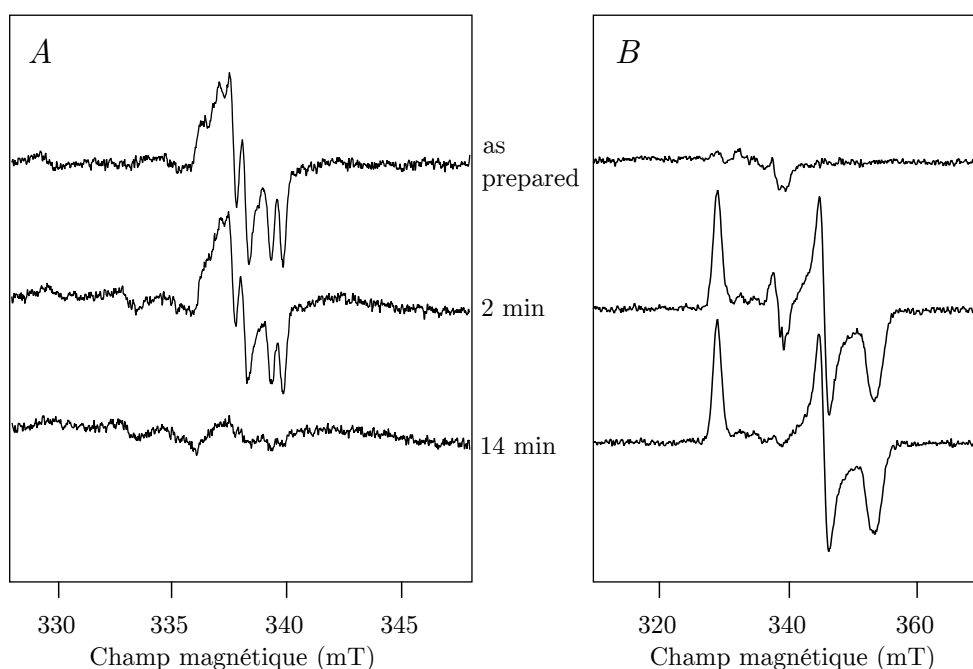


Figure 3.6 – Évolution temporelle des signaux RPE Mo^{V} (a) et du centre fer-soufre (b) dans NapA ($77 \mu\text{M}$) après ajout de dithionite de sodium (11mM). $\text{pH}=7,5$. *A* : $9,407 \text{GHz}$, 55K , 1mW , $0,2 \text{mT}$. *B* : 15K , 1mW , $0,5 \text{mT}$

mélange avec le réducteur et la forme « high g resting » ne l'est pas. Le signal Mo^{V} n'a pas diminué à $t \simeq 2 \text{min}$, mais a quasiment disparu au bout de 14 minutes. L'amplitude du signal du $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^+$ est stable dans le temps.

Les amplitudes relatives de ces signaux sont reportées en fonction du temps sur la figure 3.7, panneau *B*. On peut faire une estimation approximative de la demi-vie de l'espèce « high g resting » dans les conditions de l'expérience à moins de 10 minutes, soit la moitié de la demi-vie estimée dans NapAB. L'activation observée par chrono-ampérométrie est environ quatre fois plus rapide dans NapA que dans NapAB. La cinétique de réduction de l'espèce « high g resting » suivie par RPE montre donc la même tendance.

L'observation de NapA et NapAB en présence d'un excès de réducteur par RPE à basse température montre donc que l'espèce Mo^{V} « high g resting » n'est pas en équilibre rapide avec la forme Mo^{IV} correspondante. Il apparaît donc une contradiction avec la modélisation de l'activation de l'enzyme, présentée en introduction (schéma 3.2). Celle-ci proposait en effet un équilibre rapide entre Mo^{V} et Mo^{VI} , l'état +IV étant majoritaire en deçà de -250mV . Cependant, les temps

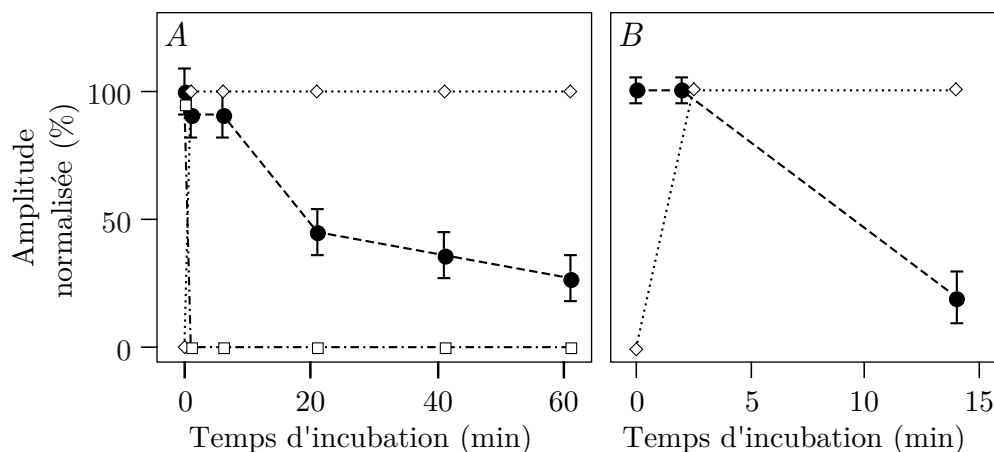


Figure 3.7 – Évolution temporelle de l'amplitude relative des signaux RPE de l'espèce « high g resting » (●), du $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^+$ (◊) et hèmes (□) dans NapAB(A) et dans NapA (B) au cours de la réduction à température ambiante

caractéristiques observés dans les deux expériences ne sont pas les mêmes : pour NapAB, 80 secondes pour l'activation à bas potentiel sur une électrode, 25°C, et 20 minutes pour la réduction du Mo^{V} suivie par RPE. Ces deux types de mesures sont donc difficilement comparables en l'absence de corrélations plus solides. Un processus s'étalant sur 20 minutes pourrait être masqué, en électrochimie, par la désorption du film.

La procédure de gel/dégel de la protéine permet d'enregistrer les spectres RPE dans de bonnes conditions de température, mais ne permet pas d'étudier un phénomène dynamique avec une résolution temporelle suffisante. La température de l'échantillon n'y est ni homogène, ni constante. Pour étudier plus précisément la cinétique de la réduction de l'espèce « high g resting », nous avons donc suivi directement l'évolution du signal RPE sans geler l'enzyme.

3.2.2 Étude cinétique par RPE à température ambiante de la réduction de l'espèce « high g resting »

3.2.2.1 Caractérisation du signal Mo^{V} « high g resting » à température ambiante

La relaxation spin-réseau des centres Mo^{V} est suffisamment lente pour que l'on puisse détecter leur signal RPE à température ambiante, ce qui n'est pas le cas des agrégats fer-soufre ou des hèmes. La possibilité d'étudier les enzymes à molybdène par RPE à température ambiante n'a été que rarement exploitée, à cause de la perte de résolution et de sensibilité, qui sont expliquées ci-dessous.

Une étude à température ambiante a l'avantage d'être plus proche des conditions trouvées *in vivo*. La congélation d'un échantillon dans l'azote liquide peut donner des valeurs apparentes du pH et du potentiel très éloignées des mesures avant congélation : suivant le tampon utilisé, le pH apparent peut chuter de trois unités, et affecter ainsi les équilibre redox (Porras et Palmer, 1982). Les séquences de congélation/décongélation peuvent aussi dégrader la protéine. PORRAS & PALMER ainsi que KAY & BARBER ont déterminé le potentiel des couples $\text{Mo}^{\text{VI}}/\text{Mo}^{\text{V}}$ et

Mo^V/Mo^{IV} dans la xanthine oxydase (Kay et Barber, 1990; Porras et Palmer, 1982), et dans des nitrate réductases assimilatrices (Kay *et al.*, 1989; Kay *et al.*, 1988) par titrages à température ambiante, sans congeler la protéine. Plusieurs contraintes expérimentales apparaissent lorsque l'on veut étudier un échantillon aqueux liquide par spectroscopie RPE :

- la loi de CURIE prévoit une variation de l'intensité du signal inversement proportionnelle à la température. Le signal est donc diminué d'un facteur $\simeq 5,4$ entre 55 K (température d'observation des signaux Mo^V) et 296 K.
- les pertes diélectriques : l'eau liquide absorbe la composante électrique des micro-ondes : $\varepsilon''_{\text{H}_2\text{O}} \simeq 30$ à 9 GHz, 20 °C (Kaatze, 2007).

Ce dernier point a deux conséquences :

- l'échantillon doit être confiné dans la zone de champ électrique minimal ; dans une cavité cylindrique, on emploie des tubes capillaires, de 1,1 mm de diamètre intérieur. Le volume d'échantillon présent dans la cavité est alors d'environ 50 μL (contre 150 μL avec des tubes standard à basse température).
- La puissance micro-ondes doit être inférieure à 10 mW. Sinon, on remarque que le signal reçu par la diode réceptrice diminue au cours du temps. C'est le signe que l'échantillon absorbe les micro-ondes, et chauffe, avec le risque de dégrader la protéine.

De manière générale, pour optimiser le rapport signal/bruit, on peut choisir une puissance micro-onde telle que les transitions soient légèrement saturées. À température ambiante, le signal Mo^V « high *g* resting » ne montre pas de saturation à 10 mW. Cette puissance n'est donc pas optimale.

Là encore la quantité d'espèce « high *g* resting » présente est critique. Le faible rapport signal/bruit nous a conduit à travailler principalement à partir de préparations de NapA. Nous avons cependant pu faire un essai avec NapAB native. D'autres essais ont été faits par reconstitution du dimère NapAB *in vitro*. Cette reconstitution est décrite plus loin (section 3.2.3.1).

La figure 3.8 montre le spectre RPE à température ambiante de NapA « as prepared ». Cinq minutes d'acquisition ont été nécessaires pour ce spectre à 296 K. Le signal à basse température (55 K) est donné pour comparaison.

Effets du mouvement brownien

Sur le spectre à 296 K, les raies sont élargies : la largeur à mi-hauteur de la raie en g_3 passe de 3,2 à 5,3 G. L'éclatement hyperfin en g_3 passe de 5,1 G à 4,6 G, le deuxième éclatement hyperfin en g_1 n'est plus résolu, et on peut noter un rétrécissement global du spectre. Ces effets sont dus à la diffusion rotationnelle des molécules : les valeurs observées de \tilde{g} et \tilde{A} tendent vers une valeur moyenne. En prenant un rayon hydrodynamique $R = 65 \text{ \AA}$ pour NapA (Dias *et al.*, 1999), et une viscosité $\eta = 10^{-3} \text{ Pa}\cdot\text{s}$ pour l'eau, on peut estimer le temps de corrélation rotationnelle :

$$1/\tau_c = \frac{3k_B T}{4\pi\eta R^3} \simeq 3,6 \text{ MHz}$$

Comparons cette valeur aux éclatements hyperfins et aux écarts entre les valeurs de \tilde{g} : L'interaction hyperfine avec le premier proton est de l'ordre de 5 G, soit 14 MHz. L'interaction hyperfine avec le deuxième proton, résolue uniquement en g_1 à basse température, vaut, elle, 7 MHz. L'écart entre deux valeurs de \tilde{g} consécutives

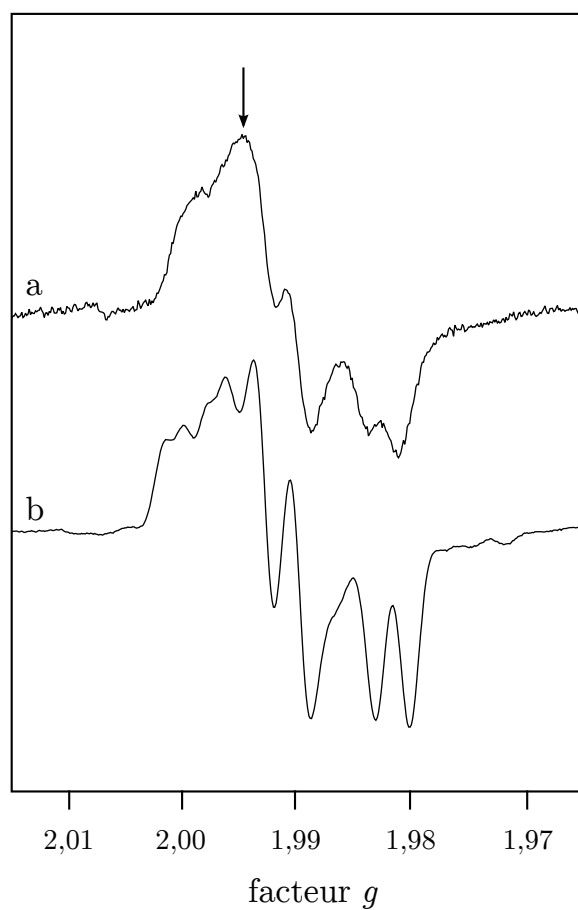


Figure 3.8 – Signal Mo^{V} « high g resting » dans NapA ($80 \mu\text{M}$), à température ambiante (a) et en solution gelée (b). La flèche indique la position du champ choisie pour suivre l'évolution du signal. Conditions : a : 296 K, 9,879 GHz, 8 mW, 0,2 mT, 36 scans. b : 55 K, 9,413 GHz, 1 mW, 0,2 mT, 16 scans.

vaut environ 0,009. Converti en fréquence, pour $B = 0,380$ mT cela vaut :

$$f_i - f_j = \frac{(g_i - g_j)\beta B}{h} \simeq 43 \text{ MHz}$$

Les plus grands éclatements hyperfins sont 4 fois plus grands que la fréquence de diffusion rotationnelle : ils sont toujours résolus. Le plus petit éclatement (sur g_1) est perdu. L'anisotropie en g est environ 10 fois plus grande. L'anisotropie du signal est donc globalement conservée à température ambiante, mais les raies sont élargies. NapA est donc dans un régime de faible mobilité.

3.2.2.2 Évolution du signal au cours du temps dans NapAB

Les expériences faites par congélation/décongélation séquentielles ont montré que le temps caractéristique de disparition du signal « high g resting » est de l'ordre de 5 minutes dans NapA. Le temps d'acquisition du spectre présenté sur la figure 3.8, de l'ordre de 5 minutes, est incompatible avec la durée du phénomène que nous voulons observer. Si le signal décroît significativement pendant le balayage en champ, le spectre sera déformé. Nous avons donc suivi l'intensité du signal en mesurant l'amplitude d'une raie au cours du temps, à champ magnétique fixé. La position choisie est celle pointée par une flèche sur la figure 3.8. Pour améliorer le rapport signal/bruit, nous avons utilisé une amplitude de modulation plus grande que celle utilisée pour acquérir les spectres.

Mode opératoire

La position du champ magnétique est repérée après l'acquisition d'un spectre de la protéine « as prepared » dans un tube capillaire. Ensuite, dans une cellule balayée d'argon, la protéine (50 μ L à 80 μ M) est désaérée, et additionnée de dithionite de sodium (20 μ L 0,1 M) fraîchement préparé. Le réducteur est en excès pour être en conditions de pseudo-premier ordre en protéine, et pour réduire les traces d'oxygène présentes dans la solution ou le montage. Le mélange est ensuite rapidement introduit dans le tube capillaire (balayé d'argon) qui est bouché puis placé dans la cavité du spectromètre. L'enregistrement est alors déclenché. Utiliser le même tube pour le réglage de la fréquence et du champ permet de démarrer l'acquisition dès que le tube est en place, sans avoir à ré-accorder la cavité. Pour isoler le capillaire de l'air, on peut aussi placer ce dernier dans un tube bande X classique, plus facile à manipuler. Le temps « mort » t_m entre le mélange des réactifs et le début de l'acquisition est de deux à trois minutes sur tous nos essais.

L'amplitude donnée par le spectromètre est une série de points $A(t_i)$ correspondant aux temps $t_i = (i - 1)t_C$, où t_C représente le temps de conversion, c'est-à-dire le temps d'accumulation du signal à chaque point. L'amplitude est normalisée entre 0 et 1 après l'ajustement des paramètres a , b , et k_{red} dans l'expression suivante :

$$y = a + b \exp(-k_{\text{red}}(t - t_m)) \quad (3.15)$$

$$A_{\text{norm}}(t_i + t_m) \equiv (A(t_i) - a) / b \quad (3.16)$$

La position du zéro est donc repérée par la valeur asymptotique de l'amplitude. Seule nous intéresse la valeur de k_{red} . Comme l'amplitude mesurée est proportionnelle à la quantité de Mo^{V} présente, on peut écrire :

$$[\text{Mo}^{\text{V}}] = [\text{Mo}^{\text{V}}]_0 \exp(-k_{\text{red}}(t - t_m))$$

La grandeur k_{red} est donc la constante de vitesse de pseudo-premier ordre de disparition du Mo^{V} :

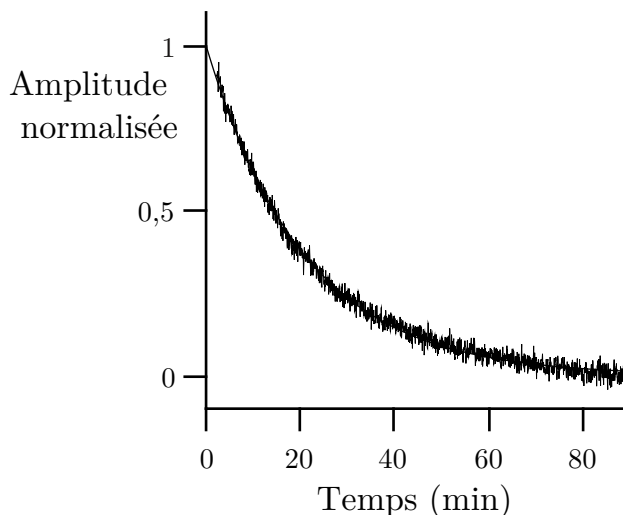
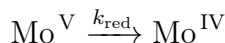


Figure 3.9 – Évolution du signal « high g resting » dans NapAB à température ambiante après addition anaérobie de dithionite de sodium (29 mM). La courbe exponentielle superposée correspond à une constante $k_{\text{red}} = 8,0 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$. Température ambiante, fréquence : 9,859 GHz, puissance : 8 mW, amplitude de modulation : 0,5 mT, temps de conversion : 2621,44 ms, constante de temps : 1310,72 ms.

Nous avons pu faire un essai avec NapAB « as prepared ». L'enregistrement obtenu et la modélisation ajustée sont donnés sur la figure 3.9. Le signal a disparu après 90 minutes. La constante de vitesse de pseudo-premier ordre ajustée vaut $(8 \pm 1) \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, ce qui correspond à un temps de demi-réaction de 15 min. Cette valeur est en accord avec les estimations faites par le suivi de cinétique par RPE à basse température.

3.2.2.3 Évolution du signal Mo^{V} au cours du temps dans NapA

Nous avons fait deux essais avec la sous-unité NapA seule, dans des conditions expérimentales identiques. Les enregistrements sont montrés sur la figure 3.10. Les constantes de vitesse de pseudo-premier ordre ajustées sont de $(5,8 \pm 0,3) \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ et $(7,2 \pm 0,5) \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$.

La vitesse de réduction du Mo^{V} « high g resting » est donc 7 à 9 fois plus rapide dans NapA que dans NapAB. Ce rapport de vitesses est cohérent avec la tendance observée dans les observations à basse température, ainsi qu'avec les mesures de vitesse d'activation par électrochimie, où NapA s'active environ 4 fois plus rapidement que NapAB (Fourmond *et al.*, 2008).

On note cependant que les deux enregistrements présentés ici donnent des résultats sensiblement différents. Ceci suggère que la cinétique étudiée est sensible à un paramètre mal contrôlé. Il est probable qu'une petite différence de température soit à l'origine de l'écart constaté.

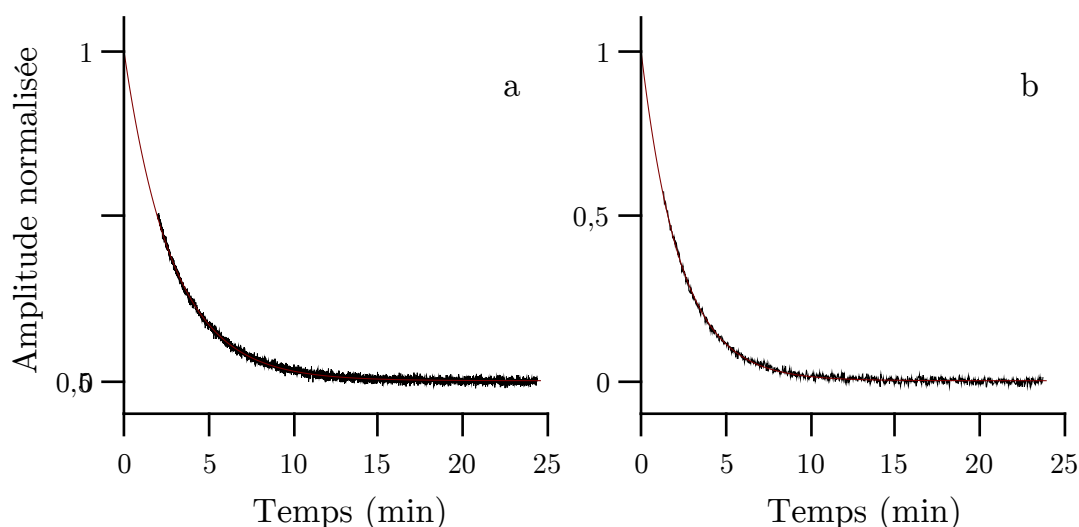


Figure 3.10 – Évolutions du signal Mo^{V} dans NapA ($57 \mu\text{M}$) à température ambiante. Les exponentielles sont tracées en rouge avec $k = 5,88 \cdot 10^{-3} \text{s}^{-1}$ (a) et $7,30 \cdot 10^{-3} \text{s}^{-1}$ (b). $29 \text{ mM Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$.

3.2.3 Recherche des facteurs déterminant la vitesse de disparition du Mo^{V}

3.2.3.1 Influence de la sous unité NapB sur la vitesse de réduction du « high g resting »

L'activation électrochimique à -460 mV est environ 4 fois plus rapide sur NapA que sur NapAB. D'autre part, l'espèce Mo^{V} « high g resting » est réduite 7 à 9 fois plus rapidement dans NapA que dans NapAB. Ces différences sont-elles dues à la présence de la sous-unité NapB? Pour répondre à cette question, nous avons examiné la cinétique d'activation de complexes NapAB reconstitués à partir de solutions des protéines NapA « as prepared » et NapB.

Formation du complexe NapA+B *in vitro*

La constante de dissociation du complexe NapA – NapB a été évaluée à $0,5 \text{ nM}$ dans l'état réduit (Arnoux *et al.*, 2003). À une concentration en NapA et NapB de $80 \mu\text{M}$, on peut estimer que le complexe est formé de manière quantitative. Pour reconstituer le complexe, nous avons simplement mélangé les deux sous-unités en proportions équimolaires. Le mélange obtenu est désigné « NapA+B » par la suite. Nous avons vérifié la formation du complexe en examinant le signal RPE des hèmes à l'état oxydé. L'examen attentif des signatures des hèmes, observables à l'état oxydé, révèle des différences de position et de largeur des raies. Dans la sous-unité NapB seule, les raies sont plus larges que dans le complexe NapAB. Ceci vient d'un effet de *g*-strain, ou dispersion des valeurs de *g*. La dispersion est plus

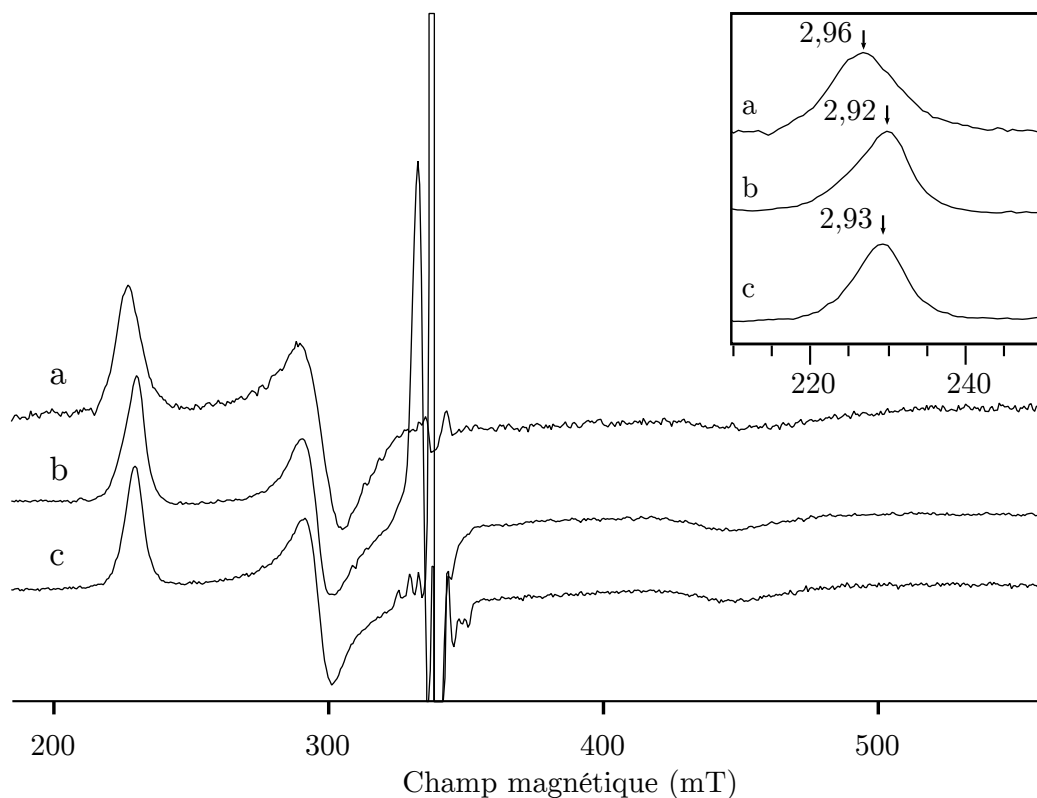


Figure 3.11 – Spectres RPE de l'état oxydé de NapB (250 μM) (a), NapA+B (80 μM) (b), NapAB « as prepared » (36 μM) (c). L'encart montre la raie en g_1 des hèmes, dont la position se décale de NapB à NapAB. Les signaux intenses vers 340 mT proviennent du Mo^{V} . Acquisition : (a) et (b) : 15 K, 4 mW, 2 mT, 9,407 GHz, 4 scans ; (c) : 15 K, 2 mW, 1 mT, 9,413 GHz

importante dans NapB du fait d'une plus large distribution de structure : NapB est une « petite » protéine de 17 kDa. Cet effet est repérable sur la raie positive et la raie dérivée (figure 3.11). La signature RPE des hèmes dans NapA+B est donnée sur la figure 3.11, spectre **b**. On peut constater que cette signature est très proche de celle obtenue avec la protéine NapAB native. Cependant, la forme de la raie en g_1 diffère légèrement de celle de NapAB, ce qui suggère l'existence d'une hétérogénéité de structures. Le décalage dans les valeurs de g reflète les modifications de la structure des hèmes.

Les valeurs de g_1 des hèmes bas spin de type c peuvent être corrélées à l'angle dièdre entre les plans des noyaux imidazole qui sont liés à l'ion Fe^{3+} , grâce au modèle du « trou t_{2g} » (More *et al.*, 1999; More *et al.*, 1990). Dans la structure cristallographique de Nap (pdb : 1OGY), où deux hèmes c sont présents, l'angle en question vaut environ 20° pour les deux centres. Les valeurs de g_1 entre 2,92 et 2,96 mesurées ici, avec des protéines en solution, sont en accord avec le modèle. Cependant, celui-ci ne renseigne pas sur la variation de l'angle dièdre entre NapB et NapAB, puisqu'il prévoit de telles valeurs de g_1 pour des angles entre 15° et 30° .

Nous n'avons détecté aucune variation de la quantité de Mo^{V} « high g resting » durant la formation du complexe.

Vitesse de réduction du Mo^{V} dans NapA+B

Nous avons suivi l'évolution à température ambiante de l'espèce Mo^{V} « high g resting » dans le complexe NapA+B. Nous trouvons une constante de vitesse de

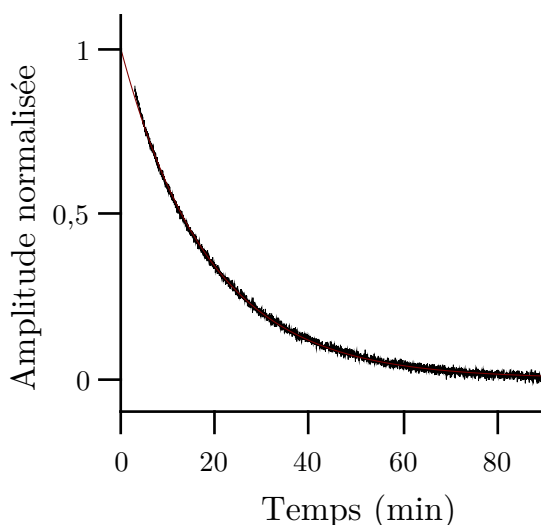


Figure 3.12 – Évolution du signal « high g resting » dans le complexe NapA+B ($57 \mu\text{M}$). $29 \text{ mM Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$, $\text{pH}=8$. La courbe en rouge représente l'équation 3.15 pour une constante $k_{\text{red}} = 9,0 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$

$(9,0 \pm 0,2) \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$. La cinétique de réduction de l'espèce « high g resting » dans NapA+B est tout-à-fait comparable à celle dans le complexe NapAB natif. C'est bien la présence de la sous-unité NapB qui rend la réduction du Mo^{V} plus lente dans NapAB que dans NapA. Les constantes de vitesse pour les trois systèmes (NapA, NapAB, NapA+B) à température ambiante sont regroupées dans le tableau 3.1 (p. 102).

3.2.3.2 Influence des médiateurs électrochimiques

La lenteur de la réduction du Mo^{V} pourrait provenir d'un transfert d'électron intermoléculaire lent. Dans les titrages potentiométriques, les protéines sont en présence de médiateurs, qui accélèrent la mise à l'équilibre du système. Pour savoir si la présence de ces composés a un effet sur la cinétique de réduction de l'espèce « high g resting ». Nous avons mesuré la vitesse de réduction de Mo^{V} en mimant les conditions d'un titrage : nous avons ajouté une série de médiateurs à hauteur de 10% de la concentration en protéine. Le mélange utilisé contenait les produits suivants :

Composé	E'^{\ominus} (mV/ESH)
acide ferrocène-carboxylique	+530
$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$	+430
2,6-dichlorophénol-indophénol	+220
2,5-diméthyl-parabenzosquinone	+180
1,2-naphtoquinone	+145
phénazine méthosulfate	+80
phénazine éthosulfate	+55
bleu de méthylène	+11
résorufine	-51
indigo disulfonate	-125
2-hydroxy-(1,4)-naphtoquinone	-145
phénosafranine	-250
rouge neutre	-325
méthylviologène	-440

L'évolution du signal Mo^{V} en présence de médiateurs dans NapA+B, à température ambiante, est montrée sur la figure 3.13. La constante de vitesse obtenue,

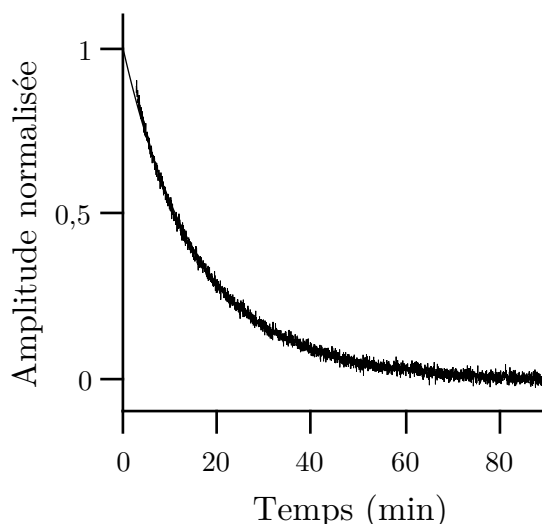


Figure 3.13 – Évolution du signal « high g resting » dans le complexe NapA+B ($57 \mu\text{M}$) en présence de médiateurs à $3 \mu\text{M}$ (voir texte). $29 \text{ mM Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$, $\text{pH} = 8$. Les pointillés représentent l'équation 3.15 avec $k_{\text{red}} = 1,1 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$.

$(1,1 \pm 0,1) \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, est quasiment identique à ce que nous avons mesuré en l'absence de médiateurs (voir le tableau 3.1 p. 102), quoique légèrement supérieure.

Les médiateurs n'ont donc pas d'influence significative sur la vitesse de réduction du Mo^V. Le transfert d'électron intermoléculaire n'est donc pas cinétiquement déterminant pour l'activation du cofacteur à molybdène, dans les conditions de pseudo-premier ordre que nous utilisons.

Tableau 3.1 – Constante de vitesse de pseudo-premier ordre pour la réduction du Mo^V « high g resting » à température ambiante ($\sim 23^\circ\text{C}$)

Protéine	Constante de vitesse (10^{-3} s^{-1})
NapA	$5,8 \pm 0,3$
NapA	$7,2 \pm 0,5$
NapAB	$0,8 \pm 0,1$
NapA+B	$0,90 \pm 0,02$
NapA+B + médiateurs	$1,1 \pm 0,1$

3.2.3.3 Influence de la température sur la vitesse de réduction du Mo^V

Nous avons estimé l'énergie d'activation apparente de la réduction du Mo^V « high g resting », en mesurant sa vitesse de disparition à des températures comprises entre 0°C et 20°C . Cette série de mesures a été faite sur la sous-unité NapA. Pour s'assurer que le transfert d'électrons intermoléculaire ne limite pas la cinétique observé, même à plus basse température, nous avons décidé d'utiliser le méthylviologène comme médiateur, à $10 \mu\text{M}$. Avec la quantité de protéine dont nous disposions, nous avons pu faire quatre essais en régulant la température de l'échantillon à 17, 13, 10 et 3°C , grâce à un cryostat à flux d'azote. Nous avons contrôlé la température *a priori* et *a posteriori* avec un thermomètre placé dans le cryostat. La figure 3.14 (p. 103) montre les enregistrements obtenus, avec la même échelle de temps. Les résultats sont donnés dans le tableau 3.2. L'énergie d'activation du processus de réduction de l'espèce Mo^V « high g resting » est évaluée à $(69 \pm 8) \text{ kJ mol}^{-1}$ à partir de ces données, par régression linéaire (voir la figure 3.16, p. 106).

Tableau 3.2 – Constantes de vitesse de pseudo-premier ordre de réduction du Mo^V « high g resting » dans NapA en fonction de la température

Température ($^\circ\text{C}$)	Constante de vitesse (10^{-3} s^{-1})
23	$5,9 \pm 0,2$
17	$3,3 \pm 0,1$
13	$2,5 \pm 0,1$
10	$1,13 \pm 0,03$
3	$0,92 \pm 0,04$

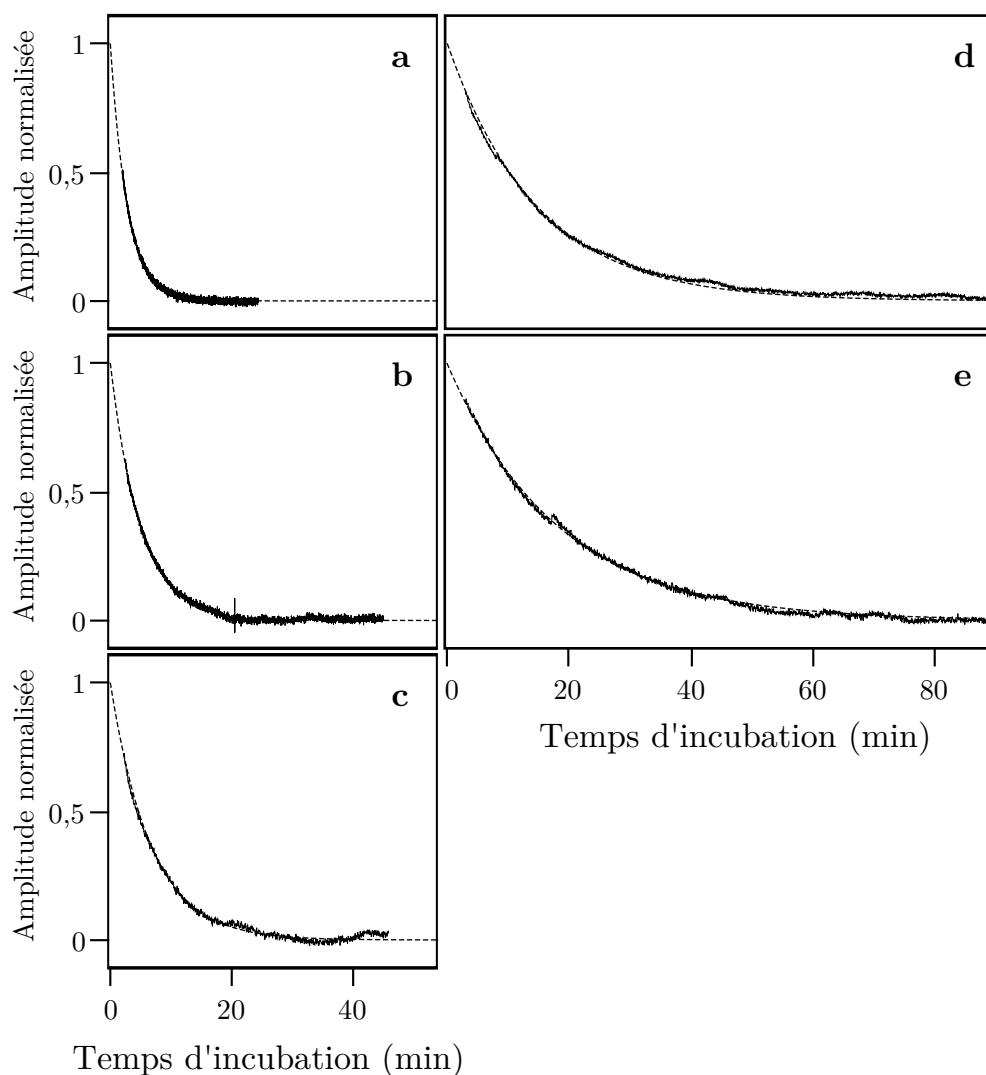


Figure 3.14 – Évolution du signal Mo^{V} « high g resting » dans NapA en fonction du temps d'incubation avec 20 mM $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ et 10 μM méthylviologène. Températures : 23°C (a), 17°C (b), 13°C (c), 10°C (d), et 3°C (e). Les exponentielles décroissantes sont tracées en pointillés avec les constantes k_{red} de : $5,90 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ (a) , $3,35 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ (b), $2,48 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ (c), $1,14 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ (d) et $9,2 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ (e). Conditions d'enregistrement : Puissance : 8 mW (a, b, c, d, e) Modulations : 0,5 mT (a) 1 mT (b, c, d, e), Constante de temps : 81,92 ms (a), 327,68 ms (b), 1310,72 ms (c, d, e) Temps de conversion : 327,68 ms (a), 655,36 ms (b), 2621,44 ms (c, d, e)

3.2.4 Étude par chronoampérométrie de l'influence de la température sur la vitesse d'activation

Pour faire le lien avec l'étude précédente, nous avons mesuré la vitesse d'activation de l'enzyme par chronoampérométrie entre 5°C et 40°C. Pour ces mesures, nous avons utilisé le complexe reconstitué NapA+B pour deux raisons. La fraction inactive y est présente en plus grande proportion que dans NapAB, et NapA+B forme des films plus stables et plus actifs que NapA. La phase d'activation est donc plus simple à détecter et à caractériser avec cette préparation. Nous nous plaçons au potentiel de -460 mV, où la vitesse d'activation est maximale. Les constantes de vitesse apparentes sont déterminées par ajustement d'une loi bi-exponentielle (équation (3.17)).

$$i = e^{-k_a(t-t_1)}(i_\infty + i_1 e^{-k_{act}(t-t_1)}) \quad (3.17)$$

La figure 3.15 montre trois de ces enregistrements à 35°C, 20°C et 5°C. Les constantes de vitesse k_{act} ajustées y valent respectivement $1,34 \cdot 10^{-2} \text{ s}^{-1}$, $4,32 \cdot 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ et $5,53 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$. L'ensemble des constantes des vitesses d'activation apparentes est reporté sur la figure 3.16. L'énergie d'activation du processus obtenue par régression linéaire, vaut $(69 \pm 5) \text{ kJ mol}^{-1}$. Sur la même figure, on a reporté les constantes de vitesse de réduction du Mo^V « high g resting » obtenues par les expériences de cinétique à température ambiante, sur la sous-unité NapA. L'énergie d'activation de ce processus, qui a été donnée plus haut, vaut $(69 \pm 8) \text{ kJ mol}^{-1}$. Les deux valeurs, déterminées par des protocoles différents, sur des phénomènes différents, sont en très bon accord au vu des incertitudes de mesure.

On pourrait objecter que les vitesses obtenues ne sont pas les mêmes, et que les systèmes observés (NapA d'un côté, NapA+B de l'autre) ne sont pas les mêmes. Cependant, les résultats obtenus par Vincent FOURMOND par électrochimie montrent que NapA et NapAB s'activent au même potentiel (*cf* figure 3.4 p. 86)

Ce résultat indique donc fortement que la réduction de l'espèce Mo^V « high g resting » et l'activation de l'enzyme dépendent d'une seule et même étape cinétiquement déterminante.

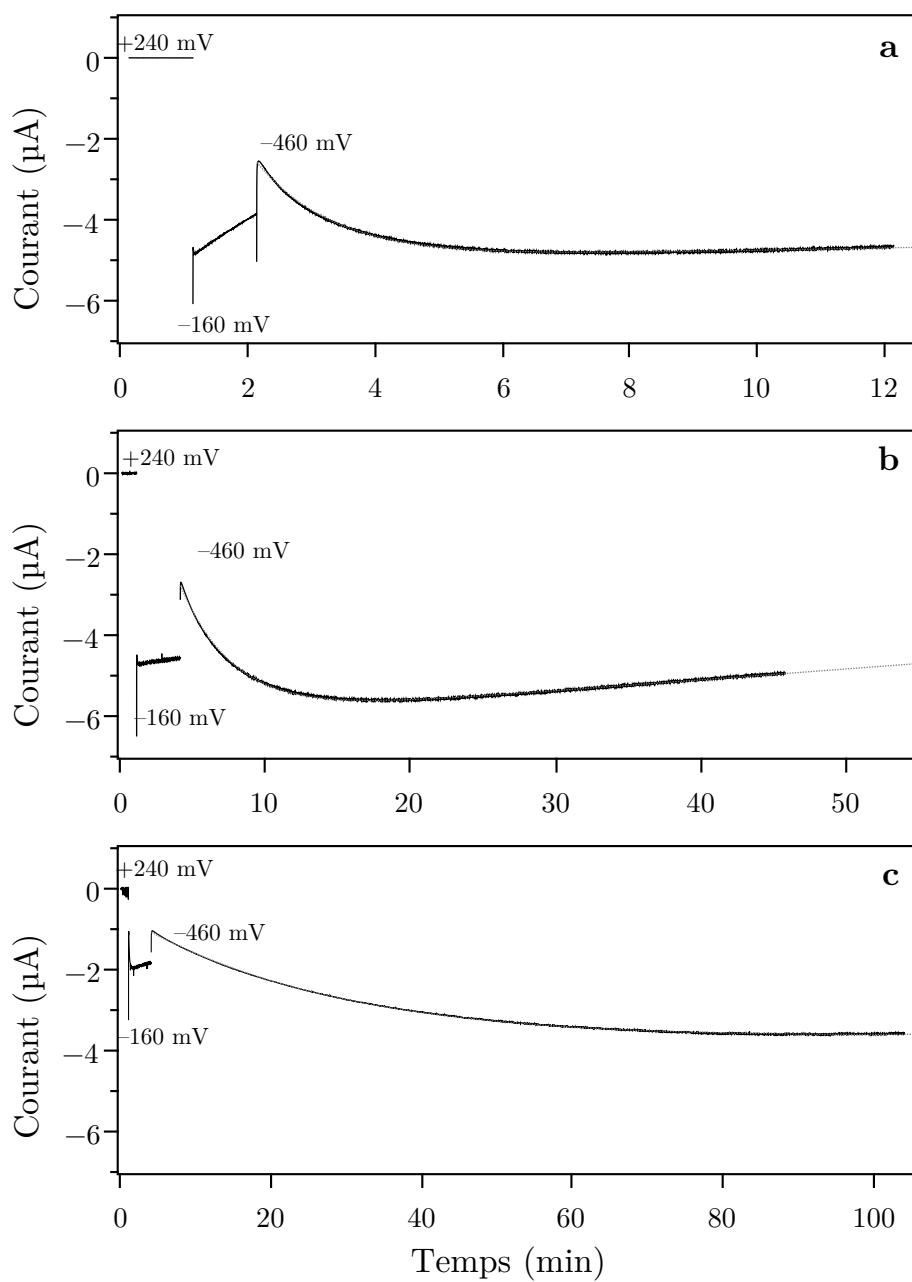


Figure 3.15 – Chronoampérommes donnés par des films de NapA+B « as prepared » portés successivement à $+240$, -160 et -460 mV , à 35°C (a), 20°C (b) et 5°C (c), $\text{pH}=6,0$. Noter les échelles de temps différentes.

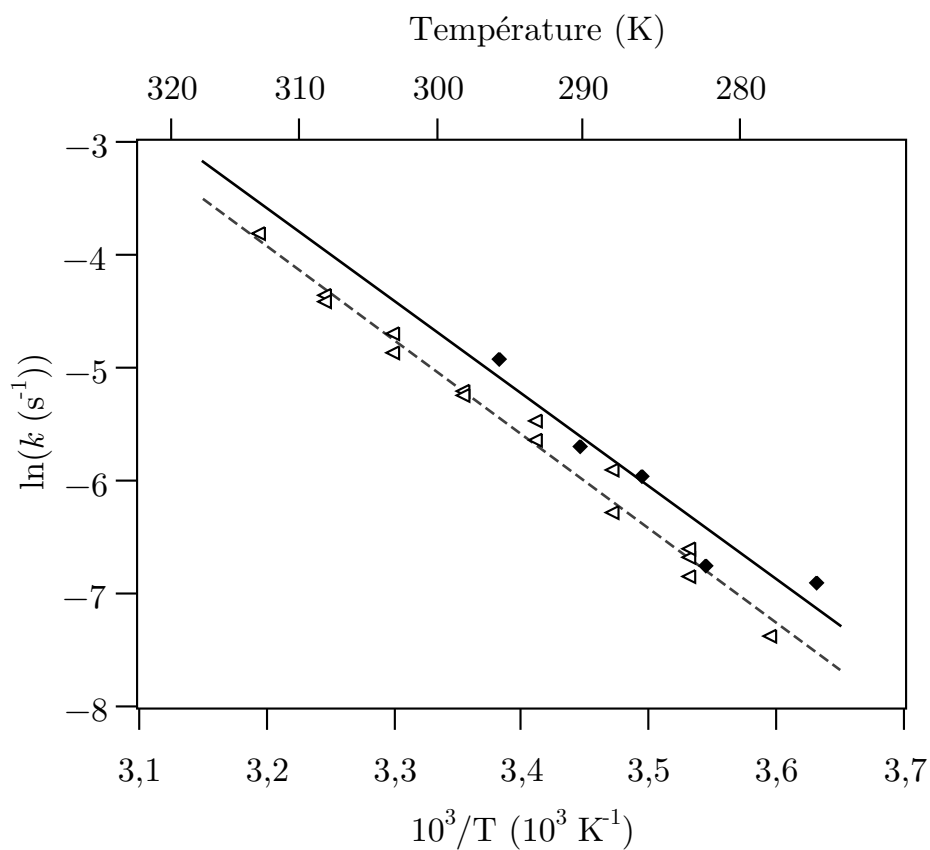


Figure 3.16 – Représentation d'ARRHENIUS des vitesses d'activation déterminées par électrochimie (\triangleleft) et de réduction du Mo^{V} déterminée par RPE (\blacklozenge), et droites de régression linéaire donnant l'énergie d'activation apparente pour chaque processus. Les deux droites ont une pente donnée par $E_a = 69 \text{ kJ mol}^{-1}$.

3.3 Discussion

Ces travaux visent à comprendre le mécanisme d'activation irréversible de NapAB par réduction. Cette activation concerne la fraction de l'enzyme « as prepared » où le cofacteur à molybdène est sous la forme Mo^{V} « high *g* resting ».

L'observation, par chronoampérométrie, de régimes mono-exponentiels suggère qu'il y a une seule étape cinétiquement déterminante. L'influence du potentiel sur la vitesse d'activation montre qu'elle ne résulte pas d'une étape élémentaire.

Le mécanisme en deux étapes qui a été proposé (Schéma 3.2) permet de rendre compte de cette influence. Dans ce mécanisme, l'activation irréversible se produit sur la forme réduite Mo^{IV} du cofacteur, qui est supposée être en équilibre rapide avec la forme oxydée Mo^{V} . Cette activation irréversible est l'étape cinétiquement déterminante du modèle (Fourmond *et al.*, 2008). La loi de vitesse dérivée de ce modèle (équation 3.14 et schéma 3.2, page 87), repose sur une hypothèse : les transitions redox sont à l'équilibre. Cela signifie que les vitesses de transfert d'électrons sont grandes devant toutes les autres constantes de vitesses.

Par RPE à basse température, nous avons constaté qu'après addition d'un réducteur, le centre fer-soufre est aussitôt réduit, alors que le cofacteur à molybdène reste dans l'état Mo^{V} . Par RPE à température ambiante, nous avons observé que l'espèce « high *g* resting » est réduite avec une vitesse de pseudo-premier ordre de l'ordre de 10^{-3} s^{-1} . Nous avons pu montrer que la cinétique de réduction de la forme « high *g* resting » est sensible aux mêmes facteurs que la cinétique d'activation de l'enzyme vue par chronoampérométrie : Celle-ci sont accélérées en l'absence de la sous-unité NapB, et dépendent fortement de la température. La phase d'activation observée par électrochimie et la disparition du signal RPE de l'espèce « high *g* resting » sont ainsi deux manifestations d'un seul processus qui :

- a lieu dans des conditions réductrices
- a une vitesse de l'ordre de 10^{-3} s^{-1}
- est irréversible
- est 4 à 7 fois plus rapide dans NapA que dans NapAB
- et dont l'étape cinétiquement déterminante a une énergie d'activation d'environ 69 kJ/mol

Ceci corrobore bien le fait que la forme inactive de l'enzyme qui s'active par réduction est celle-là même qui donne le signal RPE Mo^{V} « high *g* resting ».

Dans l'enzyme active, le centre fer-soufre est le dernier relais dans la chaîne de transfert d'électrons qui permet de réduire le molybdène. La décroissance du signal RPE est la conséquence directe d'un transfert d'électron (intramoléculaire ou intermoléculaire) vers l'ion Mo^{5+} . L'hypothèse d'un transfert d'électron intramoléculaire rapide est contredite par la lenteur de la réduction de l'espèce « high *g* resting ». L'addition de médiateurs électrochimiques n'a pas d'effet significatif. Le transfert d'électrons inter-moléculaire n'est pas en cause dans la lenteur du phénomène. De plus, l'étape cinétiquement déterminante n'est pas postérieure à la réduction du Mo^{V} « high *g* resting ». Ceci met donc en question la pertinence du modèle proposé en 2008, et la validité des potentiels de réduction de l'espèce « high *g* resting », mesurés dans NapA et NapAB en 2003 (Arnoux *et al.*, 2003).

En effet, la détermination des potentiels redox suppose également que l'équilibre redox est atteint.

Dans les molécules présentant le signal Mo^{V} « high g resting », le transfert d'électron intramoléculaire est considérablement ralenti. Nous allons donc examiner deux modèles qui doivent nous permettre de rendre compte de toutes les observations faites jusqu'ici. Au vu des cinétiques de premier ordre, nous allons considérer une seule étape lente, et qu'aucune espèce intermédiaire ne s'accumule. Comme le processus semble irréversible, la dernière étape de chaque modèle est irréversible. Dans le premier modèle, l'étape cinétiquement déterminante est précisément la transition $\text{Mo}^{\text{V}} \rightarrow \text{Mo}^{\text{IV}}$. Dans le second modèle, nous faisons l'hypothèse d'une étape lente non-redox qui précède le transfert d'électron. Nous allons calculer la vitesse de disparition des espèces Mo^{V} , ainsi que la vitesse d'apparition de formes actives. Le mécanisme doit rendre compte de la différence observée entre NapA et NapAB. L'activation est plus rapide dans NapA. Le potentiel de réduction du centre fer-soufre est de -240 mV dans NapA, -80 mV dans NapAB. Cet écart de 160 mV est-il responsable de la différence observée, dans l'hypothèse où c'est le transfert d'électron intramoléculaire qui est cinétiquement déterminant ?

3.3.1 Mécanismes proposés pour l'activation par réduction

3.3.1.1 Modèle impliquant le transfert d'électrons intramoléculaire

Nous supposons ici que le transfert d'électrons intramoléculaire vers l'espèce Mo^{V} « high g resting » est l'étape cinétiquement déterminante. Le molybdène peut *a priori* recevoir des électrons de plusieurs donneurs : les hèmes, les ptérines, les réducteurs en solution, le centre fer-soufre.

Les travaux menés au LBC de Cadarache ont montré qu'un résidu proche du site actif, l'arginine 392, empêche les ions dithionite de réduire directement le métal. En effet, la vitesse de turnover k_{cat} , mesurée *via* la production de nitrite (produit de la réduction du nitrate) :

- est faible et non mesurable avec NapA + $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$
- vaut environ $0,4 \text{ s}^{-1}$ avec NapAB + $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$
- augmente à $6,7 \text{ s}^{-1}$ dans le mutant R 392 A de NapAB

La mutation R392A en un résidu non chargé permet donc d'accélérer le turnover en présence de dithionite comme seul donneur d'électrons. Cette accélération résulterait d'une exposition du site à molybdène au solvant, ce qui permettrait une réduction du Mo non pas *via* les cofacteurs redox, mais directement depuis le solvant (Dementin *et al.*, 2007). La faible activité enzymatique détectée avec NapAB wild-type résulterait donc d'un transfert d'électron intra-moléculaire, qui se ferait *via* les hèmes, puis le centre fer-soufre. Un tel transfert d'électron serait impossible avec NapA, où les hèmes sont absents (*cf* schéma 3.1). Le turnover en présence de dithionite seul, indétectable dans NapA, est donc limité par la vitesse de transfert d'électron inter-moléculaire.

Nous notons de plus que la vitesse de turnover mesurée dans NapAB ($0,4 \text{ s}^{-1}$ avec $2,85 \text{ mM Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) est très supérieure à la vitesse de réduction du Mo^{V} « high g resting » que nous avons mesurée dans NapAB ($\simeq 1 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ avec $14 \text{ mM Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$, en présence de médiateurs ou non).

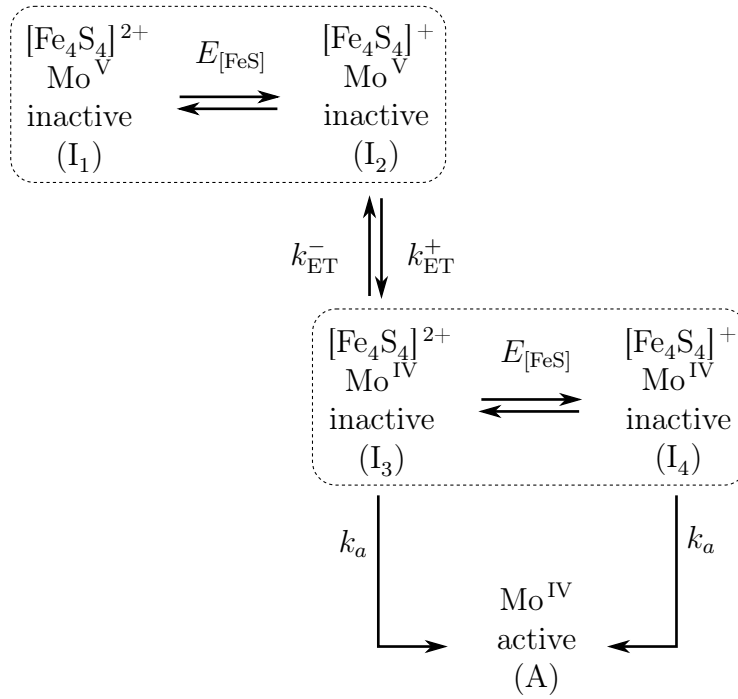


Schéma 3.3 – Modèle d'activation par réduction. Les espèces entre pointillés sont à l'équilibre. La transition $k_{\text{ET}}^{+/-}$ correspond au transfert d'un électron du centre fer-soufre vers le molybdène. Les espèces Mo^{IV} s'activent de manière irréversible.

Enfin et surtout, l'activation de l'enzyme est observée à la surface d'une électrode. La structure de NapAB (le molybdène enfoui dans la protéine) rend invraisemblable tout transfert d'électron direct depuis la surface de l'électrode vers l'ion molybdène. La réduction de l'espèce Mo^{V} « high g resting » ne procède donc pas par transfert direct d'un électron au Mo. Dans ce premier modèle, nous faisons l'hypothèse que le centre fer-soufre est le seul donneur d'électrons au centre à molybdène, c'est-à-dire que nous excluons la réduction du Mo^{V} par transfert d'électrons depuis le solvant, les hèmes, ou l'électrode sur laquelle la protéine peut être adsorbée.

Calcul de la vitesse de réaction

Nous faisons donc apparaître explicitement l'état d'oxydation du centre fer-soufre, que nous supposons en équilibre entre les états $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{2+}$ et $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^+$, pour les deux états d'oxydation du molybdène considérés.

$$\epsilon \equiv \exp\left(\frac{\mathcal{F}}{RT}(E - E_{\text{FeS}}^\circ)\right) \quad (3.18)$$

$$[\text{I}_2] = \frac{[\text{I}_1] + [\text{I}_2]}{1 + \exp\left(\frac{\mathcal{F}}{RT}(E - E_{\text{FeS}}^\circ)\right)} = \frac{[\text{I}_1] + [\text{I}_2]}{1 + \epsilon} \quad (3.19)$$

$$[\text{I}_3] = \frac{[\text{I}_3] + [\text{I}_4]}{1 + \exp\left(\frac{-\mathcal{F}}{RT}(E - E_{\text{FeS}}^\circ)\right)} = \frac{[\text{I}_3] + [\text{I}_4]}{1 + 1/\epsilon} \quad (3.20)$$

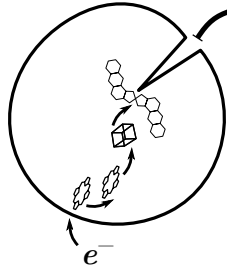


Schéma 3.4 – Voie de transfert d'électrons au molybdène. La réduction depuis le solvant n'est pas possible selon notre modèle.

Puisque l'on suppose $k_a \gg k_{\text{ET}}^+$, on appliquera l'approximation de l'état quasi-stationnaire aux espèces I_3 et I_4 .

$$\frac{d[I_3 + I_4]}{dt} = 0 = k_{\text{ET}}^+[I_2] - k_{\text{ET}}^-[I_3] - k_a ([I_3] + [I_4]) \quad (3.21)$$

$$k_{\text{ET}}^+[I_2] = \left(k_a + \frac{k_{\text{ET}}^-}{1 + 1/\epsilon} \right) ([I_3] + [I_4]) \quad (3.22)$$

$$k_{\text{ET}}^+[I_2] = \left(\frac{k_{\text{ET}}^- + k_a + k_a/\epsilon}{1 + 1/\epsilon} \right) ([I_3] + [I_4]) \quad (3.23)$$

La réaction observée par RPE correspond à la transition $\text{Mo}^{\text{V}} \rightarrow \text{Mo}^{\text{IV}}$. Dans le modèle du schéma 3.3, sa vitesse s'écrit :

$$-\frac{d([I_1] + [I_2])}{dt} = k_{\text{ET}}^+[I_2] - k_{\text{ET}}^-[I_3] \quad (3.24)$$

La relation (3.20) donne alors :

$$-\frac{d([I_1] + [I_2])}{dt} = k_{\text{ET}}^+[I_2] - \frac{k_{\text{ET}}^-}{1 + 1/\epsilon} ([I_3] + [I_4]) \quad (3.25)$$

En injectant (3.21), il vient

$$-\frac{d([I_1] + [I_2])}{dt} = k_{\text{ET}}^+[I_2] - \frac{k_{\text{ET}}^- k_{\text{ET}}^+[I_2]}{k_{\text{ET}}^- + k_a + k_a/\epsilon} \quad (3.26)$$

$$-\frac{d([I_1] + [I_2])}{dt} = k_{\text{ET}}^+[I_2] \left(1 - \frac{k_{\text{ET}}^-}{k_{\text{ET}}^- + k_a + k_a/\epsilon} \right) \quad (3.27)$$

$$-\frac{d([I_1] + [I_2])}{dt} = k_{\text{ET}}^+[I_2] \frac{k_a + k_a/\epsilon}{k_{\text{ET}}^- + k_a + k_a/\epsilon} \quad (3.28)$$

$$-\frac{d([I_1] + [I_2])}{dt} = k_{\text{ET}}^+[I_2] \frac{1 + \epsilon}{1 + (1 + k_{\text{ET}}^-/k_a)\epsilon} \quad (3.29)$$

En utilisant (3.19), on obtient l'équation différentielle d'ordre 1 vérifiée par $[I_1] + [I_2]$:

$$-\frac{d([I_1] + [I_2])}{dt} = \frac{k_{\text{ET}}^+ ([I_1] + [I_2])}{1 + \left(1 + \frac{k_{\text{ET}}^-}{k_a} \right) \exp\left(\frac{\mathcal{F}}{RT}(E - E_{\text{FeS}}^\ominus)\right)} \quad (3.30)$$

Cette équation fait apparaître la constante de vitesse de disparition du Mo^{V} :

$$k = \frac{k_{\text{ET}}^+}{1 + \left(1 + \frac{k_{\text{ET}}^-}{k_a}\right) \exp\left(\frac{\mathcal{F}}{RT}(E - E_{\text{FeS}}^\ominus)\right)} \quad (3.31)$$

Cette constante de vitesse peut prendre des valeurs entre 0 et k_{ET}^+ . C'est une fonction décroissante du potentiel. On peut réécrire la dépendance en potentiel de la manière suivante :

$$k_{\text{red}} = \frac{k_{\text{ET}}^+}{1 + \exp\left(\frac{\mathcal{F}}{RT}(E - E_{\text{eff}})\right)} \quad (3.32)$$

où l'on a posé :

$$E_{\text{eff}} = E_{\text{FeS}}^\ominus - \frac{RT}{\mathcal{F}} \ln\left(1 + \frac{k_{\text{ET}}^-}{k_a}\right) \quad (3.33)$$

La courbe de k en fonction du potentiel est donc une sigmoïde de NERNST à un électron, centrée sur le potentiel effectif E_{eff} . Ce potentiel est plus bas que celui du centre fer-soufre. À la limite $\frac{k_{\text{ET}}^-}{k_a} \rightarrow 0$, E_{eff} tend vers E_{FeS}^\ominus .

Vitesse d'apparition de la forme active

La phase d'activation lente observée en électrochimie correspond à l'apparition de l'espèce A du schéma 3.3. La vitesse de ce processus est :

$$\frac{d[\text{A}]}{dt} = k_a ([\text{I}_3] + [\text{I}_4]) \quad (3.34)$$

En comparant cette définition aux relations (3.21) et (3.24), il apparaît immédiatement que la vitesse d'activation est égale à la vitesse de disparition du Mo^{V} . Ceci est lié à l'hypothèse de l'état quasi stationnaire que nous avons appliquée aux états I_3 et I_4 .

Les données d'électrochimie obtenues par FOURMOND et coll. en 2008 montrent que la vitesse d'activation dépend du potentiel selon une sigmoïde centrée vers -250 mV/ESH pour les deux protéines, NapA et NapAB. Ce potentiel est proche du potentiel de réduction du centre fer-soufre dans NapA, où il a été titré à -240 mV , mais est nettement éloigné de celui-ci dans NapAB, où il est de -80 mV .

3.3.1.2 Modèle avec transfert d'électrons « gated »

Dans ce modèle (voir le schéma 3.5, p. 112), nous postulons la coexistence de deux formes de la protéine donnant le signal RPE « high g resting ». La différence entre celles-ci résiderait dans leur aptitude à recevoir ou donner un électron : la première (I_1) serait inerte, la deuxième (I_2) échangerait les électrons suffisamment rapidement avec le centre fer-soufre ou d'autres donneurs, pour être en équilibre avec l'état Mo^{IV} (I_3), au potentiel E_{Mo}^\ominus :

$$\epsilon[\text{I}_3] = [\text{I}_2] \quad (3.35)$$

où $\epsilon \equiv \exp\left(\frac{\mathcal{F}}{RT}(E - E_{\text{Mo}}^\ominus)\right)$. La nature de la transformation entre I_1 et I_2 n'est pas précisée pour le moment, mais nous supposons qu'elle ne dépend pas du potentiel. Ainsi, la transformation de l'espèce I_1 en I_3 est « déclenchée » par la première transformation, de I_1 en I_2 . Les constantes de vitesse de premier ordre directe et inverse sont notées k_1 et k_{-1} . L'espèce réduite I_3 s'active irréversiblement.

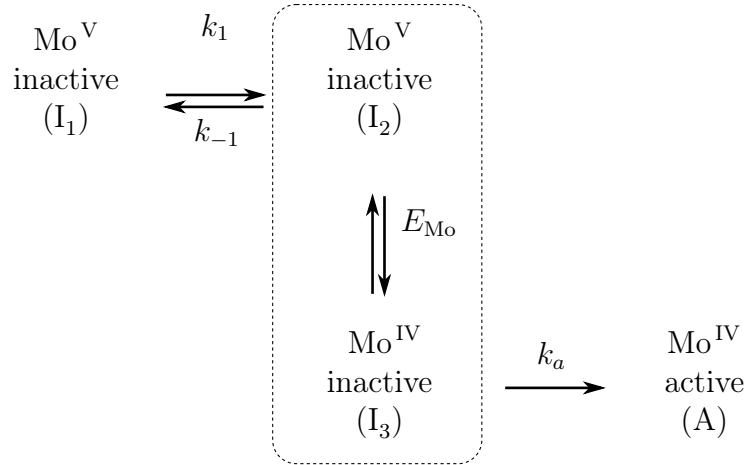


Schéma 3.5 – Modèle d'activation irréversible par réduction. Les espèces délimitées par les pointillés sont à l'équilibre permanent

Calcul de la vitesse de réduction

L'étape $\text{I}_3 \rightarrow \text{A}$ n'est pas supposée cinétiquement déterminante. On appliquera donc l'approximation de l'état quasi-stationnaire aux espèces I_2 et I_3 . On peut alors écrire globalement :

$$\frac{d([\text{I}_2] + [\text{I}_3])}{dt} = k_1[\text{I}_1] - k_{-1}[\text{I}_2] - k_a[\text{I}_3] \quad (3.36)$$

En utilisant 3.35 il vient alors :

$$0 = k_1[\text{I}_1] - k_{-1}[\text{I}_2] - k_a[\text{I}_3] \quad (3.37)$$

$$k_{-1}[\text{I}_2] + \frac{k_a}{\epsilon}[\text{I}_2] = k_1[\text{I}_1] \quad (3.38)$$

$$[\text{I}_2] = \frac{k_1}{\frac{k_a}{\epsilon} + k_{-1}}[\text{I}_1] \quad (3.39)$$

Vitesse de disparition du Mo^{V}

La transition $\text{Mo}^{\text{V}} \rightarrow \text{Mo}^{\text{IV}}$ a pour vitesse :

$$-\frac{d([\text{I}_1] + [\text{I}_2])}{dt} = -\frac{d[\text{I}_1]}{dt} = k_1[\text{I}_1] - k_{-1}[\text{I}_2] \quad (3.40)$$

La relation (3.39) donne

$$-\frac{d[I_1]}{dt} = k_1[I_1] - \frac{k_{-1}k_1}{k_{-1} + \frac{k_a}{\epsilon}}[I_1] \quad (3.41)$$

$$-\frac{d[I_1]}{dt} = k_1 \left(1 - \frac{\epsilon k_{-1}}{\epsilon k_{-1} + k_a} \right) [I_1] \quad (3.42)$$

$$-\frac{d[I_1]}{dt} = \frac{k_1}{1 + \frac{k_{-1}}{k_a}\epsilon} [I_1] \quad (3.43)$$

La constante de vitesse de pseudo-premier ordre pour la disparition du Mo^V a donc pour expression :

$$k_{\text{red}} = \frac{k_1}{1 + \frac{k_{-1}}{k_a} \exp\left(\frac{\mathcal{F}}{RT} (E - E_{\text{Mo}}^\ominus)\right)} \quad (3.44)$$

Vitesse d'activation

La vitesse d'apparition de la forme active est

$$v_{\text{act}} = \frac{d[A]}{dt} \quad (3.45)$$

$$= k_a[I_3] = k_1[I_1] - k_{-1}[I_2] \quad (3.46)$$

$$= -\frac{d[I_1]}{dt} \quad (3.47)$$

Cette vitesse est donc égale à la vitesse de disparition de la forme I_1 . La constante de vitesse k_{red} dépend du potentiel selon une sigmoïde à un électron centrée sur le potentiel effectif :

$$E_{\text{eff}} = E_{\text{Mo}}^\ominus - \frac{RT}{\mathcal{F}} \ln \frac{k_{-1}}{k_a} \quad (3.48)$$

Cette relation est compatible avec les mesures de k_{act} publiées précédemment, et montrées sur la figure 3.4 (p ; 86). Les données ne donnent accès qu'à un seul paramètre, alors qu'il y a trois paramètres indépendants dans l'expression 3.48 (E_{Mo}^\ominus , k_{-1} , et k_a).

3.3.2 Confrontation des deux modèles

Typologie de DAVIDSON pour les transferts d'électrons en biologie

Nous rappelons l'expression semi-classique de la vitesse de transfert d'électron en régime non-adiabatique :

$$k_{\text{ET}} = \frac{2\pi}{\hbar} \frac{|T_{\text{AB}}|^2}{\sqrt{4\pi\lambda k_{\text{B}}T}} \exp\left(-\frac{(\Delta_r G^\ominus + \lambda)^2}{4\lambda k_{\text{B}}T}\right) \quad (3.49)$$

L'observation d'un transfert d'électron ne signifie pas que la vitesse observée soit gouvernée par la vitesse de l'étape de transfert d'électron elle-même. Plusieurs étapes élémentaires peuvent être nécessaires au transfert d'électron, sans qu'il soit possible de les observer. DAVIDSON a proposé une classification des réactions complexes

impliquant un transfert d'électron. Il distingue trois cas où le transfert électronique est précédé par une étape quelconque (ET = electron transfer) (Davidson, 1996; Davidson, 2002; Davidson, 2008) :



- Si $k_{\text{ET}} \ll k_i$ et $k_i/k_{-i} \gg 1$, « true ET » : $k_{\text{obs}} = k_{\text{ET}}$
- Si $k_{\text{ET}} \ll k_i$ et $k_i/k_{-i} \ll 1$, « coupled ET » : $k_{\text{obs}} = \frac{k_i}{k_{-i}}k_{\text{ET}}$
- $k_{\text{ET}} \gg k_i$, « gated ET » : $k_{\text{obs}} = k_i$

Une valeur de l'élément de matrice de couplage $|T_{\text{AB}}|$ supérieure à $\simeq 80 \text{ cm}^{-1}$ serait révélatrice d'un transfert d'électron « gated ». Cette valeur correspond à la limite théorique où la réorganisation de l'eau (le solvant) devient cinétiquement limitante (Winkler et Gray, 1992). Le terme « gated » a été introduit par DAVIDSON pour décrire le cas où le transfert d'électrons d'un site redox à l'autre est littéralement « commandé » (comme un interrupteur, un transistor) ou « conditionné » par un événement de nature différente, par exemple, un changement conformationnel.

Le modèle du schéma 3.3 se rapproche du cas « true ET » à bas potentiel, où le centre fer-soufre est totalement réduit. Le modèle du schéma 3.5 revient à un « gated ET ».

De nombreux travaux ont visé à estimer les vitesses de transfert d'électron dans des systèmes biologiques sauvages, mutés, ou modifiés chimiquement. La plupart des techniques d'excitation et de détection étant optiques, les centres redox à forte absorption sont les plus étudiés : centres réactionnels des photosystèmes, protéines hémiques comme le cytochrome *c* (Venturoli *et al.*, 1998), à cuivre comme l'azurine. Peu de données sont disponibles sur les ferrédoxines, ou les centres à molybdène.

Les valeurs typiques de l'énergie λ s'échelonnent, selon les systèmes, entre 0,1 eV et 2 eV, mais les plus couramment reportées vont entre 0,5 eV et 1,5 eV. Dans les centres réactionnels des photosystèmes, des valeurs aussi faibles que 0,07 eV sont estimées (Huppman *et al.*, 2002). Les travaux de KÜMMERLE et coll. ont permis d'estimer le couplage électronique entre deux centres $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ de la ferrédoxine de *Chromatium vinosium* autour de $0,4 \text{ cm}^{-1}$, et l'énergie de réorganisation entre 0,2 et 0,5 eV (Kümmerle *et al.*, 2001).

Les valeurs estimées de $|T_{\text{AB}}|$ s'étendent de moins de 1 cm^{-1} à plusieurs centaines de cm^{-1} .

Dans l'hypothèse où le transfert d'électron intramoléculaire du centre fer-soufre vers le molybdène est l'étape cinétiquement déterminante, alors l'énergie d'activation est donnée par l'expression approchée (valide puisque $\Delta_r G^\ominus \simeq -0,2 \text{ eV} \ll \lambda$) :

$$E_a = \frac{(\Delta_r G^\ominus + \lambda)^2}{4\lambda} \quad (3.50)$$

Prenant $k_{\text{ET}} = 5,9 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ pour la vitesse de transfert d'électron à $T = 296 \text{ K}$, et $\lambda = 4E_a = 2,8 \text{ eV}$, nous obtenons

$$|T_{\text{AB}}| = 6,9 \cdot 10^{-4} \text{ eV} = 5,6 \text{ cm}^{-1}$$

Cette valeur ne permet pas de savoir si la cinétique observée est bien celle d'un « gated ET ».

Nos mesures donnent donc pour λ une valeur très élevée pour un transfert d'électron intramoléculaire. Il est peu vraisemblable que l'enzyme subisse de large mouvements de domaines.

