NNT/NL : 0000AIXM0000/000ED000

THÈSE DE DOCTORAT

Soutenance prévue à Aix-Marseille Université
le 10 mars 2022 par

Alexandre Uzel

Caractérisation fonctionnelle des formiate-déshydrogénases de *Bacillus subtilis* par spectroscopie RPE

Discipline
Sciences chimiques

Spécialité
Chimie Physique et Spectroscopie

École doctorale
250

Laboratoire/Partenaires de recherche
Laboratoire de Bioénergétique et Ingénierie des Protéines (BIP – UMR 7281)
Equipe Biophysique des Métalloprotéines

Composition du jury

Dr. Geneviève BLONDIN CEA-Grenoble	Rapportrice
Pr. Peter FALLER Université de Strasbourg	Rapporteur
Dr. Olga IRANZO Université Aix-Marseille	Présidente du jury
Dr. Vincent NIVIERE CEA-Grenoble	Examinateur
Dr. Stéphane GRIMALDI Université Aix-Marseille	Directeur de thèse
Dr. Anne WALBURGER Université Aix-Marseille	Membre invité

Pour commencer je souhaiterais remercier les membres de mon jury de thèse, Dr Geneviève Blondin, Pr. Peter Faller, Dr. Vincent Nivière et Dr. Olga Iranzo d'avoir consacré du temps (et de la ForCE) à lire, juger mes travaux et finalement les écouter.

Merci également à Aix-Marseille Université et le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche ainsi que le CNRS de m'avoir permis de faire ces recherches.

Je souhaite à présent remercier grandement mon directeur de thèse, Dr. Stéphane Grimaldi, pour m'avoir porté et supporté de là où j'étais à mon arrivée de master 2 jusqu'à aujourd'hui. Je n'aurais pas pu imaginer un meilleur directeur de thèse pour une personnalité comme la mienne. Tu as été extrêmement patient, compréhensif, pédagogue, sérieux et si prévenant. Merci pour tout « Je pense notamment à la rédaction du manuscrit … je ne t'ai pas épargné. Merci pour tout ce que tu m'as transmis Doktorvater.

Un grand merci au Dr. Anne Walburger. Ta patience pour me transmettre tes connaissances sur les complexités du monde biologique, ton calme, ta bienveillance, ta sérénité, ta douceur et ton humanité m'ont fait passer au LCB des moments lumineux.

Je souhaite remercier également le Pr. Bruno Guigliarelli. Merci pour les longues conversations que l'on a eues (scientifiques ou pas), d'avoir toujours été disponible et très pédagogue. Maintenant je connais plein de choses sur la RPE, les centres métalliques, l'histoire de Marseille et pourquoi l'eau déborde du Vieux Port quand il pleut (et plein d'autres choses). Comme disait Julia un grand polymathe.

Je souhaite remercier Dr. Axel Magalon, pour m'avoir transmis également une petite partie d'une grande connaissance et pour m'avoir soutenu et m'avoir fait rire tout au long de cette thèse. Je ne compte pas supprimer notre conversation WhatsApp de sitôt.

Il faut se représenter que quand je suis arrivé je connaissais la Chimie Organique et l'application des enzymes à cette dernière. Tout ce que je sais en RPE (avec la Physique et les Maths qui vont avec) et la Biologie et Chimie du monde vivant c'est grâce à vous. Un grand Merci.

Merci à toutes les personnes avec qui j'étais au BIP 07 et dans l'équipe Magalon au LCB, j'ai passé d'excellents moments avec vous que ce soit dans la vie de tous les jours ou en congrès. Merci de m'avoir fait rire si souvent et répondu à toutes mes petites questions. Fred, Béné

Marlène, Emilien, Pierre et Guillaume, si on avait pris sur ma bourse de thèse un euro à chaque fois que je suis venu vous embêter, je n'aurais pas eu assez d'argent pour imprimer le présent manuscrit.

Je souhaite remercier à présent Benoit, Célie, Clémentine KB, Loris et Mathilde, des amis de longues dates, toujours fidèles au poste. Merci pour votre soutient et votre compréhension pendant toutes ces années. Un adage dit que si l'on veut construire haut, il faut des bases solides. Merci d'avoir été là pour ça.

Merci à toi Paul, grâce à toi, l'année 2020 fait partie des meilleures (c'est vous dire !). Merci d'être la.

Je souhaite également remercier chaleureusement les doctorants(es) et post-doctorants(es) avec qui j'ai eu la chance de faire ma thèse, Annalisa Pierro, Natalie Payne, Marianne Broc (AKA le Bolide), Julia Rendon, Mélanie Rossotti, Maxime Bizet, Théo Pigaglio (AKA Rossignol) et Batoul Srour. Merci également du fond du cœur à Claire Chaperon, Jéremie Labasse et Sylvain Neveu. Vous tous avez tellement contribué à la création de bonne humeur quotidienne. Les journées étaient plus ensoleillées avec vous et vous avez clairement contribué à la réussite de ces travaux.

Je souhaite remercier du fond du cœur les Drs. Christine et Virgil Hélaine, Pr. Marielle Lemaire, Pr. Thierry Gefflaut qui m'ont mis le pied à l'étrier du monde des enzymes. Vous avez été l'étincelle de tout cela.

Enfin, je souhaite remercier ma famille, mon père et ma mère, mes oncles et tantes, mes cousins pour leurs soutiens indéfectibles et leurs présences à mes côtés. Merci d'être là depuis tous ce temps.

PS : Clémentine, en page 7 de l'introduction il y a une photo avec un bison qui a l'air tellement d'une grosse peluche. Forcément, j'ai pensé à toi.

Table des matières générale :

Chapitre I : Introduction…… 5

Chapitre II : Matériels et Méthodes……53

Chapitre III : Etude des centres FeS dans ForCE 1 et ForCE 2. ……..125

Chapitre IV : Etude du cofacteur à Molybdène dans ForCE 1 et ForCE 2…… 172

Chapitre V Etude du radical organique observé dans ForCE 1 et ForCE 2……. 201

Chapitre VI Etude enzymatique menées sur ForCE 1 et ForCE 2…….. 246

Chapitre VII Conclusions et perspectives ……261

Bibliographie ……..268

Annexes ……283

Chapitre I

Introduction

Table des matières :

I – Généralités sur le dioxyde de carbone (CO_2) 6
II - Les systèmes de fixation du CO_2 8
II.1 - Les photosystèmes I et II et le cycle de Calvin 8
II.2 – Le cycle de l'acide citrique (CAC, Citric Acid Cycle) : 12
II.3 - La voie Wood-Ljungdahl et la méthanogénèse 13
II.3.1 - Présentation générale 14
II.3.2 - Les carbone monoxyde déshydrogénases (CODHs) 15
II.3.3 - Les Formylméthanofurane déshydrogénases 16
III - Les Formiate Déshydrogénases (FDHs) 18
III.1 - Généralités sur les FDHs 18
III.2 – Formiate déshydrogénases à centres métalliques 21
III.2.1 – Importance des métaux en biologie 23
III.2.1.1 – Le fer et les centres FeS 23
III.2.1.2 – Le molybdène (Mo) et le tungstène (W) 24
III.2.2 - Classification des formiate déshydrogénases métalliques 25
III.2.3 – Incorporation du Molybdène et/ou du Tungstène 27
III.3 – Structure des formiate déshydrogénases 27
III.3.1 - Différentes structures, même site actif : 28
III.3.2 – Consensus au niveau du site actif des FDHs : 29
III.4 – Etudes par spectroscopie RPE des formiate déshydrogénases métalliques 31
III.4.1 – Etudes par spectroscopie RPE des centres FeS 31
III.4.2 – Etudes par spectroscopie RPE des centres catalytiques à Mo/W : 38
III.5 – Mécanismes réactionnels postulés : 43
IV – ForCE 1 et ForCE 2 : deux FDHs de chez *Bacillus subtilis* 45
IV.1 – *Bacillus subtilis* 46
IV.2 – Généralité sur ForCE 1 et ForCE 2 46
IV.2.1 – Différences d'expression entre *ForCE 1* et *ForCE 2* 47
IV.2.2 – Etudes préliminaires de ForCE 1 et ForCE 2 49
IV.2.3 – Non-conservation de la position de l'arginine et de l'histidine par rapport au consensus : 51

I – Généralités sur le dioxyde de carbone (CO_2)

Il est aujourd'hui admis que la Terre traverse une crise environnementale, appelée « the carbon dioxide crisis » par Maia et al.[1]. Cette crise se distingue des précédentes par son origine anthropique. En effet, si le dioxyde de carbone (CO_2) a toujours été présent, consommé et émis sur Terre par divers processus biogéochimiques, il faisait partie, jusqu'à l'ère industrielle, du cycle du carbone naturel et était dès lors dans un équilibre permettant sa régulation. Mais depuis les années 1850, où la révolution industrielle est devenue globale, l'homme a utilisé des sources de combustibles fossiles, charbon et pétrole, pour favoriser son développement industriel. La figure I.1 permet d'illustrer l'augmentation de la production de CO_2 dans l'atmosphère depuis les années 1850[2].

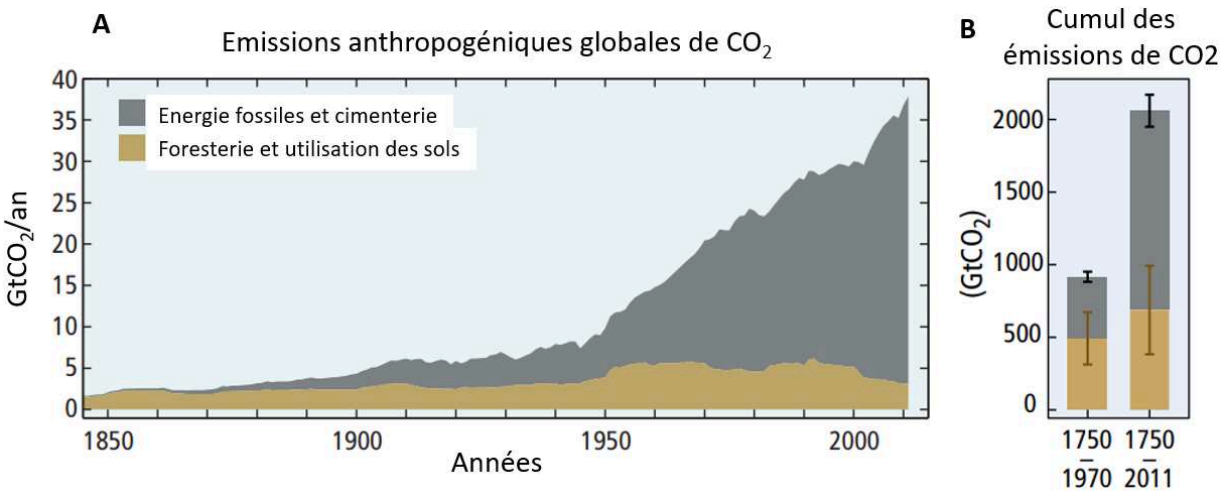


Figure I.1 : Emissions anthropogéniques mondiales de CO_2 pour la foresterie et de l'utilisation des sols (en jaune) et provenant de la combustion d'énergies fossiles et production de ciment depuis les années 1850 (A). Cumul des émissions de CO_2 présentée en (B) entre les années 1750 et 1970 et entre les années 1750 et 2011.

Ces ressources étaient alors stockées dans des poches de matières carbonées inaccessibles jusqu'alors et ainsi représentaient un stock de carbone hors-équilibre. Ainsi depuis le milieu du 19ème siècle l'Homme a libéré dans l'atmosphère des quantités de CO_2 qui ne pouvaient être traitées par les cycles biogéochimiques naturels du carbone. La figure I.2 montre un schéma simplifié des cycle biogéochimiques du carbone.

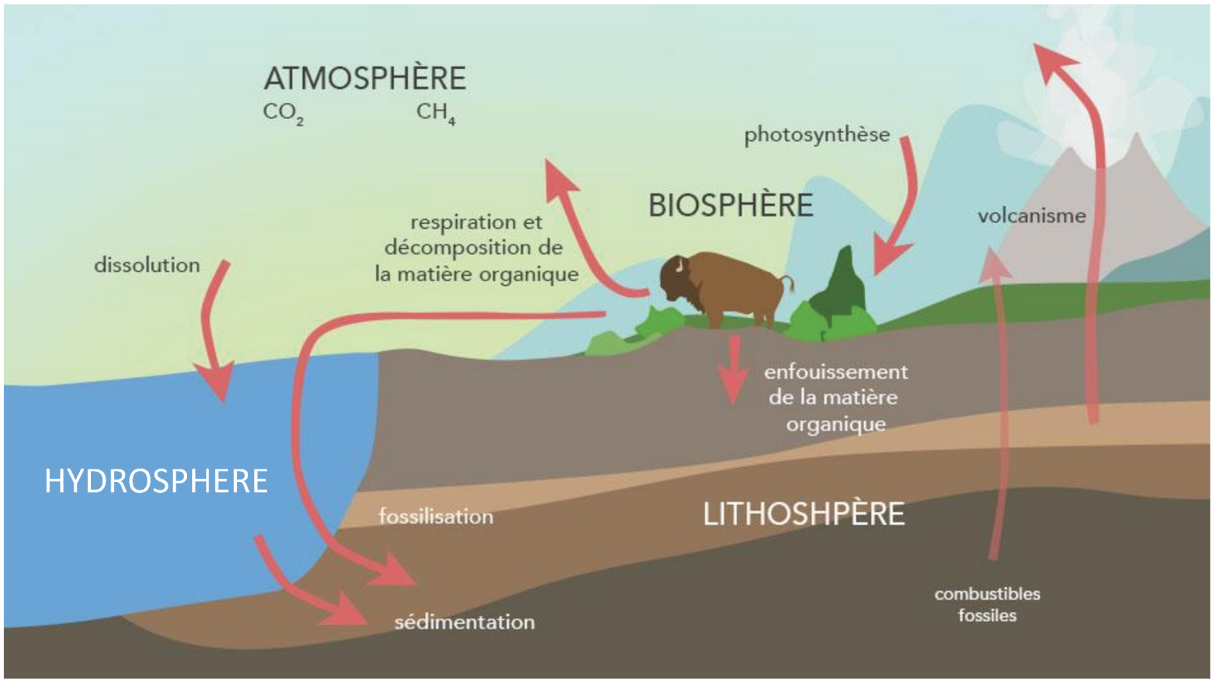


Figure I.2 : Représentation schématique des principaux mécanismes intervenant dans le cycle du carbone.

Comme le montre la figure I.2, trois voies naturelles principales permettent la gestion du carbone et ainsi du CO_2 alors présent dans plusieurs états, solide, liquide et gazeux. La première est le captage du CO_2 par la photosynthèse effectuée par les plantes et les micro-organismes photosynthétiques. La seconde est la dissolution du CO_2 dans les eaux océaniques, où il participe à leur acidification[3,4], puis sa sédimentation. Enfin la troisième voie est la dégradation de la matière organique au niveau du sol et sa possible sédimentation en combustibles fossiles. Cependant il est important de comprendre que ces mécanismes naturels sont lents et ne permettent pas la régulation de la production anthropique du CO_2 produit rapidement par combustion. Par ailleurs, par l'abattage massif d'arbres, la déforestation contribue à réduire encore plus la vitesse de captage du CO_2. De plus, le CO_2 agit comme un gaz à effet de serre. En effet, l'atmosphère est transparente dans le domaine du visible et laisse ainsi passer le rayonnement dans cette gamme de longueur d'onde. L'énergie ainsi apportée va être transformée en énergie thermique au niveau du sol. Cette dernière va être réémise dans l'atmosphère sous forme de rayonnement infrarouge. Les gaz à effet de serre tels que le CO_2 sont opaques pour ce type de rayonnement et vont emmagasiner l'énergie thermique près de la surface terrestre qu'ils contribuent ainsi à réchauffer.

Il apparait alors important de s'intéresser à des systèmes permettant le captage et l'utilisation du CO_2 comme source de carbone, ce qui contribuerait à la dépollution atmosphérique ainsi qu'à la conversion de ce sous-produit de l'activité humaine en ressource.

II - Les systèmes de fixation du CO_2

Il était déjà noté dans le rapport du Groupe Intergouvernemental sur l'Evolution du Climat (GIEC) de Juillet 1990 que « les écosystèmes terrestres pourraient faire face à des conséquences non négligeables dû à l'augmentation de la concentration atmosphérique des gaz à effet de serre et les changements climatiques associés ». Ces gaz à effet de serre étant déjà identifiés comme étant le dioxyde de carbone (CO_2), le méthane (CH_4), l'oxyde nitreux (N_2O), le monoxyde de carbone (CO) et les hydrocarbures halogénés (CFCs) entre autres. Il est donc important d'étudier les systèmes pouvant capter du CO_2 pour essayer de trouver un début de réponse aux problèmes environnementaux. Bien qu'il existe de nombreuses études sur la synthèse de catalyseurs dans le cadre de la valorisation du CO_2, nous allons nous intéresser dans cette thèse à ceux présents dans le monde vivant.

II.1 - Les photosystèmes I et II et le cycle de Calvin

Parmi les principaux systèmes enzymatiques conduisant à la réduction du CO_2 on trouve les photosystèmes I et II responsables de la photosynthèse oxygénique chez les plantes et cyanobactéries. Cette dernière serait apparue il y a environ trois milliards d'années et est responsable de la lente évolution de l'atmosphère réductrice présente alors vers une atmosphère oxydante. Le photosystème est constitué de trois protéines membranaires : le photosystème II, le cytochrome b_6/f et le photosystème I. Le photosystème II (PS II) est un large complexe membranaire constitué de plusieurs sous unités. Son rôle est d'utiliser l'énergie solaire pour catalyser l'oxydation de l'eau en dioxygène couplée à la réduction de plastoquinones[5]. Les plastoquinones réduites peuvent ensuite transférer des électrons au cytochrome b_6/f responsable de la réduction d'une partie de la plastocyanine (PC), une petite protéine soluble. Cette dernière va jouer le rôle de donneur d'électron pour le photosystème 1 (PS I). Le PS I est un large complexe membranaire qui est responsable de la réduction du

$NADP^+$ en NADPH intervenant dans le cycle de Calvin pour la synthèse de sucres tels que le ribulose-1,5-bisphosphate utilisé par la suite pour la fixation du CO_2. La figure I.3 montre une représentation schématique des photosystèmes I, II et du cytochrome b_6/f.

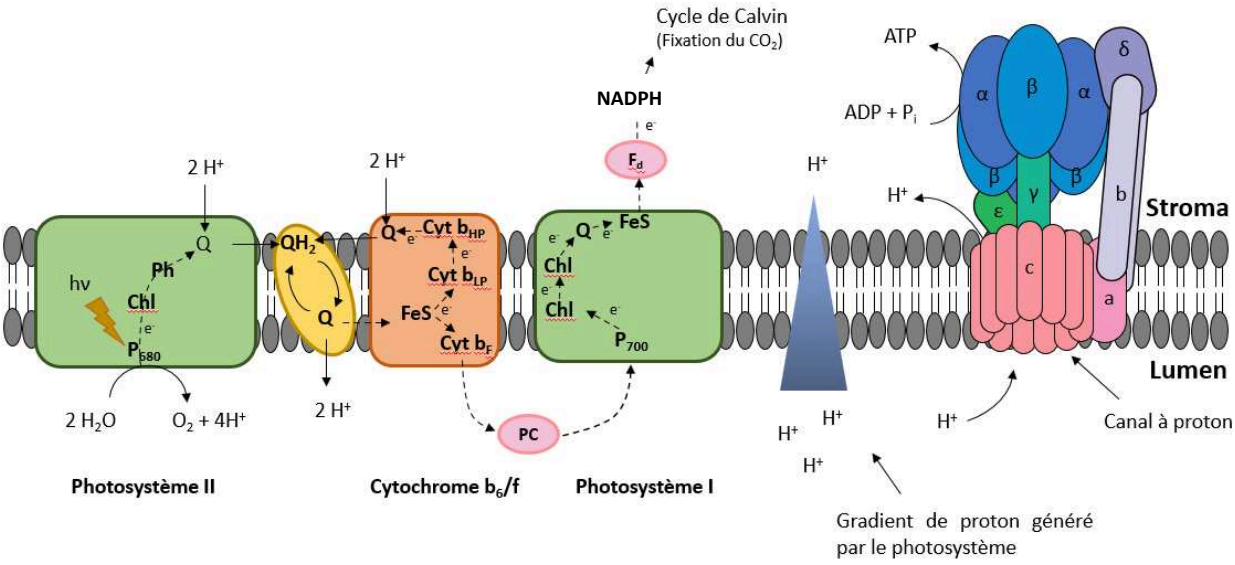


Figure I.3 : Représentation schématique de la chaine photosynthétique chez les plantes et cyanobactéries. Chl : chlorophylle, Ph : phéophytine, Q : quinone (plastoquinone dans PS II et phylloquinone dans PS I), FeS : centres FeS de bas potentiel, F_d : ferredoxine, PC : plastocyanine, Cyt : cytochrome. Adapté de la thèse de P.Dorlet[5]

Le NADPH ainsi généré est ensuite utilisé dans le cycle de Calvin représenté dans la figure I.4, intervenant dans la fixation du CO_2.

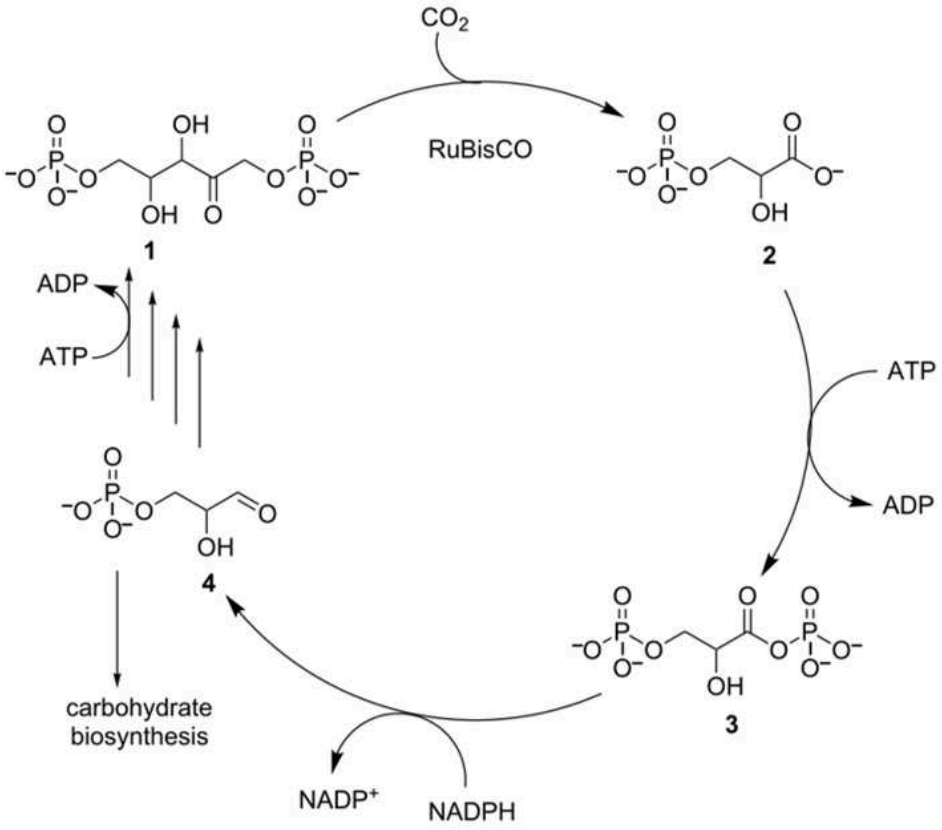


Figure I.4 : Représentation du cycle de Calvin intervenant dans la fixation du CO_2.

La figure I.4 montre que la fixation du CO_2 est catalysée par une enzyme, la Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase ou RubisCO. La RubisCO, est une des enzymes prédominantes dans la nature utilisée pour la fixation du CO_2 comme le mentionnent Erb et al.[6], qui la considèrent comme l'une des protéines les plus abondantes de la biosphère. Une étude de Phillips et al.[7] montre que plus de 90% du carbone inorganique converti en biomasse est fixé par les enzymes de type RubisCO. Ces dernières sont présentes dans les trois domaines du vivant à savoir les bactéries, les archaea et les eucaryotes. Les auteurs indiquent également que les enzymes RubisCO représentent de 30 % à 50 % des protéines solubles dans les feuilles de plantes. Ils ont de plus estimé que pour chaque personne sur terre il y aurait 5 kg de RubisCO. Les enzymes RubisCO catalysent la carboxylation et le clivage du Ribulose-1,5-bisphosphate (RuBP) en deux molécules de 3-phosphoglycérate (3PG) représenté dans la figure I.4 par l'intermédiaire 2. La figure I.5 représente cette réaction détaillée mise en évidence dans l'étude menée par Andrews et al.[8].

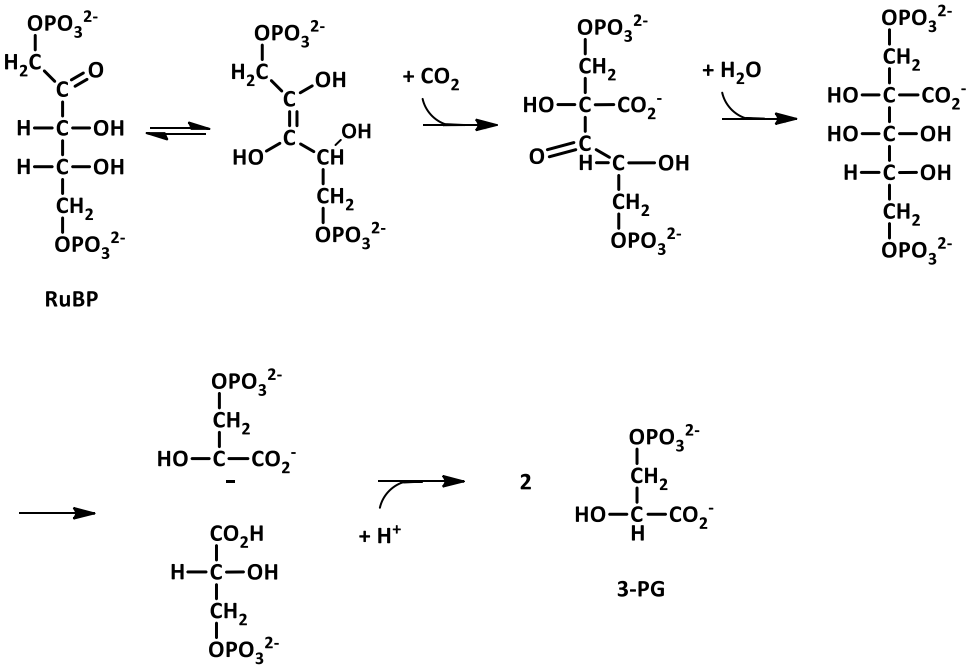


Figure I.5 : Schéma réactionnel illustrant la fixation d'une molécule de CO_2 sur une molécule de Ribulose-1,5-bisphosphate (RuBP) et son clivage en 3-phosphoglycérate (3PG). Adapté de Andrews et al.[8]

Néanmoins, malgré un rôle important dans la fixation du CO_2, ces enzymes montrent plusieurs limitations. Premièrement, les RubisCO nécessitent une activation post-traductionnelle pour pouvoir mener à bien la réaction de carboxylation. En effet une réaction de carbamylation de la lysine lys191 afin de fixer le cation Mg^{2+} est nécessaire à la réactivité de l'enzyme. Deuxièmement, la fréquence de turnover est assez lente, entre 1 s^{-1} et 10 s^{-1}. Enfin les RubisCO « commettent des erreurs » dans le sens où, en présence d'oxygène, une réaction secondaire conduit à la formation de 2-phosphoglycolate, 2PG, au lieu du 3PG comme le montre la figure I.6.

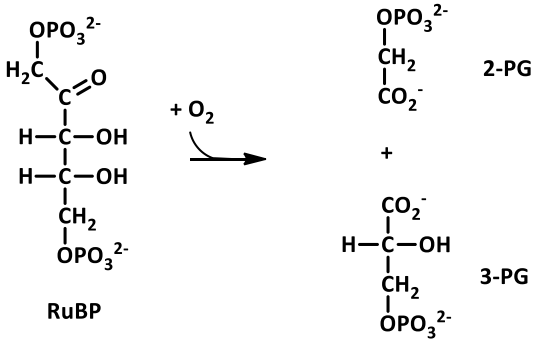


Figure I.6 : Schéma illustrant la formation de 2-phosphoglycolate (2PG) suite à une réaction secondaire en présence d'oxygène également catalysée par la RubisCO. Adapté de Andrews et al.[8]

Le 2PG est un composé toxique qui inhibe plusieurs enzymes du métabolisme du carbone comme l'on montré Norman et al.[9], Kelly et al.[10] et Anderson.[11]. A titre d'exemple les études de Sharkey et al.[12], Sage et al.[13] et Walker et al.[14] montrent qu'en moyenne le cycle de fixation du CO_2 sous la forme de molécule en C3, contenant 3 atomes de carbone, produirait plus de 20 % de 2PG, chiffre pouvant aller jusqu'à 40 % à haute température et faible concentration en CO_2. Le 2PG est ensuite recyclé durant un processus consommateur d'énergie appelé photorespiration et il a été estimé qu'approximativement 30 % de l'énergie issue de la photosynthèse est utilisée dans ces réactions.

II.2 – Le cycle de l'acide citrique (CAC, Citric Acid Cycle) :

Le cycle de l'acide citrique aussi appelé cycle de Krebs est une série de réactions chimiques permettant de récupérer l'énergie sous forme d'électrons qui peuvent circuler à travers la chaine respiratoire et ainsi participer à la formation d'ATP. Pendant le cycle, trois réactions génèrent du CO_2. La première est la transformation du pyruvate en acétyl-CoA, nécessaire pour initier le cycle, catalysée par une pyruvate déshydrogénase. La seconde est celle catalysée par une isocitrate déshydrogénase permettant la transformation de l'isocitrate en α-cétoglutarate. Enfin, la dernière, catalysée par une α-cétoglutarate déshydrogénase assure la transformation du α-cétoglutarate en succinyl-CoA.

Cependant les études menées par Buchanan et al.[15] ainsi que par Evans et al.[16] montrent qu'il existe chez la bactérie *Chlorobium thiosulfactophilum* et d'autres organismes anaérobies, un cycle de l'acide citrique renversé conduisant ainsi à la réduction du CO_2. La figure I.7 montre le cycle de Krebs « renversé », adapté de la revue de Alissandratos et al.[17].

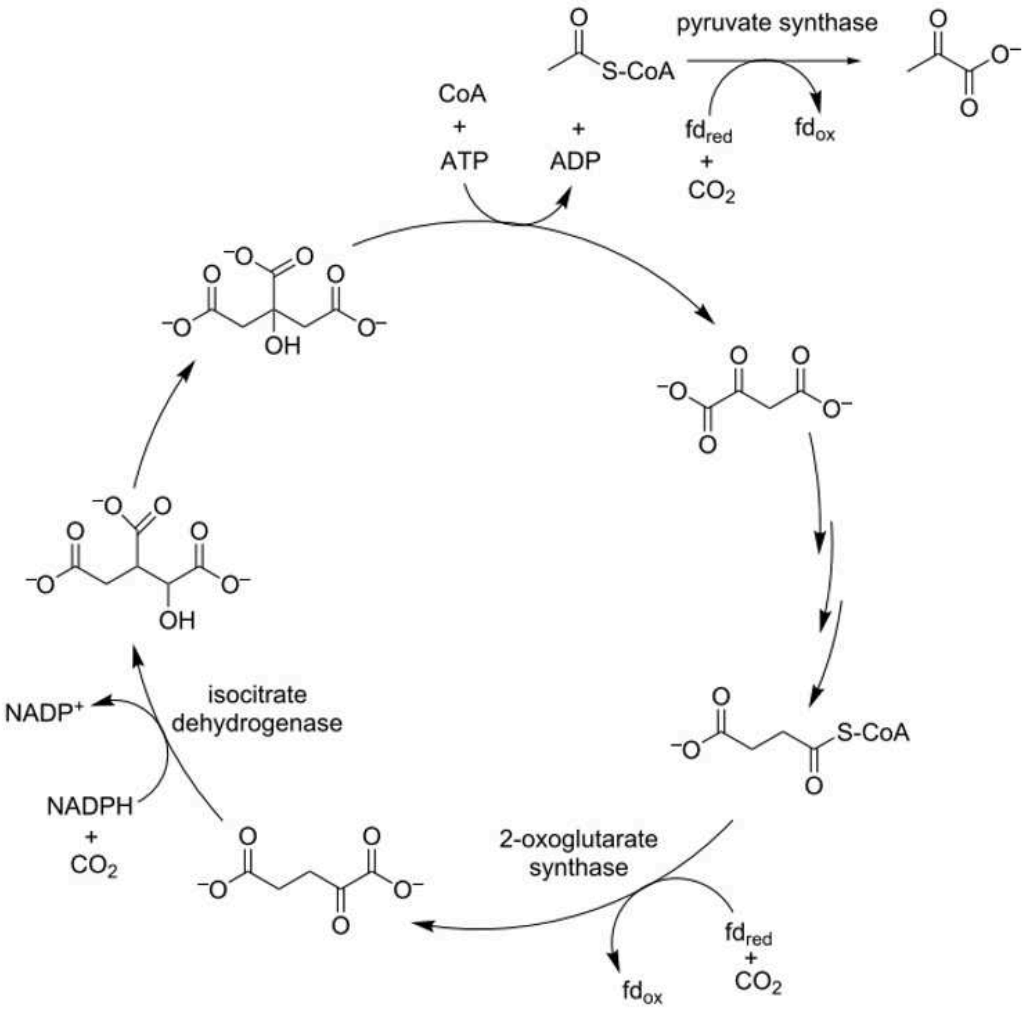


Figure I.7 : Représentation du cycle de l'acide citrique réductif (Reductive CAC Cycle) permettant la fixation du CO_2. Adapté de Alissandratos et al.[17]

Elle permet de montrer que les trois enzymes mentionnées plus haut sont utilisées ici pour capter et fixer le CO_2 au cours du cycle. Néanmoins, elles représentent une alternative difficile à mettre en œuvre dans le cadre de la valorisation du CO_2. En effet, tout comme la RubisCO, ces enzymes n'utilisent pas le CO_2 seul, mais elle le fixent sur un substrat préexistant présent au cours du cycle. La mise en place d'une cascade enzymatique apparait alors plus difficile qu'une réaction mono-enzymatique réduisant directement le CO_2. Ces dernières sont rencontrées dans la voie dite de Wood-Ljungahl chez les méthanogènes.

II.3 - La voie Wood-Ljungdahl et la méthanogénèse

II.3.1 - Présentation générale

Les études menées par Ljungdalh et al.[18] et par Ragsdale et al.[19,20] montrent que cette voie métabolique est rencontrée chez certaines batéries, notamment les méthanogènes et les acétogènes. Elle est utilisée pour fournir de l'énergie par la fixation du CO_2. L'équation 1 illustre cette réaction.

$$CO_2 + 4\ H_2 \rightleftharpoons CH_4 + 2\ H_2O \qquad \Delta G^{0'} = -131\ kJ/mol \qquad (1)$$

Deux branches sont alors distinguées : la branche du méthyle et la branche du carbonyle. Cette dernière est présente chez les micro-organismes acétogènes et utilise, en venant compléter la branche du méthyle, une seconde molécule de CO_2 pour conduire à la formation d'acétate. La réaction globale est présentée avec l'équation 2.

$$2\ CO_2 + 4\ H_2 \rightleftharpoons CH_3COO^- + H^+ + 2\ H_2O \qquad \Delta G^{0'} = -95\ kJ/mol \qquad (2)$$

Un troisième chemin catalytique recoupe ceux présentés précédemment. En effet, beaucoup d'organismes méthanogènes et acétogènes utilisent le CO_2 pour produire du méthane CH_4 comme *Methanothermobacter wolfeii*, *Methanobacterium thermoautotrophicum* et *Methanosarcina barkerii*[21–23]. La figure I.8 montre ces trois branches et comment ces dernières se recoupent.

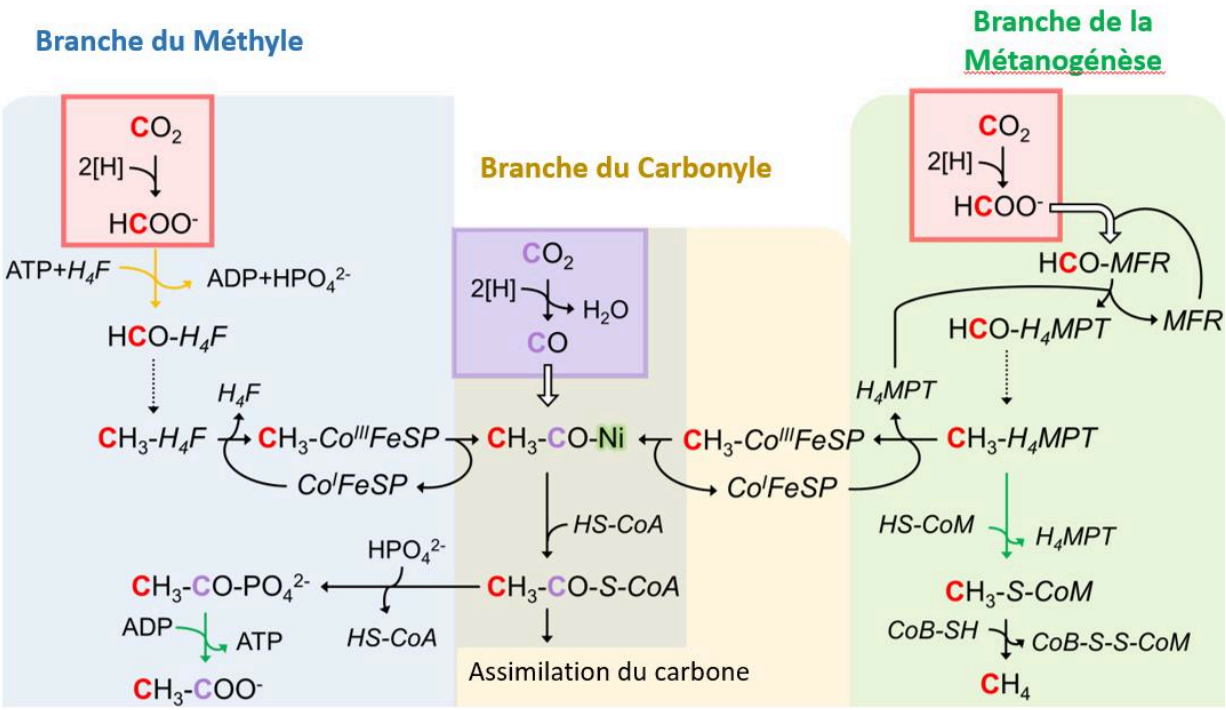


Figure I.8 : Voies de réduction de l'acétyl-CoA chez les organismes acétogènes (branche du méthyle et branche du carbonyle) ou méthanogènes (branche du carbonyle et branche de la méthanogénèse). Les flèches vertes correspondent à des réactions engagées dans la conservation de l'énergie (production d'ATP ou du gradient électrochimique à travers la membrane. Les flèches oranges représentent des réaction couplées à une hydrolyse d'ATP. Les flèches en pointillées correspondent à trois réactions successives : une étape de déshydratation et deux étapes de réduction. Les flèches blanches indiquent l'utilisation d'un canal interne entre deux sites actifs. H4F : tetrahydrofolate, MFR : méthanofurane, H4MPT : tetrahydromethanopterin, CoA-SH : coenzyme A, CoB-SH : coenzyme B, CoM-SH : coenzyme M. Adapté de Lemaire et al.[22]

On constate que les organismes acétogènes et les méthanogènes partagent la branche du carbonyle qui est conservée et est utilisée pour produire de la biomasse chez les deux types d'organismes et conserver de l'énergie dans le cas des acétogènes. La figure I.8 permet d'illustrer le rôle important d'une autre classe d'enzymes très importante dans le contexte de la fixation et de l'utilisation du CO_2, celles permettant de catalyser la réaction encadrée en violet : les Carbone Monoxyde Déshydrogénases ou CODHs.

II.3.2 - Les carbone monoxyde déshydrogénases (CODHs)

Les CODHs sont des enzymes catalysant l'interconversion entre le dioxyde de carbone, CO_2 et le monoxyde de carbone, CO comme indiqué dans l'équation 3.

$$CO_2 + 2\,H^+ + Cofacteur_{Red} \rightleftharpoons CO + H_2O + Cofacteur_{Ox} \quad E^0 = -540\ mV \qquad (3)$$

où les cofacteurs d'après les études de Ragsdale et al.[24] ainsi que la revue de Lindahl[25], peuvent être de type FMN, FAD, rubrédoxines, flavodoxines, cytochromes c, ferrédoxines, du bleu de méthylène ou encore des viologènes .

Les CODHs sont utilisées dans les voies métaboliques de divers procaryotes comme les bactéries méthanogènes, les acétogènes et les bactéries sulfato-réductrices (voir le chapitre de Burton at al.[26]). Ces enzymes existent sous deux formes fonctionnelles : la forme monofonctionnelle comme chez *Rhodospirillum rubrum*[27] et la forme bifonctionnelle comme chez *Methanosarcina thermophila*[28] et *Methanosarcina barkerii*[29]. Dans ce dernier cas elle forme un complexe bifonctionnel avec l'acétyl-CoA synthase dans lequel la CODH fournit le CO du groupe carbonyle de la molécule d'acétyle comme illustré dans la figure I.8.

Cependant, bien que les CODHs soient très intéressantes pour d'éventuelles applications biotechnologiques notamment parce que le CO peut être converti en hydrocarbures via le procédé Fischer-Tropsch[17], elles présentent néanmoins le désavantage que le CO généré est un gaz dissous en solution et est donc faiblement disponible en tant que tel pour des réactions ultérieures. Une solution serait de récupérer le produit après réaction avec l'acetyl-CoA synthase sous forme d'acide acétique, ce qui impliquerait la mise en place de cascades multi-enzymatiques.

L'examen de la figure I.8 révèle également que deux systèmes très proches présentent des caractéristiques très intéressantes pour la fixation du CO_2 en intermédiaires facilement utilisables. Ce sont les enzymes intervenant dans la catalyse des réactions encadrées en rouge. Ces réactions consistent en la réduction du CO_2 en formiate ($HCOO^-$). Ces enzymes sont la formylméthanofurane déshydrogénase dans la branche de la méthanogénèse, que je vais détailler en premier, et la formiate déshydrogénase, que je détaillerai en second.

II.3.3 - Les Formylméthanofurane déshydrogénases

Les formylméthanofurane déshydrogénases telles que celles de *Methanothermobacter wolfeii* ou *Methanobacterium thermoautotrophicum*[30] sont de larges complexes protéiques hébergeant un site actif à molybdène ou à tungstène chélaté par deux molécules de ptérine-

guanine dinucléotide. Elles catalysent l'interconversion du N-formylméthanofurane en CO_2 et méthanofurane, comme le montrent les études de Thauer et al.[31] et de Bertram et al.[23]. La figure I.9 illustre cette dernière réaction.

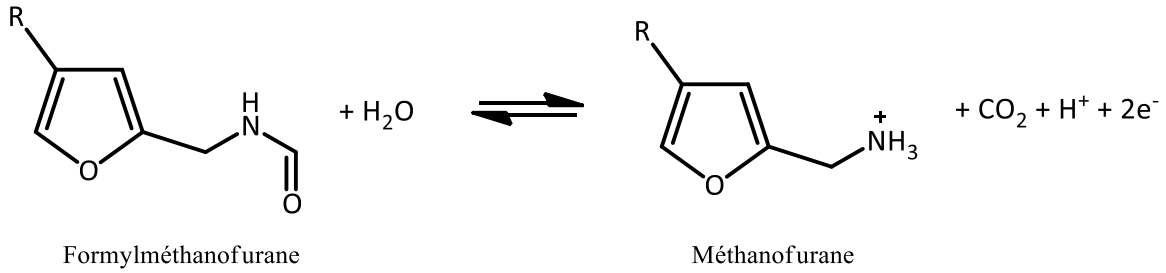


Figure I.9 : Réaction d'interconversion du N-formylméthanofurane en CO_2 réalisée par les formylméthanofurane déshydrogénases.

La formylméthanofurane déshydrogénase de *Methanothermobacter wolfeii* étudiée par Wagner et al.[21] est structurée sous la forme de tétramères d'hexamères composés de plusieurs sous-unités, Fwd(ABCDFG)$_4$, de poids moléculaire total 800 kDa, contenant 46 centres FeS pour une longueur de 206 Å. La catalyse est réalisée séparément dans les sous-unités FwdBD. Ces dernières ont beaucoup en commun avec les formiate déshydrogénases. En effet, les résidus impliqués dans la ligation des centres FeS, des ptérines, la ligation du cofacteur à molybdène ou à tungstène ainsi que le site actif sont essentiellement conservés entre FwdBD et les FDHs à molybdène ou tungstène[32–35]. Le CO_2 est ainsi réduit dans les sous-unités FwdBD au niveau du site actif à tungstène en formiate puis est acheminé via un tunnel long de 43 Å jusqu'à FwdA. Cette dernière est une sous-unité possédant un cofacteur métallique binucléaire. Il est ensuite postulé que le formiate est condensé dans cette sous-unité. La figure I.10 montre la structure d'un des complexes FwdABCDFG ainsi que celle du supercomplexe tétramérique Fwd(ABCDFG)$_4$.

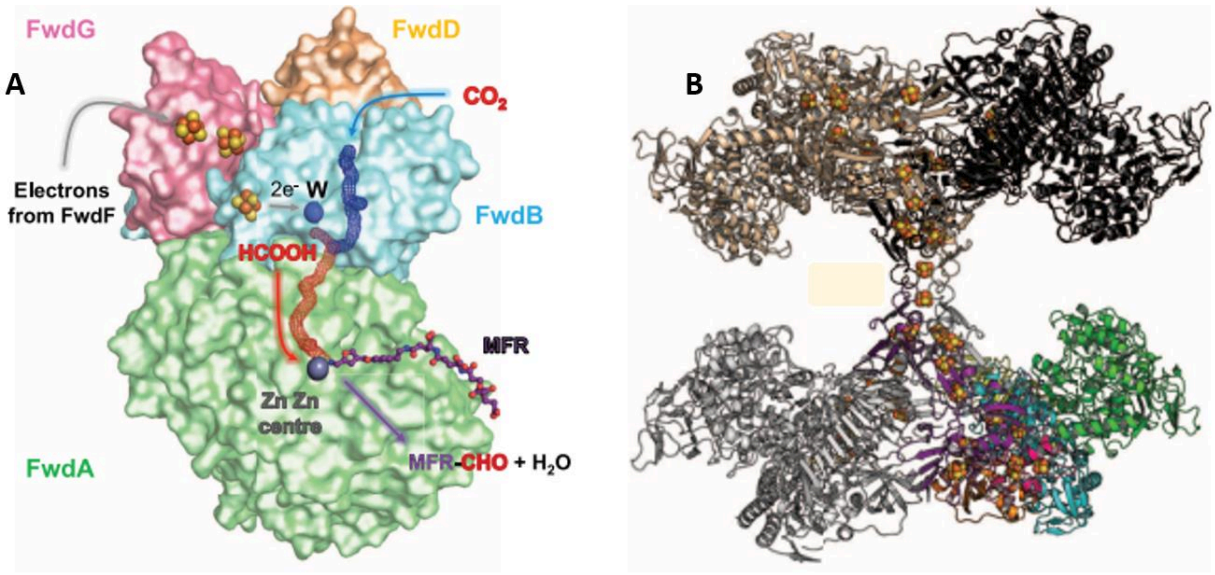


Figure I.10 : Représentation du complexe FwdABCDFG (A) et mécanisme proposé pour la réduction du CO_2 en formyl-MFR. (B) : structure du supercomplexe Fwd(ABCDFG)$_4$ avec le même code couleur que (A). PDB : 5T61. Adapté de Lemaire et al[22].

Une contrainte importante est que ces enzymes sont produites par des micro-organismes extrémophiles, comme c'est le cas pour la formylméthanofurane déshydrogénase de l'archaea *Methanothermobacter wolfeii,* et présente une sensibilité à l'oxygène importante[36]. Une voie qui apparait prometteuse est celle des formiate déshydrogénases (FDHs) pouvant catalyser la réaction de réduction du CO_2 en formiate encadrée en rouge sur la figure I.8.

III - Les Formiate Déshydrogénases (FDHs)

Dans la branche du méthyle, une succession de réactions conduisent à l'obtention du CH_3-H_4folate par la réduction du CO_2. La première étape de cette cascade est la réduction du CO_2 en formiate. Cette conversion est réalisée par une formiate déshydrogénase. Une formiate déshydrogénase connue pour être impliquée dans la branche du méthyle est celle de *Moorella thermoacetica* (*Clostridium thermoaceticum*). Il s'agit d'une FDH constituée en dimères de dimères ($\alpha_2\beta_2$). On trouve dans chaque sous-unité α un centre catalytique composé d'un atome de tungstène central chélaté par deux pyranoptérines et un atome de sélénium[20,37,38].

III.1 - Généralités sur les FDHs

Les formiate déshydrogénases catalysent l'interconversion à deux électrons entre le formiate ($HCOO^-$) et le CO_2. L'équation 4 illustre cette réaction.

$$HCO_2^- \rightleftharpoons CO_2 + H^+ + 2e^- \qquad E^{0'} = -0.43\ V \qquad (4)$$

Le formiate et par extension les FDHs jouent un rôle important dans les systèmes biologiques. On peut les trouver dans le périplasme[33,39–41] aussi bien que dans le cytoplasme[38,42–44] en tant que protéines solubles ou bien encore dans des complexes attachés à la membrane[32–34,44]. Les FDHs peuvent être classées en deux grandes catégories selon qu'elles contiennent ou pas des métaux. Au niveau de la taxonomie, les FDHs contenant des métaux se retrouvent de manière prédominante chez les procaryotes alors que les FDHs sans métal se retrouvent dans tous les domaines du vivant. Pour plus de détails, voir l'étude de Hille et al.[45].

Chez les eucaryotes, l'étude menée par Brosnan et al.[46] sur les mammifères montre l'importance du formiate, et donc des FDHs, en tant que métabolite de type C1. Le formiate pourrait de plus avoir un rôle dans le développement fœtal. Chez les plantes, le rôle des FDHs est complexe et reste à être étudié plus en détail mais l'étude de Alekseeva et al.[47] illustre une implication des FDHs dans la réponse au stress.

Celle menée par Nielsen et al.[48] permet de constater une différence importante entre les FDHs métal-dépendantes et métal-indépendantes en ce qui concerne leur efficacité vis-à-vis de la réduction du CO_2. En effet, il apparait que les FDHs contenant des centres métalliques réduisent le CO_2 plus efficacement. La figure I.11 montre une représentation du k_{cat}/K_M en fonction du k_{cat} en échelle logarithmique de plusieurs FDHs caractérisées biochimiquement[43,49–54]. Le tableau 1 reprend les données présentées dans la figure I.11.

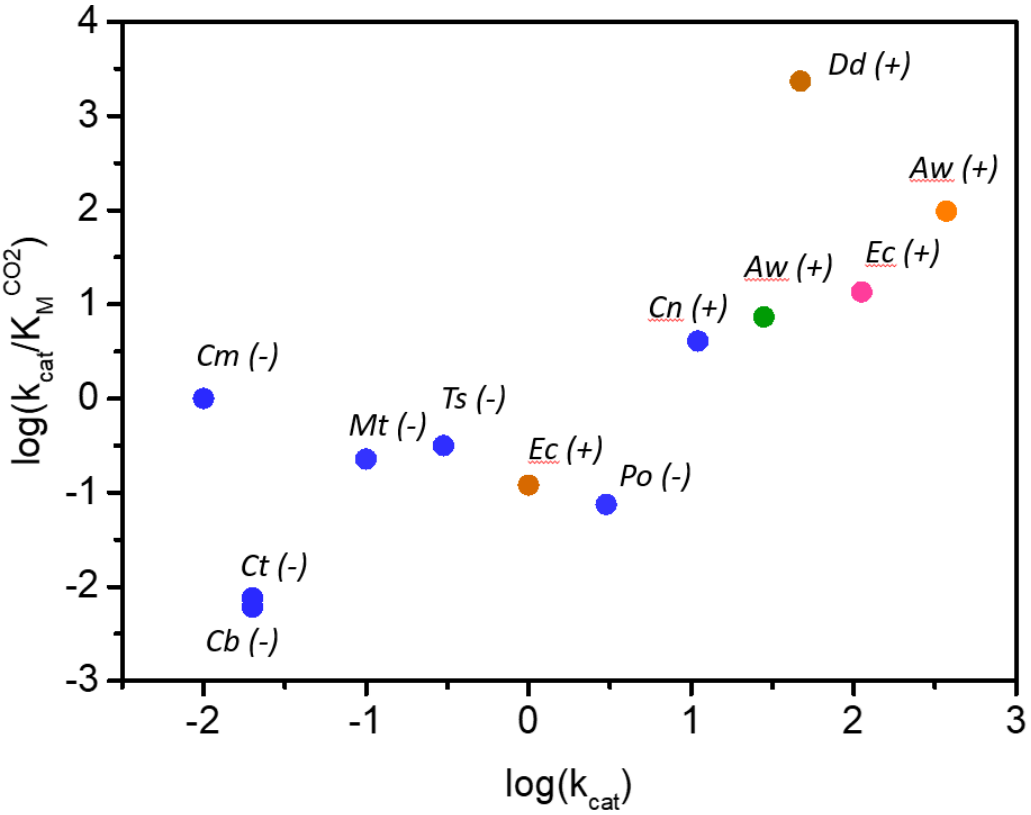


Figure I.11 : Représentation de l'efficacité catalytique (k_{cat}/K_M^{CO2}) en fonction de la constante catalytique k_{cat} des FDHs caractérisées d'un point de vue cinétique. Les cercles de couleur correspondent aux différents donneurs d'électrons utilisés pour les tests enzymatiques et récapitulés dans le tableau 1. (+) : FDHs métal-dépendantes, (-) : FDHs métal-indépendantes, Cm : Candida methylica, Cb : Candida boidinii, Ct : Chaetomium thermophilum, Mt : Myceliophthora thermophile, Ts : Thiobacillus sp. KNK65MA, Ec : Escherichia coli (Electrode à 150 mV de surpotentiel), Po : Pseudomonas oxilatus (100 mM NADH), Cn : Cupriavidus necator, Dd : Desulfovibrio desulfuricans, Aw : Acetobacterium woodii. Extrait de Nielen et al.[48]

Micro-organismes	Donneur d'électron	k_{cat} (s^{-1})	K_M^{CO2} (mM)
Desulfovibrio desulfuricans	Méthyl-viologène	47,0	0,02
Escherichia coli (FDH-H)	Méthyl-viologène	1,00	8,30
Acetobacterium woodii	Méthyl-viologène	372	3,80
Escherichia coli (FDH-H)	Electrode	112	8,30
Acetobacter woodii	Hydrogène	28,0	3,80
Candida boidinii	NADH	0,02	2,60
Thiobacillus sp. KNK65MA	NADH	0,30	0,95
Pseudomonas oxalaticus	NADH	3,00	40,0
Cupriavidus necator	NADH	11,0	2,70
Myceliophthora thermophila	NADH	0,10	0,44
Chaetomium thermophilum	NADH	0,02	3,29
Candida methylica	NADH	0,01	0,01

Tableau I.1 : FDHs étudiées pour leur efficacité à réduire le CO_2 et considérées dans la figure 11.

Nous allons nous intéresser plus en avant par la suite aux formiate déshydrogénases présentes chez les procaryotes et contenant ainsi des centres métalliques.

III.2 – Formiate déshydrogénases à centres métalliques

Beaucoup de systèmes enzymatiques en biologie, notamment chez les organismes procaryotes utilisent des métaux (Na, Mg, K, Ca, Mo, W, Fe, Ni, Co, Cu, Zn, Mn, …) pour pouvoir catalyser des réactions chimiques variées. Les formiate déshydrogénases étudiées dans cette thèse en font partie. La figure I.12 donne l'exemple de trois FDHs à métaux, FDH-N[35,55] et FDH-H[56] d'*E. coli* et la FDH de *Rhodobacter capsulatus*[57], illustrant également leur diversité de localisation, de structuration et d'insertion dans diverses voies métaboliques mentionnées plus haut.

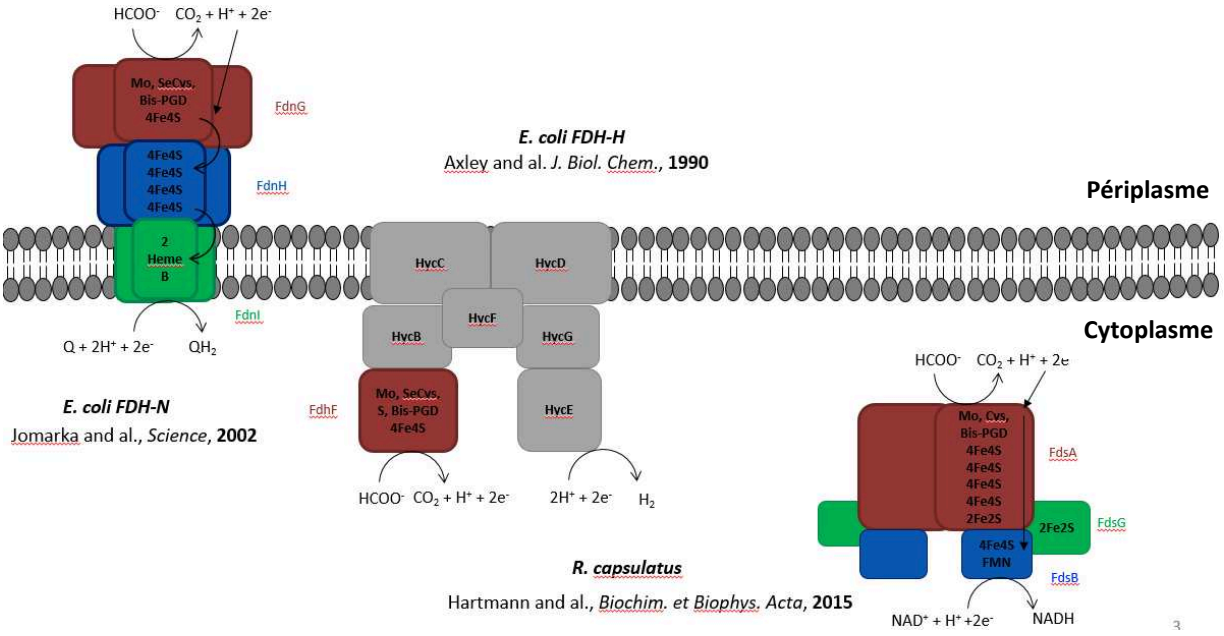


Figure I.12 : Représentation schématique de trois FDHs : FDH-N[35,55] et FDH-H[56] d'E. coli et la FDH de Rhodobacter capsulatus[57]. Adapté de Hartmann et al.[58]

En effet, la figure I.12 nous permet de voir que les FDHs sont impliquées dans les voies bioénergétiques d'*E. coli* par exemple avec FDH-N, périplasmique, qui intervient dans la respiration anaérobie. On peut également constater que d'autres FDHs telle que FDH-H toujours chez *E. coli*, s'insèrent au sein de complexes membranaires cytoplasmiques faisant partie du complexe formiate-hydrogène lyase impliqué dans la fermentation et dans génération de H_2. On se rend compte ainsi que certaines FDHs comme et FDH-N sont impliquées dans la respiration par la génération du gradient de protons transmembranaire permettant la synthèse ultérieure d'ATP. Enfin d'autres encore sont impliquées dans la régénération de cofacteur, comme c'est le cas pour la formiate déshydrogénase de *Rhodobacter capsulatus* également cytoplasmique, contribuant à la régénération du NADH. Elles sont de plus constituées d'un cofacteur métallique à molybdène (dans cette figure) ou tungstène, de plusieurs centres FeS ([4Fe4S] ou [2Fe2S]) et réagissent avec des accepteurs finaux d'électrons très variés (NAD^+, quinone, H^+, $NADP^+$, coenzyme F_{420}, …)[58,59]. De plus, la figure I.12 permet de constater que la sous-unité catalytique est essentiellement conservée parmi toutes les FDHs avec un cofacteur à Mo/W et un ou plusieurs centre(s) FeS. En revanche, on remarque que les sous-unités partenaires sont très diversifiées et pourraient être à l'origine de la diversité de voies métaboliques dans lesquelles les FDHs sont impliquées.

III.2.1 – Importance des métaux en biologie

Nous allons nous intéresser plus spécifiquement à l'importance des métaux de transition utilisés par les formiates déshydrogénases qui sont majoritairement le Mo, le W, et le Fe.

III.2.1.1 – Le fer et les centres FeS

Le fer est un élément indispensable pour les êtres vivants. Il est impliqué, entre autres, pour le transport de l'oxygène ainsi que le transfert d'électrons lors des réactions d'oxydo-réduction ($Fe^{2+} \leftrightarrow Fe^{3+}$) importantes notamment pour la respiration cellulaire. Le fer peut ainsi être présent dans des cofacteurs variés comme les hèmes, certains sites actifs enzymatiques et les centres FeS. Ces derniers sont ceux que je vais présenter plus en détail car ils sont retrouvés dans toutes les FDHs métalliques. Les centres FeS font partie des centres métalliques les plus répandus dans le monde vivant. La possibilité qu'ont ces clusters de délocaliser leur nuage électronique, entre les atomes de Fe et de S, leur permet d'être parfaitement optimisés pour le transfert électronique, leur rôle principal. Parmi les nombreux rôles joués par les centres FeS, ils interviennent également dans les mécanismes de fixation du substrat dans une large gamme de déshydratases, de réductases et d'enzymes à radical SAM (S-adénosyl-L-méthionine). Il a également été montré qu'ils jouent des rôles structuraux importants. Ils sont en outre impliqués dans certains mécanismes de réparation de l'ADN ainsi que dans certains mécanismes de régulation transcriptionnelle ou traductionnelle[60–69]. Les centres FeS sont stabilisés dans les structures protéiques par la chélation avec des cystéines (motif général 4xCys), ou plus rarement avec des résidus histidine, arginine, aspartate ou tyrosine (motif 3Cys + 1His, 3Cys + 1Arg, 3Cys + 1Asp, 3Cys + 1Tyr). Un motif de coordination avec 2 cystéines et 2 histidines existe aussi (motif 2Cys + 2His) et est rencontré dans les centres [2Fe2S] dit alors de type Rieske, qui ne seront pas étudiés dans cette thèse. Les centres FeS étant constitués des mêmes éléments (Fe et S) on comprend que leurs propriétés électrochimiques vont être modulées par les résidus présents dans les première et seconde sphères de coordination[70–80]. L'étude menée par Bak et al.[60] met en évidence ce phénomène et donne une plage de potentiel standard observée pour différents types de centres FeS possédant différentes coordinations (figure I.13).

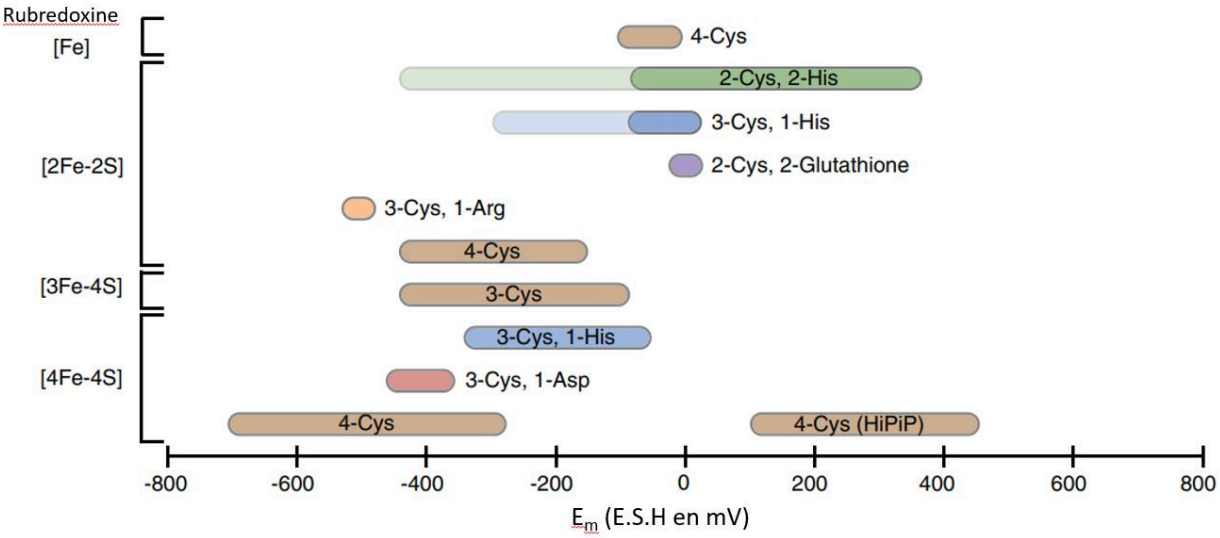


Figure I.13 : Représentation des plages de potentiels standards de différents centres FeS avec différents types de coordination étudiés dans la littérature. Extrait de Bak et al.[60]

On peut voir à partir de la figure I.13 que les centres [4Fe4S] ont des potentiels standards typiquement compris entre – 50 mV et – 700 mV. Les centres [3Fe4S] ont des potentiels standards compris entre environ – 50 mV et – 400 mV. Enfin, les centres [2Fe2S] ont des potentiels standards retrouvés dans la gamme + 50 mV et – 500 mV.

III.2.1.2 – Le molybdène (Mo) et le tungstène (W)

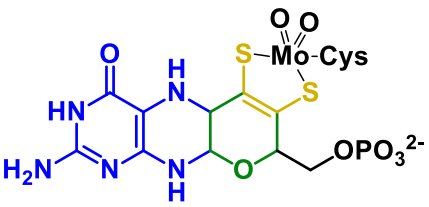
Eléments de transition situés dans la quatrième colonne du groupe d et respectivement en cinquième et sixième période, le Mo et le W, sont des éléments traces essentiels pour l'ensemble du monde vivant et font partie des plus lourds éléments de transition utilisés par les organismes vivants à l'exception de certains lanthanides (La, Ce, Pr, Nd) dans la méthanol déshydrogénase bactérienne[81]. Bien qu'ils soient présents à l'état de traces dans la croute terrestre, de 1 à 10 mg/kg, et à une concentration souvent inférieure de plusieurs ordres de grandeur à leur concentration d'environ 10 µg/L en eau douce, leur présence notable dans l'ensemble du vivant s'explique par leur grande biodisponibilité en milieu marin à une concentration de 10 µg/L sous la forme d'ions molybdates MoO_4^{2-} et tungstates WO_4^{2-} stables et peu réactifs. Le tungstène, situé en dessous du molybdène dans le tableau périodique est quant à lui majoritairement retrouvé dans les enzymes d'organismes extrêmophiles vivant à côté de sources hydrothermales, comme les archées hyperthermophiles. Il est communément admis que ce phénomène est essentiellement dû à sa biodisponibilité plus faible que celle du molybdène, exception faite des eaux environnant les cheminées hydrothermales. Le

tungstène est cependant retrouvé également chez des organismes ne nécessitant pas de conditions de vie extrêmes, suggérant un rôle potentiellement plus important du tungstène dans ces organismes[1,58,59,82–84]. Le molybdène et le tungstène se retrouvent ainsi inclus dans des cofacteurs jouant principalement le rôle de sites actifs dans la catalyse de réactions enzymatiques variées comme on peut le voir dans le cas de la nitrate réductase, la formiate déshydrogénase, la xanthine oxydase, l'aldéhyde oxydoréductase, … [45,85,86]. Les différences au niveau du site actif de ces enzymes et plus précisément les différences de mode de coordination du Mo/W permettent de classer ces enzymes en plusieurs catégories.

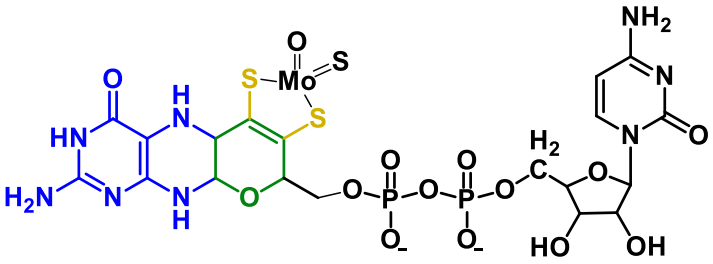
En fonction de la coordination de l'atome métallique central du site actif (molybdène ou tungstène), différentes familles d'enzymes à Mo/W sont distinguées.

III.2.2 - Classification des formiate déshydrogénases métalliques

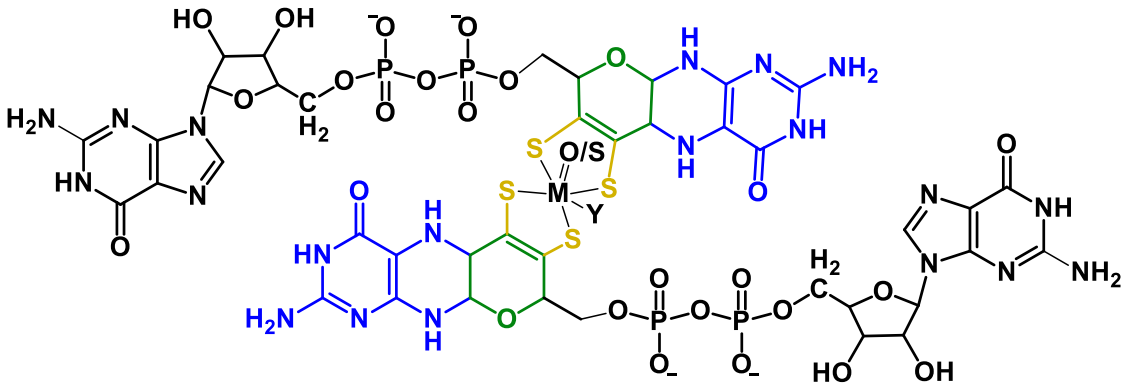
On retrouve ainsi quatre grandes familles qui sont celles de la Sulfite Oxydase (SO), de la Xanthine Oxydase (XO), de l'Aldéhyde OxydoRéductase (AOR) et celle de la Diméthylsulfoxyde Réductase (DMSOR). La figure I.14 montre les différents cofacteurs représentant les quatre grandes familles d'enzymes à Mo et à W. Dans cette classification les enzymes à tungstène telles que l'aldéhyde-ferrédoxine oxydoréductase et certaines FDHs sont séparées des autres enzymes à molybdène. Néanmoins, pour souligner les similarités structure/fonction entre les enzymes à tungstène et celles membres de la famille DMSOR, les deux familles sont réunies dans une unique super-famille appelée la famille des enzymes à cofacteur Mo/W-*bis*PGD (PGD : Pyranoptérine Guanosine Dinucléotide)[34,87]. C'est notamment le cas pour les W-FDH et les Mo-FDHs.



Famille des Sulfite Oxydases (SO)

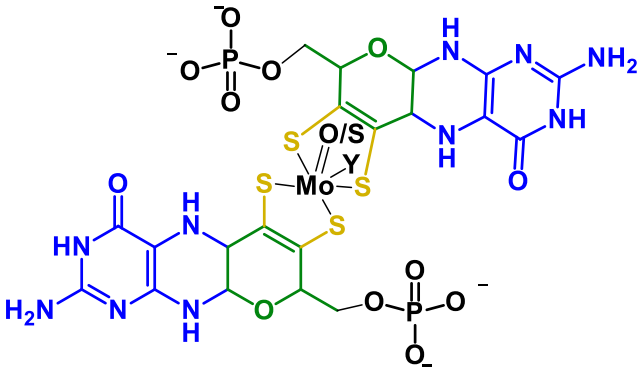


Famille des Xanthine Oxydases (XO)



Y : Cys / SeCys / Asp / Ser

Famille des espèces à cofacteur de type Mo/W-*bis*PGD
(Diméthylsulfoxyde Réductases (DMSOR) + Tungsto-enzymes)



Famille des Aldéhyde Oxydoréductases (AOR)

Figure I.14 : Représentation des différents cofacteurs mononucléaires à Mo/W des différentes familles d'enzymes auxquelles ils sont associés. M : Mo ou W, Y : Cystéine/Sélénocystéine/OH. Le cofacteur à Mo/W (représenté par M = Métal) ainsi que les ligands le chélatant avec en vert la fonction « pyrano », en bleu la partie « ptérine », en jaune les groupements dithiolène et en noir la partie méthyl-monophosphate ou nucléoside diphosphate (guanosine pour la famille de la DMSOR et cytidine pour la famille de la XO).

Les formiate déshydrogénases métalliques sont donc classées dans la famille des enzymes à cofacteur de type Mo/W-*bis*PGD.

III.2.3 – Incorporation du Molybdène et/ou du Tungstène

La présence de cofacteur à tungstène, Wco, au niveau du site actif est restreinte à la famille des enzymes à Mo/W-*bis*PGD. L'incorporation du tungstène ou du molybdène dans un site actif n'est donc pas une étape que rencontrent toutes les enzymes. La question de savoir si les FDHs appartenant à la famille des DMSOR sont capables de s'adapter aux deux métaux ou si elles sont spécifiques d'un seul est alors légitime. Comme le montre l'étude de Seelmann et al.[83], certaines FDHs présentent une stricte préférence pour le molybdène ou le tungstène alors que d'autres, bien que plus rares, montrent une plasticité par rapport à leur capacité à utiliser l'un ou l'autre de ces métaux. En effet beaucoup de FDHs, comme celles d'*E. coli* et de *M. formicium* sont Mo-dépendantes et leur production dans un milieu enrichi en tungstate (WO_4^{2-}) ou appauvri en molybdate (MoO_4^{2-}) conduit à l'obtention d'enzymes inactives, le tungstate ne pouvant pas le remplacer[88]. Néanmoins, parmi les espèces de *Desulfovibrio* présentant des cofacteurs à tungstène, *Desulfovibrio alaskensis*[82,89] est capable d'incorporer du molybdène ou du tungstène dans la même FDH selon la concentration en molybdate (1 µM $Na_2MoO_4\ 2H_2O$) et en tungstate (10 µM $Na_2WO_4\ 2H_2O$) dans le milieu. Une situation similaire est rencontrée dans le cas de la FDH périplasmique de *Campylobacter jejuni*[90,91]. D'autre part *Desulfovibrio vulgaris Hildenborough* produit deux FDHs spécifiques à chaque métal : une contenant un cofacteur à molybdène exprimée durant une croissance avec du molybdate et l'autre contenant un cofacteur à tungstène est produite durant une croissance avec du tungstate[40,92]. L'incorporation du molybdène ou du tungstène est importante pour la réactivité. En effet, les enzymes à tungstène sont impliquées dans des réactions de transfert d'électrons de bas potentiel ($E^{0'} < -400$ mV). Ceci peut être compris par le fait que les transferts redox W(IV/V/VI) sont généralement de plus bas potentiels comparées à leurs équivalentes Mo(IV/V/VI)[83,93].

III.3 – Structure des formiate déshydrogénases

Comme mentionné dans le paragraphe III.2, les formiate déshydrogénases présentent des structures très diverses. Néanmoins la structure de leur site actif est conservée. Ces derniers possèdent dans l'état oxydé un cofacteur de type Mo/W chélaté par deux molécules de PGD

(Pyranoptérine Guanosine Dinucléotide) et soit le sélénium d'une sélénocystéine, soit le soufre d'une cystéine. Un sixième soufre sous la forme d'un ligand sulfo (=S) est également présent.

III.3.1 - Différentes structures, même site actif :

La figure I.15 illustre la structure de trois enzymes et de leur site actif respectif : FDH-N de *E. coli* (A), FDH-H de *E. coli* (B) et la FDH de *D. gigas* (C), adapté de Maia et al.[1].

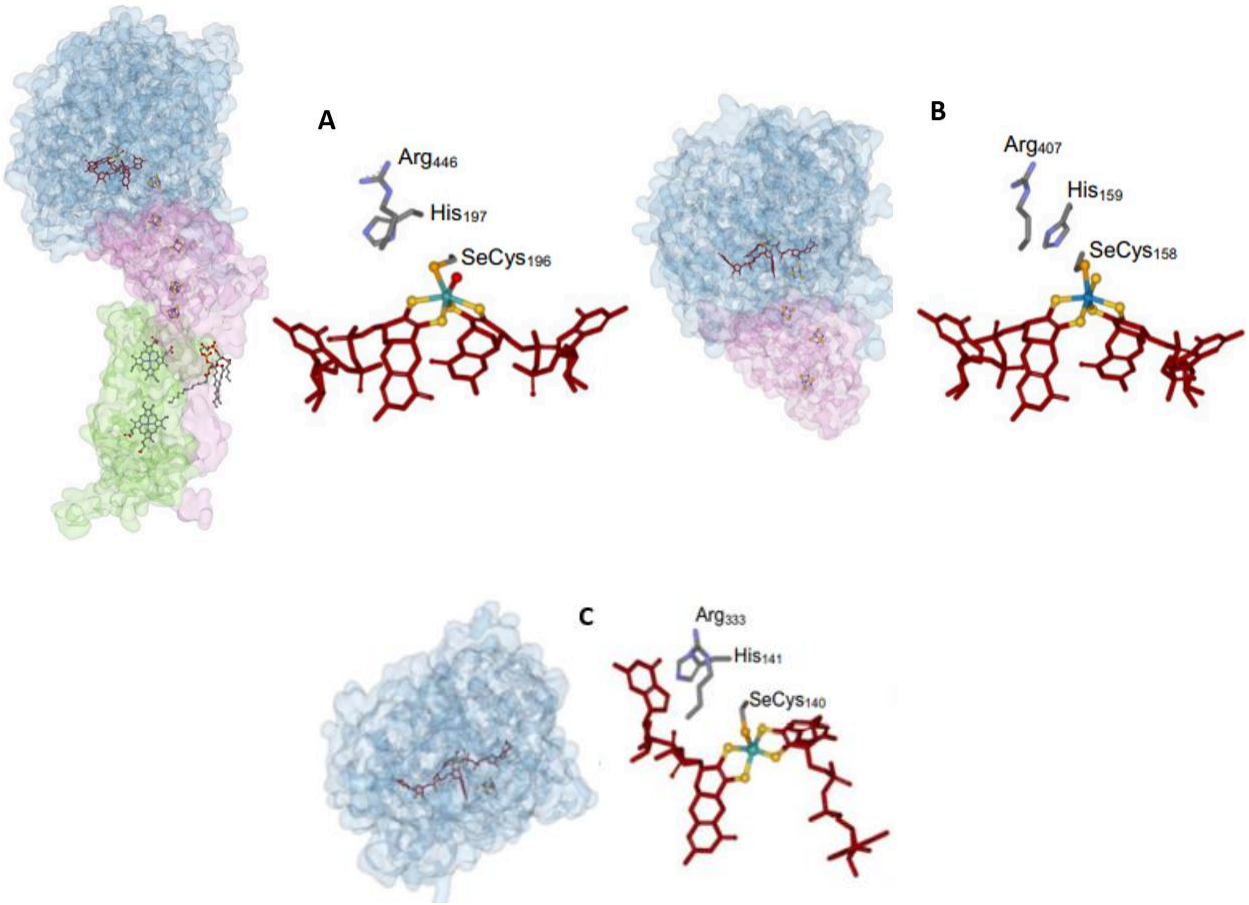


Figure I.15 : Représentation de trois FDHs. FDH-N (A) et FDH-H (C) d'E. coli et la FDH de D. gigas (B) avec l'arrangement structural des sous-unités et centres métalliques au sein de ces dernières ainsi que la représentation du cofacteur métallique à Mo/W avec les résidus conservés de la seconde sphère de coordination.

Elle permet de constater que malgré une structure globale différente les sites actifs semblent conservés et deux acides aminés de la deuxième sphère de coordination, une arginine et une histidine, sont conservés dans ces trois structures.

III.3.2 – Consensus au niveau du site actif des FDHs :

Il est intéressant de constater que le site actif des formiate déshydrogénases apparait très bien conservé parmi cette classe d'enzymes. De plus, il est à noter que le site actif semble être conservé aussi bien chez les FDHs que chez les nitrate réductases périplasmiques (Naps), appartenant aussi à la famille des Mo/W-*bis*PGD. La figure I.16 montre une comparaison entre différentes Naps de *D. desulfuricans* (code couleur) et *R. sphaeroides* (en bleu), entre la Nap de *D. desulfuricans* (en bleu clair) et la FDH à tungstène de *D. gigas* (code couleur) et enfin entre trois FDHs celle de *D.gigas* (code couleur) et les formiates déshydrogénases de *E. coli* FDH-H (rouge) et FDH-N (jaune)[34]. Code couleur (azote : bleu, carbone : gris, molybdène/tungstène : orange, oxygène : rouge, soufre : jaune).

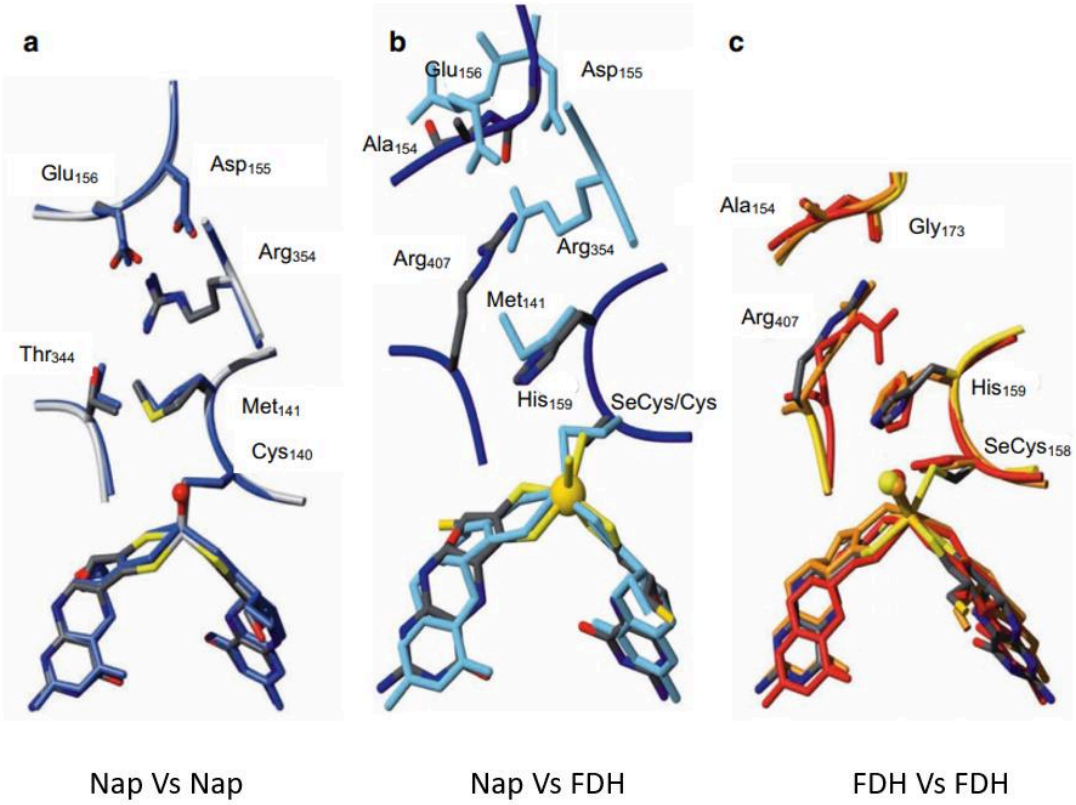


Figure I.16 : Comparaisons entre Naps et FDHs. a) comparaison entre les nitrate réductases de D.desulfuricans (code couleurs) et R.sphaeroides (bleu) b) Comparaison entre la nitrate réductase de D.desulfuricans (bleu clair) et la formiate déshydrogénase à tungstène de D.gigas (code couleur) c) Comparaison entre la formiate déshydrogénase à tungstène de D.gigas (code couleur), et les formiates déshydrogénases de chez E.coli FDH-H (rouge) et FDH-N (jaune). Adapté depuis la publication de Maia et al.[34].

Il apparait alors que les FDHs et les Naps partagent une même première sphère de coordination. Cependant, on constate que la deuxième sphère de coordination n'est pas conservée. En effet, chez les Naps, les acides aminés conservés sont un résidu thréonine (Thr) et un résidu méthionine (Met). En ce qui concerne les FDHs, les acides aminés conservés sont, comme mentionné précédemment, un résidu arginine strictement conservé et un résidu histidine très conservé. Ces différences dans la deuxième sphère de coordination pourraient être à l'origine des différentes réactivités (transfert d'oxygène pour les Naps, transfert de proton pour les FDHs).

III.4 – Etudes par spectroscopie RPE des formiate déshydrogénases métalliques

III.4.1 – Etudes par spectroscopie RPE des centres FeS

La figure I.17 montre les différents types de clusters FeS rencontrés en biologie ainsi que leurs différents états d'oxydation et de spin possibles[68].

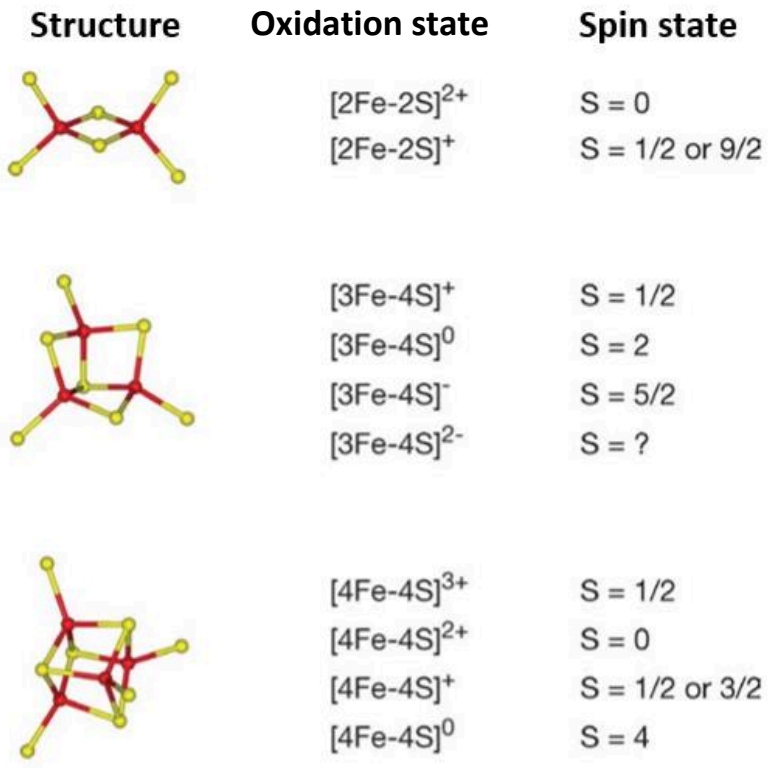


Figure I.17 : Représentation de la structure, des états d'oxydation principaux et des états de spin liés pour les différents types de centres FeS. Le fer est représenté en rouge et le soufre en jaune. L'état de spin symbolisé par un point d'interrogation reste à être déterminé. Extrait de Johnson et al.[68]

On constate ainsi que les centres [2Fe2S] peuvent être visibles en RPE dans un état de spin $^1/_2$ ou $^9/_2$. Les centres [4Fe4S] peuvent quant à eux être visibles dans un état $^1/_2$ ou$^3/_2$.

Les centres [4Fe4S] présentent généralement des signatures RPE rhombiques caractérisées par un spectre bien résolu en bande X donnant accès aux trois valeurs de g du système, g_1, g_2, et g_3. Ces signaux, centrés autour de g_{av} = 2,0, sont ceux attendus pour un centre FeS de type 4Fe4S dans un état réduit $[4Fe4S]^+$ de spin S = $^1/_2$. Deux exemples simples de systèmes

contenant des centres FeS sont donnés par les études menées par Costa et al.[94] et Brondino et al.[82].

La première, celle menée par Costa et al.[94], montre la déconvolution de deux signatures dans la FDH de *Desulfovibrio desulfuricans*. La figure I.18 montre l'étude en température entre 4 K et 61 K des centres FeS dans l'enzyme panneau (A) ainsi que le spectre à 10 K et sa simulation (B).

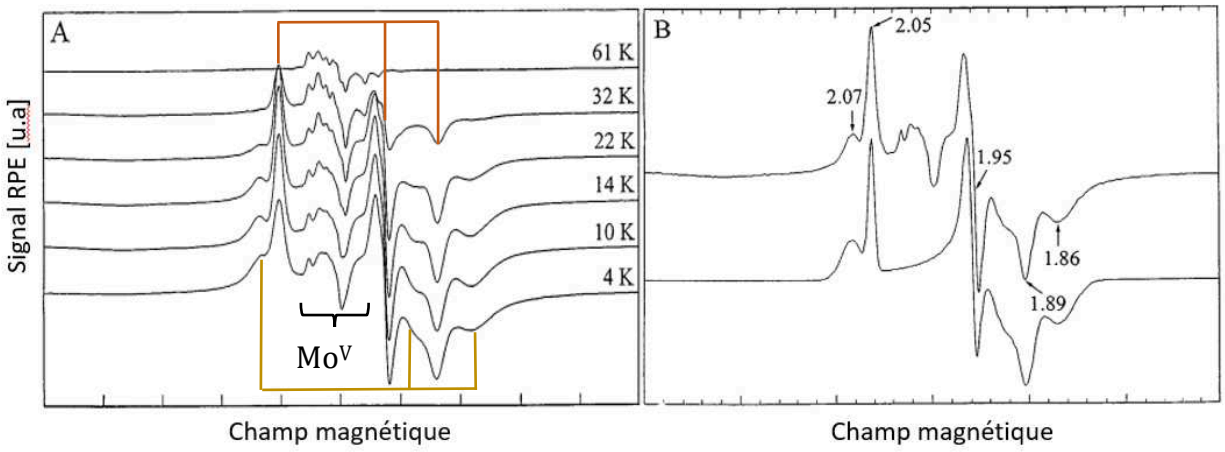


Figure I.18 : Spectres RPE de centres FeS observés dans la FDH de D. desulfuricans ATCC 27774. Conditions expérimentales : fréquences micro-ondes : 9,45 GHz, puissance micro-onde : 2,4 mW, amplitude de modulation : 1 mT. (A) : température (de haut en bas) : 61 K, 32 K, 22 K, 14 K, 10 K et 4 K. (B) : Spectre expérimental à 10 K et sa simulation en prenant en compte la contribution de deux signatures rhombiques avec les paramètres suivants [valeurs de g (largeurs de raie, mT)] : (Fe-S) I : g_1 = 2,050 (1,5), g_2 = 1,947 (1,8), g_3 = 1,896 (3,0), (Fe-S) II : g_1 = 2,071 (4,2), g_2 = 1,926 (4,5), g_3 = 1,865 (6,0). La déviation entre le spectre expérimental et la simulation au niveau de g ≈ 2,0 vient de la présence du signal de Mo^V. Extrait de Costa et al.[94]

La figure I.18 met ainsi en évidence deux signatures rhombiques dont les propriétés de relaxation et les valeurs de g sont compatibles avec celles de clusters 4Fe4S appelés centre I (g_1 = 2,050, g_2 = 1,947, g_3 = 1,896) et centre II (g_1 = 2,071, g_2 = 1,926, g_3 = 1,865).

L'étude de Brondino et al.[82] montre que l'on observe dans la FDH de *Desulfovibrio alaskensis* les spectres de deux centres [4Fe4S] à l'état réduit. La figure I.19 reprend l'étude de ces signatures à plusieurs températures ainsi que leurs signatures individuelles.

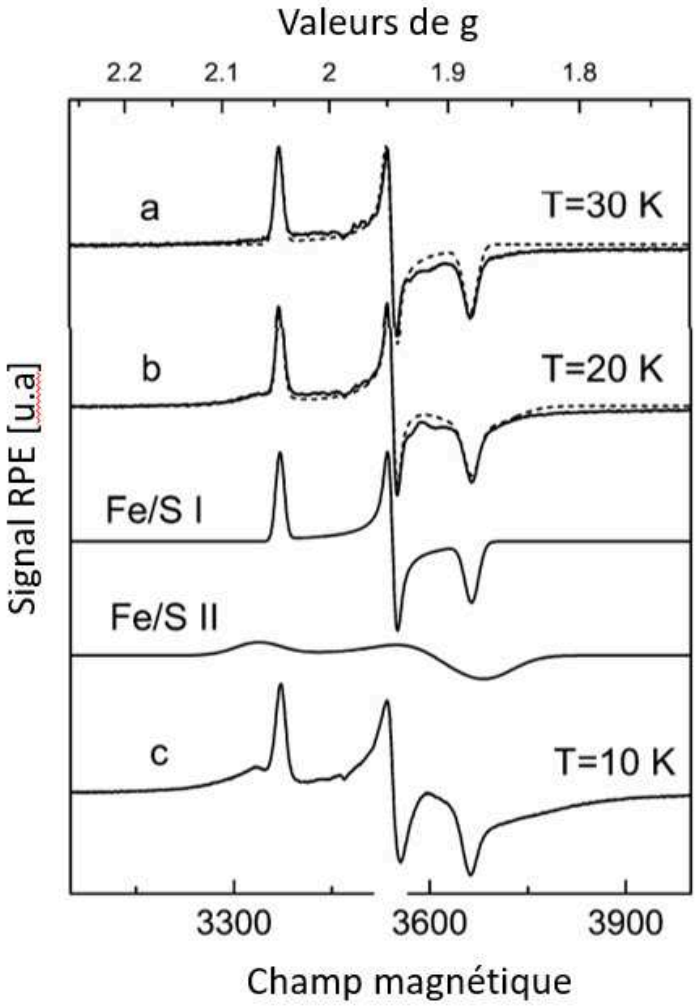


Figure I.19 : Spectres RPE de centres FeS observés dans la FDH de D. alaskensis à différentes températures (a : 30 K, b : 20 K, c : 10 K) ainsi que la déconvolution de ces signatures en utilisant deux centre FeS, Fe/S I et Fe/S II. Les traits pointillés représentent les simulations des spectres expérimentaux. *Extrait de Brondino et al.*[82]

Comme le montre la figure I.19, on constate que deux signaux provenant de centres FeS ont été déconvolués, Fe/S I avec un signal rhombique étroit visible jusqu'à 30 K caractérisé par des valeurs de g : g_1 = 2,046, g_2 = 1,946, g_3 = 1,882 et un signal large, quasi axial, visible jusqu'à 20 K ayant pour valeurs de g : g_1 = 2,066, g_2 = 1,913, g_3 = 1,868 attribué à Fe/S II. Les valeurs de g sont ici déterminées par simulation des signaux. Les centres observés relaxent plutôt rapidement et leurs valeurs de g ainsi que leurs propriétés de relaxation sont typiques du comportement de centres [4Fe4S].

Plusieurs études sur des systèmes plus complexes ayant plus de deux signatures de centres FeS visibles ont été faites par Raaijmakers et al.[39], Niks et al.[58,59] et Jollie et al.[97]

Raaijmakers et al.[39] ont étudié les quatre centres [4Fe4S] présents dans la FDH de *Desulfovibrio gigas*. La figure I.20 montre le spectre expérimental à 20 K (i) et à 10 K (v), la différence entre les deux (vi) ainsi que les simulations des signaux observés (ii et iii) et leur somme (iv).

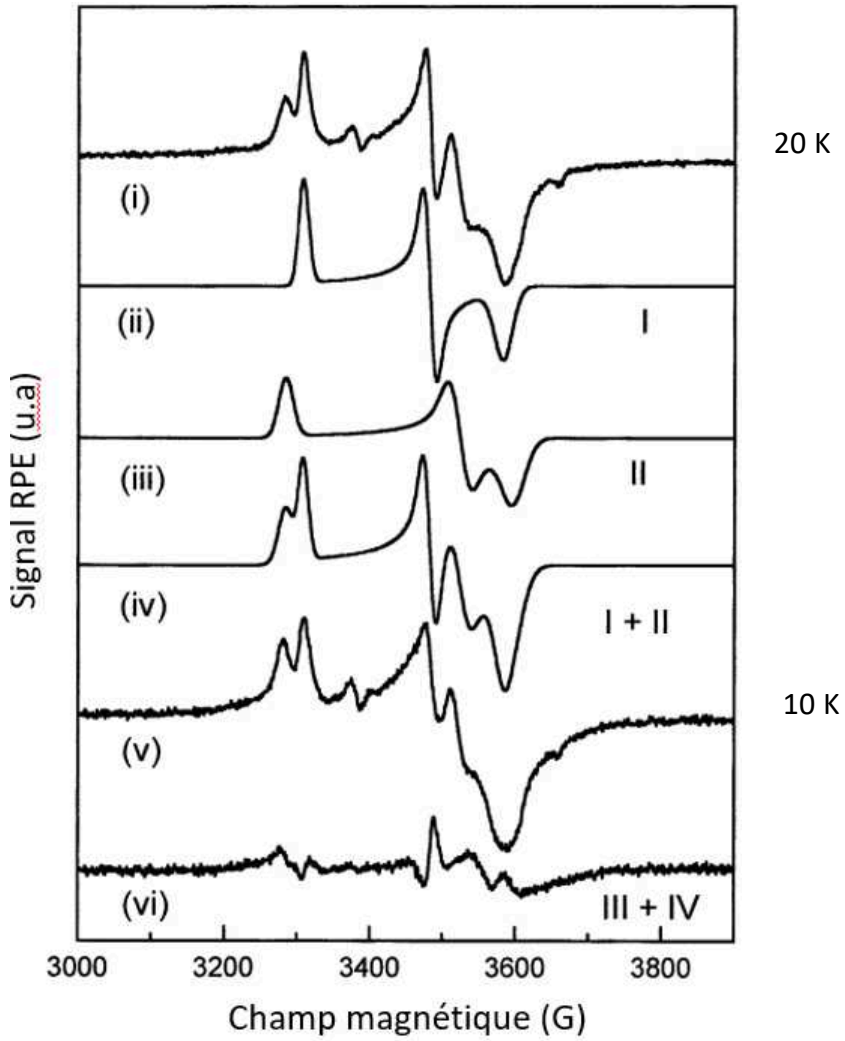


Figure I.20 : Spectres RPE de centres FeS observés dans la FDH de D. gigas dans un état réduit au formiate à 20 K (i) et à 10 K (v), la différence entre les deux (vi) ainsi que les simulations des signaux observés (ii et iii) et leur somme (iv). Conditions expérimentales : fréquences micro-ondes : 9,49 GHz, puissance micro-onde : 0,2 mW, amplitude de modulation : 4 G. Paramètres des simulations [valeurs de g (largeurs de raie, G)] : (i) : g_1 = 2,049 (14), g_2 = 1,947 (15), g_3 = 1,892 (30), (ii) : g_1 = 2,064 (20), g_2 = 1,924 (26), g_3 = 1,885 (32). Extrait de Raaijmakers et al.[39]

On constate que les signatures associées aux centres FeS I et II ont des propriétés de relaxation et des valeurs de g cohérentes avec leurs attributions à des centres de type [4Fe4S].

Néanmoins l'identification des centres III et IV parait délicate depuis le spectre différence. Entre 10 K et 20 K, l'amplitude relative des signatures peut varier en raison de leurs propriétés de relaxation et ainsi causer ces signaux peu intenses.

Une autre étude plus récente menée par Niks et al.[95,96] sur la formiate déshydrogénase NAD^+-dépendante de *Cupriavidus necator* montre la caractérisation d'un système complexe de sept centres FeS, dont quatre visibles en RPE. La figure I.21 montre les signatures de ces centres FeS (A – D) ainsi que le zoom (E) sur le spectre d'un centre difficilement visible sinon.

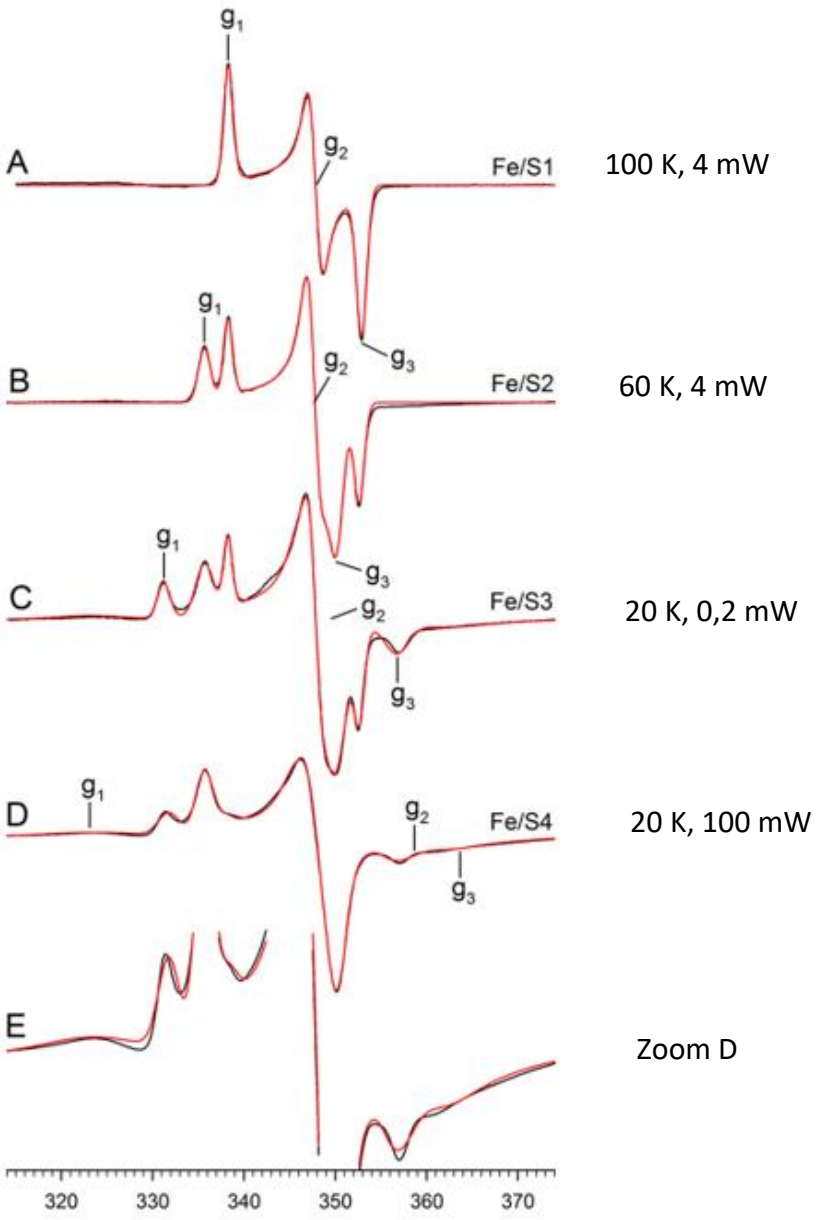


Figure I.21 : Spectres RPE de centres FeS observés dans la FDH de C. necator, avec les spectres expérimentaux (en noir) et leurs simulations (en rouge) représentant : (A) Fe/S1 et (B) Fe/S1 + Fe/S2 : amplitude de modulation : 4 G, puissance micro-onde = 4 mW à (A) 100 K et (B) 60 K,

(C) Fe/S1 + Fe/S2 + Fe/S3: amplitude de modulation : 3 G, puissance micro-onde = 0,2 mW à 20 K, Fe/S4 (D) : amplitude de modulation : 10 G, puissance micro-onde = 100 mW à 20 K. Un zoom du spectre (D) est visible en (E). Extrait de Niks et al.[95]

Les auteurs n'attribuent pas clairement les signatures des différents centres à des centres [4Fe4S] ou [2Fe2S]. Cependant on peut constater que les signatures des centres Fe/S3 et Fe/S4 de valeurs de g respectives g_1 = 2,044, g_2 = 1,937, g_3 = 1,898 et g_1 = 2,095, g_2 = 1,888, g_3 = 1,862 sont rhombiques et bien visibles à 20 K (figure 14 C et D). Le centre Fe/S1 a une rhombicité plus faible avec des valeurs de g de g_1 = 2,001, g_2 = 1,946, g_3 = 1,918 et est visible à 100 K (figure 14 A). De plus, le centre Fe/S2 g_1 = 2,017, g_1 = 1,947 et g_3 = 1,933 est toujours visible à 120 K. Ces propriétés de relaxation sont celles attendues pour des centres 2Fe2S.

Enfin les recherches menées par Jollie et al.[97], sont intéressantes pour la compréhension des systèmes à FeS puisque les auteurs caractérisent trois centres [4Fe4S] et un centre [2Fe2S] dans la formiate déshydrogénase de chez *Methylosinus trichosporium OB3B*. La figure I.22 montre dans le panneau (A) différentes signatures composites représentant la superposition des différents centres paramagnétiques dans cette FDH dans différentes conditions redox : la protéine telle qu'isolée (figure A1), réduite au dithionite à 8,0 K (figure A2, A3), réduite avec de la proflavine (figure A4), et à 90 K (figure A5, A6). Dans le panneau (B) sont représentées les simulations de plusieurs signatures isolées (figure B1 à B5) qui, une fois sommées, forment un signal composite rendant compte de la signature expérimentale observée en (figure A2).

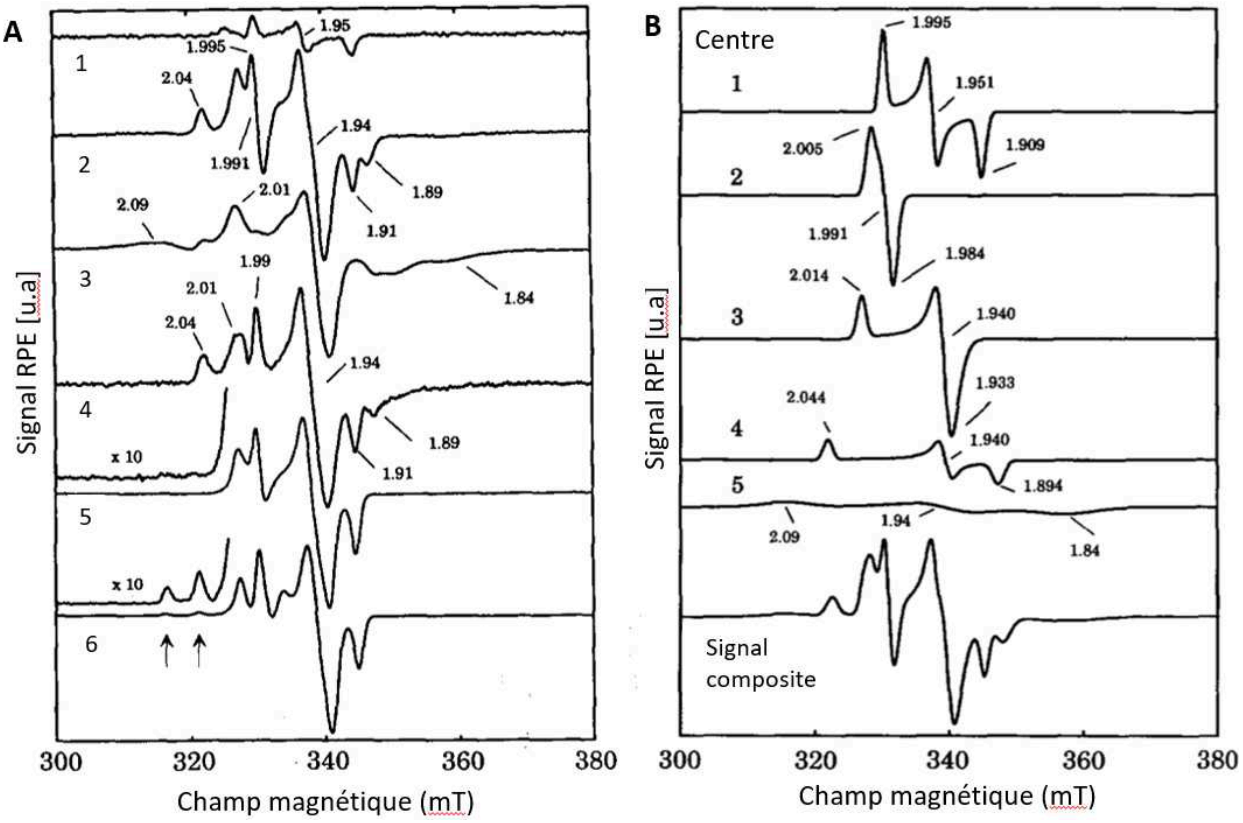


Figure I.22 : Spectres RPE expérimentaux (A) déconvolués par simulation spectrale (B) des centres paramagnétiques (FeS et Mo^{V} détectés) dans la FDH de Methylosinus trichosporium OB3B. ***(A)*** *: (1) : après purification anaérobie pH = 6,5, température : 8,0 K, puissance micro-onde : 0.001 mW. (2 et 3) : Après réduction au formiate (anaérobie), température : 8,0 K, puissance micro-onde : 0.001 mW (2), et 50 mW (3). (4) : Après réduction au dithionite (avec 10 µM proflavine), pH = 8,0, température : 8,0 K, puissance micro-onde : 0.001 mW. (5) : Après réduction au dithionite (anaérobie), température : 90 K, puissance micro-onde : 10 mW. (6) : Après réduction au dithionite, FDH purifiée depuis une culture où le molybdène a été substitué par du ^{95}Mo (I = 5/2), température : 90 K, puissance micro-onde : 10 mW. Pour tous les spectres : fréquences micro-ondes : 9,22 GHz, amplitude de modulation : 1,0 mT à 100 kHz, temps d'acquisition d'un spectre : 4 min.* ***(B)*** *: paramètres de simulation : valeur de g (largeur de raie (mT)), (1) : g_1 = 1,995 (1,2), g_2 = 1,951 (1,5), g_3 = 1,909 (1,5), (2) : g_1 = 2,005 (1,4), g_2 = 1,991 (2,1), g_3 = 1,984 (1,6), (3) : g_1 = 2,014 (1,5), g_2 = 1,940 (2,0), g_3 = 1,933 (3,3), (4) : g_1 = 2,044 (2,0), g_2 = 1,940 (2,5), g_3 = 1,894 (2,5), (5) : g_1 = 2,090 (9,0), g_2 = 1,940 (9,0), g_3 = 1,840 (9,0). Extrait de Jollie et al.*[97]

La figure I.22 panneau (B) montre comment les auteurs ont déconvolué la signature expérimentale en une somme de signaux provenant d'un centre [2Fe2S] (B1), d'un centre à molybdène (B2), et de trois centres [4Fe4S] (B3 – B5). Cette étude est intéressante sur plusieurs points. Premièrement, on constate effectivement que les centres décrits en (B3), (B4) et (B5) ont des propriétés cohérentes avec leur attribution à des centres [4Fe4S] puisque l'augmentation de température entre 30 K et 50 K conduit à un élargissement de la raie. Deuxièmement, l'attribution du spectre (B1) à un centre [2Fe2S] est faite à la suite de

l'observation d'une dépendance en température de ce centre suivant une loi de Curie jusqu'à 90 K. Néanmoins, les auteurs soulignent que le centre (B1) a trois valeurs de g < 2,0, ce qui est inhabituel pour un centre [2Fe2S]. De plus, ils soulignent que la dépendance en température de la signature (B3) est inhabituelle pour un centre [4Fe4S] car elle est toujours visible à 90 K. Cette étude montre une formiate déshydrogénase dont la caractérisation RPE est complexe en raison de la présence de nombreux centres métalliques ainsi que les limitations dans la caractérisation et l'attribution de ces centres.

III.4.2 – Etudes par spectroscopie RPE des centres catalytiques à Mo/W :

Parmi la richesse des états d'oxydation possibles du molybdène Mo^0 (d^6), Mo^{II} (d^4), Mo^{III} (d^3), Mo^{IV} (d^2), Mo^V (d^1), Mo^{VI} (d^0), trois sont observés en biologie : les états Mo^{IV} (S = 1), Mo^V (S = 1/2), Mo^{VI} (S = 0). Cependant l'état Mo^V possédant un électron non-apparié nécessaire pour être détecté en RPE est celui classiquement observé avec cette technique. La figure I.23 illustre ces trois états ainsi que l'état Mo^V visible en RPE.

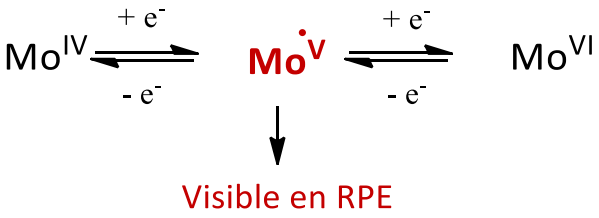


Figure I.23 : Les différents états d'oxydation d'intérêt pour l'étude des enzymes à molybdène, ainsi que l'état Mo(V) S = 1/2 visible en RPE.

Les espèces Mo^V possèdent des valeurs de $g_{av} \approx 2,0$ et relaxent plus lentement que les centres [4Fe4S]. Elles sont ainsi majoritairement observées à des températures allant de 30 K à 150 K.

Dans l'étude de Jollie et al. mentionnée plus haut, les auteurs observent une signature autour de $g_{av} = 1,99$ qui est toujours visible à 90 K (figure I.22 A5) ce qui est attendu pour un cofacteur à molybdène. Cependant pour appuyer leur attribution les auteurs ont conduit des expériences d'enrichissement isotopiques avec du ^{95}Mo ($I = {}^5/_2$, abondance naturelle : 15,9 %). La figure I.22 A6 montre le signal de l'échantillon ainsi enrichi. On constate l'apparition de raies de résonance dont l'étendue sur le spectre et l'intensité sont caractéristiques des

systèmes enrichis en $^{95}Mo^{98}$. De plus, les auteurs précisent que le signal attribué au molybdène apparait puis disparait au cours d'un titrage redox réalisé ce qui confirme qu'il s'agit d'une espèce dont seul l'état Mo^{V} est visible en RPE, comme attendu pour le cofacteur à molybdène.

Une étude menée par Costa et al.[94] sur la FDH de *Desulfovibrio desulfuricans* est également intéressante à considérer. En effet, les auteurs trouvent deux signatures rhombiques attribuées au cofacteur à molybdène de la FDH, comme illustré dans la figure I.24. La première signature, nommée (Rhombique I) est visible à l'état oxydé (A). Le panneau (B) montre la deuxième espèce de Mo^{V} (Rhombique II) ainsi que la simulation du spectre expérimental (i), et les simulations des espèces Rhombique I (ii) et Rhombique II (iii). Enfin le panneau (C) montre le signal complexe de molybdène avec des couplages hyperfins résolus. Ce signal a été généré après l'addition de formiate (2 mM) dans la solution.