Une telle valeur est le signe que la réaction observée ne correspond pas à un pur transfert d'électron, mais que celui-ci est couplé à une réaction chimique (réorganisation d'un complexe ou formation/rupture de liaisons). Si l'on s'en tient à cette interprétation, une transformation chimique précède le transfert d'électron au Mo.

3.3.3 Résumé et Perspectives

Dans cette étude, nous avons montré qu'une transformation lente et avec une énergie d'activation élevée ($E_a \simeq 69 \text{ kJ mol}^{-1}$) est nécessaire à l'activation de l'enzyme par réduction. Contrairement à ce qui était proposé jusqu'alors, nos données montrent que cette étape lente précède la réduction du molybdène « high *g* resting » en Mo^{IV}. En tentant d'analyser les résultats grâce à la théorie des transferts d'électrons dans les protéines, nous avons obtenu une énergie de réorganisation irréaliste pour une étape de transfert électronique simple. La cinétique de la transformation irréversible qui s'opère lors de la première réduction de l'enzyme est donc dictée par des étapes de nature différentes. Ces étapes peuvent être des ruptures, ou formation de liaisons, des étapes de diffusion, des réorganisations structurales, etc. Le caractère à la fois lent et irréversible de cette activation nous fait penser qu'elle ne relève pas d'une réaction physiologique.

L'activation de l'enzyme est plus rapide dans NapA que dans NapAB. Cette différence pourrait venir d'une plus grande flexibilité structurale de NapA. En effet, NapB » embrasse « NapA sur une grande surface (Arnoux *et al.*, 2003) et peut ainsi contraindre la structure de NapA. Cette contrainte se voit sur la largeur des raies RPE du centre fer – soufre, plus grande dans NapA que dans NapAB (Frangioni, 2006). Dans les chapitres suivants, nous exposons des études spectroscopiques poussées qui nous permettent d'avancer un mécanisme moléculaire pour rendre compte de cette activation par réduction.

Chapitre 4

Caractérisation spectroscopique des espèces Mo^V « high g »

Sommaire

4.1	Introduction	116
4.2	Conditions de formation et propriétés spectroscopiques de l'espèce Mo^V « high g nitrate »	117
4.2.1	Formation par oxydation au nitrate	117
4.2.2	Formation de l'espèce Mo ^V « high g nitrate » en absence de nitrate	120
4.2.3	Caractérisation du signal Mo ^V « high g nitrate »	122
4.3	Étude des interactions magnétiques intercentres dans la sous-unité catalytique	124
4.3.1	Mise en évidence et étude d'une interaction magnétique sur les formes « high g resting » et « high g nitrate »	124
4.3.2	Étude en bande Q de l'espèce « high g resting » en interaction et hors interaction	128
4.4	Caractérisation quantitative du couplage intercentre par simulation numérique	135
4.4.1	Simulation du spectre de l'espèce « high g resting » en interaction	138
4.4.2	Simulation du spectre de l'espèce « high g nitrate » en interaction	139
4.5	Étude de la relaxation des espèces paramagnétiques dans NapA	145
4.5.1	Étude de la relaxation des espèce Mo ^V « high g »	145
4.5.2	Propriétés de relaxation du centre fer-soufre	154
4.6	Mise en évidence de l'espèce Mo^V « high g turnover »	157
4.7	Discussion	160

4.1 Introduction

La compréhension du cycle catalytique des nitrate réductases périplasmiques passe par l'étude des formes Mo^V observées pendant la catalyse. Or, pour qu'une

forme spectroscopique soit attribuée à une espèce intermédiaire du cycle catalytique, il faut montrer que le *produit* de la réaction est effectivement formé dans les conditions utilisées, que cette forme apparaît sur une *échelle de temps* comparable à celle de la catalyse (Fourmond *et al.*, 2010b). Cependant ces informations sont rarement connues et souvent difficiles à obtenir.

Les formes Mo^{V} du cofacteur appelées « high *g* » sont spectroscopiquement très proches. Cela suggère fortement que la première sphère de coordination du Mo^{5+} y est donc semblable.

Les principales différences résident dans les conditions d'observation de ces espèces, leur stœchiométrie, leur stabilité, potentiel redox. Chez *E. coli*, la forme « high *g* nitrate » apparaît en faible proportion à bas potentiel.

Chez *Cyanothece* et *Synechococcus*, le signal se développe à l'état réduit. Chez *P. pantotrophus* et *R. sphaeroides*, la forme « high *g* resting » est présente dans une forme inactive de l'enzyme préparée en aérobie.

Pour comprendre le rôle des formes « high *g* » du cofacteur à molybdène dans le fonctionnement de l'enzyme, il est donc indispensable de connaître précisément les conditions d'apparition de ces espèces, et leur structure précise, au delà de la première sphère de coordination du Mo^{5+} .

Les travaux menés précédemment au laboratoire ont montré que l'espèce Mo^{V} « high *g* resting » de *R. sphaeroides* est inactive (Fourmond *et al.*, 2008). Cependant, dans toutes les nitrate réductases bactériennes périplasmiques et assimilatrices étudiées, l'espèce Mo^{V} « high *g* nitrate » est observée en présence de nitrate et d'un donneur d'électron, ce qui suggère que cette espèce est impliquée dans le cycle catalytique, ou du moins qu'elle émane d'un site à molybdène catalytiquement compétent (Gangeswaran *et al.*, 1993; Bennett *et al.*, 1994; González *et al.*, 2006; Jepson *et al.*, 2007). D'où vient cette différence d'activité? Il devient nécessaire d'étudier plus précisément la structure des espèce « high *g* » afin de comprendre ce qui les rend actives ou non.

Ici, nous avons entrepris une comparaison détaillée des conditions d'observations des espèces Mo^{V} « high *g* resting » et « high *g* nitrate ». Cette étude a été faite avec la sous-unité NapA de *R. sphaeroides*, où le cofacteur à molybdène et le cluster fer-soufre sont les seuls centres paramagnétiques.

La mise en évidence d'une interaction magnétique avec le centre fer-soufre réduit nous permet d'observer des différences significatives entre les espèces « high *g* resting » et « high *g* nitrate ». Ces données, combinées avec celles du chapitre 3, nous amènent à proposer un mécanisme inédit du processus d'activation de l'enzyme par réduction.

4.2 Conditions de formation et propriétés spectroscopiques de l'espèce Mo^{V} « high *g* nitrate »

4.2.1 Formation par oxydation au nitrate

L'espèce « high *g* resting », trouvée uniquement dans l'état « as prepared » est associée à un état inactif de l'enzyme. La forme du cofacteur à molybdène qui donne le signal « high *g* resting » est rendue active par une étape de réduction à

bas potentiel (≤ -270 mV). En solution, on utilise le dithionite de sodium $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ pour cette réaction. Par RPE, l'état réduit de l'enzyme est alors dominé par la seule signature rhombique du centre $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^+$. L'échantillon est donc supposé homogène. Pour le moins, une partie de l'hétérogénéité initiale a été abolie, comme le montre son comportement en électrochimie (*cf* Chapitre 3).

La figure 4.1 montre le spectre de l'enzyme lorsque celle-ci est dans l'état « as prepared » (*a*). On observe alors la forme « high *g* resting », ainsi que l'espèce « very high *g* » et l'espèce « low *g* ». Le centre fer-soufre est alors oxydé, donc diamagnétique. En *b*, *e*, l'enzyme a été réduite pendant une heure de sorte que la majorité de l'espèce « high *g* resting » a disparu. Après l'addition d'un excès de nitrate (KNO_3) à l'enzyme, l'enzyme est brièvement incubée sous argon à température ambiante (2 minutes) puis congelée dans l'azote liquide. On observe alors une forme Mo^{V} de type « high *g* » (*c*, *f*). Cette forme ressemble à la forme « high *g* nitrate » reportée dans la littérature. Dans le même temps, l'intensité de la signature du centre $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^+$ a légèrement décru, signe que le nitrate a oxydé l'enzyme. Si l'échantillon est décongelé et son oxydation par le nitrate prolongée, le centre fer-soufre s'oxyde complètement. La forme « high *g* nitrate » laisse alors la place à une autre forme Mo^{V} , qui ressemble à l'espèce « high *g* turnover » reportée par NAJMUDIN et coll. (spectre *d*).

Ainsi, l'addition anaérobie de nitrate à l'enzyme pré-réduite, suivie d'une congélation après une à deux minutes d'incubation conduit à l'oxydation de l'enzyme et à l'apparition de l'espèce Mo^{V} « high *g* nitrate ».

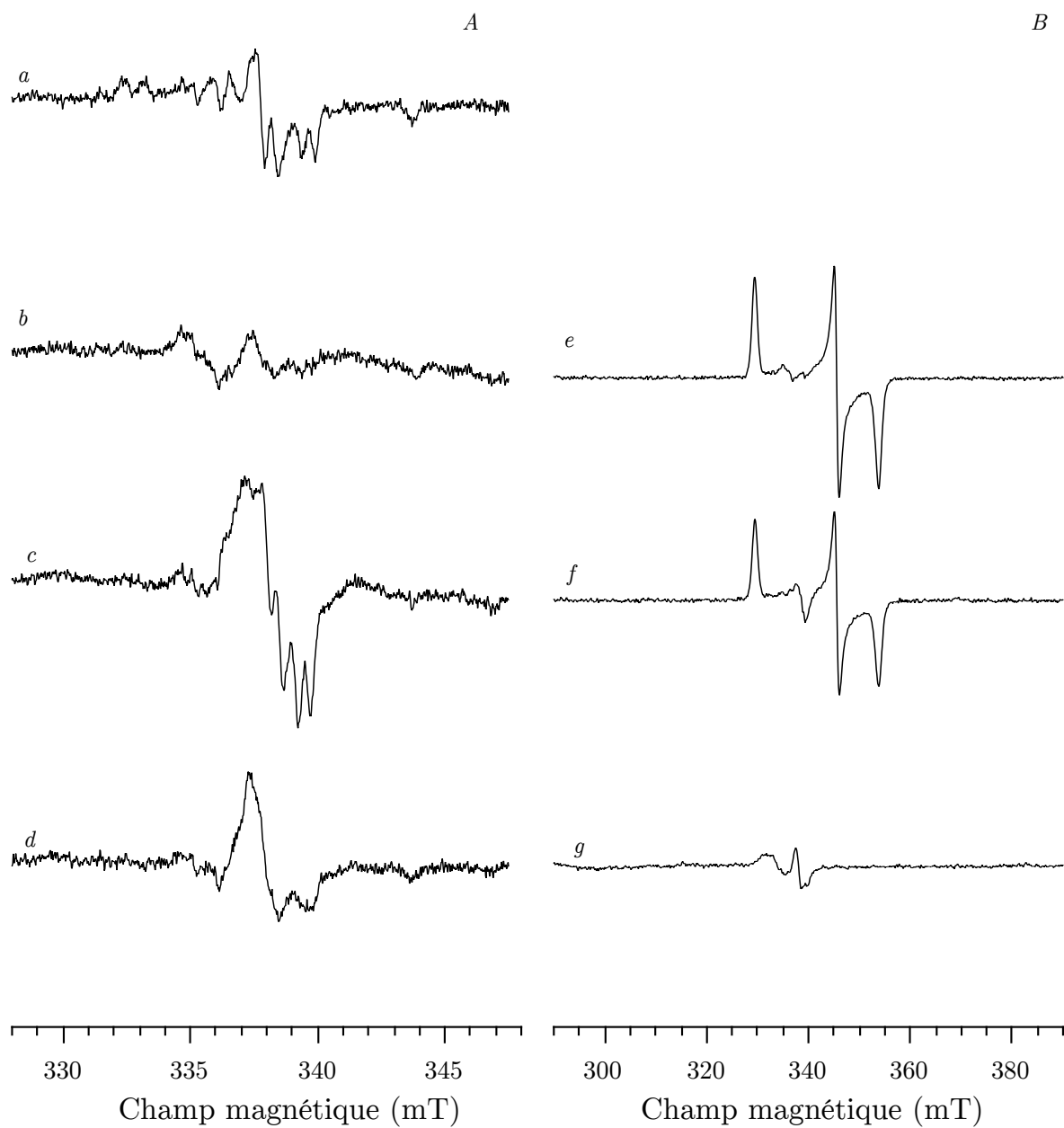


Figure 4.1 – Spectres RPE (*A* : Mo^{V} , *B* : centre fer–soufre) de NapAB « as prepared » (*a*), après une heure de réduction par $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ (5,4 mM) (*b*, *e*), après 2 min d’oxydation par KNO_3 (88 mM) (*c*, *f*) et après 30 min supplémentaires à température ambiante (*d*, *g*). Conditions : *a*, *b*, *c*, *d* : 55 K, 1 mW, 0,2 mT ; *e*, *f*, *g* : 15 K, 1 mW, 0,5 mT.

4.2.2 Formation de l'espèce Mo^{V} « high g nitrate » en absence de nitrate

Malgré son appellation, l'espèce « high g nitrate » est aussi détectable en l'absence de nitrate. La figure 4.2 montre comment cette forme a pu être observée. L'enzyme (NapA), présente « as prepared », à pH=8,0 le signal de la forme « high g resting » (*a*). Par réduction prolongée, ce signal disparaît. Après l'échange du tampon en conditions aérobies pour 100 mM MES, 50 mM NaCl, pH = 6,0, l'enzyme montre de faibles signaux, à 15 K comme à 80 K, attribuable à des traces d'espèces Mo^{V} et d'un centre $[\text{Fe}_3\text{S}_4]^{2+}$ oxydé, produit de dégradation d'un centre $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ (spectres *b*, *f*). Lors de la réduction en anaérobiose de cette protéine (14 mM $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ pendant 100 minutes sous argon), une signature Mo^{V} apparaît autour de $g \simeq 1,98$, et une raie large est visible vers $g = 2,01$, vraisemblablement due à une espèce radicalaire. Ce signal large apparaît à toutes les températures (15 K, 80 K et 160 K), dans les mêmes proportions (rapporté au signal Mo^{V}) et avec la même largeur. Il provient donc vraisemblablement d'une espèce radicalaire, qui est minoritaire par rapport à l'espèce Mo^{V} observée ($\simeq 10\%$).

Cet état de l'enzyme est stable dans le temps : l'incubation de celle-ci à température ambiante pendant deux heures supplémentaires (sous argon) ne modifie pas la forme du spectre RPE (spectre *d*, *h*). Seule une légère décroissance de l'intensité du signal est détectable.

Nous avons ainsi observé l'apparition d'une espèce Mo^{V} « high g nitrate » lors de la réduction à pH 6 d'un échantillon préréduit puis réoxydé par exposition à l'air.

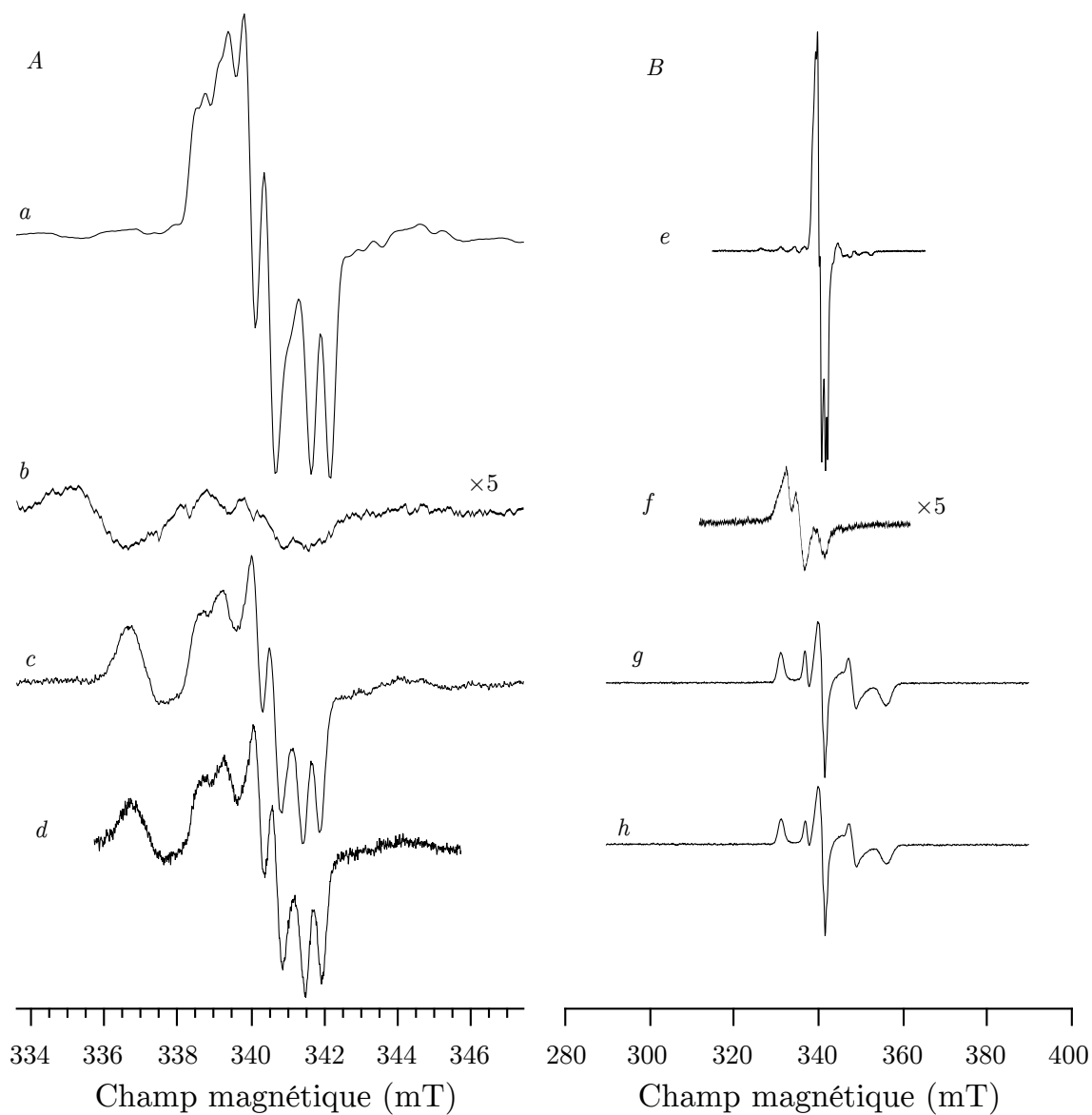


Figure 4.2 – Spectres RPE de NapA ($86\ \mu\text{M}$) « as prepared », $\text{pH}=8$ (*a,e*). Après activation par réduction puis réoxydation à l'air, $\text{pH}=6$ (*b,f*) et après réduction par $14\ \text{mM}$ de dithionite de sodium, (*c,g*) et après réincubation pendant deux heures à température ambiante (*d,h*). Température : *a, b* : $55\ \text{K}$ *c, d* : $80\ \text{K}$ *e, f, g, h* Puissance $1\ \text{mW}$ sauf *a*, $2\ \text{mW}$ Modulation *a, c* $0,2\ \text{mT}$ *c, d* $0,1\ \text{mT}$ *b, e, f, g, h* $0,5\ \text{mT}$

4.2.3 Caractérisation du signal Mo^V « high g nitrate »

Le spectre RPE à 80 K de NapAB et NapA traitées comme décrit ci-dessus montre un signal Mo^V rhombique. Ses valeurs de g sont $g_1 = 1,9977$, $g_2 = 1,9886$ et $g_3 = 1,9811$. Il présente un couplage hyperfin avec un spin $1/2$ nucléaire : $A_1/g_1\beta = 0,52$ mT, $A_2/g_2\beta = 0,48$ mT, $A_3/g_3\beta = 0,48$ mT. Son anisotropie vaut 0,0164, et sa rhombicité 0,56. Sur g_1 , la forme des raies suggère un éclatement hyperfin supplémentaire de $\simeq 0,2$ mT, inférieur à la largeur de raie, visible uniquement avec un rapport signal/bruit suffisant. La largeur de raie est similaire à celle de la forme « high g resting », ce qui suggère que l'environnement proche du Mo⁵⁺ ne comporte pas de noyaux magnétiques supplémentaires dans cet état. Ces caractéristiques en font un signal proche du signal « high g resting », et en accord avec la littérature, nous l'appelons « high g nitrate ».

Ce signal, observé d'abord en présence de nitrate chez *P. pantotrophus* et *D. desulfuricans* (Bennett *et al.*, 1994; Bursakov *et al.*, 1995), a été plus tard mis en évidence en l'absence de nitrate à bas potentiel, chez *D. desulfuricans* et *E. coli* (González *et al.*, 2006; Jepson *et al.*, 2007). La désignation « nitrate » a pourtant été conservée dans la littérature, bien qu'elle ne clarifie pas les choses.

Sur la figure 4.3, on donne pour comparaison, le signal « high g resting » dans l'état où le centre fer-soufre est oxydé (*a*) ou réduit (*b*), le signal « high g nitrate » – [Fe₄S₄]⁺ obtenu par réduction en l'absence de nitrate (*c*), et le signal obtenu par oxydation de NapAB au nitrate (*d*). Les spectres calculés sont superposés aux spectres expérimentaux. On constate de légères différences entre les spectres *c* et *d* : la raie dérivée est élargie sur le signal obtenu en présence de nitrate. La principale différence entre les signaux « high g nitrate » et « high g resting » réside dans leur rhombicité ($\frac{g_1-g_2}{g_1-g_3}$). Pour les distinguer rapidement, même avec un faible signal, on peut rechercher un épaulement qui est visible sur la raie dérivée de l'espèce « high g resting », mais pas sur l'espèce « high g nitrate » (flèches sur la figure 4.3). Le tableau 4.1 donne les paramètres utilisés dans les simulations. Pour des raisons exposées plus loin (figure 4.18, p. 151), nous attribuons cet épaulement à la présence des isotopes ⁹⁵Mo et ⁹⁷Mo.

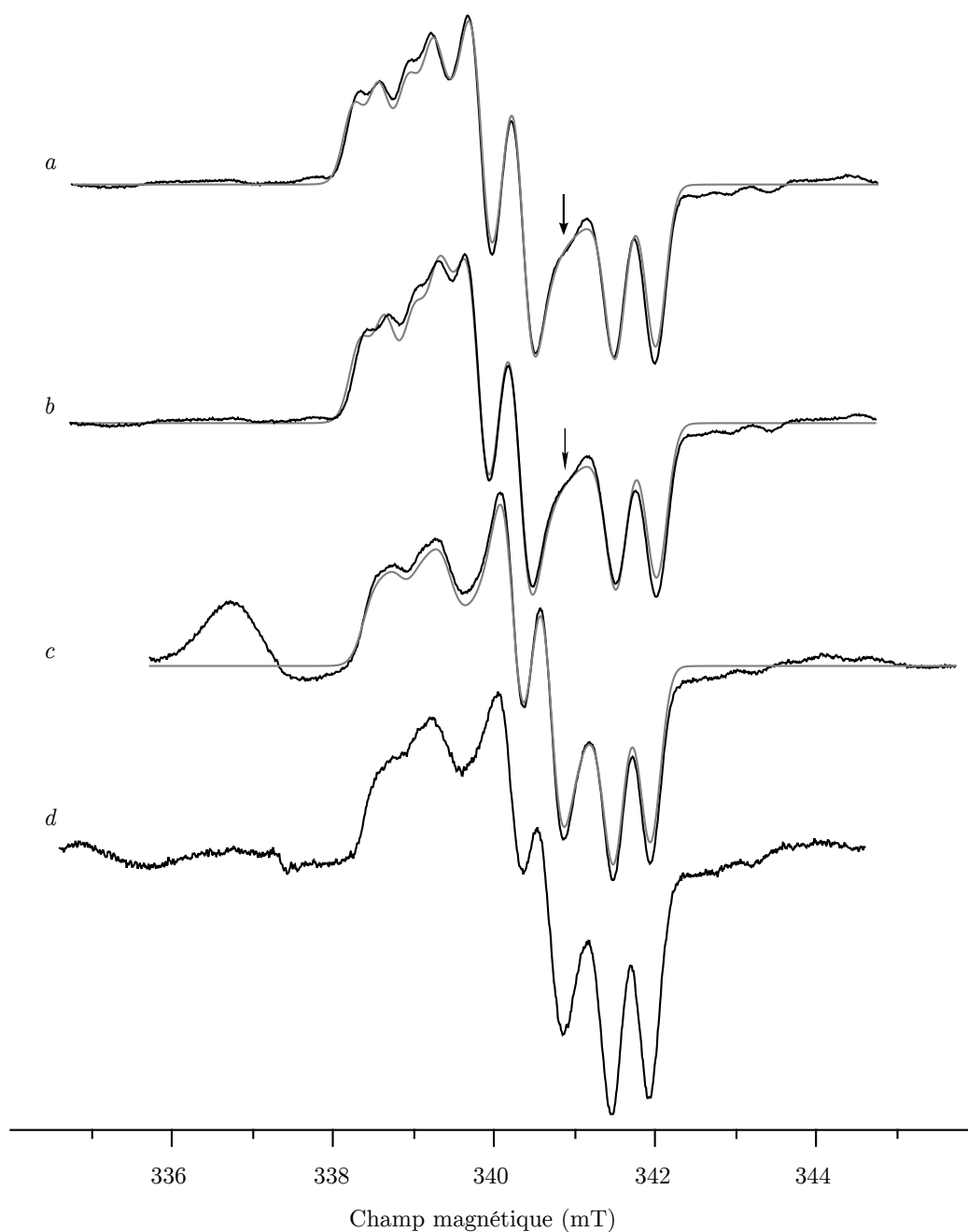


Figure 4.3 – Signaux « high g » dans Nap. *a* : état « high g resting » – $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{2+}$, *b* : état « high g resting » – $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^+$, *c* : état « high g nitrate » – $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^+$ obtenu par réduction en l'absence de nitrate, pH=6. *d* : état « high g nitrate » – $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^+$ obtenu par réoxydation partielle au nitrate, pH=8. Spectres expérimentaux : 80 K, 1 mW, 0,1 mT (*a*, *b*, *c*) ; 50 K, 0,4 mW, 0,2 mT (*d*). Les spectres simulés (trait fin) ont été calculés avec les paramètres du tableau 4.1. Les flèches pointent l'épaule sur les signaux « high g resting ».

Tableau 4.1 – Caractéristiques des signaux Mo^{V} de la figure 4.3, utilisées pour la simulation des spectres avec la suite Easyspin (Stoll et Schweiger, 2006)

Espèce Mo^{V} Centre fer–soufre	« high g resting »		« high g nitrate »
	$[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{2+}$	$[\text{Fe}_4\text{S}_4]^+$	$[\text{Fe}_4\text{S}_4]^+$
g_1	1,9988	1,9983	1,9977
g_2	1,9909	1,9911	1,9886
g_3	1,9812	1,9811	1,9813
$(g_1 + g_2 + g_3) / 3$	1,9903	1,9902	1,9892
$g_1 - g_3$	0,0176	0,0172	0,0164
$(g_1 - g_2) / (g_1 - g_3)$	0,449	0,419	0,555
$A_1(^1\text{H})(\text{MHz})$	18,8	17,4	15,9
$A_2(^1\text{H})(\text{MHz})$	14,3	14,3	13,2
$A_3(^1\text{H})(\text{MHz})$	14,0	13,7	12,7
$A'_1(^1\text{H})(\text{MHz})$	8,6	8,2	7,2
$g_1\text{-strain } (10^{-4})$	18	19	20
$g_2\text{-strain } (10^{-4})$	18	18	18
$g_3\text{-strain } (10^{-4})$	17	18	17

4.3 Étude des interactions magnétiques intercentres dans la sous-unité catalytique

4.3.1 Mise en évidence et étude d’une interaction magnétique sur les formes « high g resting » et « high g nitrate »

4.3.1.1 Influence de l’état d’oxydation du centre fer – soufre sur la forme du spectre RPE Mo^{V} « high g resting » à haute température

Obtention de l’état $\text{Mo}^{\text{V}} - [\text{Fe}_4\text{S}_4]^+$ dans le cas de l’espèce « high g resting »

L’observation d’interactions magnétiques requiert que les deux centres soient *simultanément* paramagnétiques. Dans le cas l’espèce « high g resting », nous avons utilisé des enseignements du chapitre 3. Il est possible de congeler la protéine « as prepared » dans un état où le cofacteur à molybdène et le centre fer–soufre sont simultanément paramagnétiques. Comme l’espèce Mo^{V} « high g resting » disparaît lentement lors de la réduction anaérobie de l’enzyme, nous avons simplement ajouté un excès de dithionite de sodium (11,7 mM) à NapA (81 μM), pour réduire le centre fer–soufre, avant de congeler l’échantillon par immersion dans de l’éthanol refroidi à $\simeq -60^\circ\text{C}$. Le temps d’incubation à température ambiante était d’environ 30 s. Nous avons ainsi obtenu un état où le centre fer–soufre est complètement réduit, tout en gardant une proportion appréciable de l’espèce Mo^{V} « high g resting ».

Cas de l'espèce « high g nitrate »

Jusqu'à présent, nous n'avons observé signal « high g nitrate » qu'en présence du centre fer-soufre réduit. Il n'est donc pas possible de faire la comparaison avec l'état hypothétique $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{2+} - \text{Mo}^{\text{V}}$ « high g nitrate ».

Le spectre RPE de l'état « high g resting » – $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{2+}$ ne dépend pas de la température. Lorsque le centre Fe_4S_4 est oxydé, son spin total vaut zéro. La forme du spectre de l'espèce Mo^{V} « high g resting » ne dépend alors pas de la température. Sur la figure 4.4 est tracé le signal à 80 K et 15 K. Les largeurs, les positions et les intensités relatives des raies sont identiques sur cette plage de température. Ceci nous sert de contrôle pour les résultats présentés ci-dessous. À

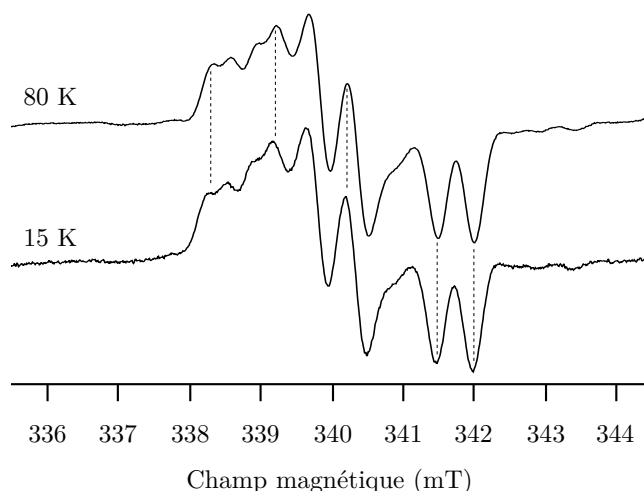


Figure 4.4 – Signal Mo^{V} « high g resting » à 80 K et 15 K, Fréquence : 9,476 GHz, modulation : 0,1 mT, 100 kHz, puissance : haut, 1,0 mW, bas, 1,0 μW

haute température (80 K), la réduction du centre fer-soufre a un effet ténu mais tout-à-fait détectable sur le signal Mo^{V} « high g resting ». La figure 4.3 montre le signal Mo^{V} « high g resting » dans l'état $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{2+}$ (a) et après réduction du centre fer-soufre (b). Les modifications que l'on peut noter sont le décalage de la raie positive vers les hauts champs et la diminution du principal éclatement hyperfin de cette raie, qui passe de 18,8 à 17,4 MHz. Ces petits décalages reflètent vraisemblablement une faible modification des longueurs et angles de liaisons lors de la réduction du cluster fer-soufre, qui se répercute sur le centre à molybdène.

4.3.1.2 Spectres RPE des espèces Mo^{V} « high g resting » et « high g nitrate » en interaction avec le centre $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^+$

Lorsque le centre fer-soufre est réduit, à basse température (15 K), les signaux du Mo^{V} « high g resting » et « high g nitrate » prennent une forme différente. Les spectres sont donnés sur la figure 4.5

Espèce « high g nitrate »

Aux extrémités du spectre deux raies apparaissent. Sur la raie g_3 , on observe un triplet bien résolu, d'intensités relatives 1 – 2 – 1. Sur la partie g_2 , on peut

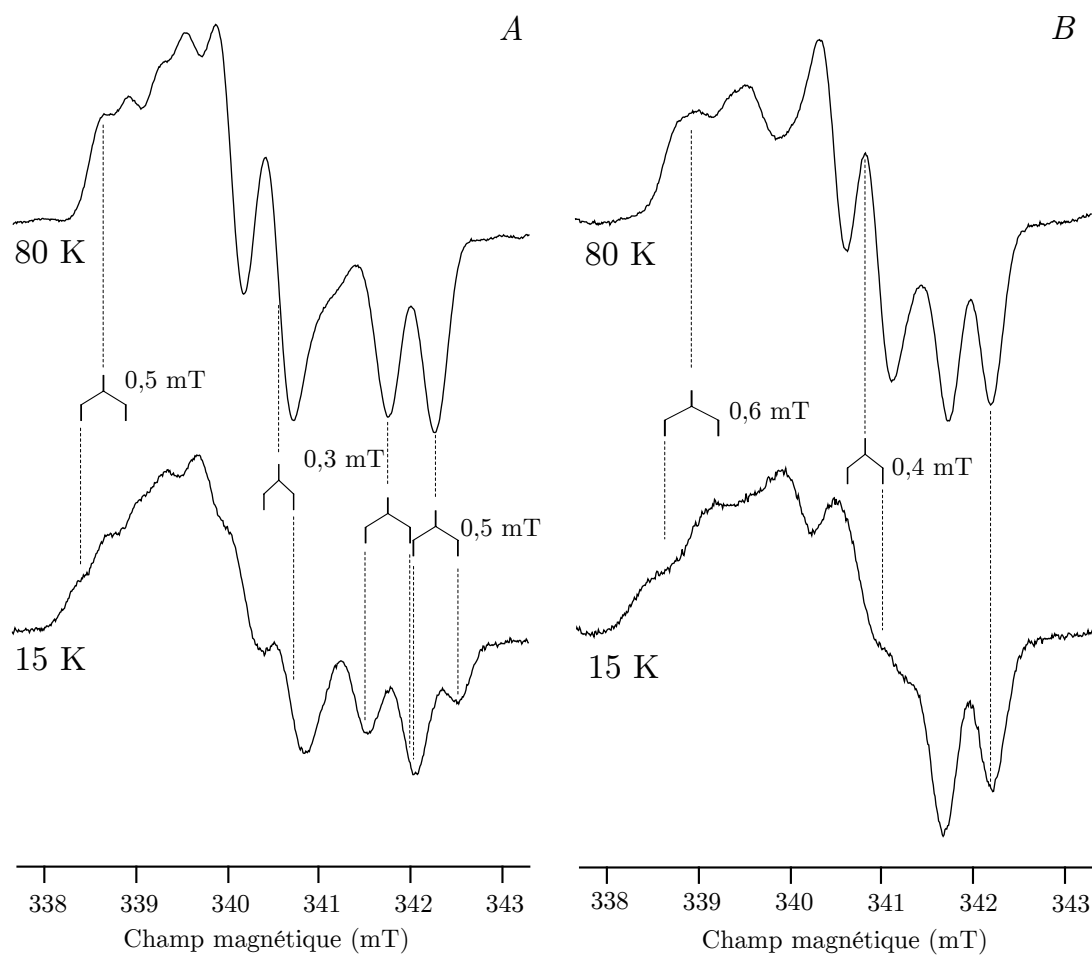


Figure 4.5 – Effets de l'interaction magnétique intramoléculaire $\text{Mo}^{\text{V}}\text{-}[\text{Fe}_4\text{S}_4]^+$ dans l'état « high g resting » (a,b) et « high g nitrate » (c,d) *A* : 20 mM HEPES, 50 mM NaCl, pH = 8,0 L'intégration des signaux donne 43 μM pour l'espèce $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^+$, et 37 μM pour le Mo^{V} . (47 μM dans l'état « as prepared »). *B* : 100 mM MES, 50 mM NaCl, pH = 6,0. $[\text{Mo}^{\text{V}}] = 6 \mu\text{M}$.

distinguer trois raies dérivées. Sur g_1 , on observe seulement quatre épaulements. Ce changement de forme spectrale suggère l'existence d'un couplage magnétique supplémentaire avec un spin $1/2$. L'amplitude de ce couplage est proche de celle des couplages hyperfins, et vaut ici environ 0,5 mT, ce qui explique le passage d'un doublet à un triplet sur la direction g_3 . Sur les directions g_1 et g_2 le dédoublement des raies s'ajoute aux éclatements hyperfins et les raies des deux directions se recouvrent partiellement, ce qui donne un massif peu résolu (huit raies positives, quatre raies dérivées). Les trois raies principales g_1 , g_2 , g_3 sont éclatées respectivement d'environ 0,5, 0,3 et 0,5 mT.

Espèce « high g nitrate »

Dans le cas de l'espèce « high g nitrate », un changement de forme intervient également. De façon surprenante, la raie en g_3 ne subit pas d'éclatement, alors que le changement de forme du reste du spectre montre clairement l'existence d'un couplage magnétique supplémentaire. On note l'apparition d'une raie sur la gauche du spectre, mais pas sur la droite. On mesure sur le spectre des éclatements d'environ 0,6 et 0,4 mT sur g_1 et g_2 .

L'examen des spectres à basse température des espèces « high g resting » et « high g nitrate » en interaction avec le centre fer – soufre réduit (figure 4.6) révèle donc des différences notables dans l'interaction spin-spin intramoléculaire.

4.3.1.3 Effets de la température sur les spectres en interaction des espèces « high g resting » et « high g nitrate »

Le couplage magnétique est observé ici à basse température (10 ou 15 K). Si celle – ci est plus basse, la forme du spectre ne change pas. Lorsque celle-ci est assez élevée (80 K), le spectre prend globalement la même forme qu'en présence du centre fer-soufre oxydé, malgré les petites variations mentionnées plus haut. Au-dessus de 80 K, la forme du spectre ne change plus.

Entre ces deux situations, la forme du spectre dépend de la température d'observation. La figure 4.6 montre l'effet de la température pour les deux espèces Mo^{V} « high g resting » (en présence du $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^+$) et Mo^{V} « high g nitrate ». On peut y distinguer trois domaines de température : jusqu'à 25 K, les raies sont dédoublées, entre 25 K et 40 K, il y a coalescence puis rétrécissement des raies à mesure que la température augmente, au-dessus de 50 K, il n'y a pas d'interaction visible sur la forme du spectre.

Ce phénomène résulte de la rapidité de la relaxation spin – réseau du centre $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^+$, et du fait que cette relaxation est bien plus accélérée que celle du Mo^{5+} lorsque la température augmente. Dans le centre $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^+$ réduit, l'état de spin $S = 1/2$ du niveau fondamental résulte d'un couplage d'échange antiferromagnétique entre les trois ions Fe^{2+} ($S = 2$) et l'ion Fe^{3+} ($S = 5/2$) constituant le centre. Il en résulte un ensemble de niveaux de spin total possible allant de $S = 1/2$ à $S = 17/2$, qui constituent des niveaux excités proches du niveau fondamental $S = 1/2$, responsable du spectre RPE observé. Le premier de ces niveaux excités est généralement un niveau de spin $S = 3/2$ qui permet l'établissement d'un mécanisme de relaxation électronique spin – réseau par effet ORBACH très efficace (Guigliarelli et Bertrand, 1999). Ce mécanisme fait intervenir le couplage entre un phonon de pulsation ω_p

et une transition $|\Delta M_S| = 1$ du niveau fondamental vers le niveau excité, séparés par une énergie Δ égale à $\hbar\omega_p$. Plus l'écart énergétique Δ est petit, plus vite la relaxation spin-réseau ($1/T_1$) s'accélère avec la température :

$$\frac{1}{T_1} \propto \exp\left(-\frac{\Delta}{k_B T}\right) \quad (4.1)$$

La conséquence est que, pour le centre fer-soufre réduit $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^+$, la vitesse de relaxation augmente très vite avec la température ce qui conduit à l'élargissement du signal $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^+$ et à sa disparition par élargissement au dessus d'une certaine température. Dans Nap, le signal $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^+$ s'élargit au-dessus de $T = 25$ K et disparaît pour $T > 60$ K (voir la figure 4.20, p. 155). À l'inverse, pour le Mo^{V} , les niveaux excités sont très séparés du niveau fondamental de spin $S = 1/2$ et la relaxation est beaucoup plus lente, ce qui permet au signal Mo^{V} d'être observé sans élargissement jusqu'à la température ambiante (*cf* chapitre 3).

Dans le cas de l'interaction $\text{Mo}^{\text{V}}-[\text{Fe}_4\text{S}_4]^+$, lorsque la température augmente, la relaxation spin-réseau du Fe_4S_4 s'accélère, ce qui conduit à un *effet de moyenne* sur l'état de spin $M_S = \pm 1/2$ du $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^+$, entraînant la disparition de la décomposition spectrale des raies du Mo^{V} (effet comparable à l'échange rapide en RMN).

4.3.2 Étude en bande Q de l'espèce « high g resting » en interaction et hors interaction

Le couplage magnétique supplémentaire qui se manifeste à basse température provoque le recouvrement des raies positives et dérivées (g_1 et g_2) des signaux Mo^{V} en bande X.

Pour confirmer la nature des éclatements supplémentaires mis en évidence à basse température, et afin de séparer les contributions des deux raies en question, nous avons voulu observer les signaux Mo^{V} en interaction à plus haute fréquence (bande Q).

Préparation des échantillons

Les échantillons observés en bande Q ont été préparés comme ceux utilisés en bande X. La sous unité NapA « as prepared » a été concentrée, puis additionnée de 6 mM de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ (200 équivalents) pour réduire le centre fer-soufre. La concentration finale en enzyme vaut 370 μM dans l'état « high g resting » « fer-soufre oxydé », et 296 μM dans l'état « high g resting » « fer-soufre réduit ».

4.3.2.1 Étude des signaux hors interaction à 80 K

Les spectres en bande Q (34,1 GHz) de l'espèce Mo^{V} « high g resting » hors interaction sont montrés sur la figure 4.7.

À 34,1 GHz, les raies correspondant aux valeurs principales de la matrice \tilde{g} sont nettement séparées. En comparant les signaux des états $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{2+}$ et $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^+$, on peut retrouver le décalage de la raie en g_1 vers les hauts champs. Par pointage des raies, l'écart en g_1 est estimé à $(+6 \pm 1) \cdot 10^{-4}$, alors que la comparaison des spectres en bande X donnait $+5 \cdot 10^{-4}$ (*cf* tableau 4.1, p. 124).

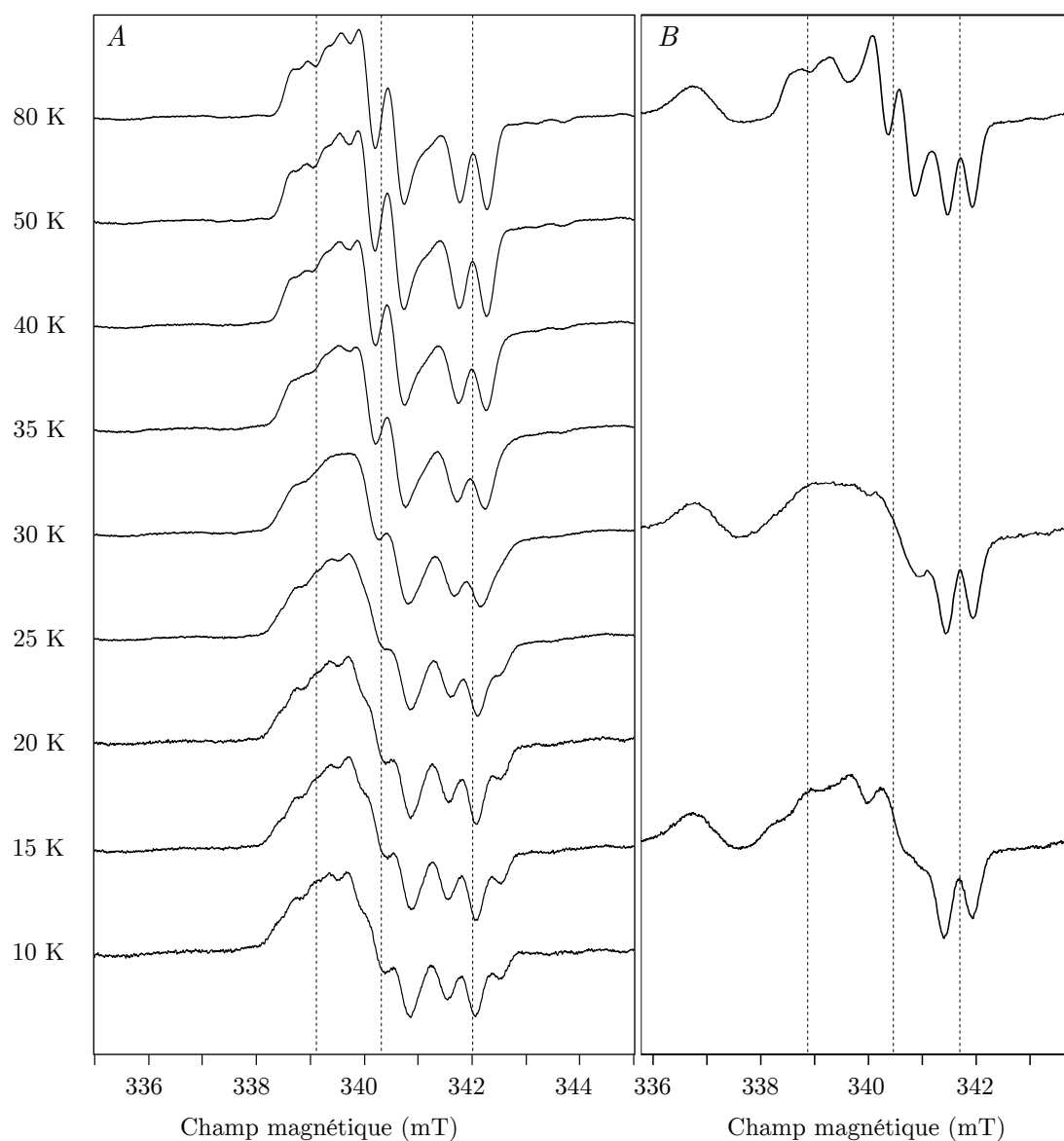


Figure 4.6 – Changement de la forme du spectre d’interaction $\text{Mo}^{\text{V}}\text{-}[\text{Fe}_4\text{S}_4]^+$ avec la température pour l’espèce « high g resting » (*A*) et l’espèce « high g nitrate » (*B*). Les guides pointillés repèrent la position des raies principales à haute température. Acquisition : *A* : 9,477 GHz, modulation à 0,1 mT, 100 kHz, puissances (de haut en bas) : 1,0 mW, 0,25 mW, 0,20 mW, 0,10 mW, 81 μW , 25 μW , 4,0 μW , 3,2 μW , 0,51 μW *B* : 9,478 GHz, modulation à 0,1 mT à 100 kHz, sauf milieu : 0,2 mT à 10 kHz puissances (de haut en bas) : 1,0 mW, 51 μW 10 μW .

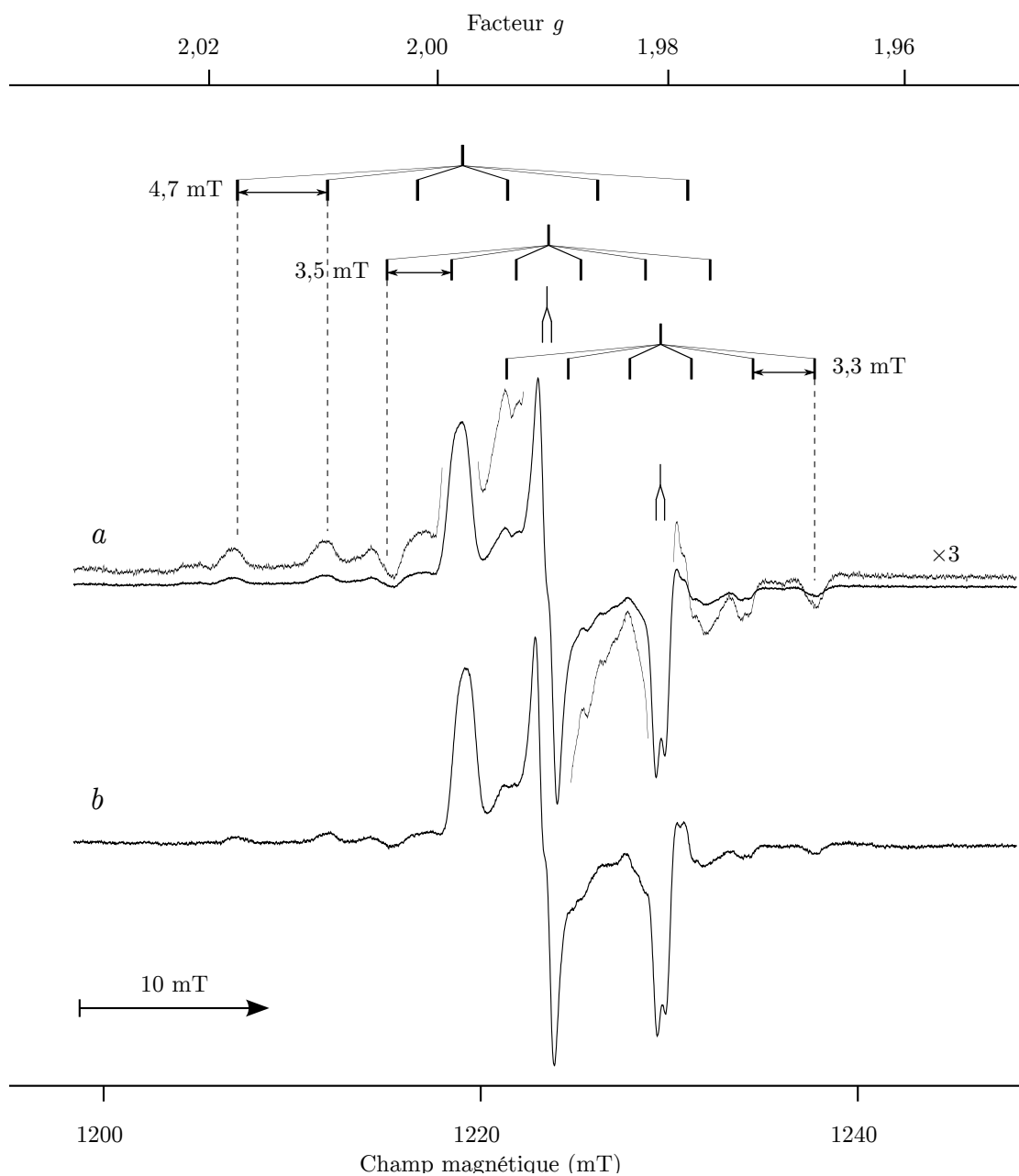


Figure 4.7 – Spectre en bande Q à 80 K de l'espèce « high *g* resting » en présence du centre fer-soufre oxydé (*a*) ou réduit (*b*). Acquisition : Modulation à 100 kHz, 0,2 mT ; *a* : 34,0897 GHz, 100 μ W, 12 scans ; *b* : 34,0865 GHz, 33 μ W, 20 scans.

Éclatements dus au couplage hyperfin avec les noyaux ^1H

Les couplages hyperfins avec les noyaux ^1H sont moins bien résolus qu'en bande X : la raie en g_1 forme un massif, alors qu'elle donne un doublet de doublets en bande X, et on note un épaulement en g_2 , alors qu'un doublet est clairement résolu sur le spectre en bande X. Le doublet en g_3 est conservé.

Sur g_2 et g_3 , on retrouve globalement les mêmes valeurs de couplage électron – proton que sur le spectre à 9,5 GHz : les éclatements relevés sur le spectre a sont respectivement $(0,57 \pm 0,02)$ mT et $(0,46 \pm 0,02)$ mT, alors qu'ils sont de $(0,53 \pm 0,02)$ mT et $(0,51 \pm 0,02)$ mT en bande X (figure 4.3, p. 123).

Éclatements dus au couplage hyperfin avec les noyaux ^{95}Mo et ^{97}Mo

Sur le spectre en bande Q, la séparation entre les valeurs principales de \tilde{g} permet de repérer plus facilement les raies supplémentaires dues au couplage avec les isotopes paramagnétiques du molybdène, ^{95}Mo et ^{97}Mo , dont le spin nucléaire vaut $5/2$, et dont l'abondance naturelle est d'environ 25 %. Contrairement aux spectres en bande X, l'anisotropie en g est ici comparable à l'éclatement maximal produit par ces noyaux. On peut donc tenter une estimation des constantes des couplage apparentes.

Sur la figure 4.7, le spectre a a été grossi trois fois. Les deux raies positives à bas champ correspondent à $m_I = +5/2$ et $m_I = +3/2$. Leur écartement donne donc la constante apparente $A_1/g_1\beta$. De même, à haut champ, les deux raies négatives correspondent à $m_I = -3/2$ et $m_I = -5/2$. J'ai estimé la constante $A_2/g_2\beta$ par l'écartement entre la dérivée principale et la première raie dérivée qui apparaît à bas champ. On a fait ici l'hypothèse que les raies hyperfines sont équidistantes, ce qui est le cas si $A_i/g\beta \ll h\nu$ et si les axes principaux des matrices \tilde{g} et \tilde{A}_{Mo} sont colinéaires. On obtient ainsi :

$$\begin{aligned} A_1/g_1\beta & (4,7 \pm 0,1) \text{ mT} \\ A_2/g_2\beta & (3,5 \pm 0,1) \text{ mT} \\ A_3/g_3\beta & (3,3 \pm 0,1) \text{ mT} \end{aligned}$$

Sur la figure 4.8, ces mêmes éclatements sont reportés à partir des valeurs principales de g . Les raies hyperfines (grossies 20 fois) n'apparaissent pas aux positions attendues, ce qui suggère que les hypothèses faites ci-dessus pour la bande Q ne sont pas valables en bande X.

Les couplages hyperfins avec le noyau du molybdène permettent de quantifier l'interaction électron – noyau, et par là même de caractériser la liaison aux ligands du Mo^{5+} (Sproules *et al.*, 2011). Ces données expérimentales doivent aussi permettre de valider les calculs de chimie théorique menés dans l'équipe par Frédéric BIASO sur des modèles de centre à molybdène. Nous pouvons tenter de comparer ces valeurs avec des données de la littérature : le tableau 4.2, ci-dessous, permet de comparer le signal « high g resting » de NapA à d'autres types de signaux issus d'enzymes à molybdène. L'entrée la plus proche du signal « high g resting » est le signal « very high g » de la polysulfure réductase de *W. succinogenes*. Ce signal, en effet, bien que dénommé « very high g », peut être corrélé aux signaux « high g » des nitrate réductase périplasmiques (*cf* Introduction générale, figure 14).

Les couplages déterminés ici pour la nitrate réductase périplasmique donnent une matrice \tilde{A} de symétrie approximativement axiale, ce qui la rapproche par

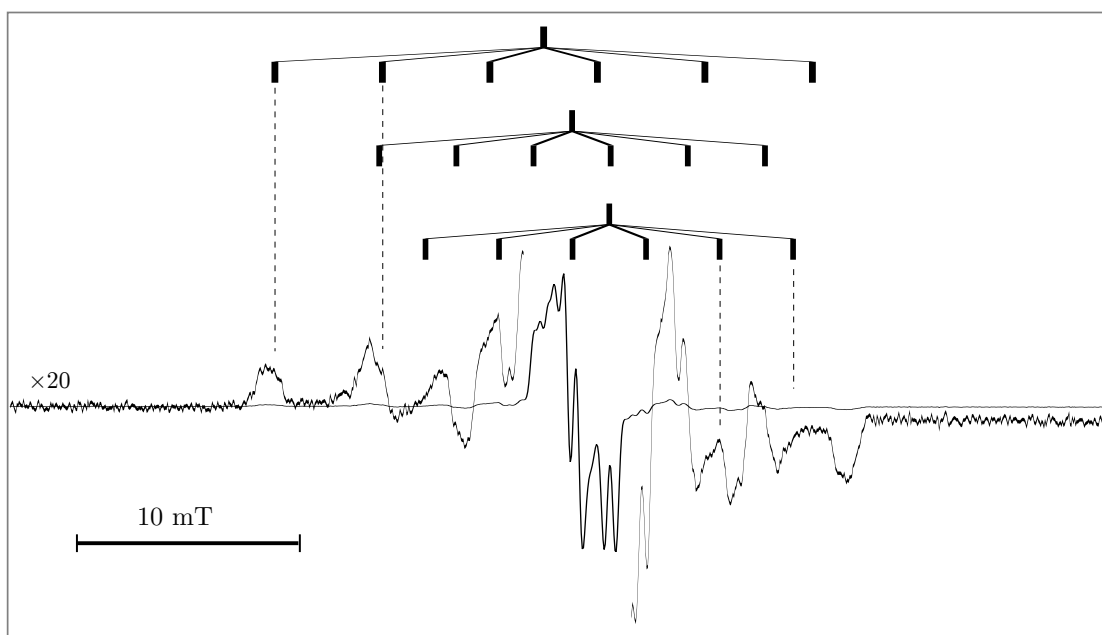


Figure 4.8 – Raies satellites due aux isotopes $^{95,97}\text{Mo}$ sur le signal « high g resting » en bande X. Les peignes correspondent aux éclatements trouvés sur le spectre en bande Q (figure 4.7) 80 K, 0,2 mT.

Tableau 4.2 – Sélection de couplages hyperfins avec les isotopes $^{95,97}\text{Mo}$ dans les enzymes à molybdène DorA : DMSO réductase périplasmique ; Psr : polysulfure réductase ; XO : xanthine oxydase ; Fdh : formiate déshydrogénase ; YedY appartient à la classe de la sulfite oxydase.

Signal	Couplage $^{95,97}\text{Mo}$ (MHz)			
	A_1	A_2	A_3	
<i>R. s.</i> NapA « high g »	132	98	93	ce travail
<i>R. s.</i> DorA « high g » split	40	112	156	(Mtei <i>et al.</i> , 2011)
<i>W. s.</i> Psr « very high g » S_n^-	141	56	56	(Prisner <i>et al.</i> , 2003)
<i>B. t.</i> XO « very rapid »	133	55	82	(George et Bray, 1988)
<i>E. c.</i> Fdh « very high g »	118	71	71	(Khangulov <i>et al.</i> , 1998)
<i>E. c.</i> YedY « as prepared »	163	70	67	(Yang <i>et al.</i> , 2009)

exemple de ce qui est trouvé dans la formiate déshydrogénase de *E. coli* ou la polysulfure réductase de *W. succinogenes*, ou encore YedY.

Élargissement par g -strain en général (et dans les Mo-enzymes en particulier)

La perte de résolution en bande Q sur les couplages avec les ^1H , par rapport aux spectres en bande X, s'explique par une plus grande largeur de raie : la largeur à mi-hauteur en g_3 vaut $\simeq 0,45$ mT contre $\simeq 0,27$ mT en bande X. Une largeur de raie qui dépend de la fréquence est le signe d'une distribution de structures, qui donne une distribution statistique des valeurs principales de la matrice \tilde{g} , appelée g -strain (dispersion en g). C'est une cause courante d'élargissement des raies avec

la fréquence dans les complexes métalliques. (Hagen, 1981; Hagen, 1992). Le modèle de HAGEN en rend compte formellement en écrivant la matrice \tilde{g} :

$$\tilde{g} = \tilde{g}_0 + \tilde{p} \quad (4.2)$$

Dans cette expression, \tilde{g}_0 est une matrice à valeurs fixes, tandis que les valeurs propres de la matrice \tilde{p} sont des variables aléatoires caractérisées par leur écart-type. La largeur d'un paquet de spin dépend du temps de relaxation spin-spin. L'élargissement des raies peut être dû aux nombreuses interactions magnétiques (hyperfines, dipolaires) non résolues, qui sont indépendantes de la fréquence. La distribution δg des valeurs de g cause un élargissement δB qui varie linéairement avec la fréquence micro-ondes :

$$\delta B = \frac{h\nu}{\beta g^2} \delta g$$

Le g -strain est une mesure de la distribution de structures du centre paramagnétique en question. Plus le centre est plastique dans sa structure, plus il est soumis au g -strain.

Les travaux de l'équipe de Biophysique des Métalloprotéines ont permis d'enregistrer des signaux Mo^{V} dans la désulfo-xanthine oxydase et l'aldéhyde oxydase à plusieurs fréquences (bandes S, X, et Q) (Bertrand *et al.*, 1994; More *et al.*, 2005). Les largeurs de raies (de forme gaussienne) ont été modélisées à chaque fois par un g -strain, quantifié par l'écart-type σ_i en g_i . Ce sont les seules occurrences de ce genre de données dans la littérature, à ma connaissance. Nous remontons à la largeur à mi-hauteur via la relation :

$$\delta B = \frac{h\nu}{\beta g^2} 2\sqrt{2 \ln 2} \sigma$$

Les données d'alors, ainsi que celles concernant le signal « high g resting » de NapA sont résumées dans le tableau suivant, pour la raie négative (g_3) seulement :

Enzyme	Xanthine oxydase		Aldéhyde oxydase		NapA
Largeur	σ_3	δB_3 (mT)	σ_3	δB_3 (mT)	δB_3 (mT)
bande S	$38 \cdot 10^{-4}$	0,66	nd	nd	nd
bande X	$8 \cdot 10^{-4}$	0,32	$15 \cdot 10^{-4}$	0,62	0,33
bande Q	$4,8 \cdot 10^{-4}$	0,73	$5,5 \cdot 10^{-4}$	0,83	0,48

Nous pouvons calculer l'élargissement dû à la fréquence entre la bande X et la bande Q :

$$\frac{\delta B_Q - \delta B_X}{\nu_Q - \nu_X}$$

Nous trouvons ainsi :

$$\begin{aligned} \text{pour l' aldéhyde oxydoréductase : } & 8.6\mu\text{T}/\text{GHz} \\ \text{pour la désulfo-xanthine oxydase : } & 1.6\mu\text{T}/\text{GHz} \\ \text{pour la nitrate réductase NapA : } & 6.1\mu\text{T}/\text{GHz} \end{aligned}$$

La valeur que nous trouvons pour NapA ne la démarque pas significativement de ces deux autres systèmes. La flexibilité du centre à Mo n'y semble donc pas plus importante.

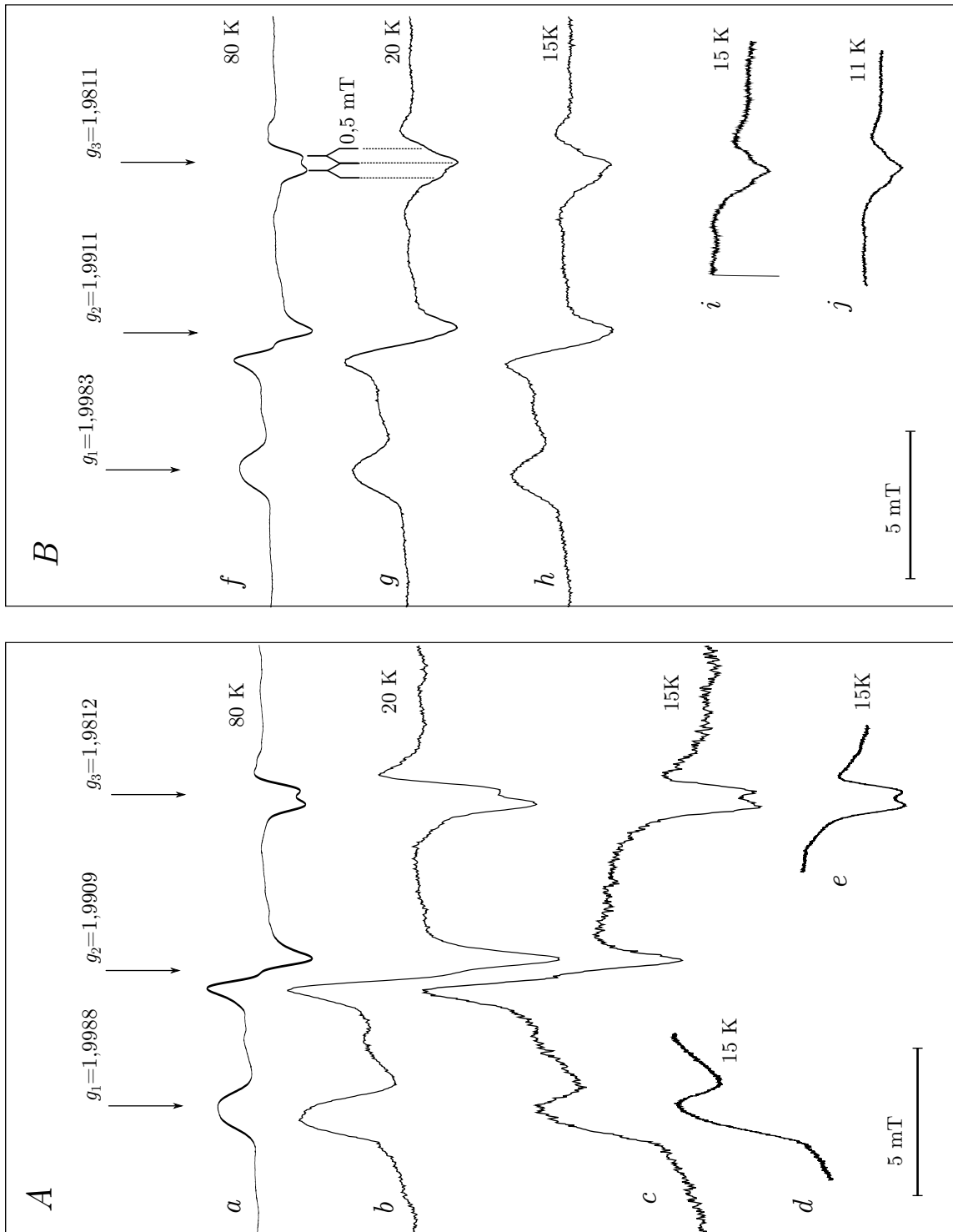


Figure 4.9 – Spectres en bande Q de l'espèce « high g resting » avec centre fer-soufre oxydé (panneau A) ou réduit (panneau B). Fréquences normalisées à 34,100 GHz. Amplitude de modulation 0,2 mT sauf *i* : 0,1 mT. Fréquence de modulation : 5 kHz sauf *a*, *f* : 100 kHz. Puissances : 100 μW (*a*), 33 μW (*b*), 1 μW (*c*), 0,2 μW (*d*), 1 μW (*e*). Les températures sont indiquées sur chaque spectre.

4.3.2.2 Étude du signal en interaction en bande Q à basse température

À basse température, on s’attend à un changement de forme du signal Mo^{V} du fait de l’interaction avec le centre $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^+$.

Les spectres à basse température de l’espèce « high g resting » – $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{2+}$ et de l’espèce « high g resting » – $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^+$ sont donnés sur la figure 4.9 L’étude est rendue délicate par la relaxation du Mo^{V} , qui encore plus lente qu’en bande X (Caldeira *et al.*, 2000). Le spectre est déformé par effet de « passage rapide », qui tend ici à *intégrer* le spectre dérivé. L’utilisation d’une fréquence de modulation inférieure à 100 kHz est nécessaire mais n’élimine pas toutes les déformations. Nous avons dû diminuer aussi la puissance micro-onde. Nous atteignons la limite du spectromètre en termes d’atténuation (59 dB). Malgré la plus grande largeur de raie, nous pouvons distinguer des modifications cohérentes avec celles observées en bande X. Sur g_3 , le doublet donne un triplet peu résolu. On peut cela dit mesurer un éclatement d’environ 0,5 mT entre deux raies contiguës, ce qui est similaire à ce que l’on mesure en bande X (*cf* figure 4.5, p. 126). La raie en g_2 perd sa structure et celle en g_1 s’élargit. Les études à plus basse température (15 K, 11 K) n’ont pas permis de préciser une structure dans les massifs.

4.3.2.3 Bilan de l’étude en bande Q

L’observation en bande Q du signal « high g resting » en interaction avec le $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^+$ a confirmé la nature du couplage. Les raies en g_1 et g_2 sont effectivement séparées sur les spectres en bande Q. Mais la perte de résolution due au g -strain nous a empêché d’avoir une meilleure précision sur l’amplitude des éclatements dus au couplage avec le centre $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^+$. En raison de la plus faible sensibilité du spectromètre à 34 GHz, nous avons restreint cette étude à l’espèce « high g resting ». Il faudra générer l’espèce « high g nitrate » avec un échantillon très concentré pour envisager de l’étudier en bande Q.

Malgré cela, nous avons pu identifier relativement aisément les raies supplémentaires dues aux noyaux ^{95}Mo et ^{97}Mo , ce qui semblait délicat avec le seul spectre en bande X, estimer le couplage hyperfin avec ces noyaux, et estimer le g -strain. Les valeurs obtenues pour ces deux grandeurs sont du même ordre de grandeur que celles rapportées dans la littérature sur d’autres enzymes à molybdène.

4.4 Caractérisation quantitative du couplage inter-centre par simulation numérique

Les spectres hors interaction sont faits de doublets voire de quadruplets qui se recouvrent partiellement. Le couplage avec un spin $1/2$ supplémentaire, d’amplitude proche, donne un spectre composé d’au moins huit raies en g_1 et quatre en g_2 et g_3 . La superposition de ces nombreuses raies rend leur position et leur amplitude délicates à mesurer par simple pointage sur le spectre.

Au sein de l’équipe de Biophysique des Métalloprotéines, Claude MORE a développé une série de programmes visant à calculer les spectres RPE d’espèces en interaction, en prenant en compte l’anisotropie des matrices \tilde{g} , les paramètres géométriques et en modélisant les effets de strain en g et en J . Écrits en FORTRAN,

ces programmes reposent sur un calcul des niveaux d'énergie par diagonalisation de l'hamiltonien. Leur puissance tient dans le traitement de la largeur de raie qui y est fait : les facteurs g , les couplages d'échange et les éléments géométriques sont traités comme des variables aléatoires à loi normale corrélée. Ces programmes ont été utilisés avec succès pour reproduire les spectres expérimentaux de centres fer-soufre couplés dans le photosystème I de *Synechocystis 6803* (Guigliarelli *et al.*, 1993), du centre nickel-fer dans une hydrogénase à Ni-Fe (Guigliarelli *et al.*, 1995) et du signal Mo^{V} « Unsplit slow type » dans l'AOR de *D. gigas* (More *et al.*, 2005).

Dans le cas des signaux « high g » de la nitrate réductase périplasmique, des couplages hyperfins résolus sont présents. Les couplages hyperfins et les couplages électron-électron étant du même ordre de grandeur, il n'est pas possible de traiter l'un comme une perturbation de l'autre, et les programmes écrits ne prennent pas en compte l'interaction hyperfine.

Nous utilisons donc ici la suite *Easyspin*, qui est un ensemble de fonctions Matlab (Stoll et Schweiger, 2006). Le programme repose sur la diagonalisation de l'hamiltonien du système de spins. Cet hamiltonien est de dimension arbitraire, ce qui permet d'inclure autant de couplages hyperfins que désiré. Un handicap de ce programme « clef en main » est le traitement de la largeur de raie qui y est fait : celle-ci repose sur des convolutions par une ou plusieurs formes gaussiennes de largeur prédéfinie. Il n'est pas possible de corrélérer deux variables d'entrée (par exemple, la distance intercentre r et le terme d'échange J) entre elles. Le spectre d'interaction magnétique entre deux centres paramagnétiques dépend de la géométrie relative des deux centres. Cinq angles et une distance sont nécessaires pour repérer ceux-ci et calculer l'interaction dipolaire. Nous les définissons ci-après.

D'après la structure cristallographique de NapAB, la distance entre le Mo et le barycentre des quatre atomes de fer de l'agrégat est de 13,5 Å. À cette distance, l'interaction dipolaire entre les deux spins est de l'ordre de $7 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$, ce qui donnerait un éclatement de 0,75 mT à $g \simeq 2$.

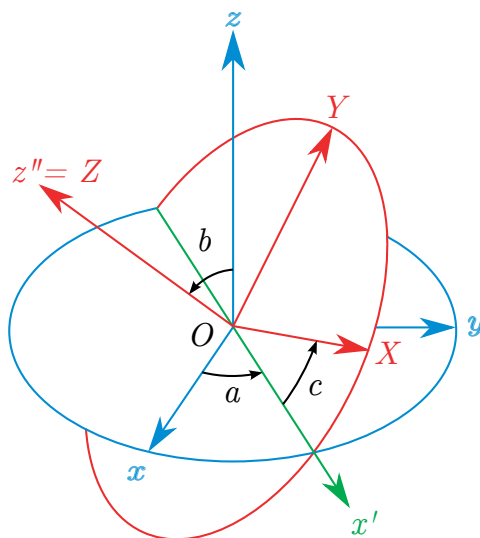


Figure 4.10 – Définition des angles d'EULER

S'y ajoute l'interaction d'échange que nous supposons isotrope, et décrite par un scalaire : J .

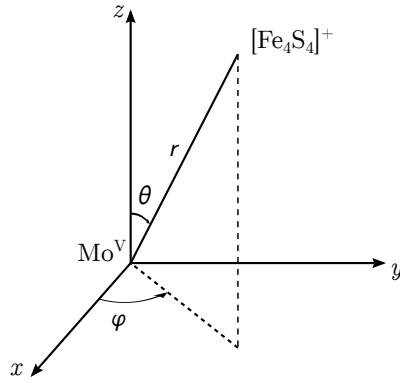


Figure 4.11 – Coordonnées sphériques du centre fer-soufre dans le repère du Mo

Le calcul numérique du spectre est nécessaire pour obtenir tous les paramètres de l'interaction.