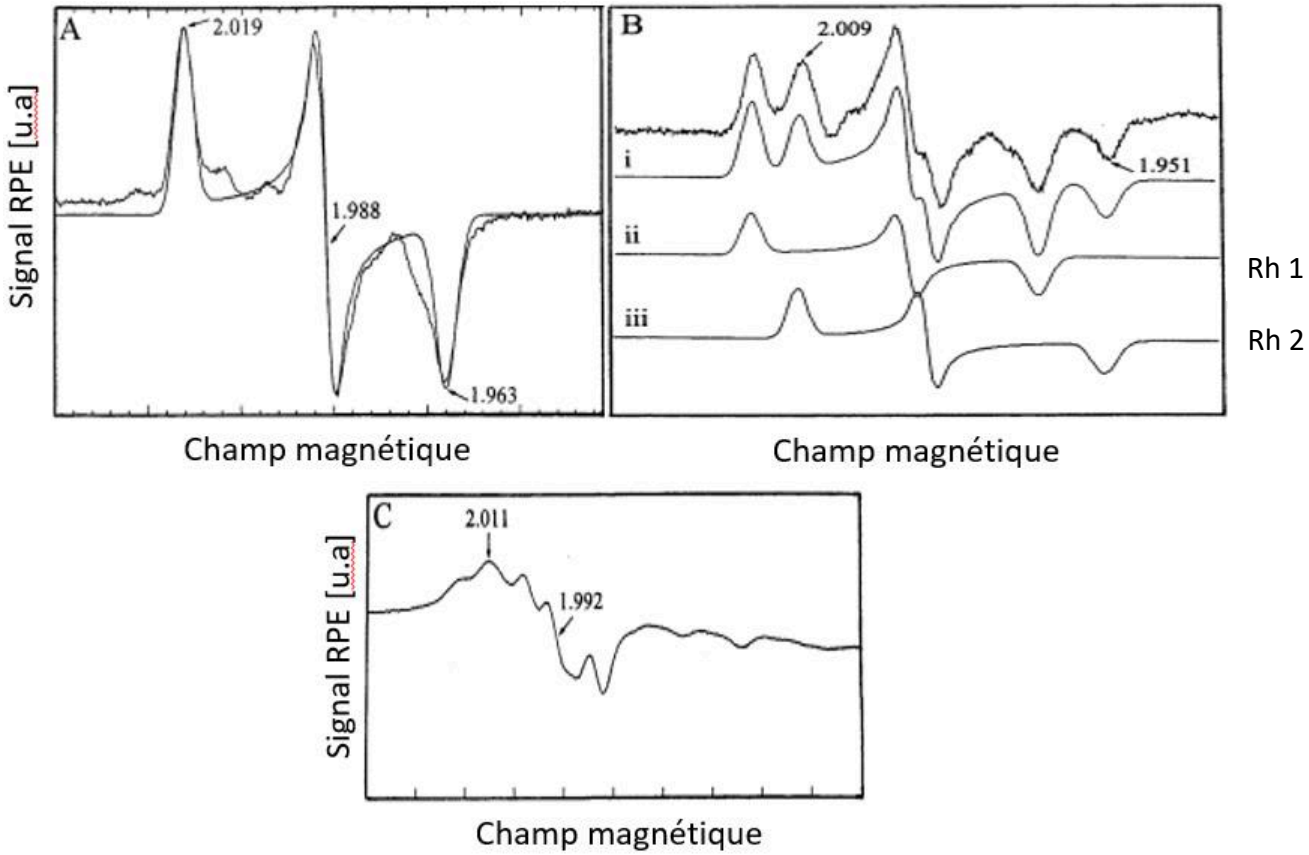


Figure I.24 : Signaux RPE du Mo^{V} dans la FDH de Desulfovibrio desulfuricans. Conditions expérimentales : fréquence micro-onde : 9,45 GHz, puissance micro-onde :2,4 mW, amplitude de modulation : 1 mT, température : 60 K (A) et 40 K (B). (A) : Spectre expérimental observé à l'état as-prep et simulé en utilisant les paramètres suivants [valeur de g (largeur de raie (mT))] : *g_1 = 2,019 (0,74), g_2 = 1,988 (0,66), g_3 = 1,963 (0,86). (B) : Signal du Mo^{V} détecté durant le titrage. Le spectre expérimental (i) est simulé en utilisant deux contributions : Rhombique I (ii) et Rhombique II (iii). Paramètres de simulation : Rhombique I idem que (A), Rhombique II :*

[valeur de g (largeur de raie (mT))] : *g_1 = 2,009 (0,74), g_2 = 1,984 (0,60), g_3 = 1,951 (0,95) dans les proportions 1 : 0,7. (C) : Spectre RPE du signal du Mo^V après réaction de l'enzyme avec du formiate (2 mM) en conditions anaérobie à pH = 7,8. Extrait de Costa et al.*[94]

Les auteurs constatent que l'espèce Rhombique I visible dans l'état oxydé est caractérisée par g_1 = 2,019, g_2 = 1,988, g_3 = 1,963. L'espèce Rhombique II apparait au cours du titrage d'oxydoréduction suivi par RPE et est caractérisée par g_1 = 2,009, g_2 = 1,984, g_3 = 1.951. Ils constatent que le signal de l'espèce Rhombique II atteint un maximum puis décroit avec le potentiel. Cela leur permet de calculer deux potentiels pour cette espèce : le premier est celui du couple $E^0(Mo^{VI}/ Mo^V)$ = 160 ± 5 mV et le second $E^0(Mo^V/Mo^{IV})$ = - 330 ± 5 mV. Les structures hyperfines observées uniquement sur le signal de l'espèce Mo^V générée lors de l'ajout de formiate ne sont pas attribués explicitement. Il est probable qu'elles proviennent du couplage hyperfin avec un proton lié au mécanisme catalytique.

L'étude réalisée par Brondino et al.[82] sur la FDH de *Desulfovibrio alaskensis* soulève un point intéressant puisqu'il est montré que cette FDH peut incorporer à la fois du molybdène et du tungstène au niveau du cofacteur. Les métaux tels que le tungstène et le molybdène sont présents à l'état de trace dans le milieu, ajoutés comme contaminants à partir d'autres composés tels que l'extrait de levure. La figure I.25 montre les spectres expérimentaux et leurs simulations à 100 K (a) et à 50 K (b) d'une préparation réduite au dithionite ainsi que la déconvolution en un signal de W^V, un signal de Mo^V et un signal provenant d'un centre FeS.

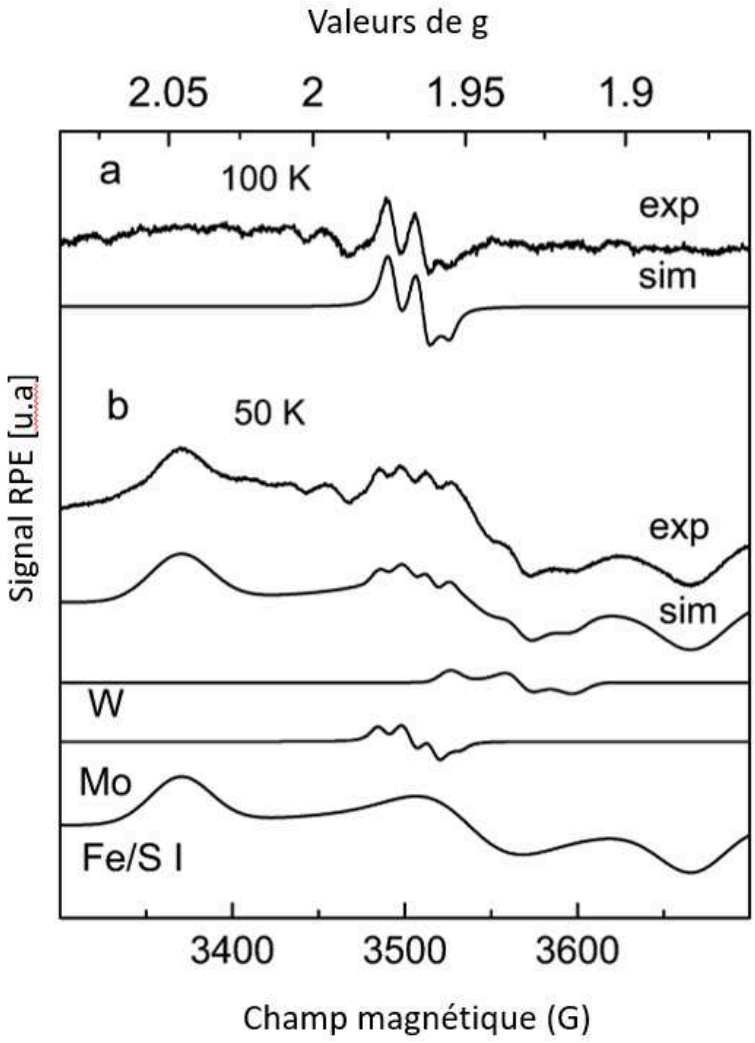


Figure I.25 : Spectres RPE de la FDH de Desulfovibrio alaskensis réduite au dithionite mesurés à 50 K et 100 K avec leurs simulations. Une simulation des signaux associés aux W^V, Mo^V et Fe/S 1 est également représentée. Conditions expérimentales : fréquence micro-onde : 9,65 GHz, puissance micro-onde :2,0 mW (a), 0,6 mW (b), amplitude de modulation : 4 G. *Extrait de Brondino et al.*[82]

Sur la figure I.25, on peut voir qu'à 100 K, seules des signatures centrées autour de g_{av} = 2,0 (g_1 = 1,971, g_2 = 1,968, g_3 = 1.959) sont présentes. Ces signatures sont typiques de celles attendues pour un cofacteur à molybdène. Cette dernière signature est de plus décrite avec un couplage dipolaire caractérisé par un tenseur de valeurs principales $A_{1,2,3}$ = 14 MHz, 16 MHz et 16 MHz et associé à l'interaction de l'ion Mo^V avec le centre Fe/S1. Cependant, à 50 K on observe que des signatures supplémentaires, en plus de celle du centre FeS Fe/S1, sont visibles. Ces signatures dont les valeurs de g sont bien en dessous de 2,0 (g_1 = 1,955, g_2 = 1,933, g_3 = 1.916) sont caractéristiques des cofacteurs à tungstène et sont donc attribuées à la présence d'un ion W^V.

Les signatures RPE d'espèce Mo^V ont également été mises en évidence dans la FDH-H d'*E. coli* par Khangulov et al.[56] et dans la FDH de *C. necator* par Niks et al.[95] Les spectres RPE dans la FDH-H d'*E. coli* sont montrés dans la figure I.26 A. Ils ont été réalisés sur des enzymes enrichies en ^{77}Se, et préparées dans H_2O avec du formiate (figure I.26 Aa trait plein) ou dans D_2O en utilisant du formiate marqué, $DCOO^-$ (figure I.26 Aa pointillés). Les simulations de ces spectres (figure I.26 Ab) sont également montrées. Les spectres RPE dans la FDH de *C. necator* sont montrés dans la figure I.26 B et ont également été générés à partir d'enzymes préparées dans H_2O (en noir) et D_2O (en rouge). Les spectres des espèces Mo^V pour la FDH-H d'*E coli* et la FDH de *C. necator* sont enregistrés respectivement à 130 K et 150 K et les valeurs de g respectives sont $g_1 = 2.094$, $g_2 = 2.001$, $g_3 = 1.990$ et $g_1 = 2.009$, $g_2 = 2.001$, $g_3 = 2{,}000$. Les propriétés de relaxation de ces centres ainsi que leurs valeurs de g sont cohérentes avec ce que l'on attend pour les cofacteurs à Mo-*bis*PGD.

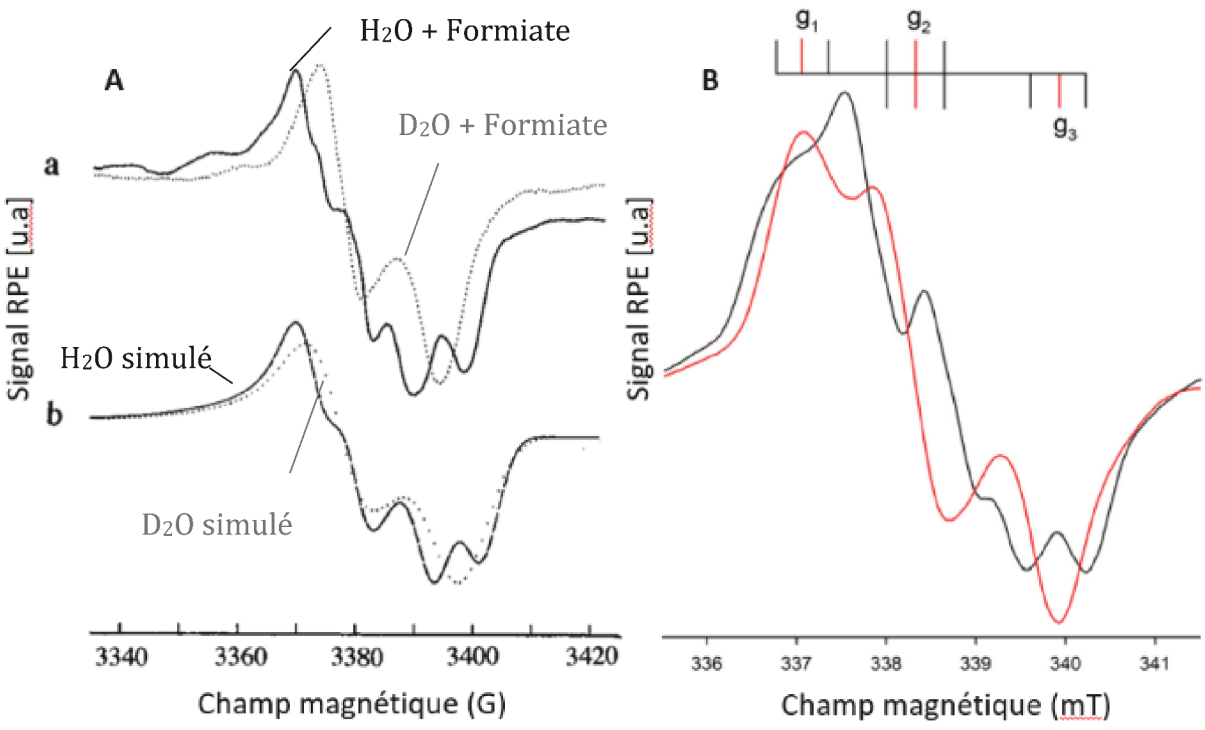


Figure I.26 : Spectres RPE du Mo^V de la FDH-H d'E. coli (A) et de la FDH de C. necator (B). (A) : les spectres RPE expérimentaux sont en (a) et les simulations en (b) avec en noir les spectres de l'échantillon préparé dans H_2O et en gris ceux de l'échantillon préparé dans D_2O. Les paramètres de simulation : [valeur de g (largeur de raie (mT))] : *$g_1 = 2{,}094$, $g_2 = 2{,}001$, $g_3 = 1{,}990$, couplages hyperfins (MHz) : $^{95,97}Mo$ (39,2, 23,6, 23,6), ^{77}Se (4,4, 25,0, 80,1), ^{1}H (2,5, 6,3, 7,0). (B) : échantillon préparé dans H_2O (en noir) et dans D_2O (en rouge). Conditions expérimentales :* puissance micro-onde :4,0, amplitude de modulation : 2 G, échantillon

préparé avec 75 mM de formiate de sodium. *Extrait de Khangulov et al.[56](A). Extrait de Niks et al.[95](B).*

Comme le montre la figure I.26 A, les auteurs détectent un couplage hyperfin entre le Mo^V et un proton (I = $^1/_2$), ($A_{1,2,3}$ ≈ 3 MHz, 6 MHz, 7 MHz). De plus ce proton apparait comme étant échangeable puisqu'en présence de D_2O il s'échange avec du deutérium ce qui se manifeste spectralement par la disparition du couplage hyperfin avec le proton, le moment magnétique nucléaire du ^2H étant 6,5 fois plus faible que celui du ^1H. Les couplages hyperfins avec le deutérium échangé sont ainsi trop faibles pour être résolus. De plus, pour rendre compte des spectres expérimentaux, les auteurs ont introduit dans les simulations des couplages hyperfins entre le Mo^V et le ^{77}Se et entre le Mo^V et des isotopes $^{95,97}Mo$ (I = 5/2 pour les deux). Cette étude montre la complexité des signatures du Mo^V dont l'analyse détaillée nécessite l'utilisation de stratégies d'enrichissement isotopiques.

Pour la FDH de *C. necator*, les auteurs constatent un couplage entre le Mo^V et un proton ($A_{1,2,3}$ ≈ 18 MHz, 21 MHz, 18 MHz). Ce couplage disparait quand l'échantillon est équilibré dans D_2O, montrant qu'il provient d'un proton échangeable. De plus, des expériences réalisées dans H_2O avec du formiate marqué DCOO- ont montré une absence de couplage hyperfin dans des temps courts après l'ajout de formiate (0-20 s) puis une apparition progressive du couplage hyperfin avec un proton dans une gamme de temps entre 20 et 60 s. Ces résultats montrent que le noyau de l'atome d'hydrogène est lié à l'atome du carbone du formiate.

Ce dernier couplage est proposé comme étant le témoin d'une étape du cycle catalytique dans laquelle ce même proton se situerait sur le cofacteur à Mo^V après une réaction de transfert d'hydrure.

III.5 – Mécanismes réactionnels postulés :

Depuis les années 1980 plusieurs mécanismes catalytiques ont été proposés pour les FDHs métal-dépendantes indépendamment de la nature du métal dans leur site actif (Mo ou W). De plus, celle du ligand protéique (SeCys ou Cys) n'est pas censée affecter leur réactivité compte tenu de la similarité des configurations électroniques du soufre ($3s^2\ 3p^4$) et du sélénium ($3d^{10}\ 4s^2\ 4p^4$). Le premier mécanisme proposé par Boyington et al.[27] se basait sur la perte du sixième ligand hydroxyle alors postulé dans la première sphère de coordination du métal, cette perte étant nécessaire pour créer une position vacante permettant la chélation

du formiate par le Mo. Suite à l'affinement de la structure par Raaijmakers et al.[33] montrant que ce sixième ligand hydroxyle devait être en réalité un ligand sulfhydryle (-SH), plusieurs autres mécanismes ont alors été postulés. Parmi ceux-ci, le mécanisme proposé par Raaijmakers et al.[33] prévoit que la sélénocystéine/cystéine se décoordonne et se coordonne au site actif durant la catalyse, en raison de la labilité plus faible du groupement sulfhydryle (-SH) par rapport à celle du groupement hydroxyle (-OH). Ce dernier mécanisme présente alors la spécificité d'inclure un ligand passif, le ligand (-SH). Il a ensuite été proposé par Cerqueira et al.[99], le mécanisme de déplacement du soufre nommé « sulfur shift » suite à des expériences d'EXAFS indiquant une liaison entre un soufre et un sélénium (S-Se) dans la FDH-H d'*E coli*. Ce mécanisme décrit un réarrangement non-trivial du site actif suite à une série de création et de rupture de liaison sélénium-soufre (Se-S) et sélénium-molybdène (Se-Mo) durant la catalyse à partir d'une espèce cyclique inactive formée par le sélénium, le soufre et le molybdène.

Plus récemment, un mécanisme réactionnel basé sur un transfert d'hydrure a été proposé par Niks et al.[95]. En effet, dans l'étude présentée précédemment de la FDH de *C. necator*, l'échange entre le ^{1}H et le ^{2}H montre que cet atome d'hydrogène est labile. De plus, les enzymes étant le résultat d'un long processus d'optimisation au cours de l'évolution, le principe du rasoir d'Ockham conduit les auteurs à postuler un mécanisme où le proton labile présent sur le groupement -SH lié au métal correspond à l'atome d'hydrogène situé sur le carbone du formiate libéré au cours de la réaction. Les autres ligands comme les deux pyranoptérine-guanosine-dinucléotides et la sélénocystéine/cystéine jouent un rôle de stabilisation et de modulation des propriétés structurales et redox du site actif à Mo/W[100]. La figure I.27 représente ce dernier mécanisme adapté de Niks et al.[95].

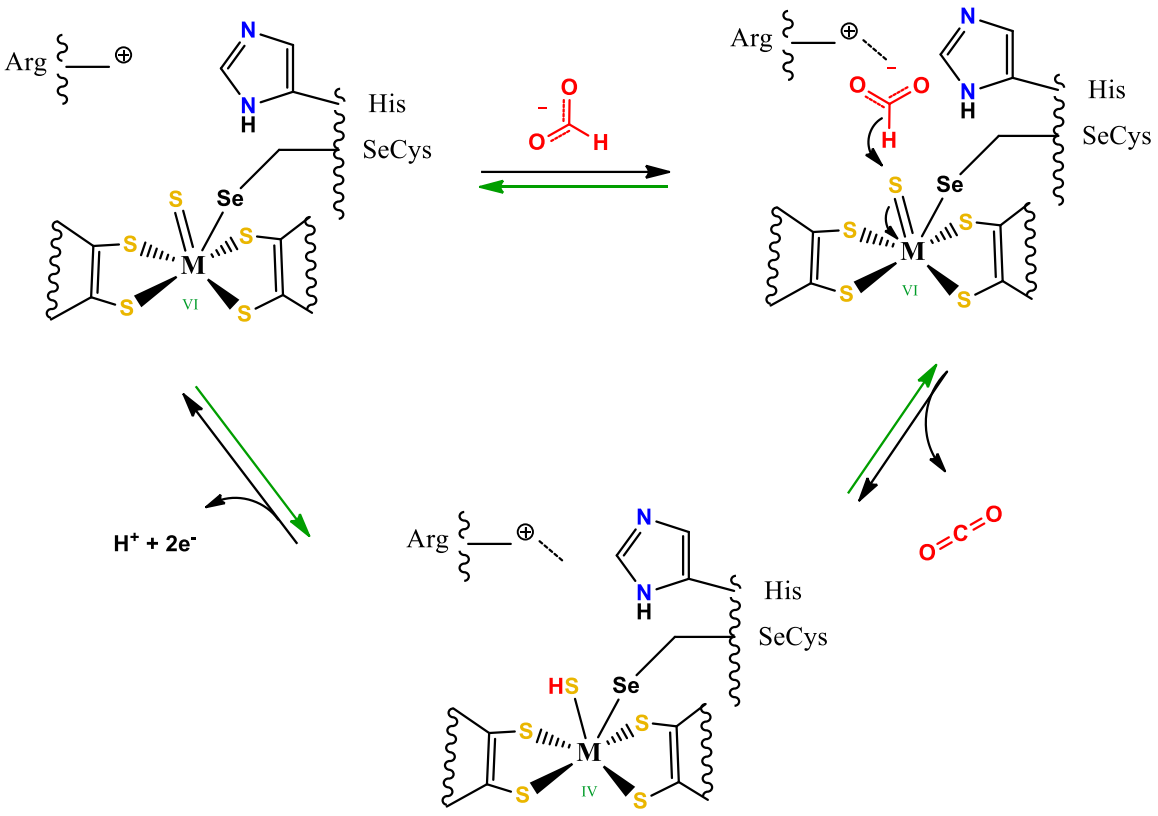


Figure I.27 : Mécanisme réactionnel proposé par Niks et al.[95] pour l'oxydation du formiate par les FDHs métalliques (flèches noires) et pour la réaction de réduction du CO_2 (flèches vertes). En rouge : les atomes provenant du formiate, en jaune : les atomes de soufre de la première sphère de coordination, en bleu : les atomes d'azote. Adapté de Niks et al.[95].

Ce mécanisme assez simple, implique la stabilisation du formiate dans la cavité par un résidu arginine permettant à l'hydrogène lié au carbone du formiate de se positionner à proximité du ligand sulfo (=S). Puis un transfert d'hydrure du formiate sur le soufre a lieu conduisant à la formation du ligand sulfhydryle (-SH). Bien que cette réaction apparaisse énergétiquement défavorable, elle peut être facilitée car la force motrice de cette dernière est la formation et la libération de CO_2, molécule thermodynamiquement très stable.

IV – ForCE 1 et ForCE 2 : deux FDHs de chez *Bacillus subtilis*

Dans le cadre des recherches sur la valorisation du CO_2 par des systèmes biologiques, Rodrigo Arias Cartin alors en stage post doctoral au LCB compara différentes séquences de FDHs « vraies », c'est-à-dire des enzymes démontrées comme étant des FDHs, avec le génome de *Bacillus subtilis* 168. Des recherches effectuées par Glaser et al.[101] ont montré une activité formiate oxydoréductase en aérobie chez *B. subtilis*. Des expériences ultérieures menées par

Rodrigo ont également montré une activité formiate oxydoréductase dans des cultures en aérobie faites en milieu riche. Ces résultats ont donc conduit à l'isolement de deux gènes *YjgCD* et *YrhED*, codant pour deux enzymes nommées respectivement *ForCE 1* et *ForCE 2*.

IV.1 – *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis est une bactérie gram positive présente au niveau du sol et est l'un des organismes modèles les mieux caractérisés en recherche fondamentale et appliquée[102]. C'est une bactérie non pathogène aérobie/anaérobie facultative qui possède deux modes de croissance anaérobie connus : la fermentation et la respiration du nitrate et du nitrite[103–110]. Quelques études, comme celle menée par Glaser et al.[101] se sont intéressées au métabolisme du formiate chez *B. subtilis*. Ils ont étudié les gènes requis pour l'assimilation du nitrate et la croissance anaérobies et ont trouvé une activité formiate déshydrogénase. Ils ont alors testé l'influence de *narQ* et de *narA*, deux gènes impliqués dans l'assimilation du nitrate chez *B. subtilis*, dans cette activité. Dans la souche wild type (*narQ*, *narA*) et en présence de 2 µM de formiate et sélénite de sodium, une activité formiate déshydrogénase phénazine méthanosulfate-dépendante significative a été détectée (48 u. (u = nmol de DCPIP (dichlorophénolindophénol) réduit/mg de protéine/min)). Le mutant *ΔnarQ* montre une activité formiate déshydrogénase bien plus faible (1,9 u). De plus, le mutant *ΔnarA* ne présente aucune activité détectable. *NarA* encoderait une protéine de 341 acides aminés ayant 32% d'identité de séquence avec *MoaA*, impliquée dans la biosynthèse du cofacteur à molybdène. Ceci suggère ainsi que la FDH de *B. subtilis* est une enzyme possédant un cofacteur à molybdène. D'après les études de mutagénèses menées dans cette étude, il apparait que *narA* et *narQ* sont indispensables pour une activité formiate déshydrogénase chez *B. subtilis*.

IV.2 – Généralité sur ForCE 1 et ForCE 2

ForCE est l'acronyme pour Formiate-Oxydo-Réductase, C (pour Catalytic) et E (pour Essential) correspondent aux sous-unités composant le complexe enzymatique. Les gènes *ForCE 1* et *forCE 2* sont organisés en opéron. De plus le gène codant pour *forC 1* (2958 paires de base) est situé en amont du gène codant pour *forE 1* (561 paires de base). De manière analogue pour *forCE 2,* on a *forC 2* (2943 paires de base) situé en amont de *forE 2* (483 paires de base) [111–113].

IV.2.1 – Différences d'expression entre *forCE 1* et *forCE 2*

Les niveaux de transcription des gènes *forC 1, forE 1, forC 2* et *forE 2* ainsi que *Sig B* et *S1031*, promoteurs respectifs des gènes *forC 1, forE 1* et *forC 2, forE 2* ont été déterminés dans plusieurs conditions dans les figures I.28 et I.29[113].

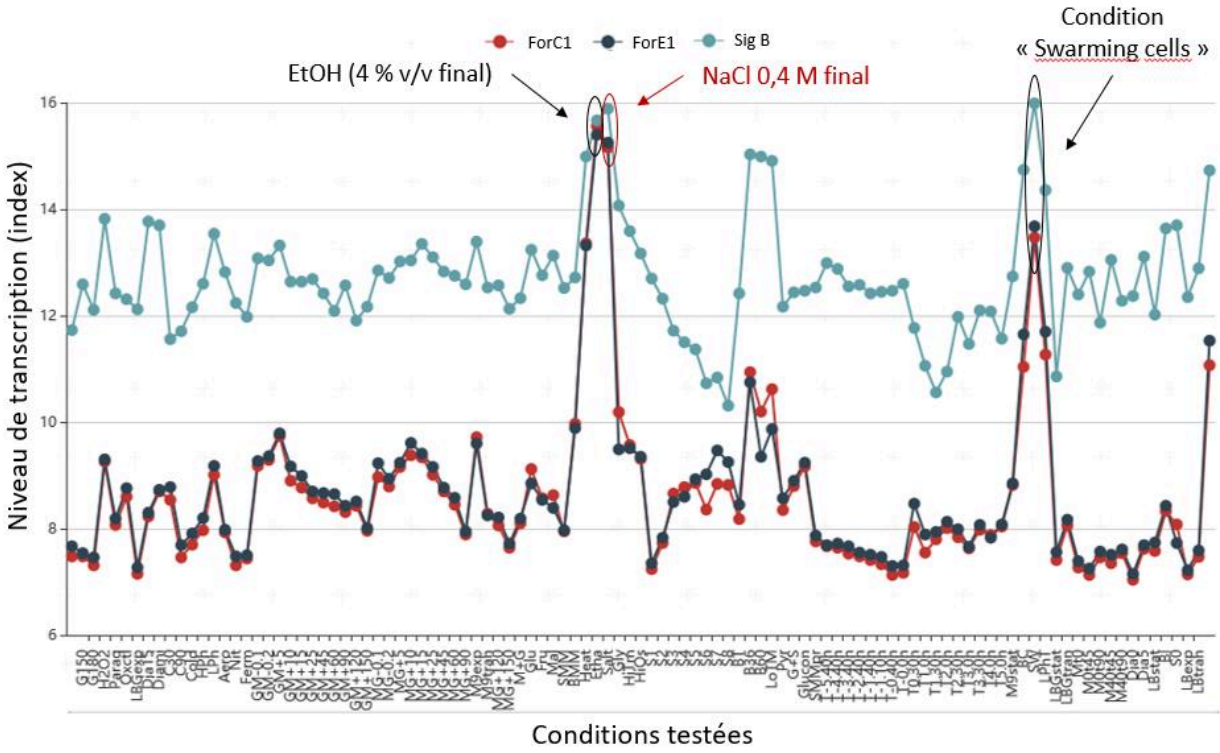


Figure I.28 : Niveaux de transcription de forC 1, forE 1 et Sig B en fonction de différentes conditions. Généré depuis la base de donnée Subtiwiki d'après l'étude de Nicolas et al.[113]

Parmi celles-ci (Figure I.28), les gènes de *forC 1* et *forE 1* sont transcrits de manière importante en conditions de stress salin (0,4 M NaCl) ou en présence d'éthanol (4% v/v). Un autre pic correspondant à la condition dite « swarming cells » associée à des conditions de culture sur boites de pétri apparait comme augmentant le niveau d'expression de *forCE 1*. Dans cette condition, des cellules en phase de croissance exponentielle ont été déposées sur un milieu LB contenant 1% d'agar, incubées à 37°C et ont été récoltées après 16h. Cette dernière condition n'est cependant pas pertinente dans l'étude menée dans cette thèse. De plus, ces mêmes conditions conduisent à la surexpression de Sig B, démontrant que l'expression de ForCE 1 est sous le contrôle du promoteur Sig B, promoteur impliqué dans la réponse au stress.

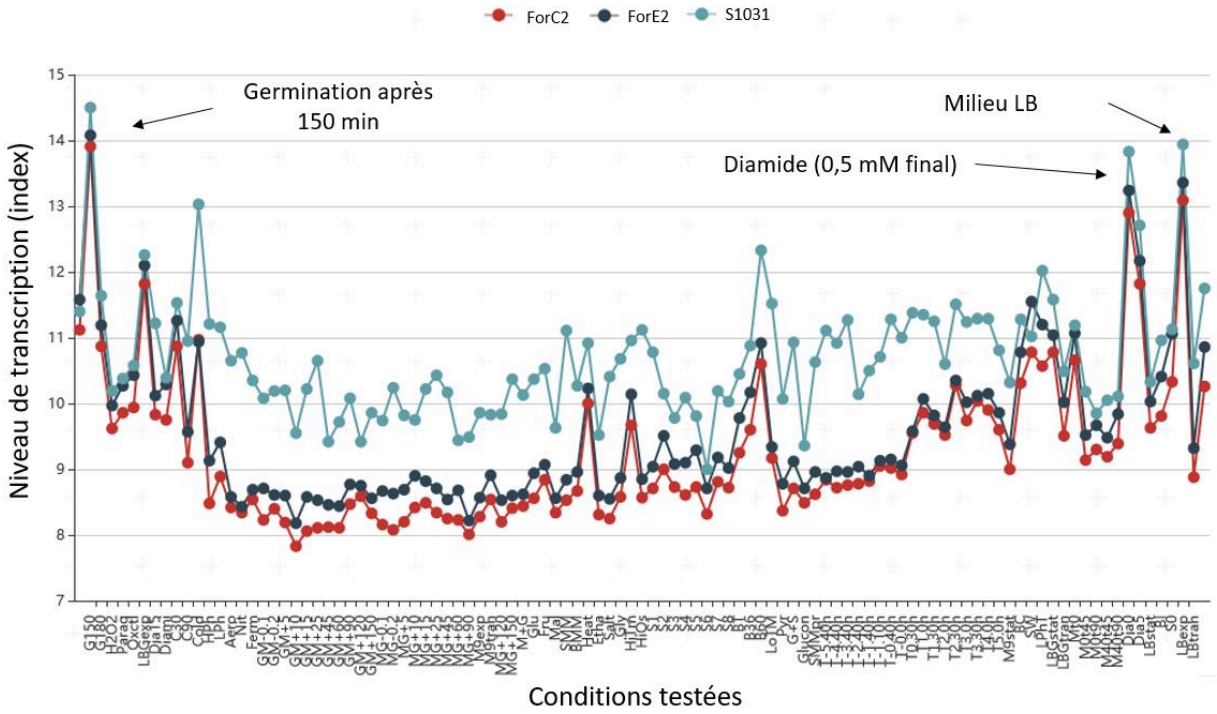


Figure I.29 : Graphique représentant les niveaux de transcription de forC 2, forE 2 et S1031 en fonction de différentes conditions. Généré depuis la base de donnée Subtiwiki depuis l'étude de Nicolas et al.[113]

Les mêmes analyses conduites sur *forC 2* et *forE 2* montrent un profil différent de celles conduites sur *forCE 1*. Le niveau de transcrit pour *forCE 2* ne présente plus les maxima pour les conditions salines et l'éthanol. En revanche elles présentent trois maxima : un correspondant à un test après germination, un autre à la suite de l'ajout de diamide. Enfin le troisième correspond à un maximum obtenu quand les cellules se trouvent en condition de croissance exponentielle en milieu LB (Luria-Bertani). La figure I.30 montre la structure en opéron des gènes codant pour ForCE 1 et ForCE 2 ainsi que les deux promoteurs identifiés précédemment.

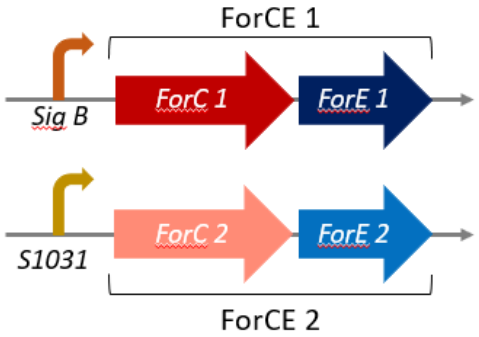


Figure I.30 : Structure opéronique des gènes de forCE 1 et forCE 2 et des promoteurs Sig B et S1031.

Des études ont été menées au sein de l'équipe d'Axel Magalon pour évaluer l'influence de l'ajout de formiate sur le taux de transcrit de *forC 2, forE 2, forC 1*, et *yrhG* qui est une protéine identifiée chez *Bacillus subtilis* comme analogue à un transporteur de formiate (figure I.31).

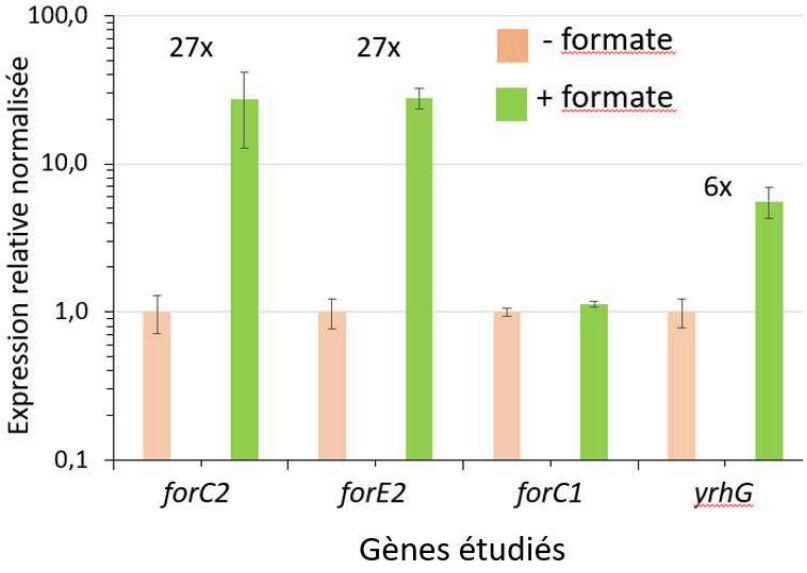


Figure I.31 : Etude du taux de transcription des gènes de ForC 2, ForE 2, ForC 1, et yrhG après ajout de formiate.

En présence de formiate, le niveau de transcription de *forCE 2* est multiplié par un facteur 27, alors que celui de *forC 1* n'est pas affecté et celui de *yrhG* est multiplié par un facteur 6. Ceci suggère l'existence d'un promoteur inductible au formiate en amont de *forCE 2*. Un examen plus attentif de la séquence montre un gène présent en amont de *forCE 2*, *S1031* et prédit pour être transcrit en ARN non codant. Il est raisonnable de penser que *S1031* est le promoteur inductible au formiate, jouant le rôle de régulateur de la transcription de *forCE 2* par un mécanisme de type riboswitch, permettant la transcription en présence de formiate.

IV.2.2 – Etudes préliminaires de ForCE 1 et ForCE 2

La prédiction à partir de la séquence et la vérification sur gel donnent respectivement des poids moléculaires pour ForCE 1 et ForCE 2 de 131 kDa (985 acides aminés) et 127 kDa (980 acides aminés). Toutefois, il est important de préciser que la prédiction des poids moléculaires à partir de la séquence ne prend pas en compte les cofacteurs (centres FeS, cofacteur à molybdène, …). Les analyses de séquences montrent que les sous-unités ForC de poids

moléculaire 110 kDa comportent dans le domaine C-terminal le motif caractéristique pour la coordination d'un cofacteur à Molybdène/Tungstène et d'un centre 4Fe4S. De plus la partie N-terminale comporte des motifs de coordination pour quatre autres centres : trois centres 4Fe4S et un centre 2Fe2S. La figure I.32 permet la comparaison de certaines des FDHs présentées précédemment avec celles de *B. subtilis*.

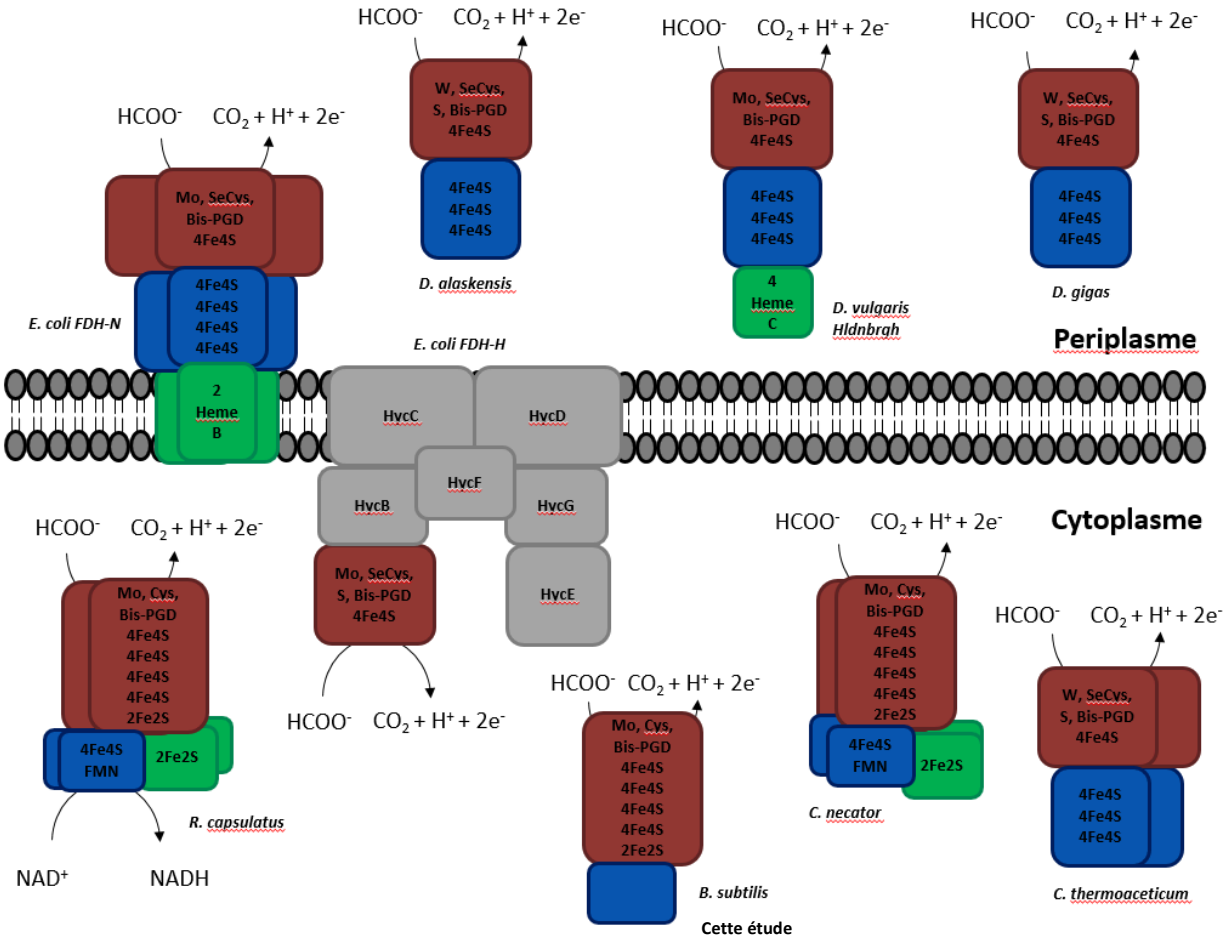


Figure I.32 : Schéma illustrant les sous-unités et leur contenu en centres métalliques composant les formiate déshydrogénases présentées dans cette introduction.

On constate que ForCE 1 et ForCE 2 présentent une grande sous-unité possédant les 5 centres FeS et le cofacteur à molybdène, la sous-unité catalytique. Néanmoins, comparées aux FDHs présentées dans cette introduction, elles sont uniques du point de vue structural ainsi que du point de vue de la composition de ses sous-unités partenaires. En effet, les sous-unités ForE 1 et ForE 2 de poids moléculaires respectifs 21 kDa (186 acides aminés) et 17 kDa (160 acides aminés) ne sont pas prédites pour contenir des centres métalliques d'après l'analyse de séquence. Elles n'en sont pas moins essentielles à l'activité du complexe puisque la délétion de ForE 1 entraine une chute d'un facteur 50 de l'activité enzymatique de ForC 1. L'alignement

de séquences montre également une identité entre ForC 1 et ForC 2 de 61 % et 75 % d'homologie. La même analyse entre ForE 1 et ForE 2 montre une identité de séquence de 20 % et une homologie de 43 %.

IV.2.3 – Non-conservation de la position de l'arginine et de l'histidine par rapport au consensus :

Comme évoqué précédemment, l'arginine et l'histidine présentes au niveau de la seconde sphère de coordination sont conservées parmi les FDHs. La figure I.33 montre les premières et secondes sphères de coordination du métal (Mo) dans les ForCEs (A) et des FDHs de chez *Rhodobacter capsulatus* (B), *Desulfovibrio vulgaris* (C) et la sous-unité CO_2-réductase de la formyle méthanofurane (Formyl-MFR) de chez *Methanobacter wolfeii* (D).

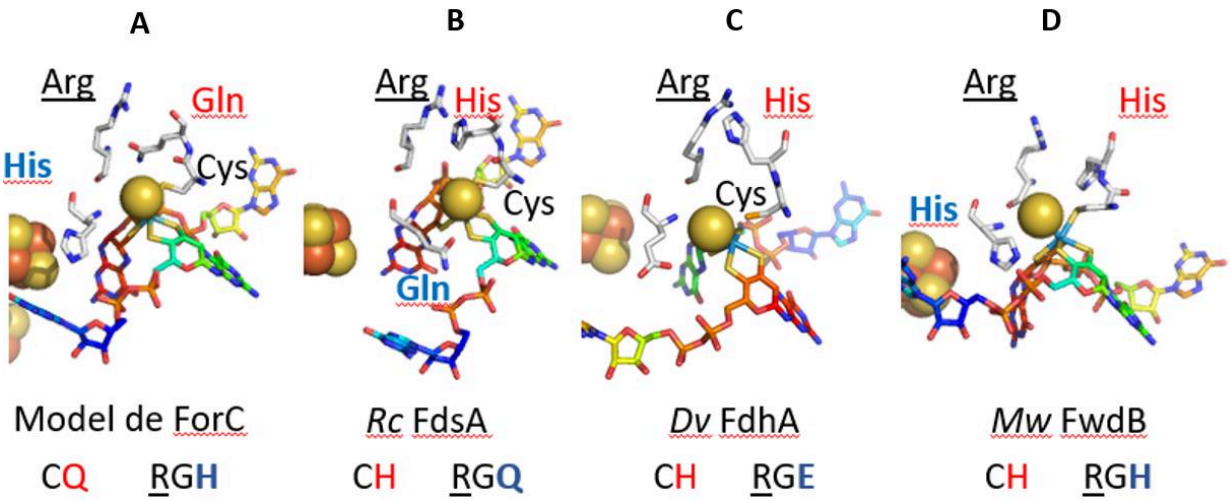


Figure I.33 : Comparaison de la deuxième sphère de coordination entre plusieurs FDHs de chez Rc : Rhodobacter capsulatus, Dv : Desulfovibrio vulgaris et la sous-unité CO2-réductase de la formyle méthanofurane (Formyl-MFR) de chez Mw (Methanobacter wolfeii).

Le résidu histidine montré dans les structures présentées en figure I.32, est remplacé par une glutamine dans les ForCEs. De plus, on constate une inversion de la glutamine et de l'histidine chez ces dernières, par rapport à ce que l'on observe chez la FDH de *Rhodobacter capsulatus.* La figure I.33 met ainsi en évidence une configuration non canonique du site actif chez les ForCEs et interroge ainsi sur leurs activités formiate/CO_2 oxydoréductase.

Dans les études qui vont être développées dans les chapitres suivants, je me suis intéressé à la caractérisation par résonance paramagnétique électronique (RPE) en ondes continues (CW) et par impulsion des deux formiate déshydrogénases ForCE 1 er ForCE 2 présentes chez *Bacillus subtilis*. Ces enzymes étant des systèmes complexes composées de plusieurs cofacteurs, je vais détailler les résultats obtenus concernant leurs caractérisations spectroscopique et redox en commençant par les travaux menés sur les centres FeS (chapitre III). Je présenterai ensuite les résultats obtenus sur le cofacteur à molybdène (Moco) (chapitre IV) et ceux sur le radical quinonique mis en évidence (chapitre V). Enfin je terminerai par la présentation des résultats concernant les études enzymologiques (chapitre VI).

Chapitre II

Matériels et Méthodes

Table des matières

I - Souches, cultures et purification 56
I.1 – Souches utilisées 56
I.2 – Culture des ForCEs 56
I.2.1 - Purification de ForCEs 57
I.1.2 – Tests d'activité et étude cinétique 57
II – Les titrages 58
II.1 – Calibrations des électrodes 58
II.2 – L'équation de Nernst 60
II.3 – Titrages par RPE, leurs analyses et tracer des courbes : 61
II.3.1 - Cas des centres avec une forme réduite paramagnétique : 62
II.3.2 - Cas des centres avec une forme oxydée paramagnétique : 63
II.3.3 - Cas des centres avec une forme intermédiaire paramagnétique : 63
II.4 - Détermination de la dépendance en pH du potentiel : 66
II.5 - Etude de la stabilité des espèces possédant un intermédiaire paramagnétique et calcul du taux d'occupation : 68
III - Mesure de l'activité formiate : ménadione/formiate oxydoréductase : 73
III.1 - Définition et détermination du Kcat : 74
III.2 - Equation de Michaelis Menten et définition du K_M : 74
IV - Principe théorique de la Résonance Paramagnétique Electronique (RPE) 77
IV.1 - Cas d'un électron libre 77
IV.2 - Principe de la RPE en onde continue 78
IV.4 - Interaction Zeeman électronique 80
IV.5 - Interaction Zeeman Nucléaire 82
IV.6 – Interaction hyperfine 83
IV.7 - Interaction Quadripolaire Nucléaire : 86
IV.8 - Spectromètre RPE en onde continue 88
IV.8.1 - Paramètres expérimentaux pertinents : 90
IV.8.3 - Relaxation, température et puissance micro-onde : 91
IV.9 - Analyse des spectres RPE 93
IV.9.1 Position de la raie de résonance 93
IV.9.2 - Largeur de la raie 94
IV.9.3 - Intensité du signal RPE et quantification 95

IV.10 - Simulation des spectres 96
V - Spectroscopie RPE Impulsionnelle 96
V.1 - Principes 97
V.2 - Génération d'un écho de spin 97
V.3 - ESEEM à deux impulsions 98
V.3.1 - Echo de spin à deux impulsions 98
V.3.2 – Le modèle du système couplé (S = 12, I = 12) 100
V.3.3 – Effet ESEEM 101
V.4 - ESEEM à trois impulsions : 103
V.5 - Spectroscopie HYSCORE 106
V.5.1 - Les cohérences électroniques et nucléaires 106
V.5.2 – Spectroscopie HYSCORE : 107
V.5.3 - Analyse des spectres HYSCORE 111
V.5.3.1 - Cas des système S = ½, I = ½ 111
V.5.3.2 - Cas d'un système S = ½ et I = 1 : 113
V.5.3.3 - Condition de compensation : 114
V.6 - Enregistrement et traitement des spectres expérimentaux 115
V.6.1 - Paramètres expérimentaux 116
V.6.2 - Traitement du signal : 117
VI - Etude RPE multifréquence 118
VII - Etude des centres de spin S =3/2 119

I - Souches, cultures et purification

I.1 – Souches utilisées

Le tableau suivant récapitule les souches utilisées pour les études menées dans cette thèse, leur génotype ainsi que le nom de la personne créatrice de la souche.

Souches	Génotype	Référence
4088	*Bacillus subtilis* 168 trpC2 amyE::pSHP1-6hisyjgCD	Rodrigo Arias Cartin
4233	*Bacillus subtilis* 168 trpC2 ΔyjgD::ery amyE::pSHP2- yjgC8his	Rodrigo Arias Cartin
4230	*Bacillus subtilis* 168 trpC2 ΔresE::ery ΔyjgC::kan amyE::pSHP1-6hisyrhED	Rodrigo Arias Cartin

Tableau II.1 : Tableau récapitulatif des souches utilisées dans le cadre de cette thèse.

Les souches sont transformées avec des plasmides qui codent pour les protéines ForCE 1, ForC 1 et ForCE 2 étiquetée avec un tag contenant plusieurs histidines, 6-Histidines pour ForCE 1 et ForCE 2, et 8-histidines pour ForC 1.

I.2 – Culture des ForCEs

Les souches de *Bacillus subtilis* (*trpC2*) utilisées sont décrites dans le tableau 1. L'intégration génomique des séquences d'intérêt a été faite en utilisant les plasmides pSPH1/pSPH2 (obtenus par Dr. Henrik Strahl von Schulten) par transformation au niveau du locus *amyE*. L'intégration du plasmide a été confirmée par des tests de sensibilité à l'amylase. L'inactivation chromosomique des gènes cibles a été faite par transformation de l'ADN génomique (gADN) depuis des souches modifiées (source BGSC). Les clones ont été controlés par PCR. Pour la culture, les cellules ont été préparées en milieu LB (Tryptone : 10 g/L, Extrait de levure : 5 g/L, NaCl : 5 g/L). Si nécessaire, des antibiotiques ont été utilisés à différentes concentrations : Spectinomycine (100 µg/mL), kanamycine (µg/mL) et de l'érythromycine (1,25 µg/mL). Pour la surexpression des protéines recombinantes ForCE 1, ForC 1 et ForCE 2, les différentes souches de *B. subtilis* ont été cultivées dans 4,8 L de milieu LB, avec 2 µM de

molybdate de sodium à 37°C jusqu'à DO = 0,3. Les cellules ont ensuite été soumises à un choc salin (0,4 M NaCl) pendant 30 min suivi d'une induction avec 0,8 % volume de xylose pendant 3 heures pour ForCE 1 et ForC 1 et pendant la nuit pour ForCE 2 à 37°C. Les cellules récoltées sont ensuite lavées une fois dans un tampon à pH = 7,5 (20 mM phosphate de sodium NaH_2PO_4/ Na_2HPO_4, 50 mM Na_2SO_4). Les cellules ont été conservées à – 80°C.

I.2.1 - Purification de ForCEs

Toutes les étapes ont été faites à 4°C avec un système Akta FPLC (GE Healthcare). Les cellules sont remises en suspension dans du tampon A (20 mM de Na_2HPO_4, 20 mM de NaH_2PO_4 pH = 7,5, 50 mM de Na_2SO_4), traitées au lysozyme à 1 $mg.mL^{-1}$ pendant 30 min à 37°C, et enfin cassées à la presse de French après l'addition d'un cocktail d'anti-protéases. Le lysat est clarifié par une centrifugation à basse vitesse (40 min à 70 000 g à 4°C), puis 50mM d'imidazole sont ajoutés. L'extrait brut (charge) est chargé sur une colonne de nickel (HisTrap HP 5 mL columns, GE healthcare) et la purification de la protéine étiquetée 6His est réalisée par FPLC à 4°C. Le non-retenu est collecté et la colonne est lavée avec du tampon A supplémenté de 50 mM d'imidazole puis la protéine d'intérêt est éluée avec du tampon B (20 mM de Na_2HPO_4, 20 mM de NaH_2PO_4 pH = 7,5, 50 mM de Na_2SO_4 et 500 mM d'imidazole). L'éluât est dialysé dans du tampon D2 (50 mM de MES pH = 6,0, 50 mM de Na_2SO_4, 5 % de glycérol) grâce à une colonne de dessalage (PD-10 Desalting Columns, GE healthcare). Celui-ci ci est finalement concentré par centrifugation à l'aide d'Amicon ultra (cutoff 100 kDa) et conservé à - 80°C. L'ensemble des fractions représentatives de la purification (charge, non-retenu, éluât et éluât concentré) est déposé sur un gel de polyacrylamide 12 %, en conditions dénaturantes. Après électrophorèse, la révélation des protéines est réalisée par coloration au bleu de Coomassie. La concentration en protéines est déterminée par la méthode de Lowry. Les échantillons sont conservés -80°C.

I.1.2 – Tests d'activité et étude cinétique

Les activités formiate déshydrogénases ont été déterminées en chambre anaérobique (100 % N_2) avec un spectrophotomètre Avaspec-5048L à température ambiante sous agitation. Pour les activités formiate : BV (Benzyl Viologène) oxydoréductases, la réduction du BV a été observée à 600 nm ($\varepsilon_{600\,nm}(BV^+)$ = 7,0945 $mM^{-1}.cm^{-1}$) avec 1,75 mM BV dans 25 mM de tampon

CHES pH = 8,6 pour ForCE 2 et avec 17,5 mM BV dans 25 mM de tampon CHES pH = 10 pour ForCE 1 et ForC 1 supplémenté avec 50 mM de formiate de sodium à température ambiante. Une unité d'activité est définie comme étant la quantité de FDH nécessaire pour l'oxydation de 1 µmol de formiate par minute et par mg d'enzyme. Les études de cinétique ont été faites pour des concentrations en substrat allant de 0,5 µM à 150 mM de formiate de sodium.

Pour les activités formiate : ménadione oxydoréductases la réduction de 60 µM de ménadione a été suivie à 260 nm ($\varepsilon_{260\,nm}$ (ménadione) = 17,2 $mM^{-1}.cm^{-1}$) dans 25 mM de tampon CHES pH = 9,0 avec 50 mM de formiate de sodium à température ambiante. Une unité d'activité est définie comme la quantité de FDH nécessaire pour la réduction de 1 µmol de ménadione par minute et par mg d'enzyme. Les études cinétiques ont été faites pour des concentrations en substrat allant de 0,5 µM à 200 µM de ménadione. Les paramètres cinétiques ont été calculés par ajustement des point expérimentaux avec une équation de Michaelis-Menten $y = \frac{(V_{max}.S)}{K_M + S}$ en utilisant Origin pro. L'influence du pH sur les activités formiate déshydrogénases a été étudiée en utilisant un tampon mixte contenant 20 mM de MES, CHAPS, CHES, HEPES à température ambiante. Le pH a été ajusté avec HCl et NaOH toutes les 0,5 unité pH dans la gamme [6,5 ; 11,0].