Nous utilisons un système de deux spins $1/2$ ponctuels A et B , de matrice g respectives g^A et g^B . Ils sont séparés par une distance r . Le repère 1 est le repère propre à g^A . Le centre B est repéré dans le repère 1 par le vecteur unitaire P :

$$\begin{pmatrix} \sin \theta \cos \phi \\ \sin \theta \sin \phi \\ \cos \theta \end{pmatrix}$$

L'hamiltonien d'interaction électron-électron H_{ee} a pour expression :

$$\hat{H}_{ee} = \hat{S}_A \cdot \tilde{C} \cdot \hat{S}_B \quad (4.3)$$

La matrice \tilde{C} a pour expression :

$$C_{i,j} = \delta_{i,j} J + \frac{\mu_0 \beta^2}{4\pi r^3} \left(\sum_k g_{k,i}^A g_{k,j}^B - 3 \sum_{l,m} g_{l,i}^A g_{m,j}^B P_l P_m \right) \quad (4.4)$$

Soit, sous forme compacte :

$$C = JI_3 + \frac{\mu_0 \beta^2}{4\pi r^3} ({}^t g^A R g^B {}^t R - 3 {}^t g^A P {}^t P R g^B {}^t R) \quad (4.5)$$

Le premier terme de cette somme est le terme d'échange, le second est le terme dipolaire. La matrice R est la matrice de passage du repère 1 au repère 2. Cette transformation revient à appliquer trois rotations successives. Les angles de ces rotations s'appellent les angles d'EULER, définis comme selon la convention « zyz ». C'est-à-dire que l'on passe du repère 1 au repère 2 par :

1. rotation d'un angle a autour de l'axe (Oz)
2. rotation d'un angle b autour de l'axe (Oy')
3. rotation d'un angle c autour de l'axe (Oz'')

La méthode choisie pour rendre compte de la largeur de raie consiste à modéliser un « H - strain », c'est à dire simuler des couplages hyperfins non résolus par convolution avec une forme gaussienne. La largeur de ladite forme peut être anisotrope. La méthode suivie pour déterminer les paramètres consiste à :

1. Fixer les valeurs de g , A et H_{Strain} à celles déterminées pour les spectres hors interaction (à 80 K)
2. Ajuster les positions des raies par recherche raisonnée de r , puis (θ, ϕ)
3. Ajuster les amplitudes par exploration systématique de (a, b, c)

4.4.1 Simulation du spectre de l'espèce « high g resting » en interaction

Nous tentons d'abord de rendre compte du spectre en interaction avec l'interaction dipolaire seule. L'éclatement est de même amplitude sur les direction g_1 et g_3 (0,5 mT). La forme du spectre en interaction est caractérisée par un triplet résolu sur g_3 , alors que la direction g_1 montre une série d'épaulements. La principale contrainte vient donc de la direction g_3 du molybdène. Le centre à molybdène est placé à l'origine du repère. En effet, le couplage dipolaire, *que l'on visualise sur le spectre du Mo^V* dépend au premier ordre de la position (r, θ, ϕ) du centre fer-soufre. La matrice \tilde{g} du centre à molybdène est très faiblement anisotrope, et beaucoup moins que celle du centre fer-soufre.

Nous pouvons estimer l'éclatement produit par un dipôle ponctuel à une distance r . L'ordre de grandeur de la *valeur absolue* de l'interaction dipolaire est, en moyenne sur tout l'espace :

$$\langle \Delta E \rangle = \frac{\mu_0 \beta^2}{4\pi r^3} g^A g^B \times \frac{1}{4\pi} \int_{\phi=0}^{2\pi} \int_{\theta=0}^{\pi} |1 - 3 \cos^2 \theta| \sin \theta d\theta d\phi \quad (4.6)$$

$$\langle \Delta E \rangle = \frac{\mu_0 \beta^2}{4\pi r^3} g^A g^B \frac{4\sqrt{3}}{9} \quad (4.7)$$

soit en champ magnétique :

$$\langle \Delta B \rangle = \frac{\mu_0 \beta}{4\pi r^3} g^B \frac{4\sqrt{3}}{9} \quad (4.8)$$

Nous obtenons les valeurs numériques suivantes en prenant $g^B = 2$:

$r(\text{\AA})$	$\langle \Delta B \rangle$ (mT)
13	0,65
14	0,52
15	0,42
16	0,35
17	0,29

Sur le spectre expérimental, la moyenne des éclatement vaut (*cf* figure 4.5, p. 126)

$$\frac{1}{3} (0,5 + 0,3 + 0,5) = 0,43 \text{ mT}$$

La distance de 15 Å semble donc être une valeur adéquate pour rendre compte des éclatements observés. Nous fixons d'abord les angles d'EULER à zéro : les axes magnétiques des deux centres sont colinéaires. Nous recherchons d'abord les

angles qui repèrent la position du centre fer–soufre par rapport au Mo^{5+} . Nous choisissons l’axe Oz selon la direction g_3 sur molybdène. De la sorte, l’éclatement dipolaire sur cette raie est, au premier ordre, uniquement déterminé par l’angle azimutal θ . Sur la figure 4.12 sont représentés les spectres calculés pour différentes valeurs de θ , en fixant d’abord ϕ à zéro. Le spectre b ($\theta = 30^\circ$) est le plus proche du spectre expérimental. Les valeurs de θ proche de 90° (spectres e, f) semblent convenir également, mais pas sur les directions g_1 et g_2 . La valeur de 60° , proche de l’angle « magique », ne donne aucun éclatement de la raie et peut être exclue. En recherchant autour de 30° , on constate que la valeur $\theta = 35^\circ$ convient mieux. Sur les spectres suivants (i, \dots, n), on recherche une valeur possible de ϕ en conservant $\theta = 35^\circ$. La valeur de 45° est celle qui permet de se rapprocher le mieux de la forme des raies sur g_1 et sur g_2 .

Le spectre k de la figure 4.12 ne reproduit pas finement le spectre expérimental. Pour cela, les angles d’EULER doivent être ajustés. La recherche des angles d’EULER est *a priori* plus difficile, puisque ceux-ci ont essentiellement un impact sur les amplitudes des raies, et aussi sur la position de celle-ci. Une recherche systématique (550 orientations uniformément réparties sur la sphère) n’a pas permis d’obtenir des simulations satisfaisantes, mais certains jeux de valeurs obtenus par tâtonnements semblent reproduire correctement la position et l’amplitude relatives des raies et des épaulements du spectre. Nous ne pouvons cependant pas nous prononcer sur l’unicité de jeu de valeurs. La simulation la plus fidèle au spectre expérimental a été obtenue avec les valeurs numériques du tableau 4.3, et est donnée sur la figure 4.13 :

Le résultat de la simulation est montré sur la figure 4.13. Nous pouvons donc rendre compte de ce signal de manière satisfaisante en prenant en compte uniquement l’interaction dipolaire.

4.4.2 Simulation du spectre de l’espèce « high g nitrate » en interaction

Notre objectif est de mettre en évidence une modification de l’interaction entre l’état « high g resting » – $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^+$ et l’état « high g nitrate » – $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^+$ ultérieur. Notre stratégie est donc de conserver les paramètres de l’interaction dipolaire déterminés pour l’état « high g resting » – $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^+$, et de les transposer à l’espèce « high g nitrate », puis d’ajuster le terme d’échange pour simuler le spectre au mieux. Pour la simulation de ce signal, une forte contrainte vient du fait que, sur la raie en g_3 , l’éclatement dû à l’interaction dipolaire est compensé par une autre interaction, l’interaction d’échange, et la raie forme un doublet très bien résolu (*cf* figure 4.5, p. 126).

Sur la figure 4.14, la simulation a utilise les mêmes paramètres d’interaction dipolaire que dans le cas de l’espèce « high g resting ». La constante d’échange ajustée vaut $5,1 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$. Si certaines raies sont bien placées, la simulation n’est globalement pas satisfaisante.

La simulation b a été obtenue en modifiant notamment la distance r , ainsi que les paramètres des couplages hyperfin (A, H_{strain}) par rapport au cas sans interaction. L’augmentation du H_{strain} est le moyen de rendre compte de la plus grande largeur de raies sur le spectre en interaction, notamment sur la raie g_1 .

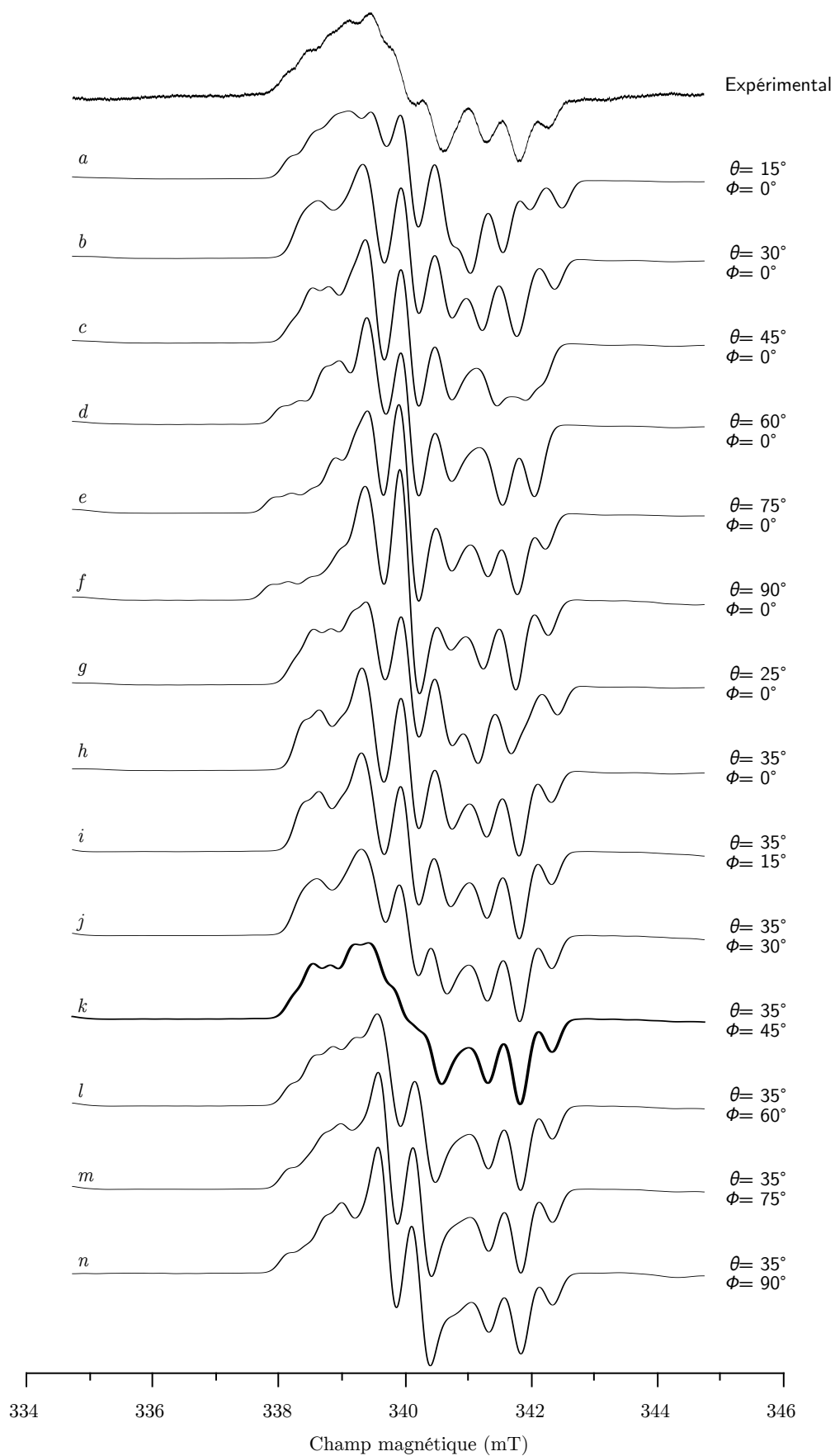


Figure 4.12 – Recherche des paramètres angulaires avec $r = 15,0 \text{ \AA}$. Le spectre *k* est celui retenu pour ajuster les valeurs des angles d'EULER.

Tableau 4.3 – Paramètres utilisés pour la simulation du spectre « high g nitrate » en interaction, figure 4.13

g^B (Mo^V)	1,9812
	1,9911
	1,9982
A_1 (G)	5
	5,2
	6,2
A_2 (G)	2,9
H_{strain} (MHz)	8
	8,3
	8,3
g^A ($[\text{Fe}_4\text{S}_4]^+$)	1,902
	1,947
	2,046
J (cm^{-1})	0
r (\AA)	15
θ ($^\circ$)	35
ϕ ($^\circ$)	45
a ($^\circ$)	-34,1
b ($^\circ$)	68,3
c ($^\circ$)	54,5

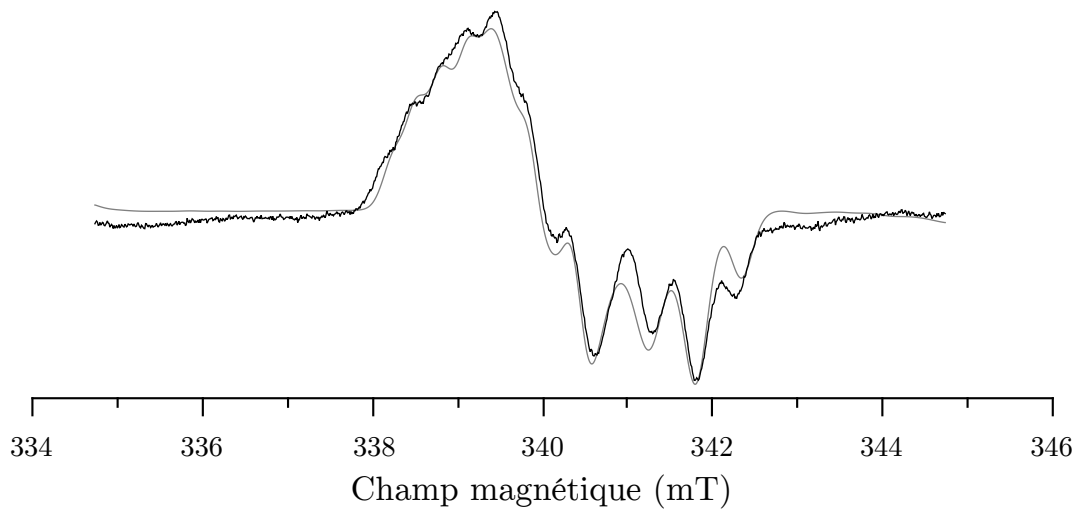


Figure 4.13 – Espèce « high g resting » couplée au $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^+$. Spectre expérimental (noir) et calculé (gris) en prenant les valeurs numériques du tableau 4.3

L'apparition d'un couplage d'échange implique également un « J -strain », c'est à dire une distribution des valeurs de J corrélée à une distribution de distances r . Le programme *Easyspin* ne permet pas de modéliser cet effet, qui peut avoir un effet drastique sur la largeur de raie d'espèces en interaction (Guigliarelli *et al.*, 1993). Cependant, la contrainte restant la même, la valeur de J qui a été estimée ici est égale à $4,75 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$, très proche donc de ce que donne la simulation précédente (tableau 4.4). Nous pouvons donc simuler correctement ces signaux en ajoutant un terme d'échange :

$$J \simeq 5 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$$

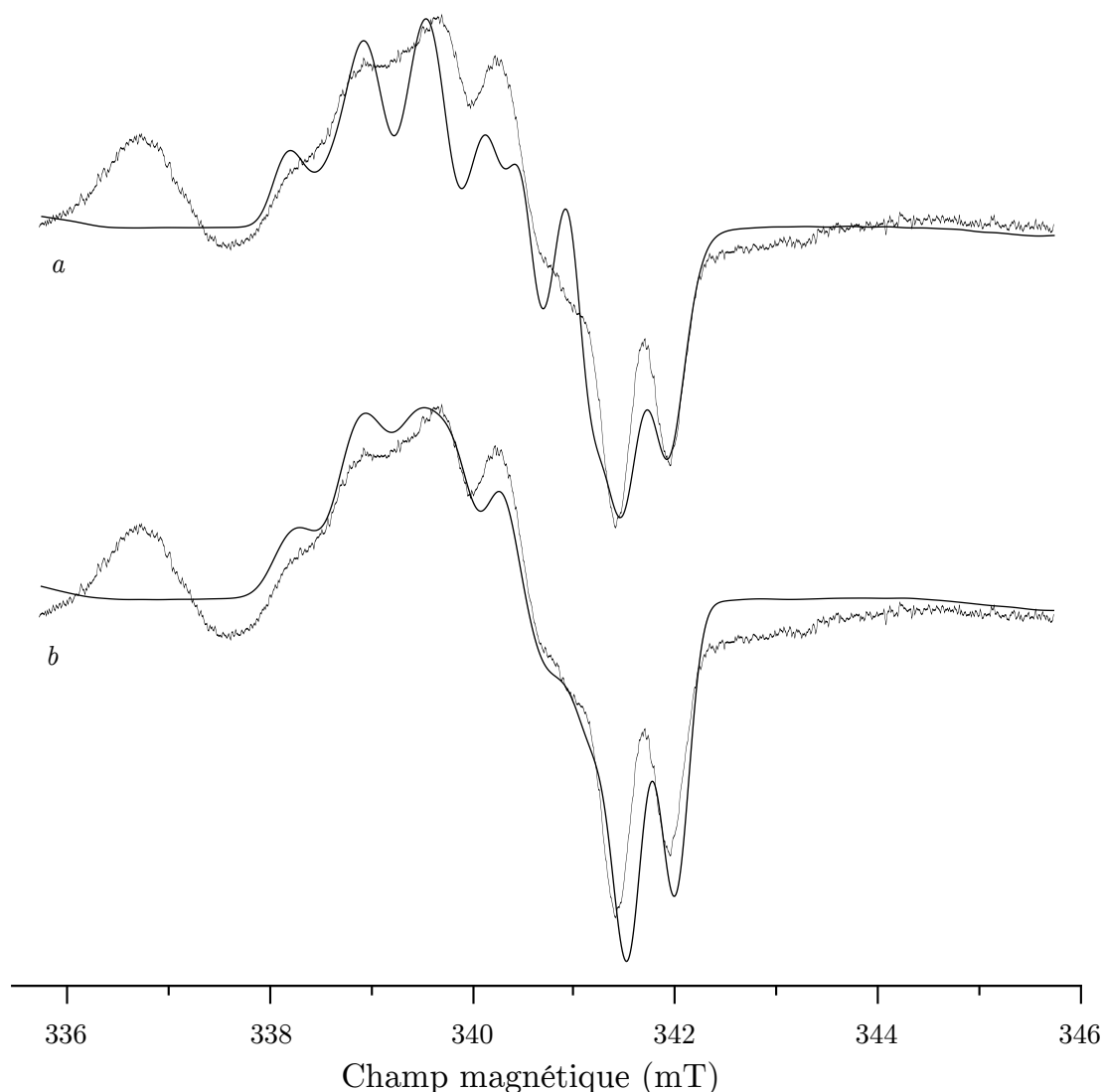


Figure 4.14 – Simulations de l'espèce « high g nitrate » en interaction avec le centre $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^+$, superposées au spectre expérimental. *a* : simulation obtenue en transposant les paramètres d'interaction de l'espèce « high g resting », et en ajustant J . *b* : Meilleure simulation obtenue, en ajustant la valeur des angles d'EULER. les paramètres sont rassemblés dans le tableau 4.4

L'étude quantitative des interactions magnétiques est une chose délicate, qui demande souvent de simuler les spectres en interactions avec un modèle physique

Tableau 4.4 – Paramètres utilisés pour la simulation du signal « high g nitrate » en interaction, figure 4.14

	Simulation <i>a</i>	Simulation <i>b</i>
g^B (Mo ^V)	1,9817	1,9817
	1,989	1,989
	1,9981	1,9981
A_1 (G)	4,7	4,6
	4,7	4,7
	5,7	5,7
A_2 (G)	1,5	2,4
	H_{strain} (MHz)	8,5
g^A ([Fe ₄ S ₄] ⁺)	8,5	10
	8,3	11
J (cm ⁻¹)	1,902	1,902
	1,947	1,947
	2,046	2,046
J (cm ⁻¹)	$5,1 \cdot 10^{-4}$	$4,75 \cdot 10^{-4}$
r (Å)	15	17
θ (°)	35	33,4
ϕ (°)	45	45,1
a (°)	-34,1	-90
b (°)	68,3	29
c (°)	54,5	-27,5

adéquat. La présence d'une interaction magnétique intercentres, ayant un effet sur les spectres du Mo^{V} , n'a pas été rapportée jusqu'ici pour les nitrate réductases périplasmiques. C'est grâce notamment aux connaissances acquises sur la réactivité de l'espèce « high g resting » que nous avons pu générer un état de l'enzyme où, de manière homogène, le Mo^{V} est en interaction avec le centre fer-soufre réduit. L'interaction est du même ordre de grandeur que l'interaction hyperfine avec les protons, et la déceler demande un œil exercé. De par les propriétés de relaxation du centre fer-soufre et du molybdène, il faut descendre en température et en puissance pour observer les spectres d'interaction. Ceci se fait au détriment de l'intensité du signal, et demande de longues durées d'acquisition.

L'interaction magnétique a également un effet d'accélération sur la relaxation du Mo^{V} . La section suivante rend compte de ces effets.

4.5 Étude de la relaxation des espèces paramagnétiques dans NapA

L'objectif de cette étude est de montrer l'effet du paramagnétisme du centre fer-soufre sur les propriétés de relaxation du molybdène, et de savoir si l'activation par réduction de l'enzyme modifie cela. Pour cela, nous comparerons les états « high g resting » – $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^+$, « high g resting » – $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{2+}$ (états avant activation) et « high g nitrate » – $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^+$ (état obtenu après l'activation par réduction). Nous avons utilisé deux approches : en mode continu par l'étude de la saturation du signal ; en mode impulsionnel par saturation-récupération.

4.5.1 Étude de la relaxation des espèce Mo^{V} « high g »

4.5.1.1 Mesures des temps de relaxation par RPE impulsionnelle

Mesure des temps de relaxation longitudinale

Nous avons mesuré les temps de relaxation à la valeur du champ magnétique donnant l'écho maximum, ajustée après l'enregistrement d'un spectre d'absorption en champ magnétique (« echo-detected field sweep », figure 4.15). Cette valeur est proche de g_2 .

Plusieurs types de procédures existent pour mesurer les temps de relaxation longitudinaux T_1 . Nous en avons utilisé deux : « inversion – récupération » et « saturation récupération ». Dans les deux cas, on observe le retour à l'équilibre de l'écho après l'application d'une perturbation. Cette perturbation peut être une inversion (impulsion π) de l'aimantation, ou bien une saturation, qui correspond à l'irradiation continue du système jusqu'à annulation de son aimantation. En théorie, les deux procédures donnent la même valeur de T_1 .

Mesure de T_1 par inversion-récupération La séquence d'impulsions est $\pi - \tau - \frac{\pi}{2} - \pi$ et l'on incrémente le temps τ . La détection se fait en intégrant l'écho. En pratique, l'impulsion π de 32 ns excite le système de spins sur une bande de fréquence valant approximativement

$$\frac{1}{32 \text{ ns}} \simeq 31 \text{ MHz}$$

Ceci correspond à une plage de champ de $\simeq 1,1 \text{ mT}$ à $g \simeq 2$. Or les signaux Mo^{V} « high g » ont une largeur d'environ 4 mT en bande X, pour leur partie centrale, et de 30 mT si l'on tient compte des raies dues aux isotopes magnétiques du molybdène. Dans ces conditions, seule une fraction des paquets de spins est stimulée par l'impulsion π , les autres restant à l'équilibre (phénomène de « hole burning »). Par *diffusion de spin*, les paquets de spins non stimulés vont contribuer au retour à l'équilibre de l'aimantation, par des mécanismes différents de la relaxation spin-réseau. Il peut en résulter une allure non-exponentielle des mesures, et une incertitude quant à la valeur de T_1 qui en est extraite. Pour obtenir le temps de relaxation longitudinale, on ajuste l'expression suivante aux points expérimentaux :

$$y(t) = y_0 \left(1 - 2 \exp \left(-\frac{t - t_0}{T_1} \right) \right) \quad (4.9)$$

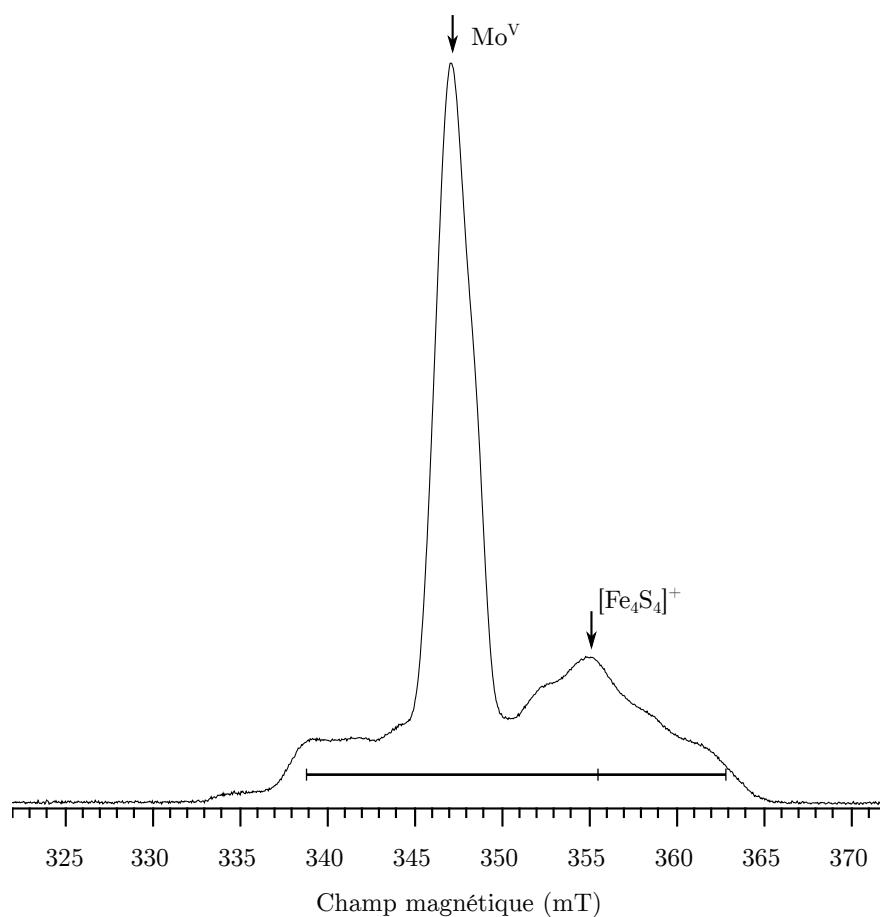


Figure 4.15 – Spectre en champ magnétique détecté *via* l'écho de spin de l'espèce « high g resting » – $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^+$ à 15 K. Les flèches indiquent la position du champ pour les mesures sur le signal Mo^{V} et le signal $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^+$ (valeurs de g sur le segment). 80 tirs/point à 125 kHz. Fréquence : 9,677 GHz.

Le paramètre t_0 sert à rendre compte du fait que la détection est en retard (« temps mort ») par rapport au début du retour à l'équilibre. Il est ainsi parfois délicat de voir l'inversion de l'aimantation si la relaxation est très rapide (*cf* panneau *B* figure 4.16, p. 148)

Mesure de T_1 par saturation-récupération En pratique, le spectromètre ne permet pas d'irradier continuellement le système. On utilise à la place une série d'impulsions $\frac{\pi}{2}$, censées avoir le même effet, et on détecte le retour à l'équilibre de l'aimantation à partir de zéro.

On applique une série de 28 impulsions $\frac{\pi}{2}$ de 16 ns toutes les 200 ns, suivies de la génération d'un écho primaire par la séquence $\pi - \frac{\pi}{2}$ après un intervalle de temps τ , que l'on incrémente. La détection est faite en « single point », c'est à dire qu'on mesure l'amplitude de l'écho à son maximum. Pour obtenir le temps de relaxation longitudinale, on ajuste l'expression suivante aux point expérimentaux :

$$y(t) = y_0 \left(1 - \exp \left(-\frac{t - t_0}{T_1} \right) \right) \quad (4.10)$$

Tableau 4.5 – Temps de relaxation longitudinale T_1 des espèces Mo^{V} mesurés par saturation-récupération.

Température	15 K	30 K	80 K
« high g resting » $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{2+}$	$(2,5 \pm 0,1)$ ms	(86 ± 1) μs	$(2,60 \pm 0,01)$ μs
« high g resting » $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^+$	$(1,9 \pm 0,1)$ ms	(74 ± 4) μs	$(2,20 \pm 0,05)$ μs
« high g nitrate » $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^+$	$(1,40 \pm 0,02)$ ms	(70 ± 10) μs	$(1,45 \pm 0,10)$ μs

Mesure du temps de relaxation transverse T_2

On applique une séquence de deux impulsions : $\frac{\pi}{2} - \tau - \pi$, et on incrémente le temps τ . On enregistre l'intégrale de l'écho en fonction de τ . Avec un incrément $\Delta\tau = 4$ ns, on obtient de fortes modulations, dues au couplage avec les spins nucléaires. Pour masquer ces modulations, on répète l'enregistrement avec un incrément $\Delta\tau = 66$ ns pour ne plus satisfaire au critère de SHANNON $\frac{1}{\Delta\tau} < 2\nu_{\text{1H}}$ (figure 4.17). Cette procédure ne masque pas cependant les modulations de plus basse fréquence, qui peuvent encore distordre la relaxation. L'ajustement d'une monoexponentielle donne le temps de mémoire de phase, qui est proche du temps de relaxation spin-spin T_2 (temps de relaxation transverse) :

$$y(t) = y_1 \exp \left(-\frac{t}{T_2} \right) + y_0 \quad (4.11)$$

L'utilisation d'une expression de type « stretched exponential » permet d'améliorer l'ajustement en introduisant un paramètre supplémentaire phénoménologique :

$$y(t) = y_1 \exp \left(-\left(\frac{t}{T_2} \right)^\alpha \right) + y_0 \quad (4.12)$$

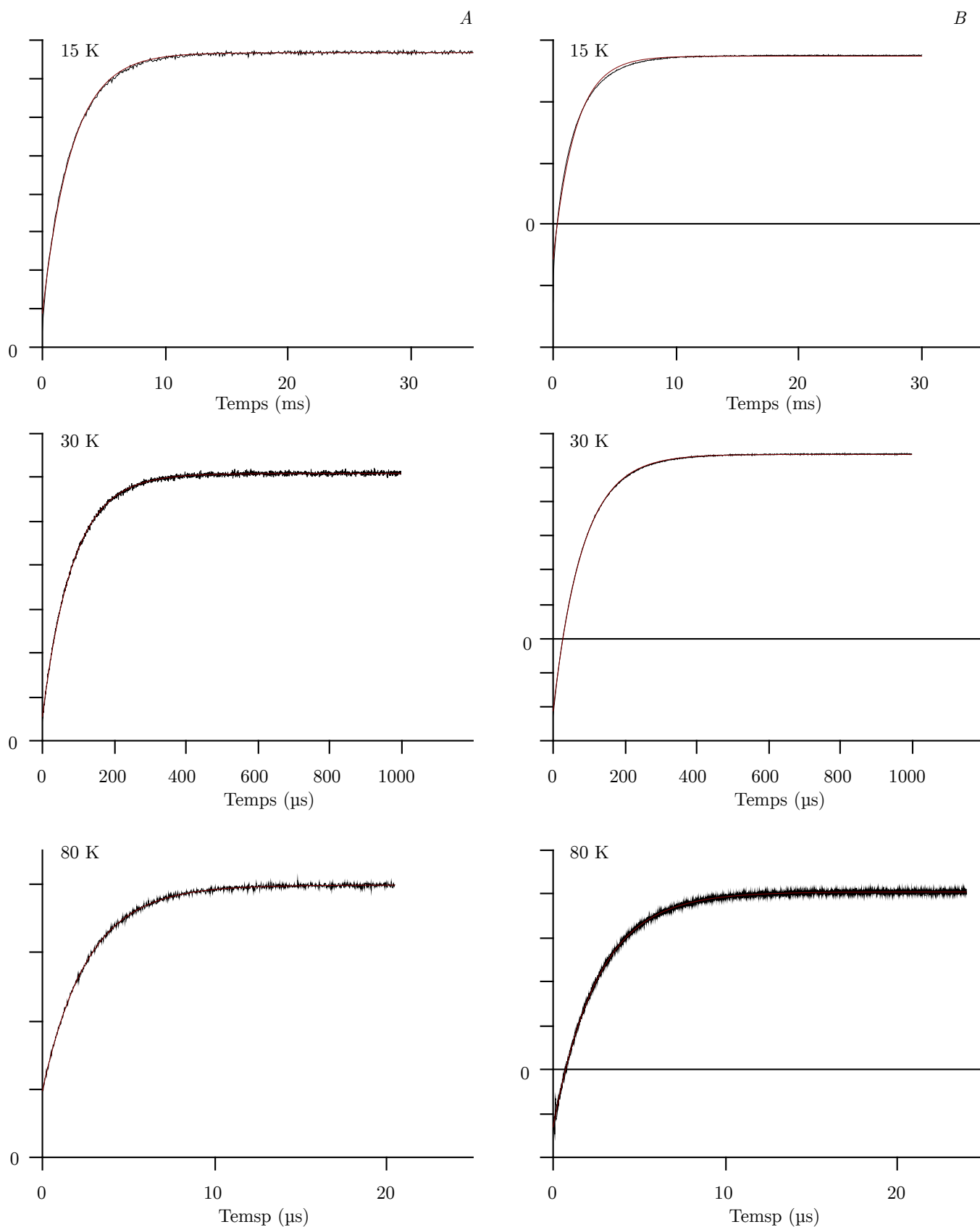


Figure 4.16 – Retour à l'équilibre de l'aimantation après saturation (panneau A) ou après inversion par une impulsion π (panneau B). Les exponentielles ajustées sont superposées en rouge.

Avec nos données, la valeur du paramètre α ne dépasse pas 1,2. Les ajustements avec une monoexponentielle pure sont de bonne qualité (voir la figure 4.17). Les résultats des ajustements de l'équation 4.11 sont données dans le tableau 4.6

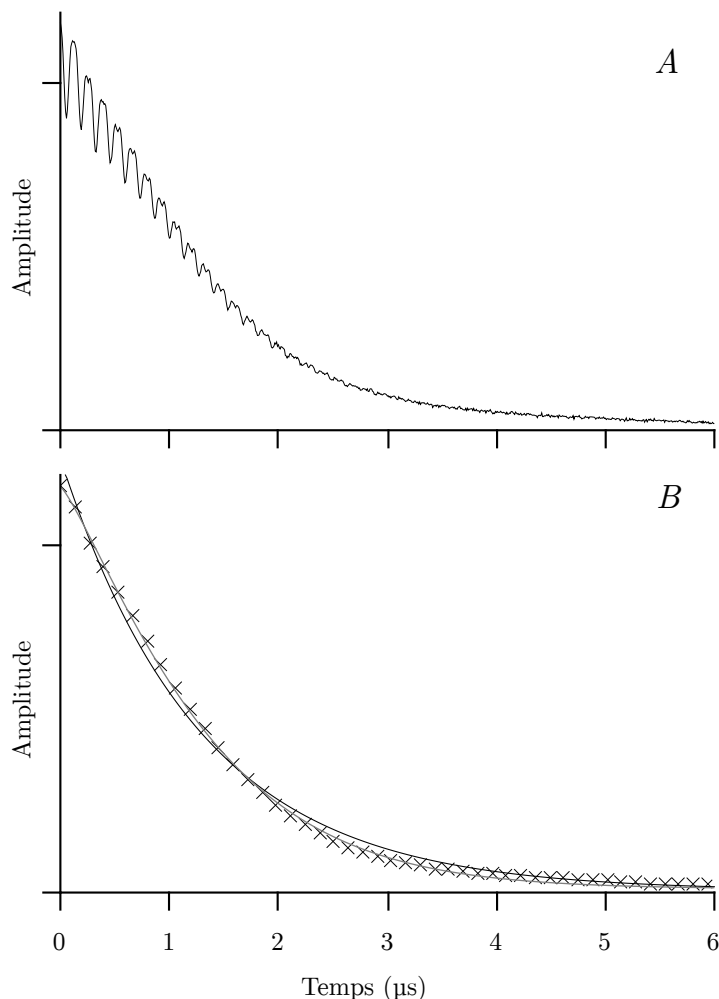


Figure 4.17 – *A* : Intensité de l'écho de spin en fonction du temps séparant les deux impulsions $\frac{\pi}{2} - \pi$, pour un incrément de valant 4 ns. Espèce « high g resting » – $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{2+}$, température 15 K. *B* : Même signal, enregistré avec un incrément de 66 ns (croix). La ligne noire représente l'ajustement de l'expression 4.11. La ligne grise représente l'ajustement de l'expression 4.12.

4.5.1.2 Étude de la relaxation des signaux Mo^{V} « high g » par saturation continue

Modification du signal par saturation

Le principe de cette expérience consiste à mesurer l'amplitude du signal en fonction du champ micro-onde B_1 . La forme d'une raie d'absorption homogène est proportionnelle à :

$$\frac{g\beta B_1 T_2}{1 + (g\beta)^2 T_2^2 (B - B_0)^2 + (g\beta)^2 T_1 T_2 B_1^2} \quad (4.13)$$

Tableau 4.6 – Temps de relaxation transverse des espèces Mo^V mesurés par une séquence à deux impulsions

	15 K	30 K	80 K
« high <i>g</i> resting » [Fe ₄ S ₄] ²⁺	(1,3 ± 0,1) μs	(1,40 ± 0,05) μs	(1,10 ± 0,05) μs
« high <i>g</i> resting » [Fe ₄ S ₄] ⁺	(1,15 ± 0,05) μs	(880 ± 50) ns	(890 ± 10) ns
« high <i>g</i> nitrate » [Fe ₄ S ₄] ⁺	(1,60 ± 0,03) μs	(800 ± 100) ns	(750 ± 50) ns

Son amplitude maximale est donc proportionnelle à

$$\frac{g\beta T_2 B_1}{1 + g^2 \beta^2 T_1 T_2 B_1^2} \quad (4.14)$$

Le signal est proportionnel à B_1 tant que $g^2 \beta^2 T_1 T_2 B_1^2 \ll 1$; au-delà, la transition est saturée. La puissance de demi-saturation est définie par :

$$B_{1/2} = \frac{1}{g\beta\sqrt{T_1 T_2}} \quad (4.15)$$

Cette relation est valable tant que l'expérience vérifie la condition :

$$\omega_m B_m \ll \frac{1}{g\beta T_1 T_2} \quad (4.16)$$

où ω_m est la pulsation du champ de modulation B_m (Cullis, 1976).

Expérimentalement, nous avons utilisé des fréquences de modulation inférieures à 100 kHz, pour s'affranchir des distorsions qui apparaissent à basse température et forte puissance sur les signaux Mo^V. Pour déterminer la fréquence à utiliser, avons nous comparé les spectres enregistrés à la puissance maximale (200 mW), pour différentes fréquences de modulation. Nous avons choisi la fréquence maximale telle que la forme du signal ne dépende pas de celle-ci. Ceci se fait aux dépens du rapport signal/bruit. La composante « en $1/f$ » du bruit est exaltée à plus basse fréquence. L'expérience devient sensible au bruit acoustique et aux vibrations mécaniques. Aux fréquences de 1 kHz ou 500 Hz, il est nécessaire d'arrêter la pompe moléculaire du cryostat, qui est mécaniquement couplée à la cavité, et dont la vitesse de 27 000 rpm équivaut à $\simeq 450$ Hz.

Tableau 4.7 – Fréquences de modulation du champ (en kHz) utilisées pour les expériences de saturation continue sur les signaux Mo^V « high *g* »

	15 K	30 K	80 K
« resting » [Fe ₄ S ₄] ²⁺	6	1	100
« resting » [Fe ₄ S ₄] ⁺	10	10	100
« nitrate » [Fe ₄ S ₄] ⁺	10	10	100

Nous avons enregistré les spectres du Mo^V à 15 K, à 80 K, ainsi qu'à 30 K, où les raies du Mo^V sont élargies mais pas éclatées (zone de coalescence). La mesure

des amplitudes de raies est compliquée par les couplages hyperfins avec les noyaux ^{95}Mo et ^{97}Mo . Les raies pour lesquelles $I \neq 0$ sont moins saturées que les raies avec $I = 0$ (relaxation croisée). Elles ressortent donc à forte puissance. Ceci est illustré sur la figure 4.18. Le spectre peut donc être vu comme résultant de deux

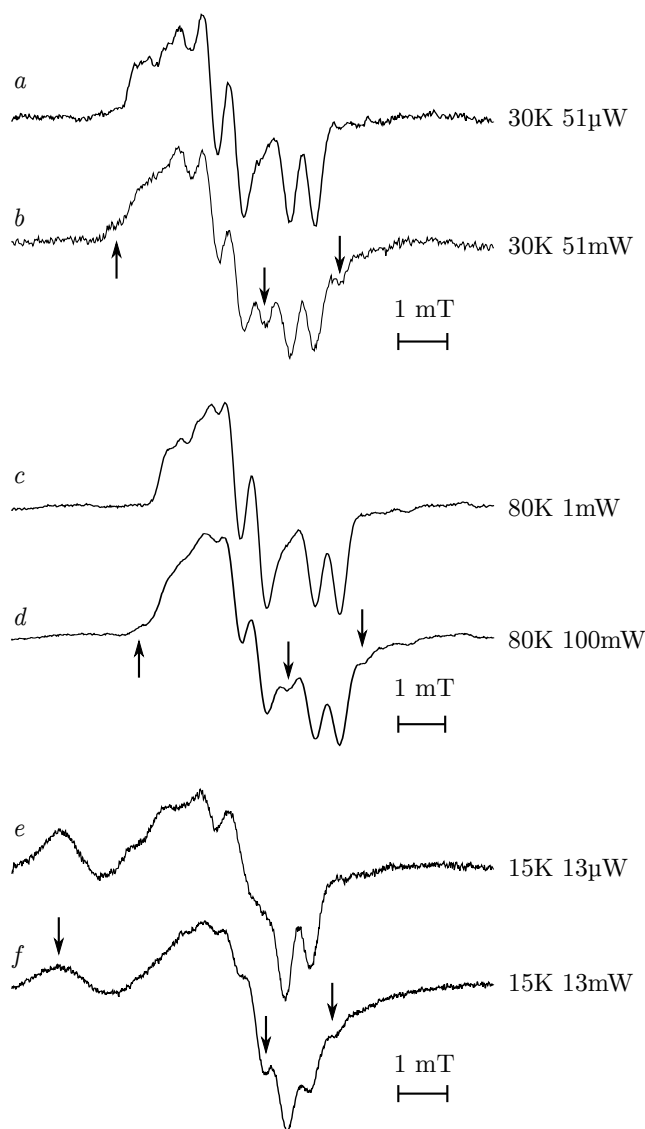


Figure 4.18 – Effet de la saturation sur les amplitudes relatives des raies des spectres de Mo^{V} « high g » « high g resting » – $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{2+}$ (*a* et *b*), « high g resting » – $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^+$ (*c* et *d*), et « high g nitrate » – $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^+$ (*e* et *f*). Les flèches indiquent les raies dont l’amplitude relative croît lorsque le signal sature. Amplitude de modulation 0,2 mT,

espèces aux propriétés de relaxation légèrement différentes. Ceci est bien visible sur le signal « high g resting », où l’épaule à droite de la raie centrale donne une raie résolue à forte puissance. On remarque aussi que l’espèce radicalaire qui apparaît avec le signal « high g nitrate » est plus facilement saturée que le signal Mo^{V} . Afin de minimiser la perturbation due aux contributions des isotopes $^{95,97}\text{Mo}$, dans l’analyse de la saturation du signal Mo^{V} , plutôt que de suivre l’amplitude des différentes raies, nous avons mesuré l’intensité du signal par double intégration.

Sur la figure 4.19 (panneau *A*) les intensités intégrées des spectres sont reportées

en fonction de la racine carrée de la puissance micro-onde (échelle logarithmique).

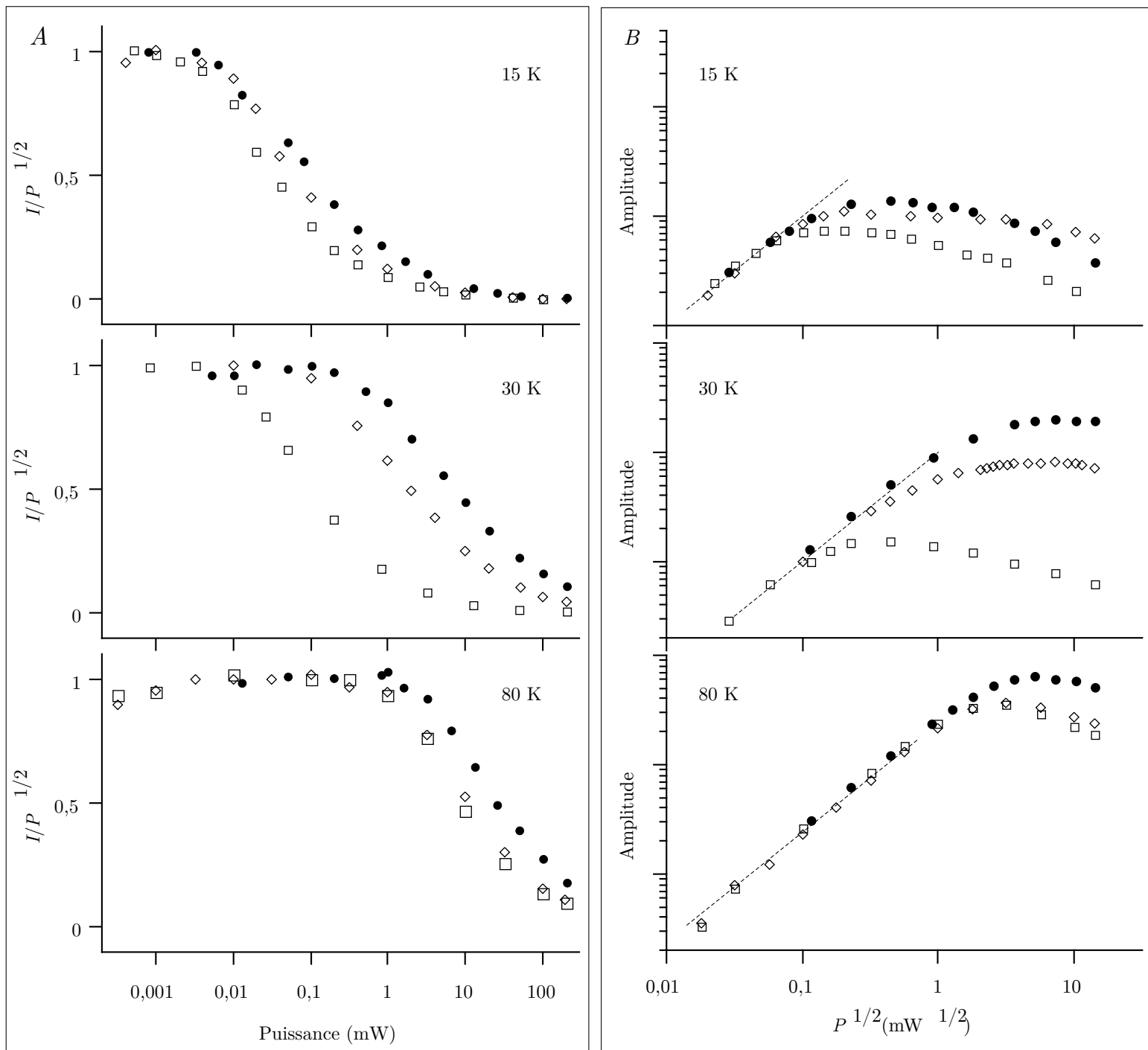


Figure 4.19 – *A* : Intensité intégrée du signal Mo^{V} dans la forme « resting »- $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{2+}$ (\square), « resting »- $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{+}$ (\diamond) et « nitrate » (\bullet) en fonction de la puissance (échelle logarithmique). *B* : Amplitude du signal Mo^{V} (amplitude de la raie à plus haut champ) en fonction de la racine carrée de la puissance (échelle log-log) utilisée pour extraire les temps de relaxation du tableau 4.9.

Tableau 4.8 – Puissances de demi-saturation des signaux Mo^{V} (en milliwatts) estimées à partir des courbes de la figure 4.19, panneau A.

	15 K	30 K	80 K
« resting » $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{2+}$	0,02	0,06	6,7
« resting » $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^+$	0,035	0,61	6,9
« nitrate » $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^+$	0,036	2,1	18

Pour l'espèce « high g resting », à 80 K, la relaxation est la même que le centre fer–soufre soit oxydé ou réduit. À 15 K, la différence de relaxation entre ces deux états est faible, avec une relaxation légèrement plus rapide lorsque le centre fer–soufre est réduit, ce qui est en accord avec la présence d'un couplage magnétique « high g resting » – $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^+$. Dans l'état « high g nitrate », à 15 K et 80 K, la relaxation est un peu plus rapide que dans l'état « high g resting », mais c'est à 30 K que les saturations des trois états sont les plus différenciées.

Les données à 30 K montrent ainsi clairement que la relaxation du Mo^{V} « high g resting » accélère lorsque le Fe_4S_4 est réduit, ce qui confirme le couplage magnétique entre les deux centres. L'accélération supplémentaire de la relaxation lorsqu'on passe dans l'état « high g nitrate » est en accord avec l'augmentation du couplage d'échange entre Mo^{V} et $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^+$ lorsqu'on passe de l'état « high g resting » à l'état « high g nitrate ». Il faut garder à l'esprit que, quel que soit le signe de J , le couplage d'échange conduit toujours à une accélération de relaxation. À 15 K, le signal RPE du $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^+$ est détectable, l'interaction est visible sur les spectres, et on s'attend à un effet sur la relaxation du Mo^{V} . Inversement, quand la température est suffisamment haute, le signal RPE du $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^+$ n'est plus détectable et le centre n'a plus d'effet sur la relaxation du molybdène.

Afin de pouvoir extraire des temps de relaxation à parti de l'acquisition de spectres à différentes puissances micro-ondes, nous avons reporté l'amplitude de la raie à haut champ en fonction de la racine carrée de la puissance (figure 4.19, panneau B). En comparant ces courbes à des abaques, nous pouvons estimer le temps de relaxation spin–réseau (T_1) et le temps de relaxation spin–spin (T_2). Les résultats de cette analyse sont reportés dans le tableau 4.9, ci-dessous. Les valeurs obtenues sont nettement *inférieures* à celles déterminées par RPE impulsionnelle. Le temps de relaxation spin–spin T_2 n'est pas censé varier avec la température. Il faut garder à l'esprit le caractère délicat de ces mesures. La mesure d'une raie peut être entachée d'erreurs systématiques. La forme irrégulière des courbes de la figure 4.19, panneau B, suggère des erreurs de mesure à forte puissance. Cependant, la tendance entre les trois espèces reste la même : c'est l'espèce « high g nitrate » – FeSred qui a la relaxation la plus efficace.

Tableau 4.9 – Valeurs de T_1 et T_2 (en microsecondes) des signaux Mo^{V} « high g » extraites des courbes de la figure 4.19, panneau *B*.

	15 K		30 K		80 K	
	T_1	T_2	T_1	T_2	T_1	T_2
« resting » $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{2+}$	370 ± 100	$1,5 \pm 0,5$	60 ± 30	$1,5 \pm 1$	$3,0 \pm 0,5$	$0,3 \pm 0,2$
« resting » $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^+$	130 ± 50	$1,2 \pm 0,5$	2 ± 2	$0,8 \pm 0,5$	$2,0 \pm 0,5$	$0,3 \pm 0,2$
« nitrate » $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^+$	90 ± 50	$1,5 \pm 0,5$	$0,7 \pm 0,3$	$0,6 \pm 0,5$	$0,8 \pm 0,3$	$0,3 \pm 0,2$

4.5.2 Propriétés de relaxation du centre fer–soufre

4.5.2.1 Étude de l’élargissement des raies avec la température

Les propriétés de relaxation du molybdène dépendent en partie de celles du centre fer-soufre, qu’il nous faut donc connaître. Nous pouvons estimer le temps de relaxation spin–réseau (T_1) en étudiant l’élargissement des raies avec la température. À basse température, la largeur de raie des centres fer–soufre provient principalement du phénomène de g -strain. Le spectre observé résulte du produit de convolution de raies de *paquets de spins* avec la distribution des raies de paquets. La largeur des paquets de spins est proportionnelle à $\frac{1}{T_2}$. La fonction de distribution des paquets est responsable de la forme globale du spectre sans élargissement. Le temps T_2 est indépendant de la température et, par conséquent, dans une certaine gamme de températures, la largeur de raie est indépendante de la température (*cf* spectres *a*, *b*, *c*, figure 4.20, p. 155). Comme T_1 diminue très vite avec la température, à partir d’une certaine température, T_1 devient comparable à T_2 , ce qui entraîne l’élargissement des raies de paquets et donc de l’ensemble du spectre RPE (*cf* spectres *c*, *d*, *e*, *f*, figure 4.20, p. 155). Au delà d’une certaine température, on peut considérer que le raie résulte du produit de convolution de la raie non élargie à basse température par une lorentzienne de demi-largeur

$$\delta_L = \frac{\hbar}{g\beta} \frac{1}{T_1} \quad (4.17)$$

La mesure de cet *élargissement* permet donc de mesurer T_1 . Sur le signal du centre $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^+$, les mesures de largeur à mi-hauteur δ ont été faites sur la raie en g_3 .

4.5.2.2 Étude de la relaxation par saturation continue à 15 K

Pour cette expérience, nous avons utilisé l’enzyme dans l’état « high g resting » – $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^+$. Nous avons mesuré les temps de relaxation du centre fer-soufre réduit à 15 K, le centre à molybdène étant soit dans l’état « high g resting », soit dans l’état « high g nitrate ». Si un centre paramagnétique relaxant lentement (ici, le Mo^{V}) voit sa relaxation accélérée par un centre proche (le $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^+$) relaxant rapidement, l’inverse n’est pas vrai. L’état du molybdène n’influe donc pas *a priori* sur la relaxation de centre fer – soufre. Il faut également garder en mémoire le fait que les formes Mo^{V} sont sous-stœchiométriques et ne représentent pas la totalité du Mo présent.

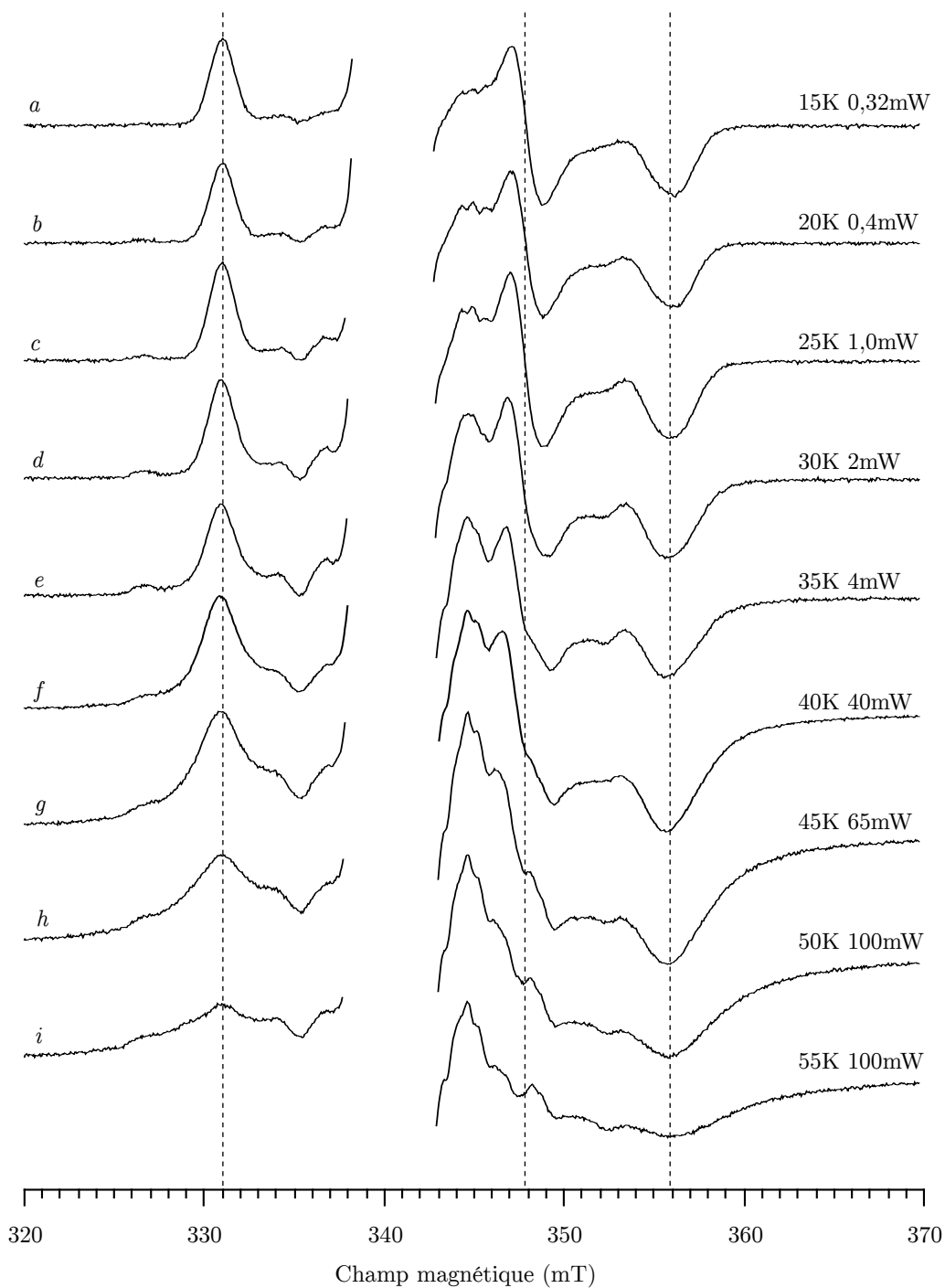


Figure 4.20 – Élargissement des raies du centre $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^+$ avec la température. Le signal intense du Mo^{V} « high g resting » est masqué.

Tableau 4.10 – Temps de relaxation spin–spin (T_1) et spin–réseau (T_2) du centre $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^+$ à 15 K estimés par RPE impulsionnelle ou par saturation continue

État du Mo	T_1		T_2	
	resting	nitrate	resting	nitrate
Mode impulsionnel	$(24 \pm 1) \mu\text{s}$	$(20 \pm 1) \mu\text{s}$	$(0,9 \pm 0,1) \mu\text{s}$	$(1,4 \pm 0,5) \mu\text{s}$
Mode continu	$(40 \pm 20) \mu\text{s}$	nd	$(35 \pm 15) \text{ns}$	nd

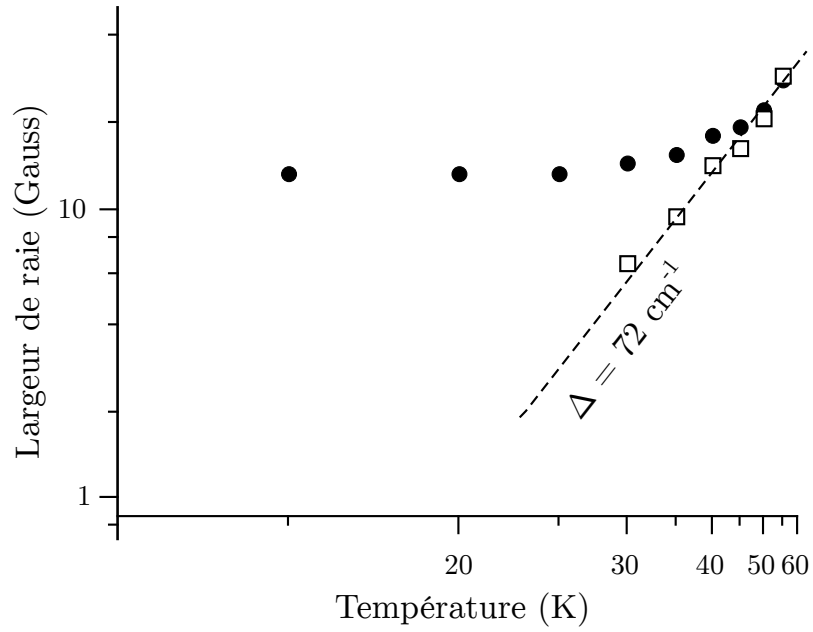


Figure 4.21 – Largeur à mi-hauteur de la raie positive du signal RPE de centre fer-soufre (●). Largeur de la raie homogène (□) déduite des valeurs tabulées de la largeur de raie élargie (Posener, 1959). La droite représente l'expression 4.1 pour $\Delta = 72 \text{ cm}^{-1}$.

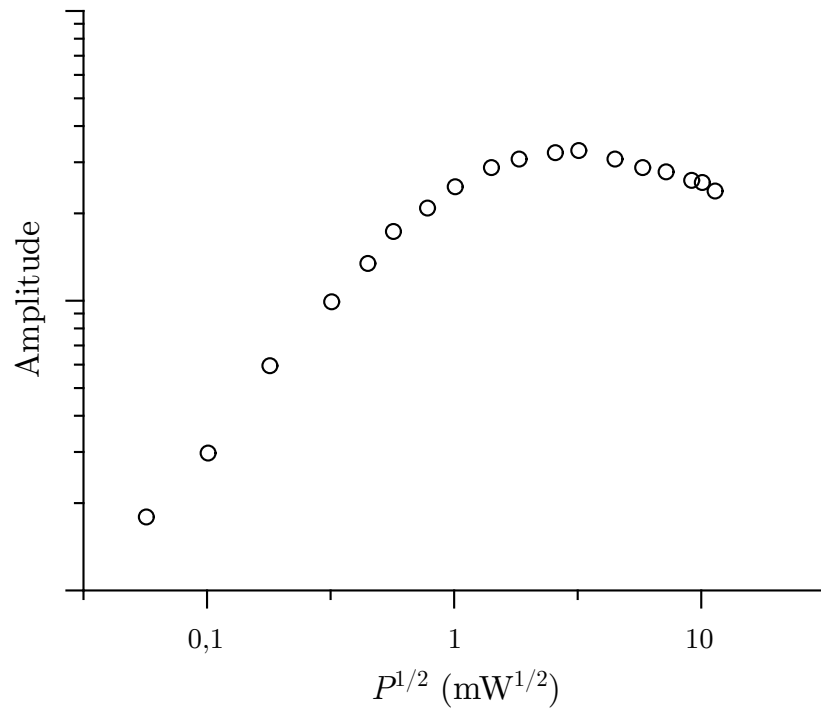


Figure 4.22 – Saturation continue du centre fer-soufre en g_3 (raie négative)

Conclusion Ici, nous avons exploité des échantillons où le Mo^{V} est effectivement en interaction avec le centre fer–soufre réduit. Ainsi, nous avons pu montrer la réduction du centre fer–soufre accélère sensiblement la relaxation du Mo^{V} « high g resting ». Cette accélération est encore plus marquée dans le cas de l’espèce « high g nitrate » – $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^+$. Ceci supporte l’hypothèse d’une augmentation du couplage d’échange en l’état « high g resting » et l’état « high g nitrate », qui rend la relaxation légèrement plus efficace dans la forme « high g nitrate »

4.6 Mise en évidence de l’espèce Mo^{V} « high g turnover »

L’espèce Mo^{V} « high g nitrate », présentée ci-dessus, est très proche de l’espèce « high g resting » en termes de valeurs de g et de couplages hyperfins avec les protons. Elle s’en distingue nettement dans l’interaction magnétique avec le centre $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^+$, et dans sa relaxation, plus rapide. Alors que l’espèce « high g resting » émane d’une enzyme inactive, l’espèce « high g nitrate » est obtenue à partir d’une enzyme qui a été activée par réduction au préalable. Ceci est vrai que l’espèce « high g nitrate » soit générée en présence ou en l’absence de nitrate. Les résultats obtenus en 2010 par électrochimie sur NapAB suggère que des formes inactives de l’enzyme s’accumulent en présence d’une forte concentration en nitrate, d’un pH acide et d’un potentiel peu réducteur (Fourmond *et al.*, 2010b). Ce point est étudié en détail dans le chapitre suivant de ce travail. Il jette cependant un doute sur la pertinence catalytique de l’espèce « high g nitrate », qui peut être obtenue en présence de hautes concentrations en nitrate ($\simeq 0,1$ M).

Au cours de ces travaux, afin de tester la pertinence catalytique de l’espèce associée au signal « high g nitrate », nous avons répété plusieurs fois l’expérience qui consiste à réduire l’enzyme, puis ajouter du nitrate avant de congeler rapidement l’échantillon, ceci à divers pH et diverses concentrations en nitrate.

Au cours de ces essais, nous avons remarqué une certaine hétérogénéité parmi les signatures obtenues. Lors de certaines expériences sur NapA, nous avons constaté que l’espèce « high g nitrate » était présente en mélange avec une autre espèce Mo^{V} , qui semble être également de type « high g ».

La figure 4.24 illustre cette hétérogénéité. Les spectres *a* et *b* sont ceux des espèces « high g nitrate » obtenues respectivement en présence et en l’absence de nitrate. Les spectres *c*, *d* et *e* ont été obtenus dans NapA en présence d’une forte concentration en nitrate ($> 0,1$ M) et de dithionite comme seul donneur d’électrons. Ces spectres semblent moins bien résolus. Sur le spectre *e*, la raie supplémentaire qui apparaît entre g_1 et g_2 , ainsi que la raie négative large visible à haut champ (à droite de la raie en g_3) indiquent clairement qu’une espèce supplémentaire est superposée à l’espèce donnant le signal « high g nitrate », et dont les motifs hyperfins sont encore visibles. J’ai tenté de soustraire le signal *a* au signal *e*. Le résultat est le « spectre » *h*, qui montre un large signal dérivé, de type « high g ». Il est difficile de dire si les motifs observés sont intrinsèques ou si ce sont des artefacts de la soustraction, et il est délicat de repérer des valeurs de g précisément. Ce signal rappelle le signal « high g turnover », qui a été rapporté par le groupe de MOURA sur NapA de *D. desulfuricans*. Sur la base de substitutions isotopiques,

ces auteurs concluent que l'espèce Mo^{V} « high g turnover » n'est pas liée à un ion nitrate, mais à une molécule d'eau (figure 4.23). Ils expliquent la forme du spectre par l'interaction avec deux noyaux d'hydrogène équivalents (González *et al.*, 2006; Najmudin *et al.*, 2008).

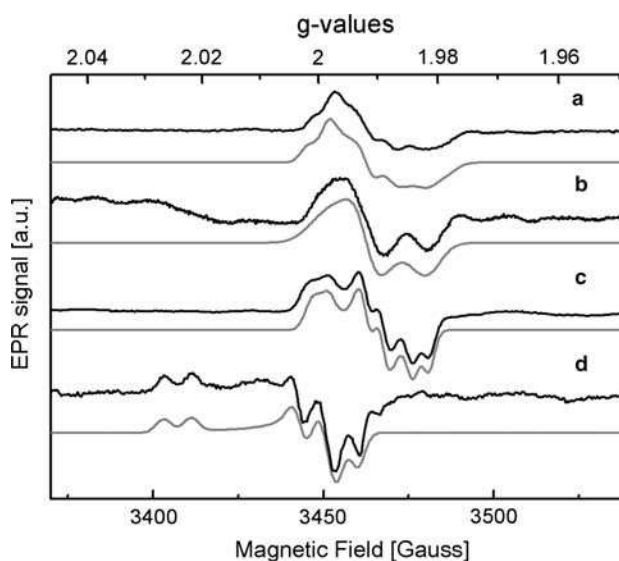


Figure 4.23 – Espèce Mo^{V} dans NapA de *D. desulfuricans*. Les spectres a et b correspondent à l'espèce « high g turnover » obtenue en présence de H_2O et D_2O

Sur la figure 4.24, les spectres f et g ont été obtenus par incubation de NapAB avec du nitrate, mais en laissant la réaction se poursuivre plus longtemps. J'ai obtenu le spectre f avec NapAB *wt*, alors que le spectre g a été obtenu par Bettina FRANGIONI pendant ses travaux sur le mutant R392A de NapAB. L'arginine R392 est un résidu proche du site actif, sur le canal d'accès du substrat. Le mutant R392A ne présente pas d'espèce « high g » dans l'état « as prepared », et aucune forme « high g nitrate » n'y a été observée, mais il possède une activité enzymatique (Dementin *et al.*, 2007). La détection de ce faible signal dans ce mutant actif, ainsi que dans la forme sauvage de NapA et NapAB, suggère qu'il pourrait être impliqué dans la catalyse. D'autres travaux sont nécessaires pour caractériser cette espèce Mo^{V} et juger de son rôle dans la catalyse.

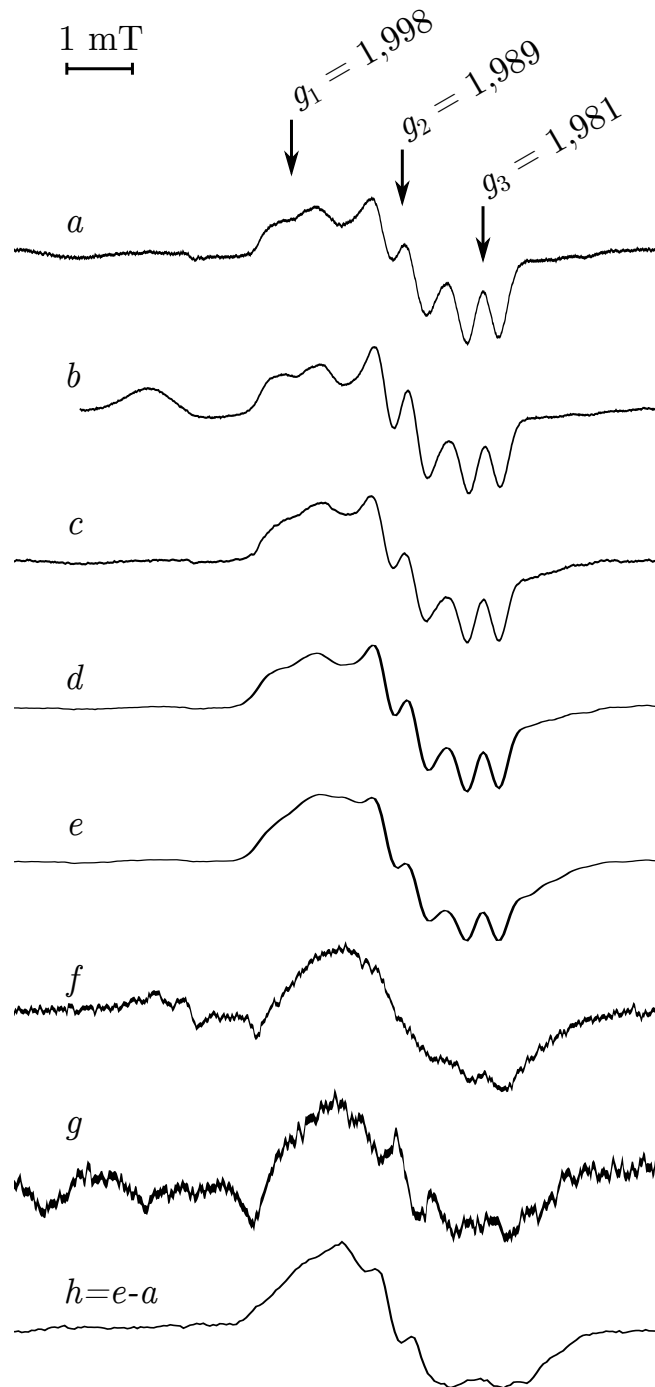


Figure 4.24 – (Voir texte pour la description des spectres) Température : 50 K (*a*), 55 K (*c*, *d*, *e*, *f*, *g*), 80 K (*b*). Puissance : 0,4 mW (*a*), 1 mW (*b*, *c*, *d*, *e*, *g*), 2 mW (*f*). Modulation : 0,2 mT (*a*, *d*, *e*, *f*, *g*), 0,1 mT (*b*, *c*)

4.7 Discussion

L'un des objectifs de cette thèse est la caractérisation spectroscopique du cofacteur à molybdène. Il s'agit de mettre en lien les propriétés électroniques des espèce Mo^{V} avec la réaction de réduction du nitrate en particulier, et l'activité de l'enzyme dans sa globalité.

Deux espèces majoritaires émergent des études par spectroscopie RPE : l'espèce « high g resting », et l'espèce « high g nitrate ». Ces dernières sont spectroscopiquement très proches en termes de valeurs de g , d'anisotropie en g , ainsi que de couplage hyperfin. Une différence existe dans la rhombicité ($\frac{g_1-g_2}{g_1-g_3}$) des signatures RPE. Ces signaux appartiennent à la classe de signaux « high g » trouvés dans les nitrate réductases périplasmiques.

Cependant ces espèces sont observées dans des état bien différents de l'enzyme. Alors que l'espèce « high g resting » est observée, comme son nom l'indique, dans l'enzyme oxydée, « as prepared », l'espèce « high g nitrate », elle, est générée après la réduction de l'enzyme et la disparition de l'espèce « resting », et sa réoxydation à l'air ou au nitrate. Il est important de noter que l'espèce « high g nitrate » n'est pas observée dans des échantillon complètement réoxydés. En effet, une fraction du centre fer-soufre reste réduite dans les échantillons où nous l'avons détectée.

Les résultats acquis précédemment au laboratoire et ceux du chapitre 3 montrent que la première réduction de l'enzyme rend celle-ci plus active, et que cette réduction est corrélée à la disparition de l'espèce « high g resting ». Comme l'ont montré les expériences d'électrochimie et de RPE à température ambiante, la vitesse de réduction du Mo^{V} « high g resting » et la vitesse d'activation de l'enzyme dépendent de la même étape cinétiquement déterminante. Le modèle que nous avons retenu veut que cette étape lente précède le transfert d'électrons vers le centre Mo^{V} « high g resting ». Lors de la première réduction de la forme « high g resting », le transfert d'électron intramoléculaire n'est pas l'étape cinétiquement déterminante. Malgré ces indications, une explication moléculaire manque à cette étape.

Le transfert intramoléculaire d'électrons du $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ vers le molybdène est inhibé dans l'état « high g resting », et rétabli par la réduction de l'enzyme. L'espèce « high g nitrate », qui apparaît après cette première réduction, émane donc d'enzymes où le transfert d'électron intramoléculaire est rétabli à sa vitesse physiologique.

Dans ce chapitre, nous avons mis en évidence une interaction magnétique entre le $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^+$ et le Mo^{V} , celui-ci étant dans sous la forme « high g resting » ou bien « high g nitrate ». Ceci montre d'une part que, lors de la première réduction de l'enzyme, le centre fer-soufre est réduit alors que le molybdène reste à l'état $+V$ *dans les mêmes molécules*. Ceci corrobore notre hypothèse d'un transfert d'électron entravé dans les molécules où le molybdène est sous la forme « high g resting ». D'autre part, cela nous indique que, dans les molécules où le molybdène est dans l'état « high g nitrate », le centre fer-soufre est réduit.

L'interaction spin-spin résulte de la combinaison d'une interaction magnétique « dipolaire » entre les moments magnétiques de spin, et d'une interaction d'échange. l'interaction magnétique « dipolaire » est approchée par un modèle de spins ponctuel et d'interaction dipôle-dipôle. L'interaction d'échange provient de la répulsion électrostatique des électrons célibataires et du principe de PAULI. On en rend compte par un terme scalaire.

Cette interaction se manifeste à la fois par un dédoublement des raies des spectres de Mo^{V} , à basse température, mais aussi par une accélération de la relaxation spin-réseau du Mo^{V} . Cette accélération résulte du couplage spin-spin avec le centre fer-soufre réduit, dont la relaxation est plus efficace et plus sensible à une augmentation de température que ne l'est celle du Mo^{V} .

Dans les enzymes à molybdène, plusieurs systèmes ont montré une interaction spin-spin entre le centre à molybdène et le centre fer-soufre proximal. Dans la xanthine oxydase, l'interaction a été étudiée depuis les années 1970 (Lowe *et al.*, 1972; Lowe et Bray, 1978), et plus tard dans l'équipe de Biophysique des Métalloprotéines (Caldeira *et al.*, 2000). Les raies sont éclatées d'environ 1,1 mT sur le signal « slow ». Un éclatement est aussi observé dans d'autres enzymes de la famille : l'aldéhyde oxydoréductase, la quinoline-2-oxydoréductase, l'isoquinoline-1-oxydoréductase, avec des éclatements du même ordre de grandeur (Canne *et al.*, 1999). Dans le cas de l'aldéhyde oxydoréductase, le couplage d'échange estimé grâce aux travaux de l'équipe de Biophysique des Métalloprotéines est de $1,2 \cdot 10^{-3} \text{ cm}^{-1}$ (More *et al.*, 2005). Au sein de la famille des enzymes à Mo-bis(PGD), une telle interaction a été observée dans deux systèmes. Dans l'aldéhyde oxydoréductase à tungstène de *P. furiosus*, une des formes W^{V} détectées est couplée au centre $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^+$ de spin $S = 3/2$, donnant un spectre très large (600 mT) (Koehler *et al.*, 1996; Mukund et Adams, 1990). Dans la DMSO réductase DmsABC de *E. coli*, une interaction magnétique est détectée *via* l'accélération de la relaxation du Mo^{V} à 30 K, sans que la forme du signal ne change (Rothery *et al.*, 1999). Dans la NAP de *D. desulfuricans*, les raies RPE du Mo^{V} sont légèrement élargies à basse température 25 K lorsque le centre fer-soufre est réduit (González *et al.*, 2006). Pour NapAB de *P. pantotrophus*, BENNETT et coll. ont rapporté n'avoir détecté aucune différence dans la saturation des espèces « high *g* resting » et « low *g* » selon l'état redox du centre fer-soufre. Ils en ont alors conclu que la distance séparant les deux centres devait être supérieure à 20 Å (Bennett *et al.*, 1994).

Dans l'enzyme de *R. sphaeroides*, les couplages sont suffisamment intenses pour être résolus au moins sur certaines directions. L'étude des deux manifestations (sur les spectres et sur la relaxation) a mis lumière des différences entre l'état « high *g* resting » – $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^+$ et l'état « high *g* nitrate » – $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^+$. Le spectre de l'espèce « high *g* nitrate » en interaction n'est pas dédoublé sur la direction g_3 . Ceci suggère que, sur cette direction, la composante d'échange a compensé algébriquement la composante dipolaire de l'interaction. *A contrario*, le spectre en interaction de l'espèce « high *g* resting » peut être simulé de façon satisfaisante en prenant en compte uniquement le terme dipolaire.

L'accélération de la relaxation du Mo^{V} en interaction est elle-même exaltée dans le cas l'espèce « high *g* nitrate ». Or, si les termes dipolaires et de HEISENBERG peuvent se compenser spectralement, ils ont des effets toujours additifs sur l'accélération de la relaxation. Cela nous montre que l'adjonction d'un terme d'échange, estimé d'après les spectres à $5 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$, permet aussi de rendre compte de la meilleure relaxation de l'espèce « high *g* nitrate ».

La modification des spectres à basse température, entre l'état « resting » et l'état « nitrate », pourrait résulter d'une modification du terme dipolaire et d'une variation de la constante d'échange. Mais le terme dipolaire est relié aux positions et orientations relatives des deux centres. Une modification significative de ce terme

impliquerait un grand réarrangement structural de l'enzyme. De plus, le transfert d'électrons est *a priori* plus rapide dans la forme « high *g* nitrate » que dans l'état « high *g* resting ». C'est pour cela que nous privilégions l'interprétation selon laquelle une augmentation du terme d'échange a eu lieu entre l'état « high *g* resting » et l'état « high *g* nitrate ».

Le terme d'échange dépend du recouvrement des orbitales occupées par les deux électrons célibataires. Il est donc très sensible au *réseau de liaisons chimiques* qui relie un centre à l'autre. Parallèlement, c'est ce même recouvrement orbitalaire qui intervient dans le transfert d'électrons intercentres. La théorie des transferts d'électron fait intervenir deux paramètres clef, l'un nucléaire, l'autre électronique (*cf* Chapitre 3 et p. 113). L'énergie de réorganisation λ représente l'énergie nécessaire pour que la protéine atteigne une configuration nucléaire favorable au transfert d'électron. L'intégrale de recouvrement $|T_{ab}|^2$ correspond au recouvrement des orbitales du donneur et de l'accepteur d'électron. Sous certaines conditions, cette grandeur a pu être reliée de manière simple à l'observable spectroscopique J (Okamura *et al.*, 1979; Bertrand, 1991; Hopfield, 1974). Plus $|J|$ est élevée, plus grand est le terme électronique.

Sur la base de ces considérations, notre interprétation de l'activation implique les ligands du molybdène. La réactivité des pyranoptérines permet d'envisager une création de liaisons qui soit déclenchée par une réduction de l'enzyme.

Dans les enzymes à Mo-bis(PGD), le métal est lié à deux ligands tricycliques, appelées pyranoptérines. Celles-ci sont sous la forme d'un dinucléotide avec la guanine. Ces dinucléotides sont stabilisés dans la protéine en formant de nombreuses liaisons de type hydrogène et π -stacking avec la chaîne polypeptidique (Romão *et al.*, 1995).

Structure des ptérines dans les enzymes à molybdène et tungstène

La structure du cofacteur à molybdène a d'abord été étudiée de manière biochimique. L'identification de celui-ci reposait sur son extraction de la protéine par un traitement dénaturant. Plusieurs produits de dégradation ont été isolés et identifiés. La structure du cofacteur à molybdène déduite de ces travaux est une structure bicyclique, à l'état dihydro, c'est à dire apte à être oxydée à deux électrons (Gardlik et Rajagopalan, 1990). Les structures cristallographiques qui ont été résolues quelques années après ont donné à voir des pyranoptérines, tricycliques.

La ptérine n'est pas stable une fois extraite de la protéine. Elle se révèle très sensible à l'oxydation. En solution, le cycle pyrane s'ouvre, alors qu'il est stable dans la protéine.

Il est généralement accepté que les ptérines sont impliquées dans le chemin de transfert d'électrons. En effet, elles sont positionnées entre le centre donneur/accepteur d'électrons et le molybdène. De nombreux travaux ont visé à comprendre le rôle de la fonction dithiolène dans la réactivité du molybdène, sans s'intéresser plus au reste de la structure. Ce n'est que plus récemment que l'influence exercée par l'ensemble de la molécule sur la réactivité du centre à molybdène est devenu un sujet de recherche. En comparant un grand nombre de structures cristallographiques d'enzymes à molybdène, ROTHERY *et coll.* ont mis en lumière des différences dans la conformation du tricycle (qui n'est pas entièrement conjugué) dans le cristal, et en ont déduit un degré d'oxydation (tétrahydro ou dihydro). D'après leurs résultats,

dans les enzymes à Mo-bis(PGD), la pyranoptérine proximale est réduite à l'état tétrahydro, alors que la pyranoptérine distale est à l'état dihydro (Rothery *et al.*, 2012).

Plusieurs travaux de chimie organique et inorganique ont visé à synthétiser des analogues des pyranoptérines trouvées dans les enzymes à molybdène, et des analogues de sites actifs. Ces travaux, notamment ceux du groupe de BURGMAYER ont permis de montrer que la formation du cycle pyrane est réversible en solution (Williams *et al.*, 2012).

Le modèle que nous proposons pour l'activation de l'enzyme repose donc sur la réduction d'une ptérine initialement dihydro. Cette réduction serait couplée à la fermeture du cycle pyrane, bloquant ainsi irréversiblement la pyranoptérine dans une conformation stable. La présence d'une ptérine ouverte dans une enzyme à molybdène a été démontrée par cristallographie (Kloer *et al.*, 2006; Bertero *et al.*, 2003).

Cette transformation, qui n'implique pas la première sphère de coordination du Mo, modifie cependant le réseau de liaisons hydrogène autour du centre à molybdène, et voit une liaison covalente se former lors de la formation du cycle pyrane.

La figure 4.25 montre un mécanisme possible pour ce modèle. L'espèce *A* la ptérine dans une forme bicyclique, l'espèce *D* est l'état « physiologique » de la pyranoptérine. L'espèce *A* est supposée à l'état dihydro : la ptérine y est complètement conjuguée. La première réaction de ce mécanisme, supposée lente, est la cyclisation qui forme le noyau pyrane. Les espèces *B* et *C* sont deux tautomères possibles pour cet état tricyclique. La réduction de cet intermédiaire par deux électrons, deux protons, donne la forme tétrahydro du cofacteur. On remarque que, dans cette transformation, les atomes d'azote du noyau pyrazine deviennent *donneurs* de liaison hydrogène, alors qu'ils sont *accepteurs* dans l'état *A*. On peut donc penser que le réseau de liaisons hydrogène autour du cofacteur à molybdène se réorganise. Ceci pourrait avoir un effet en particulier sur le potentiel de réduction du Mo⁵⁺, et permettre alors sa réduction par le centre fer-soufre.

Il est possible d'envisager que la réduction de la ptérine ait lieu *avant* l'étape de cyclisation. Il ne nous est pas possible de trancher entre l'une ou l'autre de ces hypothèses. Nous ne sommes pas non plus en mesure de dire si le Mo^V est réduit avant ou après la transformation de la ptérine.

Ce modèle ne renseigne pas sur les mécanismes de *formation* de l'espèce initialement inactive. On peut penser qu'une ptérine oxydée est la conséquence de la surexpression de l'enzyme.

Ce modèle original veut mettre en lumière le rôle primordial que les ptérines peuvent avoir dans la transmission des électrons entre centre fer-soufre et molybdène. Il est remarquable de constater qu'une « simple » réduction est suffisante pour rendre irréversiblement active une enzyme inactive. Les signatures spectroscopiques observées avant et après l'activation par réduction sont étonnamment proches. La structure du centre à Mo^V est fixe tout au long des traitements que l'on applique à l'enzyme. La chimie des ptérines est riche et elle permet d'envisager diverses transformations *dans la protéine*.

Prouver ce mécanisme impliquerait de déterminer la structure d'une partie seulement des ptérines dans l'état « as prepared », et dans l'état activé par réduction.

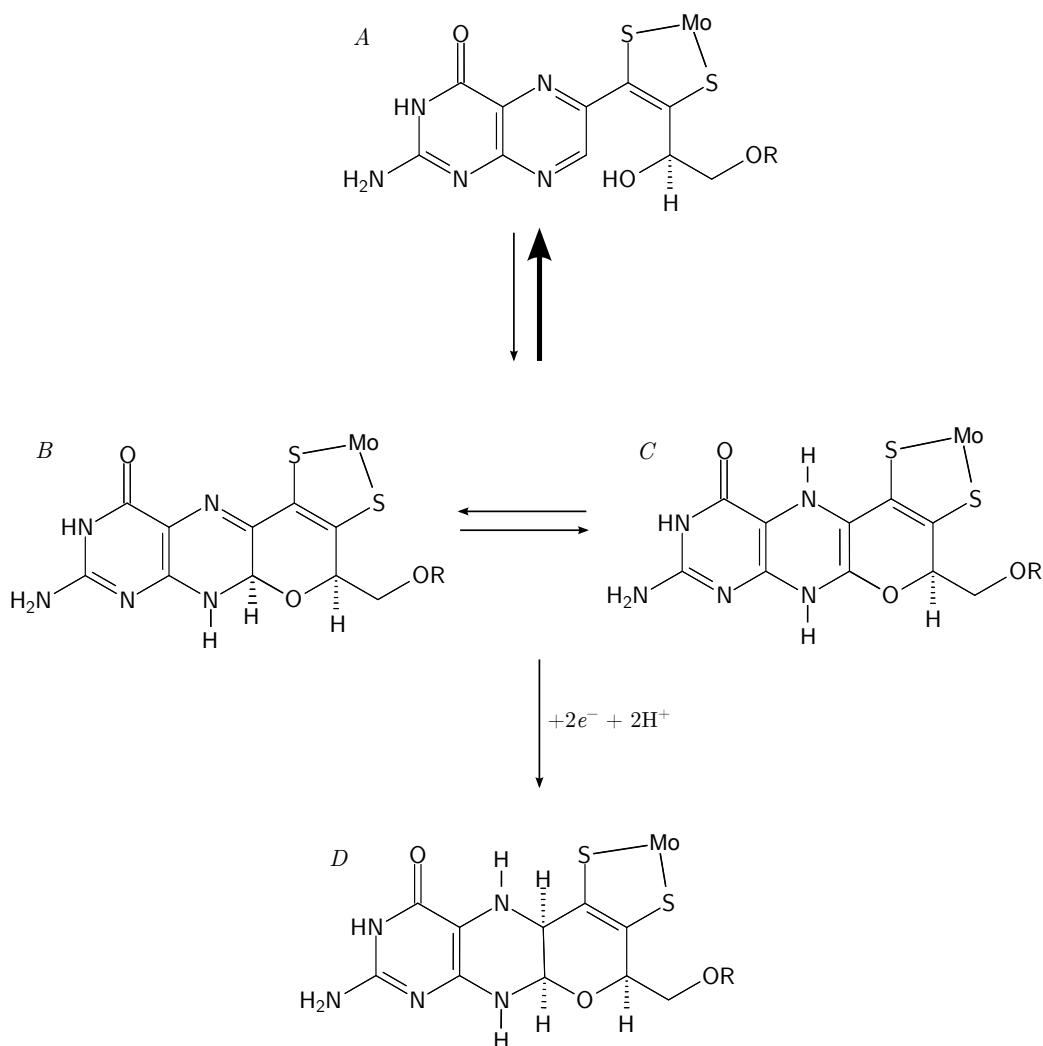


Figure 4.25 – Mécanisme de cyclisation couplée à la réduction de la ptérine proximale, proposé pour rendre compte de l'activation de l'espèce « high g resting » lors de sa première réduction. La première transformation correspond à la formation du cycle pyrane. La deuxième est une réduction du tricyclic à deux protons, deux électrons.

Les études par extraction du cofacteur, qui peuvent demander plusieurs dizaines milligrammes de protéine, ne sont pas envisageables sur NapA. Une structure cristallographique à haute résolution, couplée à la spectroscopie RPE, pourrait montrer une superposition de structures. Une approche plus réaliste consisterait à détecter le dichroïsme circulaire de la ptérine sans l'extraire de la protéine. Le principal obstacle à cette stratégie est le signal donné par les nombreux autres chromophores de la protéine.

Chapitre 5

Étude électrochimique de l'inhibition par le substrat

Sommaire

5.1	Introduction	166
5.2	Approche par échelons de concentration	168
5.2.1	Chronoampérogrammes bruts	169
5.2.2	Activité à l'état stationnaire	173
5.2.3	Régimes transitoires	178
5.2.4	Cohérence du modèle	179
5.3	Approche par échelons de potentiel	183
5.4	Discussion	203

5.1 Introduction

L'étude de NapAB par électrochimie directe, conduite au sein de l'équipe de Dynamique réactionnelle des enzymes redox multicentres, a mené à un modèle qui reproduit très bien les voltampérogrammes enregistrés avec de faibles concentrations en nitrate et un pH alcalin (7 à 9) (Bertrand *et al.*, 2007). Pour des concentrations en nitrate trop élevées, les voltampérogrammes présentent une hystérésis (*cf* figure 5.1). Pendant le scan vers les bas potentiels, la valeur absolue du courant est plus basse que sur le scan vers les hauts potentiels. L'enzyme est donc passée sous une forme inactive lorsqu'elle est portée à haut potentiel. Quand elle est portée à bas potentiel, elle se réactive. L'inactivation de l'enzyme signifie que des états n'appartenant pas au cycle catalytique s'accumulent, ce qui diminue la couverture électroactive effective, et donc le courant observé. La réactivation correspond au fait que ces états peuvent se convertir en une forme appartenant au cycle catalytique, et donc contribuer à l'augmentation du courant. La forme des voltampérogrammes de la figure 5.1 est stable dans le temps, à l'inverse du phénomène d'activation irréversible qui est présenté dans le chapitre 3. Les travaux effectués précédemment ont montré que cette (in)activation réversible est d'autant plus marquée que le pH est bas et la concentration en nitrate élevée.

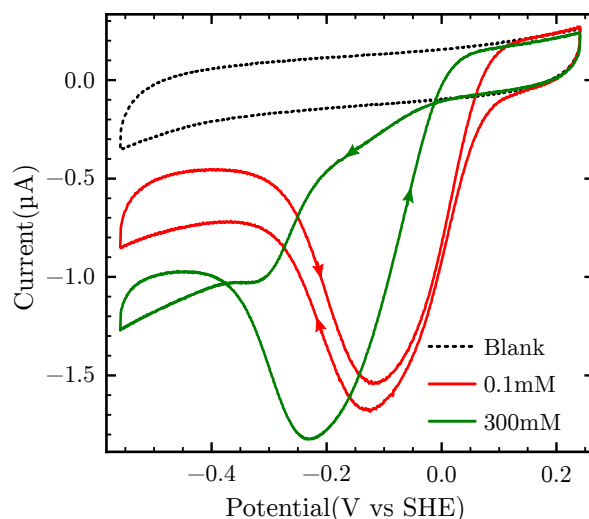


Figure 5.1 – Voltammogrammes obtenus avec NapAB et deux concentrations en nitrate différentes, pH=6 , 25 °C, 5 krpm

Les phases d’inactivation et d’activation sont lentes, durant plusieurs secondes, voire plusieurs dizaines de secondes, alors que un cycle catalytique est achevé en $\simeq 10^{-2}$ s. Les vitesses d’activation et d’inactivation ne dépendent pas de l’historique du système, mais uniquement du potentiel, de la concentration en nitrate et du pH. De plus, il a été montré que ceci n’est pas un artefact de l’électrochimie directe : le ralentissement du turnover a aussi été observé en solution, en utilisant un donneur d’électron de bas potentiel (le méthylviologène), et un donneur d’électrons de haut potentiel (le bleu de méthylène) (Fourmond *et al.*, 2010b).

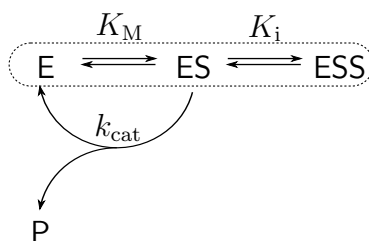


Schéma 5.1 – Modèle d’inhibition par le substrat

Pour modéliser l’activité de l’enzyme à un potentiel donné, un modèle avec inhibition par le substrat a été proposé antérieurement (schéma 5.1). Dans ce modèle, l’inhibition résulte de la fixation d’une deuxième molécule de substrat sur le complexe enzyme-substrat. L’espèce formée, notée ESS ne convertit pas le substrat : elle est inactive. Seul le complexe enzyme-substrat ES permet de former le produit et de régénérer l’enzyme libre E. La loi de vitesse qui en résulte a la forme suivante :

$$v = \frac{v_{\text{max}}}{1 + \frac{K_M}{[\text{NO}_3^-]} + \frac{[\text{NO}_3^-]}{K_i}} \quad (5.1)$$

où v_{max} est proportionnelle à k_{cat} .

La formation d'états inactifs de l'enzyme en présence de grandes quantités de nitrate peut remettre en question les interprétations d'expériences antérieures qui avaient pour but de piéger des espèces Mo^{V} en conditions de turnover. Ces expériences ont pour objectif de générer une espèce Mo^{V} appartenant au cycle catalytique, et de la caractériser par RPE. Dans la littérature sur les Nap de *D. desulfuricans* et *P. pantotrophus*, la concentration en nitrate utilisée pour ce type d'expérience est typiquement de 0,1 M, le donneur d'électrons étant en défaut. Les signaux obtenus sont soit de type « high g nitrate », soit de type « high g turnover » (Bennett *et al.*, 1994; Butler *et al.*, 1999; González *et al.*, 2006; Najmudin *et al.*, 2008). Il est donc possible que les espèces Mo^{V} observées soit des formes inhibées par le substrat. Ceci est problématique dans la mesure où c'est l'étude, par RPE, de la structure de ces espèces Mo^{V} qui est censée conduire à la compréhension du cycle catalytique.

L'étude qui est présentée ici a pour but d'obtenir des données cinétiques quantitatives sur l'activation et l'inactivation de l'enzyme en fonction des trois paramètres : $[\text{H}^+]$, $[\text{NO}_3^-]$ et potentiel, ce qui doit permettre de proposer un mécanisme d'inactivation et de savoir si les espèces Mo^{V} observées par RPE sont des formes bloquées par le substrat ou non.

Comme il n'est possible de faire varier qu'un seul paramètre à la fois, nos travaux ont consisté à mesurer l'activité lors d'une soudaine *variation de la concentration en nitrate* (échelons de concentration), ou bien lors d'une *variation du potentiel* (échelons de potentiel).

C'est cette deuxième approche qui s'est révélée la plus fructueuse. Certains résultats de la première approche ont cependant une importance cruciale pour mettre en œuvre la deuxième. Ce chapitre commence par une présentation détaillée des résultats obtenus par la première approche, puis inclut l'article que nous venons de soumettre, actuellement en cours d'évaluation, et qui décrit les résultats obtenus avec la deuxième approche.

5.2 Approche par échelons de concentration

Le principe de ces expériences consiste à mesurer l'activité de l'enzyme en fonction de $[\text{NO}_3^-]$.

Chaque expérience est faite avec un nouveau film d'enzymes. Une fois l'enzyme déposée sur l'électrode, le film est activé par un passage à bas potentiel (-460 mV) pendant 15 minutes et l'activation est détectée par chronoampérométrie (*cf* Chapitre 3). La cuve est alors rincée et remplie par un volume connu de tampon.

Le potentiel est ensuite fixé et le courant est enregistré au cours du temps à 10 Hz, alors que l'on ajoute des aliquots de solution concentrée de KNO_3 , de sorte que la concentration en nitrate double approximativement à chaque fois (échelle quasiment logarithmique).¹ On mesure ainsi l'activité pour une concentration en nitrate qui varie sur plusieurs ordres de grandeur : les premiers ajouts sont de l'ordre de $5 \mu\text{M}$, et on atteint environ $0,3 \text{ M}$ en fin d'expérience. La plupart des

1. Typiquement, on débute l'expérience avec 2 mL de tampon, auxquels on ajoute successivement 1 μL , 1 μL , 2 μL , 5 μL , 10 μL , 10 μL , 20 μL , 50 μL , à 10 mM puis 1 μL , 2 μL , 5 μL , 10 μL , 10 μL , 20 μL , 50 μL , 100 μL , à 1,0 M.

mesures ont été faites à pH=6. À un pH plus élevé, l'inhibition est moins marquée et le courant plus faible. Un pH plus bas rend le film plus instable. Nous présentons aussi les mesures faites à pH=8.

5.2.1 Chronoampérogrammes bruts

La figure 5.2 montre des enregistrements obtenus pour différents potentiels, de -400 mV à $+100\text{ mV}$, pH=6. Ces chronoampérogrammes ont globalement la même allure : le courant augmente puis diminue au fur et à mesure des additions de KNO_3 .

La présence de nitrate résiduel dans la cuve donne lieu à un courant non nul en début d'enregistrement (voir par exemple les enregistrements à -350 mV , -100 mV). Cette présence de nitrate (de l'ordre du μM) est due aux expériences précédentes. À la fin de chaque expérience, la concentration en nitrate dans la cuve atteint plus de $0,1\text{ M}$, soit 10^6 fois plus. Le rinçage de celle-ci entre deux expériences doit donc être minutieux. Malgré cela, il est possible que le nitrate à haute concentration diffuse dans le bras de référence par le capillaire, puis rétrodiffuse un fois le tampon renouvelé. Il aurait donc fallu démonter l'électrode de référence après chaque expérience pour éviter cette contamination, ce qui n'a pas toujours été fait.

Lors des premiers ajouts, le courant de réduction *augmente quasi-instantanément*. Les pointes de courant observées à l'instant de l'ajout correspondent à une plus forte concentration en nitrate localisée sur l'électrode, celle-ci s'homogénéisant par la suite (flèche sur le chronoampérogramme à -50 mV) L'activité devient alors stationnaire. La saturation progressive en substrat conduit à un courant limite : ajouter du substrat ne donne presque aucune variation d'activité (astérisque).

Lors des additions suivantes, on observe que le courant *diminue progressivement* vers une nouvelle valeur stationnaire après chaque injection. L'expérience est poursuivie en attendant chaque fois l'établissement d'un courant stationnaire.

L'activité à l'état stationnaire diminue à mesure que l'on augmente la concentration en substrat. L'expérience prend fin lorsque l'activité est nulle ou lorsque la concentration en nitrate ne peut plus être augmentée (aux environs de $0,3\text{ M}$).

Perte irréversible de l'enzyme Les enregistrements montrent également d'importantes variations du courant qui sont irréversibles. Cette perte apparemment irréversible peut résulter de la désorption du film d'enzyme, ou de l'inactivation irréversible d'enzymes adsorbées. C'est l'*irréversibilité* et la lenteur de ce phénomène qui le distinguent du phénomène d'inactivation *réversible* que nous voulons étudier. La force ionique de la solution est multipliée par quatre pendant l'expérience (il y a initialement $0,1\text{ M}$ de NaCl). Mais l'examen des données de la figure 5.5, par exemple, montre que la perte irréversible apparaît pour des concentrations voisines de 1 mM (pour $t \simeq 500\text{ s}$). La force ionique de la solution ne peut donc pas être invoquée pour expliquer la désorption de l'enzyme. Comme cette perte irréversible est peu reproductible, nous n'avons pas cherché à l'étudier précisément.

Sur les données de la figure 5.2, un bruit électrique permanent existe, mais il n'est pas visible avec l'échelle utilisée ici. Les « parasites » et pics qui sont visibles sur certains enregistrements sont souvent dus à un défaut dans le bras de référence.

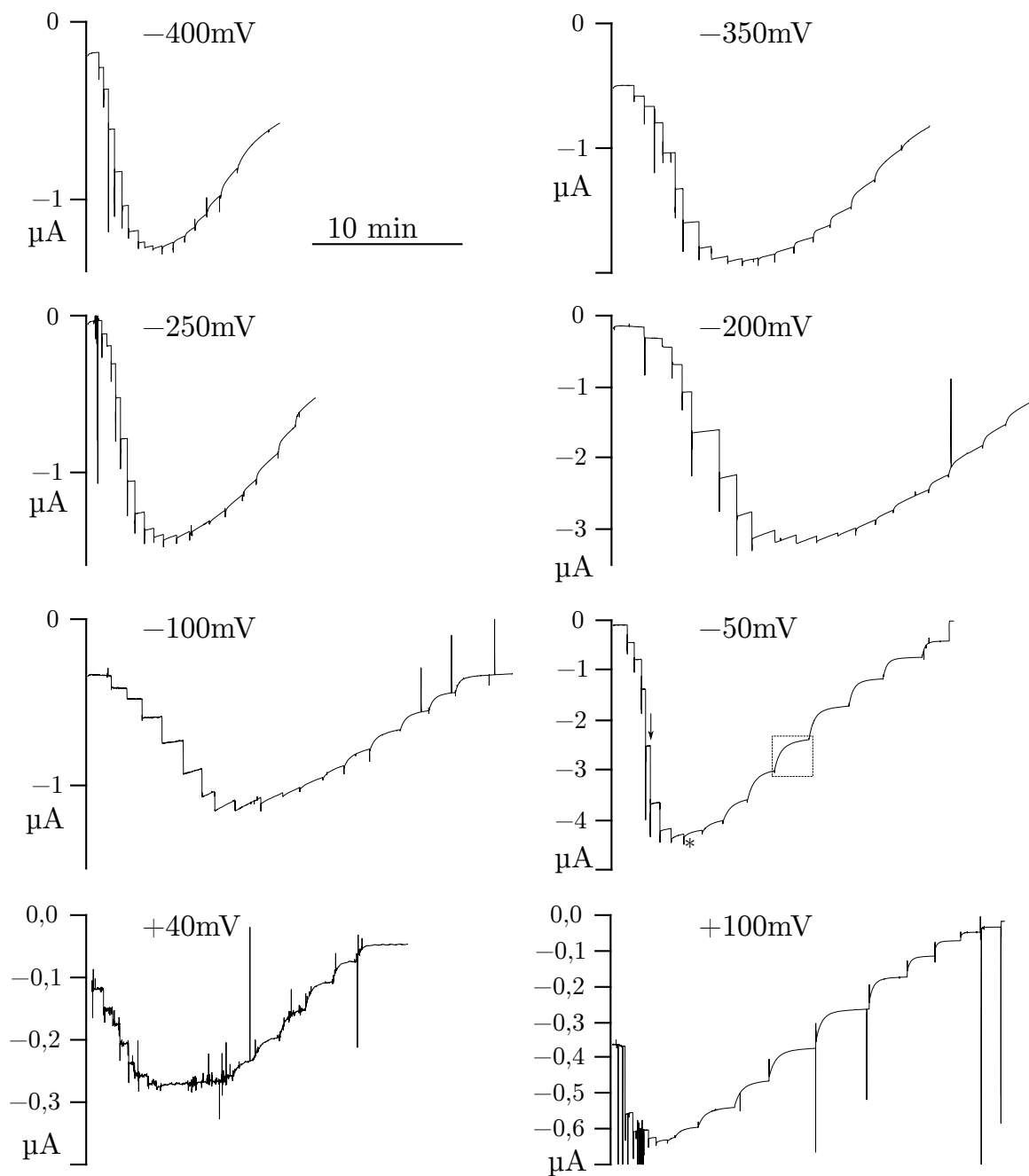


Figure 5.2 – Chronoampérogrammes enregistrés pour des échelons de substrat à différents potentiels, NapAB, pH 6, 25 °C

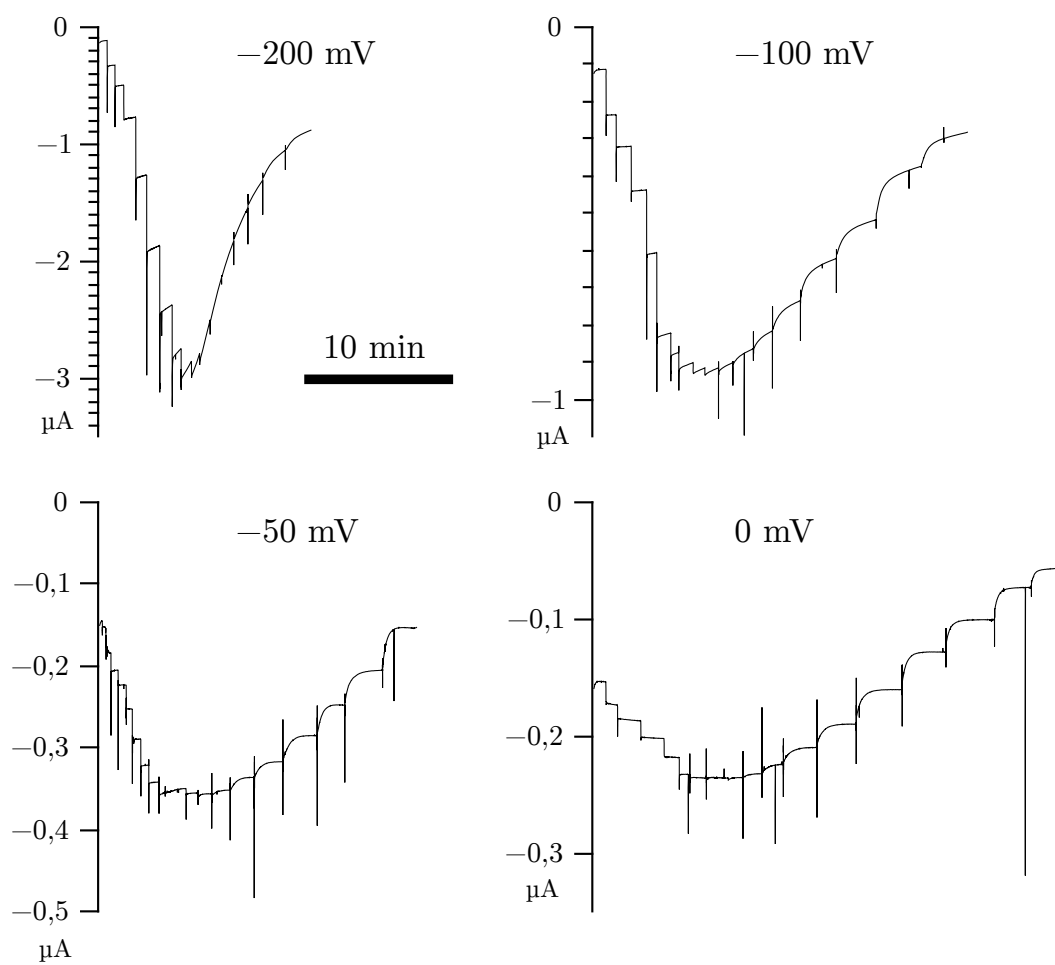


Figure 5.3 – Chronoampérogrammes obtenus à $\text{pH}=8$, NapAB, 25°C

Les enregistrements obtenus à pH=8 (figure 5.3) sont similaires à ceux obtenus à pH=6. On voit qu'à -200 mV, aucune inhibition n'est présente, la diminution du courant étant due à la perte irréversible du film.

L'inhibition par le nitrate résulte de la fixation d'un ion nitrate sur une ou plusieurs espèces actives du cycle catalytique. Cet effet n'est pas observé avec l'ion chlorure et l'ion sulfate. La seule diminution d'activité ($t = 300$ s ou 550 s, figure 5.4) résulte de la dilution. L'ion chlorate a un effet inhibiteur, qui peut être inversé par une plus grande concentration en nitrate (figure 5.4).

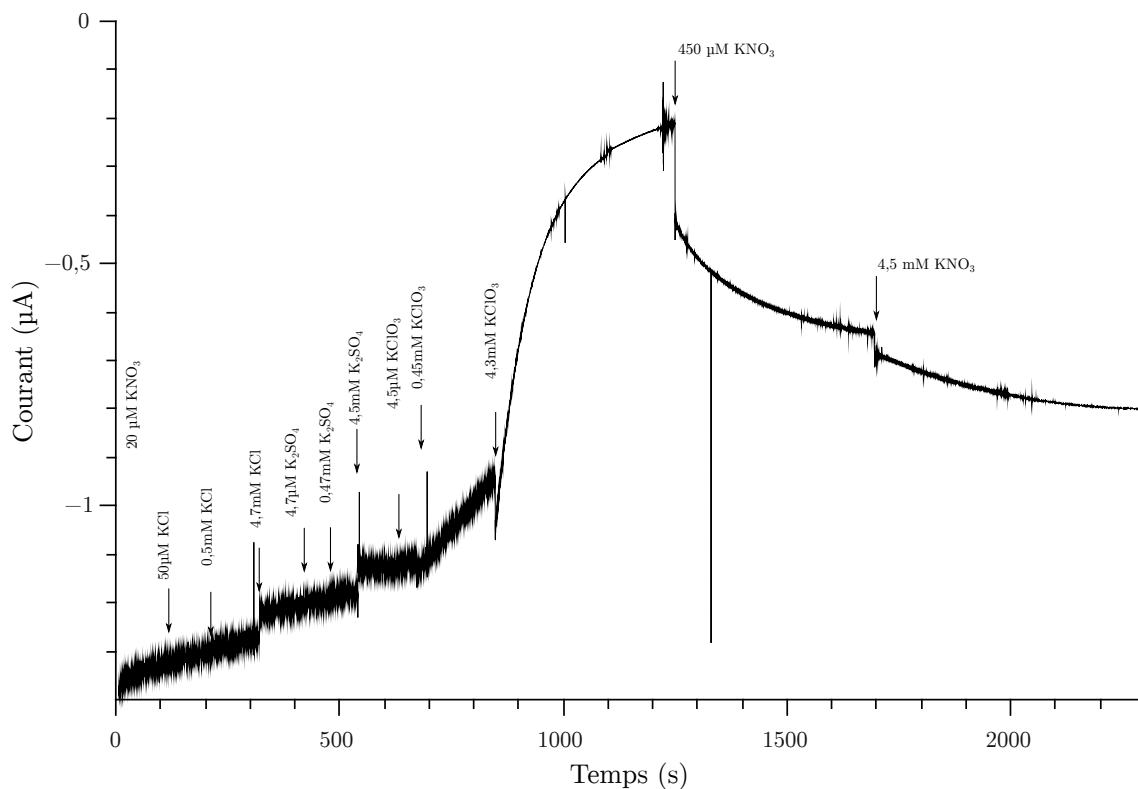


Figure 5.4 – Effet de l'ajout d'anions sur l'activité de NapAB suivi par chronoampérométrie. -200 mV, pH=6, 25 °C

5.2.2 Activité à l'état stationnaire

Les enregistrements sont d'abord corrigés pour la perte irréversible du film, par morceaux, en ajustant une droite sur la partie linéaire de chaque phase, puis en combinant celles-ci dans une fonction $g(t)$ continue, qui est égale à la fraction électroactive :

$$\Gamma(t) = \Gamma_0 g(t) \quad (5.2)$$

Le courant réel $i(t)$ est divisé par $g(t)$ pour donner un courant *corrigé* $i'(t)$, qui est proportionnel à la vitesse de turnover (le résultat de cette procédure est illustré sur la figure 5.5). Ce courant est celui que l'on mesurerait en l'absence de désactivation du film. On relève alors les valeurs de $i'(t)$ à l'état stationnaire, et celles-ci sont reportées en fonction de s , concentration en nitrate *ajouté*. La concentration initiale en substrat s_0 étant inconnue, elle est traitée comme un paramètre ajustable.

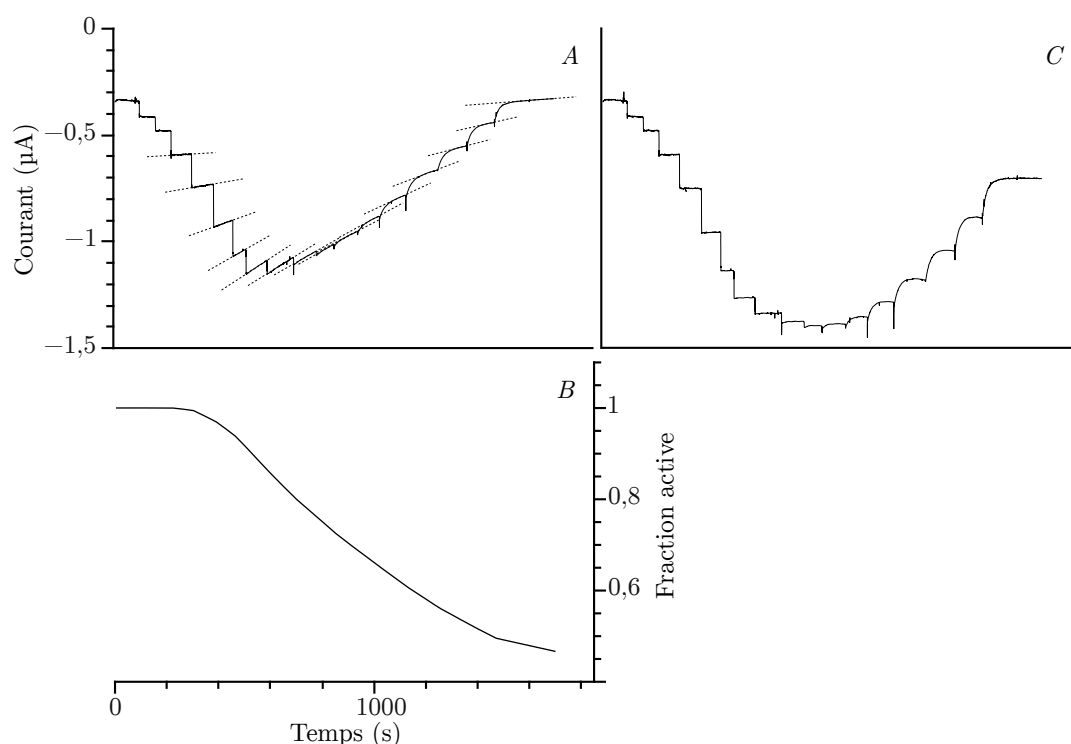


Figure 5.5 – Illustration de la marche suivie pour la correction des données pour la désactivation du film. *A* : Courant réel $i(t)$ et pentes obtenues par régression linéaire sur chaque fin de palier; NapAB, -100 mV, pH=6, 25 °C; *B* : Fonction $g(t)$, fraction électroactive (valant 1 en $t = 0$); *C* : Courant corrigé, résultat de la division $i(t)/g(t)$; (Fourmond *et al.*, 2009b)

L'équation ajustée aux données est donc :

$$i'(s) = \frac{i'_{\max}}{1 + \frac{K_M}{s + s_0} + \frac{s + s_0}{K_i}} \quad (5.3)$$

On ajuste ainsi s_0 , i_{\max} , K_M , et K_i . Dans le cas où s_0 est proche voire supérieure à la constante de MICHAELIS, celle-ci ne peut être déterminée avec précision. La

grande différence (facteur $\simeq 10^3$) entre la constante de MICHAELIS et la constante d'inhibition permet toujours de déterminer celle-ci, sauf si sa valeur est trop élevée

La figure 5.6, p. 175, montre l'activité à l'état stationnaire en fonction de la concentration en nitrate *ajoutée* pour huit potentiels d'électrode, de -400 mV à $+100$ mV, pH=6, 25°C , qui correspondent aux chronoampérogrammes bruts montrés sur la figure 5.2. La figure 5.7 montre les données obtenues à pH=8, à partir des enregistrements de la figure 5.3, p. 171.

Les deux constantes K_M et K_i suivent la même tendance : elles diminuent quand le potentiel augmente. À -400 mV, on détermine une constante de MICHAELIS de $(55 \pm 5) \mu\text{M}$, et la constante d'inhibition est trop grande pour être mesurée de façon fiable. La diminution du courant à haute concentration en nitrate montre cependant la présence d'une inactivation. *A contrario*, à $+100$ mV c'est la constante de MICHAELIS qui est trop petite ($\leq 1 \mu\text{M}$) pour être déterminée, et la constante d'inhibition vaut $(3,2 \pm 0,2) \text{mM}$.

Au vu de l'équation (5.3), le courant s'annule à une concentration en nitrate infinie. L'accord entre les données et l'équation (5.3) montre qu'il n'est pas nécessaire d'introduire de paramètre supplémentaire pour modéliser celles-ci. En particulier, on retiendra pour la suite que les espèces inhibées par le substrat n'ont pas d'activité résiduelle. En effet, dans le cas contraire, le courant tendrait vers une limite non nulle à haute concentration en substrat.

Constante de MICHAELIS

Les études de NapAB par voltampérométrie cyclique, effectuées auparavant au laboratoire, ont permis de modéliser convenablement le comportement de l'enzyme à pH alcalin et à la limite des faibles concentrations en substrat. L'enzyme se comporte de façon michaelienne, la constante de MICHAELIS dépendant du potentiel. Les valeurs obtenues ici à pH=6 sont en accord avec les données publiées (Bertrand *et al.*, 2007).

Constante d'inhibition

La répétition de ces expériences, à pH=6 et pH=8 permet d'observer l'influence du potentiel sur la constante d'inhibition, représentée sur la figure 5.9, p. 177.

L'observation de l'inhibition par le substrat est plus délicate à pH=8. En effet, la vague catalytique est décalée de 60 mV vers les bas potentiels. Enfin, l'inhibition est moins marquée, les constantes K_i étant environ huit fois plus grandes qu'à pH=6. Toutes ces contraintes réduisent la gamme de potentiels sur laquelle il est possible d'observer une activité et de déterminer une constante d'inhibition. La tendance vis-à-vis du potentiel est toutefois la même qu'à pH=6.

Les droites correspondent à l'équation :

$$K_i(E) = K_i^0 \exp\left(\frac{n\mathcal{F}}{RT}E\right) \quad (5.4)$$

avec $n = 1/2$, le préfacteur K_i^0 étant ajusté. Ceci traduit le fait que l'inhibition résulte de la fixation de deux ions nitrate couplée à l'oxydation du site actif à un électron.

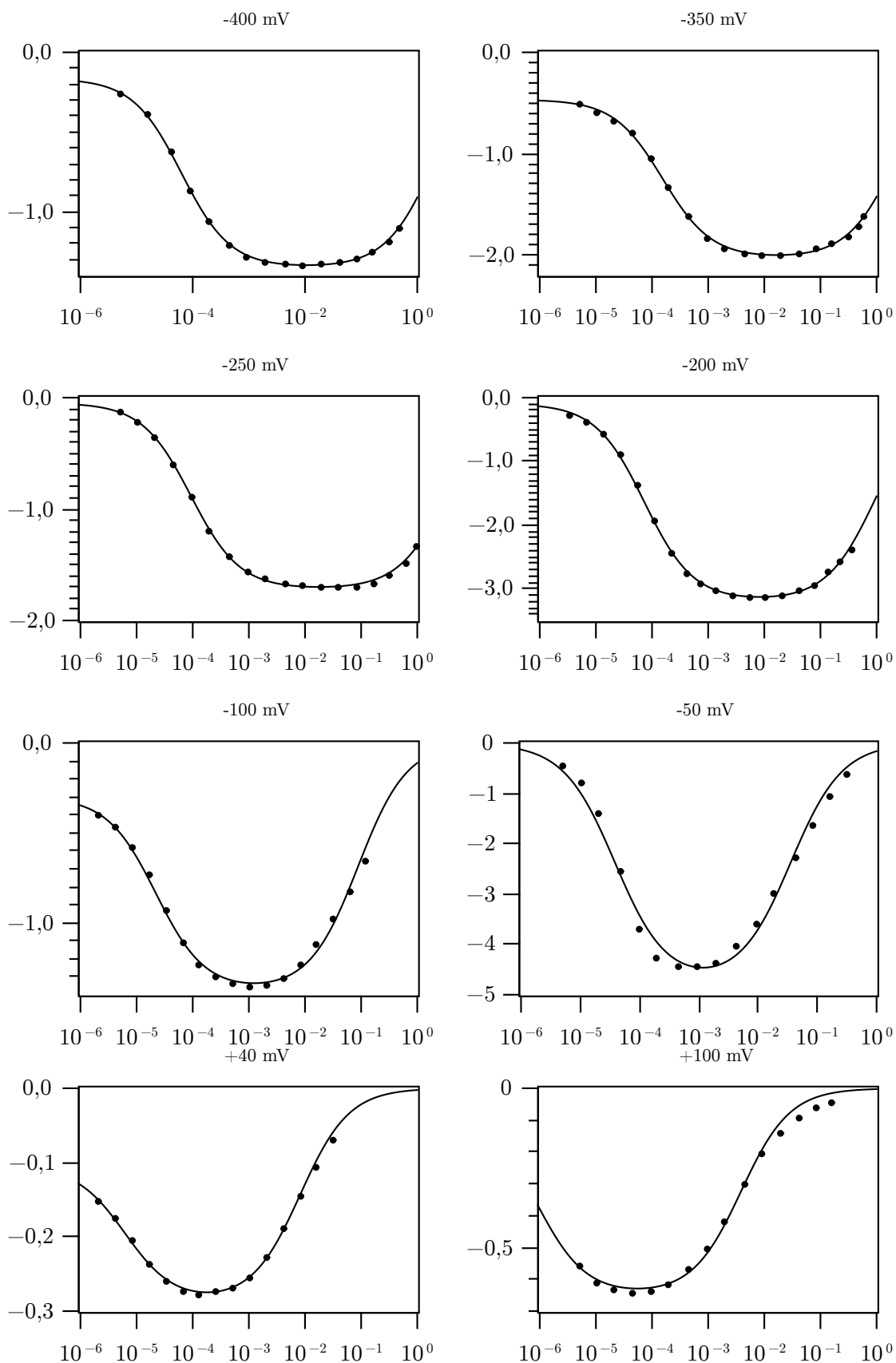


Figure 5.6 – Courant corrigé à l'état stationnaire (points, en μA) en fonction de la quantité de nitrate ajoutée, en mol L^{-1} . Les courbes correspondent à l'équation (5.3) ajustée aux points expérimentaux.

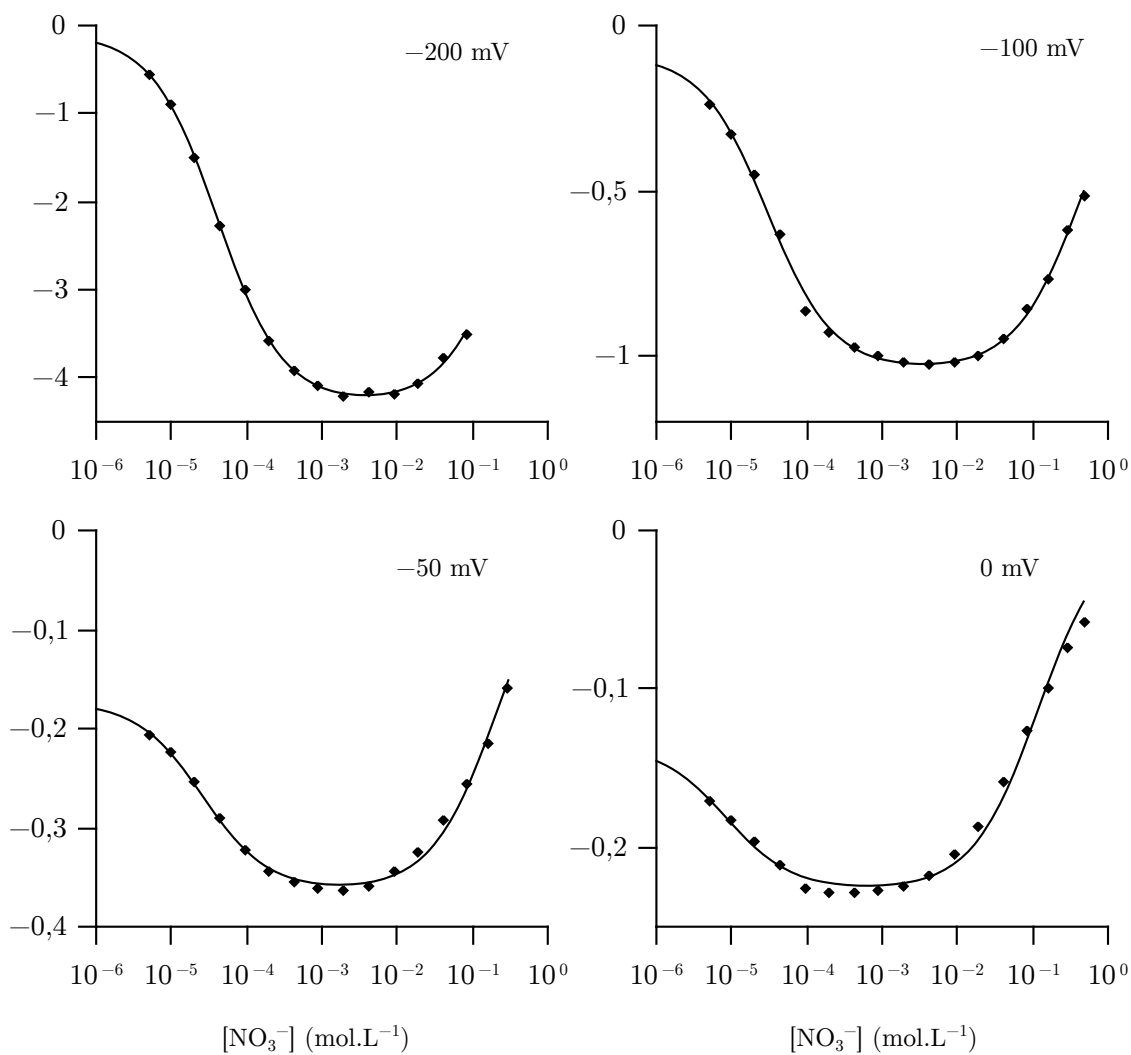


Figure 5.7 – Courant corrigé à l'état stationnaire (points, en μA) en fonction de la quantité de nitrate *ajoutée*, en mol.L^{-1} , à $\text{pH}=8$, 25°C . Les courbes correspondent à l'équation (5.3) ajustée aux points expérimentaux.

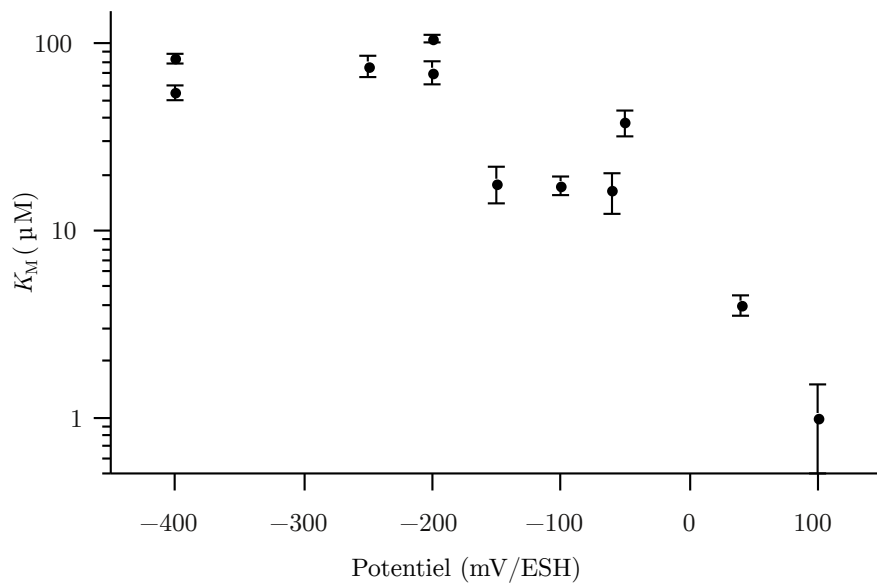


Figure 5.8 – Constantes de MICHAELIS déterminées par saturation progressive en substrat. Les barres représentent l'incertitude de l'ajustement.

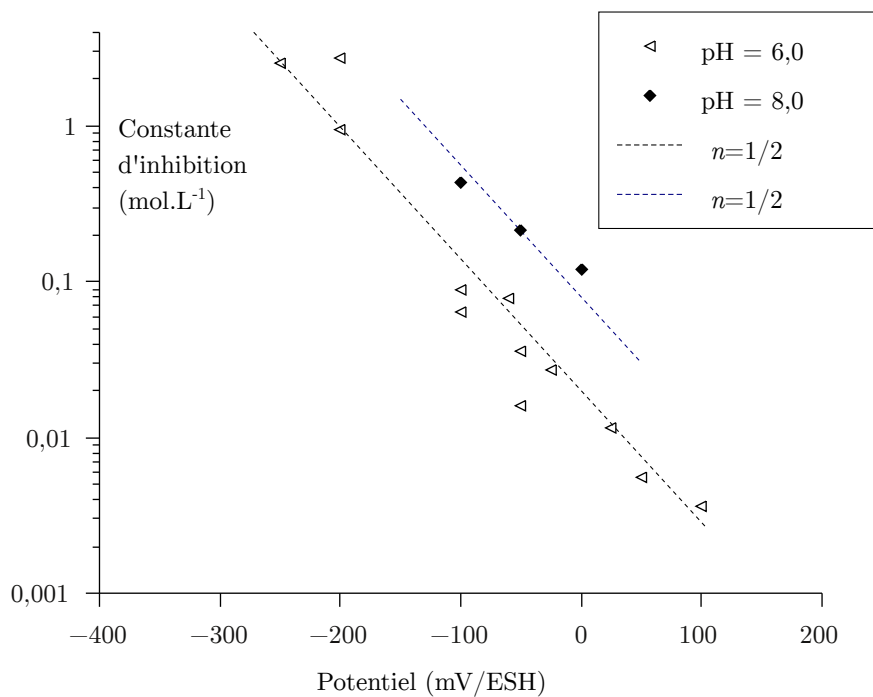


Figure 5.9 – Constantes d'inhibition déterminées par l'activité à l'état stationnaire corrigée.

5.2.3 Régimes transitoires

Les chronoampérogrammes contiennent plus d'informations que les seules constantes K_M et K_i . La présence de régimes transitoires (*cf* figure 5.2 et 5.3) montre que l'inhibition n'est pas instantanée, et met chaque fois plusieurs dizaines de secondes à s'établir. La cinétique d'inhibition doit nous permettre de comprendre le mécanisme sous-jacent.

Les régimes transitoires observés après addition de nitrate peuvent être reproduits par une loi monoexponentielle. Ceci peut se déduire d'un modèle simple, où les formes actives de l'enzyme et les formes inactives s'interconvertissent selon des étapes élémentaires (schéma 5.2) :

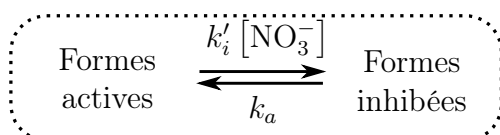


Schéma 5.2 – Modèle d'inhibition par le substrat *via* une étape élémentaire de fixation d'un ion NO_3^- . L'activité est proportionnelle à la fraction de formes actives.

Notons les espèces actives par A , et les espèces inactives I , et posons :

$$k_i = k'_i [\text{NO}_3^-] \quad (5.5)$$

$$\Gamma = [A] + [I] = \text{Constante} \quad (5.6)$$

Le modèle du schéma 5.2 donne :

$$\frac{d[A]}{dt} = -k_i[A] + k_a[I] \quad (5.7)$$

$$\frac{d[A]}{dt} = -k_i[A] + k_a(\Gamma - [A]) \quad (5.8)$$

$$\frac{d[A]}{dt} + (k_i + k_a)[A] = k_a\Gamma \quad (5.9)$$

L'intégration de l'équation (5.9) donne :

$$[A](t) = \frac{k_a\Gamma}{k_i + k_a} + [A](t_0) \exp(-(k_i + k_a)(t - t_0)) \quad (5.10)$$

La vitesse apparente d'inactivation s'écrit donc :

$$k_{\text{app}} = k_i + k_a \quad (5.11)$$

$$k_{\text{app}} = k'_i [\text{NO}_3^-] + k_a \quad (5.12)$$

Une transitoire peut donc être modélisée par l'expression générale ;

$$i(t) = i(t_0)e^{-k_{\text{app}}t} + i_\infty \quad (5.13)$$

La figure 5.10 montre l'ajustement de l'expression (5.13) sur une transitoire du chronoampérogramme à -50 mV (cadre pointillé sur la figure 5.2, p. 170). Le temps

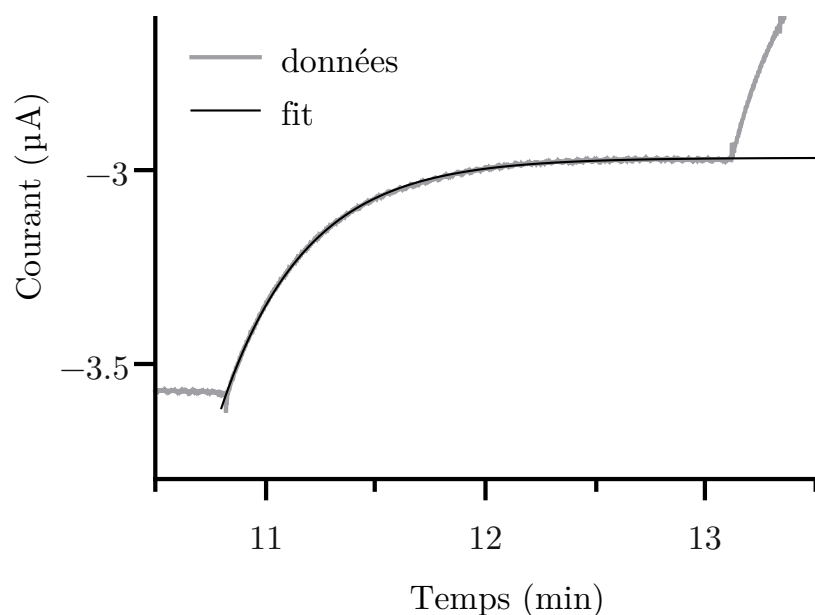


Figure 5.10 – Ajustement de l’expression (5.13) sur une transitoire à -50 mV, $\text{pH}=6$

caractéristique de ces transitoires est variable, mais reste globalement du même ordre de grandeur, entre 5 et 35 s, et ce à bas potentiel comme à haut potentiel.

Les régimes transitoires sont modélisés par une loi de premier ordre, dont on dérive une constante de vitesse de premier ordre apparent k_{app} . Les valeurs obtenues par ajustements non linéaires sur les enregistrements de la figure 5.2, à $\text{pH}=6$, sont reportées sur la figure 5.11 (p. 180), et sur la figure 5.12 (p. 181) pour les transitoires à $\text{pH}=8$.

5.2.4 Cohérence du modèle

Selon le modèle du schéma 5.2 (p. 178), la fraction active a une concentration à l’état stationnaire égale à

$$[A] = \frac{k_a}{k_a + k_i} \Gamma \quad (5.14)$$

$$[A] = \frac{1}{1 + \frac{k_i}{k_a}} \Gamma \quad (5.15)$$

Comme le courant est proportionnel à la fraction de forme active $[A]$, on doit avoir la relation suivante entre les constantes de vitesse et la constante d’inhibition en identifiant (5.1) et (5.15) :

$$K_i = \frac{k_a}{k'_i} \quad (5.16)$$

Les trois constantes qui apparaissent dans cette relation sont obtenues de manière indépendante : la constante d’inhibition est obtenue par la mesure de la valeur du courant (figures 5.6, 5.7 et 5.9), alors que k_a et k'_i sont déterminées en caractérisant les régimes transitoires (figure 5.10, 5.11 et 5.12). Les constantes d’inhibition mesurées selon les deux méthodes devraient être égales.

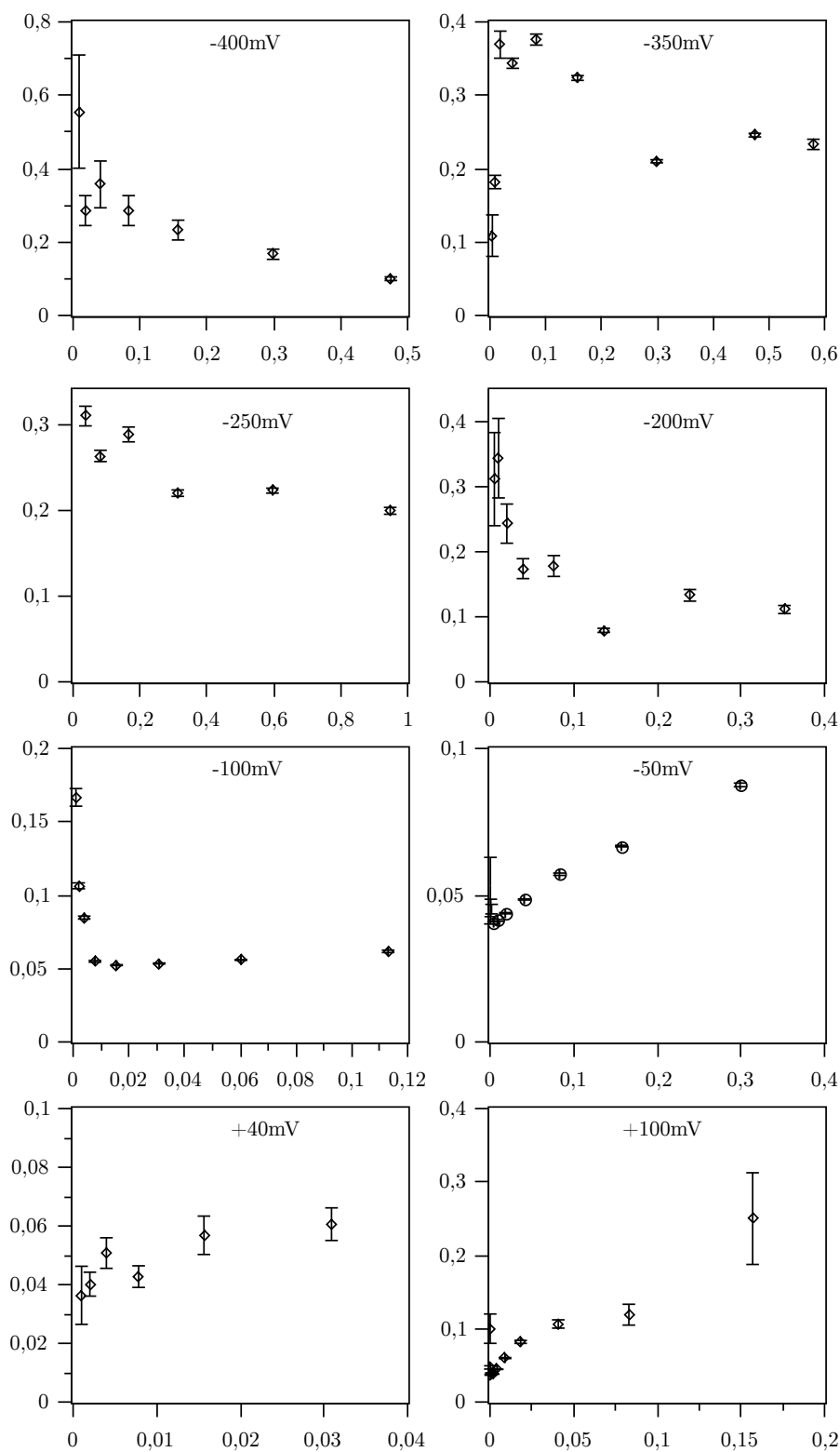


Figure 5.11 – Vitesse apparente k_{app} des régimes transitoires observés sur les chronoampérogrammes à pH=6 de la figure 5.2 en s^{-1} , en fonction de $[NO_3^-]$ (en $mol\ l^{-1}$). Les barres verticales représentent l'incertitude sur l'ajustement non linéaire. NB : Les échelles horizontales sont variables.

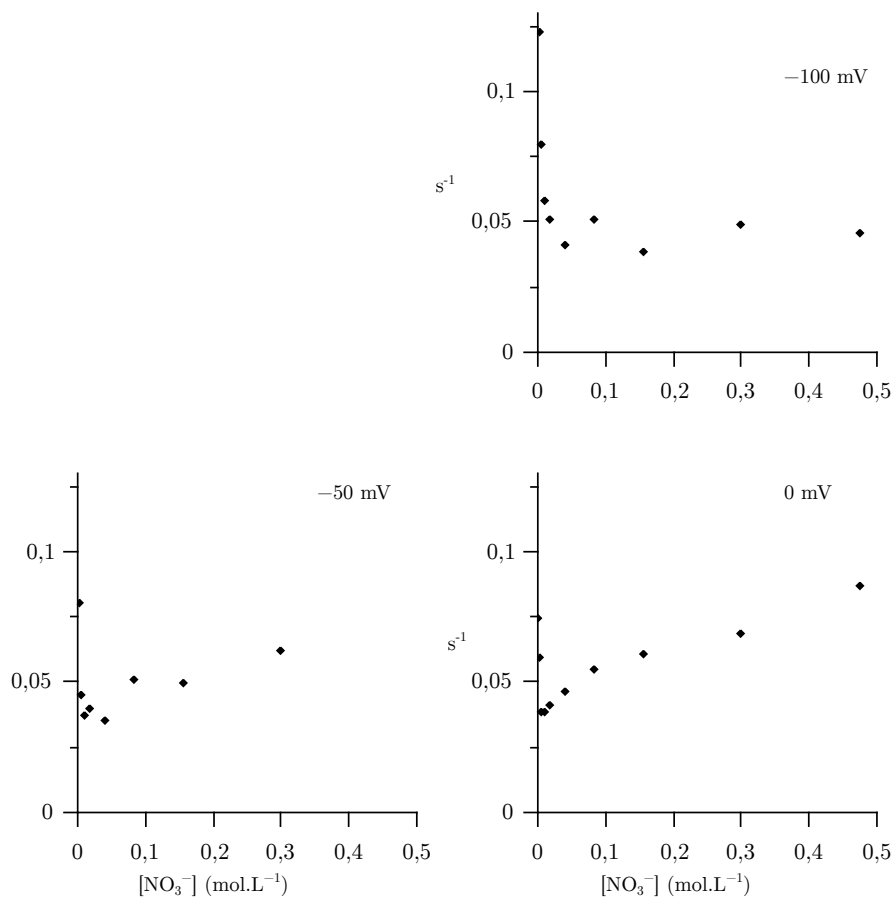


Figure 5.12 – Vitesse apparente k_{app} (en s^{-1}) des transitoires observées sur les enregistrements à $pH=8$ de la figure 5.3, en fonction de la concentration en nitrate (en $mol.L^{-1}$).

L'équation (5.12) prédit que la constante k_{app} est une fonction affine croissante de la concentration en substrat. On voit clairement sur la figure 5.11 que le comportement observé n'est pas celui attendu. À bas potentiel k_{app} est une fonction décroissante de $[\text{NO}_3^-]$. À plus haut potentiel, la constante apparente est décroissante puis croissante avec $[\text{NO}_3^-]$.

Nous avons tenté malgré tout de corrélérer la constante d'inhibition avec le rapport des constantes de vitesse en procédant à une régression linéaire sur la partie croissante des graphes de la figure 5.11. Ce faisant, nous avons exclu les données à bas potentiel (< -100 mV), et les points à faible concentration en nitrate.

La figure 5.13 montre la tentative de corrélation entre ces deux données. Si une corrélation existe, les deux grandeurs ne sont pas égales. Le modèle à deux état est donc trop simple pour rendre compte de la cinétique d'inhibition. L'inhibition et l'activation ne procèdent donc pas par une étape élémentaire de fixation ou libération d'un ion nitrate.

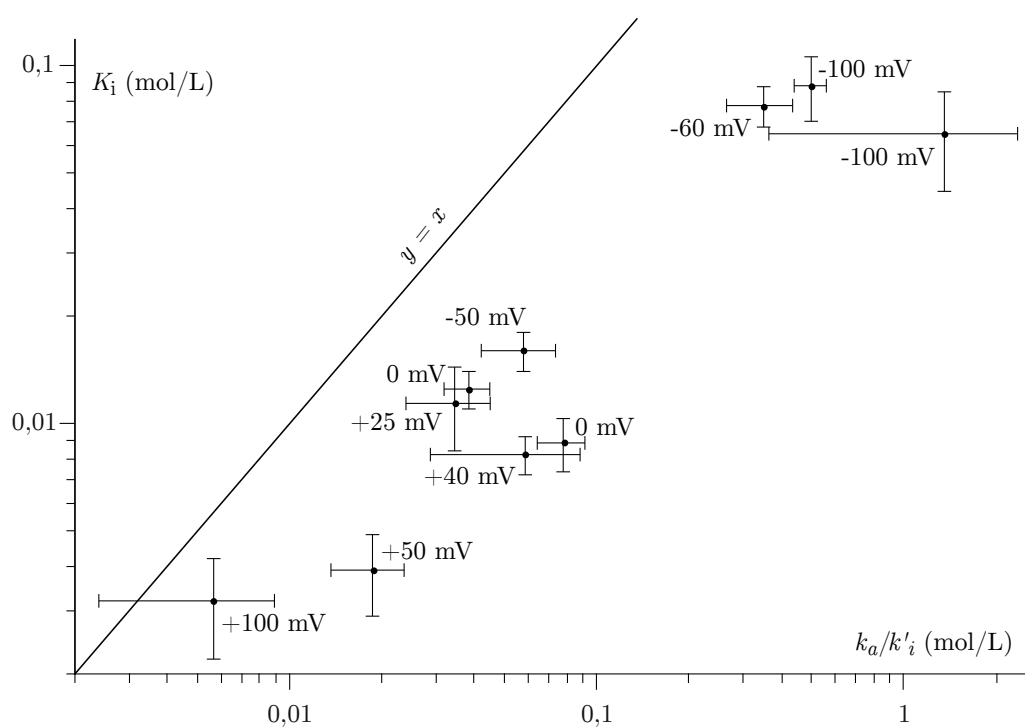


Figure 5.13 – Représentation de la constante d'inhibition en fonction du rapport k_a/k'_i pour plusieurs jeux de données, et première bissectrice. Les barres représentent les incertitudes dans la détermination des grandeurs par ajustement non linéaire

5.3 Approche par échelons de potentiel

L'approche précédente nous a permis de montrer que l'enzyme est inhibée par son substrat, l'activité tendant vers zéro à concentration infinie, et ce d'autant plus facilement que le pH est bas et le potentiel est élevé. La cinétique d'inactivation est cependant complexe, et l'inactivation ne résulte vraisemblablement pas d'une étape élémentaire de fixation d'un ion nitrate. D'autres transformations gouvernent la vitesse d'inactivation, notamment à bas potentiel. La modélisation des données de la figure 5.11 demande un modèle plus élaboré. Vu le petit nombre de points expérimentaux et l'incertitude associée, il serait difficile de décider si un mécanisme en particulier est le seul valable avec les données dont nous disposons grâce à cette approche.

Face à cette difficulté intrinsèque, nous avons opté pour une autre approche, basée non sur des échelons de concentration, mais sur des échelons de potentiel. Cette stratégie présente plusieurs avantages : le contrôle du potentiel est très précis, et plus reproductible que la concentration en nitrate obtenue par mélange, et elle permet d'inactiver et de réactiver l'enzyme *ad libitum* en variant le potentiel de l'électrode. Un inconvénient de cette manipulation est l'apparition du courant capacitif, qui peut être corrigé en soustrayant un signal de contrôle enregistré dans les mêmes conditions, mais sans enzyme adsorbée.

L'article qui suit reprend les résultats importants de la première approche, et présente les données obtenues par échelons de substrat. Celles-ci nous donnent une bien meilleure précision sur la variation des constantes k_a et k_i (le modèle de travail du schéma 5.2 est toujours utilisé) avec le potentiel. Ces variations révèlent les transitions redox que subissent les formes actives et inactives, ce que ne permettait pas les données issues de la première approche. Ceci permet de cartographier la fraction d'espèces Mo^{V} à l'état stationnaire, en fonction du potentiel et de la concentration en nitrate, sur une plage allant de -500 mV à $+100$ mV et de 1 mM à 100 mM. De plus, les nouvelles données montrent elles aussi que les constantes de vitesse ne varient pas de manière simple avec la concentration en nitrate.