II – Les titrages

L'étude des espèces paramagnétiques présentes dans ForCE 1, que ce soit pour la détermination de leurs potentiels ou leur stabilisation en condition d'équilibre thermodynamique en anaérobie et à température ambiante à un certain potentiel a été réalisée par des titrages redox. Le potentiel d'oxydo-réduction est alors ajusté avec des solutions d'oxydant ou de réducteur. Ainsi l'ajout de dithionite de sodium (hydrosulfite de sodium) permet de réduire l'échantillon et ainsi de diminuer son potentiel alors que l'ajout de ferricyanure de potassium permet quant à lui d'oxyder l'échantillon et donc d'augmenter son potentiel.

II.1 – Calibrations des électrodes

Le potentiel est mesuré en utilisant une microélectrode combinée Pt-Ag/AgCl/KCl (3M) provenant de chez Microelectrodes, Inc.

Pour les mesures à l'aide de cette microélectrode les potentiels sont donnés par rapport à l'Electrode Standard à Hydrogène (ESH). Deux corrections sont à distinguer :

- La correction du potentiel de l'électrode Pt-Ag/AgCl/KCl (mesure du potentiel de l'électrode de travail).
- La correction par rapport à l'ESH (Electrode Standard à Hydrogène)

Ces corrections sont également ajustées en fonction de la température.

La première est donc la correction Pt-Ag/AgCl/KCl (3 M) par rapport à un standard. A 20°C, température de travail, ce standard a un potentiel noté $E^0_{Théo}$ qui vaut $228\ \mathrm{mV\ Vs\ Pt-Ag/AgCl/KCl}$. Le potentiel affiché noté E^0_{Exp} est dans la très grande majorité des cas plus élevé que le potentiel théorique. On a donc $E^0_{Théo} < E^0_{Exp}$et ainsi la première correction est égale à la différence $\Delta E_{\mathrm{Pt-Ag/AgCl/KCl}} = E^0_{Exp} - E^0_{Théo}$.

La seconde correction est celle par rapport à l'Electrode Standard à Hydrogène (ESH). A 20°C la correction à appliquer au potentiel est de 210 mV Vs H^+/H_2 (ESH).

La correction totale à appliquer ainsi sur les potentiels lus au cours du titrage est de $210 - \Delta E_{\mathrm{Pt-Ag/AgCl/KCl}}$.

Cette procédure de correction de potentiel est effectuée avant chaque titrage ou préparation d'échantillon à un certain potentiel. Tous les potentiels donnés dans cette thèse le sont par rapport à l'Electrode Standard à Hydrogène (ESH).

Les titrages ont été effectués en présence des dix médiateurs suivants, préparés chacun à une concentration de 10 µM finale suffisamment faible pour que les médiateurs ne contribuent pas de manière significative à l'amplitudes des signaux RPE. Les médiateurs sont choisis pour couvrir la plage de potentiel balayée durant le titrage. Ils sont les suivants :

- Phénazine méthosulfate (PMS), $E^0 = +80\ mV$
- Phénazine éthosulfate (PES), $E^0 = +50\ \mathrm{mV}$
- Bleu de méthylène, $E^0 = +11\ \mathrm{mV}$

- Résorufine, $E^0 = -51\ mV$
- Indigo carmin, $E^0 = -125\ mV$
- Anthraquinone 2,6-disulfonate, $E^0 = -184\ mV$
- Flavine mononucléotide (FMN), $E^0 = -219\ mV$
- Phénosafranine, $E^0 = -252\ mV$
- Rouge neutre, $E^0 = -325\ mV$
- Méthyl viologène (MV), $E^0 = -440\ mV$

A la solution de protéines et de médiateurs sont ajoutés soit un réducteur ($Na_2S_2O_4$) ou un oxydant ($FeCN_6$) progressivement, en petite quantité. Le potentiel de la solution est alors mesuré avec les électrodes calibrées précédemment.

II.2 – L'équation de Nernst

L'équation de Nernst permet de lier, pour un couple Ox/Red donné, le potentiel électrochimique $E_{Ox/Red}$ à la quantité des deux espèces Ox et Red en équilibre. Pour la demi-équation $\mathrm{Ox} + ne^- \leftrightarrows \mathrm{Red}$, elle s'écrit :

$$E_{Ox/Red} = E^0_{Ox/Red} + \frac{RT}{nF}\ln\left(\frac{[Ox]}{[Red]}\right) \qquad (Eq.\ 1)$$

Avec $E^0_{Ox/Red}$ le potentiel standard du couple considéré exprimé en V, R = 8.314 J.mol^{-1}.K^{-1} et F = 96485,33 C.mol^{-1} pour respectivement les constantes des gaz parfaits et de Faraday, n le nombre d'électrons échangés au cours de la réaction et T la température en K.

$$E_{Ox/Red} = E^0_{Ox/Red} + \frac{0{,}06}{n}\log\left(\frac{[Ox]}{[Red]}\right) \qquad (Eq.\ 2)$$

Avec $\begin{cases} \log X = \frac{\ln(X)}{\ln(10)} \\ \frac{RT\ln(10)}{F} \approx 0{,}060\ V \end{cases}$

II.3 – Titrages par RPE, leurs analyses et tracés des courbes :

L'analyse des titrages nous permet d'obtenir, depuis un set de spectres RPE expérimentaux, les valeurs des potentiels standards des différentes espèces titrées. Pour ce faire il faut dans un premier temps mesurer les amplitudes RPE en une valeur de g (ou possiblement plusieurs dans le cas d'un spectre anisotrope). Il faut ensuite ajuster les points expérimentaux avec une

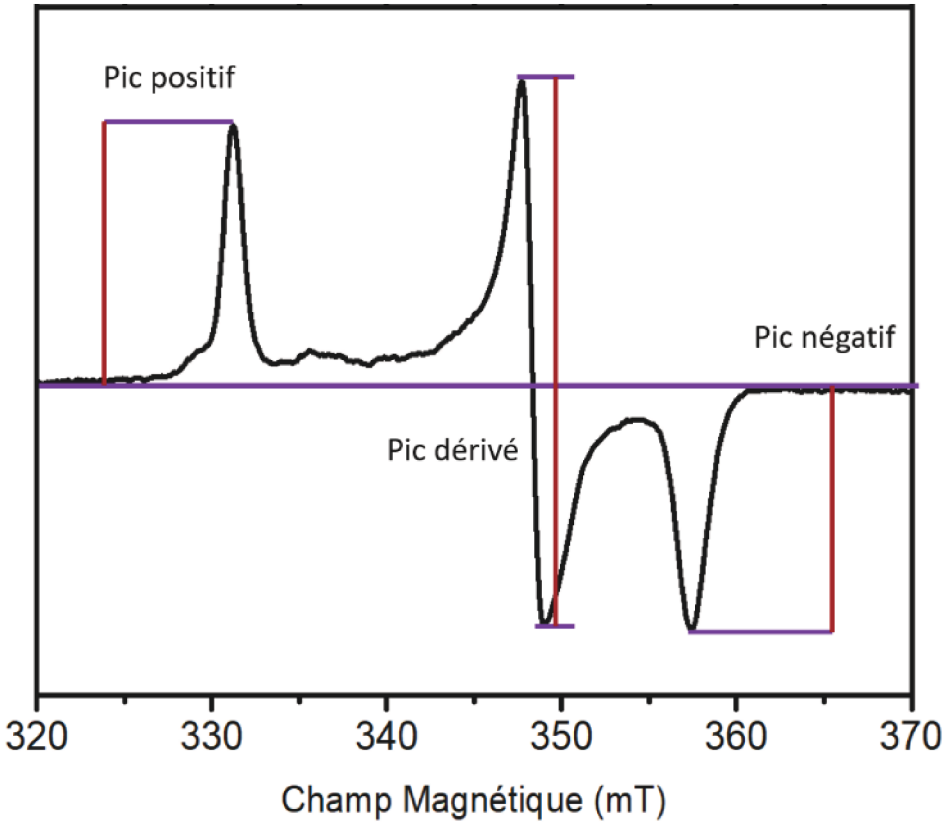


Figure II.1 : Illustration des différentes possibilités de relever d'amplitudes sur un spectre RPE. Spectre choisis pour l'exemple : centre C2, température 30K, puissance 10mW, amplitude de modulation 10G, accumulation n=1, gain 60db, sampling time = time constant = 81ms, fréquence de modulation 100kHz, fréquence micro-onde 9.4791 GHz.

loi de Nernst qui donnera accès aux potentiels standards. Les amplitudes relevées sont des amplitudes pic-à-pic quand il s'agit d'un signal isotrope. Pour les systèmes anisotropes ayant des pics positifs et/ou négatifs, les relevées d'amplitudes se font respectivement du maximum ou minimum à la ligne de base. Il est intéressant de faire ces relevés dans le cas d'un signal anisotrope pour comparer les résultats obtenus aux différentes valeurs de g. Néanmoins, le relevé pic-à-pic est avantageux car il nous permet de nous affranchir des problèmes de ligne de base (figure II.1).

On se rend compte, lors du tracé des courbes de titrage que trois comportements redox sont à prendre en compte :

- Un centre qui subit une transition redox à 1 e^- avec une forme réduite visible en RPE
- Un centre qui subit une transition redox à 1 e^- avec une forme oxydée visible en RPE
- Un centre qui subit deux transitions redox successives à 1 e^- avec une forme intermédiaire (mono-réduite) visible en RPE

Le paramètre à optimiser dans l'équation de Nernst lors du fit des courbes est le potentiel standard de l'espèce considérée noté E^0.

II.3.1 - Cas des centres avec une forme réduite active en RPE :

Le premier cas est celui attendu lors d'une réduction mono-électronique classique. Typiquement ce que l'on attendrait pour la réduction d'un centre [4Fe4S] ou [2Fe2S] puisque c'est la forme mono-réduite de ces centres qui est visible en RPE, respectivement $[4Fe4S]^+$ et $[2Fe2S]^+$. Nous avons ainsi la réaction suivante : $[FeS]_{Ox} + e^- \rightarrow [FeS]_{Red}$

L'équation de Nernst pour cette réaction s'écrit alors :

$$E_1 = E_1^0 + 0{,}06\log\left(\frac{[(\mathrm{FeS})_{Ox}]}{[(\mathrm{FeS})_{Red}]}\right) \qquad (Eq.\ 3)$$

La loi de conservation de la matière nous permet d'écrire $[FeS]_{Ox} + [FeS]_{Red} = [FeS]_{Tot}$. En renormalisant à 1 on a : $[FeS]_{Ox} + [FeS]_{Red} = 1$.

On a alors $[FeS]_{Red} = 1 - [FeS]_{Ox}$, et ainsi

$$E_1 = E_1^0 + 0{,}06\log\left(\frac{[1 - (\mathrm{FeS})_{Red}]}{[(\mathrm{FeS})_{Red}]}\right) \qquad (Eq.\ 4)$$

$$\Rightarrow 10^{\frac{E_1 - E_1^0}{0{,}06}} = \frac{[1 - (\mathrm{FeS})_{Red}]}{[(\mathrm{FeS})_{Red}]}$$

$$\Rightarrow [(\mathrm{FeS})_{Red}]\ 10^{\frac{E_1 - E_1^0}{0{,}06}} + [(\mathrm{FeS})_{Red}] = 1$$

$$\Rightarrow [(\mathrm{FeS})_{Red}] = \frac{1}{1 + 10^{\frac{E_1 - E_1^0}{0,06}}}$$

Sachant que $[(\mathrm{FeS})_{Red}]$ est proportionnelle à l'amplitude RPE, on a alors le potentiel de l'espèce en fonction du potentiel redox ambiant :

$$A_{(\mathrm{FeS})_{Red}} = \frac{A_{max}}{1 + 10^{\frac{E_1 - E_1^0}{0,06}}} \qquad (Eq.\ 5)$$

En normalisant il vient :

$$\boxed{\frac{A_{(\mathrm{FeS})_{Red}}}{A_{max}} = \frac{1}{1 + 10^{\frac{E_1 - E_1^0}{0,06}}}} \qquad (Eq.\ 6)$$

II.3.2 - Cas des centres avec une forme oxydée active en RPE :

Un deuxième cas à considérer est celui, par exemple, d'un centre 3Fe4S i.e. une espèce visible en RPE à l'état oxydé $[3Fe4S]^+$. Un calcul similaire au précédent permet de montrer que l'amplitude du signal $[3Fe4S]^+$ en fonction du potentiel redox ambiant est :

$$A_{(\mathrm{FeS})_{Ox}} = \frac{A_{max}}{1 + 10^{\frac{E_1^0 - E_1}{0,06}}} \qquad (Eq.\ 7)$$

En normalisant les amplitudes il vient :

$$\boxed{\frac{A_{(\mathrm{FeS})_{Ox}}}{A_{max}} = \frac{1}{1 + 10^{\frac{E_1^0 - E_1}{0,06}}}} \qquad (Eq.\ 8)$$

II.3.3 - Cas des centres avec une forme intermédiaire active en RPE :

Enfin, le troisième cas à considérer est celui d'une espèce ayant un intermédiaire actif en RPE. Ce cas est couramment observé dans les métalloprotéines puisque c'est un comportement que l'on retrouve dans le cas des cofacteurs à Mo/W et pour les radicaux organiques comme le sont les FMN (Flavines MonoNucléotide), les FAD (Flavines DiNucléotides) et les quinones. La figure II.2 montre le cas des quinones, que l'on gardera pour la suite de l'analyse, où seul l'intermédiaire semiquinone est paramagnétique et visible en RPE puisque le seul à posséder

un électron non apparié. Etant donné que l'espèce semiquinone (SQ) apparait lors de la première réduction puis disparait lors de la deuxième, le profil de la courbe de titrage suivi par RPE est dit « en cloche ».

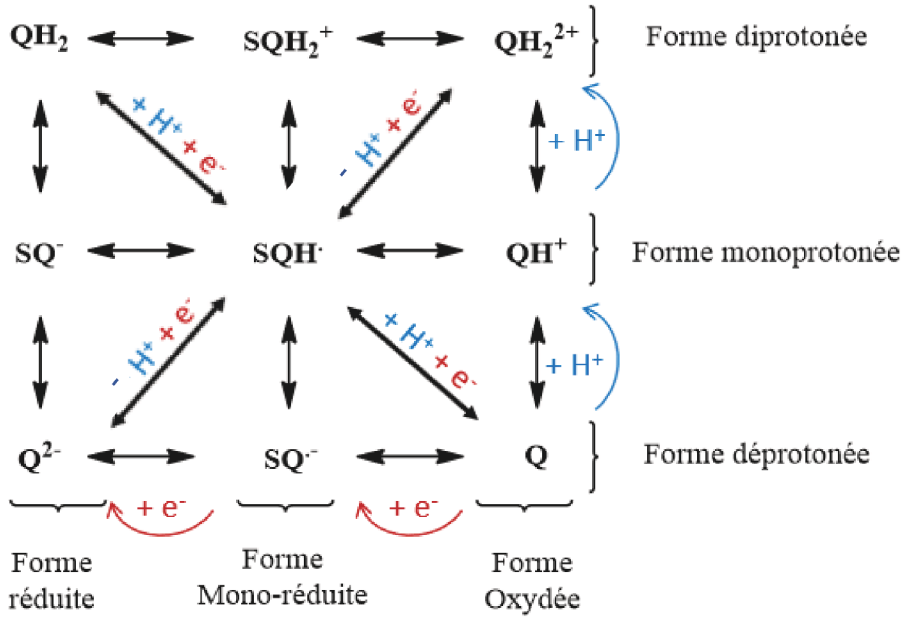


Figure II.2 : Représentation des états de protonation et d'oxydoréduction possible pour une espèce de type quinone. Le passage d'une ligne à l'autre du schéma représente l'échange d'un proton. De manière analogue, le passage d'une colonne à l'autre représente l'échange d'un électron.

Nous avons donc ici neuf espèces différant par leur degré d'oxydation et leurs états de protonation. Pour des raisons de simplicité d'écriture, considérons le cas d'une réduction sans transfert de proton. Au cours du titrage nous avons alors la réaction suivante :

$$Q + e^- \leftrightarrows SQ^{\cdot -} + e^- \leftrightarrows Q^{2-}$$

Comme précédemment nous pouvons poser $[Q] + [SQ^{\cdot -}] + [Q^{2-}] = [Q]_{Tot}$ qui après normalisation de cette dernière donne en fractions molaires : $[Q] + [SQ^{\cdot -}] + [Q^{2-}] = 1$.

Ainsi pour la première partie de la réaction $Q + e^- \leftrightarrows SQ^{\cdot -}$ nous avons :

$$E_{Q/SQ^{\cdot -}} = E^0_{Q/SQ^{\cdot -}} + 0{,}06\log\left(\frac{[Q]}{[SQ^{\cdot -}]}\right) \qquad (Eq.\ 9)$$

$$\Rightarrow 10^{\frac{E_{Q/SQ^{\cdot -}} - E^0_{Q/SQ^{\cdot -}}}{0{,}06}} = \frac{[Q]}{[SQ^{\cdot -}]}$$

$$\Rightarrow [SQ^{\cdot -}]10^{\frac{E_{Q/SQ^{\cdot -}} - E^0_{Q/SQ^{\cdot -}}}{0{,}06}} = [Q]$$

Pour la seconde partie de la réaction $SQ^{\cdot -} + e^- \leftrightarrows Q^{2-}$, nous avons :

$$E_{SQ^{\cdot -}/Q^{2-}} = E^0_{SQ^{\cdot -}/Q^{2-}} + 0{,}06\log\left(\frac{[SQ^{\cdot -}]}{[Q^{2-}]}\right) \qquad (Eq.\ 10)$$

$$\Rightarrow E_{SQ^{\cdot -}/Q^{2-}} = E^0_{SQ^{\cdot -}/Q^{2-}} - 0{,}06\log\left(\frac{[Q^{2-}]}{[SQ^{\cdot -}]}\right)$$

$$\Rightarrow 10^{\frac{E^0_{SQ^{\cdot -}/Q^{2-}} - E_{SQ^{\cdot -}/Q^{2-}}}{0{,}06}} = \frac{[Q^{2-}]}{[SQ^{\cdot -}]}$$

$$\Rightarrow [SQ^{\cdot -}].10^{\frac{E^0_{SQ^{\cdot -}/Q^{2-}} - E_{SQ^{\cdot -}/Q^{2-}}}{0{,}06}} = [Q^{2-}]$$

Sachant que $[Q] + [SQ^{\cdot -}] + [Q^{2-}] = 1$, il vient :

$$\Rightarrow [SQ^{\cdot -}] + [SQ^{\cdot -}]10^{\frac{E_{Q/SQ^{\cdot -}} - E^0_{Q/SQ^{\cdot -}}}{0{,}06}} + [SQ^{\cdot -}]10^{\frac{E^0_{SQ^{\cdot -}/Q^{2-}} - E_{SQ^{\cdot -}/Q^{2-}}}{0{,}06}} = 1 \qquad (Eq.\ 11)$$

$$\Rightarrow [SQ^{\cdot -}] = \frac{1}{1 + 10^{\frac{E_{Q/SQ^{\cdot -}} - E^0_{Q/SQ^{\cdot -}}}{0{,}06}} + 10^{\frac{E^0_{SQ^{\cdot -}/Q^{2-}} - E_{SQ^{\cdot -}/Q^{2-}}}{0{,}06}}}$$

Il est à noter que dans ce cas de figure deux potentiels seront à optimiser : $E^0_{Q/SQ^{\cdot -}}$ et $E^0_{SQ^{\cdot -}/Q^{2-}}$.

Sachant que l'amplitude du signal RPE est proportionnelle à la concentration en semiquinone, on a alors le potentiel de l'espèce en fonction du potentiel redox ambiant :

$$A_{SQ^{\cdot -}} = \frac{A_{max}}{1 + 10^{\frac{E_{Q/SQ^{\cdot -}} - E^0_{Q/SQ^{\cdot -}}}{0{,}06}} + 10^{\frac{E^0_{SQ^{\cdot -}/Q^{2-}} - E_{SQ^{\cdot -}/Q^{2-}}}{0{,}06}}} \qquad (Eq.\ 12)$$

En normalisant il vient :

$$\boxed{\frac{A_{SQ^{\cdot -}}}{A_{max}} = \frac{1}{1 + 10^{\frac{E_{Q/SQ^{\cdot -}} - E^0_{Q/SQ^{\cdot -}}}{0{,}06}} + 10^{\frac{E^0_{SQ^{\cdot -}/Q^{2-}} - E_{SQ^{\cdot -}/Q^{2-}}}{0{,}06}}}} \qquad (Eq.\ 13)$$

II.4 - Détermination de la dépendance en pH du potentiel :

L'équation précédente correspond au cas d'un strict échange d'électrons. Dans le cas d'un échange d'un proton couplé à un échange d'un électron, la réaction devient

$$\mathrm{Ox} + 1H^+ + 1\mathrm{e}^- \leftrightarrows \mathrm{RedH} \qquad (Eq.\ 14)$$

L'équation de Nernst s'écrit alors :

$$E_{Ox/Red} = E^0_{Ox/Red} + 0{,}06\log\left(\frac{[Ox][H^+]}{[RedH]}\right) \qquad (Eq.\ 15)$$

$$\Rightarrow E_{Ox/Red} = E^0_{Ox/Red} + 0{,}06\log\left(\frac{[Ox]}{[RedH]}\right) + 0.06\log([H^+])$$

$$\Rightarrow E_{Ox/Red} = E^0_{Ox/Red} + 0{,}06\log\left(\frac{[Ox]}{[RedH]}\right) - 0.06\mathrm{pH}$$

$$\Rightarrow E_{Ox/Red} = E'^0_{Ox/Red} + 0{,}06\log\left(\frac{[Ox]}{[RedH]}\right)$$

Avec $E'^0_{Ox/Red} = E^0_{Ox/Red} - 0{,}06pH$, le potentiel standard apparent du couple qui est le potentiel du couple, déterminé à pH = 0, corrigé à un autre pH.

Pour déterminer qu'elle est la variation par unité de pH, il suffit de faire l'analyse de ce que l'on obtient en faisant la différence de potentiels à deux pH différents. On a alors :

$$E^{pH_1}_{Ox/RedH} = E^0_{Ox/RedH} + 0{,}06\log\left(\frac{[Ox]}{[RedH]}\right) - 0{,}06\mathrm{pH}_1 \qquad (Eq.\ 16)$$

$$E^{pH_2}_{Ox/RedH} = E^0_{Ox/RedH} + 0{,}06\log\left(\frac{[Ox]}{[RedH]}\right) - 0{,}06\mathrm{pH}_2 \qquad (Eq.\ 17)$$

Pour $E_{Ox/RedH}^{pH_2} - E_{Ox/RedH}^{pH_1}$ il vient,

$$E_{Ox/RedH}^{pH_2} - E_{Ox/RedH}^{pH_1} = \left(E_{Ox/RedH}^{0} + 0{,}06\ \log\left(\frac{[Ox]_{pH_2}}{[Red]_{pH_2}}\right) - 0{,}06pH_2\right) - \left(E_{Ox/RedH}^{0} + 0{,}06\ \log\left(\frac{[Ox]_{pH_1}}{[RedH]_{pH_1}}\right) - 0{,}06pH_1\right)$$

$$\Rightarrow E_{Ox/RedH}^{pH_2} - E_{Ox/RedH}^{pH_1} = \left(E_{Ox/RedH}^{0} + 0{,}06\ \log\left(\frac{[Ox]_{pH_2}}{[RedH]_{pH_2}}\right) - 0{,}06pH_2\right) - E_{Ox/RedH}^{0} + 0{,}06\ \log\left(\frac{[RedH]_{pH_1}}{[Ox]_{pH_1}}\right) + 0{,}06pH_1 \qquad (Eq.\ 18)$$

$$\boxed{E_{Ox/RedH}^{pH_2} - E_{Ox/RedH}^{pH_1} = 0{,}06\log\left(\frac{[RedH]_{pH_1}\,[Ox]_{pH_2}}{[RedH]_{pH_2}\,[Ox]_{pH_1}}\right) - 0{,}06\,(pH_2 - pH_1)} \qquad (Eq.\ 19)$$

Il apparait donc clairement ici que le potentiel sera diminué de 60 mV par unité pH si pH_2 est supérieur à pH_1.

L'équation 2 qui a servi de base à ce raisonnement montre que ce dernier est basé sur l'échange d'un proton et d'un électron. Ainsi si on observe ± 60 mV de dépendance cela signifie que la réaction considérée implique un transfert couplé $1H^+/1e^-$. De la même manière, on peut montrer que si on observe une dépendance de ± 120 mV par unité pH cela signifie que la réaction implique un transfert couplé $2H^+/1e^-$.

Les titrages ont été effectués avec du dithionite de sodium comme réducteur ($Na_2S_2O_4$). On constate que les couples redox engagés sont $HSO_3^-/ S_2O_4^{2-}$ ou $SO_3^{2-}/ S_2O_4^{2-}$ en fonction de du pH de travail. De plus, sachant que pKa(HSO_3^-/ SO_3^{2-}) = 6,97, on distingue deux cas de figure dans les titrages effectués : celui à pH = 6,0 (pH < pKa) et celui à pH = 7,5 (pH > pKa).

- Dans ce premier cas la demi-équation redox est :

$2HSO_3^- + 2e^- + 2H^+ = S_2O_4^{2-} + 2H_2O$

L'équation de Nernst s'écrit alors :

$$E_{HSO_3^-/S_2O_4^{2-}} = E^0_{HSO_3^-/S_2O_4^{2-}} + \frac{0{,}06}{2}\log\left(\frac{[HSO_3^-]^2[H^+]^2}{[S_2O_4^{2-}]}\right)$$

Ce qui conduit à :

$$E_{HSO_3^-/S_2O_4^{2-}} = E^0_{HSO_3^-/S_2O_4^{2-}} + 0{,}06 \log\left(\frac{[HSO_3^-]}{[S_2O_4^{2-}]}\right) - 0{,}06pH$$

Ce qui correspond à une dépendance en pH de 60 mV par unité de pH.

- Dans le second cas la demi-équation redox est :

$2SO_3^{2-} + 2e^- + 4H^+ = S_2O_4^{2-} + 2H_2O$

L'équation de Nernst s'écrit alors :

$$E_{SO_3^{2-}/S_2O_4^{2-}} = E^0_{SO_3^{2-}/S_2O_4^{2-}} + \frac{0{,}06}{2} \log\left(\frac{[SO_3^{2-}]^2[H^+]^4}{[S_2O_4^{2-}]}\right)$$

Ce qui conduit à :

$$E_{HSO_3^-/S_2O_4^{2-}} = E^0_{HSO_3^-/S_2O_4^{2-}} + 0{,}06 \log\left(\frac{[HSO_3^-]}{[S_2O_4^{2-}]}\right) - 0{,}12pH$$

Ce qui correspond à une dépendance en pH de 120 mV par unité de pH, donc 60 mV pour 0,5 unité pH.

II.5 - Etude de la stabilité des espèces possédant un intermédiaire actif en RPE et calcul du taux d'occupation :

Dans le cas des signaux de molybdène/tungstène et de radicaux organiques, l'écart en potentiel entre les deux étapes de réduction informe quant à la stabilité de l'espèce active en RPE concernée. Une quantification des signaux est nécessaire et permet de calculer un taux d'occupation. Considérons un système de type quinone, le raisonnement étant le même dans le cas du molybdène. Le taux d'occupation des quinones par enzyme, quelque soit l'état redox de ces dernières est défini par :

$$\tau_{occ} = \frac{[SQ]_{/prot}}{[SQ]_{théorique}} . 100 \qquad (Eq.\ 20)$$

Le numérateur $[SQ]_{/prot}$ correspond à la concentration en semiquinone par protéine. Dans ce travail, elle est déterminée par double intégration du signal RPE de la semiquinone de l'échantillon du titrage pour lequel le signal est maximum. Cette valeur est alors comparée à

une référence interne, en l'occurrence le centre [2Fe2S] de ForC dont la signature peut être isolée à 100 K à bas potentiel. On fait donc l'hypothèse que les centres [2Fe2S] dans les enzymes, au potentiel le plus bas du titrage, sont alors dans un état complètement réduit et génèrent ainsi un signal dont la double intégrale correspond à un nombre de spin normalisé égal à un et que toutes les protéines contiennent un centre [2Fe2S]. Le dénominateur $[SQ]_{théorique}$ représente la quantité maximale théorique de semiquinone normalisée par enzyme qui est détectable dans le titrage. Cette dernière est calculée avec le raisonnement développé ci-après. On considère la réaction suivante :

$$Q^{2-} + Q \leftrightarrows SQ^{\cdot-} + SQ^{\cdot-} \qquad (Eq.\ 21)$$

Dans le sens indirect, cette réaction est celle de la dismutation des semiquinones en quinol et quinone. Dans le sens direct cette réaction représente la formation de semiquinone par réaction d'une quinone sur un quinol, c'est la médiamutation. La constante de stabilité de la réaction est définie comme

$$K_s = \frac{[SQ^{\cdot-}]^2}{[Q][Q^{2-}]} \qquad (Eq.\ 22)$$

Pour la première étape de réduction, de la quinone à la semiquinone, $Q + e^- \leftrightarrows SQ^{\cdot-}$ on a :

$$E_{Q/SQ^{\cdot-}} = E^0_{Q/SQ^{\cdot-}} + 0{,}06\log\left(\frac{[Q]}{[SQ^{\cdot-}]}\right) \qquad (Eq.\ 23)$$

De manière analogue, pour la deuxième étape de réduction, $SQ^{\cdot-} + e^- \leftrightarrows Q^{2-}$, on a :

$$E_{SQ^{\cdot-}/Q^{2-}} = E^0_{SQ^{\cdot-}/Q^{2-}} - 0{,}06\log\left(\frac{[Q^{2-}]}{[SQ^{\cdot-}]}\right) \qquad (Eq.\ 24)$$

Sachant qu'à l'équilibre nous avons égalité des potentiels il vient,

$$E_{Q/SQ^{\cdot-}} = E_{SQ^{\cdot-}/Q^{2-}}$$

$$\Rightarrow E^0_{Q/SQ^{\cdot-}} + 0{,}06\log\left(\frac{[Q]}{[SQ^{\cdot-}]}\right) = E^0_{SQ^{\cdot-}/Q^{2-}} - 0{,}06\log\left(\frac{[Q^{2-}]}{[SQ^{\cdot-}]}\right)$$

$$\Rightarrow 0{,}06\left(\log\left(\frac{[Q]}{[SQ^{\cdot-}]}\right) + \log\left(\frac{[Q^{2-}]}{[SQ^{\cdot-}]}\right)\right) = E^0_{SQ^{\cdot-}/Q^{2-}} - E^0_{Q/SQ^{\cdot-}}$$

$$\Rightarrow \log\left(\frac{[Q][Q^{2-}]}{[SQ^{\cdot-}]^2}\right) = \frac{E^0_{SQ^{\cdot-}/Q^{2-}} - E^0_{Q/SQ^{\cdot-}}}{0{,}06}$$

$$\Rightarrow \log\left(\frac{[SQ^{\cdot-}]^2}{[Q].[Q^{2-}]}\right) = \frac{E^0_{Q/SQ^{\cdot-}} - E^0_{SQ^{\cdot-}/Q^{2-}}}{0{,}06}$$

$$\boxed{K_s = \frac{[SQ^{\cdot-}]^2}{[Q].[Q^{2-}]} = 10^{\frac{E^0_{Q/SQ^{\cdot-}} - E^0_{SQ^{\cdot-}/Q^{2-}}}{0{,}06}}} \qquad (Eq.\ 25)$$

Il apparait ici clairement que la stabilité de l'intermédiaire semiquinone dépend de l'écart entre les potentiels standards $E^0_{Q/SQ^{\cdot-}}$ et $E^0_{SQ^{\cdot-}/Q^{2-}}$ respectivement du premier transfert électronique (passage de quinone à semiquinone) et de la deuxième (passage de semiquinone à quinol).

La figure II.3 montre la variation de la largeur à mi-hauteur de la courbe de titrage de la semiquinone en fonction de l'écart en potentiel $E^0_{Q/SQ^{\cdot-}} - E^0_{SQ^{\cdot-}/Q^{2-}}$ et noté $E^0_1 - E^0_2$, en

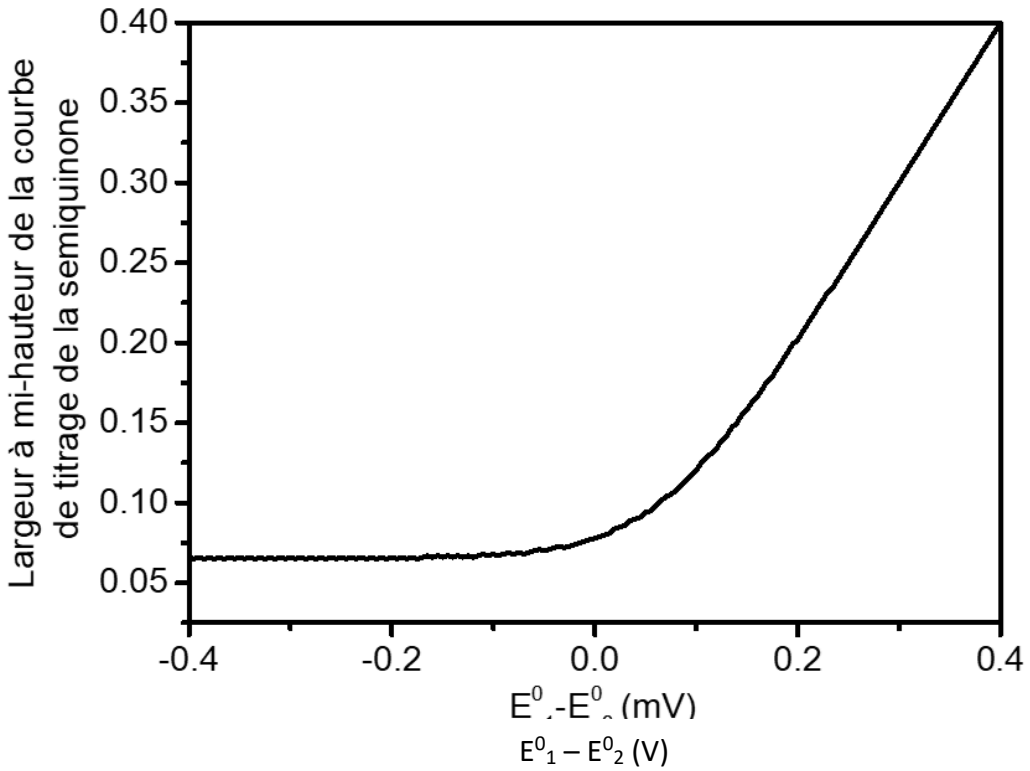


Figure II.3 : Représentation de la largeur à mi-hauteur de la courbe de titrage de l'espèce semiquinone en fonction de l'écart de ses potentiels standard E^0_1 et E^0_2.

généralisant, respectivement les potentiels standards du premier et du deuxième échange d'électrons.

On peut alors distinguer 3 régions :

- $E^0_1 - E^0_2 > 0{,}2$ V, dans ce cas on est dans la partie linéaire de la courbe et la largeur de raie à mi-hauteur est égale à l'écart en potentiel.
- $0{,}2 \text{ V} > E^0_1 - E^0_2 > -0{,}2$ V, dans cette région, on constate qu'en descendant en potentiel de 0,2 V à – 0,2 V, l'écart en potentiel décroit plus rapidement que la largeur à mi-hauteur. Cet écart n'est ainsi plus égal à la largeur à mi-hauteur. Cette dernière est ainsi toujours plus grande que l'écart en potentiel.
- $E^0_1 - E^0_2 < -0{,}2$ V, dans ce dernier cas, il n'a y plus d'évolution de la largeur à mi-hauteur en fonction du potentiel. Cette dernière est donc toujours plus grande que l'écart en potentiel et est constante.

La figure II.4 montre la variation de l'intensité maximale théorique du signal RPE de la semiquinone en fonction de l'écart en potentiel $E^0_1 - E^0_2$.

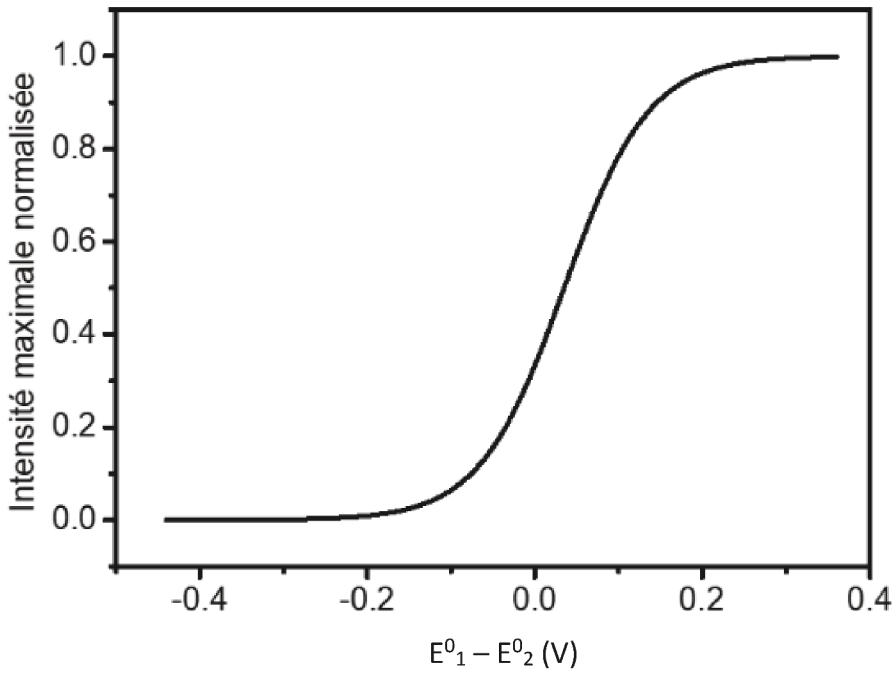


Figure II.4 : Représentation de l'intensité maximale normalisée de l'espèce paramagnétique d'un signal RPE pour une espèce de type semiquinone en fonction de l'écart des potentiels standard E^0_1 et E^0_2 associés à ces deux transitions.

Elle met en évidence ce qui est évoqué dans l'équation 5. En effet, pour des grands écarts en potentiel, typiquement $E^0_1 - E^0_2 > 0{,}3$ V, l'intermédiaire semiquinone sera fortement stabilisé dans la poche à quinone et 100 % des quinones pourront être observées dans cet état au cours du titrage. En revanche, on constate également que quand l'écart en potentiel diminue la quantité de semiquinone maximale théoriquement visible diminue fortement. Pour des écarts en potentiel très faibles, typiquement $E^0_1 - E^0_2 < -0{,}3$ V, l'intermédiaire semiquinone est très peu stabilisé dans l'enzyme et son signal n'est ainsi plus détectable par spectroscopie RPE.

Enfin la figure II.5 montre l'intensité maximale normalisée de l'intermédiaire semiquinone en fonction de la largeur à mi-hauteur de la courbe de titrage de cette même espèce.

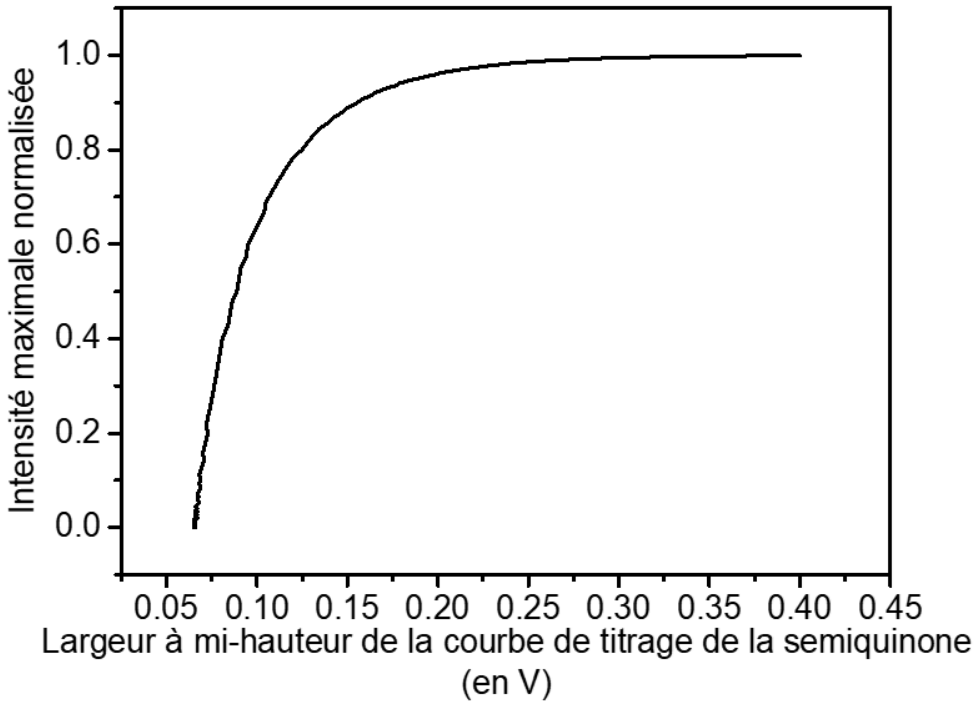


Figure II.5 : Représentation de l'intensité maximale normalisée de l'espèce paramagnétique d'un signal RPE pour une espèce de type semiquinone en fonction de la largeur à mi-hauteur de la courbe de titrage de cette même espèce associés à ces deux transferts. Tracé à partir de l'équation 5.

La figure 5 confirme que pour une largeur de la courbe de titrage de la semiquinone supérieure à 300 mV, 100 % des quinones du systèmes sont visibles sous la forme de semiquinone. On constate également que pour des largeurs de raie inférieures à 300 mV, l'intensité du signal diminue progressivement, jusqu'à zéro dans le cas où l'intermédiaire semiquinone n'est pas du tout stabilisé, alors que la largeur de la courbe ne s'annule jamais.

III - Mesure de l'activité formiate : ménadione/formiate oxydoréductase :

L'activité FDH est mesurée à température ambiante en anaérobiose, dans une enceinte à atmosphère contrôlée. Le milieu réactionnel se compose de tampon 25 mM CHES pH = 9,0, 50 mM de formiate de sodium et 20 nM de ForCE 1. La réaction est initiée par l'ajout de 0 à 150 µM de ménadione (2-Methyl-1,4-naphthoquinone, Sigma-Aldrich). L'oxydation d'une mole de formiate, catalysée par le complexe ForCE 1, est couplée à la réduction d'une mole de ménadione. La réduction de la ménadione en ménadiol est suivie par une mesure de la diminution de l'absorbance à 260 nm ($\varepsilon_{\text{ménadione}}$ = 17,2 $mM^{-1}.cm^{-1}$). L'activité de ForCE 1 est

exprimée en µmoles de ménadione réduite/min/mg de protéines. Les activités sont analysées en utilisant l'équation de Michaelis-Menten établie ci-dessous (Eq. 34) :

III.1 - Définition et détermination du Kcat :

A très basse concentration en substrat, beaucoup de réactions enzymatiques affichent une cinétique du deuxième ordre[114]. La vitesse d'une réaction est alors définie par

$$r = k_A[E]_0[S] \qquad (Eq.\ 27)$$

où $[E]_0$ et $[S]$ sont respectivement la concentration initiale en centre catalytique et en substrat et k_A est la constante de vitesse apparente du deuxième ordre ou constante de spécificité.

A très haute concentration en substrat, le comportement généralement observé est celui d'une cinétique du premier ordre (d'ordre zéro par rapport au substrat). La vitesse de réaction s'écrit alors :

$$r = k_0[E]_0 \qquad (Eq.\ 28)$$

où $[E]_0$ est la concentration initiale en enzyme et k_0 est la constante de vitesse du premier ordre, aussi appelée k_{cat}. Elle représente le nombre maximum de molécules de substrat transformée par seconde et par molécule d'enzyme. Cette dernière peut alors être calculée avec le rapport de la vitesse maximale V_{max} représentée par l'asymptote horizontale à la courbe de Michaelis-Menten décrivant la cinétique de la réaction enzymatique pour les concentrations de substrat tendant vers l'infini avec la concentration en enzyme $[E]_0$, soit $k_{cat} = \frac{V_{max}}{[E]_0} \qquad (Eq.\ 29)$.

III.2 - Equation de Michaelis Menten et définition du K_M

En considérant une réaction enzymatique écrite comme suit :

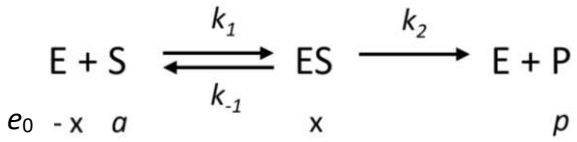


Figure II.6 : Schéma représentatif d'une réaction enzymatique tel que postulé par Briggs et Haldane[115,116] *avec passage par un complexe Enzyme-substrat conduisant à la formation du produit. E : Enzyme, S : Substrat, ES : complexe Enzyme-Substrat, P : Produit. k_1, k_2 et k_{-1} sont les constantes de vitesse des réactions matérialisées par les flèches.*

où e_0 correspond à la concentration initiale en enzyme, x la concentration en complexe ES et a celle en substrat. k_1, k_2 et k_{-1} sont les constantes de vitesse des réactions matérialisées par les flèches. La vitesse de réaction est définie par :

$$\frac{dx}{dt} = k_1(e_0 - x)a - k_{-1}x - k_2x \qquad (Eq.\ 30)$$

A l'état d'équilibre, la vitesse de la réaction est nulle, on a alors :

$$k_1e_0a - x(k_1a + k_{-1} + k_2) = 0 \qquad (Eq.\ 31)$$

Il vient alors :

$$\mathrm{x} = \frac{k_1e_0a}{k_{-1} + k_2 + k_1a} \qquad (Eq.\ 32)$$

En faisant l'hypothèse faite par Van Slyke et Cullen[2] que la quantité d'intermédiaire est constante, la vitesse de la réaction est donc donnée par $\mathrm{v} = k_2x$, l'expression au-dessus devient :

$$\mathrm{v} = \frac{k_2k_1e_0a}{k_{-1} + k_2 + k_1a} = \frac{k_2e_0a}{\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} + a} = \frac{k_{cat}e_0a}{\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} + a} \qquad (Eq.\ 33)$$

Il est intéressant de noter qu'à partir d'ici, k_2 va être remplacé par k_{cat}. Ce dernier n'est pas équivalent à une constante correspondant à la deuxième étape de la catalyse. Il a cependant, les propriétés d'une constante de premier ordre et défini la capacité du complexe enzyme-substrat à efficacement produire le produit P.

On a donc l'équation de Michaelis Menten écrite comme suit :

$$\mathrm{v} = \frac{Va}{K_M + a} \qquad (Eq.\ 34)$$

avec $V = k_{cat}.e_0$, aussi noté V_{max} ou V_m. L'union de Biochimie et Biologie Moléculaire n'est pas en faveur de cette appellation pour deux raisons. Premièrement, V_{max} n'est pas un maximum au sens mathématique du terme mais plutôt une limite. Deuxièmement, l'indice m peut faire penser qu'il s'agisse du même que celui de K_M ce qui n'est pas le cas. K_M est la constante de Michaelis, définie par $K_M = \frac{k_{-1}+k_2}{k_1}$ représentant l'affinité entre l'enzyme et le substrat.

IV - Principe théorique de la Résonance Paramagnétique Electronique (RPE)

La spectroscopie par Résonance Paramagnétique Electronique, ou spectroscopie RPE, est un outil puissant utilisé en biologie pour les informations qu'il peut nous apporter sur les structures protéiques et les mécanismes réactionnels. L'utilisation de cette technique nécessite un échantillon contenant des centres paramagnétiques qui sont des atomes ou des molécules dont une orbitale est semi-occupée, puisque si les électrons s'apparient, le magnétisme disparait. Notre échantillon est alors diamagnétique.

Cette partie a pour but de présenter les principes de base de cette technique et de décrire les méthodes d'analyses et les traitements des données spectroscopiques utilisés dans le cadre de mes recherches.

IV.1 - Cas d'un électron libre

Les électrons sont des particules fondamentales et chargées négativement, leur charge étant de -e soit -1,602 10^{-19} C, et possédant un moment cinétique intrinsèque appelé « Spin » et noté $\vec{S}$. Cette particule chargée a un moment magnétique $\overrightarrow{\mu_S}$ donné par :

$$\overrightarrow{\mu_S} = -\left(\frac{e\hbar}{2m_e}\right).g_e.\vec{S} \qquad (Eq.\ 35)$$

En l'absence de champ magnétique, les moments magnétiques des électrons sont distribués de manière aléatoire dans toutes les directions de l'espace possibles (figure II.7). En revanche, en présence d'un champ magnétique $\vec{B}$ non nul, les moments magnétiques vont s'aligner selon la direction du champ, désignée comme la direction z. Ce couplage entraine une levée de dégénérescence des niveaux d'énergie dus au spin, appelé l'effet Zeeman électronique. L'énergie de cette interaction est décrite par l'hamiltonien de spin suivant :

$$\widehat{H}_{ZE} = -\overrightarrow{\mu_S}.\vec{B} \qquad (Eq.\ 36)$$

$$\widehat{H}_{ZE} = \beta_e.g_e.B.S_z \qquad (Eq.\ 37)$$

La projection des spin $\vec{S}$ selon l'axe z ne peut prendre que deux valeurs, Ms = $\pm {}^{1}/_{2}$ correspondant aux valeurs propres de la matrice S_Z. Les moments magnétiques vont donc s'aligner de manière parallèle ou antiparallèle à $\vec{B}$, sur deux niveaux d'énergie décrits ci-après, donnant lieu à la levée de dégénérescence selon les valeurs de M_S :

$$E_{M_s} = \beta_e g_e M_s B \quad \rightarrow \quad E_{M_s} = \pm \frac{1}{2} \beta_e g_e B$$

β_e est le magnéton de Bohr électronique $\beta_e = \frac{e\hbar}{2m_e}$, et g_e le facteur g de l'électron libre.

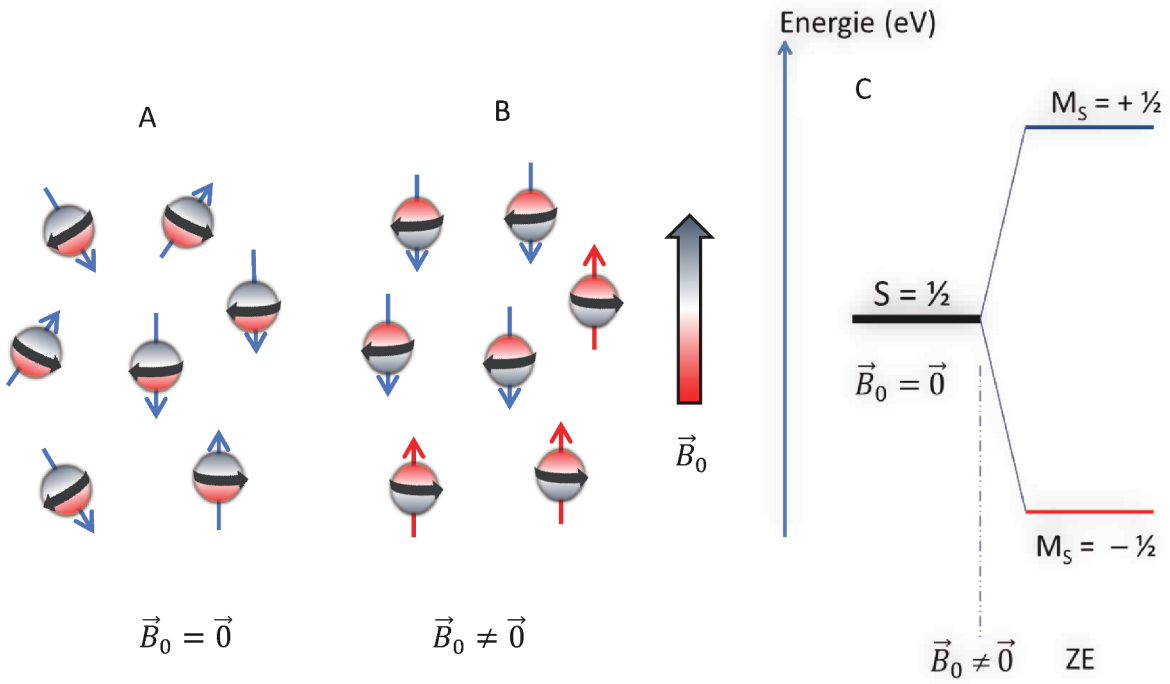


Figure II.7 : Illustration de l'effet Zeeman et de la levée de dégénérescence. A) Etat des spins en l'absence de champ magnétique B) Etat des spins en présence d'un champ magnétique C) Niveaux d'énergies associés au spin S = 1/2 de l'électron. ZE : Effet Zeeman électronique.

IV.2 - Principe de la RPE en onde continue

En RPE en ondes continues l'écart entre les niveaux énergétiques précédemment décrits est mesuré en induisant des transitions de spins électroniques entre ces niveaux appelés doublets électroniques. Pour induire ces transitions, le système est irradié par des ondes électromagnétiques appartenant au domaine des micro-ondes, le plus communément de la bande X dont la fréquence est typiquement de l'ordre de v ≈ 9,5 GHz (figure II.8).

Ces transitions sont alors possibles si l'énergie des micro-ondes correspond exactement à l'écart entre les niveaux d'énergie associés à Ms = ± $^1/_2$. La condition à remplir (condition de résonnance) est alors la suivante :

$$h\nu = \Delta E = E_+ - E_- = g_e \,.\beta_e \,.B \qquad (Eq.\ 38)$$

où E_+ est l'énergie associée au niveau M_S = + 1/2 et E_- celle associée au niveau M_S = - 1/2.

On effectue un balayage du champ magnétique avec une fréquence micro-onde constante. L'inverse n'est en revanche pas possible, la technologie actuelle ne permettant pas de produire une source micro-onde émettant sur une plage de fréquences suffisamment large.

Toutes les transitions ne sont pas observables en RPE. Celles donnant lieu à un signal sont celles induites entre les niveaux électroniques respectant la règle de sélection :

$$\Delta M_s = \pm 1$$

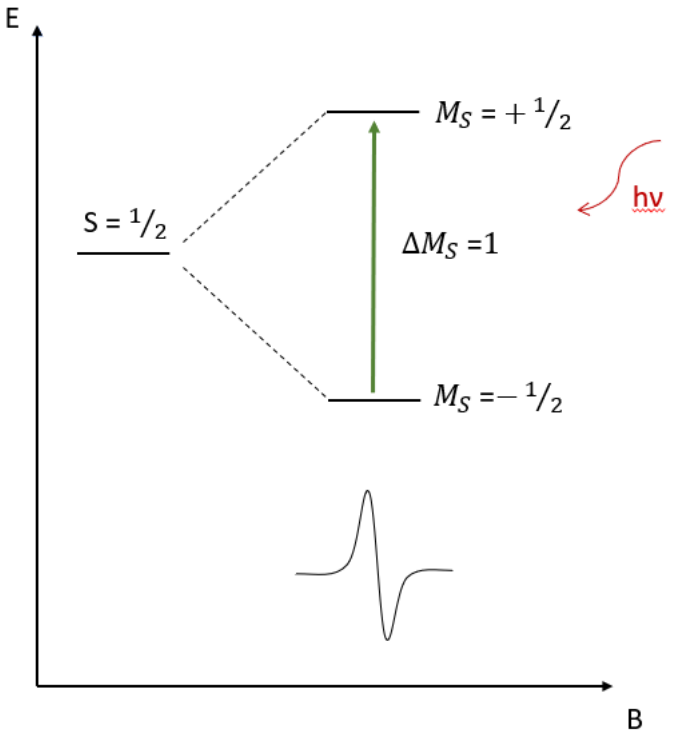


Figure II.8 : Illustration des règles de sélection pour un spin S = 1/2

Dans la majorité des systèmes étudiés, l'électron n'est pas libre mais dans une orbitale atomique ou moléculaire. Dans ce cas l'électron peut interagir avec les électrons et les noyaux environnants. Ces interactions sont modélisées dans l'hamiltonien de spin par :

$$\hat{H}_S = \hat{H}_{ZE} + \hat{H}_{HF} + \hat{H}_{ZN} + \hat{H}_{QN} + \hat{H}_{NN} + \hat{H}_{ZFS} \qquad (Eq.\ 39)$$

Cet hamiltonien se compose de termes décrivant l'effet Zeeman électronique $(\hat{H}_{ZE})$ considéré précédemment, les interactions hyperfines entre les spins nucléaires des noyaux magnétiques et le spin $\vec{S}$ électronique $(\hat{H}_{HF})$, l'effet Zeeman nucléaire $(\hat{H}_{ZN})$, les différentes interactions quadripolaires pour les noyaux ayant un spin nucléaires I > $^1/_2$ $(\hat{H}_{QN})$, les interactions spin-spin, généralement négligeables, entre les paires de spin nucléaires $(\hat{H}_{NN})$, les levées de dégénérescence en champ nul (ou zero field splitting) pour les spins électronique S > $^1/_2$, $(\hat{H}_{ZFS})$.

Les termes $\hat{H}_{ZE}$, $\hat{H}_{HF}$, $\hat{H}_{ZN}$, $\hat{H}_{QN}$ et $\hat{H}_{ZFS}$ sont détaillés par la suite puisque essentiels pour la compréhension des travaux de recherches réalisés ici.

IV.3 - Interaction Zeeman électronique

Comme décrit ci-dessus, l'interaction Zeeman électronique, interaction généralement prépondérante dans l'équation 39, rend compte de l'interaction entre le champ magnétique et le moment magnétique du centre paramagnétique. L'électron fait partie de la structure électronique d'un atome où son mouvement de rotation autour de ce dernier lui confère un moment cinétique. Ainsi le moment magnétique total de l'électron sera décrit par :

$$\vec{\mu} = \overrightarrow{\mu_l} + \overrightarrow{\mu_s} \qquad (Eq.\ 40)$$

Sachant que $\overrightarrow{\mu_l} = -\beta_e . \vec{L}$

et $\overrightarrow{\mu_S} = -\beta_e . g_e . \vec{S}$

$\vec{L}$ et $\vec{S}$ sont respectivement le moment cinétique orbitalaire et le moment cinétique de spin. Ainsi le moment magnétique total s'écrit :

$$\vec{\mu} = -\tilde{g} . \beta_e . \vec{S} \qquad (Eq.\ 41)$$

On a alors :

$$\widehat{H}_{ZE} = \beta_e . \vec{S} . \tilde{g} . \vec{B} \qquad (Eq.\ 42)$$

avec

$$\tilde{g} = \begin{pmatrix} g_{xx} & g_{xy} & g_{xz} \\ g_{yx} & g_{yy} & g_{yz} \\ g_{zx} & g_{zy} & g_{zz} \end{pmatrix}$$

La matrice g est une matrice symétrique qui peut donc être représentée par une matrice diagonale dont les valeurs propres sont : g_{xx}, g_{yy} et g_{zz}.

$$\tilde{g} = \begin{pmatrix} g_{xx} & 0 & 0 \\ 0 & g_{yy} & 0 \\ 0 & 0 & g_{zz} \end{pmatrix}$$

g_{xx}, g_{yy} et g_{zz}, aussi appelés g_1, g_2, g_3, représentent les valeurs de g selon les trois axes principaux x, y, z, de la matrice g aussi appelés axes magnétiques qui sont liés aux axes moléculaires. Dans la pratique, en solution gelée, toutes les orientations possibles sont présentes de manière équiprobable. Les valeurs de g repèrent la position des raies sur un spectre RPE et constituent une véritable signature de l'espèce considérée. La figure II.9 montre les différents types de spectre de poudre en solution gelée. Il est intéressant de noter que le facteur g peut également s'écrire :

$$\tilde{g} = g_e \mathbf{1} + 2\lambda\Lambda \qquad (Eq.\ 43)$$

où $\mathbf{1}$ est la matrice unité, λ est la constante de couplage spin-orbite et Λ un tenseur symétrique qui décrit les interactions entre l'état fondamental et les états excités. Pour un électron lié, $\tilde{g}$ est désormais un tenseur, avec des valeurs principales qui diffèrent de celles de g_e à cause du couplage spin – orbite. Pour la plupart des radicaux organiques tels que les semiquinones, les valeurs de g sont proches de celles de l'électron libre. En revanche, des écarts plus importants sont observés pour les complexes composés de métaux de transition pour lesquels le couplage spin – orbite en tant qu'effet relativiste proportionnel à la masse de l'atome est fort, induisant ainsi des valeurs de g différant de la valeur de g_e.

En fonction des valeurs principales du tenseur $\tilde{g}$ plusieurs formes spectrales sont attendues (Figure II.9)

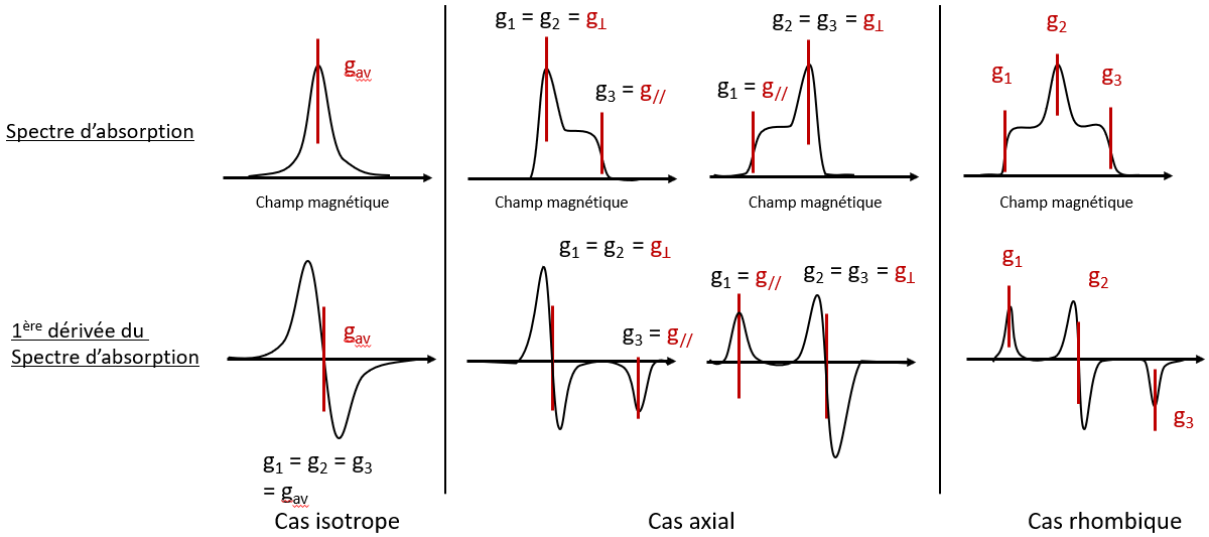


Figure II.9 : Formes spectrales attendues pour un signal RPE dépendantes des valeurs principales du tenseur $\tilde{g}$

IV.5 - Interaction Zeeman Nucléaire

De manière analogue à ce que l'on a vu précédemment, l'effet Zeeman nucléaire décrit l'interaction entre le moment magnétique lié au spin nucléaire et le champ magnétique appliqué $\vec{B}$. Comme pour le spin électronique, cette interaction s'accompagne d'une levée de dégénérescence supplémentaire des différents niveaux d'énergie du système selon les différentes valeurs de M_I . Cette interaction est décrite par :

$$\widehat{H}_{ZN} = -\, g_N \,.\beta_N \,.\vec{I}\,.\vec{B} \qquad (Eq.\ 44)$$

où g_N le facteur g nucléaire caractéristique du noyau et $\vec{I}$ le moment cinétique associé au spin nucléaire, $\beta_N = \frac{e\hbar}{2m_P}$ est le magnéton de Bohr nucléaire où m_P = 1,6726 10^{-27} kg est la masse du proton. Par exemple nous avons :

$$g_N(^{15}N) = -0{,}566\ (I = {}^1/_2), g_N(^{14}N) = 0{,}404\ (I = 1), g_N(^1H) = 5{,}586\ (I = {}^1/_2).$$

Cette interaction est donc directement proportionnelle au facteur g_N. Elle n'a pas d'influence notable sur les spectres RPE étudiés dans ces recherches en ondes continues, mais affecte les fréquences nucléaires mesurées par spectroscopie hyperfine (ESEEM, HYSCORE, ENDOR) et contient en particulier l'information sur la nature des noyaux en interactions.

IV.6 – Interaction hyperfine

L'interaction hyperfine entre le spin électronique $\vec{S}$ et le spin nucléaire $\vec{I}$ est décrite par l'hamiltonien :

$$\widehat{H}_{HF} = \vec{S} \,.\, \tilde{A} \,.\, \vec{I} \qquad (Eq.\ 45)$$

où $\tilde{A}$ est le tenseur de couplage hyperfin, i.e la matrice décrivant l'intensité du couplage hyperfin dans l'espace. L'interaction hyperfine peut être isotrope, axiale ou rhombique. $\vec{I}$ décrit l'opérateur de spin nucléaire. L'interaction hyperfine est généralement significative pour les noyaux situés jusqu'à une distance de 4 à 5 Å du centre paramagnétique et constitue une importante source d'information en RPE sur l'environnement magnétique autour de l'électron célibataire. Si on considère n noyaux couplés, l'hamiltonien s'écrit comme la somme des différentes interactions individuelles :

$$\widehat{H}_{HF} = \sum_{i=1}^{n} \vec{S} \,.\, \widetilde{A}_{\iota} \,.\, \vec{I}_{\iota} \qquad (Eq.\ 46)$$

L'énergie des niveaux (représentés en figure II.10) en tenant compte de l'interaction hyperfine est donnée par :

$$E(M_S, M_I) = g\beta_e B M_S + A M_S M_I \qquad (Eq.\ 47)$$

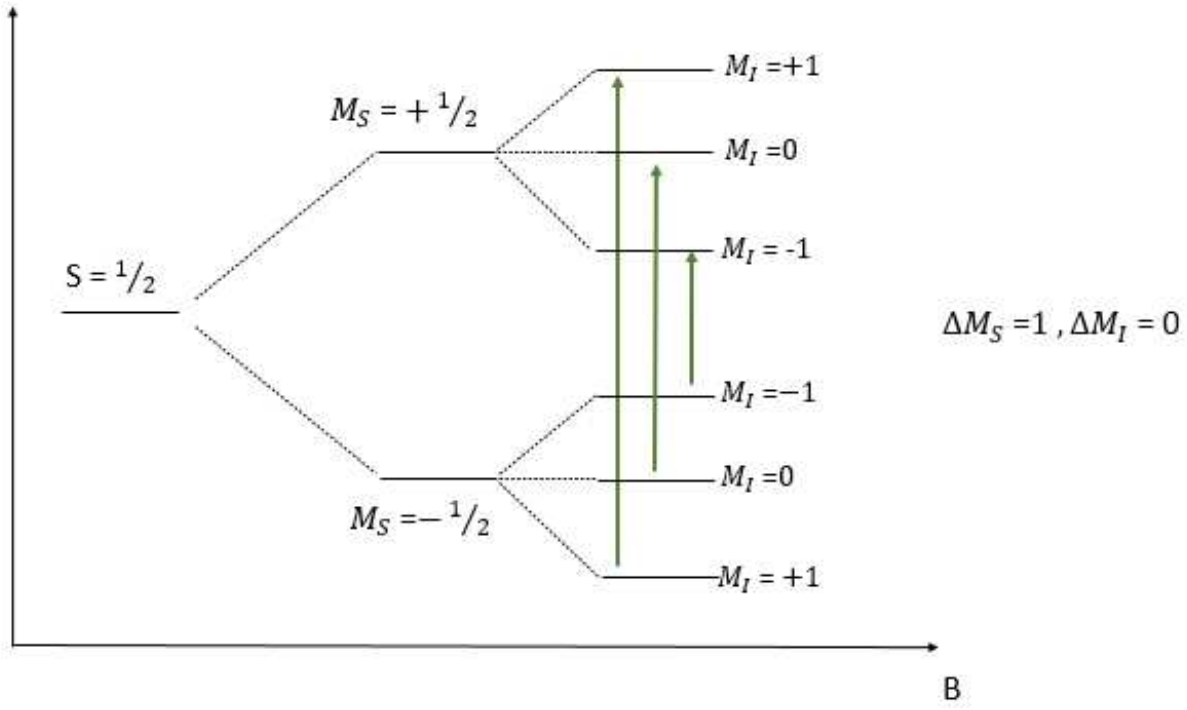


Figure II.10 : Représentation des niveaux d'énergie pour un système couplé de spins (S = 1/2, I = 1) avec A > 0. Les transitions entres les niveaux d'énergie autorisées par les règles de sélections ($\Delta M_S = \pm 1, \Delta M_I = 0$ sont représentées par les flèches vertes. L'énergie de ces niveaux est calculée d'après Eq. 47.

De plus, l'interaction hyperfine peut être décrite comme résultant de la somme de deux contributions. L'interaction de contact de Fermi ou interaction isotrope, modélisée par l'hamiltonien noté $\widehat{H}_F$ et l'interaction dipolaire correspondant au couplage dipôle électronique – dipôle nucléaire, décrite par l'hamiltonien $\widehat{H}_{DD}$.

Le terme de Fermi s'écrit mathématiquement :

$$\widehat{H}_F = A_{iso} . \vec{S} . \vec{I} \qquad (Eq.\ 48)$$

avec $A_{iso} = \frac{2\mu_0}{3h} . g_e . \beta_e . g_N . \beta_N . \rho(0)$

où A_{iso} en MHz est la constante isotrope de couplage, $\rho(0)$ est la densité de spin électronique sur le noyau ($\vec{r} = \vec{0}$). μ_0 est la perméabilité magnétique du vide soit $\mu_0 \sim 4\pi . 10^{-7}\, J . S^2 . C^{-2} . m^{-2}$. $\beta_N = 5{,}0508\ 10^{-27}\, JT^{-1}$ est le magnéton de Bohr nucléaire. Cette interaction renseigne donc sur la délocalisation électronique au niveau du noyau.

Le terme du couplage dipôle - dipôle s'écrit quant à lui :

$$\widehat{H}_{DD} = \vec{S} . \tilde{T} . \vec{I} \qquad (Eq.\ 49)$$

$\tilde{T}$ représente ici le tenseur de couplage dipolaire. Dans le cadre de l'approximation des dipôles ponctuels $\tilde{T}$ peut s'écrire :

$$\tilde{T} = \frac{\mu_0}{4\pi h} . \frac{g_e . \beta_e . g_N . \beta_N}{R^3} . \begin{pmatrix} -1 & 0 & 0 \\ 0 & -1 & 0 \\ 0 & 0 & 2 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} -T & 0 & 0 \\ 0 & -T & 0 \\ 0 & 0 & 2T \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} T_\perp & 0 & 0 \\ 0 & T_\perp & 0 \\ 0 & 0 & T_\parallel \end{pmatrix} (Eq. 50)$$

Ici T (en MHz) représente la constante de couplage dipolaire caractérisant l'anisotropie du couplage hyperfin et R représente la distance entre le centre de l'orbitale où siège l'électron et le noyau. Cette expression ne tient pas compte de l'anisotropie du tenseur $\tilde{g}$ et n'est rigoureusement valable que si $\tilde{g}$ est isotrope ou faiblement anisotrope et si la distance électron – noyau R est suffisamment grande, typiquement R > 0,25 nm.

Ainsi pour un tenseur hyperfin $\tilde{A}$ axial la matrice hyperfine s'écrit :

$$\tilde{A} = \begin{pmatrix} A_{iso} - T & 0 & 0 \\ 0 & A_{iso} - T & 0 \\ 0 & 0 & A_{iso} + 2T \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} A_\perp & 0 & 0 \\ 0 & A_\perp & 0 \\ 0 & 0 & A_\parallel \end{pmatrix} \qquad (Eq.\ 51)$$

Dans le cas d'un tenseur hyperfin $\tilde{A}$ rhombique, la matrice hyperfine devient :

$$\tilde{A} = \begin{pmatrix} A_{iso} - T(1+\delta) & 0 & 0 \\ 0 & A_{iso} - T(1-\delta) & 0 \\ 0 & 0 & A_{iso} + 2T \end{pmatrix} \qquad (Eq.\ 52)$$

où δ est le paramètre de rhombicité compris dans l'intervalle $[0\ ;\ 1]$.

L'interaction entre un spin électronique S et un spin nucléaire I quelconque donne lieu à un éclatement des raies RPE en 2I + 1 raies (figure II.11). Les règles de sélection deviennent alors :

$$\Delta M_s = \pm 1\ et\ \Delta M_I = 0$$

Les raies sont alors séparées les unes des autres de $\Delta B_i = \left|\frac{A_{ii}}{g_i . \beta}\right|$.

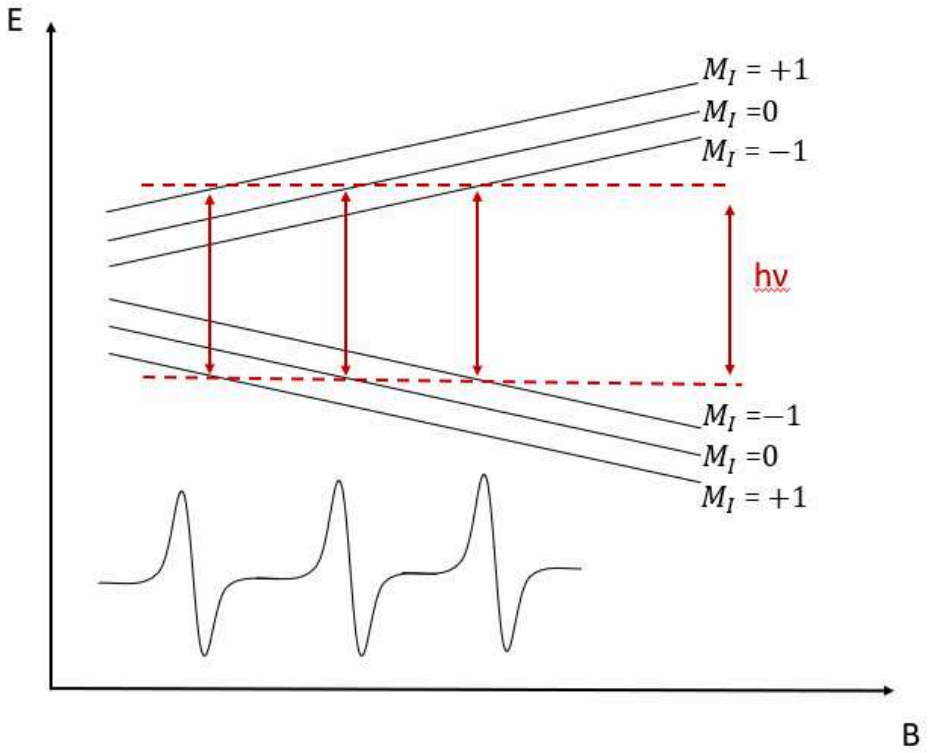


Figure II.11 Décomposition hyperfines des raies RPE pour un système couplé de spins S = 1/2 et I = 1.

IV.7 - Interaction Quadripolaire Nucléaire :

Les noyaux de spin nucléaire I > $^1/_2$ tels que ^{14}N et ^2H sont soumis à l'interaction quadripolaire nucléaire. La distribution anisotrope de charge dans ces noyaux conduit en effet à l'existence d'un moment quadripolaire nucléaire Q. Celui-ci réagit avec le gradient de champ électrique au niveau du noyau créé par les charges environnantes. Ces charges créent en effet un potentiel électrique U à partir duquel on calcule un champ électrique E défini comme $\vec{E} = -\overrightarrow{grad}(U)$. De cette dernière expression on peut définir le tenseur « gradient de champ électrique » dont l'écriture en coordonnées cartésiennes $(x_i,\ x_j, x_k)$ s'écrit $V_{ij} = \left(\frac{\partial^2 U}{\partial x_i \,.\, \partial x_j}\right)$.

L'interaction quadripolaire nucléaire est alors décrite par l'hamiltonien quadripolaire nucléaire ci-après :

$$\widehat{H}_{QN} = \vec{I} \,.\, \tilde{Q} \,.\, \vec{I} \qquad (Eq.\ 53)$$

$\tilde{Q}$ représente le tenseur quadripolaire nucléaire. Les éléments Q_{ij} de la matrice quadripolaire sont proportionnels au moment quadripolaire nucléaire Q qui dépend, lui, de la nature du noyau. Ces éléments sont aussi proportionnels aux éléments du tenseur de champ électrique V_{ij} selon l'équation :

$$Q_{ij} = \frac{e.V_{ij}.Q}{2I.(2I-1)} \qquad (Eq.\ 54)$$

Dans son système d'axes principaux, l'hamiltonien quadripolaire nucléaire peut se réécrire comme :

$$\widehat{H}_{QN} = Q_x.I_x^2 + Q_y.I_y^2 + Q_z.I_z^2 = \kappa\left[3I_z^2 - I(I+1)^2 + \eta\left(I_x^2 - I_y^2\right)\right] \qquad (Eq.\ 55)$$

$$\kappa = \frac{e^2.q.Q}{4I.(2I-1).h} \quad et \quad \eta = \frac{Q_{xx}-Q_{yy}}{Q_{zz}} \ (Eq.\ 56\ a \text{ et } b)$$

où κ et η représentent respectivement la constante de couplage quadripolaire et le paramètre d'asymétrie. La figure II.12 montre la répartition des niveaux d'énergie dans le cas d'une interaction quadripolaire nucléaire.

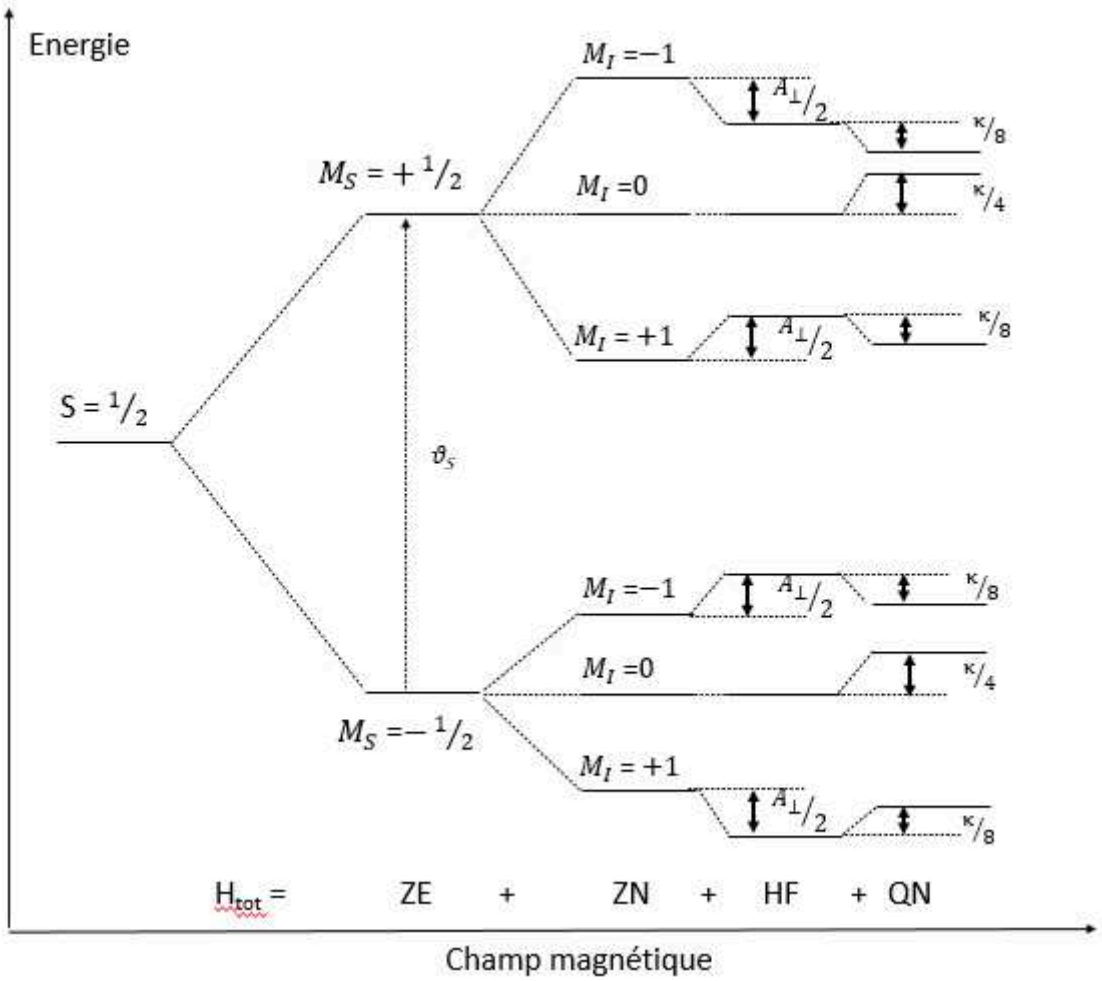


Figure II.12 Diagramme énergétique d'un système de spin S = 1/2 et I = 1. ν_S est la fréquence de Lamor électronique, $A_\perp$ est la constante de couplage hyperfin et κ est la constante de couplage quadripolaire. Les tenseurs hyperfins et quadripolaires sont supposés colinéaires et $|H_{ZN}| >> |H_{HF}| >> |H_{QN}|$.

IV.8 - Spectromètre RPE en onde continue

Pour ces travaux de recherche, j'ai utilisé la spectroscopie RPE en ondes continues (CW) en bande X, en bande Q et en bande W dont les fréquences sont respectivement de l'ordre de 9,6 GHz, 34 GHz et 95 GHz. Les expériences ont été menées sur un spectromètre Bruker de type EleXsys E500 équipé d'un cryostat ESR 900(Oxford instrument). Le dispositif expérimental schématisé sur la figure II.13 comprend en particulier un pont contenant la source micro-onde, la diode de détection, un bras de référence permettant de régler la phase du signal, le gain du

récepteur et le courant de polarisation de la diode détectrice (bias) et un circulateur destiné à aiguiller les micro-ondes. Le système contient également la cavité résonante dans laquelle l'échantillon est placé, les guides d'onde permettant de transmettre les micro-ondes. Un atténuateur est présent avant le circulateur afin de contrôler la puissance envoyée dans la cavité.

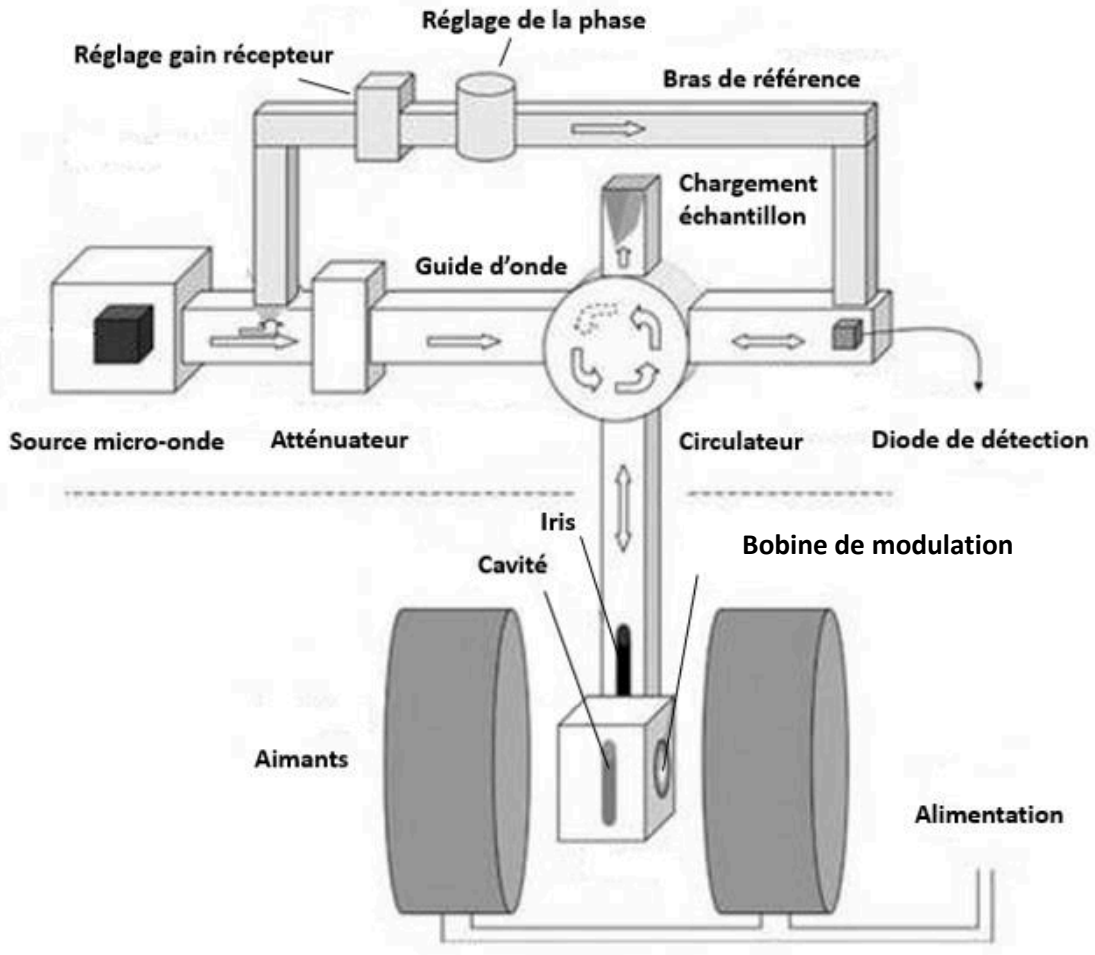


Figure II.13 Schéma d'un spectromètre RPE en ondes continues.

Pour la bande X, une cavité de type rectangulaire (ER4102ST) a été utilisée alors qu'une cavité cylindrique a été utilisée pour la bande Q (ER5106QT/W). Les expériences en bande W ont été menées sur un spectromètre Bruker Elexsys E680 équipé d'un aimant supraconducteur de 6 T et d'une bobine de balayage haute résolution (2 kG). Les spectres ont été enregistrés avec un résonateur standard équipé d'un système cryo-free (Stinger). Une correction en champ a été faite en simulant les contributions spectrales du Mn^{2+} avec $g(Mn^{2+}) = 2{,}00101 \pm 0{,}00005$ et une constante de couplage hyperfine de $A(Mn^{2+}) = -(8{,}710 \pm 0{,}003)$ mT. Les dimensions des

cavités sont comparables à la longueur d'onde de l'onde utilisée. Ces cavités permettent l'établissement d'un système d'ondes électromagnétiques stationnaires et elles sont couplées de manière critique à l'aide d'un iris afin d'absorber la totalité de l'énergie incidente. Les cavités sont positionnées entre les bobines de Helmholtz permettant de générer le champ magnétique statique $\overrightarrow{B_0}$ d'environ 0,3 T en bande X. En ondes continues, ces cavités sont caractérisées par leur facteur de qualité Q élevé qui traduit une forte absorption du rayonnement électromagnétique sur une bande passante réduite. Ce dernier dépend de la nature du matériau constituant la cavité, sa conductivité, ses dimensions, de son remplissage et des caractéristiques de l'échantillon introduit dans la cavité. Classiquement, en présence d'un échantillon protéique, le facteur de qualité du résonateur en bande X est de 3500. L'échantillon est placé au centre de la cavité, où le champ magnétique (B_1) est maximal. A la résonance l'échantillon absorbe une partie de l'énergie disponible et le couplage critique est ainsi rompu. Le signal de résonance enregistré est alors un signal d'absorption. En réalité, le signal expérimental détecté est la dérivée première de l'absorption par rapport au champ magnétique balayé en raison de l'utilisation d'une détection synchrone. Pour ce faire, le champ statique est modulé grâce à la présence de deux petites bobines insérées dans les parois de la cavité. Ces dernières produisent un champ magnétique de faible amplitude qui s'additionne au champ statique $\overrightarrow{B_0}$ et qui oscille dans la plupart des cas à 100 kHz. Lorsque la largeur de la raie est grande par rapport à l'amplitude du champ de modulation, le signal détecté correspond alors à la dérivée du signal d'absorption par rapport au champ B_0.

IV.8.1 - Paramètres expérimentaux pertinents :

L'optimisation des paramètres expérimentaux est primordiale lors de l'enregistrement de spectres RPE car ces derniers conditionnent la qualité du signal mesuré comme son amplitude mesuré et/ou le rapport signal sur bruit. Un compromis est alors à trouver entre la sensibilité et la résolution. Les paramètres expérimentaux importants sont la puissance de l'onde micro-onde incidente (P), les constantes de temps du filtre passe bas de la détection synchrone (TC) et de temps de conversion (CT), le gain du récepteur (RG), la température (T) et l'amplitude de modulation (MA). Une grande amplitude de modulation permet d'augmenter l'intensité du signal détecté mais si sa valeur est trop grande elle peut entrainer une surmodulation qui provoque une déformation du signal. Dans le cadre des travaux de recherches présentés ici,

les amplitudes de modulation utilisées sont typiquement comprises entre 1 et 10 G. Le rapport signal sur bruit d'un spectre RPE peut être amélioré en ajustant la constante de temps (TC) qui filtre le bruit en sortie du détecteur synchrone. Théoriquement le rapport signal sur bruit est d'autant meilleur que la constante de temps est grande. Néanmoins, en pratique une constante trop grande par rapport à la vitesse de balayage conduit à une distorsion du signal RPE voire à un filtrage de ce dernier. Le temps de conversion (CT) est, quant à lui, le temps nécessaire au convertisseur analogique numérique pour intégrer le signal à une valeur de champ donnée avant de passer à la suivante. Plus CT est grand, meilleur est le rapport signal/bruit mais plus le temps d'acquisition est grand.

De plus, le rapport signal sur bruit peut néanmoins toujours être amélioré en augmentant le nombre d'accumulation effectué (n), on améliore ainsi le rapport signal/bruit d'un facteur $\sqrt{n}$. Sauf mentionné explicitement, les spectres présentés dans cette thèse ont été enregistrés avec n = 1.

IV.8.3 - Relaxation, température et puissance micro-onde :

Deux types de relaxation sont distingués, liés aux deux façons que les spins électroniques, excités par l'onde électromagnétique utilisent pour redistribuer spontanément l'énergie absorbée en la transmettant soit à leurs voisins, soit à leur environnement.

Ce dernier mécanisme est appelé relaxation longitudinale ou relaxation spin-réseau. Il est défini par le temps T_1. Il se produit suivant trois principaux mécanismes :

- Un processus direct avec l'absorption ou l'émission d'un phonon,
- Un processus Raman avec la diffusion d'un phonon
- Un processus Orbach

L'autre mécanisme de relaxation permettant aux spins d'échanger leur énergie avec leurs voisins est la relaxation transversale ou relaxation spin – spin. Cette dernière est caractérisée par le temps T_2. Elle a lieu à l'intérieur du système de spins à la suite de diverses interactions entre eux. Par ce biais, les électrons peuvent passer d'un niveau d'énergie E_+ à E_- ou de E_- à E_+. Ici l'énergie totale du système est conservée. Les propriétés de relaxation d'un centre paramagnétique conditionnent la puissance micro-onde utilisée ainsi que la température

utilisée dans l'expérience RPE. Ces paramètres doivent donc être ajustés spécifiquement pour chaque type de centre dans un environnement donné.

A une température T donnée et une « faible » puissance micro-onde P, l'amplitude du signal est proportionnelle à $A_{RPE} \propto \sqrt{P}$. Pour un spin $^1/_2$, les populations de spins vont se distribuer sur deux niveaux. Cette distribution est régie par la distribution de Boltzmann selon :

$$\frac{n_1}{n_2} = e^{-\frac{\Delta E}{k_B.T}} \qquad (Eq.\ 57)$$

où n_1 et n_2 sont les populations des spins sur les niveaux d'énergies du système considéré ici, k_B est la constante de Boltzmann et T la température en Kelvin (K).

La probabilité d'avoir entre les niveaux 1 et 2 une transition en absorption est la même que la probabilité d'avoir une transition en émission entre ces deux niveaux. La source est la compétition entre les transitions induites par le rayonnement et les transitions spontanées de relaxation. Lorsque les premières dominent, les populations s'égalisent car la relaxation ne peut plus maintenir la différence de population exactement à l'équilibre. A forte puissance, au-delà d'un certain seuil caractéristique et dépendant de T_1, les populations entre les deux niveaux vont s'équilibrer. Ainsi il y aura autant de photons absorbés que de photons émis. Cela conduit à une diminution, voire une annulation, du signal RPE mesuré et à son élargissement. Pour éviter ces phénomènes de saturation, les spectres sont enregistrés à une puissance optimale définie où $A_{RPE} \propto \sqrt{P}$, donc en dessous de la puissance de saturation. La figure II.14 schématise l'évolution de l'amplitude RPE en fonction de $\sqrt{P}$ pour deux centres ayant des temps de relaxation différents.

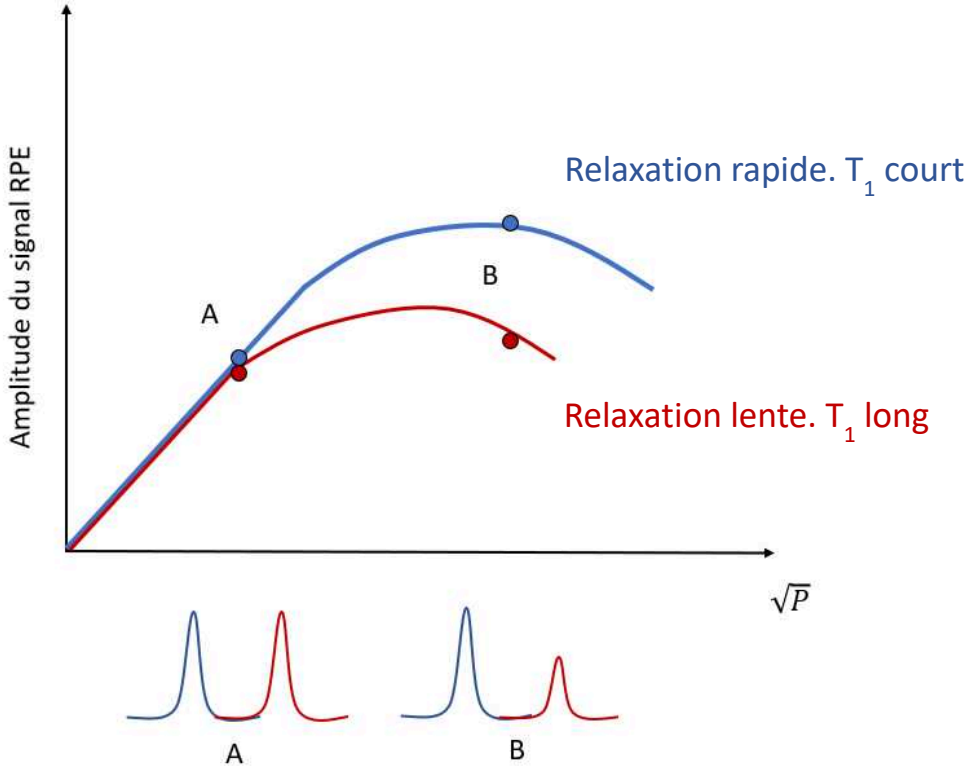


Figure II.14 Représentation du phénomène de saturation du signal RPE pour deux espèces paramagnétiques ayant des temps de relaxation différents. L'encart en dessous schématise la proportion relative des deux signaux dans les deux situations (A) et (B) considérées.

On constate que l'on peut faire varier la contribution spectrale relative de deux espèces par ajustement de la puissance.

Les centres possédant un temps de relaxation T_1 court ne seront visibles qu'à des températures cryogéniques. C'est le cas, par exemple dans cette étude, pour les centres FeS. Certains centres ne sont visibles qu'à des températures inférieures à 50 K alors que d'autres sont détectés de manière optimale à des températures de l'ordre ou supérieures à 50 K du fait de leur relaxation plus lente (espèces Mo^V, centres radicalaires organiques). Il est en effet connu sous le nom de Loi du Curie que pour un système de spin S = $^1/_2$ l'intensité du signal est inversement proportionnelle à la température.

IV.9 - Analyse des spectres RPE

IV.9.1 Position de la raie de résonance

Le paramètre g, donnant des informations sur la nature chimique et la structure électronique du centre paramagnétique est mesuré à partir du champ magnétique de résonance B au niveau du centre de la raie. La correction en champ à effectuer est alors calculée à partir de la mesure de la position de la raie de résonance sur le spectre RPE d'un échantillon de facteur g connu. Ici, nous avons utilisé le « weak pitch » fourni par Bruker (g = 2,0028).

IV.9.2 - Largeur de la raie

Deux types de raies sont observables sur un spectre RPE (figure II.15) :

- Les raies homogènes. Leur largeur est déterminée par la durée de vie des états entre lesquels a lieu la transition. Dans ce cas-là, la largeur à mi-hauteur de la raie, $\Delta B_{1/2}$ est inversement proportionnelle au temps de relaxation transverse T_2. $\Delta B_{1/2} \propto \frac{1}{T_2}$. Les raies sont alors fines (figures II.9A).
- Les raies inhomogènes. Ces dernières résultent de la superposition de plusieurs raies homogènes conduisant à l'élargissement de la raie RPE « globale » (figure II.9B). Cet élargissement peut provenir de la présence de faibles interactions hyperfines non résolues ou à de faibles variations de valeurs de g pour une même raie. Il conduit à des raies de largeurs supérieures à celle des raies homogènes. C'est par exemple le cas pour des signaux RPE des espèces radicalaires mesurées en solution gelée.

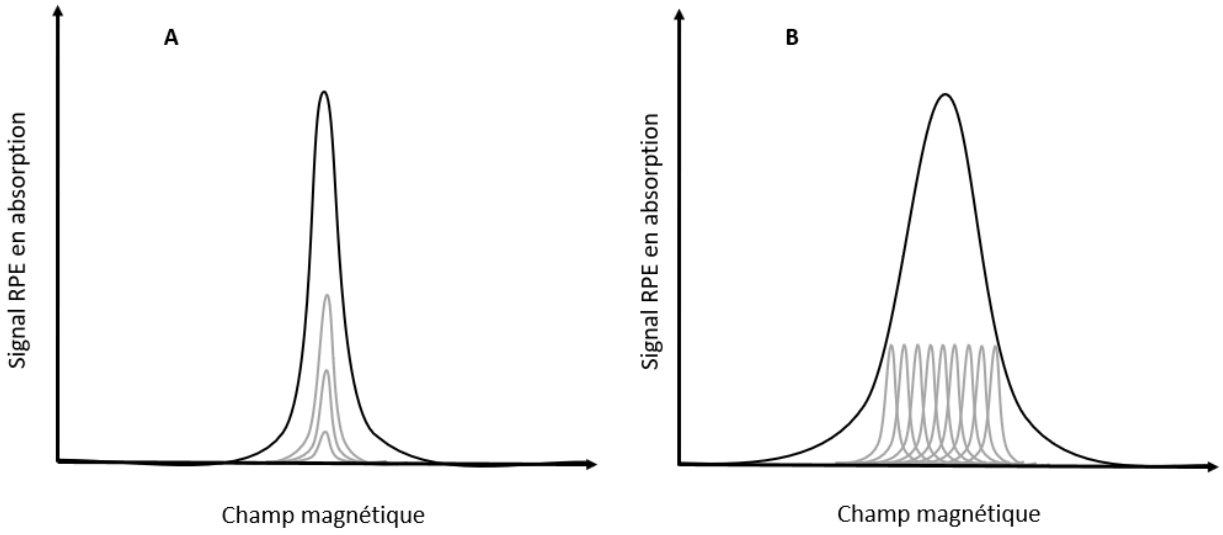


Figure II.15 : Composition d'une raie de RPE homogène (A) et inhomogène (B).

IV.9.3 - Intensité du signal RPE et quantification

L'intensité de la raie RPE est représentée par l'aire sous la courbe d'absorption, autrement dit, la double intégrale du signal dérivé obtenu en RPE. Cette intensité est proportionnelle au nombre de spins électroniques présents et donc à la concentration totale en spins dans l'échantillon. Dans notre étude, la quantification de spin a été mise en place pour mesurer la stœchiométrie des centres de ForCE 1 pour déterminer le nombre total de centres paramagnétiques dans l'échantillon réduit. Deux stratégies de quantification ont été utilisées. La première, à pH = 6,0, consiste à prendre un centre [4Fe4S] dans un état semi réduit dont le potentiel est proche du potentiel standard de ce centre et de considérer que son signal RPE représentait alors 0,5 spin. L'inconvénient est que la zone correspondant au potentiel standard est une zone où le moindre écart ou imprécision sur le potentiel de l'échantillon entraine une forte variation sur l'intensité du signal et donc du nombre de spins. En effet sur la représentation graphique d'une courbe de titrage, la zone de lecture du potentiel standard est la zone où la pente est la plus forte. A pH = 7,5 la même démarche consiste à utiliser le centre [2Fe2S] comme référence interne. En effet, sa signature spectrale, mesurable à 100 K, est bien isolée de celles des autres signaux RPE détectés dans l'enzyme. On fait l'hypothèse que son signal dans l'échantillon pleinement réduit représente 1 spin par enzyme. La deuxième stratégie permet une quantification absolue et consiste en la préparation d'un standard externe de concentration connue. Ici une solution de $CuSO_4$ préparée à 1,0 mM en présence d'EDTA à 10 mM dans du tampon Tris HCL à 100 mM et à pH = 8 a été utilisée. Le résultat de la double intégration du spectre acquis dans des conditions où le signal n'est ni saturé ni surmodulé est comparée à celle du signal à quantifier apès normalisation aux mêmes paramètres expérimentaux d'après l'équation 58.

$$\frac{I_{Ref}}{I} = \frac{C_{Ref}}{C} \cdot \frac{MA_{Ref}}{MA} \cdot \frac{T}{T_{Ref}} \cdot \frac{CT_{Ref}}{CT} \cdot \frac{10^{\frac{RG_{Ref}}{20}}}{10^{\frac{RG}{20}}} \cdot \frac{\sqrt{P_{Ref}}}{\sqrt{P}} \cdot \frac{n_{Ref}}{n} \cdot \frac{g_{moy\,Ref}}{g_{moy}} \qquad (Eq.\ 58)$$

où I est l'intensité du signal de l'espèce étudiée de spin S, MA l'amplitude de modulation utilisée, T la température en K de l'échantillon. C'est la concentration en spin de l'échantillon, CT représente le temps de conversion, n le nombre d'accumulations du signal enregistré à la puissance P avec un gain récepteur RG (mesuré en dB) et associé au facteur g_{moy}. L'indice « Ref » désigne simplement qu'il s'agit de l'échantillon de référence.

La concentration en spins dans l'échantillon peut alors être calculée d'après l'équation suivante :

$$C = \frac{MA_{Ref}.I.T.C_{Ref}.CT_{Ref}.\sqrt{P_{Ref}}.g_{moy_{Ref}}.n_{Ref}}{MA.CT.T_{Ref}.I_{Ref}.\sqrt{P}.g_{moy}.n}.10^{\frac{-RG+RG_{Ref}}{20}} \qquad (Eq.\ 59)$$

IV.10 - Simulation des spectres

Les simulations des spectres RPE CW de poudre sont réalisés en utilisant la fonction « pepper » du logiciel EasySpin[117] qui est une boite à outils développée sous MATLAB pour la simulation des spectres RPE. Dans le cadre de nos recherches nous avons utilisé pour les différents centres des systèmes de spin $^1/_2$ où les largeurs de raies ont été modélisées en utilisant 3 fonctions différentes. I) La fonction gStrain permet de rendre compte d'un élargissement des raies dû à une distribution des valeurs de g autour de leurs valeurs principales g_x, g_y, g_z. ii) Les fonctions lwpp et lw sont des fonctions qui génèrent des largeurs de raie respectivement pic – à – pic et à mi – hauteur selon un profil Gaussien, Lorentzien ou de Voigt. Les valeurs rentrées dans ces fonctions sont arbitraires et n'ont pas de sens physique. III) La fonction HStrain définit la largeur d'une raie inhomogène due à des couplages hyperfins non résolus. Trois composantes sont alors données en MHz indiquant alors la largeur à mi-hauteur de la raie dans les trois directions des axes moléculaires, correspondant aux trois directions principales du tenseur $\tilde{g}$. Les couplages hyperfins sont également simulés en entrant comme paramètres les valeurs des couplages (en MHz) selon les trois axes x, y, z propres du tenseur $\tilde{A}$. Il est également possible de définir l'orientation du tenseur $\tilde{A}$ par rapport à la matrice $\tilde{g}$ au travers des 3 angles d'Euler (en degrés). Par défaut, ces angles sont réglés à 0° dans les simulations présentées sauf mention contraire.

V - Spectroscopie RPE Impulsionnelle

Pour mesurer des couplages faibles non résolus sur le spectre RPE en ondes continues, tels que hyperfins ou quadripolaires, dont les effets perturbatifs sur les niveaux d'énergie sont du second ordre comparé à l'effet Zeeman électronique, les techniques de spectroscopie RPE à plus haute résolution peuvent être utilisées. Ces dernières sont les spectroscopies ESEEM (Electron Spin Echo Enveloppe Modulation), HYSCORE (Hyperfine Sublevel CORrelation) et

ENDOR (Electron Nuclear DOuble Resonance). En effet les interactions hyperfines et quadripolaires modifient les énergies des sous-niveaux Zeeman nucléaires. Elles contiennent des informations importantes sur la nature des noyaux magnétiques en interaction présents dans l'environnement direct du centre paramagnétique.

V.1 - Principes

Contrairement à la méthode de RPE en ondes continues, en RPE impulsionnelle le système est mis hors équilibre par des impulsions micro-ondes envoyées sur l'échantillon. Ceci provoque un basculement du vecteur aimantation macroscopique $\vec{M}$ dans le référentiel du laboratoire, définis comme le moment magnétique par unité de volume pour n spins.

$$\vec{M} = \frac{1}{V}.\sum_{i=1}^{n}\vec{\mu}_i \qquad (Eq.\ 60)$$

En présence du champ $\vec{B}_0$ et à l'équilibre thermique, $\vec{M}$ est aligné parallèlement au champ $\vec{B}_0$. Le mouvement du moment magnétique pour un ensemble de spins électroniques dans un champ $\vec{B}_0$ est défini par l'équation qui suit :

$$\frac{d\vec{M}}{dt} = \vec{M} \wedge \frac{-g_e.\beta_e}{\hbar}.\vec{B}_0 \qquad (Eq.\ 61)$$

Cette équation décrit le mouvement de précession de $\vec{M}$ autour de $\vec{B}_0$ à la fréquence de Larmor ω_S :

$$\omega_S = \frac{g_e.\beta_e.B_0}{\hbar} \qquad (Eq.\ 62)$$

V.2 - Génération d'un écho de spin

L'application d'une impulsion micro-onde de fréquence ν induit un champ micro-onde $\vec{B}_1(t)$ polarisé perpendiculairement à $\vec{B}_0$ tel que :

$$B_1(t) = B_1.\cos(2\pi.\vartheta.t) \qquad (Eq.\ 63)$$

Cette impulsion d'une durée t_p en résonance avec les spins électroniques permet alors de faire basculer l'aimantation $\vec{M}$ d'un angle θ donné par la relation ci-après :

$$\theta = \frac{g.\beta_e.B_1}{\hbar}.t_p \qquad (Eq.\ 64)$$

Les impulsions π permettent le basculement de l'aimantation $\vec{M}$ d'un angle $\theta = 180°$. D'un point de vue microscopique, ces impulsions inversent les populations sur les niveaux énergétiques entre lesquels se font les transitions RPE. Les impulsions $^{\pi}/_{2}$, quant à elles, permettent le basculement de l'aimantation $\vec{M}$ d'un angle $\theta = 90°$. Elles permettent l'égalisation des populations de Boltzmann sur les niveaux énergétiques concernés par les transitions.

V.3 - ESEEM à deux impulsions

V.3.1 - Echo de spin à deux impulsions

Les expériences d'ESEEM sont basées sur la génération et la détection d'un écho de spin électronique (ESE) suite à l'irradiation du système par une séquence d'impulsion micro-onde. La séquence d'impulsions la plus simple le permettant est la séquence de Hahn décrite pour la première fois en 1950[118]. L'écho de Hahn ou « écho primaire » est observé après la séquence suivante : $^{\pi}/_{2} - \tau - \pi - \tau - écho$. τ représente ici un temps durant lequel le système évolue librement. L'écho de spin peut ainsi être compris comme résultant d'un phénomène d'interférences constructives venant de la refocalisation des aimantations microscopiques qui évoluent à des vitesses différentes (paquet de spins). Il est dû à l'émission cohérente d'une partie de l'énergie absorbée par le système. Les aimantations microscopiques donnent ainsi naissance à une aimantation macroscopique détectable.

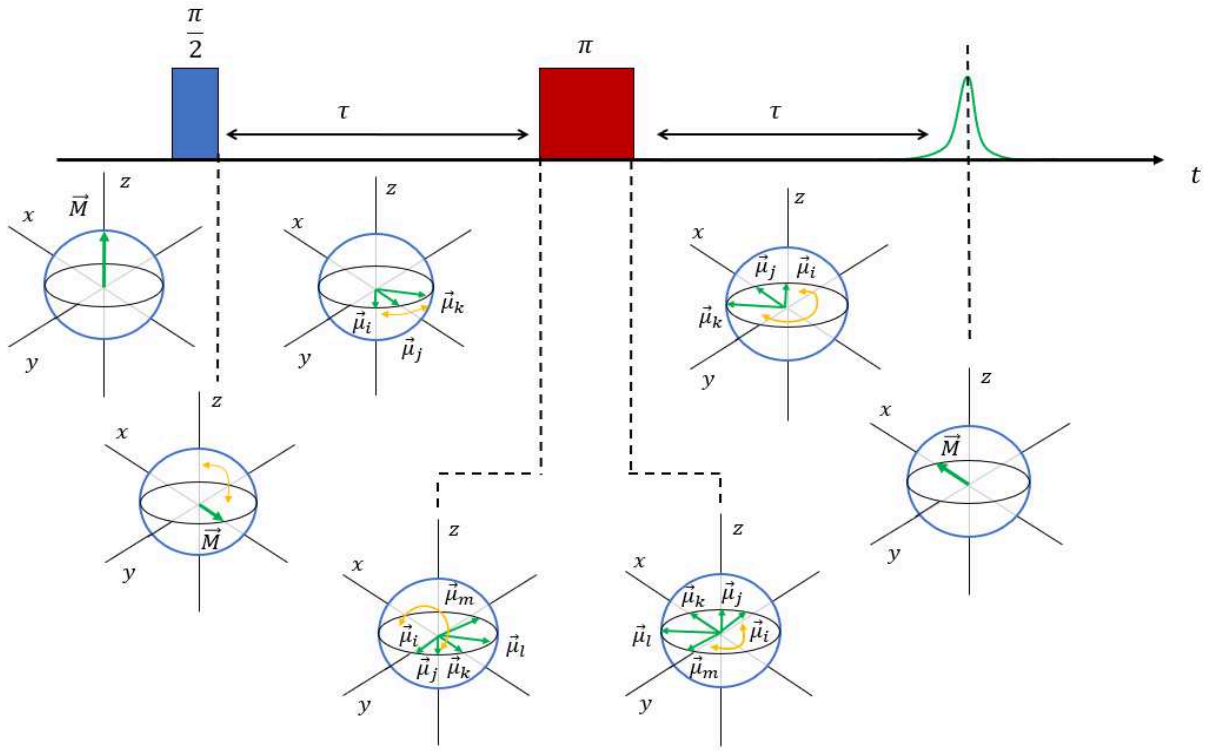


Figure II.16 Evolution spatio-temporelle de l'aimantation d'un échantillon paramagnétique au cours d'une séquence de Hahn à deux impulsions conduisant à la formation d'un écho de spin. Le comportement de l'aimantation dans la sphère de Bloch est représenté à différents stades d'avancement de la séquence d'impulsion.

Dans la représentation vectorielle semi-classique (figure II.16), l'aimantation est parallèle à l'axe z, définie par la direction du champ magnétique B_0, à l'équilibre thermique. L'impulsion $\pi/2$ de départ permet de faire basculer le vecteur aimantation autour de l'axe y, dans la direction – x. Cette première impulsion va générer une cohérence électronique qui va être transférée d'une transition à l'autre par la deuxième impulsion. Durant le temps τ où le système évolue librement, les paquets de spin ayant des fréquences de Larmor différentes, autrement dit des fréquences de précession angulaire différentes, vont subir un déphasage. Dans le référentiel tournant à la fréquence de la micro-onde, la défocalisation des paquets de spins conduit à une diminution de l'amplitude du vecteur aimantation macroscopique. L'impulsion π fait ensuite basculer les vecteurs d'aimantation d'un angle $\theta = 180°$ et, après le même temps τ que précédemment, ces différents vecteurs se refocalisent dans la direction x, produisant un écho de spin.

En 1965, Rowan et al.[119] ont constaté, sur des échantillons d'un minéral de formule $CaWO_4$ appelé scheelite dopée avec des ions de cérium (III) où ces derniers sont couplés au ^{183}W, que la décroissance de l'écho de spin au cours du temps, quand la durée τ est incrémentée, est modulée de manière sinusoïdale aux fréquences correspondant aux fréquences des transitions nucléaires du tungstène ainsi qu'à leurs combinaisons. Mims et al.[120] explique en 1972 que cette modulation de l'enveloppe de l'écho de spin électronique peut s'expliquer par le fait que l'impulsion π en plus d'inverser la phase de la cohérence électronique, répartit cette cohérence de manière égale sur toutes les transitions de spin électronique qu'elles soient autorisées ou interdites.

V.3.2 – Le modèle du système couplé (S = $^1/_2$, I = $^1/_2$)

L'expérience d'ESEEM à deux impulsions consiste alors à mesurer les variations d'intensité de l'écho de spin obtenu dans le plan transverse grâce à une séquence d'impulsions micro-ondes en faisant varier le temps τ. En présence d'une interaction hyperfine anisotrope, l'intensité de l'écho est modulée par les fréquences nucléaires des noyaux couplés. On peut comprendre cet effet en considérant un système simple de spin S = $^1/_2$ caractérisé par un tenseur $\tilde{g}$ isotrope couplé à un noyau de spin nucléaire I = $^1/_2$ avec un tenseur $\tilde{A}$ anisotrope. L'hamiltonien de spin dans le référentiel tournant s'écrit alors :

$$H_S = \Omega_S S_z + \omega_I I_z + A.S_z I_z + B.S_z I_x \qquad (Eq.\ 65)$$

Où Ω_S représente l'écart entre la fréquence de résonance ω_S et la fréquence micro-onde ω_{mw}, soit : $\Omega_S = \omega_S - \omega_{mw}$. A et B quant à eux représentent respectivement la partie séculaire et pseudo séculaire du couplage hyperfin.