Article soumis

Kinetics of substrate inhibition of
periplasmic nitrate reductase

Kinetics of substrate inhibition of periplasmic nitrate reductase

Julien G. J. Jacques,[†] Bénédicte Burlat,[†] Pascal Arnoux,[‡] Monique Sabaty,[‡]
Bruno Guigliarelli,[†] Christophe Léger,[†] David Pignol,[‡] and Vincent Fourmond^{*,†}

Aix-Marseille Université, CNRS, BIP UMR 7281, 31 chemin J. Aiguier, F-13402 Marseille cedex 20, France, and Aix-Marseille Université, CNRS, CEA, DSV/IBEB/LBC UMR 7265, F-13108 Saint Paul Lez Durance, France

E-mail: vincent.fourmond@imm.cnrs.fr

Abstract

Periplasmic nitrate reductase catalyzes the reduction of nitrate into nitrite using a mononuclear molybdenum cofactor that has nearly the same structure in all enzymes of the DMSO reductase family. In previous electrochemical investigations, we found that the enzyme exists in several inactive states, some of which may have been previously isolated and mistaken for catalytic intermediates. In particular, the so-called “high-*g* resting” EPR signature seen in the as-prepared form of the enzyme is that of a dead-end, inactive species that enters the catalytic cycle upon reduction; in addition, the enzyme slowly and reversibly inactivates when exposed to high concentrations of nitrate. Here, we study the kinetics of substrate inhibition and their dependence on electrode potential and substrate concentration to learn about the properties of the active and inactive forms of the enzyme. We conclude that the substrate-inhibited enzyme never significantly accumulates in the EPR-active Mo(+V) state. This conclusion is relevant to spectroscopic investigations where attempts are made to trap a Mo(+V) catalytic intermediate using high concentrations of nitrate.

*To whom correspondence should be addressed

[†]AMU/BIP

[‡]AMU/CEA

Introduction

Enzymes of the DMSO reductase family use a mononuclear Mo-bis(pyranopterin guanine dinucleotide) cofactor (MoCo) to catalyze a variety of reactions, mostly transfers of oxo groups (1). The dissimilatory nitrate reductase (NapAB) from *Rhodobacter sphaeroides* (*Rs*) belongs to the DMSO reductase family and catalyses the reduction of nitrate into nitrite. It is a 108 kDa, periplasmic, heterodimer which houses a [4Fe-4S] cluster in close proximity to the MoCo, and two surface-exposed, *c*-type hemes (2). The coordination sphere of the Mo ion consists of the four thiolates ligands of two molybdopterin, a sulfur atom from a cysteine that attaches the MoCo to the protein backbone, and a sixth inorganic ligand, proposed to be oxygen or sulfur (2–5). Functional information on nitrate reductase has been obtained mostly from EPR spectroscopy, but this technique is not always conclusive because the EPR signature of the MoCo is heterogeneous, and which signals correspond to species that are actually involved in the catalytic cycle is not entirely clear yet (1).

The heterogeneity of the MoCo is also revealed in direct electrochemistry (or “protein film voltammetry”, PFV) experiments (6). In this technique, *Rs* NapAB is adsorbed onto a rotating pyrolytic graphite edge electrode and the enzyme molecules receive electrons directly from the electrode. When substrate is present

in solution, the measured current is proportional to turnover rate. The electrode is spun at a high rate to ensure that there is no limitation by the diffusion of substrate towards the electrode. The changes in turnover rate in response to changes in experimental conditions (electrode potential, substrate concentration) are instantly detected as changes in current, which makes it very easy to monitor changes in activity resulting from activation or inactivation.

Previously, we used site-directed mutagenesis, EPR and PFV to demonstrate that the MoCo in *Rs* periplasmic nitrate reductase (NapAB) is subject to a slow, irreversible reductive activation (7). The amount of initially inactive form quantitatively correlates with the amount of the so-called “Mo(V) high-*g* resting” EPR signal. More recently, we have proposed that the inactive form features an open, oxidized molybdopterin, which is closed upon reduction (8).

The subject of this paper is another slow activation/inactivation process, which is most easily detected in cyclic voltammetry experiments, where the electrode potential is repeatedly swept upward and downward to monitor the current/potential response. Figure 1 shows cyclic voltammograms of *Rs* NapAB recorded at pH 6 and two concentrations of nitrate. According to the conventions we use, a reductive current is negative; therefore, the more negative the current, the higher the turnover rate.

At low nitrate concentration (red trace in fig 1), the forward and backward current traces are merely offset by the electrode charging current (dotted black trace). This indicates that catalysis is in a steady-state at each value of the electrode potential. The peculiar wave shape, with a maximum of activity under moderately reducing conditions and a decrease at lower potential, has already been observed with NapAB (from *Rs* (9, 10) and *Paracoccus pantotrophus* (11)), and other members of the DMSO reductase family (such as membrane-bound DMSO reductase (12), and respiratory nitrate reductase Nar (13)). Regarding NapAB, a comparison between PFV and solution assays demonstrated that the fact that the enzyme is most active under moderately reducing conditions is

not an artifact from the electrochemical experiment (14). The decrease in activity at higher driving force has been attributed to a change in the reaction pathway under more reducing conditions (9, 10).

At higher nitrate concentrations (green trace in fig 1), the voltammogram shows a clear hysteresis: at a given potential, the absolute value of the current, and therefore the activity, is much lower on the sweep towards low potential than on the sweep towards high potential (the arrows in fig 1 indicate the direction of the sweeps). This hysteresis reveals a potential-dependent process that is slow on the voltammetric time scale (recording the complete voltammogram takes 80 s).

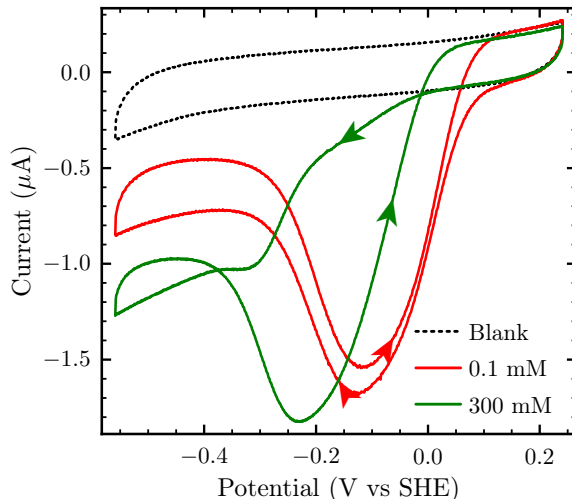


Figure 1: Cyclic voltammograms of *Rs* NapAB adsorbed onto a rotating PGE electrode. Conditions: pH 6, T = 25°C, electrode rotation rate $\omega = 5$ krpm, nitrate concentration as indicated. The dotted black line is a blank voltammogram recorded in the absence of enzyme.

In a previous work, we showed that this hysteresis stems from a slow potential-dependent inhibition by substrate (15). In this paper, we characterize in detail the kinetics of inhibition. The information we obtain allows us to compute the proportion of substrate-inhibited species as a function of substrate concentration and potential, and the sub-fraction of inactive species that are paramagnetic. This analysis will prove crucial to determine if a given spectroscopic signature obtained in turnover conditions is likely

to be that of an active species.

Results

Thermodynamics of substrate inhibition: the potential dependence of the inhibition constant

Regarding NapAB, we have shown before (15) that the turnover rate tends to zero at high nitrate concentration, as predicted by the following rate law (15, 16):

$$i = \frac{i_{\max}}{1 + K_m/s + s/K_i} \quad (1)$$

where i_{\max} is the maximum current that would be obtained at infinite substrate concentration if there were no inhibition, K_m is the Michaelis constant and K_i the inhibition constant.

The mechanism that gives substrate inhibition in Nap will be discussed below.

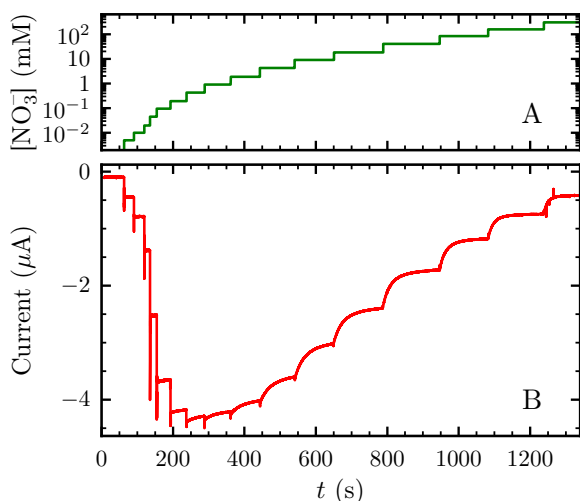


Figure 2: Chronoamperometric experiment in which an electrode with a film of adsorbed *Rs* NapAB is poised at a constant potential (here -50 mV vs SHE), and various volumes of stock solutions of nitrate are added into the buffer step-by-step. Panel A shows the nitrate concentration and panel B the resulting catalytic current.

It is possible to determine both K_m and the inhibition constant K_i using protein film

voltammetry, in an experiment where the electrode potential is held constant and the substrate concentration is increased in a step-wise fashion by repeatedly adding aliquots of a concentrated solution of nitrate. Figure 2 shows the result of such an experiment, with in panel A the concentration of nitrate as a function of time, and panel B the resulting current. When we carried out this experiment, we waited long enough between each injection for the current to reach its asymptotic value. This steady-state current is plotted against substrate concentration in figure 3.

The result in figure 3 is consistent with a steady-state current that asymptotically decreases to 0 at infinite nitrate concentration, which demonstrates that the nitrate-inhibited form has no residual activity; equation (1) is therefore appropriate to fit the data (dotted line).

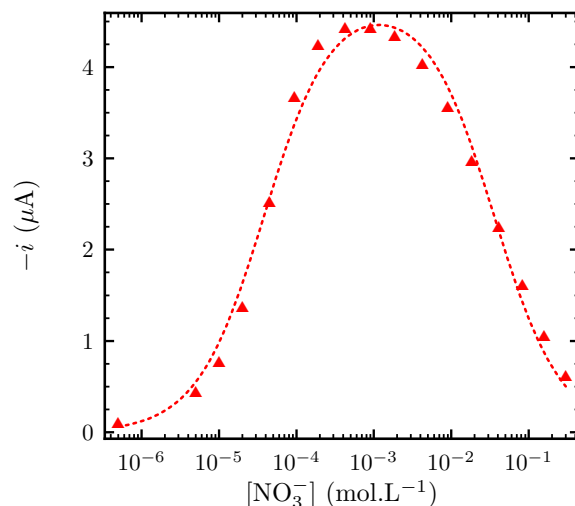


Figure 3: Steady-state currents of figure 2 as a function of nitrate concentration. Film loss was corrected using the method we described earlier (17). The dotted line shows a fit of equation (1) to the data, with parameters $i_{\lim} = -4.7$ μA , $K_m = 38$ μM and $K_i = 36$ mM. Note the log scale for abscissa. Conditions: pH 6, 25°C , potential: -50 mV.

We repeated the experiment shown in fig 2 for different values of the electrode potential, analyzed the results with equation (1), and plotted the values of K_i against potential in figure 4. Consistent with our earlier findings that inac-

tivation occurs at high potentials (15), fig 4 shows that K_i decreases as the potential increases. In fact, K_i depends on potential in a way consistent with a reaction involving one electron and two nitrate molecules (that is, one decade of K_i per 120 mV). K_i increases only weakly with pH (less than expected for a reaction that would involve 1 proton and two nitrate molecules), which suggests that inhibition is not coupled to a protonation.

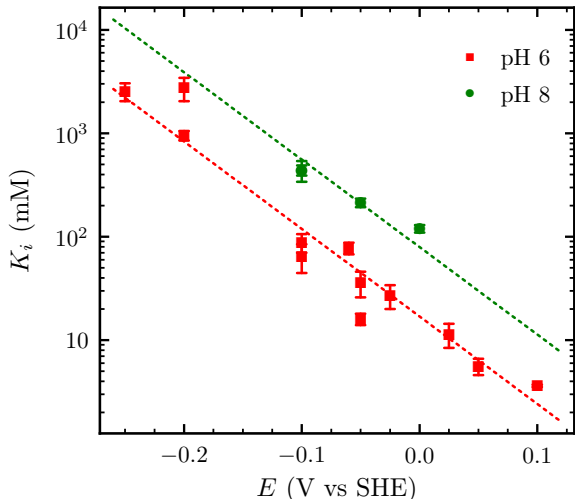


Figure 4: K_i as a function of potential for two pH values (as indicated). The dashed lines correspond to a slope of 2 nitrate molecules per electron. Temperature 25 °C.

Figure 2 shows that at high substrate concentration (*i.e.* when substrate inhibition occurs) the current relaxes slowly to its steady state value after each addition of nitrate; in contrast, at low substrate concentration, a steady-state is obtained within the mixing time (< 1 s). The slow relaxation at high substrate concentration is consistent with the presence of hysteresis in cyclic voltammograms (figure 1), and it reveals a transformation that occurs on the voltammetric time scale (≈ 100 s). This inactivation process is sufficiently slow that it is possible to measure the rate constants of the interconversion between the active (A) and inactive (I) species:



The knowledge of the apparent inactivation

($k_i(E)$) and reactivation ($k_a(E)$) rate constants is valuable to understand the chemistry of the process. Indeed, the dependence of the rate constants on potential and substrate concentration can reveal the properties of the active and inactive forms as well as the involvement of substrate molecules in the transformation between active and inactive forms (18, 19), as illustrated below.

Study of transients: a strategy based on potential steps, rather than concentration steps

Two approaches can be used to measure the (in)activation rate constants and their dependence on potential and nitrate concentration.

(i) At a given potential, add substrate in a stepwise fashion (as in figure 2), fit an exponential decay to the transients, combine the values of the time constant and the magnitude of the exponential variation (using eqs. 3-6 below) to obtain the rate constants as a function of nitrate for a given potential; repeat for different values of the electrode potential.

(ii) At a fixed concentration, change the potential in a stepwise fashion to monitor the ensuing inactivation or reactivation and deduce the rate constants by fitting an exponential decay to the transients; repeat for several values of the potential to obtain the potential dependence of the rate constants; repeat for different values of the concentration.

We found that the latter approach (potential steps at a fixed concentration) is the more reliable for several reasons: (i) it is experimentally difficult to repeat the same concentration steps, due to the intrinsic experimental errors in the concentrations (whereas the electrode potential can be set accurately); (ii) the injection of substrate and homogenization of the buffer is not an instantaneous process, even with an electrode spinning at a high rate, and uncontrolled variations in the rates of injection and mixing may affect the transients; (iii) one can only add substrate, not remove it, which means that one can only obtain transients in the direction of inactivation whereas repeatedly going

forward and back between experimental conditions improves the precision with which the rate constants are determined. We therefore chose to perform potential steps at fixed concentration of nitrate to determine the (in)activation rate constants.

Determination of the inactivation/reactivation rate constants from chronoamperometric experiments

We used a five-step procedure, as illustrated in figure 5A. We start with a step at low potential, E_0 , long enough to ensure that the enzyme is fully active; we step to an intermediate potential E_1 and then to a higher potential E_2 , back to E_1 and E_0 . The values of E_1 and E_2 are chosen to ensure that the magnitudes of the inactivation at E_1 and the ensuing reactivation at E_2 are significant (20). We could fit the current traces using equations derived from the above model (eq. 2). The fraction of active form on a step starting at t_0 is given by:

$$A(t) = (A_0 - A_\infty) \times \exp(-k_{\text{tot}}(t - t_0)) + A_\infty \quad (3)$$

where A_0 is the initial active fraction at $t = t_0$,

$$k_{\text{tot}} = k_i(E) + k_a(E) \quad (4)$$

and

$$A_\infty = \frac{k_a(E)}{k_i(E) + k_a(E)} \quad (5)$$

The current is given by :

$$i(t) = i(E) \times A(t) \times \exp[-k_{\text{loss}}(E) \times (t - t_0)] \quad (6)$$

The rightmost term accounts for the irreversible desorption of enzymes from the electrode, assuming that it proceeds with a potential-dependent first order rate constant $k_{\text{loss}}(E)$. As in our previous works (18, 19), we assume that the fractions of active and inactive forms do not instantly change after a potential step: the instantaneous change in current is due to the change in $i(E)$ alone, and the fraction of active enzyme is a continuous function of time

(*i.e.* there is no instantaneous inactivation or reactivation). This continuity makes it possible to compute the parameter A_0 in equation (3), which is necessary for the unambiguous determination of k_i and k_a . With this assumption, we are also able to follow the evolution of the fraction of active enzyme as the enzyme (in)activates in response to potential steps (figure 5B).

We analyzed a number of chronoamperometric traces such as those in figure 5 by adjusting in each case the values of 4 parameters at each potential: $k_i(E)$, $k_a(E)$, $i(E)$ and $k_{\text{loss}}(E)$. This model nicely reproduces the data, as attested by the quality of the fit in fig. 5C and D.

A single potential step experiment can be interpreted to obtain the values of k_i and k_a for two potentials (E_1 and E_2) and one concentration of nitrate. Repeating these experiments for different values of the potentials and nitrate concentration (1-100 mM) gave the data points shown in fig. 6 (at 10 and 50 mM nitrate) and supplementary fig. S2 (all nitrate concentrations).

The rather large errors on the values of the (in)activation rate constants come from two different experimental limitations. First, at high potential, the current is small, making it difficult to monitor the (in)activation. Second, when either k_i or k_a is more than two orders of magnitude smaller than the other, determining its value requires the reliable detection of changes in activity of less than one percent. The value of k_i is often less accurate than k_a , since the former is always the smaller, except at high potential where the small current impairs the reliable determination of both k_i and k_a .

The inactive species exists under three redox states

We first focus on the activation rate constants (green markers in figure 6). It is important to understand that they report on the *inactive* forms of the enzyme. It is indeed easy to realize that if, for example, we were to observe that the rate of *inactivation* at very low potential is zero, this would imply that the reduced *active* enzyme does not inactivate. In general, study-

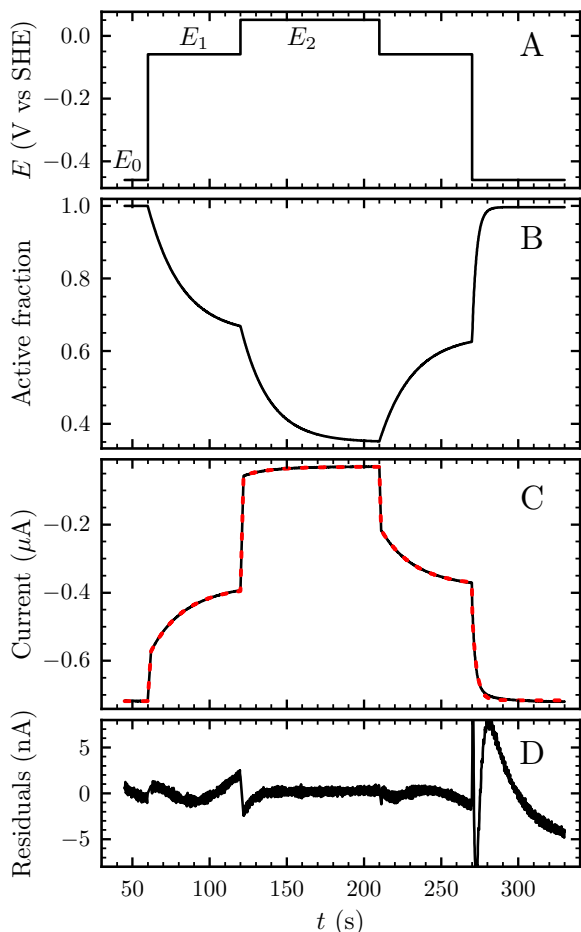


Figure 5: Chronoamperometric experiments in which an electrode coated with a film of R_s Na-pAB is poised at different potentials in step-wise fashion (panel A). The resulting (blank-subtracted) current is plotted in panel C as a black line, along with a fit using the kinetic model (dashed red line, see text). Panel D shows the residuals of the fit, while panel B shows evolution of the fraction of active form during the course of the experiment. Conditions: 25°C, pH 6, 10 mM NO_3^- .

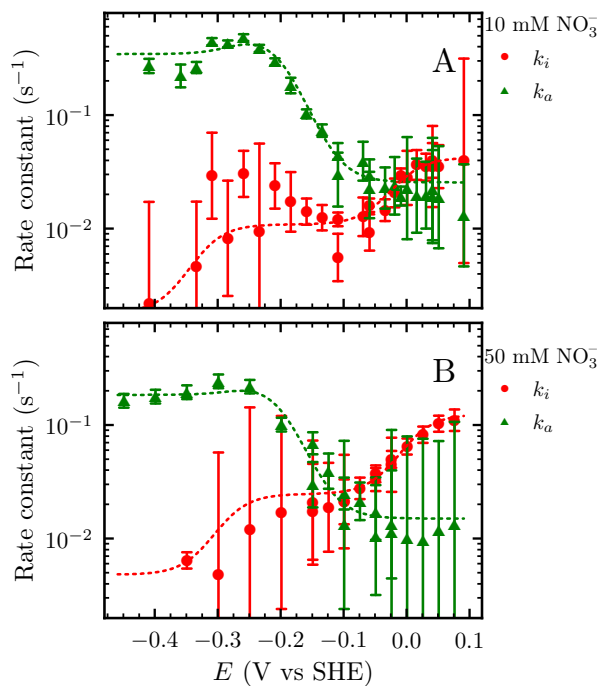


Figure 6: Rate constants of activation (green) and inactivation (red) as a function of potential for two different nitrate concentrations: 10 mM (panel A) and 50 mM (panel B). Dashed lines are the global fits described later in text, whose parameters are plotted in figure 7. Conditions: 25°C, pH 6.

ing the dependence of the rate constant of a reaction on experimental conditions informs on the properties of the reactants of the reaction, not on the products.

Figure 6 shows that the activation rate constant depends on potential; this indicates that the *inactive* forms exist under distinct redox states. The bell-shaped dependence on potential further suggests that the inactive species exists in three redox states: an oxidized form that reactivates slowly (cf the plateau at high potential), an intermediate form that reactivates quickly (peak at intermediate potential) and a fully reduced form that reactivates a bit more slowly than the intermediate form (low potential plateau). We shall assume that these three forms correspond to the three redox states of the Mo ion (VI, V and IV).

The dependence of k_a on potential can be well described by equation (7), which is derived under the assumption that all three redox states are in equilibrium, so that the apparent reactivation rate constant is the average of the rate constants of reactivation for each redox state of the inactive species weighted by their respective equilibrium fraction (Scheme 1):

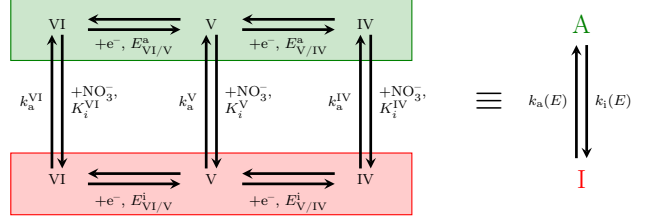
$$k_a(E) = \frac{k_a^{IV} + e_2^i k_a^V + e_1^i e_2^i k_a^{VI}}{1 + e_2^i + e_1^i e_2^i} \quad (7)$$

In this equation k_{VI}^a (resp. k_V^a and k_{IV}^a) are the reactivation rate constants of the most oxidized inactive state (resp intermediate, most reduced), and e_1^i and e_2^i are given by:

$$e_1^i = \exp [F(E - E_{VI/V}^i)/RT] \quad (8)$$

$$e_2^i = \exp [F(E - E_{V/IV}^i)/RT] \quad (9)$$

where we introduced $E_{VI/V}^i$ (resp. $E_{V/IV}^i$), the potential of the VI/V (resp. V/IV) couple of the inactive form.



Scheme 1: Kinetic scheme for the inactivation/reactivation process. With the assumption that the different redox states are in equilibrium, the system is equivalent to just two forms that interconvert with apparent rate constants k_a and k_i (rightmost scheme).

The two redox transitions of the active form can be detected from the dependence on E of the inactivation rate constants

Figure 6 shows that the inactivation rate constant also depends on potential, which is consistent with the fact that the active form must exist in different redox states within the catalytic cycle. The inactivation rate constant changes in a sigmoidal manner as a function of potential in the high potential region. A marked decrease can also be seen at lower potential, hence two redox transitions can be resolved from the potential dependence of the inactivation rate constant, which can be modelled using the following equation (see scheme 1 above):

$$k_i(E) = \frac{k_i^{IV} + e_2^a k_i^V + e_1^a e_2^a k_i^{VI}}{1 + e_2^a + e_1^a e_2^a} \quad (10)$$

where k_i^{VI} (resp. k_i^V and k_i^{IV}) are the inactivation rate constants of the most oxidized active state (resp intermediate, most reduced), and e_1^a and e_2^a are given by:

$$e_1^a = \exp [F(E - E_{VI/V}^a)/RT] \quad (11)$$

$$e_2^a = \exp [F(E - E_{V/IV}^a)/RT] \quad (12)$$

where we introduced $E_{VI/V}^a$ (resp. $E_{V/IV}^a$), the apparent potential of the VI/V (resp. V/IV) couple of the active form.

The effect of nitrate

We analyzed the dependence on electrode potential and nitrate concentration of the data in figs 6 and S2 using equations 7 and 10. However, instead of adjusting ten parameters at each concentration of nitrate (three activation rate constants, three inactivation rate constants and four redox potentials), we constrained the model as follows.

(i) Regarding the kinetics of the interconversion between the various inhibited species, we chose to adjust the three rate constants of activation and three inhibition constants K_i^{IV} , K_i^V and K_i^{VI} defined by the relation:

$$k_i^{VI} = \frac{[\text{NO}_3^-]}{K_i^{VI}} \times k_a^{VI} \quad (13)$$

(and similar equations for the V and IV redox states). The important difference between these two sets of parameters (six rate constants *versus* three rate constants plus three inhibition constants) is that the inhibition constants are independent of the concentration of substrate. Therefore, instead of having to adjust six independent parameters for each substrate concentration, we now have three kinetic parameters for each concentration and a single set of three thermodynamic constants that should take the same values for all concentrations.

(ii) The number of parameters can be further reduced by assuming that the potentials of the redox couples of the inactive are independent of nitrate concentration, as expected if all redox states of the inactive form have the same number of nitrate molecules bound.

Using these constraints, we fitted the model to the 380 data points (eight distinct concentrations of nitrate spanning two orders of magnitude) adjusting 45 parameters: 5 parameters for each concentration (3 activation rate constants, k_a^{IV} , k_a^V , k_a^{VI} and 2 redox potentials of the active form) and 5 parameters that are independent of concentration, and whose values are therefore identical for all data sets (the 3 equilibrium constants K_i^{VI} , K_i^V and K_i^{IV} , and the two redox potentials of the inactive form). While this corresponds to almost half as many parameters than for an unconstrained fit (10 pa-

rameters for each of the 8 concentrations), the fits were nearly as good, with the residuals increasing by only 15%. The dashed lines in figures 6 and S2 are the results of such constrained fits. The resulting parameters are shown in figure 7 and in table 1. Rate constants as a function of potential for all concentrations along with the global fit are shown in supplementary figure S2.

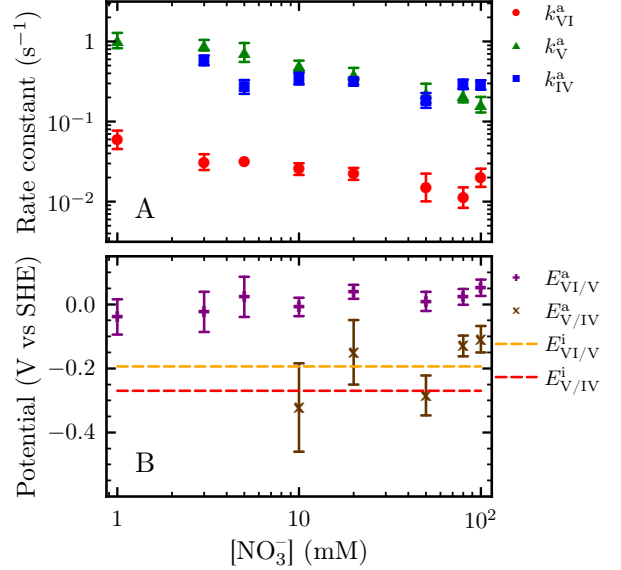


Figure 7: Results of the global fit of (in)activation rate constants described in text. Panel A shows the dependence on nitrate concentration of the activation rate constants, while Panel B shows the dependence on nitrate concentration of the potentials of the redox transitions of the active and inactive forms. Equilibrium constants are given in table 1. The error bars represent the 5% linearized confidence interval of the fit.

The values in table 1 show that the affinity for the inhibiting nitrate is two order of magnitude greater for the VI state than for the V and IV states, the latter having comparable affinities. In other words, quantitative inhibition is more pronounced when the inactive form is in the VI state. The potentials of the inactive form are close to one another and much lower than the redox potential of the VI/V couple of the active form (and possibly the V/IV too).

The potential of the VI/V redox transition of the active form could be determined with satis-

Table 1: Values of the nitrate-concentration-independent parameters of the global fit (see text).

Parameter	Value	Error
$E_{V/IV}^i$ (V vs SHE)	-0.19	± 0.01
$E_{V/IV}^i$ (V vs SHE)	-0.27	± 0.01
K_i^{IV} (mM)	6	± 1
K_i^V (mM)	500	± 100
K_i^{VI} (mM)	2000	± 400

factory accuracy for most substrate concentrations; it increases slightly as nitrate concentration increases. The potential of the V/IV redox transition of the active form could only be determined for a small number of concentrations.

The activation rate constants could be accurately determined at almost all nitrate concentrations. Their values decrease slightly as nitrate concentration increases, which indicates that nitrate binding/release is not an elementary reaction, but rather proceeds in at least two steps. Release of nitrate from the VI state is significantly slower than from the V and IV states. Together with the higher affinity of nitrate for the VI state, this indicates that electrostatics probably governs the energetics and kinetics of nitrate binding/release.

Domain of existence of the paramagnetic inactive species

From the data in figure 7 and table 1, it is possible to compute the fraction of inactive species at pH 6 for a given electrode potential and nitrate concentration:

$$\begin{aligned}
 I(E, \text{NO}_3^-) &= \frac{1}{1 + k_a/k_i} \\
 &= \frac{1}{1 + \frac{k_{IV}^a + e_2^i k_V^a + e_1^i e_2^i k_{VI}^a}{1 + e_2^i + e_1^i e_2^i} \times \frac{1 + e_2^a + e_1^a e_2^a}{k_{IV}^i + e_2^a k_V^i + e_1^a e_2^a k_{VI}^i}}
 \end{aligned}
 \tag{14}$$

where the values of k_i^{IV} , k_i^V and k_i^{VI} are determined for each concentration of nitrate by using equation (13). The steady-state fraction

of inactive enzyme is plotted as contour lines in figure 8A. The values of K_i obtained earlier (figure 4) are shown as triangles in the same figure. They overlay well the 50% contour (purple line), showing that the results of the potential steps approach are consistent with the inhibition constants determined using ‘‘concentration steps’’ (figures 2 and 3).

Furthermore, it is possible to compute the steady-state fraction of inactive species that is in the Mo(V) state from the values of the redox potentials of the inactive form (table 1) combined with equation (14). This gives the overall concentration of inactive Mo(V) species:

$$I_V(E, [\text{NO}_3^-]) = \frac{e_2^i}{1 + e_2^i + e_1^i e_2^i} \times I(E, [\text{NO}_3^-])
 \tag{15}$$

This is shown as contour lines in figure 8B.

The maximum of fraction of inactive MoV is about 8% for a very narrow region around -200 mV and 50 mM nitrate but its concentration rapidly decreases outside of that region, to amount to less than 4% at 20 mM nitrate whatever the value of E (the 4% level line is drawn in purple in figure 8B). On the other hand, the fraction of enzyme in the inactive form increases steadily with increasing potential and/or nitrate, to exceed 80% at potentials above 0 V and nitrate concentration above 20 mM.

Using the same approach, we wanted to determine the fraction of active species in the Mo(V) state as a function of potential and nitrate concentration. While this would be desirable in order to design experiments that maximize the chances to trap active paramagnetic species, this was unfortunately not feasible from our data, because the potential of the active V/IV could not be reliably determined. The fraction of active Mo(V) is therefore determined with too large an error to be of practical use.

Discussion

Periplasmic nitrate reductase adsorbed at a graphite electrode gives a voltammetric signal (fig. 1) where the already complex steady-state

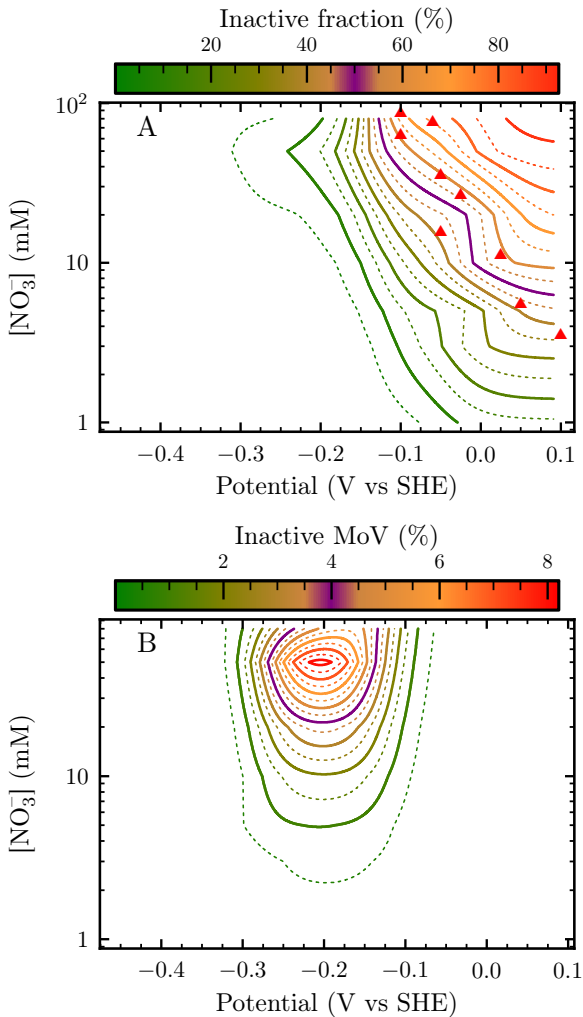


Figure 8: Panel A: steady-state fraction of the enzyme that is in the inactive form as a function of nitrate concentration and potential, pictured as level lines; solid lines correspond to multiples of 10%. The purple level lines correspond to 50% inactive form. The red triangles are the values of K_i at pH 6 (replotted from figure 4). Panel B: steady-state fraction of the enzyme that is in the paramagnetic state of the inactive form as a function of potential and substrate concentration, pictured as level lines; solid lines correspond to multiples of 1%. The purple level line corresponds to 4% MoV. Conditions: pH 6, 25°C

catalytic response is distorted by a reversible, slow, redox- and substrate concentration-dependent (in)activation process (15). Cyclic voltammograms showing a hysteresis that results from a reversible inactivation process have been recorded before by PFV for several enzymes: NiFe (19, 21) and FeFe hydrogenases (18, 22). This was also observed with horseradish peroxidase using mediated electrochemistry (23). The case of nitrate reductase is particularly intriguing since neither the structure of the inactive state nor the mechanisms of inhibition are known. The observation that the enzyme is inhibited by its substrate has consequences on the design of experiments where one tries to trap and characterize catalytic intermediates. It is essential to find out whether or not the substrate-inhibited form of the enzyme is one of the species that has been isolated and characterized using EPR. Our goal was therefore two-fold. We aimed at quantitatively analyzing the electrochemical data to learn about the (in)activation process and obtain molecular information about the inactive state(s). We also wanted to better define which experimental conditions are best suited to accumulate catalytic intermediates and avoid inactive species.

We used the strategy that we recently developed for studying the reversible redox-driven (in)activation of NiFe and FeFe hydrogenases (18, 19). The activity of the enzyme is monitored as a function of time, in an experiment where the electrode potential is repeatedly stepped up and down to trigger inactivation and reactivation (Figure 5). The data are fitted using a simple two-state model (eq (2)), where the active and inactive forms of the enzyme interconvert with apparent rate constants k_i and k_a . The dependence on potential (Fig. 6) and nitrate concentration (Fig. 7) of these two apparent rate constants is interpreted to learn about the different redox states of the active and inactive states, and how they interconvert (scheme 1). This analysis shows that the potential dependence of the inactivation stems from the fact that the inhibiting nitrate has a much higher affinity for the VI state of the enzyme rather than the more reduced states V and IV.

The information we gained is summarized in

the two contour plots of figure 8, where we show the steady-state fraction of the enzyme that is in the inactive form as a function of nitrate concentration and potential (panel A) and the steady-state fraction of the enzyme that is in the paramagnetic state of the inactive form as a function of potential and substrate concentration (panel B). The map of figure 8A shows that, as emphasized in our earlier work (15), inactive forms of the enzyme accumulate at high potentials and high concentrations of nitrate. However, by combining the information in fig 8A and B, we conclude that the substrate-inhibited states accumulate mostly in the EPR-silent Mo(VI) state. This is a consequence of the inhibition constant being much lower for the VI state than for the other redox states (Table 1). At pH 6 and nitrate concentrations below 100 mM, the fraction of EPR-active substrate-inhibited enzyme is expected to be lower than 10%, regardless of the potential.

Regarding the experiments aimed at trapping catalytic intermediates in solution, carried out at very high concentration of nitrate, we conclude that the risk of mistaking an Mo(V) signal of the substrate-inhibited form for a catalytically active species is actually low. However, unless very reducing conditions are employed, the use of a high concentration of nitrate favours the accumulation of the inactive form, which decreases the chances of detecting a catalytically competent EPR-active state. Concentrations of nitrate above 10 mM should be avoided.

As explained in e.g. section 5.9.1 of ref. 16, substrate inhibition cannot result from the non-productive binding of nitrate in a manner that prevents (or competes with) normal binding. Substrate inhibition is usually rationalized in terms of a second molecule of substrate binding to the enzyme-substrate complex (idem, section 5.9.2). This led us to label the substrate inhibited species as “Mo–S₂” (i.e. active site bound to two molecules of substrate) in our earlier work (15). However, we show in SI section S1 that substrate inhibition may also occur if, in the catalytic cycle, a substrate molecule binds the enzyme between the release of the prod-

uct and the return of the enzyme to its “resting state” (we define the resting state as the form of the enzyme that accumulates in the absence of substrate): two molecules of substrate are needed for substrate inhibition, but they do not necessarily exist at the same time in the active site pocket. This situation has also been described for dimeric glucose oxidase (24).

Several aspects of the catalytic cycle of Nap remain to be elucidated, but it is commonly accepted that nitrate binds to the active site through one of the oxygen atoms, which is retained as an oxo or hydroxo group upon release of nitrite, and must be removed before another nitrate molecule can bind to start the next catalytic cycle (25). We observed that inhibition by nitrate in Nap is very sensitive to the redox state of the active site (Table 1), which indicates that the inhibiting molecule of nitrate binds either at, or very close to, the active site. Since the active site cavity is too small to simultaneously accommodate two molecules of nitrate, we consider as most likely that inhibition results from a molecule of nitrate entering the cavity after nitrite has been released, but before the remaining oxo group has detached from the active site. According to this hypothesis, the inhibiting nitrate would prevent the release of the oxo group, thus blocking the active site in a dead-end state. This mechanism is likely to be specific of periplasmic Nap; indeed, substrate inhibition has never been reported with the related membrane-bound, respiratory nitrate reductases (NarGHI), and indeed, our attempts to evidence nitrate inhibition of *E. coli* nitrate reductase failed (unpublished results). The coordination sphere of the Mo in Nap is different of that in Nar (a cysteine binds the Mo in NapA, it is an aspartate in NarG), and this may impact both the nature of the catalytic intermediates and the existence of dead-end, substrate-inhibited states.

Many Mo(V) EPR signatures of periplasmic nitrate reductases have been reported (3, 7, 8). The most studied are those from the so-called “high-*g*” family (“high-*g* resting”, “high-*g* nitrate” and “high-*g* turnover”). According to DFT investigations, their EPR spectra are consistent with a Mo coordinated by 6 sulfur lig-

ands (3). We recently proposed that the “high-*g* resting” signal arises from an inactive species where one molybdopterin is open and therefore non-functional (8). The implication in the catalytic cycle of the species that give the “high-*g* nitrate” and “high-*g* turnover” signals has been proposed based on the observation that they are formed during turnover conditions (26, 27), but the argument is actually weak, since the present study and earlier works (15) show that, even in turnover conditions, inactive species can accumulate to a significant extent. Clearly, that a species is formed only in turnover conditions does not imply that it is catalytically relevant. However, the detailed analysis herein suggested that the inactive form of Nap that accumulates under very high concentrations of nitrate is not present in the intermediate (Mo(V)) redox state, and therefore does not correspond to a species that has been detected by EPR before.

Conclusion

Using electrochemical potential step techniques, we were able to characterize the kinetic and thermodynamic aspects of the potential-dependent substrate inhibition of periplasmic nitrate reductase. We have shown that in the inhibited form, the affinity for nitrate is much greater for the Mo VI state than for the V and IV states. We could precisely define the experimental conditions (in terms of potential and nitrate concentration) where the inactive forms accumulate, and which portion of it is in a paramagnetic state. We found that inactive species do accumulate at high nitrate concentration, but not in a paramagnetic form. This will be useful for designing experiments aimed at trapping and characterizing catalytic intermediates.

Methods

Purification of NapAB

Samples of *R. sphaeroides f. sp. denitrificans* IL106 NapAB were purified as previously described (2).

Protein film voltammetry experiments

The electrochemical setup was the same as that described in refs (7, 15). It consisted of a pyrolytic graphite edge (PGE) rotating electrode, a saturated calomel reference electrode and a platinum counter electrode. Before each measurement, the PGE electrode was abraded with α alumina (Buehler), sonicated, rinsed and dried. 0.6 μ L of a 0.2 M neomycin sulfate solution was then deposited on the electrode, allowed to dry for 5 min. 0.6 μ L of a stock solution of NapAB was deposited and allowed to dry. The electrolytic solution, buffered with (2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid) MES, (N-cyclohexyl-2-aminoethanesulfonic acid) CHES, (2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl] ethanesulfonic acid) HEPES, (3-[[1,3-dihydroxy-2-(hydroxymethyl)propan-2-yl] amino] propane-1-sulfonic acid) TAPS and sodium acetate (5 mM each), contained 0.1 M sodium chloride.

Data analysis

We analyzed and fitted the data using in-house programs called SOAS (28) and QSoas. The former is available free and free of charge on our Web site at <http://bip.cnrs-mrs.fr/bip06/software.html>. It is being replaced by an entirely new, powerful, open-source program called QSoas, which will become available soon. Both programs embed the ODRPACK software for non-linear least squares regressions (29). For the measurement of K_i , we corrected film loss as illustrated with the experiments aimed at measuring K_m in ref 17.

References

1. Grimaldi, S., Schoepp-Cothenet, B., Ceccaldi, P., Guigliarelli, B., and Magalon, A. (2013) The prokaryotic Mo/W-bisPGD enzymes family: a catalytic workhorse in bioenergetic. *Biochim. Biophys. Acta* 1827, 1048–1085.
2. Arnoux, P., Sabaty, M., Alric, J., Frangioni, B., Guigliarelli, B., Adriano, J.-M., and Pignol, D. (2003) Structural and redox

- plasticity in the heterodimeric periplasmic nitrate reductase. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *10*, 928–934.
3. Biaso, F., Burlat, B., and Guigliarelli, B. (2012) DFT Investigation of the Molybdenum Cofactor in Periplasmic Nitrate Reductases: Structure of the Mo(V) EPR-Active Species. *Inorg. Chem.* *51*, 3409–3419.
 4. Najmudin, S., González, P., Trincão, J., Coelho, C., Mukhopadhyay, A., Cerqueira, N., Romão, C., Moura, I., Moura, J., Brondino, C., and Romão, M. (2008) Periplasmic nitrate reductase revisited: a sulfur atom completes the sixth coordination of the catalytic molybdenum. *J. Biol. Inorg. Chem.* *13*, 737–753.
 5. Coelho, C., González, P. J., Moura, J. G., Moura, I., Trincão, J., and João Romão, M. (2011) The crystal structure of *Cupriavidus necator* nitrate reductase in oxidized and partially reduced states. *J. Mol. Biol.* *408*, 932–948.
 6. Léger, C., and Bertrand, P. (2008) Direct Electrochemistry of Redox Enzymes as a Tool for Mechanistic Studies. *Chem. Rev.* *108*, 2379–2438.
 7. Fourmond, V., Burlat, B., Dementin, S., Arnoux, P., Sabaty, M., Boiry, S., Guigliarelli, B., Bertrand, P., Pignol, D., and Léger, C. (2008) Major Mo(V) EPR Signature of *Rhodobacter sphaeroides* Periplasmic Nitrate Reductase Arising from a Dead-End Species That Activates upon Reduction. Relation to Other Molybdoenzymes from the DMSO Reductase Family. *J. Phys. Chem. B* *112*, 15478–15486.
 8. Jacques, J. G., Fourmond, V., Arnoux, P., Sabaty, M., Etienne, E., Grosse, S., Biaso, F., Bertrand, P., Pignol, D., Léger, C., Guigliarelli, B., and Burlat, B. (2014) Reductive activation in periplasmic nitrate reductase involves chemical modifications of the Mo-cofactor beyond the first coordination sphere of the metal ion. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* *1837*, 277–286.
 9. Frangioni, B., Arnoux, P., Sabaty, M., Pignol, D., Bertrand, P., Guigliarelli, B., and Léger, C. (2004) In *Rhodobacter sphaeroides* respiratory nitrate reductase, the kinetics of substrate binding favors intramolecular electron transfer. *J. Am. Chem. Soc.* *126*, 1328–9.
 10. Bertrand, P., Frangioni, B., Dementin, S., Sabaty, M., Arnoux, P., Guigliarelli, B., Pignol, D., and Léger, C. (2007) Effects of Slow Substrate Binding and Release in Redox Enzymes: Theory and Application to Periplasmic Nitrate Reductase. *J. Phys. Chem. B* *111*, 10300–10311.
 11. Gates, A. J., Richardson, D. J., and Butt, J. N. (2008) Voltammetric characterization of the aerobic energy-dissipating nitrate reductase of *Paracoccus pantotrophus*: exploring the activity of a redox-balancing enzyme as a function of electrochemical potential. *Biochem. J.* *409*, 159–168.
 12. Heffron, K., Léger, C., Rothery, R., Weiner, J., and Armstrong, F. (2001) Determination of an Optimal Potential Window for Catalysis by *E. coli* Dimethyl Sulfoxide Reductase and Hypothesis on the Role of Mo(V) in the Reaction Pathway. *Biochemistry* *40*, 3117–3126.
 13. Anderson, L., Richardson, D., and Butt, J. (2001) Catalytic protein film voltammetry from a respiratory nitrate reductase provides evidence for complex electrochemical modulation of enzyme activity. *Biochemistry* *40*, 11294–307.
 14. Fourmond, V., Burlat, B., Dementin, S., Sabaty, M., Arnoux, P., Étienne, E., Guigliarelli, B., Bertrand, P., Pignol, D., and Léger, C. (2010) Dependence of Catalytic Activity on Driving Force in Solution Assays and Protein Film Voltammetry: Insights from the Comparison of Nitrate Re-

- ductase Mutants. *Biochemistry* 49, 2424–2432.
15. Fourmond, V., Sabaty, M., Arnoux, P., Bertrand, P., Pignol, D., and Léger, C. (2010) Reassessing the Strategies for Trapping Catalytic Intermediates during Nitrate Reductase Turnover. *J. Phys. Chem. B* 114, 3341–3347.
 16. Cornish-Bowden, A. *Fundamentals of Enzyme Kinetics*, 3rd ed.; Portland Press, 2004; ISBN 1 85578 1581.
 17. Fourmond, V., Lautier, T., Baffert, C., Leroux, F., Liebgott, P.-P., Dementin, S., Rousset, M., Arnoux, P., Pignol, D., Meynial-Salles, I., Soucaille, P., Bertrand, P., and Léger, C. (2009) Correcting for electrocatalyst desorption or inactivation in chronoamperometry experiments. *Anal. Chem.* 81, 2962–2968.
 18. Fourmond, V., Greco, C., Sybirna, K., Baffert, C., Wang, P.-H., Ezanno, P., Montefiori, M., Bruschi, M., Meynial-Salles, I., Soucaille, P., Blumberger, J., Bottin, H., Gioia, L. D., and Léger, C. *Nature Chemistry*, in press.
 19. Fourmond, V., Infossi, P., Giudici-Orticoni, M.-T., Bertrand, P., and Léger, C. (2010) “Two-Step” Chronoamperometric Method for Studying the Anaerobic Inactivation of an Oxygen Tolerant NiFe Hydrogenase. *J. Am. Chem. Soc.* 132, 4848–4857.
 20. While the first step at E_1 is not essential for the determination of the rate constants, it reduces the charging current on the step at E_2 and therefore improves the reliability of the data.
 21. Jones, A., Lamle, S., Pershad, H., Vincent, K., Albracht, S., and Armstrong, F. (2003) Enzyme Electrokinetics: Electrochemical Studies of the Anaerobic Interconversions between Active and Inactive States of *Allochromatium vinosum* [NiFe]-hydrogenase. *J. Am. Chem. Soc.* 125, 8505–8514.
 22. Parkin, A., Cavazza, C., Fontecilla-Camps, J., and Armstrong, F. (2006) Electrochemical Investigations of the Interconversions between Catalytic and Inhibited States of the [FeFe]-Hydrogenase from *Desulfovibrio desulfuricans*. *J. Am. Chem. Soc.* 128, 16808–16815.
 23. Dequaire, M., Limoges, B., Moiroux, J., and Savéant, J.-M. (2002) Mediated electrochemistry of Horseradish peroxidase. Catalysis and inhibition. *J. Am. Chem. Soc.* 124, 240–53.
 24. Durand, F., Limoges, B., Mano, N., Mavré, F., Miranda-Castro, R., and Savéant, J.-M. (2011) Effect of Substrate Inhibition and Cooperativity on the Electrochemical Responses of Glucose Dehydrogenase. Kinetic Characterization of Wild and Mutant Types. *J. Am. Chem. Soc.* 133, 12801–12809.
 25. Sparacino-Watkins, C., Stolz, J. F., and Basu, P. (2014) Nitrate and periplasmic nitrate reductases. *Chem. Soc. Rev.* 43, 676–706.
 26. Butler, C., Charnock, J., Bennett, B., Sears, H., Reilly, A., Ferguson, S., Garner, C., Lowe, D., Thomson, A., Berks, B., and Richardson, D. (1999) Models for Molybdenum Coordination during the Catalytic Cycle of Periplasmic Nitrate Reductase from *Paracoccus denitrificans* Derived from EPR and EXAFS Spectroscopy. *Biochemistry* 38, 9000–9012.
 27. González, P., Rivas, M., Brondino, C., Bursakov, S., Moura, I., and Moura, J. (2006) EPR and redox properties of periplasmic nitrate reductase from *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774. *J. Biol. Inorg. Chem.* 11, 609–616.
 28. Fourmond, V., Hoke, K., Heering, H. A., Baffert, C., Leroux, F., Bertrand, P., and Léger, C. (2009) SOAS: A free program to analyze electrochemical data and other one-dimensional signals. *Bioelectrochemistry* 76, 141–147.

29. Boggs, P. T., Donaldson, J. R., h. Byrd, R., and Schnabel, R. B. (1989) Algorithm 676: ODRPACK: software for weighted orthogonal distance regression. *ACM Trans. Math. Softw.* 15, 348–364.

$$k_{\text{cat}} = \frac{k_1 k_2}{k_1' + k_2} \quad K_m = \frac{k_2 (k_{-1} + k_1')}{k_1 (k_1' + k_2)} \quad K_i = \frac{k_{-3} (k_1' + k_2)}{k_3 k_1'} \quad (\text{S3})$$

The “resting state” of this system, ie the state that accumulate in the absence of substrate, is E. As can be seen here, the substrate binding step that makes the enzyme inactivate at high nitrate concentration can take place after the product has been released, so long as the enzyme is not back to its resting state.

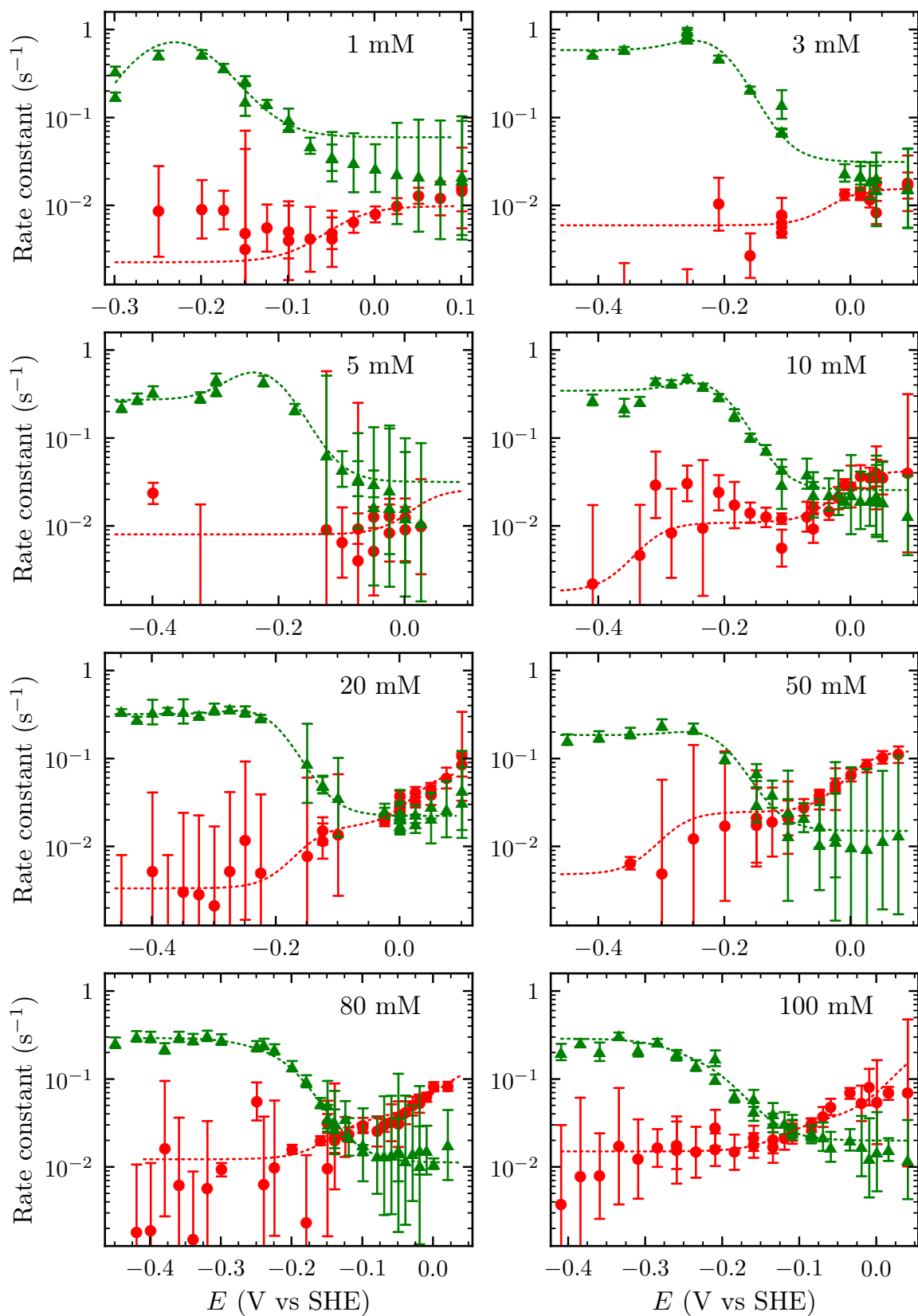


Figure S2: Activation (green) and inactivation (red) rate constants as a function of potential for different values of the nitrate concentration, for all the nitrate concentrations used. The dashed lines represent the global fit described in text. Conditions: pH 6, 25°C.

5.4 Discussion

Les travaux présentés ici ont permis de caractériser en détail l'activité de NapAB dans des conditions où l'inhibition par le substrat apparaît. L'utilisation de méthodes chronoampérométriques nous a donné accès aux vitesses de formation et de disparition des espèces inactives en fonction du potentiel et de la concentration en nitrate.

À l'état stationnaire, l'activité est cohérente avec un modèle classique à trois état E, ES, ESS, où l'état ESS est inactif du fait de la fixation d'un ion nitrate supplémentaire au site actif. Nos mesures montrent que la forme qui a fixé deux ions nitrate n'a effectivement aucune activité résiduelle. Ce résultat donne donc une contrainte essentielle pour l'analyse des chronoampérogrammes obtenus par échelons de potentiel.

Le mécanisme le plus simple suppose le passage de la forme active à la forme inactive *via* la fixation ou la libération d'un ion nitrate supplémentaire. Cependant, l'examen des régimes transitoires qui apparaissent lors de l'ajout d'un excès de substrat démontre l'influence complexe du potentiel et de la concentration en nitrate. Le modèle d'inhibition en une étape élémentaire ne peut pas expliquer ces données.

Cependant, le passage de la forme active à la forme inactive est un processus d'ordre apparent égal à un. L'influence du potentiel, étudiée en détail grâce à l'approche par échelons de potentiels, a révélé que la forme inactive de l'enzyme peut être présente dans trois état d'oxydation distincts. Ces état ont été dénommés arbitrairement Mo^{IV} , Mo^{V} , et Mo^{VI} .

L'état Mo^{VI} se réactive très lentement, alors que les état Mo^{V} et Mo^{IV} se réactivent le plus vite. La forme active est elle aussi présente sous trois états redox, la forme oxydée étant celle qui s'inactive le plus rapidement. À partir de l'ensemble des valeurs des constantes de vitesse, la fraction de la forme semi-réduite (Mo^{V}) inactive a été calculée, et ne dépasse pas 8 %, et ce sur une plage de potentiel très étroite (~ 25 mV), autour de -200 mV. À ce potentiel, le centre fer-soufre de NapA est quasi-totalement oxydé, mais dans NapAB il est réduit. Le signal « high *g* nitrate » a toujours été observé avec le centre fer-soufre réduit dans NapA. Vu que ce signal est aussi observé en l'absence de nitrate, et qu'il a été observé dans des proportions plus élevée que 8% (spins/molécule)⁴, il ne semble pas provenir d'une espèce inhibée. Quand au signal « high *g* turnover », il est observé avec le centre fer-soufre oxydé, mais il est difficile de faire le lien avec cette étude vu le peu d'observations dont nous disposons. D'après NAJMUDIN et coll., la structure hyperfine du signal « high *g* turnover » résulte du couplage hyperfin avec les protons d'une molécule d'eau (Najmudin *et al.*, 2008).

Le mécanisme classiquement invoqué pour expliquer l'inhibition par le substrat repose sur la fixation de deux molécules de substrat au site actif, dans une conformation telle que la réaction n'a pas lieu. Dans le cas de la nitrate réductase périplasmique, aucune structure cristallographique n'a encore permis de résoudre la position du nitrate dans le site actif. Dans la structure cristallographique de NapA de *D. desulfuricans* en présence de nitrate (10 mM), aucun ion nitrate n'est détecté à proximité du molybdène (Najmudin *et al.*, 2008).

Le mécanisme proposé dans le matériel supplémentaire de l'article repose sur

la formation d'un état E', qui serait incapable de transformer un ion nitrate (S), contrairement à l'état E. L'état E' serait ainsi un état « inhibé par le produit », où la molécule d'eau produite lors de la réduction du nitrate reste « bloquée » dans le site actif. La présence de cette molécule d'eau suggère que l'espèce « high *g* turnover » correspond à la forme Mo^V inhibée. Selon ce mécanisme, il n'y a jamais deux ions nitrate simultanément dans la cavité du site actif.

Un autre cas de figure est illustré par la glucose déshydrogénase, enzyme dimérique où la conformation de chaque monomère dépend de la concentration en substrat et influe sur l'activité de l'autre monomère (Durand *et al.*, 2011). Une autre enzyme à molybdène est sujette à l'inhibition par le substrat : il s'agit de la xanthine oxydase. L'étude du mécanisme a conduit à la conclusion que l'inhibition résultait d'un déplacement du cofacteur FAD par la xanthine en excès (Hofstee, 1955). De tels mécanisme, « allostériques », sont à écarter pour NapAB, qui est un monomère. En effet, le fait que l'inhibition et l'activation dépendent du potentiel selon des sigmoïdes à un électron montre que l'ion nitrate « inhibiteur » se fixe sur un centre redox, le centre à molybdène étant le meilleur candidat.

La vitesse d'inactivation ne dépend pas de manière simple de la concentration en nitrate. Nous avons observé cela quelle que soit l'approche utilisée. Ceci montre que l'inactivation ne résulte pas d'un processus élémentaire. Le mécanisme moléculaire précis de l'inhibition est encore à éclaircir. Il serait nécessaire d'explorer l'influence d'autres paramètres, comme la viscosité du milieu, la présence d'autres inhibiteurs, ou encore d'eau lourde.

Chapitre 6

Étude des espèces Mo^{V} « high g » par spectroscopie hyperfine à haute résolution

Sommaire

6.1	Introduction	205
6.2	Étude de la forme « high g resting » par spectroscopie HYSCORE	207
6.2.1	État « as prepared »	207
6.2.2	État « centre fer–soufre réduit »	209
6.3	Étude de l’espèce « high g nitrate »	214
6.3.1	Effet de la substitution isotopique	214
6.3.2	Étude du secteur des hautes fréquences	214
6.3.3	Étude du secteur des basses fréquences	219
6.4	Discussion	223

6.1 Introduction

Les résultats des chapitres 3 et 4 montrent que les formes paramagnétiques majoritaire du cofacteur à molybdène donnent des spectres RPE en onde continue semblables avant l’activation de l’enzyme et après l’activation de l’enzyme. Les signatures de type « high g » (« high g resting », « high g nitrate », et potentiellement « high g turnover ») sont en effet toutes très proches en termes de matrice \tilde{g} et de matrice hyperfine \tilde{A} .

Les études par DFT faites dans l’équipe de Biophysique des Métalloprotéines par Frédéric BIASO montrent que ces valeurs de g sont associées à un ion Mo^{5+} coordiné par six atomes de soufre : quatre issus des pyranoptérines, les deux derniers sous la forme d’une cystéine persulfurée 6.1.

Le couplage hyperfin avec les protons non-échangeables de la cystéine donne lieu aux éclatements observés sur les spectres en onde continue. Le mécanisme d’activation que nous proposons dans le chapitre 4 met en jeu un réarrangement du cofacteur qui ne fait pas intervenir la première sphère de coordination du molybdène.

Les espèces « high g » étant les espèces Mo^{V} majoritaires, bien que toujours sous-stœchiométriques, il est tentant d'affirmer qu'elles sont catalytiquement actives. L'espèce « high g resting », elle, ne saurait être incluse dans un cycle catalytique. Mais la place exacte de l'espèce « high g nitrate » ou de l'espèce « high g turnover » dans le cycle catalytique (ou hors du cycle) est inconnue. Il devient indispensable de connaître la structure de ces espèces *au delà* de la première sphère de coordination, à plus grande distance du métal.

Le premier objectif de cette étude est de mettre en évidence des modifications de structure dues à l'activation de l'enzyme par réduction. Ceci doit se faire en comparant la forme « high g nitrate » avec la forme « high g resting » dans l'état $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{2+}$ et dans l'état $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^+$

Le second objectif est la compréhension de la place des espèces « high g » dans la catalyse. Pour cela, nous chercherons à mettre en évidence une éventuelle interaction magnétique avec le noyau d'azote du substrat NO_3^- (ou du produit ceNO₂-), en s'appuyant notamment sur la substitution isotopique.

Pour sonder la structure du site actif à plus grande distance du métal, nous avons donc entrepris de caractériser les espèces Mo^{V} « high g » par spectroscopie hyperfine à haute résolution (spectroscopie HYSCORE, Hyperfine sublevel correlation (Schweiger et Jeschke, 2001)). Cette approche permet la résolution de couplages hyperfins non résolus par spectroscopie RPE en onde continue.

Les principaux noyaux magnétiques en abondance naturelle dans une protéine sont l'azote (^{14}N , $I = 1$) et l'hydrogène ($I(^1\text{H}) = 1/2$). Pour mettre en évidence un noyau d'azote appartenant au substrat, du nitrate isotopiquement enrichi en ^{15}N sera utilisé.

À terme, la confrontation des données expérimentales à des calculs de fonctionnelle de la densité sur des modèles *étendus*¹ doit permettre d'attribuer sans ambiguïté les couplages aux noyaux environnants.

Si elle améliore beaucoup la résolution spectrale, la RPE impulsionnelle souffre d'une faible sensibilité par rapport à la RPE en onde continue. Les échantillons doivent donc présenter un signal suffisamment intense. L'avantage des signaux Mo^{V} « high g » est leur finesse. Nous avons travaillé avec des concentrations en Mo^{V} entre 10 et 40 μM . Ces valeurs sont environ dix fois plus faibles que celles publiées pour la sulfite oxydase, par exemple (Astashkin *et al.*, 2007). D'autre part, la présence du centre fer-soufre réduit nous oblige, lorsqu'il est présent à travailler à plus haute température ($T > 50 \text{ K}$)². Il en résulte un rapport signal/bruit plus faible, demandant des temps d'acquisition plus longs.

La protéine utilisée tout au long de cette étude est la sous-unité catalytique NapA. Les hèmes en sont absents, et la quantité de Mo^{V} présente dans l'état « as prepared » est la plus importante. De plus seule l'espèce « high g resting » est présente dans l'état « as prepared », ce qui simplifie l'étude.

Nous avons étudié la forme « high g resting », dans l'état oxydé « as prepared », ainsi que dans l'état brièvement réduit où seul le centre Fe_4S_4 est réduit. En outre, nous avons étudié la forme « high g nitrate », générée de trois façons différentes : par oxydation au nitrate de potassium naturel, au nitrate de potassium enrichi en

1. Un modèle étendu comprend le cofacteur à molybdène ainsi que les acides aminés les plus proches

2. Les travaux sur la sulfite oxydase sont faits à 20 K

^{15}N , et enfin par simple réduction au dithionite de sodium.

6.2 Étude de la forme « high g resting » par spectroscopie HYSCORE

6.2.1 État « as prepared »

Dans l'état « as prepared » de NapA, le Mo^{V} est le seul centre paramagnétique. Nous avons donc enregistré les spectres à 30 K, ce qui n'est pas possible lorsque le centre fer-soufre est paramagnétique. On gagne ainsi en signal (loi de CURIE) Le spectre d'absorption en champ magnétique (echo-detected field-sweep spectrum) à 30 K de la forme « high g resting » – $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^+$ est montré sur la figure 6.1.

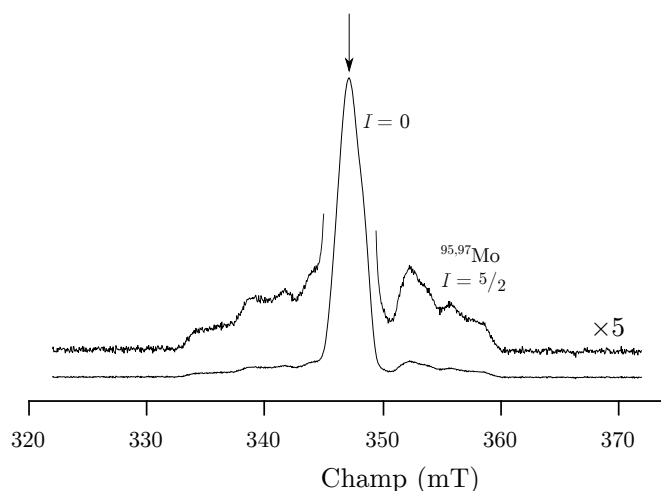


Figure 6.1 – Spectre en absorption du signal « high g resting », dans l'état « as prepared » (centre fer-soufre oxydé). Les raies latérales sont dues aux isotopes ^{95}Mo et ^{97}Mo ($I = 5/2$). La flèche pointe la valeur du champ choisie pour les spectres d'ESEEM-HYSCORE (excitation en $\sim g_2$), sauf indication contraire. 30 K, 9,671 GHz, 200 tirs/point à la fréquence de répétition de 17 kHz

Les spectres HYSCORE de l'espèce « high g resting » enregistrés à 30 K pour trois valeurs de τ sont montrés sur la figure 6.2, p. 208. Comme les fréquences de modulations égales à $1/\tau$ ne sont pas détectées (« blind spot »), enregistrer des spectres avec différentes valeurs de τ permet de pallier cette difficulté, source potentielle d'artefact négatifs.

6.2.1.1 Examen du secteurs de hautes fréquences

Ces spectres sont dominés par les composantes à haute fréquence issues des couplages avec les protons (pics n° 1,2 et 3). Outre un important pic diagonal à la fréquence de LARMOR (n° 1, panneau A), qui provient des nombreux noyaux faiblement couplés, on observe des crêtes, globalement rectilignes, de part et d'autre de ce pic. Les crêtes sont d'autant plus visibles que le temps τ est élevé. Elles sont à peine visibles pour $\tau = 96$ ns. L'une des crêtes (n° 2, panneau B) s'étend de (16,1 ; 13,6) MHz ($\Delta\nu = 2,5$ MHz) à (17,8 ; 12,0) MHz ($\Delta\nu = 5,8$ MHz). Le deuxième

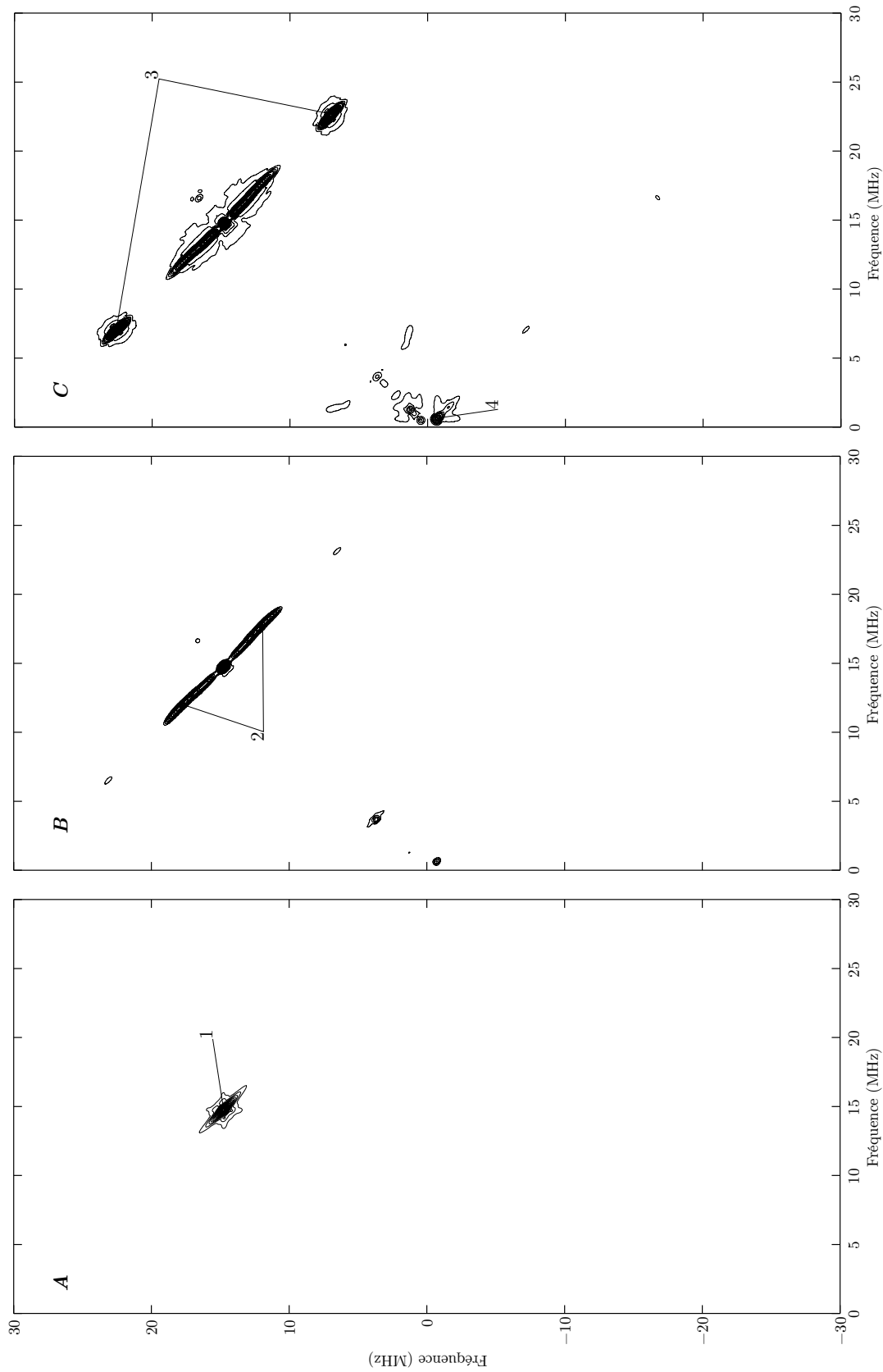


Figure 6.2 – Spectres HYSCORE de NapA, forme « high g resting » – $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{2+}$, enregistrés à 30 K pour un temps d'évolution $\tau = 96$ ns (A), 136 ns (B) et 204 ns (C).

couple de crêtes (n° 3, panneau *C*) apparaît à (23,2; 6,5) MHz ($\Delta\nu = 16,7$ MHz). On détecte également des pics ponctuels de moindre intensité à (16,7; $\pm 16,7$) MHz sur le panneau *C*. On ne distingue pas de courbure sur les crêtes, signe que l'interaction hyperfine avec ces noyaux est relativement isotrope. Les couplages hyperfins qui sont résolus sur le spectre RPE en onde continue de l'espèce « high *g* resting » valent 19 MHz, 14 MHz et 8,6 MHz (*cf* Chapitre 4, tableau 4.1, p. 124). Ces valeurs sont retrouvées sur le spectre HYSORE, mais la largeur d'excitation (2,2 mT) conduit à exciter aussi les transition en g_1 et g_3 , et à observer les valeurs des couplages pour ces directions de \tilde{g} . Ce mélange peut expliquer l'aspect étiré des crêtes. Les pics intenses à haute fréquence proviennent donc bien du couplage avec les protons β du ligand cystéine.