De plus, $\pm\frac{1}{2} g_I \beta_I B_0 = \pm\frac{1}{2}\omega_I \hbar$. On a ainsi $\omega_I = \frac{g_I \beta_I B_0}{\hbar}$ la précession de Larmor du noyau au champ H_0 appliqué avec $\beta_I = \beta_N$, B_0 le champ magnétique, g_I le facteur g nucléaire du noyau de spin nucléaire I. Ils sont définis dans le cadre d'une interaction hyperfine décrite par un tenseur :

$$A = A_{/\!/} \cos^2\theta + A_\perp \sin^2\theta = a_{iso} + T(3\cos^2\theta - 1) \qquad (Eq.\ 66)$$

$$B = \left(A_{/\!/} - A_\perp\right) \sin\theta \cos\theta = 3T \sin\theta \cos\theta \qquad (Eq.\ 67)$$

θ représente l'angle entre le vecteur électron – noyau et le champ statique $\vec{B}_0$. T représente la constante de couplage dipolaire. Dans le cas du système couplé (S = $^1/_2$, I = $^1/_2$), les vecteurs propres de l'hamiltonien correspondant aux différents niveaux énergétiques s'écrivent à l'ordre 1 : $|+^1/_2,+^1/_2\rangle$; $|+^1/_2,-^1/_2\rangle$; $|-^1/_2,+^1/_2\rangle$; $|-^1/_2,-^1/_2\rangle$.

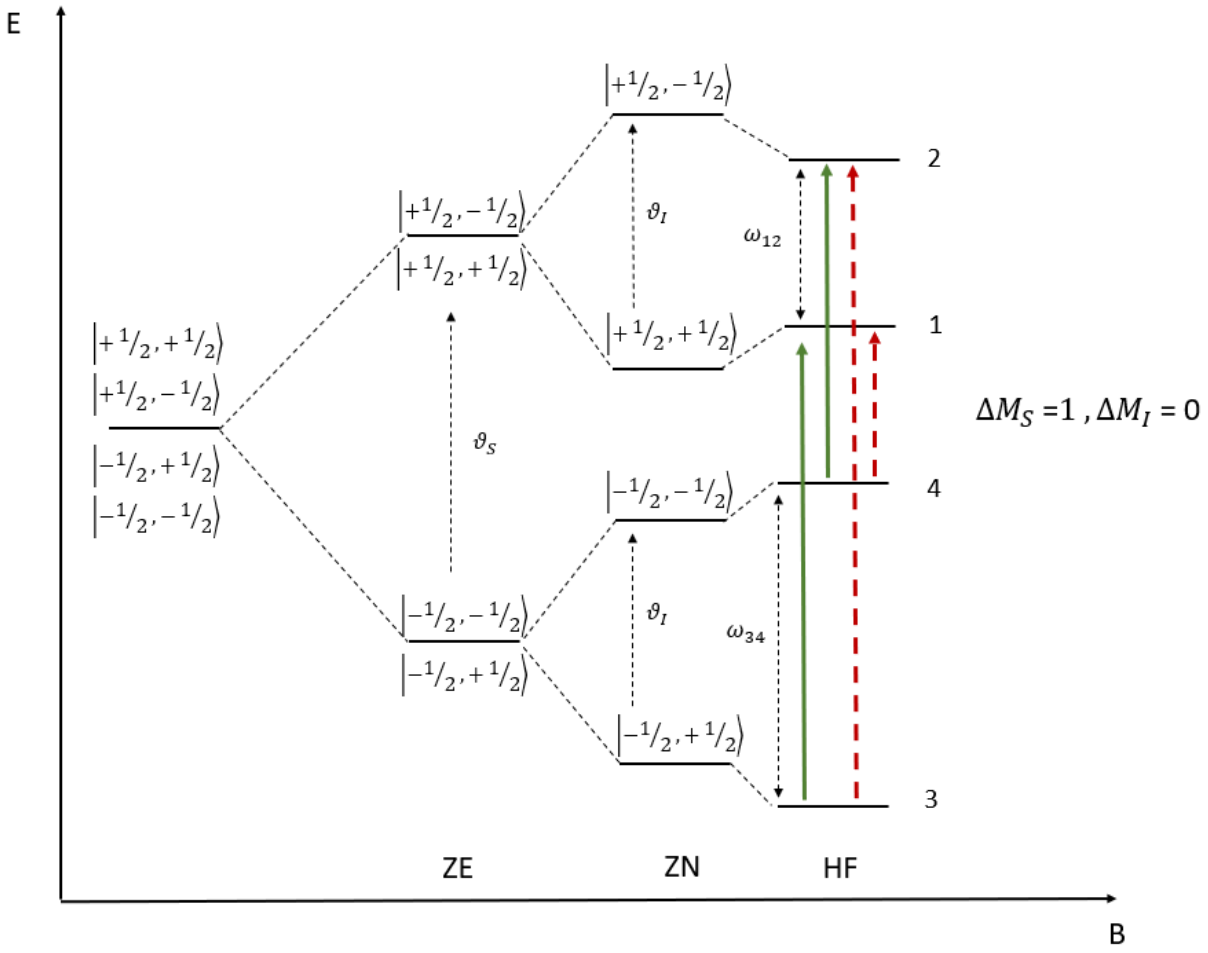


Figure II.17 Diagramme énergétique d'un système S = 1/2 et I = 1/2 construit en considérant un tenseur $\tilde{g}$ isotrope et un tenseur $\tilde{A}$ anisotrope. ν_S est la fréquence de Lamor électronique, ν_I la fréquence de Lamor nucléaire du noyau concerné. ω_{12} et ω_{34} sont les fréquences de transitions nucléaires mesurées dans une expérience d'ESEEM, ω_{14} et ω_{23} sont les fréquences des transitions électroniques interdites ou semi-interdites induites après la deuxième impulsion π et sont représentées en traits pointillées rouge. ω_{13} et ω_{24} sont les fréquences des transitions RPE permises (en trait plein vert) satisfaisant à la règle de sélection $\Delta M_S = \pm 1, \Delta M_I = 0$.

V.3.3 – Effet ESEEM

Les expériences ESEEM reposent sur l'excitation simultanée des transitions RPE autorisées ω_{13} et ω_{24} ainsi que des transitions « interdites » ω_{14} et ω_{23}. Celles-ci devenant partiellement

permises par le biais d'un mélange des états $|M_S, M_I\rangle$ causé par l'anisotropie de l'interaction hyperfine. Les fréquences des transitions interdites et permises sont données par :

$$\omega_{13} = \omega_S + \frac{\omega_-}{2} \; ; \; \omega_{24} = \omega_S - \frac{\omega_-}{2} \; ; \; \omega_{14} = \omega_S + \frac{\omega_+}{2} \; ; \; \omega_{23} = \omega_S - \frac{\omega_+}{2}.$$

$$Avec \begin{cases} \omega_+ = \omega_\alpha + \omega_\beta \\ \omega_- = \omega_\alpha - \omega_\beta \end{cases} \qquad (Eq. 68a)$$

ω_α et ω_β représentent les fréquences des transitions nucléaires ou transitions RMN qui vérifient les règles de sélection $\Delta M_S = 0$; $\Delta M_I = \pm 1$. Ces fréquences sont elles-mêmes données par :

$$\omega_\alpha = |\omega_{12}| = \left[\left(\omega_I + \frac{A}{2}\right)^2 + \left(\frac{B}{2}\right)^2\right]^{1/2} \; ; \; \omega_\beta = |\omega_{34}| = \left[\left(\omega_I - \frac{A}{2}\right)^2 + \left(\frac{B}{2}\right)^2\right]^{1/2} \quad (Eq. 68b)$$

Cette modulation, pour un système couplé de spins (S = $^1/_2$, I = $^1/_2$) est décrite par :

$$V_{2p}(\tau) = 1 - \frac{k}{4}\left[2 - 2\cos(\omega_\alpha \tau) - 2\cos(\omega_\beta \tau) + \cos(\omega_- \tau) + \cos(\omega_+ \tau)\right] \; (Eq. 68c)$$

$k = \left(\frac{B\omega_I}{\omega_\alpha \omega_\beta}\right)^2$ est alors la profondeur de la modulation et B est défini dans l'équation 67.

Le paramètre k dépend donc de l'anisotropie du couplage hyperfin. Ainsi, aucune modulation (k = 0) est observée dans le cas d'une interaction hyperfine purement isotrope pour laquelle B = 0.

Cette équation est valable pour tout système paramagnétique en interaction avec un noyau de spin I = $^1/_2$, comme c'est le cas par exemple des radicaux flaviniques et quinoniques. Cependant pour des systèmes en interaction avec des noyaux de spin un tels que ^{14}N et ^2H (I = 1) possédant ainsi des moments quadripolaires et perturbant légèrement les sous niveaux nucléaires, l'équation reste pertinente mais avec :

$$k = \frac{4}{3} I.(I+1).k_{1/2} \qquad (Eq. \; 69)$$

où $k_{1/2}$ est le paramètre k pour le système S = $^1/_2$ et I = $^1/_2$.

Dans le cas d'une expérience d'ESEEM à deux impulsions sur un système de N noyaux couplés, on a :

$$V_{2p_{Totale}}(\tau) = \prod_{i=1}^{N} V_{2p_i}(\tau) \qquad (Eq.\ 70)$$

En ESEEM à deux impulsions, la décroissance de l'amplitude de l'écho de spin est liée à la relaxation transverse, elle-même caractérisée par le temps de mémoire de phase électronique, T_m^e, généralement de l'ordre de quelques centaines de nanosecondes pour les espèces étudiées ici. Les phénomènes de modulation se superposent à la décroissance exponentielle du signal. Ainsi la modulation observée expérimentalement pour un spin électronique couplé à un spin nucléaire est décrite par :

$$V'_{2p}(\tau) = e^{\frac{-\tau}{T_m^e}}.V_{2p}(\tau) \qquad (Eq.\ 71)$$

La spectroscopie ESEEM à deux impulsions a néanmoins plusieurs inconvénients :

- En plus des transitions nucléaires ω_α et ω_β, les combinaisons des fréquences nucléaires $\omega_\pm = \omega_\alpha \pm \omega_\beta$ interviennent aussi dans la modulation de l'écho et sont donc également détectées sur un spectre ESEEM. Sachant qu'en présence de plusieurs noyaux interagissant l'effet de la modulation est multiplicatif, le nombre de fréquences ainsi détectées augmente drastiquement pour un système de spin couplé à plusieurs noyaux. Généralement ceci conduit à un encombrement spectral dû au chevauchement des pics qui se traduit par l'élargissement des raies spectrales et donc une faible résolution.
- Comme mentionné précédemment, le temps de mémoire de phase électronique T_m^e est très court ce qui conditionne la durée de vie de la modulation et donc la largeur des raies dans le domaine fréquentiel.

Pour remédier à ces problèmes, l'ESEEM à trois impulsions peut être utilisée.

V.4 - ESEEM à trois impulsions :

Dans un article publié en 1972, W. B. Mims[120] développe l'ESEEM à trois impulsions. La séquence est la suivante : $^{\pi}/_{2} - \tau - {}^{\pi}/_{2} - T - {}^{\pi}/_{2} - \tau - écho$. Elle conduit à l'obtention d'un écho de spin dit « stimulé » (figure II.18). La variation de l'amplitude de l'écho de spin est mesurée en fonction du temps T, incrémenté au cours de l'expérience, séparant

les deux dernières impulsions. La valeur de τ reste quant à elle fixée. Premièrement, cette méthode ne génère pas de pics aux fréquences de combinaison, $\omega_{\pm}$, des fréquences de transitions nucléaires et deuxièmement la largeur des raies ne dépend plus de temps de mémoire de phase électronique T_m^e mais du temps de mémoire de phase nucléaire T_m^n. Or $T_m^n > T_m^e$, les raies sont dès lors plus étroites. De plus, elle permet d'observer des modulations de l'écho de spin sur des temps plus longs ce qui simplifie grandement l'analyse des spectres. Ceci est dû au fait que, durant le temps T, ce sont les processus de relaxation longitudinaux qui sont à l'œuvre, caractérisés par le temps de relaxation longitudinal T_1, et non plus les processus de relaxation transversaux caractérisés, eux, par les temps de relaxation transversaux T_2 ou T_m généralement plus courts que T_1.

Par soucis de clarté, je me dois de rappeler ici que l'aimantation $\vec{M}$ peut se décomposer en deux composantes :

- L'aimantation longitudinale $\vec{M}_z$ selon l'axe z (direction du champ magnétique appliqué).
- L'aimantation transverse $\vec{M}_{xy}$ selon le plan transverse définis par x et y.

Le retour de $\vec{M}$ à son état initial représente le processus de relaxation. Le retour de l'aimantation longitudinale suit une cinétique du premier ordre définie par la constante de temps T_1. De même, l'aimantation transversale retourne à sa position d'origine en suivant une cinétique de premier ordre dont la constante de temps est T_2.

La séquence d'ESEEM à trois impulsions est très proche de celle décrite à deux impulsions plus haut (Figure II.18). En effet on peut considérer que l'impulsion π présente dans la séquence de Hahn a été ici décomposée en deux impulsions $\pi/2$. Ainsi le vecteur de l'aimantation évolue de manière similaire jusqu'à la seconde impulsion $\pi/2$. Ces deux impulsions $\pi/2$ créent des cohérences nucléaires. Ces dernières vont évoluer librement dans le plan longitudinal durant le temps T.

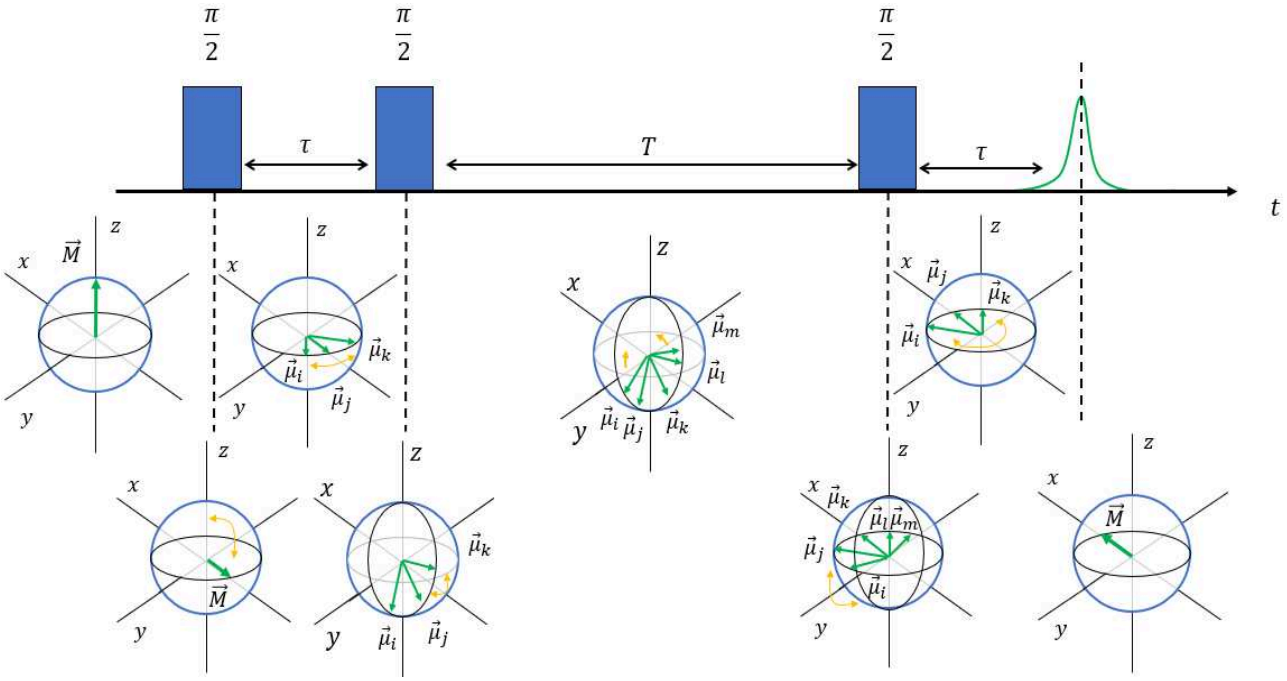


Figure II.18 : Evolution spatio-temporelle de l'aimantation macroscopique d'un système paramagnétique pendant une expérience d'ESEEM à 3 impulsions : $^{\pi}/_{2} - \tau - {}^{\pi}/_{2} - T - {}^{\pi}/_{2}$ – écho, montrant le mécanisme de formation d'un écho de spin stimulé.

L'amplitude de la modulation de l'écho stimulé V_{3p} pour un système (S = $^{1}/_{2}$, I = $^{1}/_{2}$) décrite par :

$$V_{3p}(\tau) = \frac{1}{2}\left[V^{\alpha}(\tau,T) + V^{\beta}(\tau,T)\right] \qquad (Eq.\ 72)$$

$V^{\alpha}(\tau,T)$ est la contribution du multiplet électronique α :

$$V^{\alpha}(\tau,T) = 1 - \frac{k}{2}\left[1 - \cos(\omega_{\beta}\tau)\right]\left[1 - \cos(\omega_{\alpha}(\tau + T))\right] \qquad (Eq.\ 73)$$

où k est la profondeur de modulation, $V^{\beta}(\tau,T)$ représente la contribution du multiplet électronique β :

$$V^{\beta}(\tau,T) = 1 - \frac{k}{2}\left[1 - \cos(\omega_{\alpha}\tau)\right]\left[1 - \cos\left(\omega_{\beta}(\tau + T)\right)\right] \qquad (Eq.\ 74)$$

Et comme nous l'avons vu précédemment pour l'ESEEM à deux impulsions, pour un système de spin S = $^{1}/_{2}$ couplé à N noyaux magnétiques, on a une contribution multiplicative des N noyaux à la modulation de l'enveloppe de l'écho qui s'écrit alors :

$$V'_{3p}(\tau) = \frac{1}{2}\left[\prod_{i=1}^{N} V_i^{\alpha}(\tau,T) + \prod_{i=1}^{N} V_i^{\beta}(\tau,T)\right] \qquad (Eq.\ 75)$$

Un point important est l'apparition de « blind spots » dont il faut tenir compte à chaque fois que la cohérence nucléaire est générée par une séquence $^{\pi}/_{2} - \tau - {}^{\pi}/_{2}$. Ainsi, les amplitudes $V^{\alpha}(\tau,T)$ et $V^{\beta}(\tau,T)$ dépendent respectivement des facteurs $1 - \cos(\omega_{\beta}\tau)$ et $1 - \cos(\omega_{\alpha}\tau)$. Les pics aux fréquences ω_{α} et ω_{β} peuvent être entièrement supprimés quand $\cos(\omega_{\alpha(\beta)}\tau)$ = 1, c'est-à-dire pour des valeurs telles que $\tau = \frac{2\pi\tau}{\omega_{\alpha(\beta)}}$. Ceci est appelé l'effet de suppression et il est donc nécessaire d'enregistrer de spectres à différentes valeurs de τ afin d'éviter la perte de certaines fréquences.

V.5 - Spectroscopie HYSCORE

V.5.1 - Les cohérences électroniques et nucléaires

La cohérence est définie comme un comportement quantique commun à plusieurs spins. La cohérence électronique est donc porteuse d'information sur le spin de l'électron comme la cohérence nucléaire l'est sur le spin nucléaire. Les cohérences sont représentées sur un diagramme de niveau d'énergie sur la figure II.19.

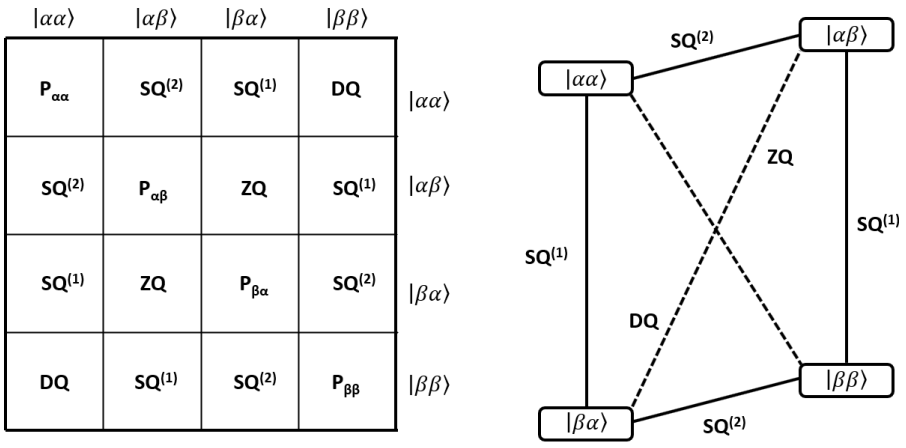


Figure II.19 : A gauche : matrice densité pour un système à quatre états de deux spins couplés $S_1 = S_2 = ½$. P_{ij} représentent les populations des états. Les éléments non-diagonaux représentent les cohérences « zero-quantum » (ZQ), les cohérences « single quantum » et les cohérences « double-quantum ». Les cohérences sont explicitées sur le diagramme d'énergie représenté à droite.

V.5.2 – Spectroscopie HYSCORE

La spectroscopie HYSCORE permet de visualiser des corrélations entre le système paramagnétique considéré et différents noyaux magnétiques ($I \neq 0$) sur un spectre en 2D dont chaque dimension correspond à un spectre d'ESEEM à 4 impulsions. Les séquences d'ESEEM à 4 impulsions et HYSCORE sont donc identiques. La séquence HYSCORE comprend quatre pulses. Le premier pulse $\pi/2$ permet la création d'une cohérence électronique dans le plan transverse. Le deuxième pulse $\pi/2$, permet de transférer les cohérences électroniques en cohérences nucléaires dans le plan longitudinal. Ici les transferts de cohérences électroniques en cohérences nucléaires se traduisent par un changement de M_I en conservant le même M_S. Le troisième pulse π non sélectif permet de faire un changement de Ms en conservant le même M_I. Ceci permet de transférer les cohérences électroniques d'un doublet à l'autre. Enfin la dernière impulsion $\pi/2$ permet de détecter l'écho dans le plan transverse. La séquence HYSCORE est donc $\pi/2 - \tau - \pi/2 - t_1 - \pi - t_2 - \pi/2 - \tau - écho$ (figure II.20), avec ici τ ayant une valeur fixée et t_1 et t_2 étant incrémentés indépendamment. L'écho stimulé est donc inversé par l'impulsion π et sa mesure produit un jeu bidimensionnel de données en temps qui conduit à l'obtention d'un spectre 2D en fréquence, après transformée de Fourier à deux dimensions. Découverte en 1986 par le groupe de Höfer et al.[121] sous le nom de spectroscopie de corrélation des sous-niveaux hyperfins, cette technique permet d'engendrer des corrélations entre les fréquences des transitions nucléaires. Les deux premières impulsions $\pi/2$ vont engendrer une cohérence nucléaire qui va évoluer librement dans le multiplet $|\alpha\rangle$ ou $|\beta\rangle$ selon certaines fréquences durant le temps t_1. Ces cohérences nucléaires évoluent de nouveau durant le temps t_2 avec de nouvelles fréquences. Enfin la dernière impulsion $\pi/2$ va transférer ces cohérences nucléaires en cohérences électroniques et l'écho stimulé, modulé par les fréquences nucléaires, est détecté.

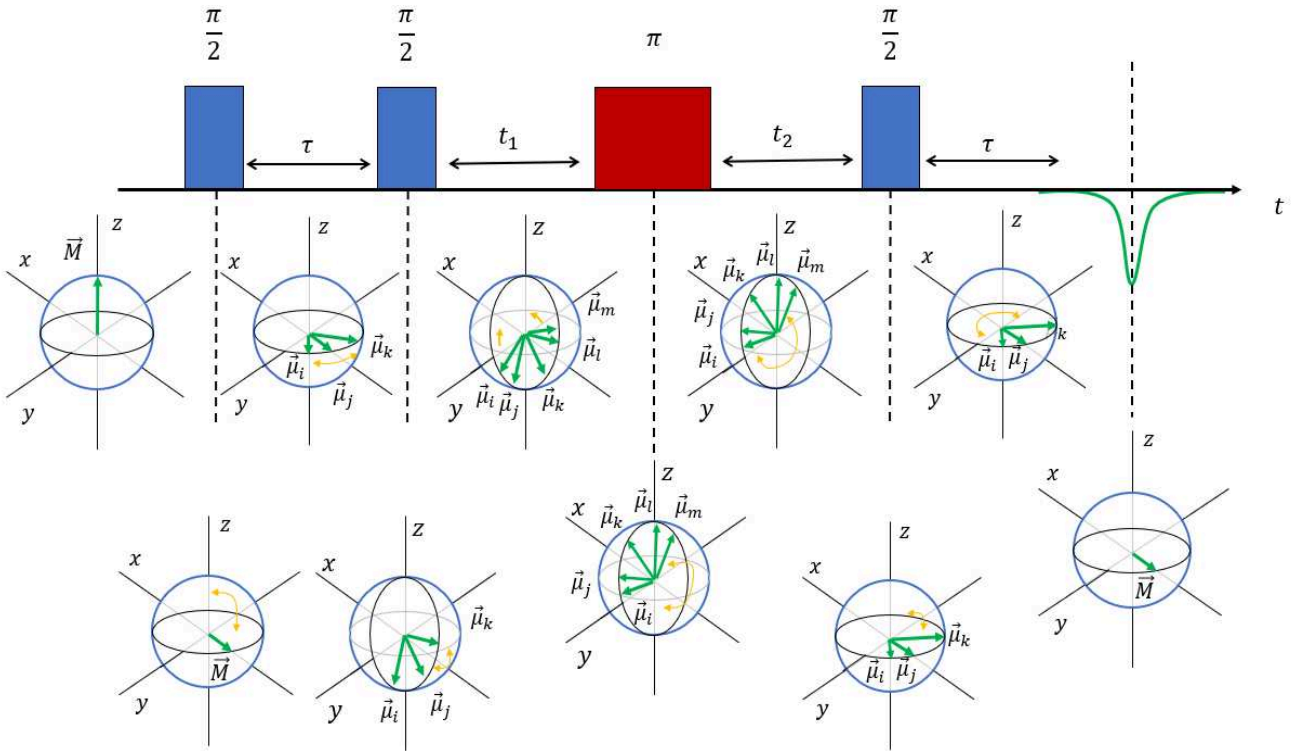


Figure II.20 Séquence d'impulsions pour une expérience HYSCORE où t_1 et t_2 représentent les temps incrémentés au cours de l'expérience.

Pour un système de spins couplés (S = $^1/_2$, I = $^1/_2$), des impulsions idéales et une matrice $\tilde{g}$ isotrope, la modulation de l'écho mesurée dans une expérience HYSCORE est décrite par :

$$V_{4p}(\tau, t_1, t_2) = \frac{1}{2}\left[V^{\alpha\beta}(\tau, t_1, t_2) + V^{\beta\alpha}(\tau, t_1, t_2)\right] \qquad (Eq.\ 76)$$

où :

$$\begin{aligned} V^{\alpha\beta}(\tau, t_1, t_2) = 1 \\ - \frac{k}{2}\Big\{\frac{C_0}{2} + C_\alpha \cos\left[\omega_{12}\left(t_1 + \frac{\tau}{2}\right)\right] + C_\beta \cos\left[\omega_{34}\left(t_2 + \frac{\tau}{2}\right)\right] \\ + C_c\left[\cos^2\eta \cos\left(\omega_{12}t_1 + \omega_{34}t_2 + \omega_+\frac{\tau}{2}\right)\right. \\ \left. - \sin^2\eta\, cos\left(\omega_{12}t_1 - \omega_{34}t_2 + \omega_-\frac{\tau}{2}\right)\right]\Big\} \qquad (Eq.\ 77) \end{aligned}$$

et :

$$V^{\beta\alpha}(\tau, t_1, t_2) = 1 - \frac{k}{2}\left\{\frac{C_0}{2} + C_\alpha \cos\left[\omega_{12}\left(t_2 + \frac{\tau}{2}\right)\right] + C_\beta \cos\left[\omega_{34}\left(t_1 + \frac{\tau}{2}\right)\right] + C_c\left[\cos^2\eta \cos\left(\omega_{34}t_1 + \omega_{12}t_2 + \omega_+\frac{\tau}{2}\right) - \sin^2\eta \cos\left(\omega_{34}t_1 - \omega_{12}t_2 - \omega_+\frac{\tau}{2}\right)\right]\right\} \quad (Eq.\ 78)$$

Ici les coefficients $C_\alpha, C_\beta\ et\ C_C$ sont données comme suit :

$$C_0 = 3 - \cos(\omega_{12}\tau) - \cos(\omega_{34}\tau) - \sin^2\eta\cos(\omega_+\tau) - \cos^2\eta\cos(\omega_-\tau)$$

$$C_\alpha = \cos^2\eta\cos\left(\left(\omega_{34} - \frac{\omega_{12}}{2}\right)\tau\right) + \sin^2\eta\cos\left(\left(\omega_{34} + \frac{\omega_{12}}{2}\right)\tau\right) - \cos\left(\omega_{12}\frac{\tau}{2}\right)$$

$$C_\beta = \cos^2\eta\cos\left(\left(\omega_{12} - \frac{\omega_{34}}{2}\right)\tau\right) + \sin^2\eta\cos\left(\left(\omega_{12} + \frac{\omega_{34}}{2}\right)\tau\right) - \cos\left(\omega_{34}\frac{\tau}{2}\right)$$

$$C_C = -2\sin\left(\omega_{12}\frac{\tau}{2}\right)\sin\left(\omega_{34}\frac{\tau}{2}\right)$$

Ces dernières sont données en fonction de l'angle η tel que 2 η correspond à l'angle entre les deux axes de quantification nucléaire dans les deux multiplets électroniques repérés par rapport au champ statique $\overrightarrow{B_0}$ dans le calcul des probabilités des transitions autorisées P_A et interdites P_I données par $P_A = cos^2\eta = \frac{\left|\omega_I^2 - \frac{1}{4}\omega_-^2\right|}{\omega_\alpha\omega_\beta}$ et $P_I = sin^2\eta = \frac{\left|\omega_I^2 - \frac{1}{4}\omega_+^2\right|}{\omega_\alpha\omega_\beta}$ avec $\omega_- = \omega_\alpha - \omega_\beta$ et $\omega_+ = \omega_\alpha + \omega_\beta$. Une transformée de Fourier du signal temporel nous donne accès au spectre HYSCORE dans le domaine fréquentiel comprenant quatre quadrants, couvrant les signes possibles des fréquences dans les deux dimensions. Sachant que le spectre obtenu est symétrique par rapport à l'origine, deux quadrants suffisent, comme (+ +) et (- +), pour l'interprétation. De plus, trois types de pics peuvent être rencontrés sur un spectre HYSCORE. En effet, les termes dans les équations donnant $V^{\alpha\beta}(\tau, t_1, t_2)$ et $V^{\beta\alpha}(\tau, t_1, t_2)$ dépendent des coefficients $C_\alpha$et C_β proviennent du transfert de la cohérence nucléaire à la polarisation et réciproquement. Ces termes produisent des pics sur les axes aux fréquences $(0, \omega_{12}), (0, \omega_{34}), (\omega_{12}, 0), (\omega_{34}, 0\ )$ (figure II.21).

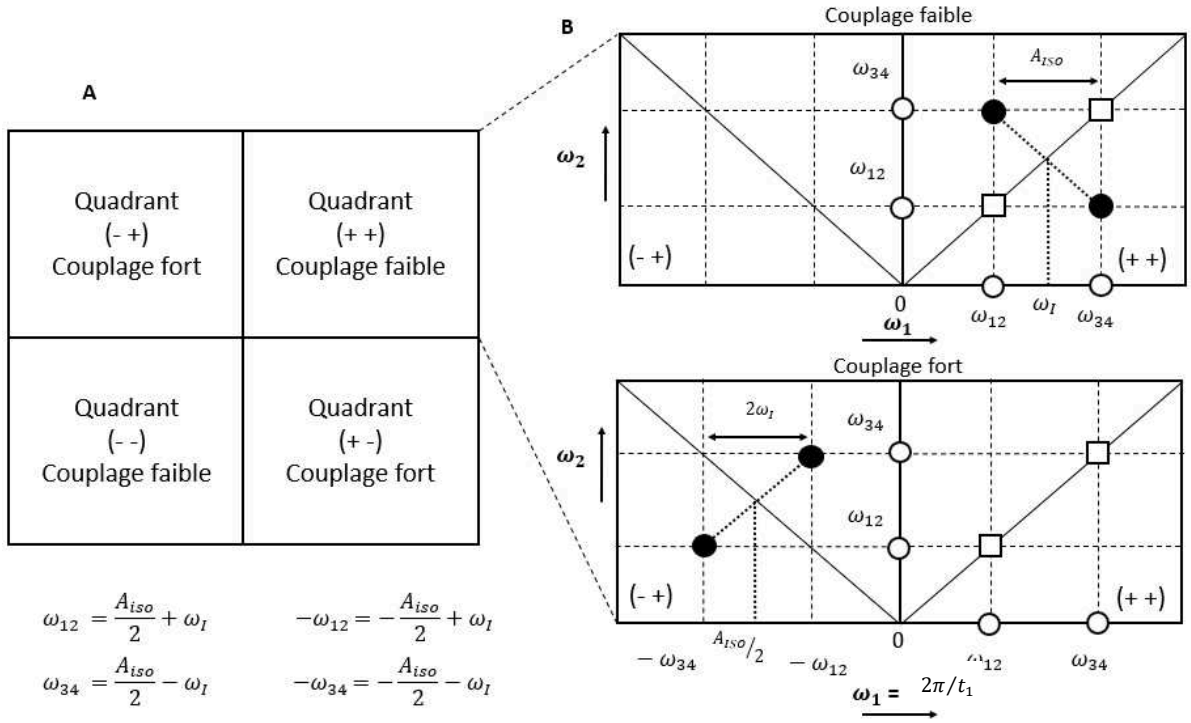


Figure II.21 : (A) représentation des quatre quadrants composant un spectre HYSCORE. (B) représentation schématique des pics présents sur un spectre HYSCORE. Seuls les quadrants (-,+) et (+,+) sont représentés. Le cas d'un couplage faible, $|a_{iso}| < 2|\omega_I|$ est considéré en haut alors que celui d'un couplage fort $|a_{iso}| > 2|\omega_I|$ est considéré en bas. Avec $\omega_1 = {}^{1}/_{t_1}$. Adapté de Harmer et al.[122]

Les termes dépendant du coefficient C_c proviennent du transfert de la cohérence nucléaire d'un multiplet électronique à l'autre et donnent des pics de corrélation non diagonaux aux fréquences (ω_{12}, ω_{34}) et(ω_{34}, ω_{12}) avec pour facteur de probabilité $\cos^2\eta$, et des pics de corrélation aux fréquences ($-\omega_{34}, \omega_{12}$) et ($-\omega_{12}, \omega_{34}$) avec pour facteur de probabilité $\sin^2\eta$ (cercles pleins sur la figure II.21). On peut distinguer trois cas :

- Pour les couplages forts $|a_{iso}| > 2|\omega_I|$, soit $\cos^2\eta << \sin^2\eta \sim 1$, l'amplitude de modulation est positive. Cela implique que les fréquences nucléaires ω_{12} et ω_{34} sont de signes opposés. Ainsi, les pics de corrélation (ω_{12}, $-\omega_{34}$) et (ω_{34}, $-\omega_{12}$) sont dominants dans le quadrant (- +).

- Pour les couplages faibles $|a_{iso}| < 2|\omega_I|$, soit $\sin^2\eta << \cos^2\eta \sim 1$, l'amplitude de modulation est positive. Cela implique que les fréquences nucléaires ω_{12} et ω_{34} sont de même signe. Ainsi, les pics de corrélation (ω_{12}, ω_{34}) et (ω_{34}, ω_{12}) sont dominants dans le quadrant (+ +). Au premier ordre, ils apparaissent aux fréquences ${A_{iso}}/{2} \pm \omega_I$.

- Pour les couplages intermédiaires, $2|\omega_I| \sim |a_{iso}|$, les pics de corrélation ont une intensité comparable dans les deux quadrants considérés.

De plus, des pics peuvent également apparaitre sur la diagonale aux coordonnées (ω_{12}, ω_{12}) et (ω_{34}, ω_{34}) dans le cas où l'impulsion π est non-idéale. Ils sont représentés dans la figure II.21 par des carrés. Cette non-idéalité implique que le transfert de la cohérence nucléaire n'est pas complet. Il est important de noter aussi qu'à part les facteurs de probabilités $\cos^2\eta$ et $\sin^2\eta$, l'intensité des pics en HYSCORE est aussi déterminée par le paramètre de profondeur de modulation k et le coefficient C_c. Ce dernier induit des blind-spots aux fréquences $\vartheta_n = \frac{n}{\tau}$ $(n = 0, 1, 2, \dots)$ dans les deux dimensions. C'est pour cela qu'il est important de réaliser des expériences HYSCORE à différentes valeurs de τ. De plus cet effet de suppression dépendant de τ peut aussi supprimer les signaux présents, par exemple, à la fréquence de Larmor des protons. On peut ainsi choisir une valeur de τ qui supprime la contribution des protons de la matrice et qui, sinon, conduit généralement à un pic diagonal très intense à la fréquence de Larmor. Cela permet d'observer les pics de plus faible intensité proches de la fréquence de Larmor.

V.5.3 - Analyse des spectres HYSCORE

V.5.3.1 - Cas des système S = ½, I = ½

Dans le cas d'un couplage hyperfins axial fort ($|a_{iso}| > 2|\omega_I|$) les pics de corrélation apparaissent dans le quadrant (- +) et l'anisotropie est à l'origine d'une élongation des pics parallèlement à l'antidiagonale et séparés par $2\omega_I$ (figure II.22 A). De façon analogue pour un couplage hyperfin axial faible ($|a_{iso}| < 2|\omega_I|$), les pics de corrélation apparaissent dans le quadrant (+ +) et le même phénomène d'élongation des pics dû à l'anisotropie est observé. L'amplitude de la projection des arcs sur la diagonale $\Delta\omega_{max}$ depuis ω_I est liée à la constante de couplage dipolaire selon la formule suivante[123] :

$$\Delta\omega_{max} = \frac{9}{32}\frac{T^2}{|\omega_I|} \qquad (Eq.\ 79)$$

La détermination de T à partir de la mesure du décalage $\Delta\omega_{max}$ à ω_I permet de s'affranchir du fait que l'intensité des extrémités des arcs, correspondant aux orientations du champ

magnétique parallèle à l'un des axes principaux du tenseur hyperfin, s'annule car la profondeur de modulation *k* vaut zéro dans ces cas. Les fréquences correspondantes aux extrémités de ces axes sont :

$$\omega_{\alpha(\beta)\perp} = \left|\omega_I + (-)^{A_\perp}/_2\right|$$

$$\omega_{\alpha(\beta)//} = \left|\omega_I + (-)^{A_{//}}/_2\right|$$

où α et β correspondent aux multiplets électroniques, $A_\perp = a_{iso} - T$ et $A_{//} = a_{iso} + 2T$. Les fréquences ϑ_α et ϑ_β vérifient la relation $\left|\vartheta_\alpha + \vartheta_\beta\right| = 2\omega_I$ si $A_{\perp(//)} < 2\omega_I$ et $\left|\vartheta_\alpha - \vartheta_\beta\right| = 2\omega_I$ si $A_{\perp(//)} > 2\omega_I$.

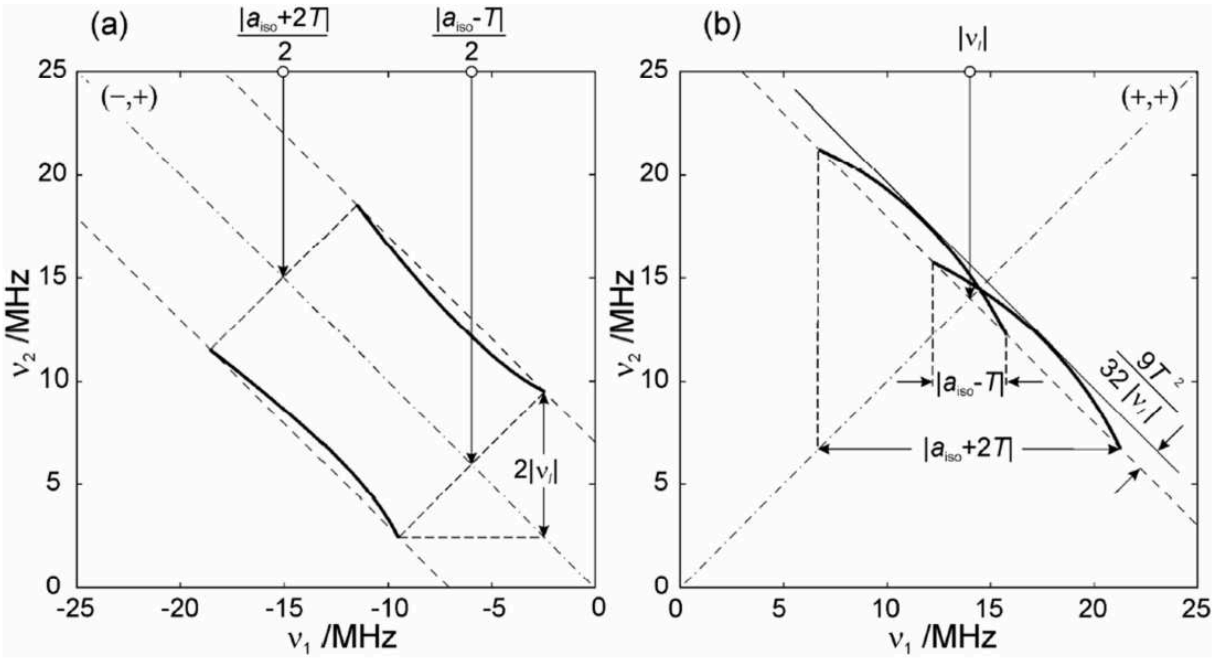


Figure II.22 : Spectre HYSCORE théorique pour un système de spins couplés S = ½ et I = ½ avec des tenseurs $\tilde{g}$ et $\tilde{A}$ colinéaires. A) cas d'un couplage fort avec $a_{iso} = 18\ MHz, \omega_I = 3{,}5\ MHz$ et $T = 6\ MHz$. B) cas d'un couplage faible avec $a_{iso} = 2{,}5\ MHz, \omega_I = 14\ MHz$ et $T = 6\ MHz$. Adapté de Harmer et al.[122]

Une autre méthode proposée par Dikanov et al.[124] pour déterminer les paramètres de couplage consiste à représenter le spectre HYSCORE en mode quadratique. Les fréquences ϑ_α^2 et ϑ_β^2 sont en effet reliées par l'équation linéaire :

$$\left|\vartheta_{\alpha(\beta)}\right| = \left(Q_{\alpha(\beta)}\vartheta_{\beta(\alpha)}^2 + G_{\alpha(\beta)}\right)^{1/2} \qquad (Eq.\ 80)$$

avec $Q_{\alpha(\beta)} = \frac{T + 2a_{iso} - (+)\, 4\omega_I}{T + 2a_{iso} + (-)\, 4\omega_I}$ et $G_{\alpha(\beta)} = \frac{+(-)\, 2\omega_I\left(4\omega_I^2 - a_{iso}^2 + 2T^2 - a_{iso}T\right)}{T + 2a_{iso} + (-)\, 4\omega_I}$ $(Eq. 81\ a\ et\ b)$

Ces quantités représentent respectivement la pente de la droite et son ordonnée à l'origine. La détermination de $Q_{\alpha(\beta)}$ et de $G_{\alpha(\beta)}$ par un ajustement linéaire des maxima d'amplitude des crêtes du signal HYSCORE permet d'obtenir quatre jeux de données possibles pour les couples a_{iso} et T compte tenu des incertitudes sur l'attribution des fréquences ν_α et ν_β,

$$|T| = \frac{2}{3}\left(\frac{\pm\left[G_{\alpha(\beta)}\left(F_{\alpha(\beta)} \pm 4\omega_I\right)\right]}{2\omega_I} - 4\omega_I^2 + \frac{F_{\alpha(\beta)}^2}{4}\right)^{1/2} \qquad (Eq.\ 82)$$

$$a_{iso} = \frac{F_{\alpha(\beta)} - T}{2} \qquad (Eq.\ 83)$$

$$o\grave{u}\ F_{\alpha(\beta)} = \frac{\mp 4\omega_I\left(Q_{\alpha(\beta)} + 1\right)}{Q_{\alpha(\beta)} - 1} \qquad (Eq.\ 84)$$

Selon le choix de cette attribution, les paramètres $Q_\alpha, Q_\beta, G_\alpha$ et G_β sont liés par :

$$Q_\alpha = \frac{1}{Q_\beta} \text{ et } G_\alpha = -Q_\alpha G_\beta$$

V.5.3.2 - Cas d'un système S = ½ et I = 1

Les noyaux de spin nucléaire I = 1 les plus fréquemment étudiés dans les études d'ESEEM/HYSCORE des biomolécules sont les noyaux ^{14}N et ^{2}H. Le couplage quadripolaire peut induire un éclatement supplémentaire des raies dans le spectre en fréquence. Ces dernières correspondent à des transitions dites simple quantum notées ν_{sq} et des transitions double quantum notées ν_{dq} ($\Delta M_I = 2$).

Dans ce cas-là, l'expression analytique des fréquences de transition nucléaire est calculée dans le cas *i*) d'un tenseur $\tilde{g}$ isotrope, *ii*) d'une approximation de champ fort et *iii*) pour des orientations arbitraires des tenseurs quadripolaire et hyperfin par rapport au champ magnétique. Dans le cas des modulations ESEEM, il n'y a pas de formule analytique. Néanmoins, les fréquences de ces transitions nucléaires peuvent varier en fonction des constantes quadripolaires[120,125–128]. Dans un spectre de poudre, les transitions appelées double quanta induisent des pics aux fréquences suivantes :

$$\nu_{dq} = 2\left(\nu_{ef\pm}^2 + c\right) \qquad (Eq.\ 85)$$

où $\nu_{ef\pm} = \left|\nu_I \pm {}^{a_{iso}}/_{2}\right|$ et $c^2 = \kappa^2(3+\eta^2)$

Cette équation est valable si la constante hyperfine anisotrope notée T, est faible comparée à la constante hyperfine isotrope, A_{iso}, et à l'interaction quadripolaire. Une anisotropie de l'interaction hyperfine affecte principalement la forme du pic mais pas les fréquences de transition double quanta.

V.5.3.3 - Condition de compensation

La condition de compensation désigne le cas particulier où l'interaction hyperfine est compensée par l'effet Zeeman nucléaire dans l'un des multiplets électroniques permettant de faire la lecture directe sur le spectre HYSCORE des fréquences quadripolaires pures. C'est le cas par exemple quand un noyau de spin I = 1 (^{14}N) est en interaction avec un système de spin S = ${}^{1}/_{2}$. Ces fréquences quadripolaires pures d'un des multiplets électroniques ν_0, ν_- et ν_+ sont liées en elles par :

$$\nu_0 + \nu_- = \nu_+ \qquad (Eq.\ 86)$$

Une quatrième fréquence directement accessible depuis le spectre HYSCORE est celle de la transition double quanta, ϑ_{dq}, de l'autre multiplet électronique (figure II.23).

Ainsi, la condition de compensation permet d'avoir accès facilement aux constante quadripolaire et paramètre d'asymétrie, respectivement κ et η puisque ces derniers sont liés aux fréquences quadripolaires pures par :

$\nu_0 = 2\kappa\eta$

$\nu_- = \kappa(3-\eta)$

$\nu_+ = \kappa(3+\eta)$

De plus, ϑ_{dq} s'exprime en fonction de A, κ et η par :

$\nu_{dq} = 2\left[\left(\nu_I \pm \frac{A}{2}\right)^2 + \kappa^2(3+\eta^2)\right]$, où ν_I est la fréquence de Larmor du noyau considéré.

On peut ainsi calculer κ selon :

$$\kappa = \frac{\nu_+ + \nu_-}{6}, \qquad \kappa = \frac{2\nu_+ - \nu_0}{6}, \qquad \kappa = \frac{2\nu_- + \nu_0}{6} \qquad (Eq.\ 87\ a, b \text{ et } c)$$

Et on peut calculer η selon :

$$\eta = \frac{3\nu_0}{2\left(\nu_- + \frac{\nu_0}{2}\right)},\ \eta = \frac{3\nu_0}{2\left(\nu_+ - \frac{\nu_0}{2}\right)},\ \eta = \frac{3\,(\nu_+ - \nu_-)}{\nu_+ + \nu_-} \qquad (Eq.\ \ 88\ a, b \text{ et } c)$$

Ce qui donne pour le calcul de A :

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

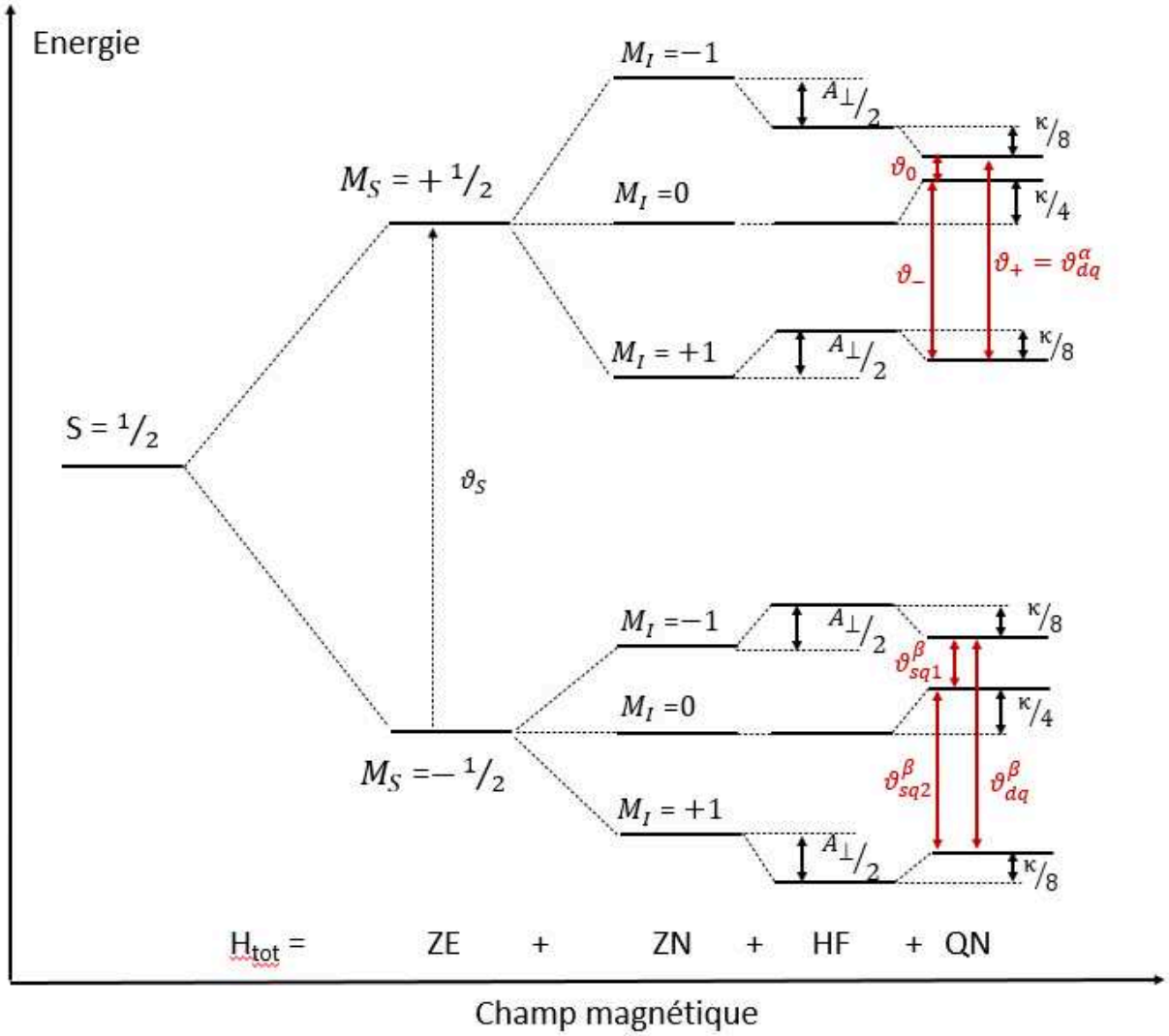


Figure II.23 : Diagramme énergétique pour un système de spin couplés (S = ½, I = 1). ν_S est la fréquence de Larmor électronique, $A_\perp$ est la constante de couplage hyperfin et κ est la constante de couplage quadripolaire. Les tenseurs hyperfins et quadripolaires sont supposés coaxiaux et $|H_{ZN}| >> |H_{HF}| >> |H_{QN}|$.

V.6 - Enregistrement et traitement des spectres expérimentaux

V.6.1 - Paramètres expérimentaux

Afin d'enregistrer un spectre ESEEM/HYSCORE exploitable, il est nécessaire d'ajuster un certain nombre de paramètres. Les principaux paramètres sont :

- Le temps de répétition de la mesure (Shot Repetition Time, SRT) correspondant à la durée séparant deux séquences consécutives d'impulsion. Ce paramètre est ajusté en fonction du temps de relaxation T_1 du centre étudié. Ce temps correspond en pratique au temps de répétition de l'expérience soit le temps à attendre entre deux séquences successives d'impulsion. Typiquement, il doit être d'environ $5T_1$ afin de s'assurer que le système revienne à son état d'équilibre initial avant la mesure suivante.

- Le nombre de mesures par point du spectre (noté h).

- Le nombre d'accumulations (ou scans, noté n). Les paramètres SRT, h et n contrôlent la durée de l'expérience et conditionnent le rapport s/b. La résolution en fréquence (Δf) des expériences ESEEM/HYSCORE dépend de la durée totale d'acquisition (T) du signal selon : $\Delta f = 1/T$

- Le champ magnétique. Il est fixé suite à la réalisation d'une expérience de balayage de champ « field sweep » avant chaque expérience ESEEM. L'expérience « field sweep » consiste en l'application d'une séquence de Hahn dans laquelle le temps τ n'est pas incrémenté, et d'un balayage en champ magnétique. Le signal enregistré correspond à l'amplitude de l'écho de spin mesurée à chaque valeur de champ dans la gamme explorée. Dans les études menées dans cette thèse, la valeur du champ correspondant à l'amplitude maximale du signal obtenu est celle pour laquelle un maximum de Mo^V et de radicaux organiques réagissent aux impulsions. Cette valeur est fixée dans les expériences ESEEM. Généralement la valeur de champ correspondant est de l'ordre de ~ 346 mT en bande X (~ 9.6 GHz). Les longueurs d'impulsion et la puissance des micro-ondes influencent l'angle de nutation de l'aimantation, la largeur de bande d'excitation et le temps d'acquisition. La résolution temporelle maximale du spectromètre est de 2 ns. En fonction de la puissance micro-onde disponible, des

longueurs d'impulsion comprises entre 12 ns et 16 ns pour des impulsions $\pi/2$ et 24 ns et 32 ns pour des impulsions π ont été utilisées.

- La phase de détection. Le matériel permet la détection en quadrature. La phase de détection est configurée pour optimiser le signal dans l'un des deux canaux (le canal dit «réel»). Les spectres ESEEM n'étant pas sensibles à la phase de détection, seule la partie réelle du signal est conservée avant le traitement des données.
- Incréments de temps et nombre de points d'acquisition qui déterminent la résolution dans les spectres de domaine de fréquence. Les données HYSCORE incluent généralement 256 x 256 points de données.
- Le cyclage de phase : Lors de la mise en œuvre d'une séquence de plus de deux impulsions, plusieurs échos sont générés qui peuvent interférer au cours de l'expérience avec l'écho mesuré. Afin de supprimer ces interférences, une procédure de cyclage de phase est utilisée. Elle consiste à varier de manière contrôlée la phase des impulsions de l'expérience et à combiner judicieusement les signaux alors obtenus (Gemperle et al[129]). Dans le cas d'une séquence ESEEM à trois impulsions cinq échos au total sont générés, dont l'écho stimulé désiré. Par exemple, après la deuxième et la troisième impulsion, des échos de Hahn ou échos primaires sont créés aux temps 2τ, $(\tau+2T)$, et $2(\tau+T)$. En plus de ceux-ci, un écho refocalisé avec une phase négative est formé au temps 2T. Un cyclage de phase en quatre étapes a été utilisé pour supprimer la contribution des échos non désirés en ESEEM à 3 impulsions.