6.2.1.2 Examen du secteur de basses fréquences

Le secteur des basses fréquences est celle où l'on observe les éventuels couplages avec les noyaux d'azote. La figure 6.5, panneau *A* montre un zoom sur ce secteur, avec un espacement logarithmique des lignes de niveau (cette représentation exalte les motifs de faible amplitude). Ici, ce secteur montre un pic diagonal à 3,7 MHz (n° 5). De part et d'autre de ce pic, nous observons des pics plus faibles qui apparaissent à (5,9; 1,7) MHz ($\Delta\nu = 4,2$ MHz, n° 8). Ceci suggère un couplage avec un spin $1/2$ nucléaire. Ce spin $1/2$ pourrait provenir d'un noyau de ^{13}C (abondance naturelle $\simeq 1\%$), dont la fréquence de LARMOR vaut 3,75 MHz à 0,35 T.

On observe aussi d'autres pics relativement intenses sur la première bissectrice, à basses fréquences : l'un est à 1,26 MHz (n° 6), l'autre à 3,1 MHz (n° 7). Un pic intense est présent à 0,54 MHz sur la deuxième bissectrice (n° 4). Il est difficile d'attribuer ces pics à un noyau particulier.

Le couplage hyperfin avec les noyaux ^{95}Mo et ^{97}Mo ne sont pas visibles sur ces spectres, parce que leur amplitude, de l'ordre de 100 MHz (*cf* Chapitre 4 132), dépasse la gamme de fréquence du spectre HYSORE (≤ 42 MHz).

6.2.2 État « centre fer–soufre réduit »

Les spectres HYSORE de la forme Mo^{V} « high *g* resting » avec le centre $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ réduit ont été enregistrés à 55 K pour éviter les contributions dues au centre $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ paramagnétique, dont le signal recouvre complètement celui du Mo^{V} (figure 6.3). La figure 6.3 montre le spectre d'absorption RPE en champ magnétique de cette espèce, enregistré à 55 K et 15 K. On ne détecte pas le centre fer–soufre à 55 K. Nous ne nous attendons donc pas à voir de contribution de ce centre sur les spectres HYSORE, qui sont de fait enregistrés à 55 K.

Les spectres HYSORE obtenus pour trois valeurs de τ sont montrés sur la figure 6.4. Les secteurs des hautes comme des basses fréquences sont essentiellement identiques à ceux de l'état « high *g* resting » – $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{2+}$ de la figure 6.2. Sur le spectre à $\tau = 136$ ns (panneau *B*), on observe toujours dans la zone de basses fréquences un pic sur la première bissectrice à 3,7 MHz (n° 5). Le pic diagonal à 1,26 MHz (n° 6) est toujours présent.

Les secteurs des basses fréquences des deux états « high *g* resting » ($[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{2+}$ et $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^+$) sont regroupés sur la figure 6.5. La différence, ténue, apparaît sous la forme de deux pics diagonaux à 2,4 et 3,5 MHz (n° 9 et n° 7), et deux pics de

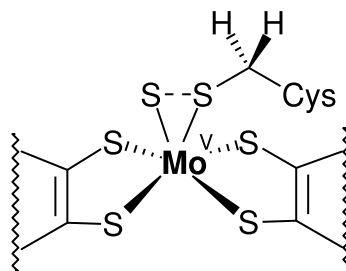


Schéma 6.1 – 1^{ère} sphère de coordination du Mo^V dans les formes « high *g* » (Biaso *et al.*, 2012)

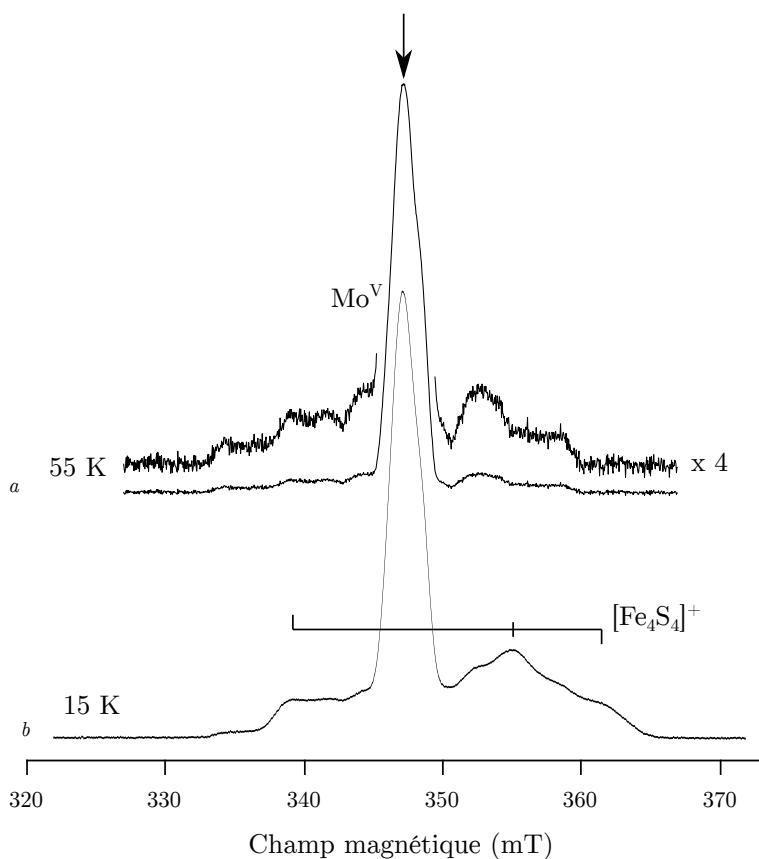


Figure 6.3 – Spectre d'absorption en champ magnétique de NapA dans l'état « high *g* resting » – $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^+$ à 55 K (*a*) et 15 K (*b*). La règle indique les valeurs principales de la matrice \tilde{g} du centre $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^+$, qui n'apparaît pas à 55 K. La flèche indique la position du champ utilisée pour l'HYSORE du Mo^V (0,347 07 T). Fréquence : 9,676 GHz *a* : 400 tirs/points à une fréquence de répétition de 20 kHz *b* : 80 tirs/points à une fréquence de répétition de 125 kHz

corrélation à (2,4; 3,5) MHz (n° 10,10'). Ce motif de quatre pics est de faible intensité; il provient donc vraisemblablement d'une espèce minoritaire.

Tableau 6.1 – Fréquences des principaux pic relevés sur les spectres HYSCORE de la forme « high g resting », dans l'état « as prepared » ($[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{2+}$) et $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^+$ (figures 6.2, 6.5)

Pic	ν_1 (MHz)	ν_2 (MHz)
1	14,7	14,7
2	17,8	12,0
3	28,2	6,5
4	0,54	-0,54
5	3,7	3,7
6	1,3	1,3
7	3,1	3,1
8	5,9	1,7
9	2,4	2,4
10	3,5	2,4

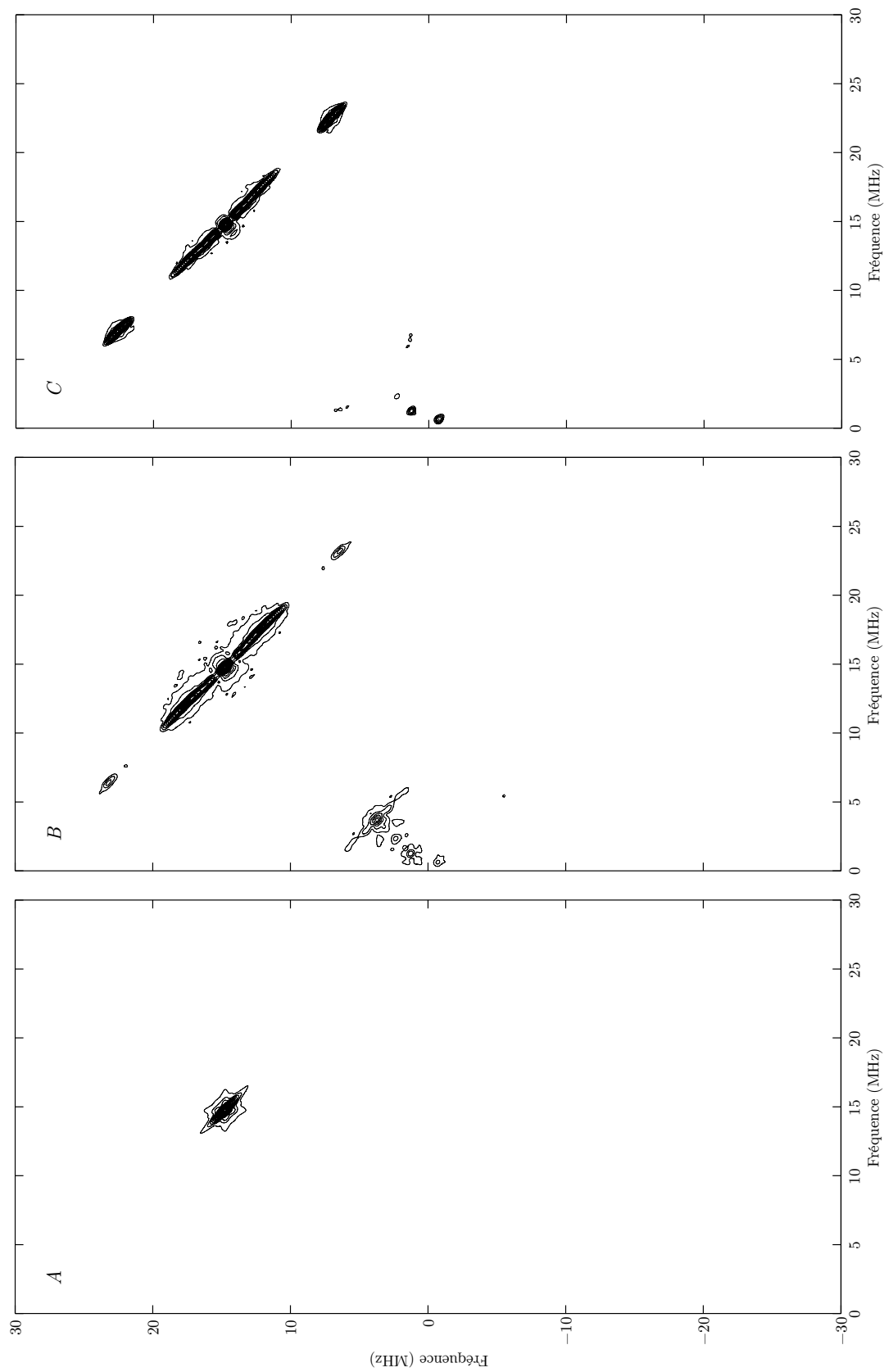


Figure 6.4 – Spectres HSCORE de NapA, forme « high g resting » – $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^+$, enregistrés à 55 K pour un temps d'évolution τ de 96 ns (A, 20 tirs/point), 136 ns (B, 120 tirs/point) et 204 ns (C, 50 tirs/point) ; 0,347 07 T, 9,674 GHz, fréquence de répétition : 2,5 kHz

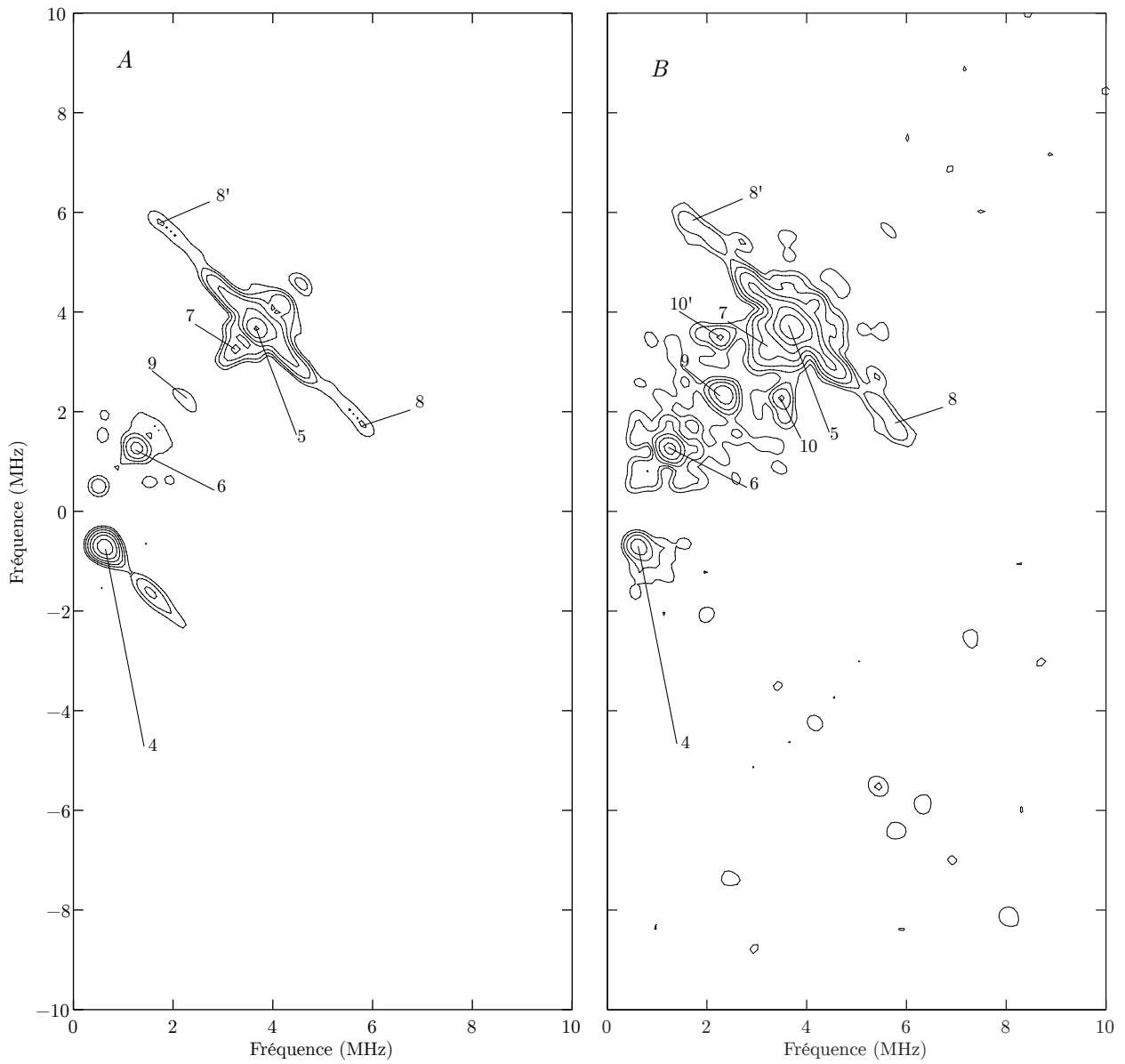


Figure 6.5 – Secteur des basses fréquences de la forme « high g resting » dans l'état « as prepared » (*A*) et dans l'état $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ réduit (*B*). $\tau = 136$ ns, 55 K. Excitation en $\sim g_2$. Niveaux logarithmiques

6.3 Étude de l'espèce « high g nitrate »

6.3.1 Effet de la substitution isotopique

Pour détecter la présence éventuelle d'un ion nitrate à proximité de l'ion Mo^{5+} , nous avons généré l'espèce « high g nitrate » avec du KNO_3 en abondances naturelles, avec du KNO_3 isotopiquement enrichi en ^{15}N , ainsi que en l'absence de nitrate. Les signaux obtenus sont donnés sur la figure 6.6. L'espèce « high g nitrate » a été obtenue en réduisant l'enzyme « as prepared » au dithionite de sodium (5 mM) jusqu'à l'extinction du signal « high g resting », puis en oxydant celle-ci au nitrate de potassium, pendant un temps bref (30 – 60 secondes) avant de la geler dans l'éthanol refroidi à -60°C . Pour générer l'espèce en l'absence de nitrate, la protéine « as prepared » (31 μM , $\text{pH}=8$) a été réduite par 10 mM de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$.

La signature « high g nitrate » obtenue dans les trois cas présente les mêmes valeurs de g , et des éclatements hyperfins identiques. Cependant, un examen minutieux des spectres révèle des différences de forme entre ceux-ci. Alors le spectre de l'espèce générée en l'absence de nitrate (*c*) possède les raies les mieux résolues, le spectre *b*, obtenue avec du $^{15}\text{NO}_3^-$, est le moins bien résolu des trois. On peut noter l'apparition de motifs larges entre g_1 et g_2 , ainsi qu'à plus haut champ. Ceci nous suggère que l'espèce « high g nitrate » a été piégée en mélange (superposée) avec l'espèce « high g turnover », dont le spectre RPE est peu résolu (*cf* figure 4.24, p. 159). J'ai estimé, par soustraction et intégration, la proportion d'espèce « high g turnover » à environ 50 % sur le spectre *b*. L'examen du spectre *a* suggère que la forme « high g turnover » est également présente en faible proportion dans l'échantillon préparé avec du $^{14}\text{NO}_3^-$. Dans le cas du signal généré sans nitrate, on ne détecte pas la forme « high g turnover ».

Nous avons obtenu des signaux dont l'intégration nous donne 12 μM ($^{14}\text{NO}_3^-$) et 16 μM ($^{15}\text{NO}_3^-$) (respectivement 0,16 et 0,21 spin/molécule).

Le spectre d'absorption RPE en champ magnétique de l'espèce « high g nitrate » générée en présence de KNO_3 isotopiquement enrichi est montré sur la figure 6.7.

6.3.2 Étude du secteur des hautes fréquences

Les spectres HYSCORE des signaux Mo^{V} obtenus avec du nitrate ^{14}N et ^{15}N sont représentés sur la figure 6.8. À première vue, ces deux spectres sont identiques, mais très différents de ceux obtenus sur la forme « high g resting ».

Les pics à haute fréquence, qui résultent du couplage avec les protons, sont relativement bien plus faibles. On retrouve cependant, dans le secteur des hautes fréquences, les pics sur l'antidiagonale (droite perpendiculaire à la diagonale) séparés de $\Delta\nu = 1,8\text{ MHz}$ et $\Delta\nu = 14,6\text{ MHz}$.

Atténuation des modulations de haute fréquence Bien que le signal « high g nitrate » montre, *en onde continue*, un couplage hyperfin résolu sur chaque direction principale ($\sim 14\text{ MHz}$), les pics à haute fréquences sont de faible intensité, contrairement à ce qui est observé pour la forme « high g resting ». Pourtant, ce sont vraisemblablement les mêmes protons β de la cystéine 152 qui sont couplés

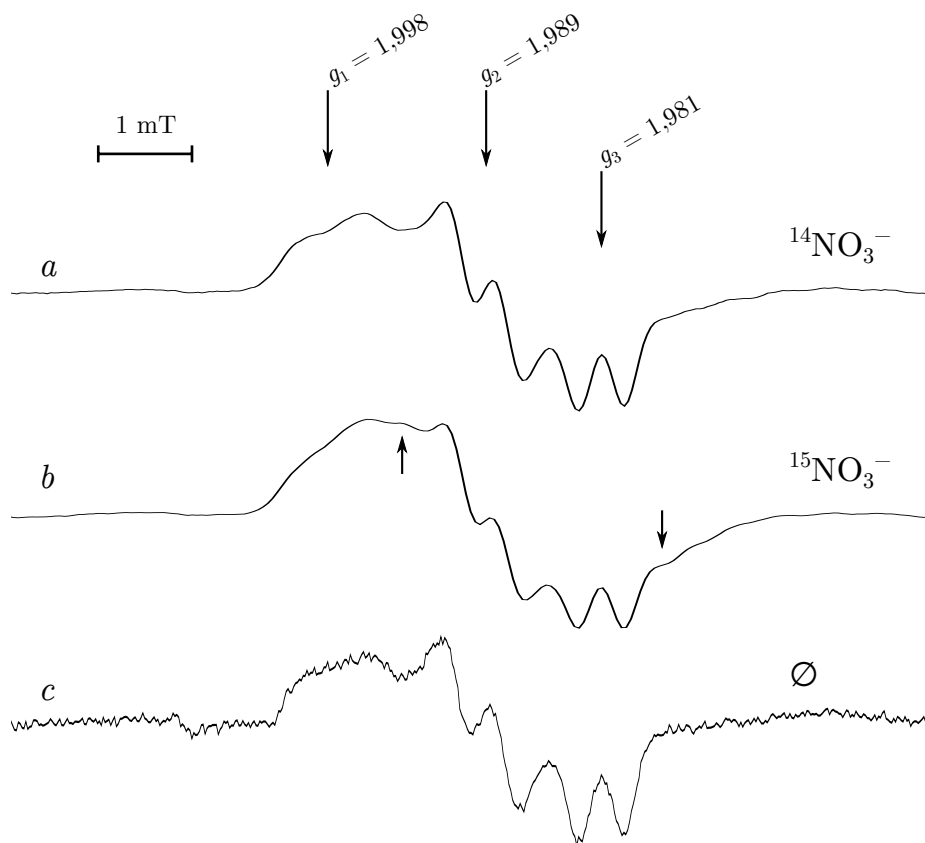


Figure 6.6 – Spectres RPE en onde continue des signaux « high g nitrate » dans les trois échantillons étudiés par spectroscopie HYSCORE. *a* :125 mM KNO_3 en abondance naturelle; *b* :100 mM KNO_3 enrichi à 98 % en ^{15}N ; *c* :6,3 mM $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$, sans nitrate. Fréquence : 9,481 GHz. Puissance : 1 mW. Température : 55 K. Modulation : 0,2 mT. Scans : 10 (*a*, *b*), 4 (*c*).

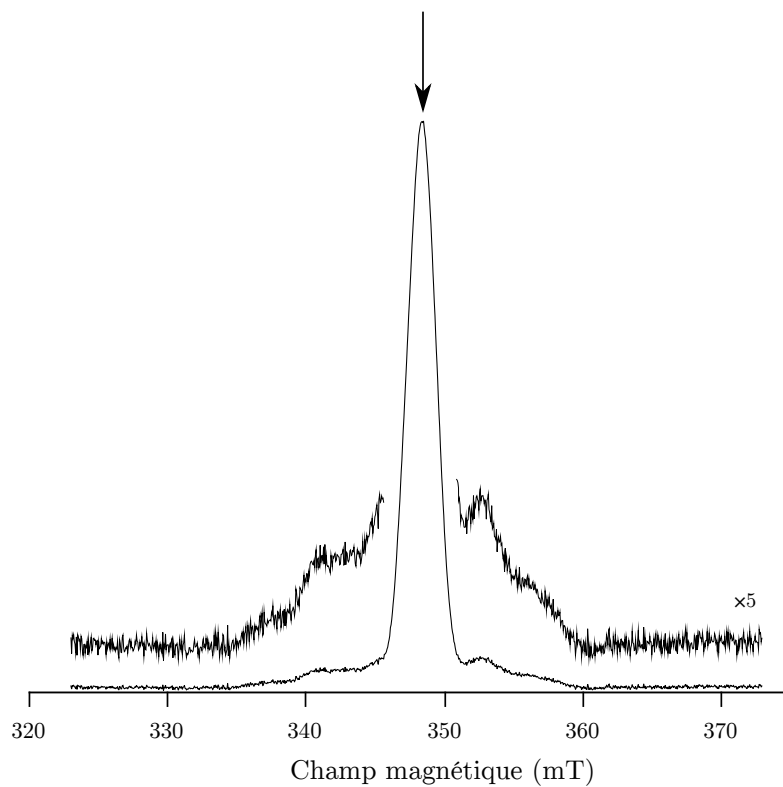


Figure 6.7 – Spectre d'absorption en champ magnétique de la forme « high g nitrate » (générée avec $K^{15}NO_3$) dans NapA. 9,701 GHz, 55 K, 300 tirs/points, fréquence de répétition 2,5 kHz.

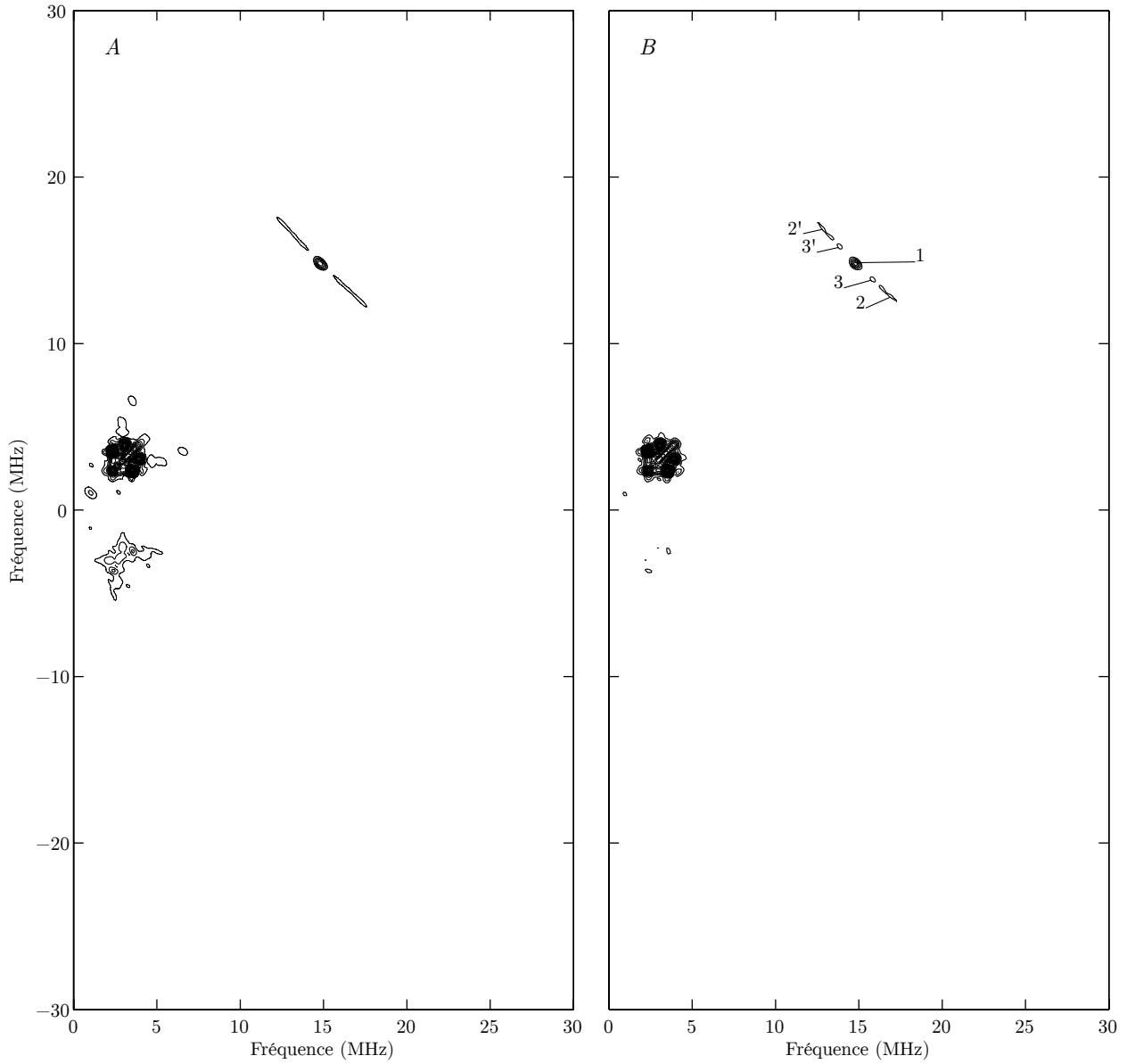


Figure 6.8 – Spectres HSCORE de l'espèce « high g nitrate » obtenue en présence de nitrate. Le spectre *A* correspond au signal généré avec du $^{15}\text{NO}_3^-$, le *B* à celui en présence de $^{14}\text{NO}_3^-$. 55 K, $\tau = 136$ ns, fréquence 9,70 GHz, champ magnétique 0,348 T, fréquence de répétition 2,5 kHz, *A* : 150 tirs/points, *B* : 45 tirs/points.

au molybdène. La présence de couplages supplémentaires issus d'autres noyaux provoque ici une forte atténuation (« suppression croisée ») des modulations de l'écho dues au couplage avec les protons (Stoll *et al.*, 2005). La figure 6.9 illustre ce phénomène sur le signal temporel. Y est représentée *une* tranche (la n° 128/256, $t_2 = 1536$ ns) de l'écho inversé en fonction de t_1 . Sur le panneau *A*, la trace est celle obtenue avec la forme « high g nitrate ». Sur le panneau *B*, celle obtenue avec la forme « high g resting » $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{2+}$, dominée par les modulations à 15 MHz.

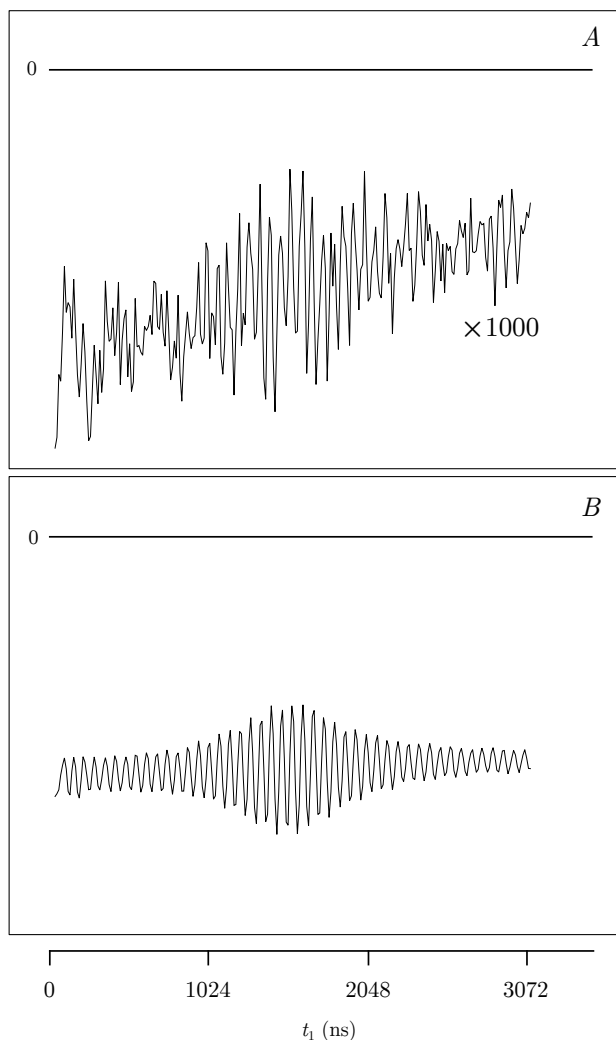


Figure 6.9 – Signal HYSORE en domaine temporel pour la forme « high g nitrate » (*A*) et pour la forme « high g resting » – $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{2+}$ *B* pour $t_2 = 1536$ ns.

Cet effet nous empêche de comparer précisément les couplages avec les protons présents dans l'environnement du Mo^{V} entre les états « high g resting » et « high g nitrate ». Les couplages avec les protons ont un intérêt pour caractériser les espèces Mo^{V} générées par l'oxydation de l'enzyme (« high g nitrate » et « high g turnover ») En effet, le signal obtenu avec le nitrate enrichi, ainsi que, dans une moindre mesure, les signaux obtenus avec le nitrate non-enrichi, sont composites : ils résultent de la superposition de la forme « high g nitrate » et de la forme « high g turnover », plus large et dont les raies sont moins bien résolues. La structure hyperfine de la forme « high g turnover » en RPE en onde continue proviendrait

du couplage avec deux protons équivalents échangeables (approximativement égal à 16,6 MHz) (Najmudin *et al.*, 2008), qui devraient donc être visibles sur les spectre HYSORE.

L'utilisation de séquences HYSORE à six impulsions (Kasumaj et Stoll, 2008) ou un autre choix du temps τ pourrait permettre d'exalter les pics des protons et de comparer les espèces. Une étude par spectroscopie de double résonance (ENDOR) permettrait vraisemblablement d'identifier les éventuels noyaux d'hydrogène supplémentaires, échangeables ou non, qui pourraient être couplés au Mo^V « high *g* nitrate », sans être gêné par l'effet de suppression croisée.

6.3.3 Étude du secteur des basses fréquences

Les pics les plus intenses sont situées dans la zone basse fréquence, contrairement à l'espèce « high *g* resting ». Dans le cas du signal obtenu avec le nitrate enrichi, nous avons enregistré un spectre HYSORE sur chaque valeur principale de la matrice \tilde{g} , avec $\tau = 136$ ns, pour conserver un bon rapport signal/bruit. La figure 6.10 montre le secteur des basses fréquences sur chacune de ces valeurs. Les spectre sont dominés par un couple de corrélations à (3,6; 2,4) MHz ($\Delta\nu = 1,2$ MHz, n° 4,4') et un à (3,9; 3,1) MHz ($\Delta\nu = 0,8$ MHz, n° 5,5'), ainsi que par des pics diagonaux à 2,45 MHz (n° 6), 3,7 MHz (n° 7), 3,4 MHz (n° 11) et 3,0 MHz (n° 8). La similitude entre ces deux spectres suggère que les noyaux à l'origine de ces couplages appartiennent à la protéine.

Les pics de couplage avec un éventuel noyau ¹³C, observés sur la forme « high *g* resting », ont disparu. Les pics n° 4,4', très intenses, ainsi que les n° 6,7 et 8 rappellent les pics de faible intensité observés sur le spectre HYSORE de l'espèce « high *g* resting » - [Fe₄S₄]⁺.

Examen des pics de corrélation intenses Nous avons enregistré un spectre HYSORE sur chaque valeur principale de la matrice \tilde{g} , en choisissant un temps $\tau = 136$ ns. La figure 6.10 donne les spectres correspondants, dans le secteur des basses fréquences.

De nombreux pics apparaissent en g_3 , qui ne sont pas observés en g_1 . Un fait remarquable concerne les pics étiquetés (4,4') et (5,5'). Ceux-ci sont à la même fréquence quelle que soit l'orientation choisie. Ceci, ainsi que l'intensité et l'aspect symétrique de ces pics, nous indique qu'ils sont associées à des transitions *double quantum* ($\Delta m_I = \pm 2$) de deux noyaux ¹⁴N distincts (Maryasov et Bowman, 2004). On obtient ainsi pour un premier noyau :

$$\begin{aligned}\nu_{dq+} &= 3,5 \text{ MHz} \\ \nu_{dq-} &= 2,4 \text{ MHz}\end{aligned}$$

Et pour le deuxième noyau :

$$\begin{aligned}\nu_{dq+} &= 3,9 \text{ MHz} \\ \nu_{dq-} &= 3,1 \text{ MHz}\end{aligned}$$

De ces fréquences, nous pouvons tirer pour le premier atome (*cf* p. 65) :

$$\begin{aligned}A_{\text{iso}} &= 0,76 \text{ MHz} \\ c &= 0,96 \text{ MHz}^2\end{aligned}$$

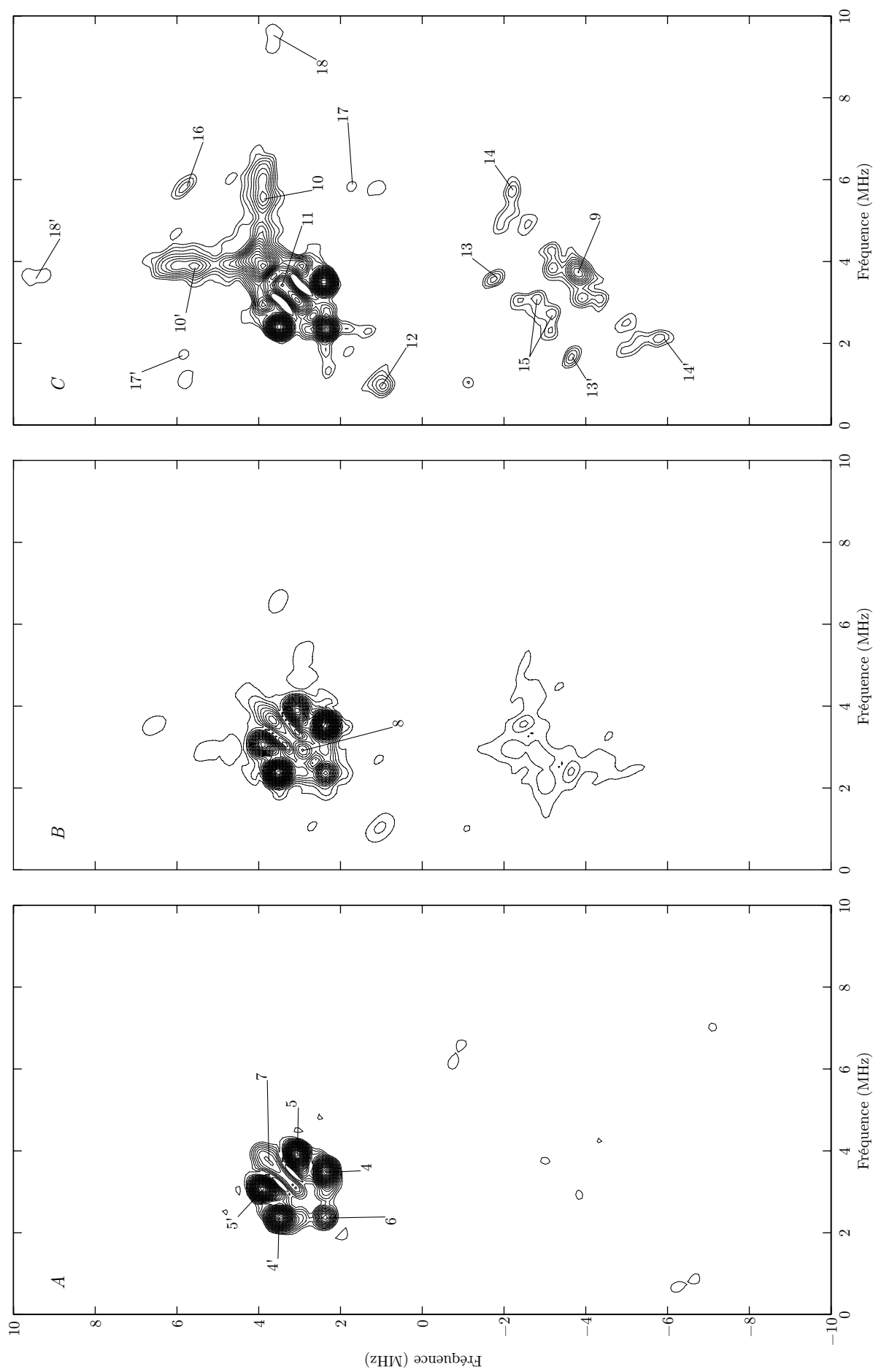


Figure 6.10 – Secteur des basses fréquences des spectres HYSCORE de l'espèce « high g nitrate » obtenue en présence de nitrate enrichi ($^{15}\text{NO}_3^-$), en g_1 (A), g_2 (B), et g_3 (C). Les index des pics sont reportés dans le tableau 6.2 p. 221. 55 K, $\tau = 136$ ns, fréquence micro-onde 9,70 GHz, fréquence de répétition 2,5 kHz. 0,3466 T, 15 tirs/point (A), 0,3484 T, 150 tirs/point (B), 0,3498 T, 50 tirs/point (C).

Tableau 6.2 – Fréquences des principaux pic relevés sur les spectres HYSCORE de la forme « high g nitrate », représentés sur les figures 6.8 (p. 217) et 6.10 (p. 220)

Pic	ν_1 (MHz)	ν_2 (MHz)
1	14,7	14,7
2	16,1	13,7
3	16,7	13,1
4	3,5	2,4
5	3,9	3,1
6	2,4	2,4
7	3,7	3,7
8	3,0	3,0
9	3,8	-3,8
10	5,6	3,9
11	3,4	3,4
12	1,0	1,0
13	3,6	-1,8
14	5,6	-2,2
15	3,0	-2,7
16	5,8	5,8
17	5,8	1,9
18	9,4	3,6

et pour le deuxième :

$$\begin{aligned} A_{\text{iso}} &= 0,65 \text{ MHz} \\ c &= 1,85 \text{ MHz}^2 \end{aligned}$$

la quantité c étant définie par :

$$c \equiv \kappa^2 (3 + \eta^2) \quad (6.1)$$

Nous avons simulé les spectres grâce au programme *Easyspin* (Stoll et Schweiger, 2006) en recherchant le paramètre d'anisotropie η par pas de 0,1 entre 0 et 1, ainsi qu'en ajustant pas à pas les valeurs des matrices $\tilde{A}_{14\text{N}}$. Les meilleures simulations sont données sur la figure 6.11. Les paramètres utilisés sont rassemblés dans le tableau 6.3. Ces simulations reproduisent correctement les pics principaux observés sur les spectres expérimentaux, mais ne reproduisent pas les motifs plus faibles qui ressortent en g_3 (spectre C de la figure 6.10, p. 220) à plus haute fréquence, dans le cadran supérieur et dans le cadran inférieur. Il faut cependant noter que le nombre d'accumulations, et donc le rapport signal/bruit, n'est pas le même sur les spectres A et C . Ces motifs (pics n° 9, 10, 13, 14, 16, 17, 18) indiquent la présence d'un couplage avec un noyau d'azote 14 supplémentaire, mais émanant probablement d'une espèce minoritaire. Des expériences complémentaires sont nécessaires pour caractériser le couplage de ce noyau supplémentaire avec le centre Mo^{V} . Le spectre HYSCORE de l'espèce « high g nitrate » générée en l'absence de nitrate est donné sur la figure 6.12. On retrouve sur ce spectre les pics de corrélation intenses (n° 4,4') et (n° 5,5'). Leur détection sur le signal RPE généré en l'absence de nitrate montre

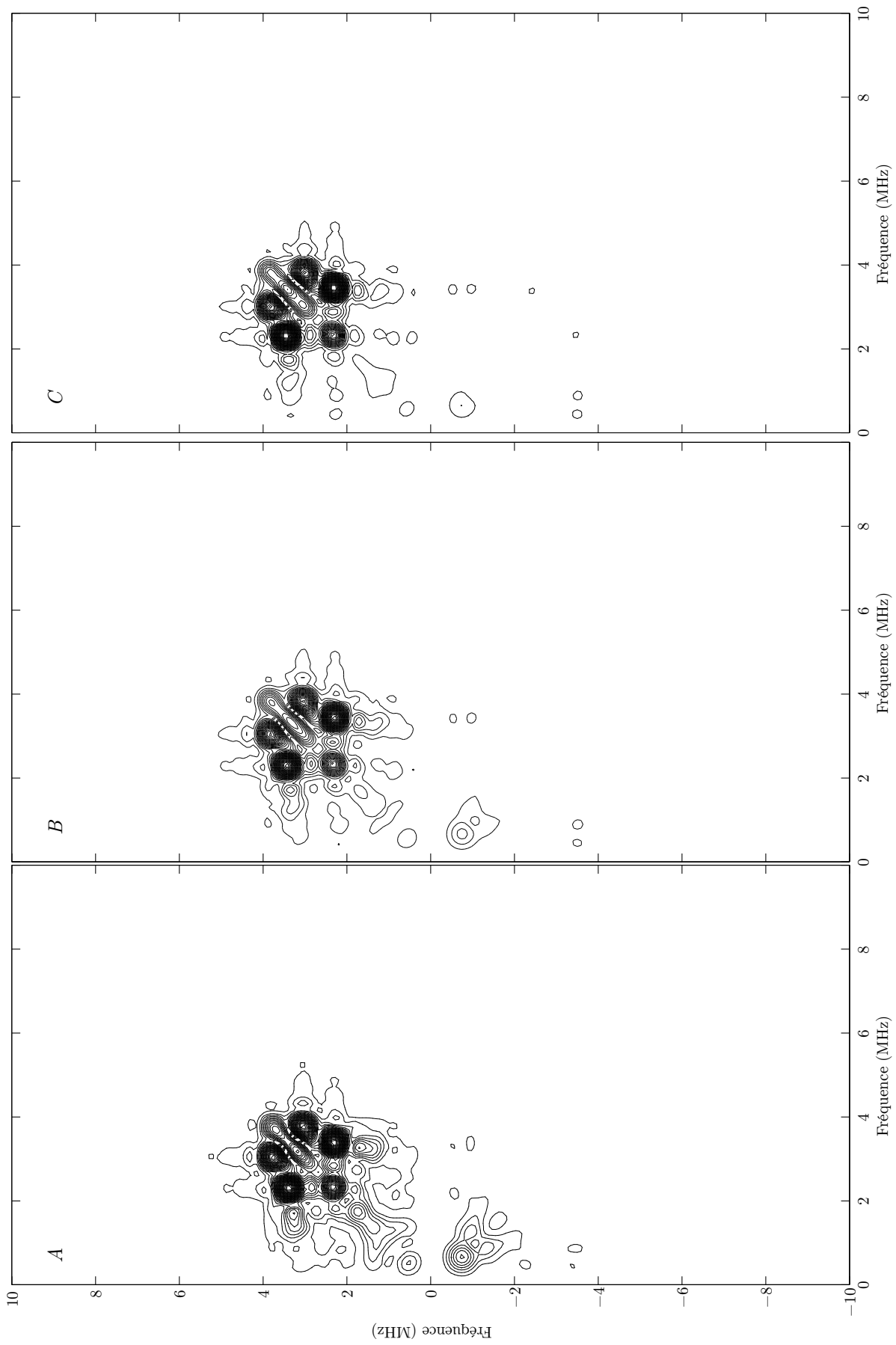


Figure 6.11 – Simulations des spectres HYSCORE en bande X de l'espèce « high g nitrate » pour g_1 (A), g_2 (B) g_3 (C). Les paramètres de simulation sont regroupés dans le tableau 6.3 p. 223

Tableau 6.3 – Paramètres des simulations du spectre HYSCORE de l’espèce « high g nitrate » présentés sur la figure 6.11

g_1	1,998	
g_2	1,988	
g_3	1,981	
Noyau	^{14}N	^{14}N
A_1 (MHz)	0,65	0,53
A_2 (MHz)	0,80	0,72
A_3 (MHz)	0,83	0,70
c	0,96	1,88
η	0,9	0,6
ν_{mw} (GHz)	9,699 424	

clairement que les noyaux correspondants appartiennent à la protéine et non pas à un ion nitrate ou nitrite.

Confirmation du couplage à deux ^{14}N La figure 6.13 (panneau *A*) montre le spectre HYSCORE en bande Q de la forme « high g nitrate » générée en présence de nitrate enrichi en azote 15. Une séquence à six impulsions au lieu de quatre a été utilisée pour améliorer le rapport signal/bruit et s’affranchir des effets de suppression croisée. Cette procédure est responsable des pics diagonaux intenses sur le spectre, artefactuels. Le spectre montré sur le panneau *B* a été simulé avec les mêmes paramètres que ceux utilisés pour la bande X (tableau 6.3). Les quatre pics intenses à (8,5 ; 6,9) MHz et (8,6 ; 7,3) MHz, qui correspondent aux fréquences double-quanta de deux noyaux ^{14}N , sont reproduits très correctement par la simulation. Cette expérience confirme que ces couples de pics proviennent du couplage avec deux noyaux ^{14}N .

Pour tenter d’attribuer les couplages observés à un atome particulier, nous pouvons examiner la structure cristallographique. Le tableau 6.4 répertorie les atomes d’azote distants de moins de 6 Å du Mo^{VI} (les cristaux ont été obtenus en conditions aérobies) dans les structures cristallographiques de NapAB de *R. sphaeroides* (1OGY) et de *C. necator* (3ML1).

Aucun couplage avec un atome d’azote provenant du substrat n’a pu être détecté pour le moment par cette approche. Un noyau d’azote 15 possède une fréquence de LARMOR de 1,5 MHz en bande X. Aucun motif n’est retrouvé autour de cette fréquence. Les noyaux d’azote couplés avec le centre Mo^{V} n’appartiennent donc pas à un ion nitrate ou nitrite.

6.4 Discussion

L’utilisation de la spectroscopie HYSCORE sur les signaux « high g » de NapA a révélé de profondes différences entre l’état « high g resting » et l’état « high g nitrate ». Alors que les spectres HYSCORE du premier sont dominés par les couplages (à haute fréquence) avec les protons β de la cystéine qui coordine le

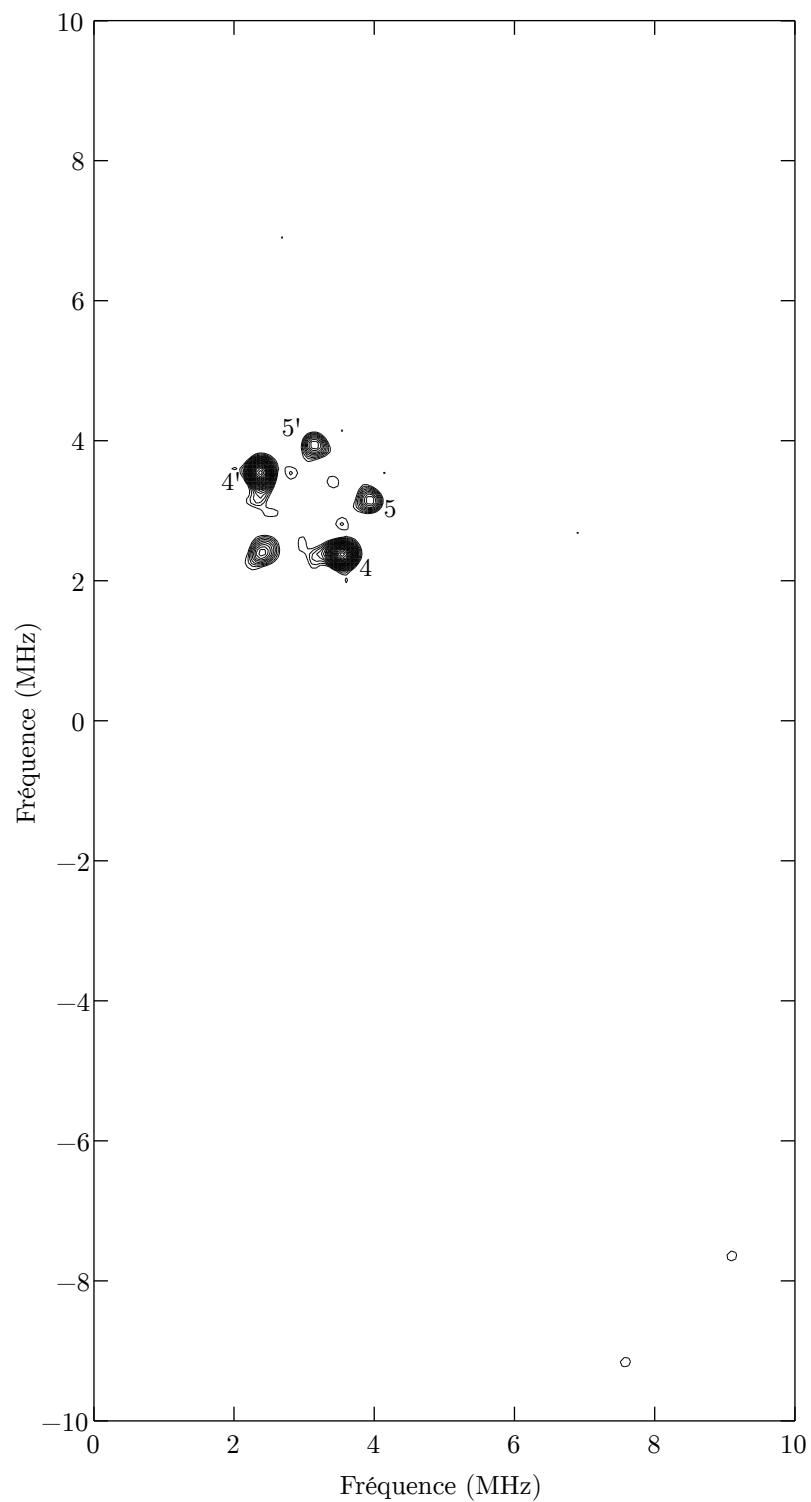


Figure 6.12 – Spectre HYSORE de la forme Mo^{V} « high g nitrate » générée en l'absence de nitrate. 55 K, $\tau = 136$ ns, fréquence micro-onde 9,702 GHz, fréquence de répétition 2 kHz, champ magnétique : 0,3485 T, 1 scan.

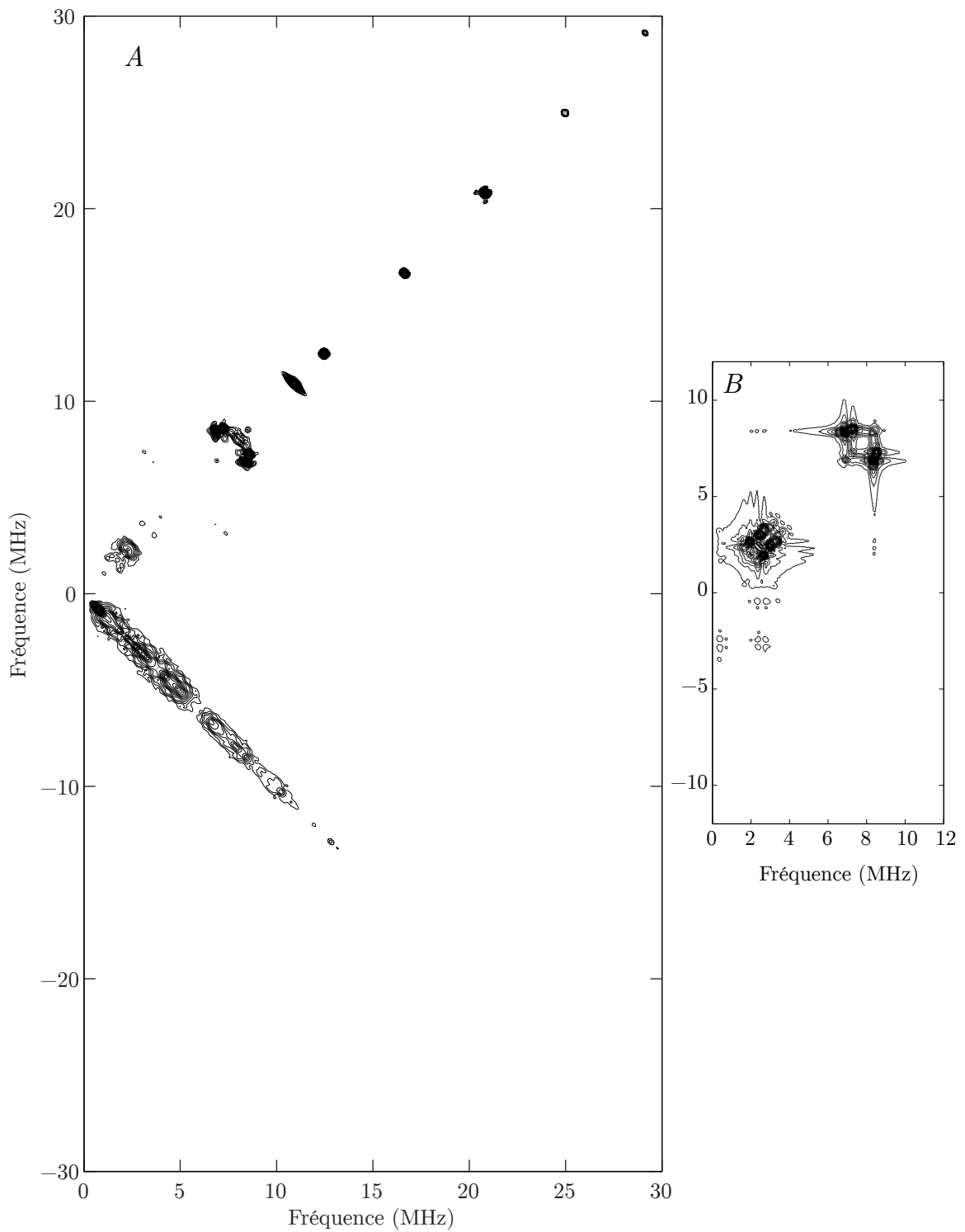


Figure 6.13 – Spectre HSCORE à six impulsions en bande Q de l'espèce « high g nitrate » générée avec $^{15}\text{NO}_3^-$ (A). 55 kelvin, 33,67 GHz, 1,2099 T, $\tau_1 = \tau_2 = 200$ ns, 50 tirs/point, fréquence de répétition 2 kHz. B : Simulation, secteur basses fréquences, utilisant les paramètres du tableau 6.3.

Tableau 6.4 – Distances azote – molybdène (en ångström), inférieures à 6 Å, calculées d’après la structure cristallographique de NapAB de *R. sphaeroides* (1OGY, résolution 3,2 Å), ainsi que d’après celle de *C. necator* (3ML1, résolution 1,5 Å). On notera que l’atome le plus proche du Mo dans 1OGY sort de la sphère des 6 Å dans 3ML1

Atome	Structure	
	1OGY	3ML1
Gln384 N ^{ε2}	4,1	6,2
Gln384 O ^{ε1}	nd	4,7
Gln384 N	4,1	4,4
Gly383 N	4,6	4,8
Arg694 N ^{η2}	4,7	3,7
Arg694 N ^{η2}	4,7	5,4
Arg694 N ^ε	nd	5,4
His700 N ^{ε2}	4,7	4,4
Cys152 N	5,0	5,8
P-PGD N ⁵	5,1	5,2
Q-PGD N ⁵	5,5	5,4
Met153 N	5,6	5,8
His700 N ^{δ1}	5,9	5,9

Mo^V, les spectres du second présentent des pics très intenses à basse fréquences. Vraisemblablement, le couplage avec les noyaux en question conduit à un effet de suppression des modulations de haute fréquence.

L’enregistrement des spectres sur les trois direction principales de \tilde{g} ainsi que l’utilisation de la bande Q a permis d’attribuer sans ambiguïté ces corrélations à *deux* noyaux d’azote ¹⁴N. Ces noyaux appartiennent à la protéine, et non à un ion nitrate ou nitrite, puisque les corrélations sont retrouvées sur le spectre HYSORE d’un signal « high g nitrate » généré *sans nitrate*.

Un examen de la structure cristallographique de nitrate réductases périplasmiques montre que plusieurs atomes d’azote peuvent de donner lieu à ces couplages de part leur proximité avec le Mo. Les meilleurs candidats sont les atomes d’azote η (terminaux) de l’arginine 694, ainsi que les atomes d’azote de la glutamine 384.

Les couplages avec ces noyaux apparaissent sur la forme « high g nitrate », c’est à dire *après* l’activation de l’enzyme par réduction. Selon le mécanisme donné dans le chapitre 4 (p. 164), l’activation par réduction conduit deux atomes d’azote de la ptérine proximale à devenir donneur de liaison hydrogène. Or, la structure cristallographique montre qu’il existe une liaison hydrogène entre les azote n° 5 des deux pyranoptérines et l’arginine 694 (voir la figure 6.15).

Un liaison hydrogène existe aussi entre la ptérine proximale et l’histidine 700. Le réarrangement de la ptérine que nous proposons dans le chapitre 4 est susceptible de déplacer la densité de spin vers l’un de ces noyaux, donnant lieu au couplage observé. L’évolution des spectres HYSORE entre l’état « as prepared » (« high g resting » – [Fe₄S₄]²⁺) et l’état « high g nitrate » – [Fe₄S₄]⁺ *via* l’état « high g resting » – [Fe₄S₄]⁺ renforce cette interprétation. Alors qu’aucun pic de corrélation (hors diagonales) à l’azote n’est détecté sur la forme « high g resting » – [Fe₄S₄]²⁺,

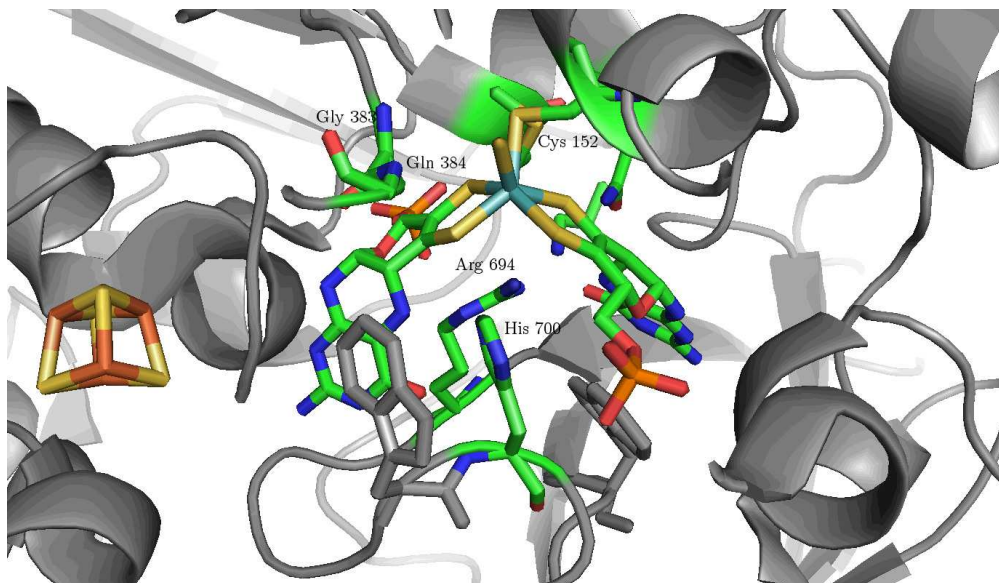


Figure 6.14 – Atomes d'azote à proximité du Mo^{VI} dans la structure cristallographique 3ML1 (NapAB de *C. necator*)

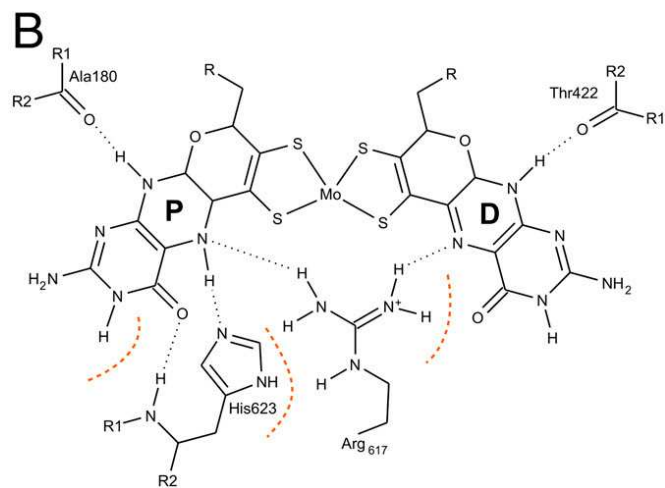


Figure 6.15 – Représentation des résidus en liaison hydrogène avec les ptérines (P : proximale, D : distale), à proximité du Mo, dans NapAB de *C. necator* (Rothery *et al.*, 2012)

une corrélation à (2,4 ; 3,1) MHz apparaît sur la forme « high *g* resting » – FeSred, qui est *en cours d'activation*, et est dominante sur la forme « high *g* nitrate », générée *après activation*. Ainsi, la présence discrète de cette corrélation sur le spectre de l'espèce « high *g* resting » – $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^+$ montre bien que c'est le processus d'activation par réduction qui déplace la densité de spin vers le noyau d'azote ^{14}N en question.

Pour tester ces conclusions, des calculs DFT sur des modèles étendus seront nécessaires. L'étude de mutants où l'un des résidus susnommés est muté permettrait également d'éliminer certaines hypothèses. Une approche par marquage isotopique sélectif de certains acides aminés (histidine, arginine) est une autre stratégie possible, bien que techniquement plus délicate.

Les spectres RPE en onde continue de l'espèce « high *g* nitrate » présentés ici montrent qu'une proportion non négligeable du Mo^{V} est sous la forme « high *g* turnover ». Le contrôle avec un échantillon sans nitrate n'a pas montré de différence flagrante. On y retrouve les mêmes couplages intenses avec deux ^{14}N , ce qui nous montre que ceux-ci n'émanent pas de la forme « high *g* turnover ». Cependant, un ou plusieurs autres noyaux ont pu être détectés, soit en sélectionnant la direction g_3 (un ^{14}N) en bande X, soit en bande Q. Les pics en question sont de faible intensité, ce qui rend les comparaisons très délicates.

Pour attribuer ces pics à l'espèce Mo^{V} et au noyau correct, il sera d'abord nécessaire de maîtriser la génération de l'espèce « high *g* turnover ». Les concentrations en nitrate utilisées dans cette étude sont supérieures à 0,1 M, et il est possible qu'une petite fraction du Mo^{V} corresponde à une forme du site actif inhibée par excès de substrat.

L'atténuation des modulations dues aux protons empêche de comparer les couplages avec les noyaux d'hydrogène entre l'état « high *g* resting » et l'état « high *g* nitrate ». Une étude par double résonance (ENDOR ^1H) pourrait permettre de surmonter ce handicap.

Les résultats présentés dans ce chapitre constituent le début d'une étude approfondie de l'environnement nucléaire des espèces Mo^{V} « high *g* nitrate » et « high *g* turnover », qui doit mener à trouver la place exacte de ces espèces dans le cycle catalytique.

Discussion, conclusion et perspectives

La réduction du nitrate en nitrite est un processus fondamental pour de nombreux organismes procaryotes. Les nitrate réductases périplasmiques et cytoplasmiques partagent le même site actif. Les études cristallographiques sur des enzymes modèles, ainsi que les travaux de chimie théorique ont permis de préciser la première sphère de coordination du molybdène dans ces systèmes. C'est l'élucidation de la structure à six atomes de soufre qui, en 2008, a remis en question les mécanismes catalytiques qui avaient été proposés précédemment (Najmudin *et al.*, 2008). L'objectif de cette thèse était de progresser dans la compréhension de la réactivité de la nitrate réductase périplasmique de *R. sphaeroides* (NapAB), en s'appuyant principalement sur l'électrochimie directe et la spectroscopie RPE. Dans la littérature, plusieurs espèces paramagnétiques du cofacteur à molybdène ont été observées avec les nitrate réductases d'autres procaryotes. Cependant, la place qu'occupent ces espèces par rapport au cycle catalytique était incertaine. Au cours de mes travaux, nous nous sommes focalisés sur les espèces Mo^{V} de type « high *g* ». Ces espèces sont retrouvées dans toutes les nitrates réductases périplasmiques ou cytoplasmiques, mais avec de subtiles variations de leurs caractéristiques spectroscopiques. Les travaux effectués au BIP avant mon arrivée en thèse ont mis en évidence la réactivité complexe de NapAB. Une partie des travaux de cette thèse s'inscrit dans la continuité de ces résultats.

Dans un premier temps, nous avons travaillé à élucider le mécanisme qui conduit à l'activation irréversible de l'enzyme et à la disparition de l'espèce Mo^{V} « high *g* resting » lorsque l'enzyme subit une première réduction. Initialement, ce phénomène a été découvert par électrochimie directe. La caractérisation par chronoampérométrie avait montré la lenteur du processus d'activation, mais ne donnait pas d'indication sur le devenir de l'espèce « high *g* resting » (Fourmond *et al.*, 2008). Nous avons mis en œuvre une approche originale, consistant à mesurer l'évolution temporelle de l'amplitude du signal RPE Mo^{V} « high *g* resting » en solution fluide. Nos observations montrent la décroissance lente de ce signal au cours de cette activation. En examinant l'effet de la température sur la vitesse de ce processus quand l'enzyme est incubée avec un réducteur, nous avons estimé une énergie d'activation apparente de $(69 \pm 8) \text{ kJ mol}^{-1}$. La même valeur a été obtenue en mesurant la vitesse d'activation de l'enzyme par chronoampérométrie, montrant que la cinétique des deux phénomènes, étudiés par des approches différentes, résulte d'une seule et même étape cinétiquement déterminante. Puisque le processus se produit à bas potentiel, et conduit à la réduction de l'espèce Mo^{V} , nous avons tenté d'analyser nos données dans le cadre de la théorie des transferts d'électrons.

Cette démarche a conduit à des valeurs irréalistes pour l'énergie de réorganisation ($\lambda \simeq 2,8 \text{ eV}$), et nous amène à conclure que, dans le modèle le plus simple, une étape non-redox doit précéder le transfert d'électron vers le centre Mo^{V} . Le nouveau modèle que nous proposons permet de rendre compte de l'ensemble des observations expérimentales faites depuis 2008.

Les travaux d'électrochimie sur NapAB réalisés en 2010 au BIP ont également montré que l'enzyme s'inactive réversiblement dans des conditions de haut potentiel, haute concentration en nitrate, et pH acide (Fourmond *et al.*, 2010b). Ceci correspond à une inhibition réversible par le substrat. Cette découverte a jeté un doute sur l'interprétation de travaux reportés dans la littérature, où des espèces Mo^{V} (de type « high g ») générées en présence de grandes quantités ($0,1 \text{ mol l}^{-1}$) de nitrate ont été reliées à des intermédiaires catalytiques. Au cours de mes travaux, nous avons caractérisé en détail l'activité de NapAB à l'état stationnaire, ainsi que la cinétique de formation et de disparition des états inhibés par le substrat. Dans ce but nous avons utilisé deux méthodes chronoampérométriques. Dans la première, la concentration en substrat est incrémentée sur plusieurs ordres de grandeur, à potentiel fixé. Dans la seconde, des échelons de potentiel sont appliqués, à concentration en nitrate fixée. L'activité à l'état stationnaire déterminée par la première approche est cohérente avec un modèle simple d'inhibition par fixation d'une deuxième molécule de substrat sur le complexe de MICHAELIS. Cette forme inhibée n'a pas d'activité résiduelle. Cependant, l'étude de la cinétique d'inhibition, qui est lente comparée à la vitesse de turnover, montre que la formation des espèces inhibées ne résulte pas d'une étape élémentaire de fixation du nitrate. L'analyse des données obtenues par la seconde approche a permis de mettre en évidence l'existence de trois états redox pour les formes actives et inactives, *via* l'étude de la vitesse de disparition de ces formes en fonction du potentiel. D'une part, nous avons montré que la forme inactive semi-réduite (supposée être Mo^{V}) ne s'accumule que dans une petite plage de potentiel autour de -200 mV pour des concentrations en nitrate supérieures à 10 mM . Sa fraction maximale avoisine les 8%, ce qui suggère que l'espèce « high g nitrate » n'est pas une forme inhibée par le substrat, puisqu'elle a pu être observée dans de plus grandes proportions. D'autre part, nous avons potentiellement observé *indirectement* les potentiels de transition $\text{Mo}^{\text{VI/V}}$ et $\text{Mo}^{\text{V/IV}}$ grâce à ce phénomène d'inhibition par le substrat. Ce résultat fournit les conditions expérimentales qui permettront de piéger quantitativement une espèce Mo^{V} active, en portant l'enzyme dans la plage de potentiel déterminée. Ceci nécessitera vraisemblablement des techniques de cinétique rapide telles que le rapid-freeze quench.

La compréhension de la réactivité de l'espèce Mo^{V} « high g resting » nous a permis de progresser dans la caractérisation du cofacteur. Après la première réduction qui active l'enzyme, l'espèce Mo^{V} « high g nitrate » a été observée, en présence de nitrate, mais également en l'absence de nitrate. Comme l'espèce « high g resting » demande plusieurs dizaines de minutes pour être réduite, nous avons pu piéger la sous-unité NapA dans un état où le centre fer-soufre est réduit (donc paramagnétique), tout en conservant l'espèce « high g resting » dans des proportions appréciables. Dans le cas de l'espèce « high g nitrate », nous avons systématiquement observé que le centre fer-soufre était réduit. L'étude de ces états, où ces deux centres, distants de 13 \AA , sont simultanément paramagnétiques a mis

en évidence l'existence d'une interaction spin-spin intercentres, qui se manifeste de plusieurs façons sur le signal RPE du Mo^V. D'une part, la forme du spectre à 15 K est modifiée par des dédoublements des raies, signe de l'interaction avec un spin 1/2. D'autre part, la relaxation du signal RPE du Mo^V est accélérée par rapport à l'état où le centre fer-soufre est oxydé, donc diamagnétique. Cette accélération est une conséquence du couplage avec le centre fer-soufre, dont la relaxation spin-réseau est plus efficace. La comparaison des spectres en interaction pour les formes « high g resting » et « high g nitrate » a révélé des éclatements de raie significativement différents. De plus, la relaxation de l'espèce « high g nitrate » est plus efficace encore que celle de l'espèce « high g resting » couplée au centre fer-soufre. Ces observations qualitatives tendent à montrer que la nature et l'amplitude du couplage ont été modifiées entre l'état « high g resting » et l'état « high g nitrate ». Afin de quantifier l'interaction, nous nous sommes appuyés sur la simulation des spectres RPE en interaction, et nous avons estimé les temps de relaxation spin-réseau et spin-spin grâce à l'étude des courbes de saturation continue. Les temps de relaxation ont aussi été mesurés par RPE impulsionnelle. Par ces travaux, nous avons rendu compte du spectre de l'état « high g resting » en interaction par le terme dipolaire seul. En ajoutant un terme de HEISENBERG ($+J\vec{S}_A \cdot \vec{S}_B$) avec $J \simeq 5 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$, nous avons obtenu des modélisations correctes du spectre en interaction de l'état « high g nitrate ». Ces données originales nous permettent de proposer un modèle moléculaire qui rende compte du processus d'activation irréversible.

Nos études de saturation continue et l'analyse des spectres en interaction des signaux « high g » ont été rendues difficiles à cause de la présence des isotopes magnétiques du molybdène (⁹⁵Mo et ⁹⁷Mo). En effet, nous avons constaté que les raies supplémentaires dues au couplage avec ces noyaux se superposaient au signal principal, et ont des propriétés de relaxation légèrement différentes. La substitution isotopique par le ⁹⁸Mo ($I = 0$) aurait donc plusieurs avantages : la signature des espèces « high g » serait épurée, ce qui faciliterait leur comparaison, l'étude de la relaxation serait simplifiée, et tout le spectre RPE serait concentré dans la raie principale ($I = 0$), plutôt que d'être dispersé sur 30 mT. Le même type d'approche est à envisager pour les protons β du ligand cystéine : ceux-ci pourraient être remplacés sélectivement par des deutérons, ce qui simplifierait l'analyse des spectres « high g », notamment à basse température en interaction avec le centre $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^+$.

Pour comprendre son lien avec le cycle catalytique, nous avons tenté de corréler la fraction d'espèce « high g nitrate » formée à la concentration en nitrate. Au cours de nos essais, il est apparu que l'espèce « high g nitrate » était obtenue en quantité maximale avec la sous-unité NapA, et en présence de grandes concentrations en nitrate (0,1 M). Dans ces conditions, nous avons également détecté une autre espèce « high g », dont le signal se superpose au signal « high g nitrate ». Cette espèce ressemble à la forme « high g turnover » observée dans NapA de *D. desulfuricans* (González *et al.*, 2006; Najmudin *et al.*, 2008). Elle a également été détectée en très faible proportion dans NapAB oxydée au nitrate. Il sera important à l'avenir de maîtriser la réactivité du système pour que les études spectroscopiques ne portent que sur une seule espèce à la fois.