V.6.2 - Traitement du signal :

Les spectres ESEEM expérimentaux sont des traces dans le domaine temporel. Effectuer une transformation de Fourier permet la séparation des différents composants donnant lieu à la modulation ESEEM. Le traitement du signal se déroule en plusieurs partie et il faut veiller à ne pas supprimer les fréquences des modulations existantes, et à ne pas en introduire d'artéfactuelles. Ainsi, la décroissance globale de l'écho due aux processus de relaxation est éliminée en corrigeant la ligne de base à l'aide d'une fonction mono- ou bi-exponentielle décroissante (ESEEM à deux et trois impulsions) ou polynomiale (HYSCORE). Afin d'augmenter la résolution dans le domaine fréquentiel, le nombre de points a été doublé par ajout de zéros

(Zero filling) à la fin du spectre, suivi d'une étape de deux fenêtrages identiques à l'aide d'une fonction Hamming. Cette dernière procédure permet d'atténuer la transition entre le jeu de points expérimentaux et le jeu de zéros ajoutés qui conduirait à des oscillations non désirées après transformée de Fourier. Ces étapes sont effectuées dans les deux dimensions temporelles dans le cas des spectres HYSCORE. Finalement, une transformée de Fourier est effectuée (à deux dimensions pour les spectres HYSCORE). La valeur absolue des 81 composantes spectrales est alors représentée sur les spectres fréquentiels. On obtient alors un spectre sur lequel on peut directement lire les fréquences des transitions nucléaires, indiquées par des pics de signal positifs. Le traitement a été effectué à l'aide du logiciel Xepr développé par Bruker.

VI - Etude RPE multifréquence

Les analyses RPE multifréquences sont menées en ayant recours à plusieurs fréquences micro-ondes et ainsi, puisque $h\nu = g_e \,.\beta_e \,.B$, en utilisant différentes plages de champ magnétique. Ainsi nous avons :

- Bande X, $\nu \approx 9.5\ GHz\ et\ B \approx 0{,}3\ T$
- Bande Q, $\nu \approx 34\ GHz\ et\ B \approx 1{,}2\ T$
- Bande W, $\nu \approx 95\ GHz\ et\ B \approx 3{,}4\ T$

L'étude RPE en bande Q ou en bande W permet une meilleure résolution du tenseur $\tilde{g}$ dont les valeurs principales (g_x, g_y, g_z) sont parfois trop proches pour être résolues dans les études en bande X. Cet effet peut être simplement compris en calculant les champs de résonance pour 2 raies adjacentes d'un signal anisotrope, par exemple B_x et B_y. On peut écrire :

$$B_x = \frac{h\nu}{g_x\beta}, B_y = \frac{h\nu}{g_y\beta}$$

L'écart entre les deux pics du spectre est alors

$$B_y - B_x = \frac{h\nu}{\beta}\left(\frac{1}{g_y} - \frac{1}{g_x}\right) \qquad (Eq.\ 89)$$

Ainsi si ϑ augmente, alors l'écart $B_y - B_x$ augmente et donc la résolution spectrale augmente également.

VII - Etude des centres de spin S =3/2

Pour un système possédant un centre de spin élevé (S > $^1/_2$), l'analyse du spectre RPE est plus complexe. En effet, pour les systèmes de spin élevé, nous avons une contribution non négligeable de l'hamiltonien d'éclatement en champ nul $\widehat{H}_{ZFS}$. Les quatre niveaux énergétiques d'un système de spin S = $^3/_2$ sont dégénérés dans la situation virtuelle où il y a une absence totale d'interaction. Placé dans un environnement, protéique par exemple, on a une levée de dégénérescence qui apparait en l'absence de champ magnétique séparant les quatre niveaux énergétiques en deux groupes de deux niveaux. Une nouvelle levée de dégénérescence apparait avec l'introduction d'un champ magnétique, ce qui a été présenté plus en amont de ce chapitre avec l'interaction Zeeman électronique (figure II.24).

La levée de dégénérescence en champ nul est modélisée par l'hamiltonien d'éclatement en champ nul (Zero Field Splitting), tel que :

$$\widehat{H}_{ZFS} = \vec{S}\,\widetilde{D}\,\vec{S} \qquad (Eq.\ 90)$$

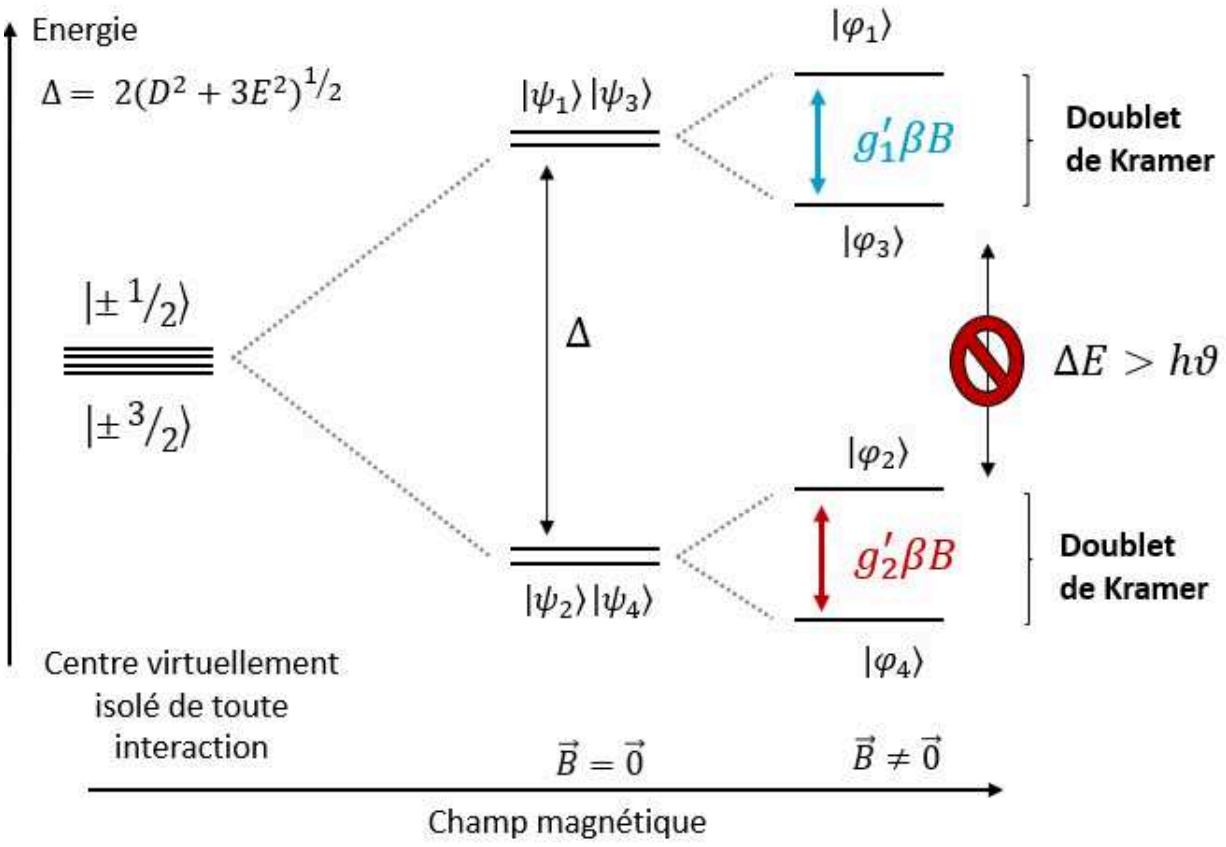


Figure II.24 : Représentation des niveaux d'énergie lors de la levée de dégénérescence en champ nul et lors de l'interaction Zeeman électronique.

Comme le montre la figure II.24, si l'écart énergétique Δ entre les doublets $|\psi_1\rangle, |\psi_3\rangle$ et $|\psi_2\rangle, |\psi_4\rangle$ est supérieur à l'énergie de la micro-onde fournie au système, alors les deux doublets dits de Kramer vont chacun donner un spectre RPE caractérisé par (g_1', g_2', g_3') et (g_1'', g_2'', g_3''). Ces valeurs de g apparentes provenant des doublets de Kramer dépendent de (g_1, g_2, g_3), les valeurs de g intrinsèques du spin S = 3/2. Les pics positifs situés à bas champs sont les plus souvent détectés. En effet les autres contributions spectrales sont situées à plus haut champ ce qui les rend plus difficiles à analyser pour plusieurs raisons. Premièrement, ces signaux sont dans des régions où il y a les signaux des espèces S = $^1/_2$ et ils ont généralement une amplitude plus faible que ces derniers. Deuxièmement, leurs contributions à plus haut champ sont élargies ce qui les rend encore plus difficiles à détecter.

Pour une meilleure compréhension théorique de l'analyse des systèmes à haut spin, il est important de noter que les niveaux d'énergie, une fois effectuées les levées de dégénérescence ne correspondent pas aux états « purs» $|\pm\ ^1/_2\rangle$ et $|\pm\ ^3/_2\rangle$. La raison est la présence d'opérateur dans les Hamiltoniens $\hat{H}_{ZFS}$ *et* $\hat{H}_{ZE}$ dont le rôle est de mixer les états

« purs ». En effet, l'Hamiltonien de levée de dégénérescence en champ nul peut se réécrire comme suit :

$$\widehat{H}_{ZFS} = D\left(\hat{S}_z^2 + \frac{1}{3}S(S+1)\right) + E\left(\hat{S}_x^2 - \hat{S}_y^2\right) \qquad (Eq.\ 91)$$

Le premier terme en bleu correspond au terme dit axial et le second terme en orange correspond au terme dit rhombique. Ce dernier dépend des opérateurs $\hat{S}_x^2$ et $\hat{S}_y^2$. Par ailleurs, $\hat{S}_x^2$ et $\hat{S}_y^2$ dépendent des opérateurs $\hat{S}_+$ et $\hat{S}_-$ selon :

$$\hat{S}_+ = \hat{S}_x + i\hat{S}_y \qquad (Eq.\ 92)$$

$$\hat{S}_- = \hat{S}_x - i\hat{S}_y \qquad (Eq.\ 93)$$

On constate que nous pouvons exprimer les opérateurs précédents $\hat{S}_x^2$ et $\hat{S}_y^2$ avec $\hat{S}_+$ et $\hat{S}_-$. Nous avons ainsi :

$$\hat{S}_x = \frac{1}{2}\left(\hat{S}_+ + \hat{S}_-\right) \qquad (Eq.\ 94)$$

$$\hat{S}_y = \frac{1}{2i}\left(\hat{S}_+ - \hat{S}_-\right) \qquad (Eq.\ 95)$$

Ce qui conduit à une nouvelle expression du terme rhombique de l'Hamiltonien $\widehat{H}_{ZFS}$:

$$\hat{S}_x^2 - \hat{S}_y^2 = \frac{1}{2}\left(\hat{S}_+^2 + \hat{S}_-^2\right) \qquad (Eq.\ 96)$$

Les opérateurs $\hat{S}_+$ et $\hat{S}_-$ opèrent selon :

$$\widehat{S_+}|S,M_S\rangle = \sqrt{S(S+1) - M_S(M_S+1)}.\,|S,M_S+1\rangle \qquad (Eq.\ 97)$$

$$\widehat{S_-}|S,M_S\rangle = \sqrt{S(S+1) - M_S(M_S-1)}.\,|S,M_S-1\rangle \qquad (Eq.\ 98)$$

L'opérateurs $\hat{S}_+$ mélange les états $|S,M_S\rangle$ et $|S,M_S+1\rangle$ comme indiqué en jaune. De même l'opérateur $\hat{S}_-$ mélange les états $|S,M_S\rangle$ et $|S,M_S-1\rangle$ comme indiqué en orange.

Il est à noter que l'hamiltonien $\widehat{H}_{ZE}$ peut s'exprimer comme suit :

$$\widehat{H}_{ZE} = g\beta B.\left[\widehat{S_z}.\cos\theta + \frac{\sin\theta(\cos\varphi + i\sin\varphi)}{2}\widehat{S_-} + \sin\theta\,.\frac{(\cos\varphi - i\sin\varphi)}{2}\widehat{S_+}\right] \qquad (Eq.\ 99)$$

Cette expression fait intervenir à son tour les opérateurs $\hat{S}_+$ et $\hat{S}_-$. Une nouvelle étape de mélange est donc faite ici.

Nous allons donc nous concentrer sur l'étude des signaux bas champ pour l'espèce S = $^3/_2$. Ces derniers possèdent typiquement deux raies visibles à bas champs, g_{1x} et g_{2y}. Ces valeurs sont respectivement les g_1' et g_1'' mentionnés plus haut et représentant les composantes bas champ des deux doublets de Kramer. Plusieurs méthodes plus ou moins complexes ont été utilisées pour l'étude de ce signal et elles reposent sur l'étude en température des signaux à bas champ.

La première d'entre elle, la plus simple mais également la moins précise consiste à mesurer l'amplitude des signaux en fonction de la température. Pour un centre de spin $^3/_2$ on s'attend à trouver que pour l'une des raies associées à g_{1x} et g_{2y}, l'amplitude suive une décroissance de type exponentielle par augmentation de la température. Ce comportement est caractéristique des spins du doublet excité puisque ce niveau d'énergie ne peut que se dépeupler. De manière analogue, le pic associé à l'autre valeur de g doit passer par un maximum avant de décroitre également de manière exponentielle, correspondant ainsi au doublet fondamental.

La deuxième méthode, plus délicate à mettre en œuvre mais également plus précise consiste en une simulation du spectre total par deux gaussiennes, chacune représentant un des deux signaux bas champ. Il est à noter que l'intensité d'une raie A_i dans le cas des systèmes à haut spin est proportionnelle à :

$$A_i \propto g_{Pi} D_i . \frac{N}{1 + e^{-\frac{\Delta}{k_B T}}} \qquad (Eq.\ 100)$$

avec N le nombre total de centres paramagnétiques dans un état S = 3/2, g_{Pi} le facteur d'intensité, grandeur sans dimension pondérant le signal en fonction de l'orientation des molécules et D_i la densité de raie également sans dimension. Δ représente l'écart énergétique entre les niveaux lors de la levée de dégénérescence en champ nul.

Le rapport $^{A_1}/_{A_2}$ s'exprime par :

$$\frac{A_1}{A_2} = \frac{g_{P1} D_1}{g_{P2} D_2} . e^{\frac{\Delta}{k_B . T}} \qquad (Eq.\ 101)$$

La représentation du $ln\left(\frac{A_1}{A_2}\right) = \mathrm{f}\left(\frac{1}{T}\right)$donnera une droite si le système est bien de spin S = $^3/_2$. Cette dernière permet également d'avoir accès à Δ représentant l'écart énergétique entre les niveaux lors de la levée de dégénérescence en champ nul. En effet $ln\left(\frac{A_1}{A_2}\right) = \frac{\Delta}{k_B}.\frac{1}{T} + ln\left(\frac{g_{P1}D_1}{g_{P2}D_2}\right)$. Le coefficient directeur de cette droite sera alors égal à $\frac{\Delta}{k_B}$ et l'ordonnée à l'origine sera égale à $ln\left(\frac{g_{P1}D_1}{g_{P2}D_2}\right)$.

Enfin, découlant de ce qui vient d'être dit sur les systèmes à haut spin, nous allons nous intéresser à présent à leurs quantifications.

La quantification des systèmes de spin S = $^3/_2$ n'est pas triviale. Elle se résume en trois étapes que je me propose de décrire ici :

1) La détermination des valeurs de g apparentes du système en utilisant les rhombogrammes (figure II.25).
2) La détermination de $g_{P1}D_1$, $g_{P2}D_2$ et g_{Pmoy}
3) La détermination de $\frac{A_1}{I_0}$ et de $\frac{N}{N_0}$

La détermination des valeurs de g apparentes se fait via l'utilisation des rhombogrammes des multiplets $\left|\pm\ ^1/_2\right\rangle$ et $\left|\pm\ ^3/_2\right\rangle$ la (les) valeur(s) de g apparente(s) accessible(s) sur le spectre (figur II.19). Les rhombogrammes sont construit avec $g_1 = g_2 = g_3 = 2{,}00$.

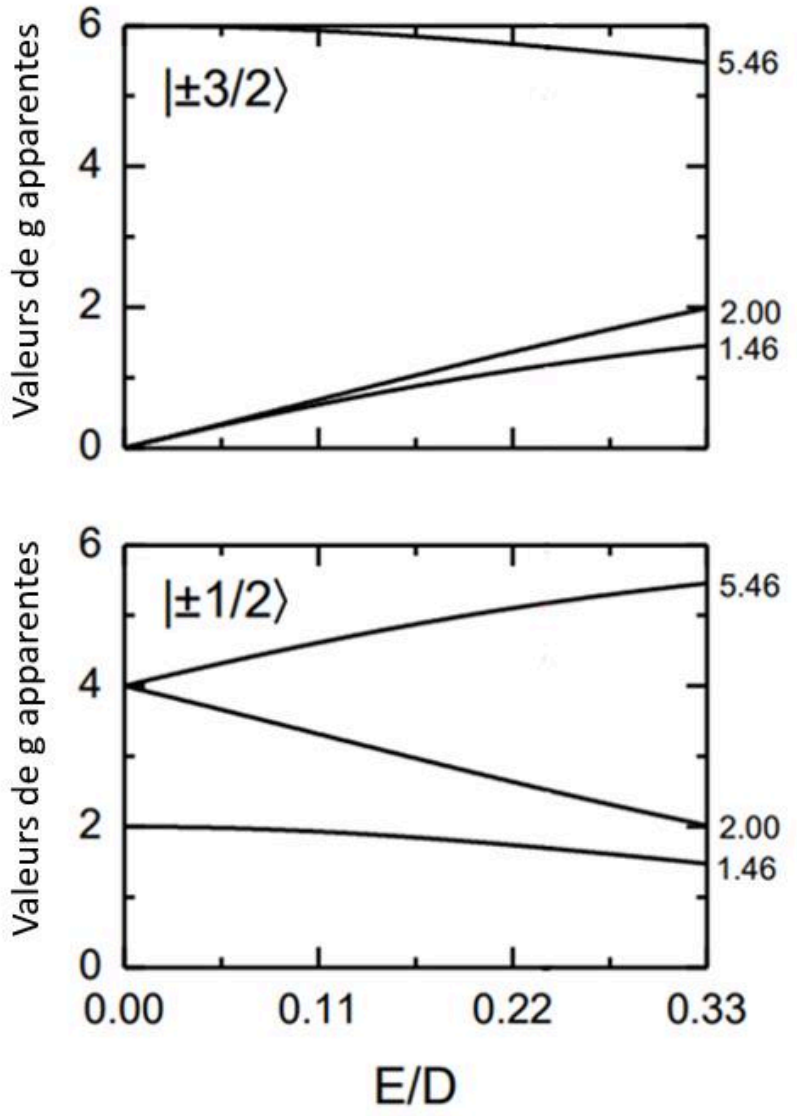


Figure II.25 : Rhombogrammes donnant accès aux valeurs de g apparentes pour les multiplets $|\pm\ {}^{1}/_{2}\rangle$ *et* $|\pm\ {}^{3}/_{2}\rangle$.

Une fois déterminées, ces valeurs de g apparentes permettent de calculer les coefficients $g_{P1}D_1$, $g_{P2}D_2$, en sachant que pour le doublet de Kramer i, on a :

$$g_{Pi}D_i = \frac{1}{8B}.\frac{g_{iz}\left(g_{ix}^2 + g_{iy}^2\right)}{\sqrt{g_{iz}^2 - g_{ix}^2}.\sqrt{g_{iz}^2 - g_{iy}^2}} \qquad (Eq.\ 102)$$

où B est la position en champ magnétique correspondant au pic étudié. Une référence interne a été choisie ayant, dans des conditions non-saturante et non surmodulante, un signal d'intensité $I_0 \propto g_{P0}.N_0$. Ici la référence a été prise dans des conditions telles que sa

quantification donne 0,5 spin. De plus, la référence utilisée ici est un signal de type rhombique, le calcul du facteur d'intensité g_{P_0} pour un tel signal est donnée par :

$$g_{P_0} = \frac{\frac{2}{3}\left[\frac{\left(g_x^2 + g_y^2 + g_z^2\right)}{3}\right]^{1/2} + \frac{1}{3}\left[\frac{\left(g_x + g_y + g_z\right)}{3}\right]^{1/2}}{4} \qquad (Eq.\ 103)$$

Le rapport entre l'intensité de la référence I_0 et celle du signal considéré A_i (Eq. 58) est :

$$\frac{A_i}{I_0} = \frac{g_{Pi} D_i . N}{g_{P0} . N_0} . \frac{1}{1 + e^{-\frac{\Delta}{k_B . T}}} \qquad (Eq.\ 104)$$

On peut alors exprimer le rapport des populations par :

$$\frac{N}{N_0} = \frac{I_0 . g_{P_1} . D_1}{A_1 . g_{P_0}} . \left(1 + e^{-\frac{\Delta}{k_B . T}}\right) \qquad (Eq.\ 105)$$

Ceci permet une estimation du nombre de spin du centre de spin S = 3/2 dans l'échantillon.

Chapitre III

Etude des centres FeS dans ForCE 1 et ForCE 2

Table des matières

I - Titrages de ForCE 1 128
I.1 – Titrages de ForCE 1 à pH = 6,0 128
I.1.1 – Etude des signaux à haut potentiel 129
I.1.2 – Etude des signaux de potentiels E < 0 mV 131
I.1.2.1 – Identification de deux centres FeS de potentiels intermédiaires (C_1 et C_2) 131
I.1.2.2 – Identification de deux centres FeS de bas potentiels (C_3 et C_4) 132
I.1.2.3 – Détermination des potentiels redox de C_1 et C_2 134
I.1.2.3.1 – Titrage de C_1 134
I.1.2.3.2 – Titrage de C_2 137
I.1.2.3.2 – Titrage de C_3 et C_4 142
I.2 - Titrage à pH = 7,5 144
I.2.1 - Titrage de 3Fe4S 144
I.2.2. – Analyse du comportement redox de C_1 145
I.2.3 – Détermination des potentiels de C_2, C_3 et C_4 150
I.2.4 – Quantification de spin des centres FeS 151
II – Caractérisation d'une espèce de spin S = 3/2 155
II.1 – Identification des signatures RPE 155
II.2 – Détermination des propriétés redox 158
II.3 - La quantification spin S = 3/2 159
III - Comparaison des signatures RPE dans ForCE 1 vs ForCE 2 161
III.1 – Après réduction au dithionite de sodium 161
III.2 – Echantillon oxydé à l'air ou réduit au formiate de sodium 163
V - Discussion 164

Dans cette partie on se concentrera sur l'étude des centres FeS dans ForCE 1. Comme mentionné précédemment, le signal généré dans l'état le plus réduit, i.e. à très bas potentiel est complexe à analyser. Nous allons ainsi faire varier plusieurs paramètres tel que le potentiel d'oxydoréduction de l'échantillon et par conséquent déterminer ceux des espèces présentes, ainsi que la température et la puissance micro-onde ce qui nous permettra d'utiliser les propriétés de relaxation des centres FeS pour isoler au mieux les signatures individuelles.

I - Titrages de ForCE 1

I.1 – Titrages de ForCE 1 à pH = 6,0

Deux titrages ont été réalisés sur ForCE 1 dans du tampon MES à pH = 6.0, pH d'optimum de stabilité pour ForCE 1 et ForCE 2. Ils ont permis d'identifier certaines signatures de centres FeS et de nous assurer de la reproductibilité des résultats. Les figures III.1 et III.2 montrent la forme des signaux observés dans les deux titrages effectués à pH = 6,0 (A) ainsi qu'un zoom permettant de mieux distinguer les signaux faibles (B). On a ainsi pu distinguer quatre groupes de signaux (en couleur sur les figures III. 1A et III.2A). Le premier est visible à haut potentiel (> 207 mV). Le deuxième groupe apparaissant à des potentiels compris entre (0 mV, - 150 mV) est celui contenant les signatures d'un radical organique et celles du molybdène. On reviendra sur ces signaux dans les autres chapitres. Le troisième groupe de signaux apparait au cours du titrage à des potentiels intermédiaires compris entre -150 mV et -350 mV. Il contient les signatures que l'on pense être celles des centres FeS de potentiel intermédiaire. Enfin le quatrième et dernier groupe observé à des potentiels inférieurs à – 350 mV contient les signaux que l'on pense être des centres FeS de plus bas potentiels. Il est à noter que tous les potentiels donnés dans ce chapitre le sont par rapport à l'Electrode Standard à Hydrogène (ESH).

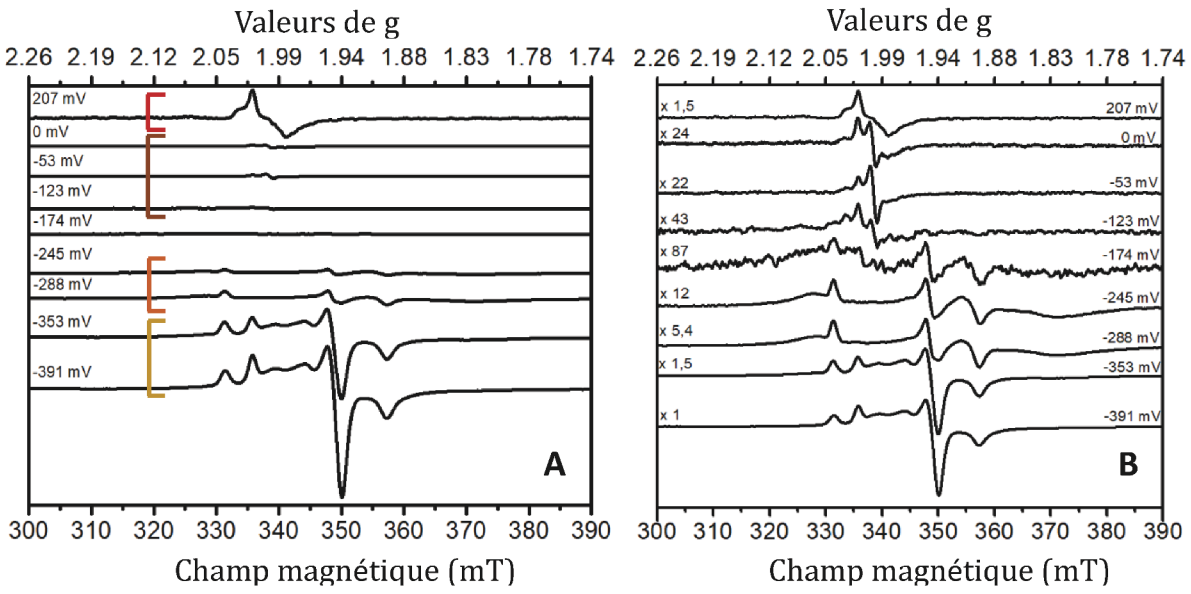


Figure III.1 : Titrage 1 de ForCE 1. A droite représentation des spectres du titrage (A). La représentation des spectres du titrage après une normalisation par rapport à l'amplitude maximale mesurée sur chaque spectre (B). Conditions expérimentales : température 15 K : puissance micro-onde : 10 mW, amplitude de modulation : 10 G à 100 kHz, fréquence ≈ 9,48 GHz.

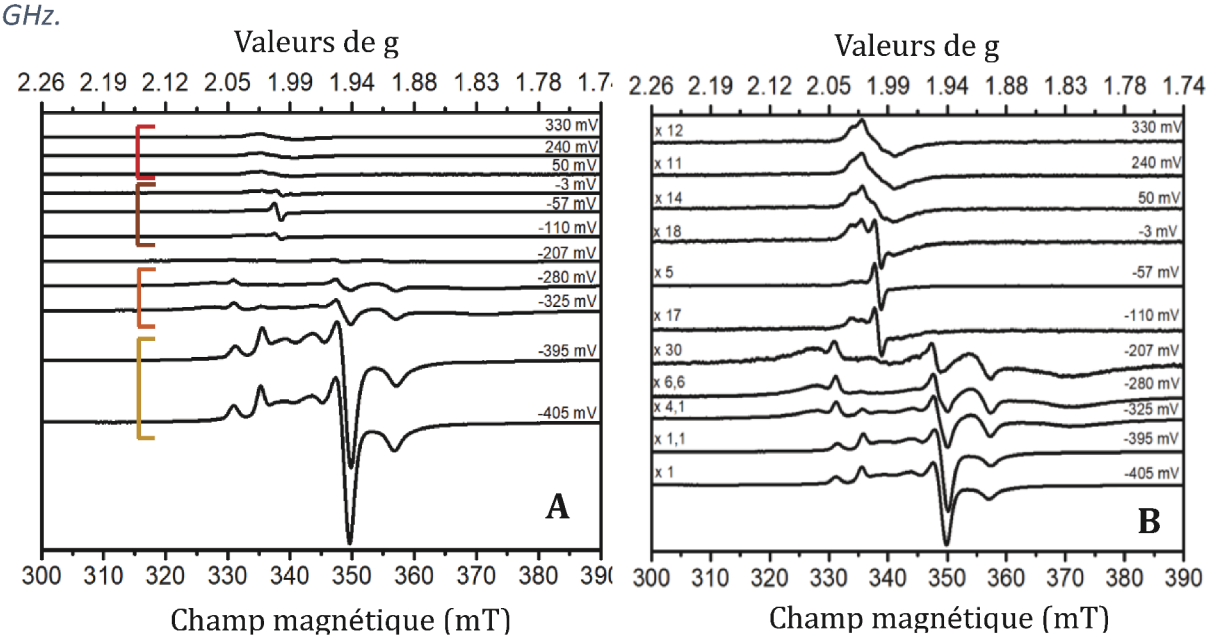


Figure III.2 : Titrage 2 de ForCE 1 (A). La représentation des spectres du titrage après une normalisation par rapport à l'amplitude maximale mesurée sur chaque spectre (B). Conditions expérimentales identiques à celles de la figure III.1.

I.1.1 – Etude des signaux à haut potentiel

Il apparait à haut potentiel une signature visible à 15 K repérée par un pic positif à g = 2,018 et un pic dérivé à g = 2,001. Il est faiblement anisotrope avec une largeur de raie pic à pic d'environ 50 G. Deux titrages à pH = 6,0 ont été effectués pour vérifier la reproductibilité des résultats. La figure III.3 montre le signal de ce centre au cours du premier (A) et du second (C) titrage ainsi que les points expérimentaux issus des relevés d'amplitude pic-à-pic. Le fit de ces points avec une équation de Nernst permet de modéliser le comportement redox de ce signal et de déterminer son potentiel pour le premier titrage (B) et pour le second (D).

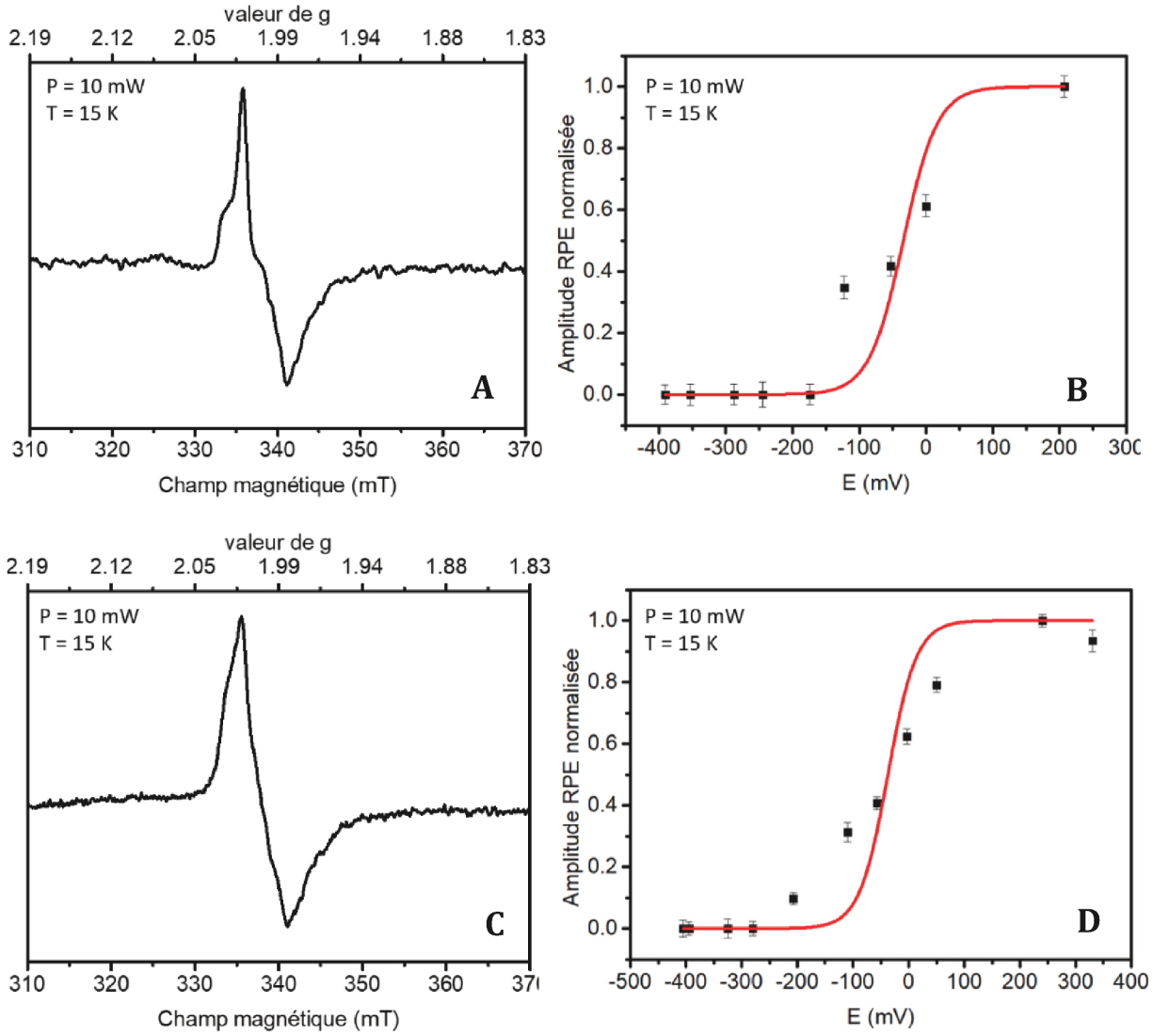


Figure III.3 : Analyse du centre 3Fe4S. (A et C) : signal RPE du centre issu respectivement du titrage 1 et 2 à pH = 6,0. (B et D) : ajustement des mesures d'amplitude expérimentales avec une équation de Nernst. Conditions expérimentales : température : 15 K, puissance micro-onde : 10 mW, potentiel : oxydé as-prep (A, B), + 240 mV (C, D), amplitude de modulation : 10 G, fréquence ≈ 9,48 GHz. GHz.

Les potentiels standards déterminés à pH = 6,0 au cours du premier et second titrage sont respectivement de $E^{g=2,018}_{FeS/FeS^+}$ = -30 ± 10 mV et $E^{g=2,018}_{FeS/FeS^+}$ = -40 ± 10 mV. Au vu des propriétés redox, de la forme du signal et des propriétés de relaxation de ce centre, il est raisonnable de l'attribuer à un centre de type $[3Fe4S]^+$.

I.1.2 – Etude des signaux de potentiels E < 0 mV

I.1.2.1 – Identification de deux centres FeS de potentiels intermédiaires (C_1 et C_2)

On s'intéresse ici au groupe de signaux apparaissant entre -150 mV et -350 mV. La figure III. III.4 présente les signatures RPE provenant d'un échantillon stabilisé à un potentiel de -288 mV du titrage 1 à pH = 6,0, enregistrées à différentes puissances et différentes températures.

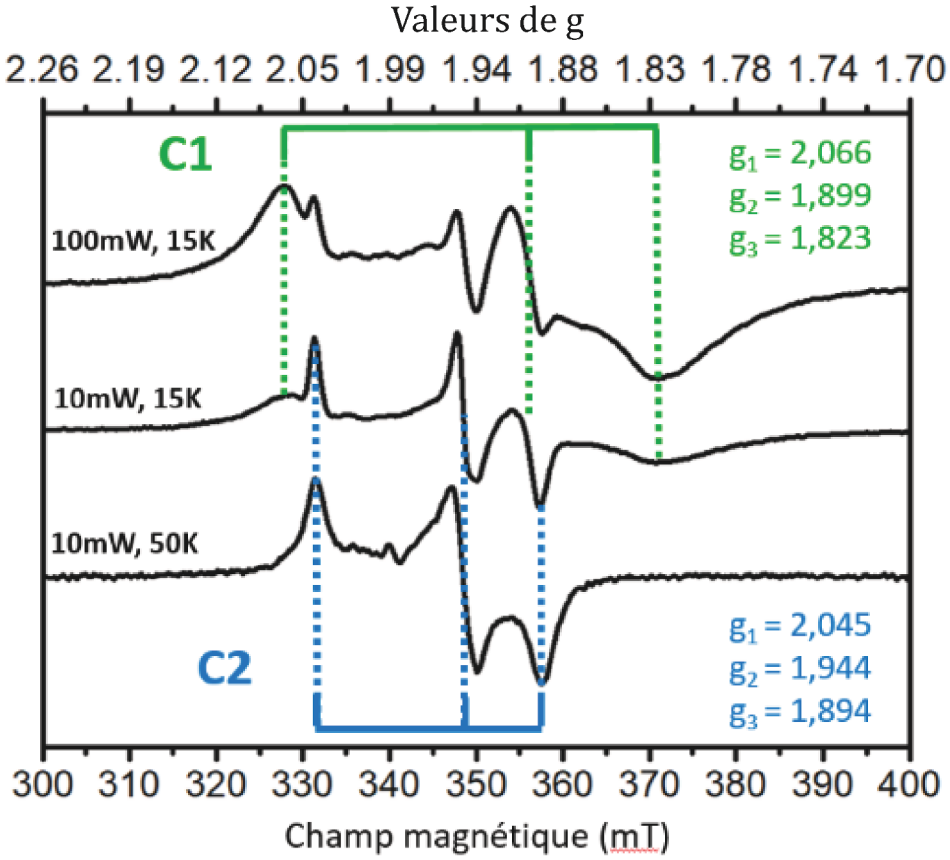


Figure III.4 : Identification spectrale de deux centres FeS de potentiels redox intermédiaires nommés C1 et C2. Données issues du titrage 1. En haut : mise en évidence du centre C1. En bas mise en évidence du centre C2. Conditions expérimentales : potentiel : -288 mV, amplitude de modulation : 10 G à 100 kHz, fréquence ≈ 9,48 GHz.

Les centres sont nommés selon l'apparition des signatures associées par ordre décroissant de potentiel. A 15, K, on mesure un signal complexe et composite constitué de plusieurs raies comme on peut le constater sur la figure III.3. Pour mieux comprendre ce signal, on l'enregistre à différentes puissances à 15 K et à différentes températures (15 K et 50 K). Cette approche permet de résoudre deux centres FeS rhombiques possédant des propriétés de relaxation distinctes.

Il apparait dans cette gamme de potentiel deux signatures de centres FeS différentes, nommées C_1 et C_2. Un centre visible à basse température et forte puissance, caractérisé par un signal large noté C_1 avec $g_1 = 2,066$, $g_2 = 1,899$ et $g_3 = 1,823$ et un centre C_2 associé à des signaux étroits relaxant moins vite que C_1 car toujours visible à 50 K. Ce dernier, noté C_2, est caractérisé par $g_1 = 2,045$, $g_2 = 1,944$, $g_3 = 1,894$. Enfin la comparaison des spectres enregistrés à à 15 K à plusieurs puissances permet de déterminer que le centre C_1 n'est pas saturé à 10 mW mais l'est à 100 mW. Il est visible à 15 K et son signal disparait à 50 K. C_1 est donc un centre relaxant rapidement. De même pour C_2, il est non saturé à 15 K et 0,1 mW mais saturé à 1 mW et demeure visible jusqu'à 50 K (figure III.4). C_2 est donc un centre relaxant plus lentement que le centre C_1. En fonction des propriétés de relaxation et des valeurs de g, les centres C_1 et C_2 sont attribués à deux centres de type $[4Fe4S]^+$.

I.1.2.2 – Identification de deux centres FeS de bas potentiels (C_3 et C_4)

L'examen des signaux visibles entre -350 mV et -405 mV révèle que d'autres signatures viennent s'additionner aux précédentes. Le centre C_2 est toujours visible alors que le centre C_1 ne l'est plus.

La figure III.5 présente l'évolution entre 15 K et 100 K des signatures visibles à bas potentiel. On constate la disparition du centre C_2 en augmentant la température et l'apparition de deux nouvelles signatures, une visible à 15 K et en dessous, et une autre restant jusqu'à 100 K. Les nouveaux signaux présents à bas potentiels ont alors des propriétés de relaxation différentes. Nous avons attribué ces signatures à deux nouveaux centres FeS, nommés C_3 et C_4. La figure III.5 montre la comparaison de trois spectres enregistrés dans un état très réduit (- 390 mV) à

trois températures différentes permettant ainsi de mettre en évidence les deux nouveaux centres.

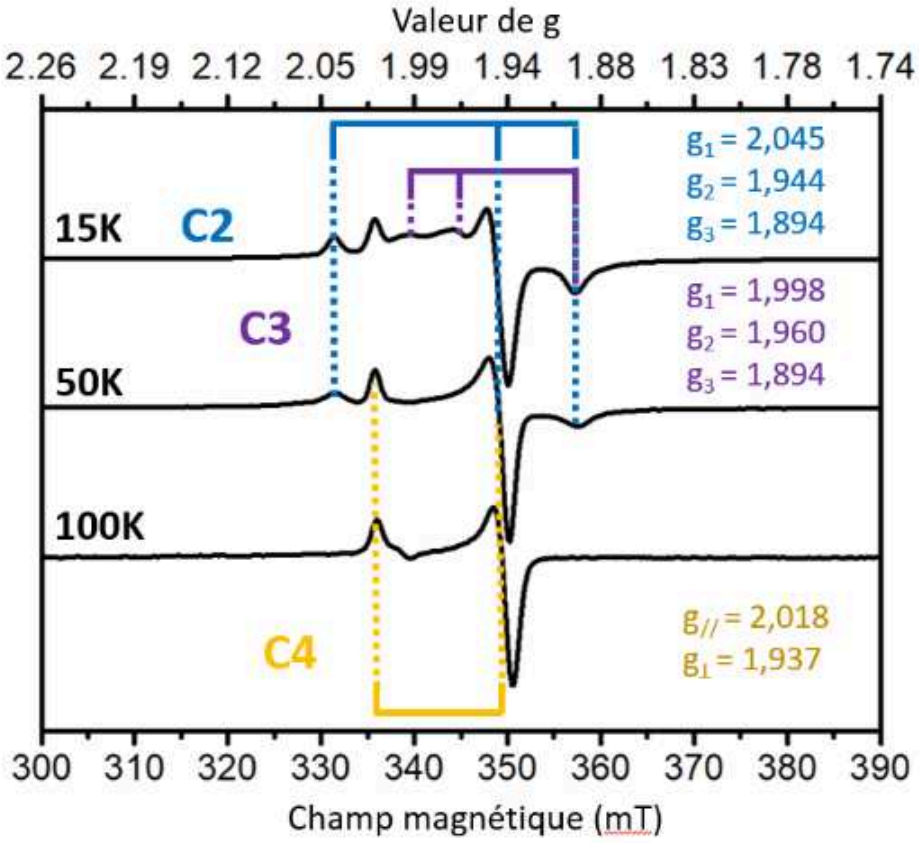


Figure III.5 : Identification spectrale de deux centres FeS de bas potentiels. Données issues du titrage 1. En haut : mise en évidence du centre C2. En bas mise en évidence du centre C4. Conditions expérimentales : puissance 10 mW, potentiel : -390 mV, amplitude de modulation : 10 G à 100 kHz, fréquence ≈ 9,48 GHz.

Le centre C_4 possède une signature axiale caractérisée par $g_{//}$ = 2,018 et $g_{\perp}$ = 1,937. Il relaxe plus lentement que les autres centres C_1 et C_2 puisqu'il est toujours visible à 100 K. En fonction des propriétés de relaxation et des valeurs de g, le centre C_4 est attribué à un centre de type $[2Fe2S]^{+}$. Les temps de relaxation longitudinal ou spin réseau (T_1) et transversal ou spin-spin (T_2) sont propres à un type donné de centre. Ainsi le type de centre (4Fe4S ou 2Fe2S) ainsi que son environnement proche tel que les ligands le coordonnant influent sur les temps de relaxation du cluster. Plus un centre relaxe lentement, plus il sera visible à haute température (100 K), et inversement plus sa relaxation sera rapide, plus il faudra mener des observations à basse température pour l'observer (4 K – 15 K). En effet, à haute température les centres relaxant rapidement s'élargissent et disparaissent ainsi du spectre.

Le signal du centre C_3 est associé à deux pics visibles à g_1 = 1,998, g_2 = 1,960. Ce centre relaxe très rapidement puisque sa signature n'est plus visible au-dessus de 15 K. De plus, il apparait que ce dernier possède une contribution en g_3 = 1,894, confondue avec le pic en g_3 du centre C_2. En effet on constate que l'amplitude de ce dernier en g_3 = 1,894 est plus grande que celle en g_1 = 2,045 quand le centre C_3 est présent sur le spectre. De même que pour C_1 et C_2, le centre C_3 en fonction des propriétés de relaxation et des valeurs de g, est attribué à un centre de type $[4Fe4S]^+$.

I.1.2.3 – Détermination des potentiels redox de C_1 et C_2

Les valeurs les plus adéquates pour un relevé d'amplitude des signaux en vue d'un titrage sont le g_1 et le g_3 pour le centre C_1 à 100 mW et le g_1 pour le centre C_2 à 10 mW. En effet la raie en g_3 du centre C_2 se confond avec celle en g_2 du centre C_1 à 10 mW ce qui apporte une contribution de ce dernier à l'amplitude totale du signal à cette valeur de g.

I.1.2.3.1 – Titrage de C_1

La figure III.6 montre les courbes de titrage normalisées réalisées par un ajustement des points expérimentaux avec une loi de Nernst (tableau 1). Les carrés et courbe noirs représentent les relevés et le fit fait à g = 2,066 (g_1 du centre C_1). Les cercles et courbe rouges représentent les relevés et le fit fait à g = 1,823. Ces relevés ont été effectués à plusieurs puissances (entre 100 mW et 0,1 mW) pour vérifier la présence d'éventuelles contributions d'autres centres ou la présence d'interactions magnétiques.

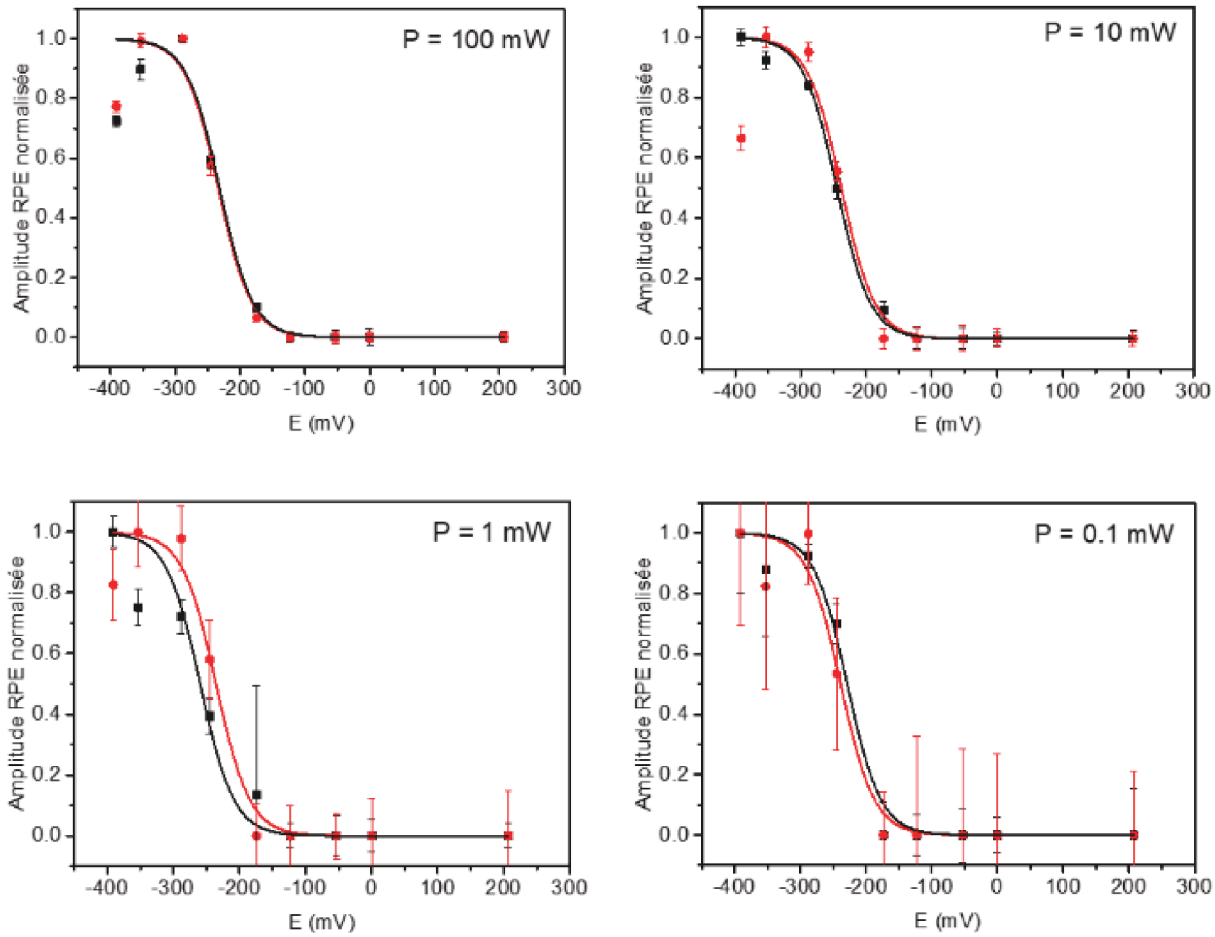


Figure III.6 : Ajustement des mesures d'amplitude expérimentales avec une équation de Nernst de l'espèce C1 à 15 K à différentes puissances et différentes valeurs de g. Carrés noirs : mesure d'amplitude en g_1 = 2.066. Cercles rouges : mesure d'amplitude en g_3 = 1.823. Données issues du titrage 1. Conditions expérimentales : tampon MES pH = 6, concentration en protéine = 80 µM, potentiel : -390 mV, amplitude de modulation : 10 G à 100 kHz, fréquence ≈ 9,48 GHz.

Les potentiels obtenus par ajustement sont dans le tableau III.1.

Puissance	Centre C_1	
	g_1 = 2,066	g_3 = 1,823
0,1 mW	-220 mV	-230 mV
1 mW	-250 mV	-230 mV
10 mW	-240 mV	-230 mV
100 mW	-220 mV	-230 mV

Tableau III.1 : Potentiels déterminés pour le centre C_1 à différentes puissances pour les raies g_1 = 2,066 et g_3 = 1,823.

D'après ces analyses, le potentiel du centre C_1 ne dépend que peu de la puissance et de la position en champ. Il est donc d'environ $\bar{E} = -230mV$ à pH = 6,0. L'analyse du titrage révèle une décroissance de l'amplitude du signal RPE de C_1 à des potentiels inférieurs à - 300 mV, bien visibles à partir des spectres à fortes puissances (10 mW et 100 mW). Cette décroissance est examinée plus en détail dans le paragraphe I.2.2 et est proposée comme étant due à un couplage magnétique de C_1 et un centre de bas potentiel.

Comme il a été mentionné dans le paragraphe I.1.2.1, un deuxième titrage à pH = 6,0 a été effectué pour vérifier la reproductibilité des résultats. La figure III.7 montre les relevés d'amplitude faits pour l'espèce C1 à une température de 15 K et une puissance micro-onde comprise entre 0,1 mW et 10 mW en g_1 = 2,066 (cercles rouges) et g_3 = 1,823 (carrés noirs). Les courbes de titrage sont obtenues par fit des points expérimentaux avec une équation de Nernst.

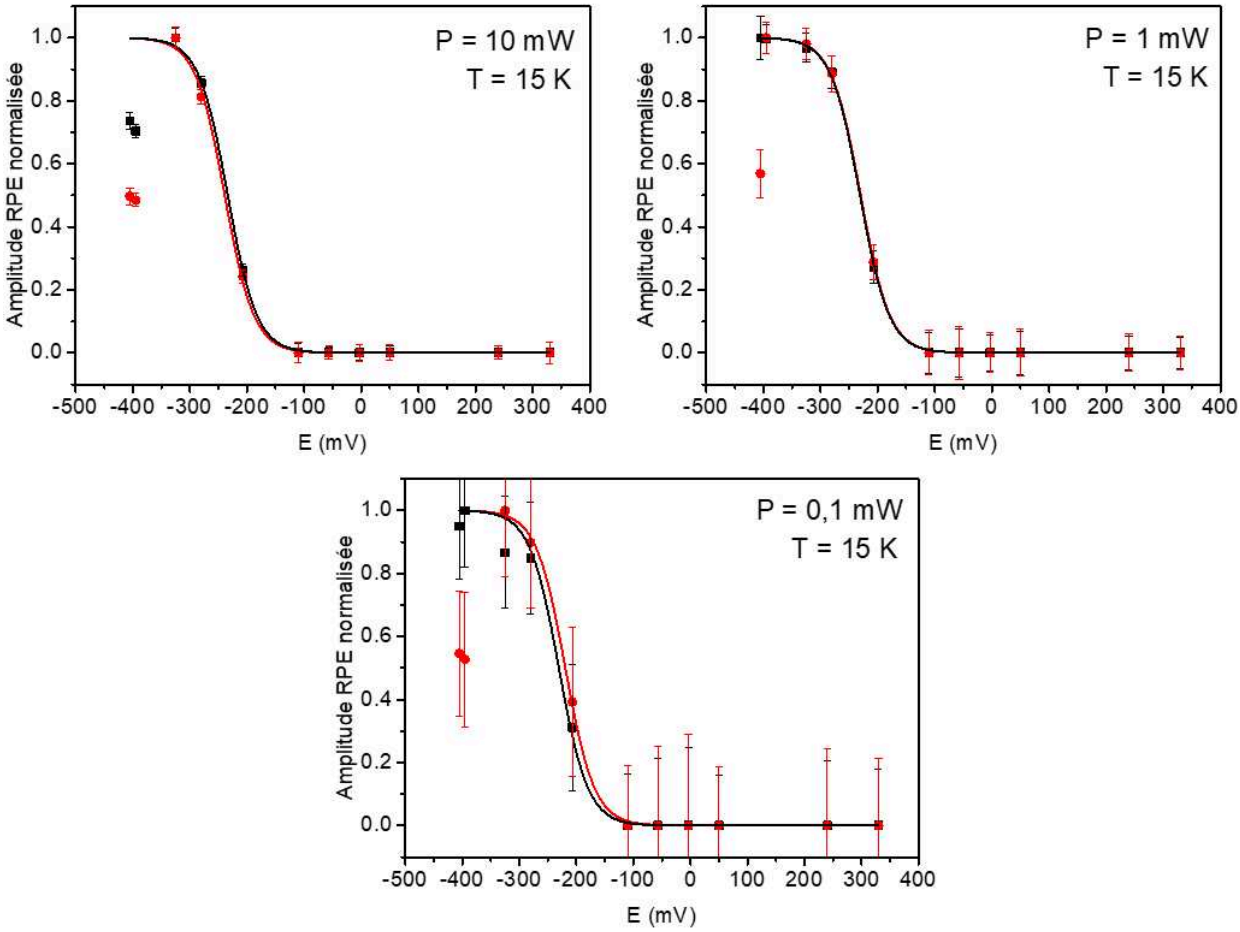


Figure III.7 : Ajustement des mesures d'amplitude expérimentales avec une équation de Nernst l'espèce C1 à 15 K, différentes puissances et différentes valeurs de g. Carrés noirs : mesure d'amplitude en g_1 = 2.066. Cercles rouges : mesure d'amplitude en g_3 = 1.823. Conditions

expérimentales : tampon MES pH = 6, concentration en protéine = 80 µM, puissance 10 mW, amplitude de modulation : 10 G à 100 kHz, fréquence ≈ 9,48 GHz.

Les potentiels standards déterminés sont dans le tableau III.2.

Puissance	Centre C_1	
	g_1 = 2,066	g_3 = 1,823
0,1 mW	-230 mV	-240 mV
1 mW	-230 mV	-230 mV
10 mW	-230 mV	-220 mV

Tableau III.2 : Potentiels déterminés pour le centre C_1 à différentes puissances pour les raies g_1 = 2,066 et g_3 = 1,823 lors du second titrage.

Premièrement on constate que ces données sont en accord avec celles déterminées lors du premier titrage à pH = 6,0.

Deuxièmement il est intéressant de constater qu'ici aussi une diminution du signal est visible dans la zone des bas potentiels, renforçant l'hypothèse d'un couplage magnétique inter-centre.

I.1.2.3.2 – Titrage de C_2

La figure III.8 montre les relevés d'amplitude expérimentaux pour le centre C_2 à 15 K pour différentes puissances (entre 100 mW et 0,1 mW) mesurées en g_1 = 2,045 (cercles rouges) et g_3 = 1,895 (carrés noirs). Les données ont été modélisées par ajustement d'une équation de Nernst sur les relevés d'amplitudes RPE expérimentaux. Les courbes de titrage sont obtenues par fit des points expérimentaux avec une équation de Nernst.