L'existence d'une sphère de coordination à six atomes de soufre, qui semble caractéristique des espèce Mo^V « high g » (Biaso *et al.*, 2012), invalide les mécanismes

catalytiques initialement proposés, où le nitrate se coordine à une espèce Mo^{IV} coordonnée par deux dithiolènes et une cystéine. D'autres mécanismes, procédant par sphère interne (avec « sulfur shift ») ou par sphère externe ont été proposés, sur la base de considérations théoriques (Metz, 2011). Devant le manque d'observations expérimentales, et l'absence de différence visible sur les spectres en onde continue, l'étude de NapA par spectroscopie hyperfine à haute résolution a pour objectif d'explorer l'environnement nucléaire du Mo^{V} dans les différentes espèces « high g ». C'est ainsi que nous avons commencé à caractériser les formes « high g resting » et « high g nitrate » par spectroscopie HYSORE. Dans le cas de l'espèce « high g resting », le spectre hyperfin est dominé par les contributions des protons, mais nous avons eu la surprise de détecter un couplage au ^{13}C , que nous pouvons tenter d'attribuer au carbone β de la cystéine. Les spectres HYSORE de la forme « high g nitrate » (obtenue en présence de nitrate) présentent des différences flagrantes avec ceux de la forme « high g resting ». Les pics dominants y sont dans le secteur des basses fréquences, et sont présents que l'échantillon soit préparé avec du $^{14}\text{NO}_3^-$, du $^{15}\text{NO}_3^-$, ou encore en l'absence de nitrate. Ces pics intenses ont ainsi été attribués à deux noyaux ^{14}N de la protéine. L'observation de ces couplages dans la protéine *après activation* suggère que l'activation par réduction a eu pour conséquence de déporter la densité de spin vers ces deux atomes d'azote. Au vu des structures cristallographiques, plusieurs noyaux sont susceptibles de donner lieu aux couplages observés. Des calculs de type DFT sur des modèles étendus du site actif, ainsi que des substitutions isotopiques sélectives (histidine, arginine) seraient nécessaires pour attribuer sans ambiguïté ces couplages à leurs atomes respectifs. Par ailleurs, il sera essentiel de pouvoir générer les espèces « high g nitrate » et « high g turnover » séparément, pour savoir si l'une ou l'autre de ces espèce donne une contribution particulière sur les spectres HYSORE. Un autre objectif des études par HYSORE est la compréhension de la place des espèce « high g » dans le cycle catalytique. Pour cela, il est crucial de détecter une éventuelle interaction avec un atome du substrat. Dans l'hypothèse où un couplage avec un atome d'azote ^{14}N exogène (*n'appartenant pas* à la protéine) serait détecté par HYSORE, il serait intéressant de déterminer ses paramètres quadrupolaires. En effet, leur analyse pourraient indiquer si le noyau en question appartient à un ion nitrate ou nitrite, qui est le produit de l'enzyme.

En effet, le lien entre les espèces « high g nitrate » et « high g turnover » et le cycle catalytique reste à élucider. Puisque le nitrate n'est vraisemblablement pas coordonné au Mo^{V} , il se peut que l'une ou l'autre de ces espèce soit produite pendant la réduction séquentielle du site actif, qui intervient après la libération du nitrite. La plupart des signaux Mo^{V} obtenus en conditions catalytiques dans les enzymes à molybdène sont en effet des signaux de sites actifs en cours de régénération. C'est le cas des signaux « rapid » de la xanthine oxydase (Hille *et al.*, 1993), ou du signal « high g » de la DMSO réductase (Mtei *et al.*, 2011).

L'activation par réduction de l'enzyme est un processus lent, irréversible, et dont l'énergie d'activation est élevée. D'après les conclusions du chapitre 3, le transfert d'électron ne peut avoir lieu qu'une fois cette étape limitante achevée. Les observations du chapitre 4 indiquent que la nature du couplage intercentres est modifiée par l'activation de l'enzyme. Il est nécessaire de prendre en compte un couplage d'échange entre le centre fer-soufre et le Mo^{V} . Enfin, la densité de spin

est déplacée vers deux atomes d'azote de la protéine. Toutes ces observations nous font penser que l'activation repose sur un réarrangement de la ptérine proximale (qui est située *entre* le fer-soufre et le molybdène). La réactivité de composés analogues des pyranoptérines montre que la fermeture du cycle pyrane est possible, et réversible, en solution, et qu'elle dépend de l'état d'oxydation de la ptérine (Williams *et al.*, 2012). De plus, certaines structures cristallographiques d'enzymes à *bis*(PGD) montrent des ptérines où le cycle pyrane est ouvert (Bertero *et al.*, 2003; Kloer *et al.*, 2006).

Nous proposons donc que l'inactivité de l'espèce « high *g* resting » vienne du fait que la ptérine proximale est oxydée, et que le cycle pyrane est ouvert. La réduction de l'enzyme permettrait de stabiliser par réduction la forme fermée, bloquant ainsi la pyranoptérine dans une conformation physiologique qui permet le transfert d'électrons du centre fer-soufre vers le molybdène.

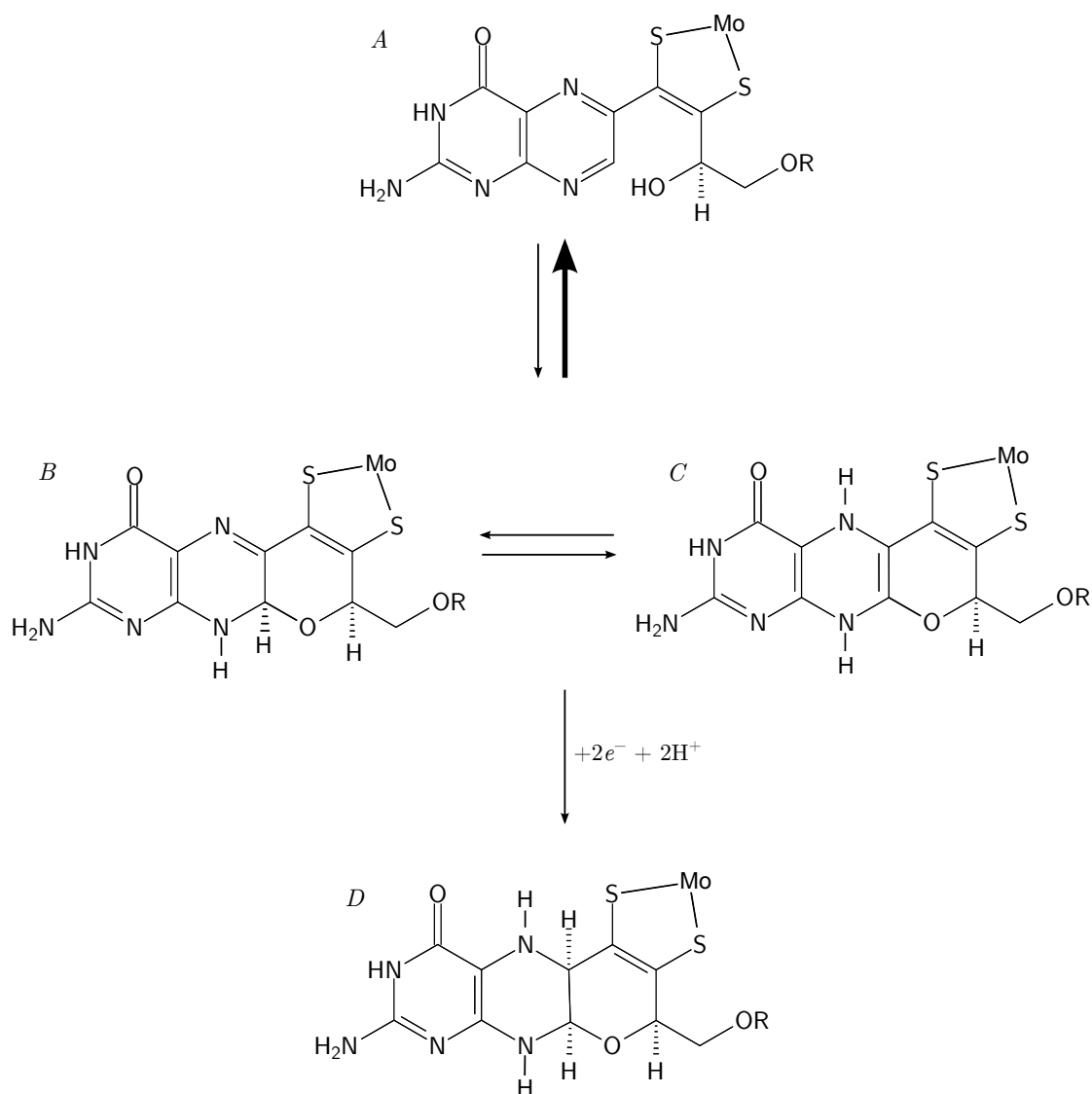


Schéma 6.2 – Mécanisme proposé pour l'activation par réduction de l'enzyme

Le réarrangement conduirait à la création de liaisons hydrogène avec certains acides aminés azotés proches du site actif, ce qui donnerait lieu aux couplages

observées par spectroscopie HYSORE. Par ailleurs, un résidu conservé dans les nitrate réductase et les formiate déshydrogénases a été proposé par DIAS et coll. pour servir de pont au transfert d'électron « through bond » entre le centre fer-soufre et le molybdène *via* la ptérine : il s'agit de la lysine 56, située entre le cycle pyrimidine et le cluster fer-soufre (Dias *et al.*, 1999). La mutation de ce résidu a un impact sur l'activité de l'enzyme (Hettmann *et al.*, 2003; Srivastava *et al.*, 2013). La production de protéines NapAB mutées sur ce résidu a été commencée par nos collaborateurs du Laboratoire de Bioénergétique Cellulaire. Notre ambition est de tester l'hypothèse proposée par DIAS et coll. en étudiant le couplage spin-spin $\text{Mo}^{\text{V}} - [\text{Fe}_4\text{S}_4]^+$ dans ces mutants. La réponse expérimentale à cette question permettrait de contribuer au débat sur les mécanismes de transfert d'électrons dans les protéines (Page *et al.*, 1999; Moser *et al.*, 2010; Beratan *et al.*, 1992; Warren *et al.*, 2012).

L'activation par réduction est un phénomène qui a déjà été rapporté dans les enzymes à Mo-*bis*(PGD). Dans la DMSO réductase périplasmique, la réduction puis la réoxydation de l'enzyme conduit à la simplification du spectre RAMAN de l'enzyme, ce qui montre que l'hétérogénéité résidait dans la première sphère de coordination du molybdène (Bray *et al.*, 2000; Bell *et al.*, 2001). Dans le cas de la nitrate réductase périplasmique de *D. desulfuricans*, les premiers cristaux ont révélé la présence d'une méthionine sulfoxyde à proximité (4 Å) du site actif. Les auteurs ont proposé que la réduction de cette méthionine soit une réaction secondaire qui, lors de la première réduction de l'enzyme, conduit à son activation (Dias *et al.*, 1999). L'activation par réduction de la nitrate réductase NarGH de *E. coli* et de la nitrate réductase cytoplasmique de *Synechococcus elongatus* ont été observées par électrochimie directe (Field *et al.*, 2005), mais aucun nouveau mécanisme n'a été proposé. Récemment, l'étude par cristallographie du mécanisme d'activation de l'aldéhyde oxydoréductase à Mo a révélé un mécanisme relevant de la chimie de la fonction dithiolène.

Les études de l'inactivation de la sulfite oxydase par le ferricyanure ont mené GARDLIK et coll. à pointer le rôle de l'état d'oxydation de la ptérine dans le transfert d'électrons intramoléculaire (Gardlik et Rajagopalan, 1991). L'activation de la sulfite déshydrogénase *R. capsulatus* a été observée par voltammétrie cyclique lors du passage à *haut potentiel*. Ceci a mené à la proposition d'une implication de la chimie redox de la pyranoptérine dans l'activation ou l'inactivation de l'enzyme (figure 6.16). Pour ces derniers auteurs, la ptérine est *entièrement saturée* dans la forme inactive de l'enzyme. Le mécanisme que nous proposons est symétrique en quelque sorte de celui qu'ils proposent.

Le mécanisme que nous proposons est basé sur plusieurs observations expérimentales, à la fois électrochimiques et spectroscopique, et est assez original pour une enzyme à Mo-*bis*(PGD) Il demande à être confirmé ou invalidé par des analyses chimiques ou spectroscopiques des ptérines.

Les perspectives proposées ci-dessus nécessitent de disposer de grandes quantité de matériel biologique, chose qui a été un facteur limitant tout au long de ces travaux. Pour produire la protéine en plus grande quantité, nous avons tenté d'augmenter les volumes de culture, et les essais en fermenteur sont encore en cours d'optimisation.

Les études présentées dans cette thèse ont permis de proposer un modèle de la

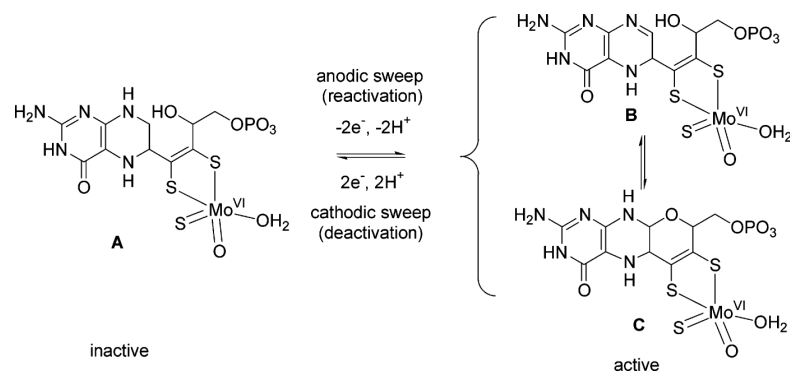


Figure 6.16 – Proposition de mécanisme d’(in)activation *réversible* par oxydation de la sulfite déshydrogénase (Aguey-Zinsou *et al.*, 2003)

réactivité de l’espèce « high *g* resting ». Nos travaux ont montré l’importance des ptérines dans la réactivité du cofacteur à molybdène (modulation des propriétés thermodynamiques du centre à Mo et de l’efficacité du transfert d’électrons), et leur rôle précis dans la catalyse reste à élucider. Cette thèse appelle ainsi à de nouveaux travaux d’électrochimie, de cinétique rapide et de spectroscopie avancée, qui devront permettre d’élucider la structure et la pertinence catalytique des espèce « high *g* nitrate » et « high *g* turnover », et fournir une compréhension globale du cycle catalytique.

Bibliographie

- AASA, R. et VÄNNGÅRD, T. (1975). EPR signal intensity and powder shapes : A reexamination. *J. Mag. Res. (1969)*, 19(3):308 – 315.
- AGUEY-ZINSOU, K. F., BERNHARDT, P. V. et LEIMKÜHLER, S. (2003). Protein film voltammetry of rhodobacter capsulatus xanthine dehydrogenase. *J. Am. Chem. Soc.*, 125(50):15352–15358.
- ARNOUX, P., SABATY, M., ALRIC, J., FRANGIONI, B., GUIGLIARELLI, B., ADRIANO, J.-M. et PIGNOL, D. (2003). Structural and redox plasticity in the heterodimeric periplasmic nitrate reductase. *Nat. Struct. Biol.*, 10(11):928 – 934.
- ASTASHKIN, A. V., JOHNSON-WINTERS, K., KLEIN, E. L., BYRNE, R. S., HILLE, R., RAITSIMRING, A. M. et ENEMARK, J. H. (2007). Direct demonstration of the presence of coordinated sulfate in the reaction pathway of *Arabidopsis thaliana* sulfite oxidase using ³³S labeling and ESEEM spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.*, 129(47):14800 – 14810.
- BARBER, M. J., MAY, H. D. et FERRY, J. G. (1986). Inactivation of formate dehydrogenase from *Methanobacterium formicicum* by cyanide. *Biochemistry*, 25(25):8150–8155.
- BASTIAN, N. R., KAY, C. J., BARBER, M. J. et RAJAGOPALAN, K. V. (1991). Spectroscopic studies of the molybdenum-containing dimethyl sulfoxide reductase from *Rhodobacter sphaeroides* f. sp. *denitrificans*. *J. Biol. Chem.*, 266(1):45–51.
- BASU, P. et BURGMAYER, S. J. N. (2011). Pterin chemistry and its relationship to the molybdenum cofactor. *Coord. Chem. Rev.*, 255(9 - 10):1016 – 1038.
- BELL, A. F., HE, X., RIDGE, J. P., HANSON, G. R., MCEWAN, A. G. et TONGE, P. J. (2001). Active site heterogeneity in dimethyl sulfoxide reductase from *Rhodobacter capsulatus* revealed by Raman spectroscopy. *Biochemistry*, 40(2): 440–448.
- BENNETT, B., BERKS, B. C., FERGUSON, S. J., THOMSON, A. J. et RICHARDSON, D. J. (1994). Mo(V) electron paramagnetic resonance signals from the periplasmic nitrate reductase of *Thiosphaera pantotropha*. *Eur. J. Biochem.*, 226(3):789 – 798.
- BENNETT, B., CHARNOCK, J. M., SEARS, H. J., BERKS, B. C., THOMSON, A. J., FERGUSON, S. J., GARNER, C. D. et RICHARDSON, D. J. (1996). Structural investigation of the molybdenum site of the periplasmic nitrate reductase from *Thiosphaera pantotropha* by x-ray absorption spectroscopy. *Biochem. J*, 317 - Pt - 2:557 – 563.

- BENSON, N., FARRAR, J. A., MCEWAN, A. G. et THOMSON, A. J. (1992). Detection of the optical bands of molybdenum(V) in DMSO reductase (*Rhodobacter capsulatus*) by low-temperature MCD spectroscopy. *FEBS Lett.*, 307(2):169 – 172.
- BERATAN, D., ONUCHIC, J., WINKLER et GRAY, H. (1992). Electron-tunneling pathways in proteins. *Science*, 258(5089):1740–1741.
- BERTERO, M. G., ROTHERY, R. A., PALAK, M., HOU, C., LIM, D., BLASCO, F., WEINER, J. H. et STRYNADKA, N. C. J. (2003). Insights into the respiratory electron transfer pathway from the structure of nitrate reductase a. *Nat. Struct. Biol.*, 10(9):681 – 687.
- BERTRAND, P. (1991). Application of electron transfer theories to biological systems. In *Long-Range Electron Transfer in Biology*, volume 75 de *Structure and Bonding*, pages 1–47. Springer Berlin Heidelberg.
- BERTRAND, P., FRANGIONI, B., DEMENTIN, S., SABATY, M., ARNOUX, P., GUIGLIARELLI, B., PIGNOL, D. et LÉGER, C. (2007). Effects of slow substrate binding and release in redox enzymes : Theory and application to periplasmic nitrate reductase. *J. Phys. Chem. B*, 111(34):10300 – 10311.
- BERTRAND, P., MORE, C., GUIGLIARELLI, B., FOURNEL, A., BENNETT, B. et HOWES, B. (1994). Biological polynuclear clusters coupled by magnetic interactions : From the point dipole approximation to a local spin model. *J. Am. Chem. Soc.*, 116(7):3078–3086.
- BEVERS, L. E., HAGEDOORN, P.-L. et HAGEN, W. R. (2009). The bioinorganic chemistry of tungsten. *Coord. Chem. Rev.*, 253(3-4):269 – 290.
- BIASO, F., BURLAT, B. et GUIGLIARELLI, B. (2012). DFT investigation of the molybdenum cofactor in periplasmic nitrate reductases : Structure of the Mo(V) EPR-active species. *Inorg. Chem.*, 51(6):3409 – 3419.
- BOLL, M., FUCHS, G., MEIER, C., TRAUTWEIN, A., EL KASMI, A., RAGSDALE, S. W., BUCHANAN, G. et LOWE, D. J. (2001). Redox centers of 4-hydroxybenzoyl-CoA reductase, a member of the xanthine oxidase family of molybdenum-containing enzymes. *J. Biol. Chem.*, 276(51):47853–47862.
- BONIN, I., MARTINS, B. M., PURVANOV, V., FETZNER, S., HUBER, R. et DOBBEK, H. (2004). Active site geometry and substrate recognition of the molybdenum hydroxylase quinoline 2-oxidoreductase. *Structure*, 12(8):1425–1435.
- BRAY, R. C., ADAMS, B., SMITH, A. T., BENNETT, B. et BAILEY, S. (2000). Reversible dissociation of thiolate ligands from molybdenum in an enzyme of the dimethyl sulfoxide reductase family. *Biochemistry*, 39(37):11258 – 11269.
- BRAY, R. C., MALMSTROM, B. G. et VANNGARD, T. (1959). The chemistry of xanthine oxidase. Electron-spin resonance of xanthine oxidase solutions. *Biochem. J.*, 73:193–197.
- BRAY, R. C. et MERIWETHER, L. S. (1966). Electron spin resonance of xanthine oxidase substituted with molybdenum-95. *Nature*, 212(5061):467–469.
- BRIGÉ, A., LEYS, D., MEYER, T. E., CUSANOVICH, M. A. et VAN BEEUMEN, J. J. (2002). The 1.25 Å resolution structure of the diheme NapB subunit of soluble nitrate reductase reveals a novel cytochrome c fold with a stacked heme arrangement. *Biochemistry*, 41(15):4827–4836.

- BROKX, S. J., ROTHERY, R. A., ZHANG, G., NG, D. P. et WEINER, J. H. (2005). Characterization of an *Escherichia coli* sulfite oxidase homologue reveals the role of a conserved active site cysteine in assembly and function. *Biochemistry*, 44(30):10339–10348.
- BURSAKOV, S., LIU, M. Y., PAYNE, W. J., LEGALL, J., MOURA, I. et MOURA, J. J. (1995). Isolation and preliminary characterization of a soluble nitrate reductase from the sulfate reducing organism *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774. *Anaerobe*, 1(1):55 – 60.
- BURSAKOV, S. A., CARNEIRO, C., ALMENDRA, M. J., DUARTE, R. O., CALDEIRA, J., MOURA, I. et MOURA, J. J. (1997). Enzymatic properties and effect of ionic strength on periplasmic nitrate reductase (NAP) from *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 239(3):816 – 822.
- BUTLER, C. S., CHARNOCK, J. M., BENNETT, B., SEARS, H. J., REILLY, A. J., FERGUSON, S. J., GARNER, C. D., LOWE, D. J., THOMSON, A. J., BERKS, B. C. et RICHARDSON, D. J. (1999). Models for molybdenum coordination during the catalytic cycle of periplasmic nitrate reductase from *Paracoccus denitrificans* derived from EPR and EXAFS spectroscopy. *Biochemistry*, 38(28):9000 – 9012.
- BUTLER, C. S., CHARNOCK, J. M., GARNER, C. D., THOMSON, A. J., FERGUSON, S. J., BERKS, B. C. et RICHARDSON, D. J. (2000). Thiocyanate binding to the molybdenum centre of the periplasmic nitrate reductase from *Paracoccus pantotrophus*. *Biochem. J*, 352 - Pt - 3:859 – 864.
- BUTLER, C. S., FAIRHURST, S. A., FERGUSON, S. J., THOMSON, A. J., BERKS, B. C., RICHARDSON, D. J. et LOWE, D. J. (2002). Mo(V) co-ordination in the periplasmic nitrate reductase from *Paracoccus pantotrophus* probed by electron nuclear double resonance (ENDOR) spectroscopy. *Biochem. J*, 363(Pt - 3):817 – 823.
- CALDEIRA, J., BELLE, V., ASSO, M., GUIGLIARELLI, B., MOURA, I., MOURA, J. J. G. et BERTRAND, P. (2000). Analysis of the electron paramagnetic resonance properties of the [2Fe-2S]¹⁺ centers in molybdenum enzymes of the xanthine oxidase family :Assignment of signals I and II. *Biochemistry*, 39(10):2700–2707.
- CANNE, C., LOWE, D. J., FETZNER, S., ADAMS, B., SMITH, A. T., KAPPL, R., BRAY, R. C. et HÜTTERMANN, J. (1999). Kinetics and interactions of molybdenum and iron-sulfur centers in bacterial enzymes of the xanthine oxidase family : Mechanistic implications. *Biochemistry*, 38(42):14077 – 14087.
- CECCALDI, P. (2013). *Identification des déterminants moléculaires de la réactivité d'une molybdoenzyme modèle : la nitrate réductase A d'Escherischia coli*. Thèse de doctorat, Aix-Marseille Université.
- CERQUEIRA, N. M. F. S. A., GONZÁLEZ, P. J., BRONDINO, C. D., ROMÃO, M. J., ROMÃO, C. C., MOURA, I. et MOURA, J. J. G. (2009). The effect of the sixth sulfur ligand in the catalytic mechanism of periplasmic nitrate reductase. *J. Comp. Chem.*, 30(15):2466–2484.

- CHAN, M., MUKUND, S., KLETZIN, A., ADAMS, M. et REES, D. (1995). Structure of a hyperthermophilic tungstopterin enzyme, aldehyde ferredoxin oxidoreductase. *Science*, 267(5203):1463–1469.
- COATES, J. D. et ACHENBACH, L. A. (2004). Microbial perchlorate reduction : rocket-fuelled metabolism. *Nat. Rev. Micro.*, 2(7):569–580.
- COELHO, C., GONZÁLEZ, P. J., MOURA, J. G., MOURA, I., TRINCÃO, J. et ROMÃO, M. J. (2011). The crystal structure of *Cupriavidus necator* nitrate reductase in oxidized and partially reduced states. *J. Mol. Biol.*, 408(5):932 – 948.
- CULLIS, P. (1976). Electron paramagnetic resonance in inhomogeneously broadened systems : A spin temperature approach. *J. Mag. Res. (1969)*, 21(3):397 – 418.
- CZYZEK, M., SANTOS, J.-P. D., POMMIER, J., GIORDANO, G., MÉJEAN, V. et HASER, R. (1998). Crystal structure of oxidized trimethylamine N-oxide reductase from *Shewanella massilia* at 2.5 Å resolution. *J. Mol. Biol.*, 284(2): 435 – 447.
- DANCE, I. (2013). Nitrogenase : a general hydrogenator of small molecules. *Chem. Commun.*, 49:10893–10907.
- DAVIDSON, V. L. (1996). Unraveling the kinetic complexity of interprotein electron transfer reactions. *Biochemistry*, 35(45):14035–14039.
- DAVIDSON, V. L. (2002). Chemically gated electron transfer. A means of accelerating and regulating rates of biological electron transfer. *Biochemistry*, 41(50):14633 – 14636.
- DAVIDSON, V. L. (2008). Protein control of true, gated, and coupled electron transfer reactions. *Acc. Chem. Res.*, 41(6):730 – 738.
- DEMENTIN, S., ARNOUX, P., FRANGIONI, B., GROSSE, S., LÉGER, C., BURLAT, B., GUIGLIARELLI, B., SABATY, M. et PIGNOL, D. (2007). Access to the active site of periplasmic nitrate reductase : Insights from site-directed mutagenesis and zinc inhibition studies. *Biochemistry*, 46(34):9713 – 9721.
- DIAS, J. M., THAN, M. E., HUMM, A., HUBER, R., BOURENKOV, G. P., BARTUNIK, H. D., BURSAKOV, S., CALVETE, J., CALDEIRA, J., CARNEIRO, C., MOURA, J. J., MOURA, I. et ROMÃO, M. J. (1999). Crystal structure of the first dissimilatory nitrate reductase at 1.9 Å solved by MAD methods. *Structure*, 7(1):65 – 79.
- DOBBEK, H. (2011). Structural aspects of mononuclear Mo/W-enzymes. *Coord. Chem. Rev.*, 255(9-10):1104–1116.
- DOBBEK, H., GREMER, L., KIEFERSAUER, R., HUBER, R. et MEYER, O. (2002). Catalysis at a dinuclear [CuSMo(O)OH] cluster in a CO dehydrogenase resolved at 1.1-Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99(25):15971–15976.
- DOONAN, C. J., STOCKERT, A., HILLE, R. et GEORGE, G. N. (2005). Nature of the catalytically labile oxygen at the active site of xanthine oxidase. *J. Am. Chem. Soc.*, 127(12):4518–4522.
- DRIDGE, E. J., WATTS, C. A., JEPSON, B. J. N., LINE, K., SANTINI, J. M., RICHARDSON, D. J. et BUTLER, C. S. (2007). Investigation of the redox centres of periplasmic selenate reductase from *Thauera selenatis* by EPR spectroscopy. *Biochem. J*, 408(1):19 – 28.

- DURAND, F., LIMOGES, B., MANO, N., MAVRÉ, F., MIRANDA-CASTRO, R. et SAVÉANT, J.-M. (2011). Effect of substrate inhibition and cooperativity on the electrochemical responses of glucose dehydrogenase. Kinetic characterization of wild and mutant types. *J. Am. Chem. Soc.*, 133(32):12801 – 12809.
- ELLIS, P. J., CONRADS, T., HILLE, R. et KUHN, P. (2001). Crystal structure of the 100 kDa arsenite oxidase from *Alcaligenes faecalis* in two crystal forms at 1.64 Å and 2.03 Å. *Structure*, 9(2):125 – 132.
- EMSLEY, J. (2001). *Nature's Building Blocks : An A-Z Guide to the Elements*. Oxford University Press.
- ENEMARK, J. H., ASTASHKIN, A. V. et RAITSIMRING, A. M. (2008). Structures and reaction pathways of the molybdenum centres of sulfite-oxidizing enzymes by pulsed EPR spectroscopy. *Biochem. Soc. Trans.*, 36(Pt - 6):1129 – 1133.
- ENEMARK, J. H. et GARNER, D. (1997). The coordination chemistry and function of the molybdenum centres of the oxomolybdoenzymes. *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2(6):817 – 822.
- FANNING, J. (2000). The chemical reduction of nitrate in aqueous solution. *Coord. Chem. Rev.*, 199(1):159–179.
- FARVER, O., KRONECK, P. M., ZUMFT, W. G. et PECHT, I. (2002). Intramolecular electron transfer in cytochrome cd1 nitrite reductase from *Pseudomonas stutzeri*; kinetics and thermodynamics. *Biophysical Chemistry*, 98(1-2):27 – 34.
- FIELD, S. J., THORNTON, N. P., ANDERSON, L. J., GATES, A. J., REILLY, A., JEPSON, B. J. N., RICHARDSON, D. J., GEORGE, S. J., CHEESMAN, M. R. et BUTT, J. N. (2005). Reductive activation of nitrate reductases. *Dalton Trans.*, 0(21):3580 – 3586.
- FISCHER, B., ENEMARK, J. H. et BASU, P. (1998). A chemical approach to systematically designate the pyranopterin centers of molybdenum and tungsten enzymes and synthetic models. *J. Inorg. Biochem.*, 72(1-2):13 – 21.
- FISH, K. M., MASSEY, V., SANDS, R. H. et DUNHAM, W. R. (1990). The interaction of bisulfite with milk xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.*, 265(32):19665–71.
- FOURMOND, V., BURLAT, B., DEMENTIN, S., ARNOUX, P., SABATY, M., BOIRY, S., GUIGLIARELLI, B., BERTRAND, P., PIGNOL, D. et LÉGER, C. (2008). Major Mo(V) EPR signature of *Rhodobacter sphaeroides* periplasmic nitrate reductase arising from a dead-end species that activates upon reduction. Relation to other molybdoenzymes from the DMSO reductase family. *J. Phys. Chem. B*, 112(48):15478 – 15486.
- FOURMOND, V., BURLAT, B., DEMENTIN, S., SABATY, M., ARNOUX, P., ETIENNE, E., GUIGLIARELLI, B., BERTRAND, P., PIGNOL, D. et LÉGER, C. (2010a). Dependence of catalytic activity on driving force in solution assays and protein film voltammetry : Insights from the comparison of nitrate reductase mutants. *Biochemistry*, 49(11):2424 – 2432.
- FOURMOND, V., HOKE, K., HEERING, H. A., BAFFERT, C., LEROUX, F., BERTRAND, P. et LÉGER, C. (2009a). SOAS : A free program to analyze electrochemical data and other one-dimensional signals. *Bioelectrochemistry*, 76(1-2):141 – 147.

- FOURMOND, V., LAUTIER, T., BAFFERT, C., LEROUX, F., LIEBGOTT, P.-P., DEMENTIN, S., ROUSSET, M., ARNOUX, P., PIGNOL, D., MEYNIAL-SALLES, I., SOUCAILLE, P., BERTRAND, P. et LÉGER, C. (2009b). Correcting for electrocatalyst desorption and inactivation in chronoamperometry experiments. *Anal. Chem.*, 81(8):2962 – 2968.
- FOURMOND, V., SABATY, M., ARNOUX, P., BERTRAND, P., PIGNOL, D. et LÉGER, C. (2010b). Reassessing the strategies for trapping catalytic intermediates during nitrate reductase turnover. *J. Phys. Chem. B*, 114(9):3341 – 3347.
- FRANGIONI, B. (2006). *Étude fonctionnelle de la nitrate réductase périplasmiques de Rhodobacter sphaeroides par spectroscopie RPE et électrochimie directe*. Thèse de doctorat, Université de Provence.
- FRANGIONI, B., ARNOUX, P., SABATY, M., PIGNOL, D., BERTRAND, P., GUIGLIARELLI, B. et LÉGER, C. (2004). In *Rhodobacter sphaeroides* respiratory nitrate reductase, the kinetics of substrate binding favors intramolecular electron transfer. *J. Am. Chem. Soc.*, 126(5):1328 – 1329.
- GANGESWARAN, R., LOWE, D. J. et EADY, R. R. (1993). Purification and characterization of the assimilatory nitrate reductase of *Azotobacter vinelandii*. *Biochem. J.*, 289(2):335–342.
- GARDLIK, S. et RAJAGOPALAN, K. V. (1990). The state of reduction of molybdopterin in xanthine oxidase and sulfite oxidase. *J. Biol. Chem.*, 265(22):13047 – 13054.
- GARDLIK, S. et RAJAGOPALAN, K. V. (1991). Oxidation of molybdopterin in sulfite oxidase by ferricyanide. Effect on electron transfer activities. *J. Biol. Chem.*, 266(8):4889 – 4895.
- GARTON, S. D., HILTON, J., OKU, H., CROUSE, B. R., RAJAGOPALAN, K. V. et JOHNSON, M. K. (1997). Active site structures and catalytic mechanism of *Rhodobacter sphaeroides* dimethyl sulfoxide reductase as revealed by resonance Raman spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.*, 119(52):12906 – 12916.
- GATES, A. J., BUTLER, C. S., RICHARDSON, D. J. et BUTT, J. N. (2011). Electrocatalytic reduction of nitrate and selenate by NapAB. *Biochem. Soc. Trans.*, 39(1):236 – 242.
- GEORGE, G. N. et BRAY, R. C. (1988). Studies by electron paramagnetic resonance spectroscopy of xanthine oxidase enriched with molybdenum-95 and with molybdenum-97. *Biochemistry*, 27(10):3603 – 3609.
- GEORGE, G. N., HILTON, J., TEMPLE, C., PRINCE, R. C. et RAJAGOPALAN, K. V. (1999). Structure of the molybdenum site of dimethyl sulfoxide reductase. *J. Am. Chem. Soc.*, 121(6):1256 – 1266. S147C.
- GONZÁLEZ, P. J., RIVAS, M. G., BRONDINO, C. D., BURSAKOV, S. A., MOURA, I. et MOURA, J. J. G. (2006). EPR and redox properties of periplasmic nitrate reductase from *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774. *J. Biol. Inorg. Chem.*, 11(5):609 – 616.
- GRIMALDI, S., SCHOEPP-COTHENET, B., CECCALDI, P., GUIGLIARELLI, B. et MAGALON, A. (2013). The prokaryotic Mo/W-bisPGD enzymes family : A catalytic workhorse in bioenergetic. *Biochim. Biophys. Acta*, 1827(8-9):1048–1085.

- GUIGLIARELLI, B. et BERTRAND, P. (1999). Application of EPR spectroscopy to the structural and functional study of iron-sulfur proteins. In SYKES, A., éditeur : *Advances in Inorganic Chemistry*, volume 47 de *Advances in Inorganic Chemistry*, pages 421 – 497. Academic Press.
- GUIGLIARELLI, B., GUILLAUSIER, J., MORE, C., SÉTIF, P., BOTTIN, H. et BERTRAND, P. (1993). Structural organization of the iron-sulfur centers in *Synechocystis* 6803 photosystem I. EPR study of oriented thylakoid membranes and analysis of the magnetic interactions. *J. Biol. Chem.*, 268(2):900 – 908.
- GUIGLIARELLI, B., MORE, C., FOURNEL, A., ASSO, M., HATCHIKIAN, E. C., WILLIAMS, R., CAMMACK, R. et BERTRAND, P. (1995). Structural organization of the Ni and (4Fe-4S) centers in the active form of *Desulfovibrio gigas* hydrogenase. Analysis of the magnetic interactions by electron paramagnetic resonance spectroscopy. *Biochemistry*, 34(14):4781 – 4790.
- HAGEN, W. (1981). Dislocation strain broadening as a source of anisotropic linewidth and asymmetrical lineshape in the electron paramagnetic resonance spectrum of metalloproteins and related systems. *J. Mag. Res. (1969)*, 44(3):447 – 469.
- HAGEN, W. R. (1992). EPR spectroscopy of iron-sulfur proteins. volume 38 de *Advances in Inorganic Chemistry*, pages 165 – 222. Academic Press.
- HAVELIUS, K. G. V., RESCHKE, S., HORN, S., DÖRING, A., NIKS, D., R. HILLE, C. S., LEIMKÜHLER, S. et HAUMANN, M. (2011). Structure of the molybdenum site in YedY, a sulfite oxidase homologue from *Escherichia coli*. *Inorg. Chem.*, 50(3):741 – 748.
- HETTMANN, T., SIDDIQUI, R. A., von LANGEN, J., FREY, C., ROMÃO, M. J. et DIEKMANN, S. (2003). Mutagenesis study on the role of a lysine residue highly conserved in formate dehydrogenases and periplasmic nitrate reductases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 310(1):40 – 47.
- HILLE, R. (2005). Molybdenum-containing hydroxylases. *Arch. Biochem. Biophys.*, 433(1):107 – 116.
- HILLE, R. (2013). The molybdenum oxotransferases and related enzymes. *Dalton Trans.*, 42(9):3029 – 3042.
- HILLE, R., KIM, J. H. et HEMANN, C. (1993). Reductive half-reaction of xanthine oxidase : Mechanistic role of the species giving rise to the "rapid type 1" molybdenum(V) electron paramagnetic resonance signal. *Biochemistry*, 32(15):3973–3980.
- HINE, F. J., TAYLOR, A. J. et GARNER, C. D. (2010). Dithiolene complexes and the nature of molybdopterin. *Coord. Chem. Rev.*, 254(13-14):1570 – 1579. Dithiolenes and non-innocent redox-active ligands.
- HOFFMAN, B. M., LUKOYANOV, D., DEAN, D. R. et SEEFELDT, L. C. (2013). Nitrogenase : A draft mechanism. *Acc. Chem. Res.*, 46(2):587 – 595.
- HOFSTEE, B. H. J. (1955). On the mechanism of inhibition of xanthine oxidase by the substrate xanthine. *J. Biol. Chem.*, 216(1):235–244.
- HOLM, R. H., SOLOMON, E. I., MAJUMDAR, A. et TENDERHOLT, A. (2011). Comparative molecular chemistry of molybdenum and tungsten and its relation

- to hydroxylase and oxotransferase enzymes. *Coord. Chem. Rev.*, 255(9-10):993–1015.
- HOPFIELD, J. J. (1974). Electron transfer between biological molecules by thermally activated tunneling. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 71(9):3640–3644.
- HUBER, R., HOF, P., DUARTE, R. O., MOURA, J. J., MOURA, I., LIU, M. Y., LEGALL, J., HILLE, R., ARCHER, M. et ROMÃO, M. J. (1996). A structure-based catalytic mechanism for the xanthine oxidase family of molybdenum enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93(17):8846 – 8851.
- HUPPMAN, P., ARLT, T., PENZKOFER, H., SCHMIDT, S., BIBIKOVA, M., DOHSE, B., OESTERHELT, D., WACHTVEIT, J. et ZINTH, W. (2002). Kinetics, energetics, and electronic coupling of the primary electron transfer reactions in mutated reaction centers of *Blastochloris viridis*. *Biophys. J.*, 82(6):3186 – 3197.
- JACQUES, J. G., FOURMOND, V., ARNOUX, P., SABATY, M., ETIENNE, E., GROSSE, S., BIASO, F., BERTRAND, P., PIGNOL, D., LÉGER, C., GUIGLIARELLI, B. et BURLAT, B. (2014). Reductive activation in periplasmic nitrate reductase involves chemical modifications of the Mo-cofactor beyond the first coordination sphere of the metal ion. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1837(2):277 – 286.
- JEPSON, B. J. N., ANDERSON, L. J., RUBIO, L. M., TAYLOR, C. J., BUTLER, C. S., FLORES, E., HERRERO, A., BUTT, J. N. et RICHARDSON, D. J. (2004). Tuning a nitrate reductase for function. The first spectropotentiometric characterization of a bacterial assimilatory nitrate reductase reveals novel redox properties. *J. Biol. Chem.*, 279(31):32212 – 32218.
- JEPSON, B. J. N., MOHAN, S., CLARKE, T. A., GATES, A. J., COLE, J. A., BUTLER, C. S., BUTT, J. N., HEMMINGS, A. M. et RICHARDSON, D. J. (2007). Spectropotentiometric and structural analysis of the periplasmic nitrate reductase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, 282(9):6425 – 6437.
- JORMAKKA, M., TÖRNROTH, S., BYRNE, B. et IWATA, S. (2002). Molecular basis of proton motive force generation : Structure of formate dehydrogenase-N. *Science*, 295(5561):1863–1868.
- KAATZE, U. (2007). Reference liquids for the calibration of dielectric sensors and measurement instruments. *Meas. Sci. Technol.*, 18(4):967.
- KAPPLER, U. (2011). Bacterial sulfite-oxidizing enzymes. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1807(1):1 – 10.
- KARRASCH, M., BÖRNER, G. et THAUER, R. K. (1990). The molybdenum cofactor of formylmethanofuran dehydrogenase from *Methanosarcina barkeri* is a molybdopterin guanine dinucleotide. *FEBS Lett.*, 274(1 - 2):48 – 52.
- KASUMAJ, B. et STOLL, S. (2008). 5- and 6-pulse electron spin echo envelope modulation (ESEEM) of multi-nuclear spin systems. *J. Mag. Res.*, 190(2):233 – 247.
- KAY, C. J. et BARBER, M. J. (1990). Measurement of oxidation-reduction midpoint potentials by room temperature electron paramagnetic resonance potentiometry. *Anal. Biochem.*, 184(1):11 – 15.

- KAY, C. J., BARBER, M. J., NOTTON, B. A. et SOLOMONSON, L. P. (1989). Oxidation–reduction midpoint potentials of the flavin, haem and Mo-pterin centres in spinach (*Spinacia oleracea* L.) nitrate reductase. *Biochem. J.*, 263(1):285–287.
- KAY, C. J., BARBER, M. J. et SOLOMONSON, L. P. (1988). CD and potentiometry of FAD, heme and molybdenum-pterin prosthetic groups of assimilatory nitrate reductase. *Biochemistry*, 27(16):6142–6149. trouver au centre de documentation.
- KENGEN, S. W., RIKKEN, G. B., HAGEN, W. R., van GINKEL, C. G. et STAMS, A. J. (1999). Purification and characterization of (per)chlorate reductase from the chlorate-respiring strain GR-1. *J. Bacteriol.*, 181(21):6706 – 6711.
- KHANGULOV, S. V., GLADYSHEV, V. N., DISMUKES, G. C. et STADTMAN, T. C. (1998). Selenium-containing formate dehydrogenase H from *Escherichia coli* : a molybdopterin enzyme that catalyzes formate oxidation without oxygen transfer. *Biochemistry*, 37(10):1305 – 1308.
- KISKER, C., SCHINDELIN, H., BAAS, D., RÉTEY, J., MECKENSTOCK, R. U. et KRONECK, P. M. (1998). A structural comparison of molybdenum cofactor-containing enzymes. *FEMS Microbiol. Rev.*, 22(5):503 – 521.
- KISKER, C., SCHINDELIN, H., PACHECO, A., WEHBI, W. A., GARRETT, R. M., RAJAGOPALAN, K., ENEMARK, J. H. et REES, D. (1997). Molecular basis of sulfite oxidase deficiency from the structure of sulfite oxidase. *Cell*, 91(7):973–983.
- KLOER, D. P., HAGEL, C., HEIDER, J. et SCHULZ, G. E. (2006). Crystal structure of ethylbenzene dehydrogenase from *Aromatoleum aromaticum*. *Structure*, 14(9):1377 – 1388.
- KOEHLER, B. P., MUKUND, S., CONOVER, R. C., DHAWAN, I. K., ROY, R., ADAMS, M. W. W. et JOHNSON, M. K. (1996). Spectroscopic characterization of the tungsten and iron centers in aldehyde ferredoxin oxidoreductases from two hyperthermophilic archaea. *J. Am. Chem. Soc.*, 118(49):12391–12405.
- KROMPHOLZ, N., KRISCHKOWSKI, C., REICHMANN, D., GARBE-SCHÖNBERG, D., MENDEL, R.-R., BITTNER, F., CLEMENT, B. et HAVEMEYER, A. (2012). The mitochondrial amidoxime reducing component (mARC) is involved in detoxification of N-hydroxylated base analogues. *Chemical Research in Toxicology*, 25(11):2443–2450.
- KÜMMERLE, R., GAILLARD, J., KYRITSIS, P. et MOULIS, J.-M. (2001). Intramolecular electron transfer in [4Fe-4S] proteins : Estimates of the reorganization energy and electronic coupling in *Chromatium vinosum* ferredoxin. *J. Biol. Inorg. Chem.*, 6(4):446–451.
- KUNDU, T. K., VELAYUTHAM, M. et ZWEIER, J. L. (2012). Aldehyde oxidase functions as a superoxide generating NADH oxidase : An important redox regulated pathway of cellular oxygen radical formation. *Biochemistry*, 51(13): 2930–2939.
- LANCIANO, P., SAVOYANT, A., GRIMALDI, S., MAGALON, A., GUIGLIARELLI, B. et BERTRAND, P. (2007). New method for the spin quantitation of [4Fe-4S](+)

- clusters with $s = (3)/(2)$. Application to the FS0 center of the NarGHI nitrate reductase from *Escherichia coli*. *J. Phys. Chem. B*, 111(48):13632 – 13637.
- LÉGER, C. et BERTRAND, P. (2008). Direct electrochemistry of redox enzymes as a tool for mechanistic studies. *Chem. Rev.*, 108(7):2379 – 2438.
- LI, H.-K., TEMPLE, C., RAJAGOPALAN, K. V. et SCHINDELIN, H. (2000). The 1.3 Å crystal structure of *Rhodobacter sphaeroides* dimethyl sulfoxide reductase reveals two distinct molybdenum coordination environments. *J. Am. Chem. Soc.*, 122(32):7673–7680.
- LI, Y., KATZMANN, E., BORG, S. et SCHÜLER, D. (2012). The periplasmic nitrate reductase Nap is required for anaerobic growth and involved in redox control of magnetite biomineralization in *Magnetospirillum gryphiswaldense*. *J. Bact.*, 194(18):4847–4856.
- LIMOGES, B., MOIROUX, J. et SAVÉANT, J.-M. (2002). Kinetic control by the substrate and/or the cosubstrate in electrochemically monitored redox enzymatic homogeneous systems. Catalytic responses in cyclic voltammetry. *J. Electroanal. Chem.*, 521(1 - 2):1 – 7.
- LIU, H. P., TAKIO, S., SATOH, T. et YAMAMOTO, I. (1999). Involvement in denitrification of the *napKEFDABC* genes encoding the periplasmic nitrate reductase system in the denitrifying phototrophic bacterium *Rhodobacter sphaeroides* f. sp. *denitrificans*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 63(3):530–536.
- LOWE, D. J. et BRAY, R. C. (1978). Magnetic coupling of the molybdenum and iron-sulphur centres in xanthine oxidase and xanthine dehydrogenases. *Biochem. J.*, 169(3):471–479.
- LOWE, D. J., LYNDEN-BELL, R. M. et BRAY, R. C. (1972). Spin-spin interaction between molybdenum and one of the iron-sulphur systems of xanthine oxidase and its relevance to the enzymic mechanism. *Biochem. J.*, 130(1):239 – 249.
- LUYKX, D. M., DUINE, J. A. et de VRIES, S. (1998). Molybdopterin radical in bacterial aldehyde dehydrogenases. *Biochemistry*, 37(32):11366 – 11375.
- MAIA, L. B. et MOURA, J. J. G. (2011). Nitrite reduction by xanthine oxidase family enzymes : A new class of nitrite reductases. *J. Biol. Inorg. Chem.*, 16(3):443 – 460.
- MALTHOUSE, J. P. et BRAY, R. C. (1980). The nature of the sulphur atom liberated from xanthine oxidase by cyanide. Evidence from e.p.r. spectroscopy after ³⁵S substitution. *Biochem. J.*, 191(1):265–267.
- MANIKANDAN, P., CHOI, E.-Y., HILLE, R. et HOFFMAN, B. M. (2001). 35 GHz ENDOR characterization of the "very rapid" signal of xanthine oxidase reacted with 2-hydroxy-6-methylpurine (¹³C8) : Evidence against direct Mo-C8 interaction. *J. Am. Chem. Soc.*, 123(11):2658–2663.
- MARYASOV, A. G. et BOWMAN, M. K. (2004). Hyperfine sublevel correlation (HYSCORE) spectra for paramagnetic centers with nuclear spin I = 1 having isotropic hyperfine interactions. *J. Phys. Chem. B*, 108(27):9412–9420.
- MASSEY, V. et EDMONDSON, D. (1970). On the mechanism of inactivation of xanthine oxidase by cyanide. *J. Biol. Chem.*, 245(24):6595 – 6598.

- MCALPINE, A., MCEWAN, A. et BAILEY, S. (1998). The high resolution crystal structure of DMSO reductase in complex with DMSO. *J. Mol. Biol.*, 275(4):613 – 623.
- MCALPINE, A. S., MCEWAN, A. G., SHAW, A. L. et BAILEY, S. (1997). Molybdenum active centre of DMSO reductase from *Rhodobacter capsulatus* : crystal structure of the oxidised enzyme at 1.82-Å resolution and the dithionite-reduced enzyme at 2.8-Å resolution. *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2(6):690–701.
- MCWHIRTER, R. B. et HILLE, R. (1991). The reductive half-reaction of xanthine oxidase. identification of spectral intermediates in the hydroxylation of 2-hydroxy-6-methylpurine. *J. Biol. Chem.*, 266(35):23724–31.
- MENDEL, R. R. et BITTNER, F. (2006). Cell biology of molybdenum. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1763(7):621 – 635.
- METZ, S. (2011). Theoretical studies on the reactivity of molybdenum enzymes. *Coord. Chem. Rev.*, 255(9 - 10):1085 – 1103.
- MICHAELIS, L. et MENTEN, M. L. (1913). Die Kinetik der Invertinwirkung. *Biochem. Z.*, 49:333.
- MORE, C., ASSO, M., ROGER, G., GUIGLIARELLI, B., CALDEIRA, J., MOURA, J. et BERTRAND, P. (2005). Study of the spin-spin interactions between the metal centers of *Desulfovibrio gigas* aldehyde oxidoreductase : identification of the reducible sites of the $[2\text{Fe}-2\text{S}]^{1+,2+}$ clusters. *Biochemistry*, 44(34):11628–11635.
- MORE, C., BELLE, V., ASSO, M., FOURNEL, A., ROGER, G., GUIGLIARELLI, B. et BERTRAND, P. (1999). EPR spectroscopy : A powerful technique for the structural and functional investigation of metalloproteins. *Biospectroscopy*, 5(5 - Suppl):S3 – 18.
- MORE, C., GAYDA, J. et BERTRAND, P. (1990). Simulations of the g-strain broadening of low-spin hemoprotein EPR spectra based on the t_{2g} hole model. *J. Mag. Res.*, 90(3):486 – 499.
- MOSER, C. C., ANDERSON, J. L. R. et DUTTON, P. L. (2010). Guidelines for tunneling in enzymes. *Biochim. Biophys. Acta*, 1797(9):1573 – 1586.
- MOSER, C. C., KESKE, J. M., WARNCKE, K., FARID, R. S. et DUTTON, P. L. (1992). Nature of biological electron transfer. *Nature*, 355(6363):796–802.
- MTEI, R. P., LYASHENKO, G., STEIN, B., RUBIE, N., HILLE, R. et KIRK, M. L. (2011). Spectroscopic and electronic structure studies of a dimethyl sulfoxide reductase catalytic intermediate : Implications for electron- and atom-transfer reactivity. *J. Am. Chem. Soc.*, 133(25):9762 – 9774.
- MUKUND, S. et ADAMS, M. W. (1990). Characterization of a tungsten-iron-sulfur protein exhibiting novel spectroscopic and redox properties from the hyperthermophilic archaeobacterium *Pyrococcus furiosus*. *J. Biol. Chem.*, 265(20):11508–11516.
- NAJMUDIN, S., GONZÁLEZ, P. J., TRINCÃO, J., COELHO, C., MUKHOPADHYAY, A., CERQUEIRA, N. M. F. S. A., ROMÃO, C. C., MOURA, I., MOURA, J. J. G., BRONDINO, C. D. et ROMÃO, M. J. (2008). Periplasmic nitrate reductase revisited : A sulfur atom completes the sixth coordination of the catalytic molybdenum. *J. Biol. Inorg. Chem.*, 13(5):737 – 753.

- OKAMOTO, K., MATSUMOTO, K., HILLE, R., EGER, B. T., PAI, E. F. et NISHINO, T. (2004). The crystal structure of xanthine oxidoreductase during catalysis : Implications for reaction mechanism and enzyme inhibition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101(21):7931–7936.
- OKAMURA, M., ISAACSON, R. et FEHER, G. (1979). Spectroscopic and kinetic properties of the transient intermediate acceptor in reaction centers of *Rhodospseudomonas sphaeroides*. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenergetics*, 546(3):394 – 417.
- PAGE, C. C., MOSER, C. C., CHEN, X. et DUTTON, P. L. (1999). Natural engineering principles of electron tunnelling in biological oxidation-reduction. *Nature*, 402(6757):47 – 52.
- PORRAS, A. G. et PALMER, G. (1982). The room temperature potentiometry of xanthine oxidase. pH-dependent redox behavior of the flavin, molybdenum, and iron-sulfur centers. *J. Biol. Chem.*, 257(19):11617 – 11626.
- POSENER, D. (1959). The shape of spectral lines : Tables of the voigt profile. *Aust. J. Phys.*, 12(2):184–196.
- PRISNER, T., LYUBENOVA, S., ATABAY, Y., MACMILLAN, F., KRÖGER, A. et KLIMMEK, O. (2003). Multifrequency cw-EPR investigation of the catalytic molybdenum cofactor of polysulfide reductase from *Wolinella succinogenes*. *J. Biol. Inorg. Chem.*, 8(4):419 – 426.
- PUSHIE, M. J. (2011). Spectroscopic studies of molybdenum and tungsten enzymes. *Coord. Chem. Rev.*, 255(9 - 10):1055 – 1084.
- PUSHIE, M. J., COTELESAGE, J. J. H., LYASHENKO, G., HILLE, R. et GEORGE, G. N. (2013). X-ray absorption spectroscopy of a quantitatively Mo(V) dimethyl sulfoxide reductase species. *Inorg. Chem.*, 52(6):2830 – 2837.
- RAJAGOPALAN, K. V. et JOHNSON, J. L. (1992). The pterin molybdenum cofactors. *J. Biol. Chem.*, 267(15):10199 – 10202.
- RIVAS, M. G., GONZÁLEZ, P. J., BRONDINO, C. D., MOURA, J. J. G. et MOURA, I. (2007). EPR characterization of the molybdenum(V) forms of formate dehydrogenase from *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774 upon formate reduction. *J. Inorg. Biochem.*, 101(11 - 12):1617 – 1622.
- ROMÃO, M. J. (2009). Molybdenum and tungsten enzymes : A crystallographic and mechanistic overview. *Dalton Trans.*, 0(21):4053 – 4068.
- ROMÃO, M. J., ARCHER, M., MOURA, I., MOURA, J. J. G., LEGALL, J., ENGH, R., SCHNEIDER, M., HOF, P. et HUBER, R. (1995). Crystal structure of the xanthine oxidase-related aldehyde oxido-reductase from *D. gigas*. *Science*, 270(5239):1170 – 1176.
- ROTHERY, R. A., BERTERO, M. G., CAMMACK, R., PALAK, M., BLASCO, F., STRYNADKA, N. C. J. et WEINER, J. H. (2004). The catalytic subunit of *Escherichia coli* nitrate reductase a contains a novel [4Fe-4S] cluster with a high-spin ground state. *Biochemistry*, 43(18):5324 – 5333.
- ROTHERY, R. A., STEIN, B., SOLOMONSON, M., KIRK, M. L. et WEINER, J. H. (2012). Pyranopterin conformation defines the function of molybdenum and tungsten enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 109(37):14773 – 14778.

- ROTHERY, R. A., TRIEBER, C. A. et WEINER, J. H. (1999). Interactions between the molybdenum cofactor and iron-sulfur clusters of *Escherichia coli* dimethylsulfoxide reductase. *J. Biol. Chem.*, 274(19):13002–13009.
- ROTHERY, R. A., WORKUN, G. J. et WEINER, J. H. (2008). The prokaryotic complex iron-sulfur molybdoenzyme family. *Biochim. et Biophys. Acta - Biomembranes*, 1778(9):1897 – 1929.
- SABATY, M., AVAZERI, C., PIGNOL, D. et VERMEGLIO, A. (2001). Characterization of the reduction of selenate and tellurite by nitrate reductases. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67(11):5122 – 5126.
- SAMUEL, P. P., HORN, S., DÖRING, A., HAVELIUS, K. G. V., RESCHKE, S., LEIMKÜHLER, S., HAUMANN, M. et SCHULZKE, C. (2011). A crystallographic and Mo K-Edge XAS study of molybdenum oxo bis, mono, and non dithiolene complexes first sphere coordination geometry and noninnocence of ligands. *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2011(28):4387–4399.
- SCHINDELIN, H., KISKER, C., HILTON, J., RAJAGOPALAN, K. V. et REES, D. C. (1996). Crystal structure of DMSO reductase : Redox-linked changes in molybdopterin coordination. *Science*, 272(5268):1615–1621.
- SCHNEIDER, F., LÖWE, J., HUBER, R., SCHINDELIN, H., KISKER, C. et KNÄBLEIN, J. (1996). Crystal structure of dimethyl sulfoxide reductase from *Rhodobacter capsulatus* at 1,88 Å resolution. *J. Mol. Biol.*, 263(1):53 – 69.
- SCHOEPP-COTHENET, B., van LIS, R., PHILIPPOT, P., MAGALON, A., RUSSELL, M. J. et NITSCHKE, W. (2012). The ineluctable requirement for the trans-iron elements molybdenum and/or tungsten in the origin of life. *Sci. Rep.*, 2(263):1–5.
- SCHWEIGER, A. et JESCHKE, G. (2001). *Principles of pulse electron paramagnetic resonance*. Oxford University Press.
- SEIFFERT, G. B., ULLMANN, G. M., MESSERSCHMIDT, A., SCHINK, B., KRONECK, P. M. H. et EINSLE, O. (2007). Structure of the non-redox-active tungsten/[4Fe :4S] enzyme acetylene hydratase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 109(9):3073–3077.
- SIPONEN, M., ADRYANCZYK, G., GINET, N., ARNOUX, P. et PIGNOL, D. (2012). An electron transfer chain for magnetotactic bacteria organelle formation. *Biochem. Soc. Trans.*, 40(6):1319–1323.
- SPARACINO-WATKINS, C., STOLZ, J. F. et BASU, P. (2014). Nitrate and periplasmic nitrate reductases. *Chem. Soc. Rev.*, 43:676–706.
- SPENCE, J. T., BARBER, M. J. et SIEGEL, L. M. (1982). Determination of the stoichiometry of electron uptake and the midpoint reduction potentials of milk xanthine oxidase at 25 °C by microcoulometry. *Biochemistry*, 21(7):1656–1661.
- SPENCE, J. T., BARBER, M. J. et SOLOMONSON, L. P. (1988). Stoichiometry of electron uptake and oxidation-reduction midpoint potentials of NADH :nitrate reductase. *Biochem. J.*, 250(3):921–0.
- SPENCE, J. T., KIPKE, C. A., ENEMARK, J. H. et SUNDE, R. A. (1991). Stoichiometry of electron uptake and the effect of anions and pH on the molybdenum and heme reduction potentials of sulfite oxidase. *Inorg. Chem.*, 30(15):3011–3015.

- SPROULES, S., BANERJEE, P., WEYHERMÜLLER, T., YAN, Y., DONAHUE, J. P. et WIEGHARDT, K. (2011). Monoanionic molybdenum and tungsten tris(dithiolene) complexes : A multifrequency EPR study. *Inorg. Chem.*, 50(15):7106 – 7122.
- SRIVASTAVA, A. P., HIRASAWA, M., BHALLA, M., CHUNG, J.-S., ALLEN, J. P., JOHNSON, M. K., TRIPATHY, J. N., RUBIO, L. M., VACCARO, B., SUBRAMANIAN, S., FLORES, E., ZABET-MOGHADDAM, M., STITLE, K. et KNAFF, D. B. (2013). Roles of four conserved basic amino acids in a ferredoxin-dependent cyanobacterial nitrate reductase. *Biochemistry*, 52(25):4343–4353.
- STOCKERT, A. L., SHINDE, S. S., ANDERSON, R. F. et HILLE, R. (2002). The reaction mechanism of xanthine oxidase : Evidence for two-electron chemistry rather than sequential one-electron steps. *J. Am. Chem. Soc.*, 124(49):14554–14555.
- STOLL, S., CALLE, C., MITRIKAS, G. et SCHWEIGER, A. (2005). Peak suppression in ESEEM spectra of multinuclear spin systems. *J. Mag. Res.*, 177(1):93 – 101.
- STOLL, S. et SCHWEIGER, A. (2006). EasySpin, a comprehensive software package for spectral simulation and analysis in EPR. *J. Mag. Res.*, 178(1):42 – 55.
- STOLZ, J. F., BASU, P., SANTINI, J. M. et OREMLAND, R. S. (2006). Arsenic and selenium in microbial metabolism. *Ann. Rev. Microbiol.*, 60(1):107–130.
- THOMÉ, R., GUST, A., TOCI, R., MENDEL, R., BITTNER, F., MAGALON, A. et WALBURGER, A. (2012). A sulfurtransferase is essential for activity of formate dehydrogenases in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, 287(7):4671–4678.
- TRIEBER, C. A., ROTHERY, R. A. et WEINER, J. H. (1996). Engineering a novel iron-sulfur cluster into the catalytic subunit of *Escherichia coli* dimethylsulfoxide reductase. *J. Biol. Chem.*, 271(9):4620–4626.
- VENTUROLI, G., DREPPER, F., WILLIAMS, J. C., ALLEN, J. P., LIN, X. et MATHIS, P. (1998). Effects of temperature and ΔG^\ominus on electron transfer from cytochrome c2 to the photosynthetic reaction center of the purple bacterium *Rhodobacter sphaeroides*. *Biophys. J.*, 74(6):3226 – 3240.
- VINCENT, S. P. et BRAY, R. C. (1978). Electron-paramagnetic-resonance studies on nitrate reductase from *Escherichia coli* K12. *Biochem. J.*, 171(3):639 – 647.
- WAGENER, N., PIERIK, A. J., IBDAH, A., HILLE, R. et DOBBEK, H. (2009). The Mo-Se active site of nicotinate dehydrogenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106(27):11055–11060.
- WAHL, B., REICHMANN, D., NIKS, D., KROMPHOLZ, N., HAVEMEYER, A., CLEMENT, B., MESSERSCHMIDT, T., ROTHKEGEL, M., BIESTER, H., HILLE, R., MENDEL, R. R. et BITTNER, F. (2010). Biochemical and spectroscopic characterization of the human mitochondrial amidoxime reducing components hmARC-1 and hmARC-2 suggests the existence of a new molybdenum enzyme family in eukaryotes. *J. Biol. Chem.*, 285(48):37847–37859.
- WANG, T.-H., CHEN, Y.-H., HUANG, J.-Y., LIU, K.-C., KE, S.-C. et CHU, H.-A. (2011). Enzyme kinetics, inhibitors, mutagenesis and electron paramagnetic resonance analysis of dual-affinity nitrate reductase in unicellular N₂-fixing

- cyanobacterium *Cyanothece* sp. PCC 8801. *Plant Physiol. Biochem.*, 49(11): 1369 – 1376.
- WARREN, J. J., ENER, M. E., VLČEK, A. J., WINKLER, J. R. et GRAY, H. B. (2012). Electron hopping through proteins. *Coord. Chem. Rev.*, 256(21 - 22):2478 – 2487.
- WEIK, M., RAVELLI, R. B. G., KRYGER, G., MCSWEENEY, S., RAVES, M. L., HAREL, M., GROS, P., SILMAN, I., KROON, J. et SUSSMAN, J. L. (2000). Specific chemical and structural damage to proteins produced by synchrotron radiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97(2):623–628.
- WILLIAMS, B. R., FU, Y., YAP, G. P. A. et BURGMAYER, S. J. N. (2012). Structure and reversible pyran formation in molybdenum pyranopterin dithiolene models of the molybdenum cofactor. *J. Am. Chem. Soc.*, 134(48):19584 – 19587.
- WINKLER, J. R. et GRAY, H. B. (1992). Electron transfer in ruthenium-modified proteins. *Chem. Rev.*, 92(3):369–379.
- WORKUN, G. J., MOQUIN, K., ROTHERY, R. A. et WEINER, J. H. (2008). Evolutionary persistence of the molybdopyranopterin-containing sulfite oxidase protein fold. *Mic. Mol. Biol. Rev.*, 72(2):228–248.
- XIE, H. et CAO, Z. (2010). Enzymatic reduction of nitrate to nitrite : Insight from density functional calculations. *Organometallics*, 29(2):436 – 441.
- YANG, J., ROTHERY, R., SEMPOMBE, J., WEINER, J. H. et KIRK, M. L. (2009). Spectroscopic characterization of YedY : the role of sulfur coordination in a Mo(V) sulfite oxidase family enzyme form. *J. Am. Chem. Soc.*, 131(43):15612–15614.
- YANO, J., KERN, J., IRRGANG, K.-D., LATIMER, M. J., BERGMANN, U., GLATZEL, P., PUSHKAR, Y., BIESIADKA, J., LOLL, B., SAUER, K., MESSINGER, J., ZOUNI, A. et YACHANDRA, V. K. (2005). X-ray damage to the Mn₄Ca complex in single crystals of photosystem II : A case study for metalloprotein crystallography. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102(34):12047–12052.
- ZANDER, U., FAUST, A., KLINK, B. U., de SANCTIS, D., PANJIKAR, S., QUENTMEIER, A., BARDISCHEWSKY, F., FRIEDRICH, C. G. et SCHEIDIG, A. J. (2011). Structural basis for the oxidation of protein-bound sulfur by the sulfur cycle molybdohemo-enzyme sulfane dehydrogenase SoxCD. *J. Biol. Chem.*, 286(10):8349 – 8360.

Article publié

Reductive activation in periplasmic
nitrate reductase involves chemical
modifications of the Mo-cofactor beyond
the first coordination sphere of the metal
ion



Reductive activation in periplasmic nitrate reductase involves chemical modifications of the Mo-cofactor beyond the first coordination sphere of the metal ion



Julien G.J. Jacques^a, Vincent Fourmond^a, Pascal Arnoux^b, Monique Sabaty^b, Emilien Etienne^a, Sandrine Grosse^b, Frédéric Biaso^a, Patrick Bertrand^a, David Pignol^b, Christophe Léger^a, Bruno Guigliarelli^a, Bénédicte Burlat^{a,*}

^a Aix-Marseille Université, CNRS, BIP UMR 7281, 31 chemin J. Aiguier, F-13402 Marseille cedex 20, France

^b Aix-Marseille Université, CNRS, CEA, DSV/IBEB/LBC UMR 7265, F-13108 Saint Paul Lez Durance, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 June 2013

Received in revised form 24 October 2013

Accepted 30 October 2013

Available online 7 November 2013

Keywords:

Molybdenum

Nitrate reductase

Pyranopterin

Electron transfer

Protein film voltammetry

EPR spectroscopy

ABSTRACT

In *Rhodobacter sphaeroides* periplasmic nitrate reductase NapAB, the major Mo(V) form (the “high g” species) in air-purified samples is inactive and requires reduction to irreversibly convert into a catalytically competent form (Fourmond et al., J. Phys. Chem., 2008). In the present work, we study the kinetics of the activation process by combining EPR spectroscopy and direct electrochemistry. Upon reduction, the Mo(V) “high g” resting EPR signal slowly decays while the other redox centers of the protein are rapidly reduced, which we interpret as a slow and gated (or coupled) intramolecular electron transfer between the [4Fe–4S] center and the Mo cofactor in the inactive enzyme. Besides, we detect spin–spin interactions between the Mo(V) ion and the [4Fe–4S]¹⁺ cluster which are modified upon activation of the enzyme, while the EPR signatures associated to the Mo cofactor remain almost unchanged. This shows that the activation process, which modifies the exchange coupling pathway between the Mo and the [4Fe–4S]¹⁺ centers, occurs further away than in the first coordination sphere of the Mo ion. Relying on structural data and studies on Mo-pyranopterin and models, we propose a molecular mechanism of activation which involves the pyranopterin moiety of the molybdenum cofactor that is proximal to the [4Fe–4S] cluster. The mechanism implies both the cyclization of the pyran ring and the reduction of the oxidized pterin to give the competent tricyclic tetrahydropyranopterin form.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Periplasmic nitrate reductases (Nap) are soluble molybdenum-containing enzymes found in Prokaryotes. These dissimilatory enzymes catalyze the two-electron and two-proton reduction of nitrate into nitrite [1]. So far, periplasmic nitrate reductases have been purified from *Paracoccus pantotrophus* (formerly *Paracoccus denitrificans*) [2], *Desulfovibrio desulfuricans* [3], *Rhodobacter sphaeroides* [4], *Cupriavidus necator* (formerly *Ralstonia eutropha*) [5], *Escherichia coli* [6] and *Shewanella gelidimarina* [7]. Besides, soluble bacterial assimilatory nitrate reductases (Nas), closely related to Nap enzymes, have been isolated and characterized [8–10]. With the exception of the monomeric NapA from *D. desulfuricans* which directly receives electrons from the membrane-bound tetraheme NapC, Nap enzymes form heterodimeric complexes. The NapA catalytic subunit (75–90 kDa) houses both the molybdenum cofactor where substrate binds and a [4Fe–4S] center;

the NapB subunit (15 kDa) uses two c-type hemes to mediate electrons from NapC to NapA. The strength of the interaction between NapA and NapB is organism-dependent: nitrate reductases from *E. coli* or *S. gelidimarina* purify as a monomer (NapA), while nitrate reductases from *P. pantotrophus* and *R. sphaeroides* are isolated as tight NapAB heterodimers [6,7,11].

Several crystallographic structures of NapA (*D. desulfuricans* [12,13] and *E. coli* [6]) and NapAB (*R. sphaeroides* [11] and *C. necator* [14]) unveil the structural characteristics of the Mo-bis(pyranopterin-guanosine-dinucleotide or PGD) cofactor (Mo-cofactor) of the molybdo-enzymes from the DMSO reductase family. Within this large cofactor of about 1.6 kDa the molybdenum ion is coordinated by two dithiolene ligands from the pyranopterins (often named molybdopterin) and one thiolate ligand from a cysteine which is the only covalent anchor of the cofactor to the protein. An inorganic ligand completes the coordination sphere of the Mo ion; it was formerly modeled as an oxygenated species (hydroxo or water ligand [6,12]) and has been more recently reinterpreted as a sulfur atom forming a partial disulfide bond with the sulfur of the cysteine ligand [13,14].

These recent structural data called for reconsidering the catalytic mechanism of Nap, particularly the coordination mode of nitrate to

* Corresponding author at: Unité de Bioénergétique et Ingénierie des Protéines UMR7281, CNRS/AMU, FR3479, F-13402 Marseille Cedex 20, France. Tel.: +33 491 164 559; fax: +33 491 164 097.

E-mail address: burlat@imm.cnrs.fr (B. Burlat).

the Mo-cofactor and the oxo transfer reaction. New proposals came from theoretical studies (recently reviewed in refs [15,16]). Both inner- and outer-sphere mechanisms have been investigated. In the former, nitrate is an extra ligand of the Mo ion, which either extends its coordination number to 7, or undergoes a “sulfur-shift” mechanism that allows the binding of nitrate on its sixth position [17–19]. Outer-coordination sphere mechanisms investigate the possibility of nitrate binding to the inorganic sulfido ligand of the Mo during turnover [17,18]. While initial mechanisms considered that the oxidation degree of the Mo ion ranges from + IV to + VI, the question of the Mo valence during catalysis, and notably the role of the Mo^V state, remain debated in the last mechanisms. The Mo^V state (4d¹) being paramagnetic with a spin $S = 1/2$, Mo(V) intermediates of the Mo-cofactor related to redox regeneration during catalysis, and/or substrate-bound Mo(V) species, can be detected by EPR spectroscopy.

All EPR studies have shown the plasticity of the Mo coordination sphere in soluble nitrate reductases. Many Mo(V) species have been detected and classified in three groups: “high *g*”, “very high *g*” and “low *g*”, the last two being minor species. The “low *g*” form, occasionally observed in reduced states of Nap, has been assigned to a degradation product with only one pyranopterin-unit binding the Mo [20]. The catalytic relevance of the “very high *g*” species that is also detected in the resting state of Nas enzymes is still unclear. Several Mo(V) “high *g*” species could be identified depending on purification conditions, on sample treatment, and on the organism of origin. The so-called “high *g*” state was observed in *as prepared* samples of NapAB from *P. pantotrophus* [2], *R. sphaeroides* [11] and NapA from *S. gelidimarina* [7], in reduced samples of *Syneccochus elongatus* NarB [9] and also in turnover conditions in *P. pantotrophus* NapAB [21]. Another form, named “high *g* nitrate”, was observed after enzyme reduction in the presence of nitrate in *P. pantotrophus* NapAB [20], *D. desulfuricans* NapA [3] and in *Azotobacter vinelandii* Nas [8], but also upon reduction without nitrate in *E. coli* NapA [6]. A third species, giving the “high *g* turnover” signal, was obtained in *D. desulfuricans* NapA in the presence of nitrate and reduced methyl viologen [22]. Other “high *g*” species have been observed when Nap is treated with inhibitors, azide and thiocyanide [20,22,23]. In addition, other minor Mo(V) signals with different *g*-values have been reported in studies of *D. desulfuricans* NapA [22]. All these “high *g*” signals share common features suggesting a similar coordination sphere of the Mo ion that was recently assigned as a 6-sulfur coordinated Mo(V) species [24]. However, which and whether any of these Mo(V) species is actually involved in turnover is still ambiguous.

We have previously characterized, using protein film voltammetry (PFV) and EPR spectroscopy, the kinetics of a reductive activation in NapAB from *R. sphaeroides* [25]. This process is slow, irreversible and correlates with the disappearance upon reduction of the Mo-cofactor form that gives rise to the Mo(V) “high *g*” resting signal. However, the molecular mechanism underlying activation was unclear. In the present study, we show that the intramolecular electron transfer step from the [4Fe–4S] center to the Mo-cofactor is slow in the inactive Mo(V) “high *g*” resting state of the enzyme. We detect a spin–spin interaction between the Mo(V) species and the [4Fe–4S]¹⁺ cluster that is modified upon activation of the enzyme. This is interpreted as an activation process involving the pyranopterin chemistry: in the inactive “high *g*” resting Mo(V) species, the pterin proximal to the iron–sulfur center is fully oxidized to a non-functional pyran ring-opened form and is modified upon activation, while the first coordination sphere of the molybdenum ion does not change.

2. Material and methods

2.1. Cell cultures, purifications and activities assays

Samples of *R. sphaeroides f. sp. denitrificans* IL106 NapA, NapB and NapAB were purified as previously described [11].

2.2. Protein film voltammetry experiments

The electrochemical setup was the same as described in refs [25,26]. It consisted of a PGE rotating electrode, a SCE reference electrode and a platinum counter electrode. Before each measurement, the PGE electrode was abraded with alpha alumina (Buehler), sonicated, rinsed and dried. 0.6 μL of a 0.2 M neomycin sulfate solution was then deposited on the electrode, allowed to dry for 5 min. 0.6 μL of a stock solution of the *in vitro* reconstituted NapAB heterodimer (see below) was deposited. The electrolytic solution, buffered with (2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid) MES, (N-cyclohexyl-2-aminoethanesulfonic acid) CHES, (2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethanesulfonic acid) HEPES, (3-[[1,3-dihydroxy-2-(hydroxymethyl)propan-2-yl]amino]propane-1-sulfonic acid) TAPS and sodium acetate (5 mM each), contained 0.1 M sodium chloride and 0.1 mM potassium nitrate.

2.3. In vitro reconstitution of the NapAB complex

NapAB dimer was reconstituted from independently purified NapA and NapB samples. NapA and NapB sample concentrations, determined by the Bradford method, were controlled spectrophotometrically by using the extinction coefficient of the iron–sulfur center in NapA ($\epsilon = 21,200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ at 400 nm) and of the reduced hemes in NapB ($\epsilon = 280,000, 41,000$ and $66,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ at 419, 522 and 550 nm respectively) [14]. Based on the measured dissociation constant of 0.5 nM for the reduced heterodimer [11], we estimated that the complex would quantitatively form by adding 1 equivalent of a 400 μM NapB aliquot to NapA in order to obtain a NapAB sample at the concentration of about 80 μM. Control of the heterodimer formation was achieved by comparing the EPR signal of the hemes in native NapAB to that of the hemes in NapB before and after quantitative addition to NapA (Supplementary Fig. S1). Anchoring NapB to the NapA subunit induces a slight shift in the position of the low field EPR-line ($g_{1,2,3} = 2.97, 2.26, 1.48$ in NapB versus $g_{1,2,3} = 2.93, 2.27, 1.50$ in NapAB) and also a decrease of the *g*-strain, the EPR lines being narrower in the heme signal in both native and *in vitro* reconstituted heterodimers NapAB. Moreover, we observed that the Mo(V) “high *g*” resting signal remains the same both in shape and intensity in NapA before and after reconstitution of the NapAB heterodimer.

2.4. Low temperature EPR spectroscopy studies

The EPR spectra were recorded on a Bruker ELEXSYS E500 spectrometer fitted with an Oxford Instruments ESR 900 helium flow cryostat. Quantifications were made by using an external standard solution of freshly prepared 1 mM Cu-EDTA in 100 mM TRIS–HCl, 10 mM EDTA at pH8 transferred into a calibrated EPR tube.

2.5. Room temperature EPR spectroscopy studies

Room temperature EPR experiments were performed on an ESP300E Bruker spectrometer fitted with a variable temperature unit BVT3000 (Bruker) using liquid nitrogen as cryogen. The temperature inside the cryostat was controlled before and after each measurement using a temperature probe set in an EPR tube. For all experiments performed at room temperature, 70 μL of protein was kept into a quartz capillary tube. Kinetic experiments were performed by recording the EPR signal decay at fixed magnetic field as a function of time. 500 equivalents of sodium dithionite (20 μL at 100 mM) and 50 μL of a fresh Nap sample were mixed together in an anaerobic cell prior to quick transfer of 70 μL of the sample in a septum-sealed EPR capillary flushed with Ar. The capillary was subsequently placed into a cryostat-mounted resonator already cooled at a fixed temperature. The dead time in the kinetic experiments, including mixing, transfer of the protein in the capillary and the required time for the sample to stabilize at the regulated temperature in the cryostat, was about 3 min. Once the kinetic

measurement was achieved, the complete extinction of the Mo(V) signal was checked by recording a room-temperature spectrum and the redox status of the sample in the capillary was controlled by low temperature EPR spectroscopy. We ensured that no magnetic field drift occurred during the course of the experiment (up to 2 h).

2.6. Preparation of the Mo(V) species

The Mo(V) “high g” resting form was detected in all *R. sphaeroides* NapA and NapAB aerobically-purified samples studied so far. The “high g” species is stable at room temperature under both aerobic and anaerobic conditions. In these samples, the iron–sulfur and heme centers are oxidized. The “high g” species can be detected together with the reduced $[4\text{Fe}-4\text{S}]^{1+}$ center by freezing a NapA sample incubated with about 100 equivalents of dithionite for less than 1 min at room temperature (all sodium dithionite solutions were prepared just before use from Ar-degassed powder dissolved in the protein buffer, 20 mM Hepes pH 8, 50 mM NaCl). Two procedures were used to prepare the “high g nitrate” Mo(V) form in NapA and NapAB, the proportions of which did not exceed 0.15 spin/protein in our experiments. In the first procedure, the “high g nitrate” state was obtained by adding nitrate (from 100 to 150 mM final concentration) to a sample (25 to 80 μM of protein) that was firstly reduced with 100 equivalents sodium dithionite (5–10 mM final concentration). We checked using low temperature EPR that the “high g” resting signal had totally vanished before re-oxidizing the sample with nitrate. In the second procedure, the sample was first activated by incubation with 500 equivalents dithionite for 1 h. The sample was then reoxidized by exposure to air, washed under

aerobic conditions with a final buffer consisting of 100 mM MES, 50 mM NaCl at pH 6 or 50 mM HEPES pH 8, 50 mM NaCl. Under these conditions, the reoxidized sample was EPR-silent and the Mo(V) “high g nitrate”-like signal developed by further reduction with 200 equivalents of dithionite. In all sample preparations showing the “high g nitrate”, both the iron–sulfur cluster and the hemes (in NapAB only) were reduced.

3. Results

3.1. Slow decay of the Mo(V) “high g” EPR signal under reductive conditions

Air-purified samples of NapAB display at 15 K an EPR signature at $g = 2.93, 2.27, 1.50$ associated to the two low spin $S = 1/2$ *c*-type hemes of the NapB subunit (Fig. 1c). In addition to the heme signal, a slow relaxing signal is visible around $g \sim 2$. This rhombic signal is better observed at higher temperature (55 K in Fig. 1e) and is due to a paramagnetic Mo(V) $S = 1/2$ species with g -values at 1.999, 1.991, 1.981 (Table 1). This signal shows hyperfine interaction with two non-exchangeable $I = 1/2$ nuclei, attributed to the β -methylene protons of the cysteine that binds the molybdenum ion [21]. The average g -value of this Mo(V) signal is higher than usual for Mo(V) EPR signals; for this reason the Mo(V) species have been called “high g”. Among them, the “high g” resting form, that is observed in the *as purified* enzymes, is identical in both *R. sphaeroides* NapA and NapAB samples except that it accounts for 30–60% of the enzyme in NapA and 5–20% in NapAB, depending on the purification batch. In the air-purified NapAB,

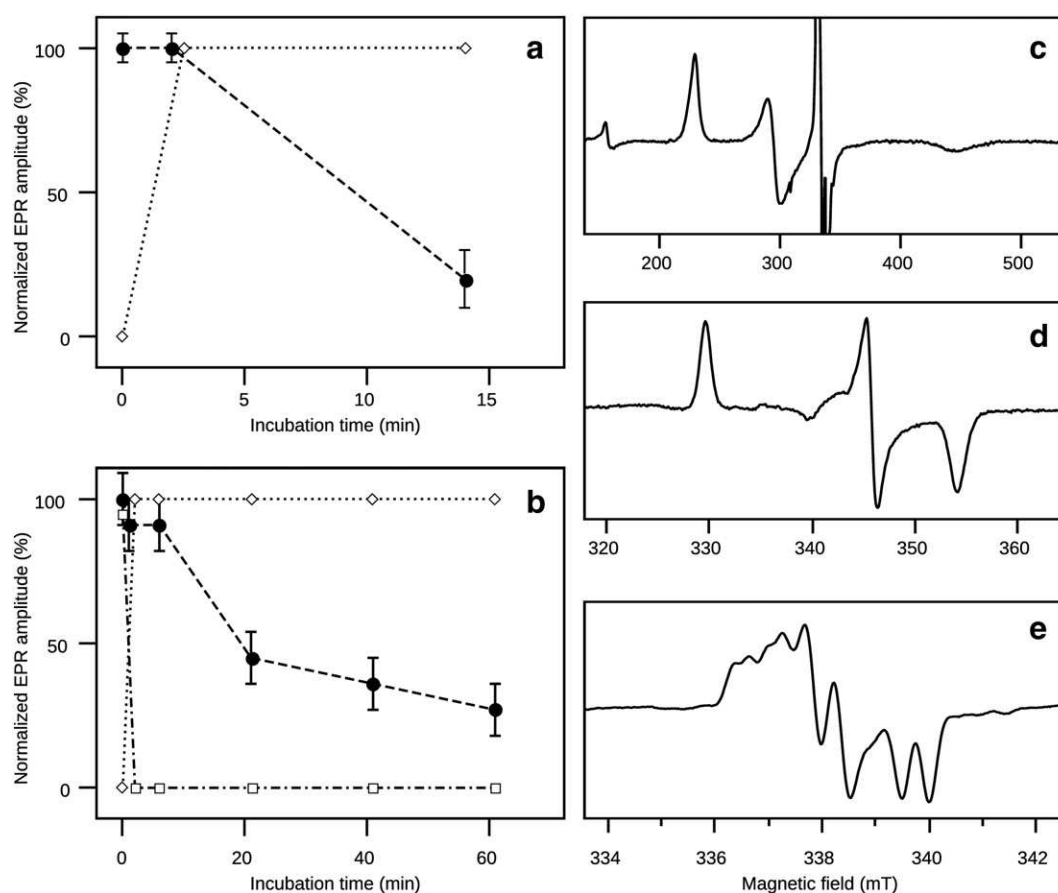


Fig. 1. EPR signatures of the redox centers in *Rhodobacter sphaeroides* NapAB and signals decay over incubation time with dithionite at room temperature monitored by low temperature EPR in NapA and NapAB. Left panels - Evolution of the EPR signal amplitude of the “high g” Mo(V) species (●), $[4\text{Fe}-4\text{S}]^{1+}$ (◇) and hemes (□) in NapA (a) and NapAB (b) upon addition of 100 equivalents of sodium dithionite. Right panels - EPR signatures of the *c*-type hemes (c), $[4\text{Fe}-4\text{S}]^{1+}$ center (d) and the Mo(V) “high g” species (e) in NapAB. EPR recording conditions: microwave frequency 9.408 GHz (a) temperature 15 K, modulation amplitude 2 mT, microwave power 4 mW; (b) 15 K, 0.5 mT, 1 mW; (c) 55 K, 0.2 mT, 1 mW.

Table 1
g- and A-parameters for the Mo(V) “high g” species in *Rhodobacter sphaeroides* NapA and NapAB. The parameters given are those determined in the simulations of the experimental EPR-spectra by using the EasySpin package [28]. n.d.: not determined.

Mo(V) “high g” species	g-values (g_1, g_2, g_3)			g_{av}	$g_{anisotropy}$ ($g_1 - g_3$)	Rhombicity ($g_1 - g_2$)/($g_1 - g_3$)	Hyperfine splitting $A/g\beta$ (mT) (A_1, A_2, A_3)			Reference
High g resting NapAB	1.9989	1.9908	1.9812	1.9903	0.0177	0.458	0.61	0.56	0.50	[27]
High g resting NapA	1.9988	1.9909	1.9812	1.9903	0.0176	0.449	0.29	n.d.	n.d.	This work
High g-reduced [4Fe-4S] ¹⁺ NapA	1.9983	1.9911	1.9811	1.9902	0.0172	0.419	0.64	0.52	0.50	This work
High g nitrate NapA	1.9977	1.9886	1.9813	1.9892	0.0164	0.555	0.29	n.d.	n.d.	This work
							0.57	0.47	0.45	
							0.26	n.d.	n.d.	

an additional species at $g = 2.02, 2.00$ and 1.99 , referred to “very high g” in the literature, is sometimes visible together with the “high g” species (not shown). In our preparations, the “very high g” form never exceeded 0.05 spin/protein. The third type of Mo(V) signal, called “low g”, is only occasionally observed in dithionite-reduced samples of Nap from *R. sphaeroides* (not shown).

Upon addition of an excess of sodium dithionite to an air-purified sample of NapAB, followed by a short incubation time (less than 1 min) and by freezing in liquid nitrogen, the signal of the hemes disappears and a signal typical of a $S = 1/2$ reduced [4Fe-4S]¹⁺ cluster is detected at $g = 2.04, 1.95, 1.90$ (Fig. 1d). The same signal is observed for NapA which has no hemes. Surprisingly, the intensity of the “high g” Mo(V) signal remains unchanged after incubation with dithionite for a few minutes. We monitored the disappearance of the “high g” resting signal incubated with the reductant by low temperature EPR (Fig. 1). To do so, the sample was quickly thawed under Ar atmosphere and refrozen after different incubation times. The total extinction of the Mo(V) “high g” resting signal occurred in less than 20 min for NapA (Fig. 1a) and more than 1 h for NapAB (Fig. 1b). This slow reduction of the “high g” resting form has already been observed in *P. pantotrophus* NapAB [2,20]. Furthermore, once extinguished, this signal cannot be regenerated by oxidation of the sample with ferricyanide or air, whereas the other cofactors show a fully reversible redox behavior [25]. This suggests that the redox properties of the Mo-cofactor are modified by the enzyme activation process. In addition, in NapAB samples in which a “very high g” Mo(V) signal could be detected together with the “high g” signal, the former disappeared as quickly as the heme signal upon reduction (not shown), suggesting that the slow decay of the Mo-cofactor is a peculiar feature of the “high g” resting form.

3.2. Kinetic study of the Mo(V) “high g” signal extinction monitored by EPR spectroscopy at room temperature

Due to its slow relaxation properties, the “high g” resting signal can still be observed at room temperature, as shown in Fig. 2. The position and shape of the EPR lines indicate that the tumbling of the protein is slow enough not to average (or to average only weakly) the g- and A-tensors anisotropy of the EPR species. Room temperature EPR Mo(V) signals have been reported in a few molybdo-proteins, but the advantages of detecting Mo(V) signals in fluid protein solution have been rarely exploited [29–31]. Here the kinetics of the “high g” Mo(V) EPR signal decay after anaerobic addition of 500 equivalents of sodium dithionite were monitored in NapA, and in the native and *in vitro* reconstituted NapAB heterodimers. These EPR experiments are very demanding in terms of amount of biological material since, once reduced, the “high g” resting state cannot be restored. The evolution of the EPR signal amplitude as a function of the incubation time with the reductant is shown in Fig. 3. The experimental data can be described by a monoexponential decay giving apparent time constants of 2.8 ± 0.2 min for NapA, 21 ± 3 min for NapAB and 18 ± 1 min for the reconstituted NapAB complex, all at room temperature (ca. 23 °C).

The corresponding pseudo-first-order rate constants (called k_{dec} for decay) are reported in Table 2. The extinction of the “high g” signal is about 6 times faster for NapA than for the NapAB complex. This shows that the rate of Mo(V) signal decay is affected by the presence of the NapB subunit, as previously shown for the rate of reductive activation by PFV [25]. Adding low potential redox mediators, either methyl viologen or a mixture of mediators, at 10% of the protein concentration had no noticeable effect on the kinetics of the Mo(V) signal extinction (Table 2). The temperature dependence of the reduction process of the Mo(V) “high g” resting state was also investigated on NapA to take advantage of the higher relative proportion of the “high g” resting signal than in NapAB. Fig. 4 shows the results as an Arrhenius plot, from which an activation energy value of 69 ± 8 kJ/mol can be derived.

3.3. Comparison of kinetic parameters for the reductive activation studied by PFV and by EPR

We compared the effect of temperature on the rate of activation of NapA, measured using EPR, and of NapAB, measured using electrochemistry, since NapAB gives more intense electrochemical signals than NapA. In a previous electrochemical study, we showed that films of periplasmic nitrate reductase undergo a slow activation process the first time the enzyme is poised at a sufficiently low potential [25]. This reductive activation is illustrated in the chronoamperogram of Fig. 5b, obtained with a fresh film of NapAB adsorbed onto a rotating graphite electrode, and immersed into a solution of 0.1 mM nitrate, when the electrode potential is changed as indicated in panel a (Fig. 5). The magnitude of the current is proportional to turnover rate (the more negative

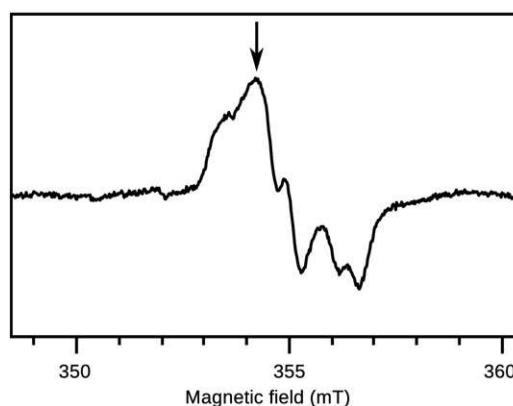


Fig. 2. EPR signature of the Mo(V) “high g” resting species at room temperature in *Rhodobacter sphaeroides* NapA. Enzyme concentration about 100 μ M, the “high g” Mo(V) represents about 0.3 spin per protein. EPR recording conditions: microwave frequency 9.879 GHz, modulation amplitude 0.2 mT, microwave power 8 mW. Arrow marks the position of the magnetic field chosen for kinetic measurement at room temperature (on Fig. 3).

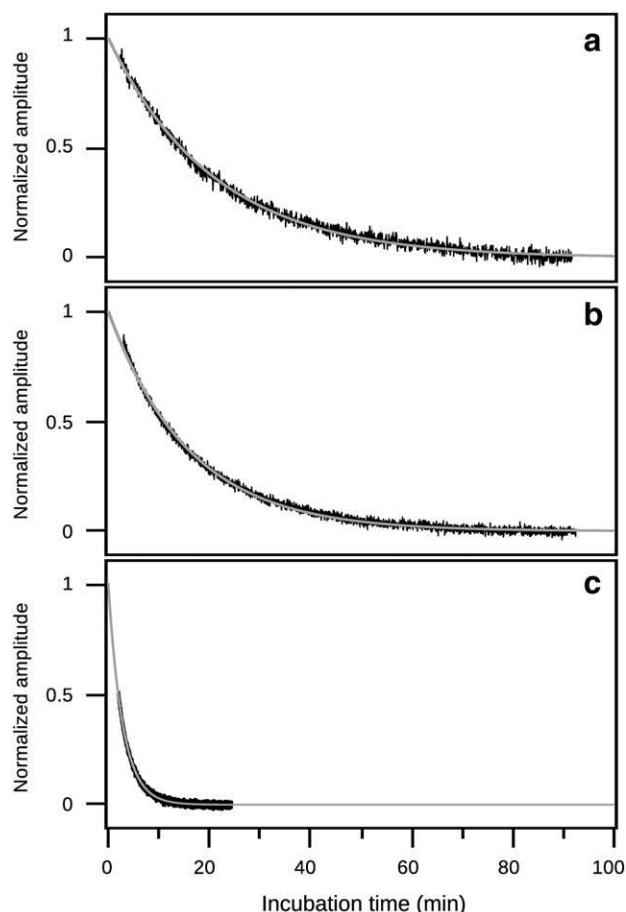


Fig. 3. Kinetics of reduction of the Mo(V) “high g” resting species monitored by EPR at fixed magnetic field and room temperature (23 °C). Traces a), b) and c) correspond to reduction in native NapAB complex, *in vitro* reconstituted NapAB complex and NapA respectively, at pH 8. Position of the magnetic field is marked by an arrow on Fig. 2. Experimental decays in traces a, b and c are adjusted with monoexponential fits (gray lines) with time constants τ : 21 min (native NapAB), 18 min (reconstituted NapAB) and 2.8 min (NapA).

the current, the higher the activity). When the potential is poised at $E = -160$ mV (at $t = 1$ min), the current is essentially constant. On the step to -460 mV, at $t = 4$ min, the activity first instantly decreases (the current becomes less negative), consistent with the lower activity at lower potentials [32] and then slowly increases before it stabilizes. This slow change in current demonstrates that the enzyme activates at low potential. When this sequence of potential steps is repeated with the same film of enzyme, after a poise at $+240$ mV (from $t = 46$ min), the activity detected at $E = -160$ mV is greater than that measured on the first step at this potential (at $t = 1$ min), and no further activation occurs on the second step to -460 mV, at

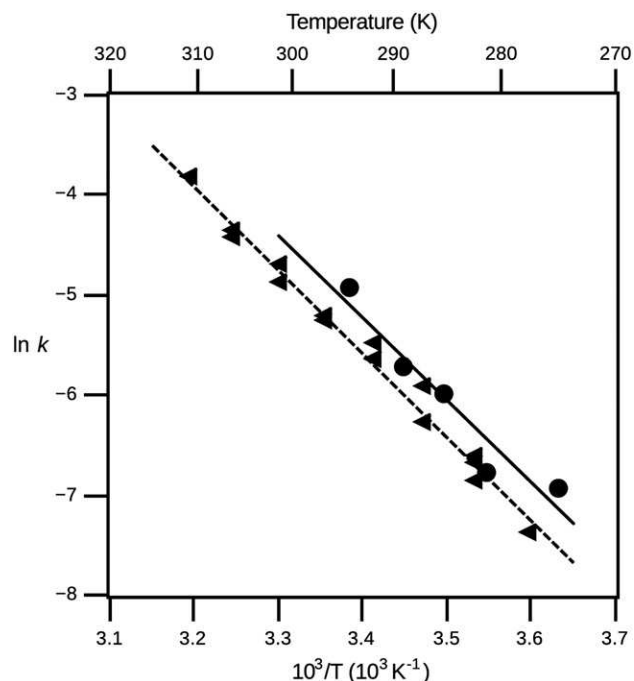


Fig. 4. Temperature dependence of the apparent kinetic rate constants for the decay of the Mo(V) “high g” resting signal monitored by EPR at room temperature (k_{dec} , ●) and of the irreversible reductive activation process studied by PFV (k_{act} , ▲). EPR experiments were performed on NapA at pH8 (in the presence of 10 μM methyl viologen) and PFV experiments on NapAB at pH6.

$t = 51$ min. Therefore, the activation proceeds only once, on the first step to -460 mV, and it is not reversed by taking back the enzyme to oxidizing conditions ($+240$ mV), indicating that the enzyme inactivation is a very slow process.

We have shown before that the relative magnitude of this activation equates the fraction of Mo(V) “high g” resting that is present in the sample before activation [25]. We concluded that this species is an inactive form that irreversibly activates the first time the enzyme is reduced. In order to mirror the kinetic measurements made with EPR, we have used electrochemistry to investigate the temperature dependence of the activation rate constant k_{act} with NapAB at pH 6. The data summarized in Table 2 show a five-fold difference between the rate constants measured at pH 8 and 6 in two completely independent experiments (PFV versus EPR). The fact that this difference is small is consistent with our former conclusion that the rate of the activation process depends only very weakly on pH [25]. From the data in Fig. 4, we calculated an activation energy value of 69 ± 5 kJ/mol. The agreement between data derived from chronoamperometry and room temperature EPR experiments shows that the reduction of the Mo(V) “high g” resting into Mo(IV) and the activity enhancement seen by electrochemistry depend on the same rate-determining step.

Table 2

Rate constants of the reductive activation and reduction potential of the redox centers in *R. sphaeroides* NapA and NapAB.

	Reduction rate of the Mo(V) “high g” k_{dec} (s^{-1}) from EPR experiments at 23 °C, pH8	Activation rate k_{act} (s^{-1}) from PFV experiments, at 25 °C, pH6	Redox potential E° (Mo ^V /Mo ^{IV}) (mV vs SHE) at pH7	Redox potential E° [4Fe-4S] ^{2+/1+} (mV vs SHE) at pH 7
NapA	$6.5 \cdot 10^{-3}$	$2.6 \cdot 10^{-2}$ b	-210 mV ^c	-240 mV ^c
Native NapAB	$8 \cdot 10^{-4}$	$6 \cdot 10^{-3}$ b	-225 mV ^c	-80 mV ^c
Reconstituted NapAB	$9.5 \cdot 10^{-4}$	$5.4 \cdot 10^{-3}$	n.d.	n.d.
	(11.10^{-4} with mediators ^a)			

a: in the presence of mediators (ferrocene monocarboxylic acid, potassium hexacyanoferrate(III), 2,6-dichlorophenol-indophenol, 2,5 dimethyl-*p*-benzoquinone, 1,2-napthoquinone, phenazine methosulfate, phenazine ethosulfate, methylene blue, resorufin, indigo carmine, 2-hydroxy-1,4-napthoquinone, phenosafranin, neutral red and methyl viologen, 3 μM final each), b: reference [25], c: reference [11].

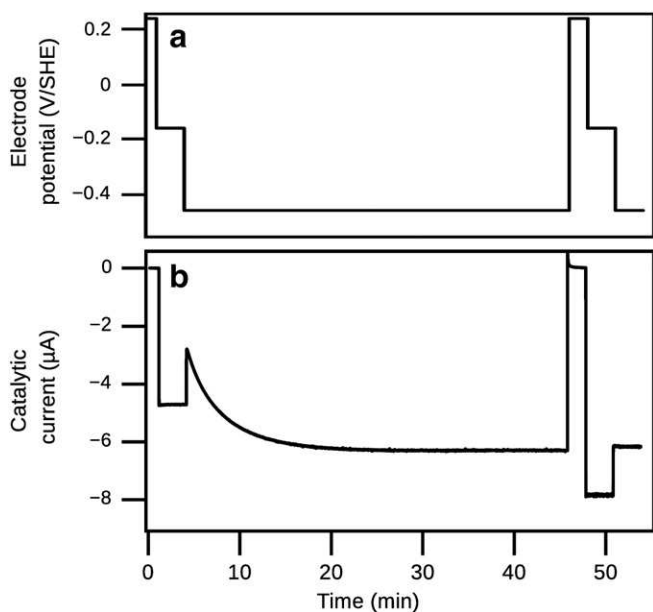


Fig. 5. Chronoamperometric experiment evidencing the irreversible activation process occurring during the first reduction of *in vitro* reconstituted NapAB. Electrode rotation rate 5000 rpm, pH 6, 20 °C. Data have been corrected for film desorption as described in reference [33].

3.4. Modification of the spin–spin interactions between the Mo center and the $[4\text{Fe-4S}]^{1+}$ cluster upon reductive activation

The shape of the Mo(V) “high *g*” resting EPR signal detected in frozen samples of *as prepared* Nap is independent of temperature, as observed up to 240 K and illustrated at 15 and 80 K (Fig. 6a, b). Upon reduction with dithionite followed by rapid freezing, the $[4\text{Fe-4S}]$ becomes fully reduced and paramagnetic ($S = 1/2$) while the “high *g*” Mo(V) signal remains observable. The latter is shown at 80 K and 15 K in traces 6c and 6d. At 80 K, the Mo(V) EPR spectrum shows no significant changes in *g*- and *A*-values upon reduction of the proximal $[4\text{Fe-4S}]$ (see

Table 1). In contrast, weak spin–spin interactions between the “high *g*” Mo(V) and the reduced iron–sulfur center develop at 15 K as additional lines-splitting (Fig. 6d); the magnitude of the interaction (about 0.5 mT) is similar to the hyperfine splitting (Table 1). Spin–spin interactions are visible on the EPR spectrum at temperatures up to 40 K at which the $[4\text{Fe-4S}]^{1+}$ signal disappears due to relaxation broadening.

Once the enzyme fully reduced and activated, we can detect another Mo(V) species both in NapA and NapAB by adding an excess of nitrate (see material and methods for details). Such species was originally observed in reduced *A. vinelandii* nitrate reductase in the presence of an excess of nitrate and later called “high *g*” nitrate [8,20]. In *R. sphaeroides* nitrate reductase, the “high *g* nitrate” Mo(V) can also be produced in the absence of nitrate after a redox cycling procedure, which consists of a reductive activation followed by air-oxidation and then reduction with dithionite. The “high *g* nitrate” displays *g*-values and ^1H -hyperfine couplings that are close but slightly different from those of the “high *g*” resting species (compare traces a and e in Fig. 6, and see Table 1). The two “high *g* nitrate” forms observed with or without nitrate present the same continuous-wave EPR features and line splitting. In all samples prepared, the Mo(V) “high *g* nitrate” was detected with the iron–sulfur cluster being in the reduced state. The “high *g* nitrate” EPR spectra presented in Fig. 6e (80 K) and 6f (15 K) come from a sample obtained without nitrate. As for the “high *g*” signal, the line splitting due to magnetic coupling with the $[4\text{Fe-4S}]^{1+}$ center disappears above 40 K. We observed that at 15 K, the pH value (6 or 8) had an influence neither on the shape nor on the splitting of the Mo(V) signal (not shown). At 15 K, the spectrum of the Mo(V) “high *g* nitrate” species coupled to the iron–sulfur cluster shown in Fig. 6f is characterized by a splitting of the g_1 and g_2 lines and a slight broadening of the g_3 lines.

Whereas “high *g*” resting and “high *g* nitrate” species display close *g*- and *A*-values, the overall comparison of the two split signals at 15 K evidences significant changes in the spin–spin interactions after reductive activation. The most visible modification is that the g_3 -lines are split in the “high *g*” resting but not in the “high *g* nitrate” states (compare Fig. 6d and f). However, the magnitude of the splitting does not significantly change between both “high *g*” Mo(V) species. Similar weak spin–spin interactions between the Mo-cofactor and the

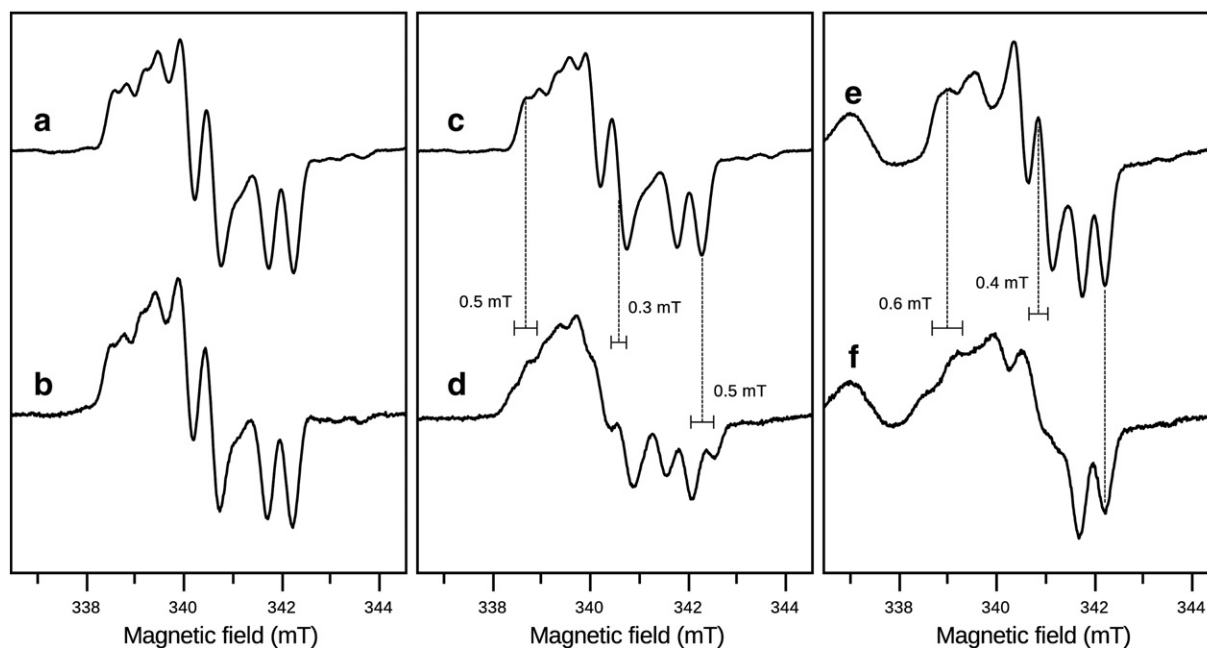


Fig. 6. EPR signatures of the Mo(V) “high *g*” resting-oxidized $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$, “high *g*”-reduced $[4\text{Fe-4S}]^{1+}$ and “high *g* nitrate”-reduced $[4\text{Fe-4S}]^{1+}$ species at 80 K (a, c, e) and 15 K (b, d, f) in *Rhodobacter sphaeroides* NapA. All spectra presented here were obtained with NapA (concentration 70–80 μM) at pH8 (a–d) and pH6 (e–f). EPR recording conditions: microwave frequency $\nu = 9.48\text{GHz}$, modulation amplitude 0.1 mT, modulation frequency 100 kHz; a), c), e) temperature 80 K, microwave power 1 mW; b) 15 K, 1 μW ; d) 15 K, 3 μW and f) 15 K, 10 μW .

adjacent Fe–S cluster have been described in other molybdoenzymes such as xanthine oxidase (XO) [34] or aldehyde oxidoreductase (AOR) [35]. In these proteins, magnetic interactions between various Mo(V) species and the proximal $[2\text{Fe}-2\text{S}]^{1+}$ center are visible by EPR at low temperature, with lines splitting of the Mo(V) signals ranging from about 0.5 to 2.5 mT [34,36]. Quantitative studies of the magnetic couplings between the Mo(V) species and the proximal $[2\text{Fe}-2\text{S}]^{1+}$ (at 16 Å from the Mo ion in AOR, and 19 Å in XO) showed that the contributions from dipolar and exchange interactions are comparable, with exchange parameter values deduced from spectrum analysis of $J = 1.2 \times 10^{-3} \text{ cm}^{-1}$ for AOR [37] and $2.2 \times 10^{-3} \text{ cm}^{-1}$ for XO [34] (with the convention for the exchange term $+J\mathbf{S}_A\mathbf{S}_B$). In *R. sphaeroides* NapAB, the distance between the Mo ion and the $[4\text{Fe}-4\text{S}]$ center (taken at the center of the iron tetrahedron) is close to 13.5 Å according to the crystal structure. With such a distance, comparable contributions (of about 10^{-3} cm^{-1}) from the dipolar and exchange interactions to the spin–spin coupling are expected, which is consistent with the Mo(V) signal line splittings observed at low temperature.

4. Discussion

4.1. Fast intramolecular electron transfer between the iron–sulfur center and the Mo-cofactor is recovered upon reductive activation

A reductive activation process has been observed for several nitrate reductases: the membrane-bound *E. coli* NarGH [38], the soluble cytoplasmic *S. elongatus* Nas [38] and the periplasmic *R. sphaeroides* Nap [25]. This reductive activation has been evidenced in protein film voltammetry experiments by a slow increase of the catalytic current the first time the potential of the electrode is stepped down (Fig. 5). In *R. sphaeroides* NapAB, we have previously shown that this process is slow, pH- and nitrate concentration-independent, irreversible and related to the disappearance of the Mo-cofactor form that gives rise to the Mo(V) “high g” resting signal [25]. This species is observed in variable amounts in as-prepared samples of Nap: about 10–20% in NapAB and up to 60% in NapA.

Here, we have demonstrated that reductive activation includes the slow reduction of the Mo(V) “high g” resting form, the others redox centers of the protein being quickly reduced by dithionite on the time scale of our experiments. Kinetic experiments performed by room-temperature EPR spectroscopy enabled us to measure the pseudo-first order rate constant of decay (k_{dec}) of the “high g” resting signal. This constant is independent of the presence of methyl viologen or a cocktail of mediators, but it is lower when the catalytic subunit NapA is associated to NapB ($k_{\text{dec, NapA}}/k_{\text{dec, NapAB}} \sim 6$, see Table 2). This ratio is consistent with the rates of the first activation measured by PFV, which are four times faster in NapA than in NapAB [25]. We have studied the effect of the temperature on the rate of activation by EPR with NapA, and by electrochemistry with NapAB, and have determined the same activation energy $E_a = 69 \text{ kJ mol}^{-1}$.

Intramolecular electron transfer between FeS and the Mo-cofactor must be slow in the inactive enzyme since the iron–sulfur in NapA (and the hemes in NapAB) are quickly reduced whereas the “high g” Mo(V) signal requires minutes to hours to completely vanish. If we suppose that the rate-limiting step in the activation process is precisely the intramolecular electron transfer step from the $[4\text{Fe}-4\text{S}]^{1+}$ to the Mo-cofactor, then the apparent rate constants k_{dec} or k_{act} can be interpreted by using the Marcus equation (Eq. (1)):

$$k_{\text{ET}} = \frac{2\pi}{\hbar} \frac{|T_{\text{ab}}|^2}{\sqrt{4\pi\lambda k_B T}} \exp\left(\frac{-(\Delta_r G^\circ + \lambda)^2}{4\lambda k_B T}\right) \quad (1)$$

At room temperature, the $T^{-1/2}$ term is of little influence, so that the exponential term can be expressed as the function of the activation energy determined experimentally. The free enthalpy of reaction $\Delta_r G^\circ$ can

be roughly estimated using the redox potentials derived from potentiometric titrations coupled to EPR spectroscopy for the Mo(V)/Mo(IV) and $[4\text{Fe}-4\text{S}]^{2+/1+}$ transitions for NapA and NapAB at pH 7 (Table 2). This gives a free energy $\Delta_r G^\circ = RT(E_{4\text{Fe}}^\circ - E_{\text{Mo}}^\circ) \sim -30 \text{ meV}$ and -145 meV for NapA and NapAB, respectively, which can be reasonably neglected with respect to the reorganization term λ . Indeed, using the activation energies determined above, one deduces that $\lambda \sim 4E_a = 2.8 \text{ eV}$ for both NapA and NapAB. With such values of λ , the ratio of activation rates constant between NapA and NapAB can be explained by a slightly different electronic coupling matrix element T_{ab} of 5.6 cm^{-1} and 1.6 cm^{-1} for NapA and NapAB respectively. The unreasonably high value of the reorganization energy λ is not consistent with a pure electron transfer reaction. This rather suggests that the electron transfer depends on a chemical step that precedes it, a mechanism described as a gated or coupled electron-transfer in the literature [39,40].

Alternatively, the intramolecular electron transfer may be extremely slow in the inactive enzyme, even slower than the measured activation rate. The reductive activation would then require that dithionite directly reduces the Mo-cofactor, either from the surface through the more solvent-exposed pyranopterin, or after diffusion towards the active site along the substrate access channel. The formation of the NapAB complex may slightly modify the structure of the channel and the accessibility of the Mo-cofactor, thus explaining the changes in activation rate between NapA and NapAB. However, we consider this mechanism as unlikely since direct electron transfer from the working electrode to the Mo-cofactor is impossible in electrochemical experiments.

The observation that the “high g” resting EPR signal slowly decays is apparently conflicting with the former kinetic model we proposed, in which the activation proceeded by fast (Nernstian) reduction of the Mo(V) ion followed by a slow and irreversible chemical step [25]. All kinetic data can however be rationalized in a refined model by considering that a slow and rate-limiting equilibrium transformation at the Mo-cofactor in the Mo(V) state precedes the reduction to the Mo(IV) state.

4.2. A molecular model of reductive activation

No molecular mechanism of reductive activation in Nap has been proposed so far. We have previously shown that this activation is not reversed under any of the conditions tested in our experiments (exposure to concentrated HEPES or MES buffers, Ni^{2+} , Zn^{2+} with or without nitrate, sulfite, sulfide, azide, imidazole, glycerol, O_2 , or electrode potentials up to +640 mV for up to 5 min) [25]. This suggests that the inhibition is probably not due to an exogenous molecule that enters the molybdenum coordination sphere.

Once the enzyme fully reduced and activated, we detect in certain conditions another EPR-active Mo(V), previously named in the literature “high g nitrate”. Its g-values are very close to those from the “high g” resting, with slight changes in the ^1H -hyperfine couplings. This shows that the reductive activation does not involve significant modifications in the first coordination sphere of the Mo ion. However, the “high g nitrate” species displays a spin–spin interaction spectrum which is different from the one observed for the inactive Mo(V) “high g” resting state thus reflecting some structural modifications between the Mo^{5+} ion and the $[4\text{Fe}-4\text{S}]^{1+}$ (Fig. 6).

Spin–spin interactions between paramagnetic centers may be affected by the modification of either the dipolar or the exchange magnetic interactions, or both. The electronic structures of both the Mo(V) and $[4\text{Fe}-4\text{S}]^{1+}$ being unchanged, the dipolar component of the magnetic interaction would be modified only if the relative arrangements of the Mo and $[4\text{Fe}-4\text{S}]$ centers were modified, which is unlikely. We therefore favor the possibility that the exchange coupling pathway between centers is changed upon activation, which modulates the magnitude of the exchange coupling constant. Such an interaction depends on the overlap between the magnetic molecular orbitals of the interacting

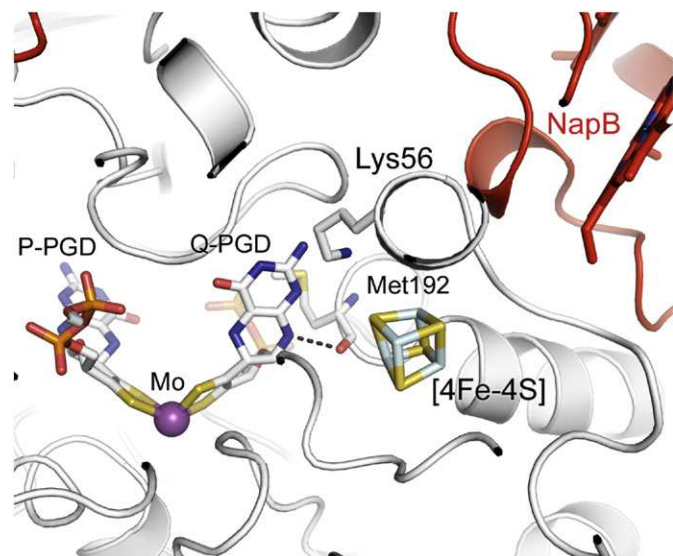


Fig. 7. Zoom on the molybdenum cofactor and the [4Fe–4S] cluster in *Rhodobacter sphaeroides* NapAB (PDB code: 1OGY).

paramagnetic centers. Based on available Nap crystal structures, we propose an exchange coupling pathway between the Mo ion and the [4Fe–4S] involving lysine 56 and the pyranopterin proximal to the iron–sulfur cluster (Q-PGD in Fig. 7). Chemical modifications of the proximal pyranopterin, such as a conformational and/or redox changes, would precisely affect the exchange coupling pathway between the Mo-cofactor and the [4Fe–4S] cluster.

Although pterins can exist in a variety of redox states, pyranopterins are thought to be present in either the “dihydro” or the “tetrahydro” reduced forms in molybdoenzymes (Fig. 8) [41]. In Mo-bisPGD enzymes, the conformation of the pyranopterin proximal to the iron–sulfur center would be consistent with the tetrahydro state and the distal pyranopterin with a dihydro conformation [41]. Furthermore, in most of the available crystal structures, pterins present a tricyclic structure with a pyran ring fused to the pyrazine ring of the pterin unit. A bicyclic pyran ring-opened form has been observed in two crystal structures from the Mo-bis-PGD enzymes family, namely the heterotrimeric membrane-bound nitrate reductase (NarGHI) from

E. coli and *Aromatoleum aromaticum* ethylbenzene deshydrogenase EdbH [42,43]. Several authors propose the participation of scission/condensation reactions of the pyran ring in catalysis at the metal center [41,44–46]. Another point is whether the pterin redox reactivity is involved in the catalytic reaction of the enzymes [45,46]. These two aspects are difficult to address, especially because of the *in vitro* instability of the pyranopterin upon release from the protein. Nevertheless, one can learn from *in vitro* studies about the reactivity on pyranopterin and molybdopterin complex. Thus, several studies have shown the reversibility of the pyran-cycle formation [47], or that pyranopterin oxidation leads to the bicyclic oxidized pterin (Fig. 8, form 4) [48,49].

Relying on this literature, we propose that the Mo(V) “high g” resting form in *R. sphaeroides* NapAB is inactive because the proximal pterin ligand of the Mo-cofactor is present in a fully oxidized and ring-opened form (form 4 in Fig. 8), impeding efficient intramolecular electron transfer. The variations observed in the low-temperature EPR spectrum of the Mo(V) species, before and after activation, interpreted as a modification of the proximal pyranopterin affecting the exchange coupling pathway, support this hypothesis. In the inactive enzyme, the oxidized and open state of the pterin affects the reduction potential of the Mo(V)/Mo(IV), as evidenced by the fact that Mo(V) has a large potential stability range before the activation while it is not detectable afterwards [25,50]. Such thermodynamic influence was discussed in the case of sulfite oxidase, which undergoes inhibition upon oxidation of the pyranopterin cofactor by ferricyanide [51]. Even though oxidized sulfite oxidase retains some activity, electron transfer from the molybdenum site is severely slowed. This led to two main hypotheses with regard to the role of the pyranopterin in sulfite oxidase activity, either acting as an electron transfer conduit or modulating the molybdenum reduction potential, the latter being favored on the basis of spectroscopic studies on synthetic models which mimic the ferricyanide-inhibited sulfite oxidase Mo-cofactor [52]. In periplasmic nitrate reductase, the reduction of the pterin and the formation of the pyran ring probably modify both the thermodynamic properties of the Mo ion and the kinetics of the electron transfer, thus enabling recovery of physiologic intramolecular electron transfer between the [4Fe–4S] center and the Mo ion.

The overall mechanism of the reductive activation we propose, presented in Fig. 9, includes the cyclization of the pyran unit and the two-electron and two-proton reduction of the proximal pterin, yielding the tetrahydropyranopterin state (form 1, Fig. 8). A more detailed mechanism requires considering the source of the electrons needed to

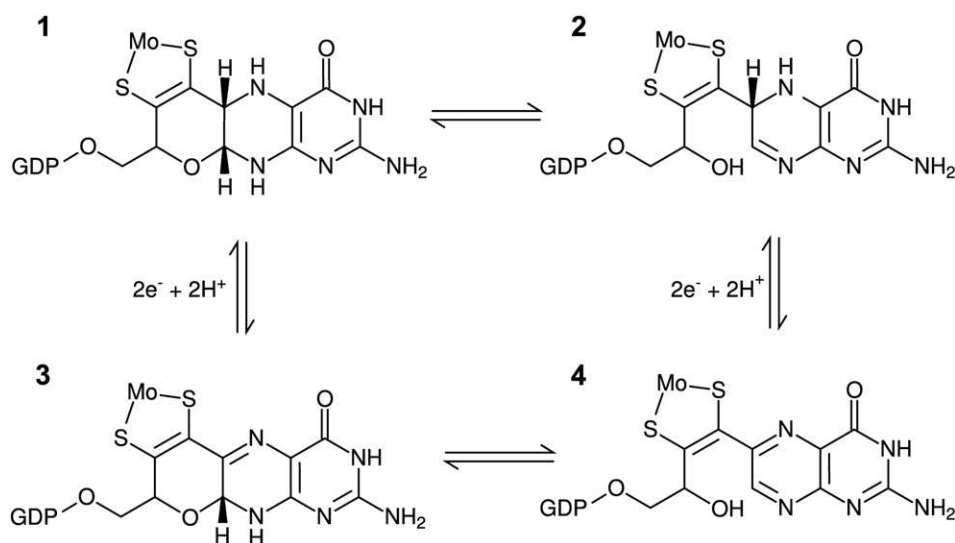


Fig. 8. Representations of the pyranopterin ligand in the “dihydro” (3) or the “tetrahydro” (1) tricyclic states. The equilibrium between the forms 1 and 2 (one of the possible tautomer is represented here), or 3 and 4, corresponds to condensation/scission reaction of the pyran ring.

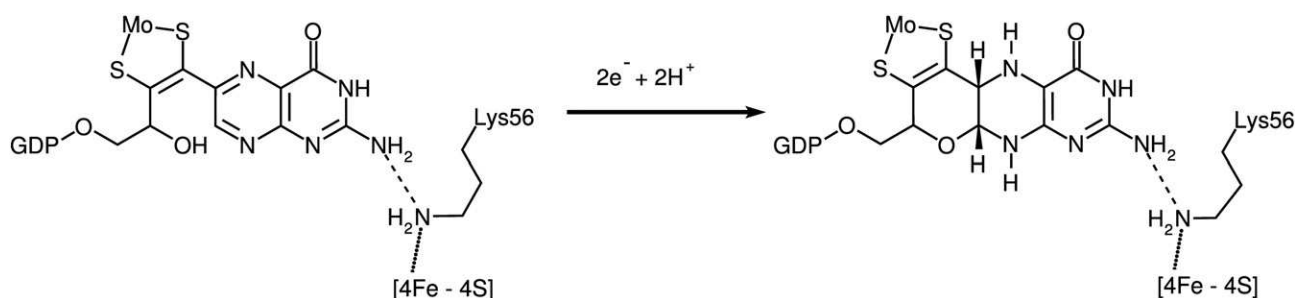
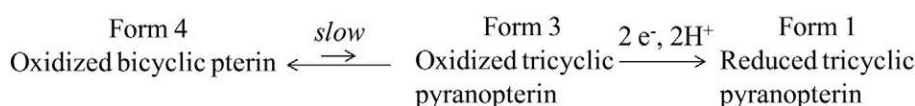


Fig. 9. Proposed overall molecular mechanism for the irreversible activation occurring upon reductive treatment of the *as prepared* *R. sphaeroides* NapAB (or NapA) in the Mo(V) “high g” resting state. Irreversible conversion of the inactive into a catalytically competent form of the enzyme includes the formation of the pyran ring and the 2-electron, 2-proton reduction of the fully oxidized pterin to the functional tetrahydropyranopterin state.



Scheme 1. Putative mechanism for the reductive activation centered on the proximal pterin of the Mo-cofactor of periplasmic nitrate reductase.

reduce the pterin, and whether the formation of the pyran unit precedes the reduction of the pterin or not. Studies on synthetic pyranopterin reactivity have shown that air (or ferricyanide) oxidation yielded the oxidized bicyclic pterin (form 4), that is then thermodynamically more stable than the oxidized tricyclic counterpart (form 3 in Fig. 8) [45,49]. Considering that the equilibrium between forms 4 and 3 is strongly shifted towards form 4, we favor the mechanism presented in scheme 1, in which the slow and reversible formation of the pyran ring that produces the dihydro state (form 3) constitutes the first step. This would be followed by the irreversible reduction of the pterin to form the tetrahydropyranopterin form (form 1), locking it in the tricyclic form. The latter step may become mostly irreversible for thermodynamic reasons, especially if the reduction potential of the pterin is significantly higher than that of the redox center providing/removing the electrons.

We have concluded above that the electrons necessary to reduction of the pterin moiety transit through the [4Fe–4S] center. Two possible mechanisms can be envisioned. In a first mechanism, the [4Fe–4S] center would deliver the two electrons to the pterin moiety one at a time (but only when the pyran ring is formed). This reduction would be the rate-limiting step of the reactivation. Once the pterin is closed and reduced, fast electron transfer can occur between the [4Fe–4S] and the molybdenum, in the normal catalytic cycle. In an alternative mechanism, electron transfer between the [4Fe–4S] and the molybdenum would be recovered at least partially when the pterin is oxidized and closed: the reduction of molybdenum ion would be slow because it is gated by the conformational change of the pterin (formation of the pyran ring). Once the molybdenum is reduced to the IV state, the transfer of two electrons from the molybdenum would reduce the pterin and lock it in the tricyclic form.

4.3. Conclusions

In this paper, we conclude that the mechanism of the reductive activation in *R. sphaeroides* NapAB does not involve the first coordination sphere of the Mo ion but the pyranopterin that is proximal to the [4Fe–4S] center. Based on magneto-structural correlations, we have recently proposed that the Mo(V) “high g” species in soluble nitrate reductases corresponds to a six-sulfur coordinated molybdenum ion [24], as seen in the recent high resolution crystal structure of NapAB from *C. necator* [14]. This suggests that a six-sulfur coordinated Mo^V species could be an intermediate involved in turnover. Such catalytically competent Mo(V) species still remains to be detected and/or identified as such among the various Mo(V) species observed so far. Additional

kinetic, thermodynamic and spectroscopic investigations on Mo(V) species in soluble nitrate reductases are then required to progress on the understanding of their catalytic mechanism.

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbabbio.2013.10.013>.

Acknowledgements

We would like to acknowledge the Aix-Marseille EPR spectroscopy Facility Center (national TGE-RENARD network, FR3443). This work was funded by the CNRS, CEA, Aix-Marseille Université and the Agence Nationale de la Recherche (ANR MC2 n°11-BSV5-005-01).

References

- [1] P.J. Gonzalez, C. Correia, I. Moura, C.D. Brondino, J.J. Moura, Bacterial nitrate reductases: molecular and biological aspects of nitrate reduction, *J. Inorg. Biochem.* 100 (2006) 1015–1023.
- [2] B. Bennett, B.C. Berks, S.J. Ferguson, A.J. Thomson, D.J. Richardson, Mo(V) electron paramagnetic resonance signals from the periplasmic nitrate reductase of *Thiosphaera pantotropha*, *Eur. J. Biochem.* 226 (1994) 789–798.
- [3] S. Bursakov, M.Y. Liu, W.J. Payne, J. Legall, I. Moura, J.J.G. Moura, Isolation and preliminary characterization of a soluble nitrate reductase from the sulfate-reducing organism *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774, *Anaerobe* 1 (1995) 55–60.
- [4] M. Sabaty, C. Avazeri, D. Pignol, A. Vermeglio, Characterization of the reduction of selenate and tellurite by nitrate reductases, *Appl. Environ. Microbiol.* 67 (2001) 5122–5126.
- [5] T. Hettmann, R.A. Siddiqui, C. Frey, T. Santos-Silva, M.J. Romao, S. Diekmann, Mutagenesis study on amino acids around the molybdenum centre of the periplasmic nitrate reductase from *Ralstonia eutropha*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 320 (2004) 1211–1219.
- [6] B.J. Jepson, S. Mohan, T.A. Clarke, A.J. Gates, J.A. Cole, C.S. Butler, J.N. Butt, A.M. Hemmings, D.J. Richardson, Spectropotentiometric and structural analysis of the periplasmic nitrate reductase from *Escherichia coli*, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 6425–6437.
- [7] P.J.L. Simpson, A.A. McKinzie, R. Codd, Resolution of two native monomeric 90 kDa nitrate reductase active proteins from *Shewanella gelidimarina* and the sequence of two napA genes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 398 (2010) 13–18.
- [8] R. Gangeswaran, D.J. Lowe, R.R. Eady, Purification and characterization of the assimilatory nitrate reductase of *Azotobacter vinelandii*, *Biochem. J.* 289 (1993) 335–342.
- [9] B.J.N. Jepson, L.J. Anderson, L.M. Rubio, C.J. Taylor, C.S. Butler, E. Flores, A. Herrero, J.N. Butt, D.J. Richardson, Tuning a nitrate reductase for function – the first spectropotentiometric characterization of a bacterial assimilatory nitrate reductase reveals novel redox properties, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 32212–32218.
- [10] T.H. Wang, Y.H. Chen, J.Y. Huang, K.C. Liu, S.C. Ke, H.A. Chu, Enzyme kinetics, inhibitors, mutagenesis and electron paramagnetic resonance analysis of dual-affinity nitrate reductase in unicellular N-2-fixing cyanobacterium *Cyanothece* sp PCC 8801, *Plant Physiol. Biochem.* 49 (2011) 1369–1376.
- [11] P. Arnoux, M. Sabaty, J. Alric, B. Frangioni, B. Guigliarelli, J.M. Adriano, D. Pignol, Structural and redox plasticity in the heterodimeric periplasmic nitrate reductase, *Nat. Struct. Biol.* 10 (2003) 928–934.
- [12] J.M. Dias, M.E. Than, A. Humm, R. Huber, G.P. Bourenkov, H.D. Bartunik, S. Bursakov, J. Calvete, J. Caldeira, C. Carneiro, J.J. Moura, I. Moura, M.J. Romao, Crystal structure of

- the first dissimilatory nitrate reductase at 1.9 Å solved by MAD methods, *Structure* 7 (1999) 65–79.
- [13] S. Najmudin, P.J. Gonzalez, J. Trincão, C. Coelho, A. Mukhopadhyay, N.M. Cerqueira, C.C. Romão, I. Moura, J.J. Moura, C.D. Brondino, M.J. Romão, Periplasmic nitrate reductase revisited: a sulfur atom completes the sixth coordination of the catalytic molybdenum, *J. Biol. Inorg. Chem.* 13 (2008) 737–753.
- [14] C. Coelho, P.J. Gonzalez, J.G. Moura, I. Moura, J. Trincão, M. João Romão, The crystal structure of *Cupriavidus necator* nitrate reductase in oxidized and partially reduced states, *J. Mol. Biol.* 408 (2011) 932–948.
- [15] S. Metz, W. Thiel, Theoretical studies on the reactivity of molybdenum enzymes, *Coord. Chem. Rev.* 255 (2011) 1085–1103.
- [16] S. Grimaldi, B. Schoepp-Cothenet, P. Ceccaldi, B. Guigliarelli, A. Magalon, The prokaryotic Mo/W-bisPGD enzymes family: a catalytic workhorse in bioenergetic, *Biochim. Biophys. Acta* 8–9 (2013) 1048–1085.
- [17] N.M. Cerqueira, P.J. Gonzalez, C.D. Brondino, M.J. Romão, C.C. Romão, I. Moura, J.J. Moura, The effect of the sixth sulfur ligand in the catalytic mechanism of periplasmic nitrate reductase, *J. Comput. Chem.* 30 (2009) 2466–2484.
- [18] H. Xie, Z. Cao, Enzymatic reduction of nitrate to nitrite: insight from density functional calculations, *Organometallics* 29 (2009) 436–441.
- [19] M. Hofmann, Density functional theory study of model complexes for the revised nitrate reductase active site in *Desulfovibrio desulfuricans* NapA, *J. Biol. Inorg. Chem.* 14 (2009) 1023–1035.
- [20] C.S. Butler, J.M. Charnock, B. Bennett, H.J. Sears, A.J. Reilly, S.J. Ferguson, C.D. Garner, D.J. Lowe, A.J. Thomson, B.C. Berks, D.J. Richardson, Models for molybdenum coordination during the catalytic cycle of periplasmic nitrate reductase from *Paracoccus denitrificans* derived from EPR and EXAFS spectroscopy, *Biochemistry* 38 (1999) 9000–9012.
- [21] C.S. Butler, S.A. Fairhurst, S.J. Ferguson, A.J. Thomson, B.C. Berks, D.J. Richardson, D.J. Lowe, Mo(V) coordination in the periplasmic nitrate reductase from *Paracoccus pantotrophus* probed by electron nuclear double resonance (ENDOR) spectroscopy, *Biochem. J.* 363 (2002) 817–823.
- [22] P.J. Gonzalez, M.G. Rivas, C.D. Brondino, S.A. Bursakov, I. Moura, J.J. Moura, EPR and redox properties of periplasmic nitrate reductase from *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774, *J. Biol. Inorg. Chem.* 11 (2006) 609–616.
- [23] C.S. Butler, J.M. Charnock, C.D. Garner, A.J. Thomson, S.J. Ferguson, B.C. Berks, D.J. Richardson, Thiocyanate binding to the molybdenum centre of the periplasmic nitrate reductase from *Paracoccus pantotrophus*, *Biochem. J.* 352 (2000) 859–864.
- [24] F. Biaso, B. Burlat, B. Guigliarelli, DFT investigation of the molybdenum cofactor in periplasmic nitrate reductases: structure of the Mo(V) EPR-active species, *Inorg. Chem.* 51 (2012) 3409–3419.
- [25] V. Fourmond, B. Burlat, S. Dementin, P. Arnoux, M. Sabaty, S. Boiry, B. Guigliarelli, P. Bertrand, D. Pignol, C. Léger, Major Mo(V) EPR signature of *Rhodobacter sphaeroides* periplasmic nitrate reductase arising from a dead-end species that activates upon reduction. Relation to other molybdoenzymes from the DMSO reductase family, *J. Phys. Chem. B* 112 (2008) 15478–15486.
- [26] V. Fourmond, M. Sabaty, P. Arnoux, P. Bertrand, D. Pignol, C. Léger, Reassessing the strategies for trapping catalytic intermediates during nitrate reductase turnover, *J. Phys. Chem. B* 114 (2010) 3341–3347.
- [27] V. Fourmond, B. Burlat, S. Dementin, M. Sabaty, P. Arnoux, E. Etienne, B. Guigliarelli, P. Bertrand, D. Pignol, C. Léger, Dependence of catalytic activity on driving force in solution assays and protein film voltammetry: insights from the comparison of nitrate reductase mutants, *Biochemistry* 49 (2010) 2424–2432.
- [28] S. Stoll, A. Schweiger, EasySpin, a comprehensive software package for spectral simulation and analysis in EPR, *J. Magn. Reson.* 178 (2006) 42–55.
- [29] C.J. Kay, M.J. Barber, Measurement of oxidation-reduction midpoint potentials by room temperature electron paramagnetic resonance potentiometry, *Anal. Biochem.* 184 (1990) 11–15.
- [30] A.G. Porras, G. Palmer, The room temperature potentiometry of xanthine oxidase. pH-dependent redox behavior of the flavin, molybdenum, and iron-sulfur centers, *J. Biol. Chem.* 257 (1982) 11617–11626.
- [31] G.R. Hanson, I. Lane, Dimethylsulfoxide (DMSO) reductase, a member of the DMSO reductase family of molybdenum enzymes, in: G. Hanson, L. Berliner (Eds.), *Metals in Biology Applications of High-Resolution EPR to Metalloenzymes*, Springer, 2010, pp. 169–193.
- [32] P. Bertrand, B. Frangioni, S. Dementin, M. Sabaty, P. Arnoux, B. Guigliarelli, D. Pignol, C. Léger, Effects of slow substrate binding and release in redox enzymes: theory and application to periplasmic nitrate reductase, *J. Phys. Chem. B* 111 (2007) 10300–10311.
- [33] V. Fourmond, T. Lautier, C. Baffert, F. Leroux, P.-P. Liebgott, S. Dementin, M. Rousset, P. Arnoux, D. Pignol, I. Meynial-Salles, P. Soucaille, P. Bertrand, C. Léger, Correcting for electrocatalyst desorption and inactivation in chronoamperometry experiments, *Anal. Chem.* 81 (2009) 2962–2968.
- [34] P. Bertrand, C. More, B. Guigliarelli, A. Fournel, B. Bennett, B. Howes, Biological polynuclear clusters coupled by magnetic interactions. From the point dipole approximation to a local spin model, *J. Am. Chem. Soc.* 116 (1994) 3078–3086.
- [35] J. Caldeira, V. Belle, M. Asso, B. Guigliarelli, I. Moura, J.J.G. Moura, P. Bertrand, Analysis of the electron paramagnetic resonance properties of the [2Fe-2S]¹⁺ centers in molybdenum enzymes of the xanthine oxidase family: assignment of signals I and II, *Biochemistry* 39 (2000) 2700–2707.
- [36] D.J. Lowe, R.C. Bray, Magnetic coupling of molybdenum and iron-sulfur centers in xanthine oxidase and xanthine deshydrogenases, *Biochem. J.* 169 (1978) 471–479.
- [37] C. More, M. Asso, G. Roger, B. Guigliarelli, J. Caldeira, J. Moura, P. Bertrand, Study of the spin-spin interactions between the metal centers of *Desulfovibrio gigas* aldehyde oxidoreductase: identification of the reducible sites of the [2Fe-2S]¹⁺ + 2 + clusters, *Biochemistry* 44 (2005) 11628–11635.
- [38] S.J. Field, N.P. Thornton, L.J. Anderson, A.J. Gates, A. Reilly, B.J.N. Jepson, D.J. Richardson, S.J. George, M.R. Cheesman, J.N. Butt, Reductive activation of nitrate reductases, *Dalton Trans.* (2005) 3580–3586.
- [39] V.L. Davidson, What controls the rates of interprotein electron-transfer reactions, *Acc. Chem. Res.* 33 (2000) 87–93.
- [40] V.L. Davidson, Protein control of true, gated, and coupled electron transfer reactions, *Acc. Chem. Res.* 41 (2008) 730–738.
- [41] R.A. Rothery, B. Stein, M. Solomonson, M.L. Kirk, J.H. Weiner, Pyranopterin conformation defines the function of molybdenum and tungsten enzymes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109 (2012) 14773–14778.
- [42] M.G. Bertero, R.A. Rothery, M. Palak, C. Hou, D. Lim, F. Blasco, J.H. Weiner, N.C.J. Strynadka, Insights into the respiratory electron transfer pathway from the structure of nitrate reductase A, *Nat. Struct. Biol.* 10 (2003) 681–687.
- [43] D.P. Kloeber, C. Hagel, J. Heider, G.E. Schulz, Crystal structure of ethylbenzene dehydrogenase from *Aromatoleum aromaticum*, *Structure* 14 (2006) 1377–1388.
- [44] B. Bradshaw, D. Collison, C.D. Garner, J.A. Joule, Stable pyrano[2,3-*b*]quinoxalines and pyrano[2,3-*b*]pteridines related to molybdopterin, *Chem. Commun.* (2001) 123–124.
- [45] P. Basu, S.J.N. Burgmayer, Pterin chemistry and its relationship to the molybdenum cofactor, *Coord. Chem. Rev.* 255 (2011) 1016–1038.
- [46] J.H. Enemark, C.D. Garner, The coordination chemistry and function of the molybdenum centres of the oxomolybdoenzymes, *J. Biol. Inorg. Chem.* 2 (1997) 817–822.
- [47] B.R. Williams, Y. Fu, G.P. Yap, S.J. Burgmayer, Structure and reversible pyran formation in molybdenum pyranopterin dithiolene models of the molybdenum cofactor, *J. Am. Chem. Soc.* 134 (2012) 19584–19587.
- [48] B. Bradshaw, D. Collison, C.D. Garner, J.A. Joule, Synthesis of 1,3-dithiol-2-ones as proligands related to molybdopterin, *Org. Biomol. Chem.* 1 (2003) 129–133.
- [49] S.J. Burgmayer, D.L. Pearsall, S.M. Blaney, E.M. Moore, C. Sauk-Schubert, Redox reactions of the pyranopterin system of the molybdenum cofactor, *J. Biol. Inorg. Chem.* 9 (2004) 59–66.
- [50] S. Dementin, P. Arnoux, B. Frangioni, S. Grosse, C. Léger, B. Burlat, B. Guigliarelli, M. Sabaty, D. Pignol, Access to the active site of periplasmic nitrate reductase: insights from site-directed mutagenesis and zinc inhibition studies, *Biochemistry* 46 (2007) 9713–9721.
- [51] S. Gardlik, K.V. Rajagopalan, Oxidation of molybdopterin in sulfite oxidase by ferricyanide. Effect on electron transfer activities, *J. Biol. Chem.* 266 (1991) 4889–4895.
- [52] M.E. Helton, M.L. Kirk, A model for ferricyanide-inhibited sulfite oxidase, *Inorg. Chem.* 38 (1999) 4384–4385.

Supplementary data

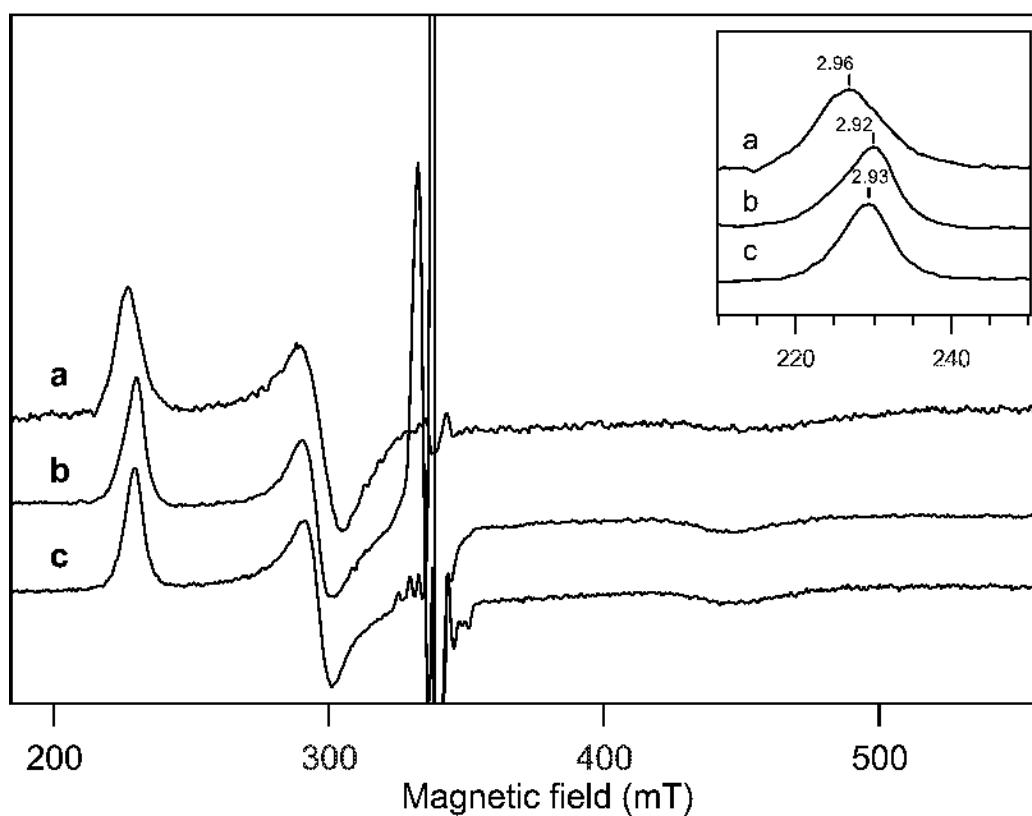


Figure S1 EPR signatures of the hemes in *Rhodobacter sphaeroides* NapB (a), native NapAB (b) and *in vitro* reconstituted NapAB (c).

Recording conditions: temperature 15K, incident microwave power 4mW, modulation amplitude 1mT, microwave frequency 9.407GHz. A sharp and intense signal is also visible in spectra b and c around 340mT that corresponds to the Mo(V) “high *g*” resting species.

Résumé

La nitrate réductase périplasmique de *Rhodobacter sphaeroides* catalyse la réduction du nitrate en nitrite. C'est une métalloenzyme qui comprend un cofacteur à molybdène, un centre fer-soufre et deux hèmes.

La réactivité du cofacteur à molybdène reste mal comprise pour plusieurs raisons. Entre autres : l'hétérogénéité des signatures RPE Mo^V, état semi-réduit du site actif, et l'existence d'états inactifs de l'enzyme selon les conditions.

Pour comprendre la réactivité et la pertinence catalytique des principales espèces Mo^V, nous avons entrepris une caractérisation des processus d'activation et d'inactivation par électrochimie sur film de protéines, et une étude de leur structure par spectroscopies RPE et HYSORE.

Nos observations cinétiques suggèrent que l'activation irréversible de l'enzyme implique un réarrangement d'une des pterine du cofacteur à Mo.

Ceci est mis en évidence par la modification des couplages magnétiques intercentres du fait de l'activation, et par des modifications de structure au delà de la première sphère de coordination du Mo.

Enfin, l'étude de l'inactivation réversible de l'enzyme par électrochimie montre l'implication des différents états redox du site actif dans le mécanisme d'inhibition, et donne les conditions nécessaires au piégeage de forme Mo^V actives.

Abstract

Rhodobacter sphaeroides periplasmic nitrate reductase catalyses the reduction of nitrate into nitrite. It is a metalloenzyme containing a molybdenum cofactor, an iron-sulfur cluster, and two haems.

The reactivity of the molybdenum cofactor remains elusive for many reasons. Among others : the heterogeneity of the EPR signatures of Mo^V, the semi-reduced state of the active site, and the existence of inactive states of the enzyme, depending on conditions.

In order to understand the reactivity and the catalytic relevance of the major Mo^V species, we have undertaken a characterisation of the activation and inactivation processes by protein-film-electrochemistry, and a study of their structure by EPR and HYSORE spectroscopies.

Our kinetic observations suggest that the irreversible activation of the enzyme involves a rearrangement of one of the pterins of the Mo cofactor.

This is evidenced by the modification of intercentres magnetic couplings due to the activation, and by structural modifications beyond the first coordination sphere of Mo.

Finally, the study of enzyme reversible inactivation by electrochemistry shows the involvement of the different redox states of the active site in the inhibition mechanism, and yields the necessary conditions to trapping active Mo^V forms.