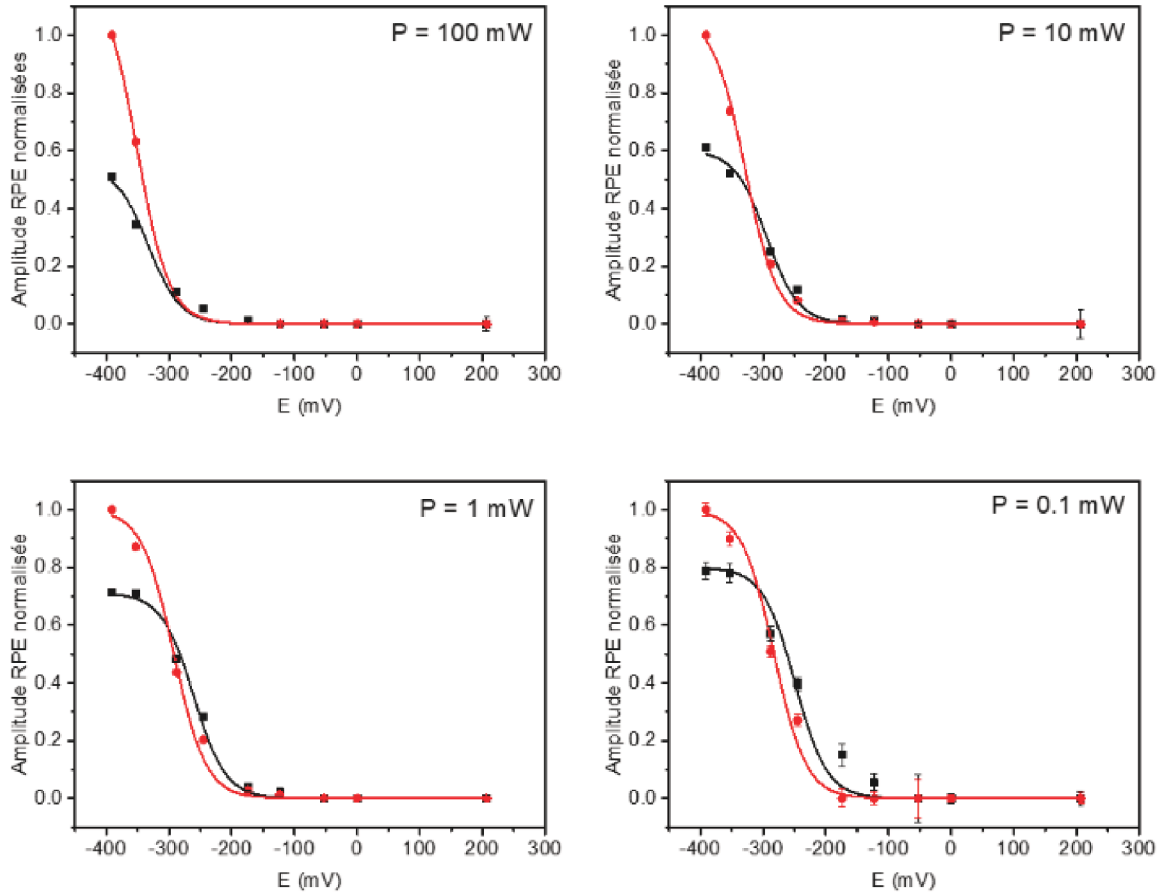


Figure III.8 : Ajustement des mesures d'amplitude expérimentales avec une équation de Nernst du titrage 1 de l'espèce C2 à 15 K, différentes puissances et différentes valeurs de g. Carrés noirs : mesure d'amplitude en g_1 = 2,045. Cercles rouges : mesure d'amplitude en g_3 = 1,894. Conditions expérimentales : identiques à celles de la figure III. 5.

L'analyse de la figure III.8 révèle que l'écart entre les maxima d'amplitude des courbes de titrages entre le g_1 et le g_3 augmente avec la puissance. Les potentiels calculés, à partir des fits des points expérimentaux présentés dans la figure III.6 sont dans le tableau III.3 :

Puissance	Centre C_2	
	g_1 = 2,045	g_3 = 1,894
0,1 mW	-250 mV	-280 mV
1 mW	-260 mV	-290 mV
10 mW	-290 mV	-330 mV
100 mW	-330 mV	-350 mV

Tableau III.3 : Potentiels déterminés pour le centre C_2 à différentes puissances à partir des relevés d'amplitude pour les raies g_1 = 2,045 et g_3 = 1,894.

Il apparait que le potentiel mesuré diminue avec l'augmentation de la puissance et que l'augmentation de la puissance s'accompagne d'une augmentation de l'amplitude du signal en g = 1,894. Ceci suggère la contribution d'au moins un centre de potentiel inférieur à celui de C_2. Les potentiels de ce centre sont déterminés à partir des spectres des titrages enregistrés à 0,1 mW pour les soucis de recouvrement de signaux évoqués précédemment. Les résultats sont donnés avec une erreur de 10 mV.

L'augmentation relative de l'amplitude en g_3 = 1,894 par rapport à g_1 = 2,045 à fortes puissances est cohérente avec la contribution d'un centre de bas potentiel et relaxant rapidement en g_3 = 1,894. Ce ne peut pas être le centre C_4 dont la raie bas champ correspond à $g_\perp$ = 1,937 >> 1,894. Il est donc raisonnable de penser que le centre C_3 contribue à g = 1,894. Ceci est appuyé par le spectre enregistré à 6 K présenté en figure III.9.

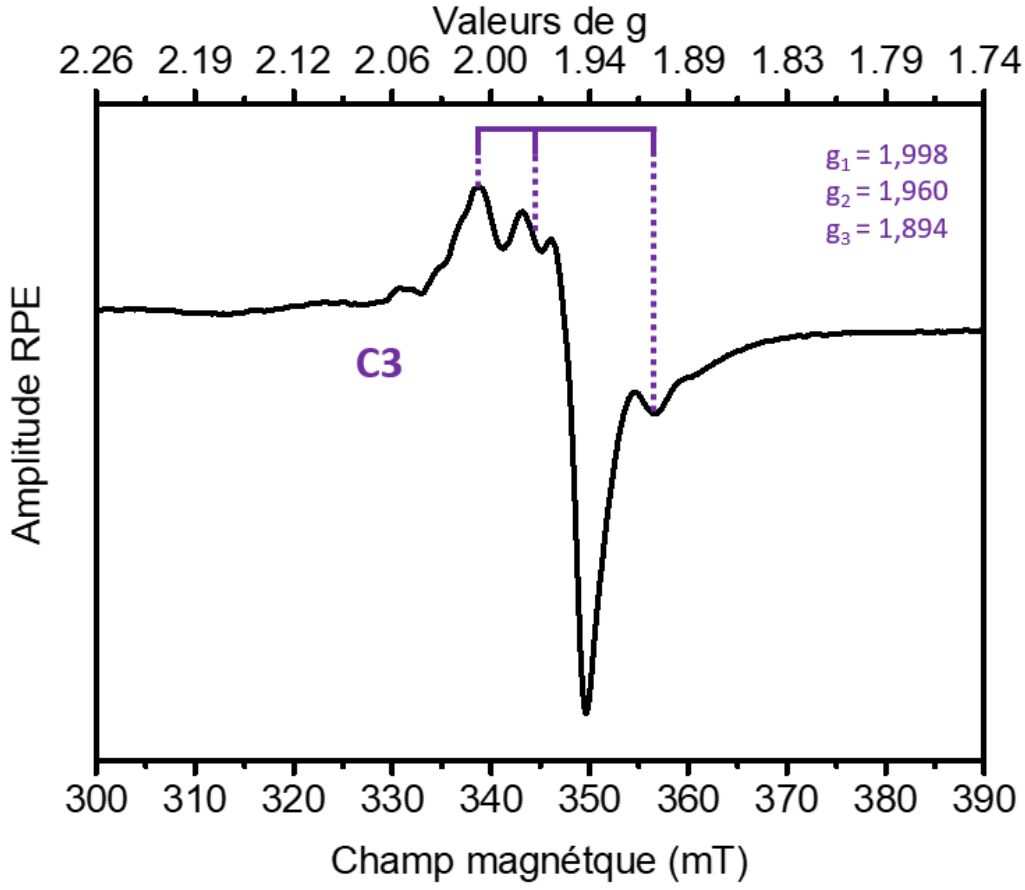


Figure III.9 : Spectre RPE montrant le centre C_3 dans ForCE 1. Conditions expérimentales : température : 6 K, tampon MES pH = 6, potentiel : -390 mV, puissance micro-onde : 100 mW, amplitude de modulation : 10 G à 100 kHz, fréquence ≈ 9,48 GHz.

La figure III.9 montre qu'à 6 K une contribution significative à g = 1,894 est présente, cohérente avec son attribution au centre C3.

Toutefois, il apparait également que le potentiel mesuré diminue avec l'augmentation de la puissance, qu'il soit mesuré en g_1 = 2,045 ou en g_3 = 1,894. Deux hypothèses peuvent être envisagées. La première serait que l'augmentation de l'amplitude des signaux à fortes puissances (10 mW et 100 mW) entraine l'augmentation de celle des signaux situés à proximité. La deuxième serait qu'un centre FeS additionnel ayant des propriétés de relaxation intermédiaire aux centres C_2 et C_3 et de bas potentiel contribuerait à g = 2,045 (g_1 du C_2). La figure III.10 montre la superposition des signatures des centres FeS de ForCE 1 dans un état réduit (-390 mV) à différentes puissances : 100 mW (Vert), 10 mW (bleu), 1 mW (rouge) et 0,1 mW (noir).

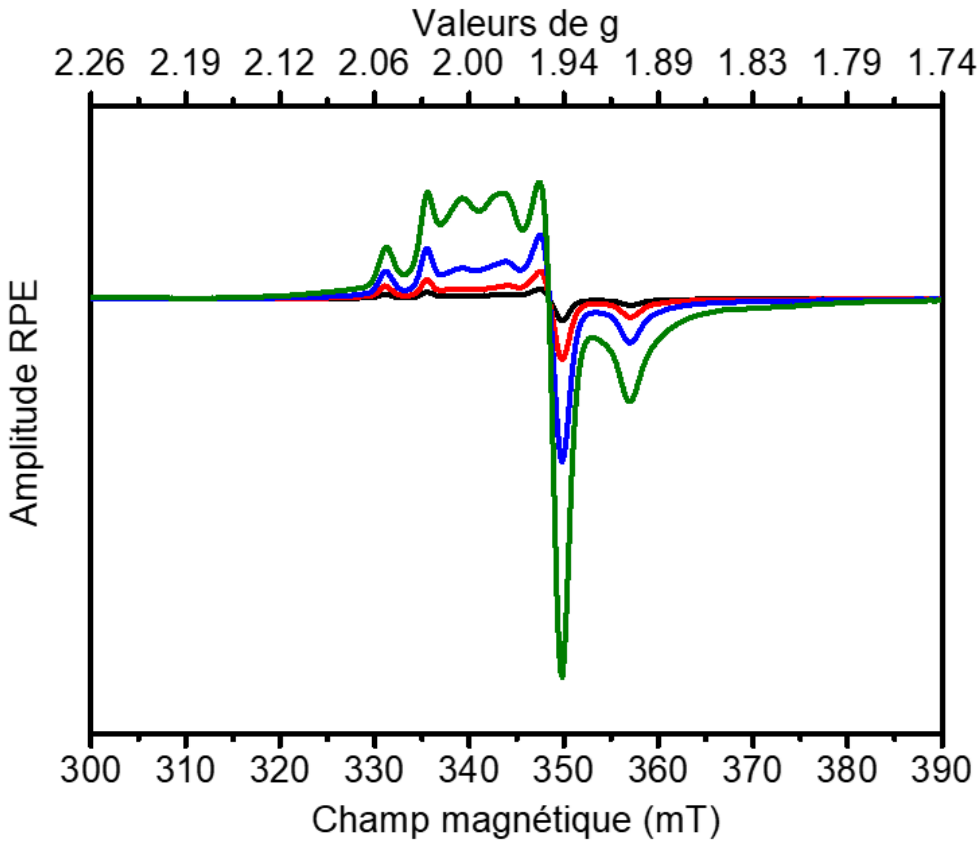


Figure III.10 : Comparaison des spectres RPE de ForCE 1 à -391 mV à plusieurs puissances : 100 mW (Vert), 10 mW (bleu), 1 mW (rouge) et 0,1 mW (noir). Conditions expérimentales : 10 K, idem figure III.5

La figure III.10 montre qu'à forte puissance les raies attribuées au centre C_3 sont larges et leurs augmentations d'amplitude pourraient causer l'augmentation de celle en g = 2,045. De plus, les potentiels sont affectés de la même façon par l'augmentation de puissance ($\Delta E_{g_1-g_3} \approx 30\,mV$) ce qui suggère que le même centre contribue aux deux positions. On ne peut néanmoins écarter complètement aucune des deux hypothèses.

Pour conclure, une estimation de la valeur du potentiel de C_2 est de – 270 mV. Elle est obtenue en moyennant les potentiels déterminés aux puissances de 0,1 mW et 1 mW, aux deux positions de champ concidérées. Ces conditions minimisent les contributions sous-jacentes des centres C_3, C_4 et/ou C_5 (dernier centre FeS non observé dans cette étude).

Une étude de la répétabilité a également été menée sur ce centre. La figure III. III. 11 montre les relevés d'amplitude pour le centre C_2 fait à une température de 15 K et une puissance micro-onde comprise entre 0,1 mW et 10 mW en g_1 = 2,045 (carrés noirs) et g_3 = 1,894 (cercles rouges). Les courbes de titrage sont obtenues par fit des points expérimentaux avec une équation de Nernst.

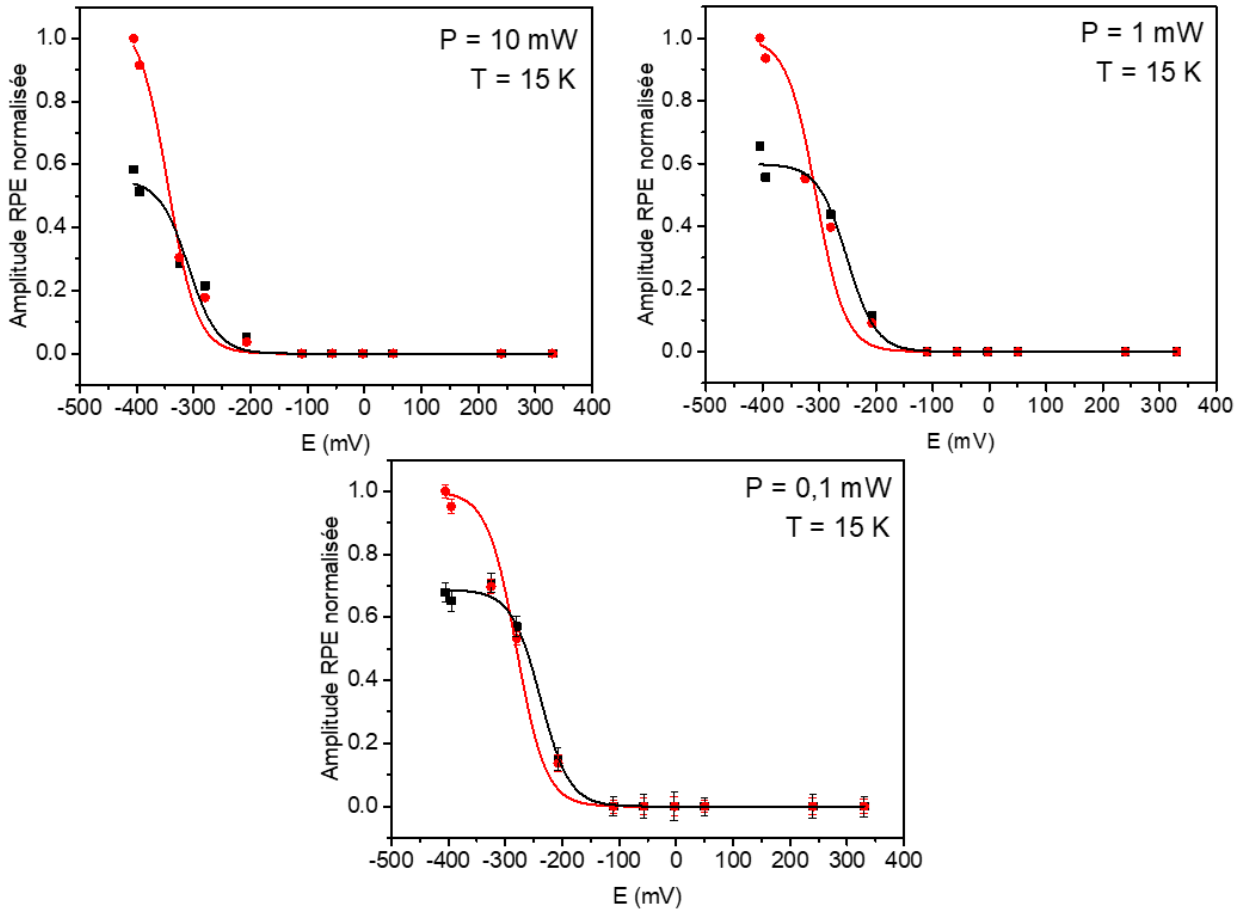


Figure III.11 : Ajustement des mesures d'amplitude expérimentales avec une équation de Nernst l'espèce C_2 à 15 K, différentes puissances et différentes valeurs de g. Carrés noirs : mesure d'amplitude en g_1 = 2,045. Cercles rouges : mesure d'amplitude en g_3 = 1,894. Conditions expérimentales : tampon MES pH = 6,0, concentration en protéine = 80 µM, puissance 10 mW, 1 mW et 0,1 mW, amplitude de modulation : 10 G à 100 kHz, fréquence ≈ 9,48 GHz.

Les potentiels standards déterminés sont dans le tableau 4 :

Puissance	Centre C_2	
	g_1 = 2,045	g_3 = 1,894
0,1 mW	-240 mV	-280 mV
1 mW	-250 mV	-310 mV
10 mW	-300 mV	-340 mV

Tableau III.4 : Potentiels déterminés pour le centre C_2 à différentes puissances pour les raies g_1 = 2,045 et g_3 = 1,895 lors du second titrage.

Il apparait ainsi que les résultats déterminés ici soient en accord avec ceux trouvés lors du titrage 1. Les potentiels de ce centre sont déterminés à partir des titrages fait à 0,1 mW pour les soucis de recouvrement de signaux évoqués précédemment. Les résultats sont donnés avec une erreur de 10 mV.

De plus, il est important de constater que l'on retrouve le même phénomène d'augmentation d'amplitude relative entre les deux valeurs de g. Ceci suggère que ce comportement reproductible a bel et bien une réalité physique.

I.1.2.3.2 – Titrage de C_3 et C_4

La figure III.12 montre les points expérimentaux issus des relevés d'amplitude à 15 K en $g_{//}$ = 2,018 pour le centre C_4 et g_2 = 1,960 pour le centre C_3 qui sont les positions les plus adaptées pour effectuer les relevés d'amplitude puisqu'une seule espèce contribue sous chaque pic, respectivement C_4 et C_3. De plus, le pic g_2 = 1,960 correspond au pic dérivé du centre C_3 et permet, par des relevés d'amplitude pic-à-pic de s'affranchir des problèmes de correction de ligne de base. Néanmoins, la présence d'autres centres sur le spectre à bas potentiel complique les relevés expérimentaux. Les courbes titrage pour les espèces de bas potentiel sont obtenues à partir de l'ajustement d'une équation de Nernst sur les relevés d'amplitudes RPE expérimentaux. En (A) et (C) se trouvent l'analyse redox et sa reproductibilité pour le centre C_3 et en (B) et (D) leurs équivalents pour le centre C_4.

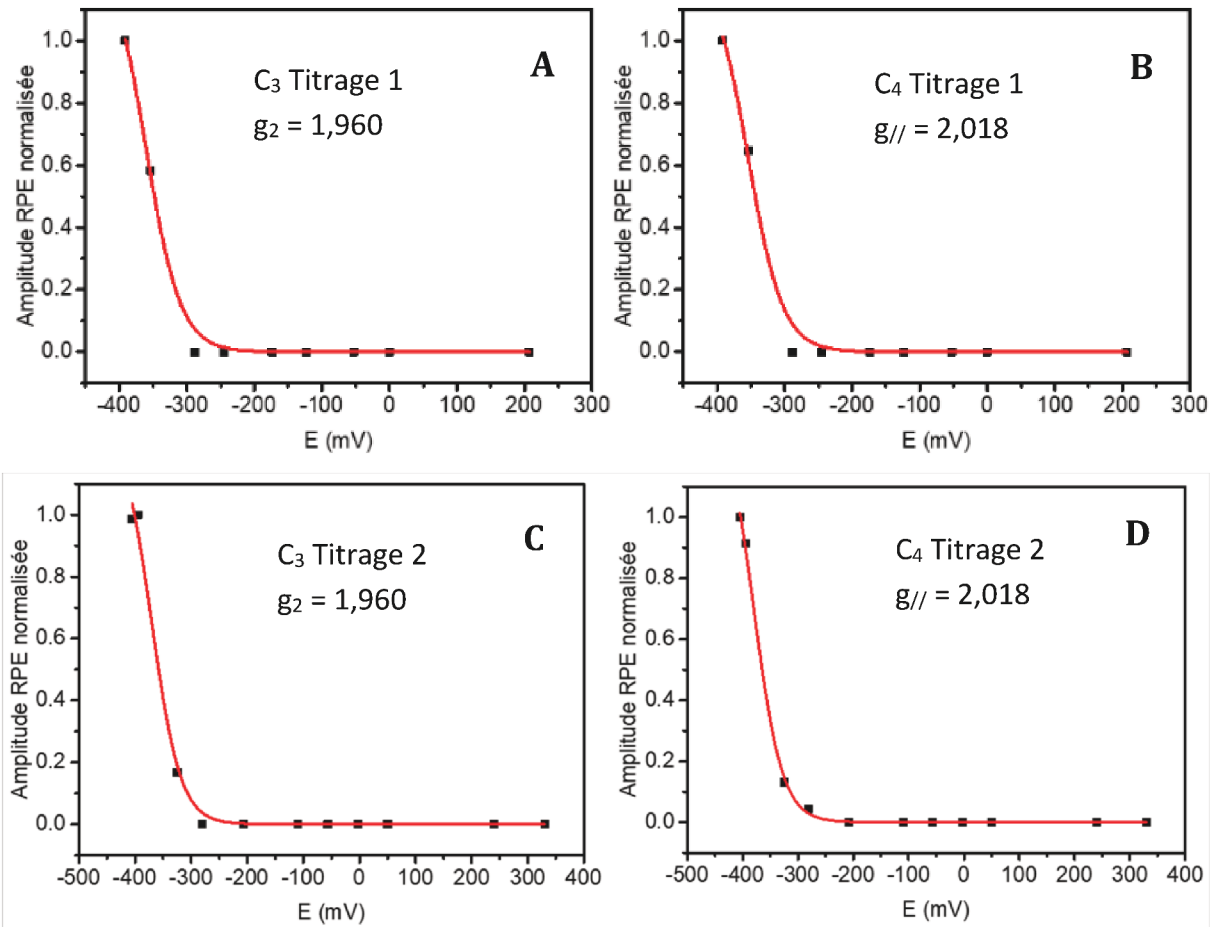


Figure III.12 : Ajustement des mesures d'amplitude expérimentales avec une équation de Nernst de l'espèce C3 (A et C) et C4 (B et D) à 15 K. Conditions expérimentales : tampon MES pH = 6, concentration en protéine = 80 µM, puissance 10 mW, amplitude de modulation : 10 G à 100 kHz, fréquence ≈ 9,48 GHz.

On a ainsi pu établir des limites supérieures du potentiel redox des centres à pH = 6,0 qui sont : $E^0_{C3} < -320\ mV$ et $E^0_{C4} < -380\ mV$ dans le cas du premier titrage et estimées à $E^0_{C3} < -370\ mV$ et $E^0_{C4} < -380\ mV$ dans le cas de l'étude de la reproductibilité.

Le tableau 5 récapitule les différentes propriétés des centres FeS étudiés dans ForCE 1.

Centre (ForCE 1)	Type de centre	Symétrie	Valeurs de g			Vitesse de relaxation
			g_1	g_2	g_3	
C_1	4Fe4S	Rhombique	2,066	1,899	1,823	Rapide (< 30 K)
C_2	4Fe4S	Rhombique	2,045	1,944	1,894	Intermédiaire (< 50 K)
C_3	4Fe4S	Rhombique	1,998	1,960	1,894	Rapide (< 30 K)
C_4	2Fe2S	Axial	$g_{//}$ = 2,018	$g_\perp$ = 1,937		Lent (< 100 K)

Tableau III.5 : Informations obtenues sur les centres FeS dans ForCE 1.

I.2 - Titrage à pH = 7,5

Dans les titrages précédents à pH = 6,0, les potentiels atteints n'étaient pas suffisamment bas pour réduire complètement tous les centre FeS. Un titrage à pH 7,5 a donc été mené car le potentiel redox du couple S^{IV} (SO_3^{2-}, HSO_3^-) / S^{III} ($S_2O_4^{2-}$) du dithionite de sodium diminue de 120 mV par unité pH si pH > pKa (paragraphe II.4 chapitre Matériels et Méthodes).

I.2.1 - Titrage d'un centre $[3Fe4S]^+$

Un faible signal est observé dans l'état oxydé de l'enzyme, autour de g = 2,0. Il est caractérisé par un pic positif à g = 2,017 et un pic dérivé à g = 2,001. Le signal est donc faiblement anisotrope, avec une largeur de raie pic-à-pic de 48 G. Ce signal est semblable à celui observé au cours des titrages à pH = 6,0. Il est donc raisonnable de l'attribuer à un centre de type $[3Fe4S]^+$ appelé centre C_0 (figure III.13 (A)).

La mesure de l'amplitude pic-à-pic de ce signal en fonction du potentiel de l'échantillon est reportée dans la figure III.13 (B). L'ajustement d'une courbe de Nernst permet la modélisation de ce comportement redox.

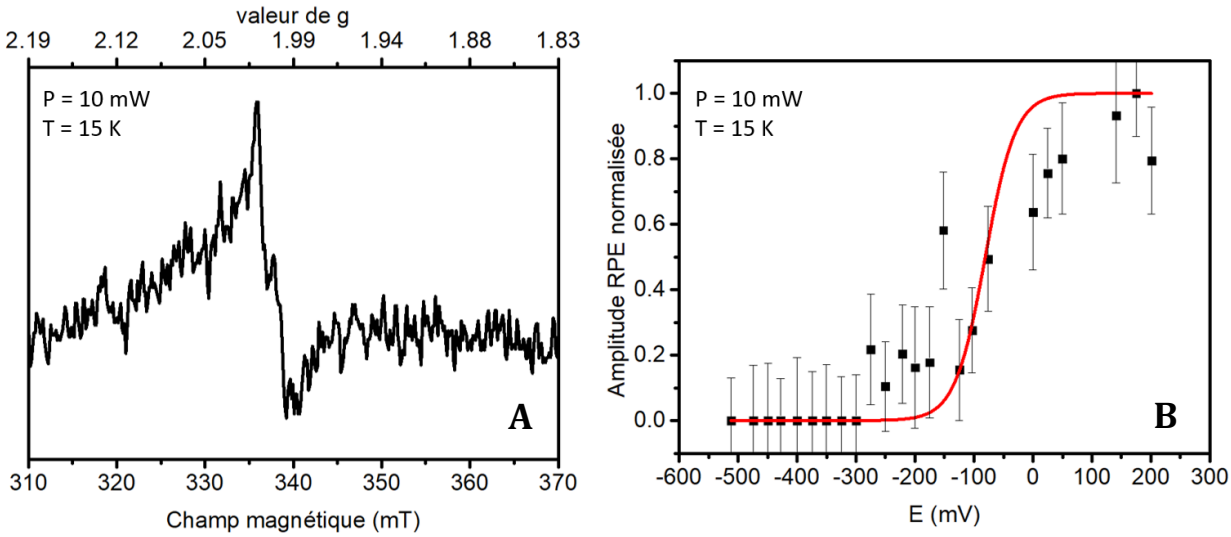


Figure III.13 : Analyse du centre [3Fe4S]⁺. (A) le signal de ce centre issu du titrage 3. Conditions expérimentales : température : 15 K, puissance micro-onde : 10 mW, potentiel : + 240 mV, amplitude de modulation : 10 G, fréquence ≈ 9,48 GHz. (B) mesures d'amplitude effectuées à g = 2,017 ajustées par une loi de Nernst.

La détermination du potentiel standard conduit à une valeur de E_{FeS/FeS^+} = -80 ± 10 mV.

I.2.2. – Analyse du comportement redox de C_1

La figure III.14 montre les mesures expérimentales des amplitudes RPE pour les différents centres étudiés au cours du titrage 3 ainsi que leurs ajustements avec des lois de Nernst. Sur la figure III.14 on voit ainsi les données du centre C_4 en orange, du centre C_3 en violet, du centre C_2 en bleu et du centre C_1 en vert. Comme précédemment, les amplitudes ont été mesurées pour les centres C_1, C_2, C_3 et C_4 en g = 2,066, g = 2,045, g = 1,998 et g = 2,018 respectivement.

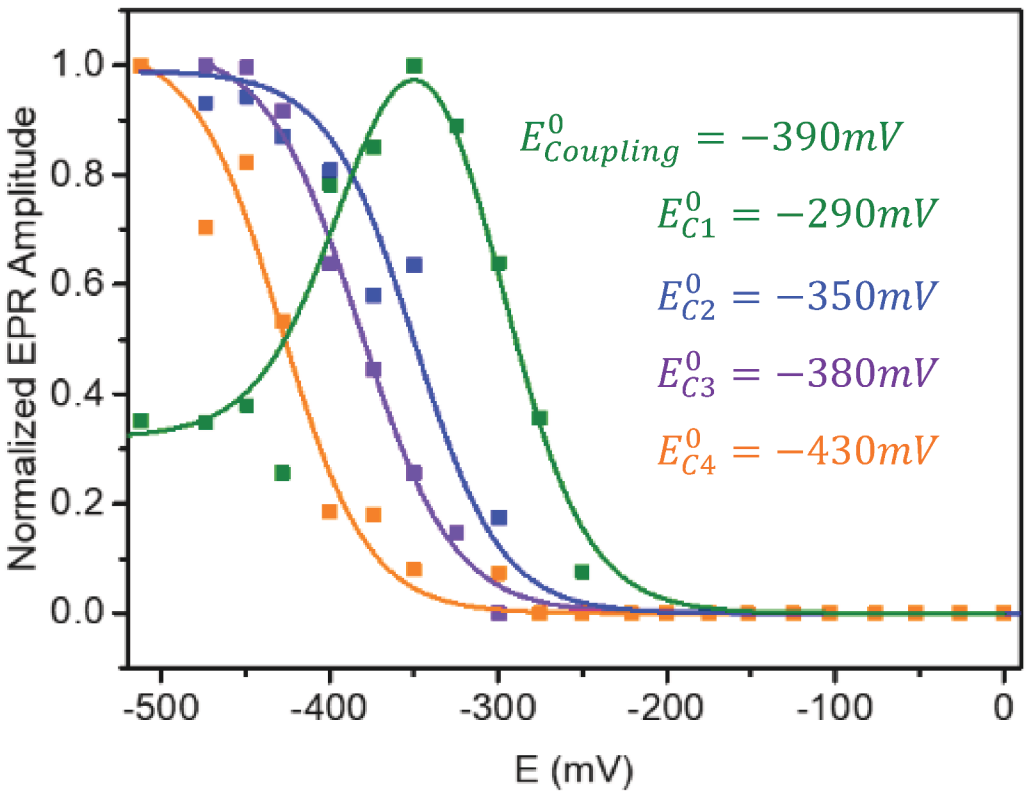


Figure III.14 : Titrages des centres FeS dans ForCE 1 déterminées après l'analyse du troisième titrage, tampon CHES pH = 7,5. Conditions expérimentales : T = 15 K, concentration en protéine = 80 µM, puissance 10 mW, amplitude de modulation : 10 G à 100 kHz, fréquence ≈ 9,48 GHz

Un point intéressant est l'allure de la courbe de titrage du centre C1. En effet, l'intensité du signal de C_1 atteint un maximum aux alentours de -340 mV à pH = 7,5 puis diminue aux plus bas potentiels étudiés. Ce comportement est inhabituel pour un centre FeS paramagnétique à l'état réduit mais peut toutefois être rationalisé en considérant l'hypothèse que le centre C_1 se couple à bas potentiel à un autre centre paramagnétique qui se réduit progressivement à partir de -350 mV. L'hypothèse d'un couplage magnétique inter-centre est soutenue par l'apparition de raies latérales à bas potentiel sur le spectre à g = 2,23 et g = 1,68 (Figure III. III. 15).

La figure III.15 montre le spectre RPE obtenu dans un état réduit (- 391 mV), 15 K et 10 mW ainsi qu'un zoom des parties droite et gauche du spectre montrant des pics latéraux à g = 2,23 et g = 1,68.

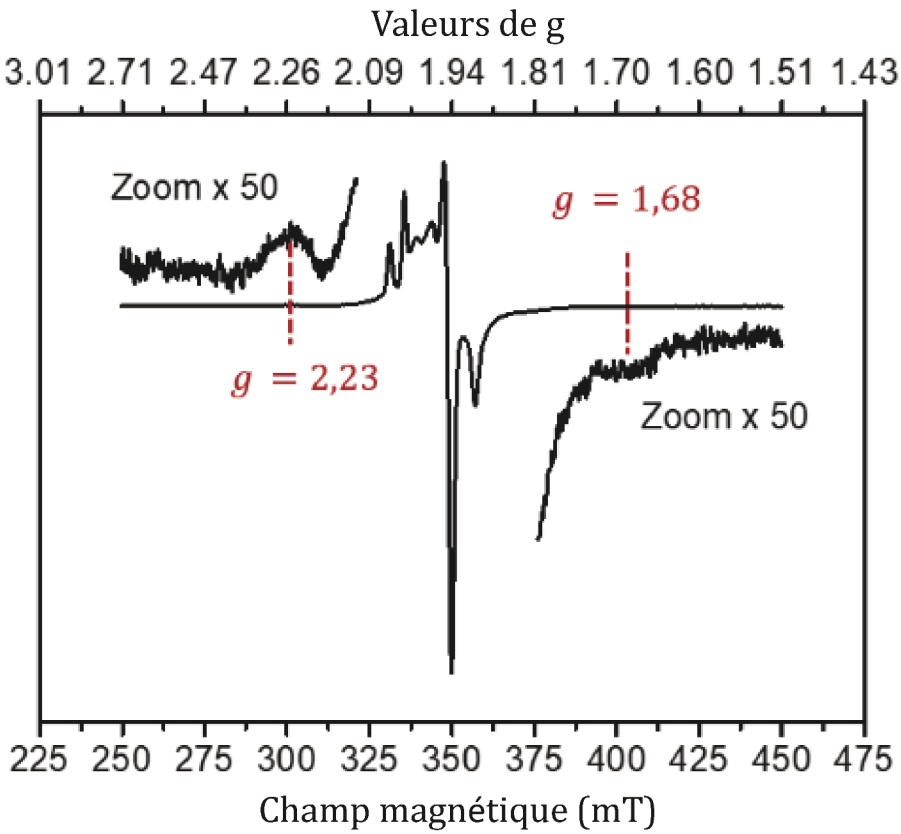


Figure III.15 : Spectre illustrant l'apparition des raies latérales sur le spectre bas potentiel présenté ici. Spectre issu du titrage 1. Conditions expérimentales : T = 15 K, potentiel : - 391 mV, tampon MES pH = 6, concentration en protéine = 80 µM, puissance 10 mW, amplitude de modulation : 10 G à 100 kHz, fréquence ≈ 9,48 GHz.

Ces raies sont des manifestations spectrales typiques de ce que l'on peut attendre lors d'un couplage entre centres.

Le couplage magnétique entre deux centres conduit à une diminution d'intensité du signal RPE du centre visible avant le couplage. Ainsi on peut déterminer un potentiel pour ce couplage qui est de $E^0_{Couplage} = -390\ mV$ à pH = 7,5 (figure III. 14). Il apparait alors que le centre impliqué dans le couplage avec C_1 serait le centre C_3 compte tenu de la proximité entre le potentiel standard du centre C_3 et celui calculé ici. Contrairement à la signature du centre C_1, celle du centre C_3 n'apparait pas perturbée car ce dernier apparait à des potentiels plus bas que C_1.

Pour analyser et comprendre ce comportement un modèle simplifié constitué de deux centres a été utilisé.

Le système considéré ici possède deux centres considérés indépendants du point de vue de leurs propriétés redox. Il peut ainsi être présent sous trois états redox différents :

- A_0 représente le système sous sa forme oxydée
- A_1 représente le système sous sa forme mono-réduite
- A_2 représente le système sous sa forme bi-réduite

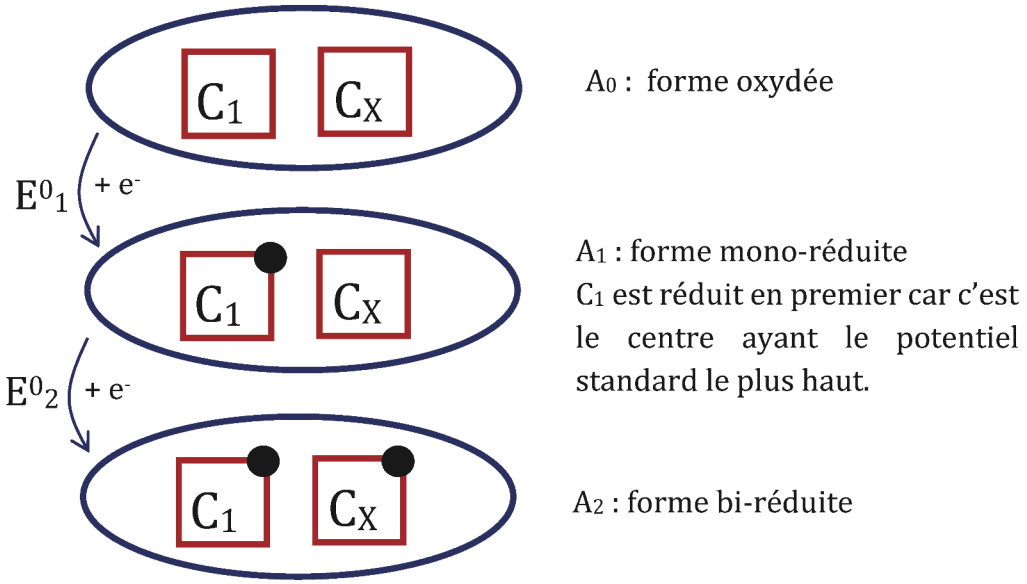


Figure III.16 : Modèle utilisé pour l'étude de la dépendance en potentiel du signal de C_1. Le carré de gauche représente C1 et celui de droite représente Cx.

Nous pouvons écrire, au vu de ce qu'on vient de dire :

- $A_0 + e^- = A_1, E^0_1$
- $A_1 + e^- = A_2, E^0_2$

E^0_1 et E^0_2 sont respectivement le potentiel standard du centre se réduisant lors de la première transition redox et celui du centre se réduisant lors de la seconde transition redox.

De plus, d'après la loi de conservation de la matière il vient :

$$[A_0] + [A_1] + [A_2] = [A]_{Tot}$$

Après renormalisation on a les fractions molaires suivantes :

$$f_0 + f_1 + f_2 = 1$$

Dans ce cas l'équation de Nernst s'écrit :

$$E_1 = E_1^0 + 0{,}06\log\left(\frac{f_0}{f_1}\right)$$

Nous pouvons ainsi exprimer le ratio $\frac{[A_1]}{[A_0]}$ par :

$$10^{\frac{E_1^0 - E_1}{0{,}06}} = \frac{f_1}{f_0}$$

De manière similaire le ratio $\frac{[A_1]}{[A_2]}$ s'exprime par :

$$10^{\frac{E_2^0 - E_2}{0{,}06}} = \frac{f_2}{f_1}$$

On peut ainsi exprimer la loi de conservation de la matière en utilisant $\frac{f_1}{f_0}$ et $\frac{f_1}{f_2}$,

$$f_0.\left[1 + \frac{f_1}{f_2} + \frac{f_2}{f_0}\right] = 1$$

On peut exprimer le rapport $\frac{A_2}{A_0}$ comme suit :

$$f_0.\left[\left(1 + \frac{f_1}{f_0}\right) + \frac{f_2}{f_1}.\frac{f_1}{f_0}\right] = 1$$

Nous pouvons à présent exprimer chaque quantité f_0, f_1 et f_2 en fonction des rapports $\frac{f_1}{f_0}$ et $\frac{f_2}{f_1}$ donnés par l'équation de Nernst. On a ainsi :

$$f_0 = \frac{1}{1 + \frac{f_1}{f_0} + \left(\frac{f_2}{f_1}.\frac{f_1}{f_0}\right)} \Rightarrow f_0 = \frac{1}{1 + 10^{\frac{E_1^0 - E_1}{0{,}06}} + 10^{\frac{E_2^0 - E_2}{0{,}06} + \frac{E_1^0 - E_1}{0{,}06}}}$$

$$f_1 = \frac{f_1}{f_0}.f_0 \Rightarrow f_1 = \frac{10^{\frac{E_1^0 - E_1}{0{,}06}}}{1 + 10^{\frac{E_1^0 - E_1}{0{,}06}} + 10^{\frac{E_2^0 - E_2}{0{,}06} + \frac{E_1^0 - E_1}{0{,}06}}}$$

$$f_2 = \frac{f_2}{f_1}.f_1 \Rightarrow f_2 = \frac{10^{\frac{E_2^0 - E_2}{0{,}06}}}{1 + 10^{\frac{E_1^0 - E_1}{0{,}06}} + 10^{\frac{E_2^0 - E_2}{0{,}06} + \frac{E_1^0 - E_1}{0{,}06}}}$$

De plus nous savons que l'amplitude du signal RPE est proportionnelle à la concentration de l'espèce paramagnétique et que l'amplitude totale du spectre en une position du champ

magnétique particulière $S_{P_{Tot}}$ peut-être exprimée comme une combinaison linéaire de f_0, f_1 et f_2 telle que :

$$\boxed{S_{P_{Tot}}(g,E) = f_0(E).S_{P_0}(g) + f_1(E).S_{P_1}(g) + f_2(E).S_{P_2}(g)}$$

avec f_i les fractions molaires de l'espèce i dépendantes du potentiel et S_{P_i}, les amplitudes des spectres des formes i dépendantes du champ magnétique (donc de g). Les centres observés sont des centres [4Fe4S] ou [2Fe2S] et donc non paramagnétiques à l'état oxydés. Ainsi la fraction f_0 = 0. Enfin il ne reste plus qu'à ajuster le tracé de la courbe de Nernst théorique aux points expérimentaux en faisant varier le potentiel de la seconde transition électronique dans ce modèle, E^0_2 (la première étant connue puisqu'il s'agit du potentiel standard du premier centre réduit), ainsi que les fractions f_1 et f_2. Ces derniers représentent les contributions des espèces mono et bi-réduites aux champs magnétiques où les amplitudes expérimentales ont été relevées.

I.2.3 – Détermination des potentiels de C_2, C_3 et C_4

A pH = 7,5 on réduit suffisamment le système pour pouvoir déterminer une valeur pour leurs potentiels standards. Le tableau III.6 résume les potentiels déterminés pour chaque centre à pH = 6,0 et pH = 7,5 les potentiels sont donnés avec une erreur de 10 mV.

Centre	Type de centre	Potentiels calculés		
		Titrage 1, pH = 6,0	Titrage 2, pH = 6,0	pH = 7,5
C0	3Fe4S	-30 mV	-40 mV	-80 mV
C1	4Fe4S	-240 mV	-230 mV	-290 mV
C2	4Fe4S	-250 mV	-250 mV	-350 mV
C3	4Fe4S	< -320 mV	< -370 mV	-380 mV
C4	2Fe2S	< -380 mV	< -380 mV	-430 mV

Tableau III.6 : Potentiels obtenus à pH = 6,0 et 7,5 pour les différents centres étudiés dans ForCE 1. Conditions expérimentales : idem figure III. 12.

Pour résumer, la figure III.17 montre les différentes signatures des centres FeS caractérisés dans ce travail dans les conditions expérimentales les plus spécifiques à leur observation.

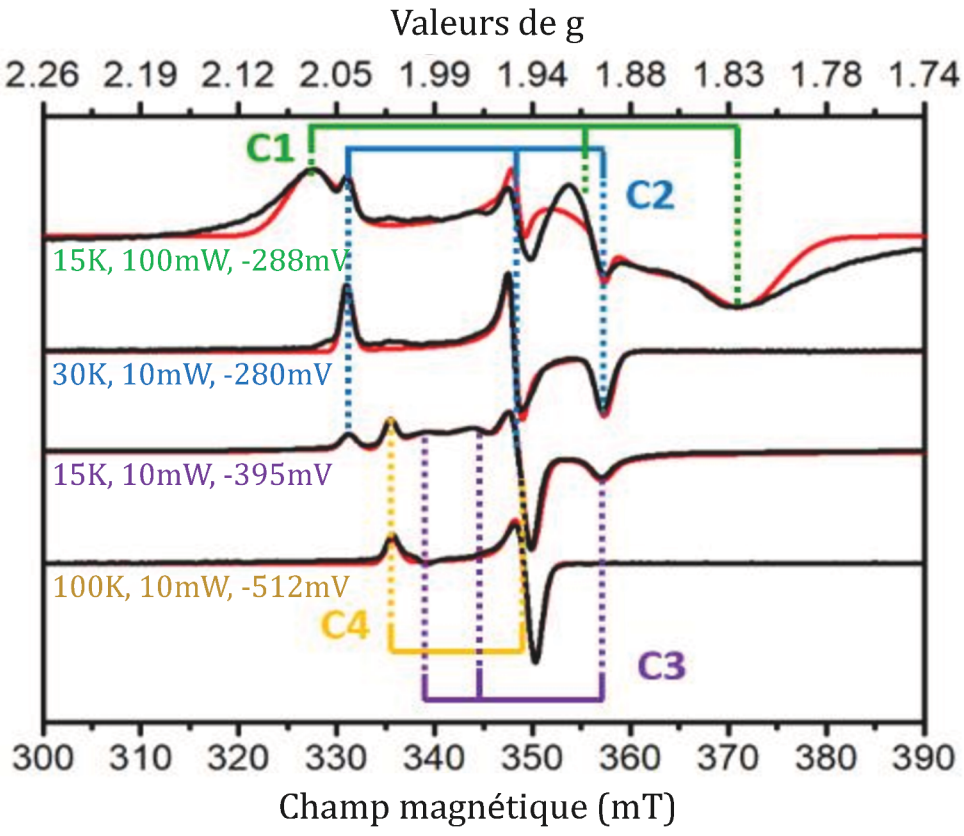


Figure III.17 : Superposition des signatures isolées des centres FeS dans des conditions optimales pour leur observation.

I.2.4 – Quantification de spin des centres FeS

Une quantification de spin à partir des signatures des centres FeS détectées dans les titrages 1, 2 et 3 a été effectuée. On a fait l'hypothèse raisonnable que ces centres sont de spin S = ½.

On va quantifier les centres FeS en utilisant une référence interne. La quantification du signal s'effectue par double intégration sur l'ensemble du spectre expérimental. Ensuite une comparaison avec la référence interne permet de déterminer le nombre de spins par ForCE 1.

A pH = 6,0, l'enzyme est partiellement réduite donc on utilise un centre de potentiel intermédiaire comme référence, en l'occurrence le centre C_2, dont on peut isoler la signature en le mesurant à 30 K. Ici on a choisi un potentiel de – 288 mV à pH = 6,0 correspondant à la demi-réduction de ce centre d'après les données du titrage (cf. tableau III.6). A ce potentiel, la contribution des centres FeS de plus bas potentiel est négligeable. On a fait l'hypothèse que

dans ces conditions le centre C_2 contribue donc pour 0,5 spin/enzyme. Cette quantification est présentée en figure III. 18.

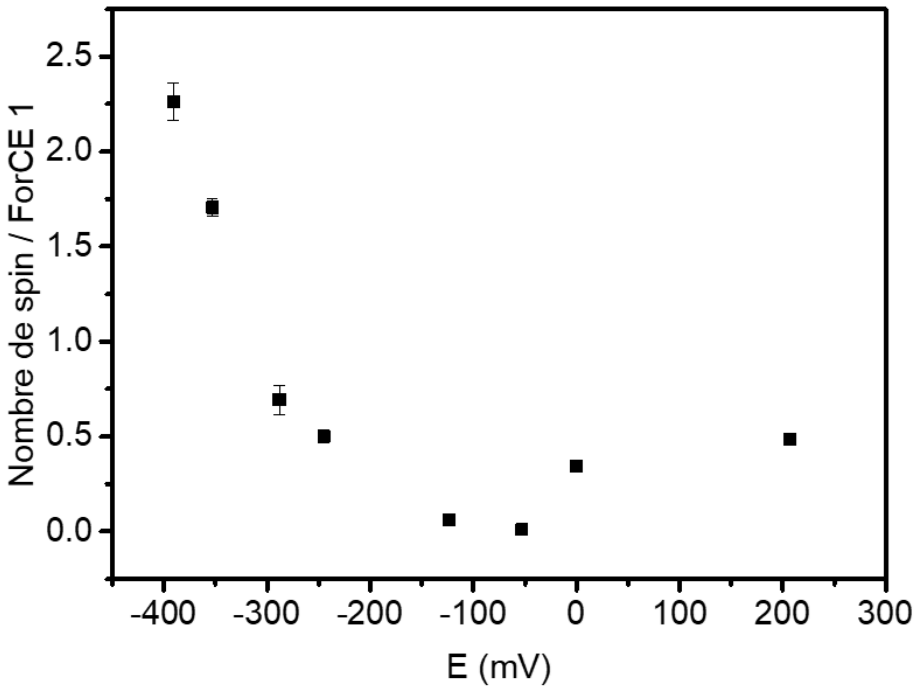


Figure III.18 : Quantification de spin des centres FeS avec C_2 comme référence interne de quantification. Conditions expérimentales : T = 15 K, tampon MES pH = 6, concentration en protéine = 80 µM, puissance 10 mW, amplitude de modulation : 10 G à 100 kHz, fréquence ≈ 9,48 GHz.

On constate que l'on obtient pour E < -400 mV, 2,26 ± 0,4 spins par ForCE 1, ce qui est cohérent avec un système contenant cinq centres FeS dont 2 réduits et au moins 1 partiellement réduit.

A pH = 7,5, l'enzyme peut être réduite suffisamment pour pouvoir utiliser le centre de bas potentiel C_4 comme référence de spin interne. L'avantage est qu'il présente des propriétés de relaxation telles que sa signature peut être isolée à 100 K et 81 mW, condition non sur-modulante et non-saturante. On considère que la double intégration de son spectre mesuré dans ces conditions dans l'échantillon préparé au potentiel de – 512 mV traduit la présence d'un centre C_4 par enzyme.

Ainsi, la figure III. 19 montre les variations de la proportion de spins obtenue par double intégration des spectres de ForCE 1 enregistrés à 15 K et faible puissance (0,1 mW) relativement à celle de C_4 obtenue comme indiqué précédemment, ceci en fonction du potentiel redox de l'échantillon.

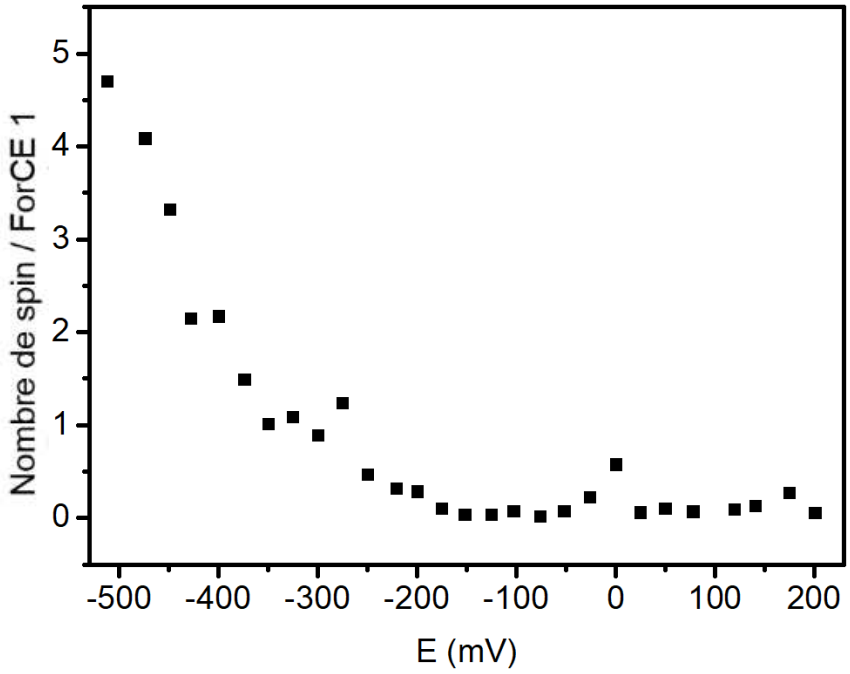


Figure III.19 : Quantification des signaux des centres FeS en utilisant pour référence interne le signal du centre C_4 (température : 100 K, puissance : 80 mW amplitude de modulation : 10 G, 4 accumulations. Conditions expérimentales des spectres utilisés : température : 15 K, puissance : 0.1 mW amplitude de modulation : 10 G à 100 kHz.

Le nombre maximal de spin total calculé à -512 mV, à pH = 7,5 est ainsi de 4.7 ± 0.4 spins. Il est également important de noter qu'à haut potentiel (+175 mV), le signal provenant du centre $[3Fe4S]^+$ correspond à 0,3 spin. Cette valeur est cohérente avec les prédictions faites à partir de la séquence pour une protéine contenant 5 centres FeS et la présence d'un centre de type $[3Fe4S]^+$ provenant vraisemblablement de la dégradation d'un centre $[4Fe4S]^+$.

Dans le but de mieux comprendre la contribution des différents centres FeS aux mesures reportées sur la figure III. 19, une simulation de celle-ci a été faite additionnant plusieurs courbes sigmoïdes construites à partir de l'équation de Nernst (Matériel et Méthode paragraphe II.2) dans lesquelles les potentiels redox sont des variables à optimiser. Le but est d'obtenir un ajustement optimal en modifiant le moins possible ces potentiels calculés à partir des valeurs présentées dans le tableau 6. Le résultat de cet ajustement correspond à la courbe rouge représentée sur la figure III.20 et a été obtenu en considérant cinq centres FeS indépendants. Leurs potentiels redox sont donnés dans le tableau III.7 où ils sont comparés avec ceux obtenus au cours du titrage à pH = 7,5.

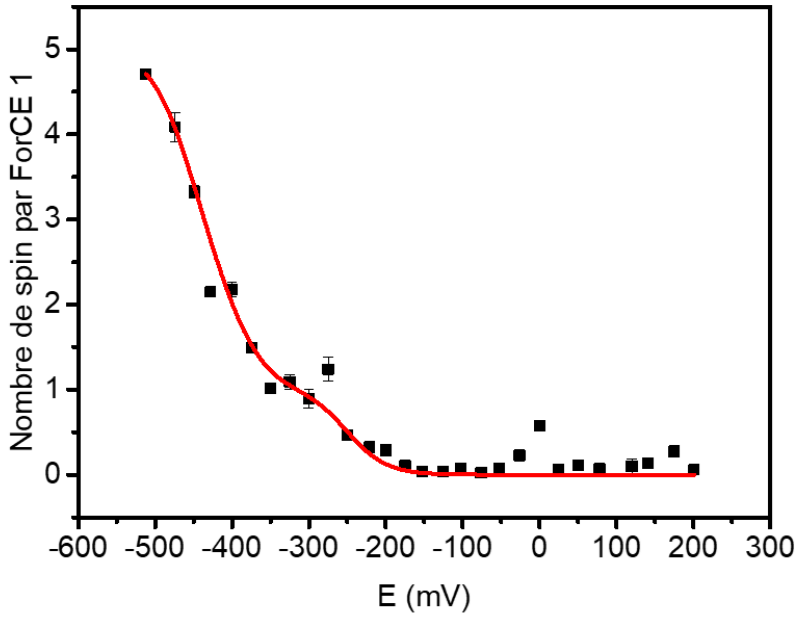


Figure III.20 : Ajustement de plusieurs lois de Nernst sur les points expérimentaux issus des expériences pour la quantification présentée en figure III.15.

Lors de l'ajustement de la courbe théorique aux point expérimentaux, la contribution de chaque centre a été fixée à 1,0 ce qui implique que la protéine est correctement métallée. De plus, le centre $[3Fe4S]^{+}$ n'a pas été modélisé dans cette simulation.

Le tableau suivant montre un comparatif des potentiels calculés au cours des titrages et ceux déterminés précédemment dans la figure III.14.

Détermination des potentiels	**Titrage à pH = 7,5**	**Analyse quantification de spin**
C_1	- 290 mV	- 250 mV
C_2	-350 mV	- 390 mV
C_3	- 380 mV	- 430 mV
C_4	- 430 mV	- 450 mV
C_5	/	- 470 mV

Tableau III.7 : Potentiels redox des centres FeS de ForCE 1 issus du titrage à pH = 7,5 et de la quantification de spin.

Comme les résultats du tableau III.7 le montrent, il y a un écart de ± 40mV en moyenne entre les résultats issus de l'analyse des titrages et ceux venant de la quantification de spin.

II – Caractérisation d'une espèce de spin S = 3/2 :

II.1 – Identification des signatures RPE :

Pour compléter l'étude des centres FeS dans la région g = 2,0, la région bas champ du spectre a également été étudiée pour évaluer la présence d'espèces de spin $S > {}^{1}/_{2}$.

La figure III.21 montre deux spectres de cette région mesurés à – 245 mV et à - 391 mV à partir des deux titrages effectués à pH = 6,0 titrage 1 (A) et titrage 2 (B).

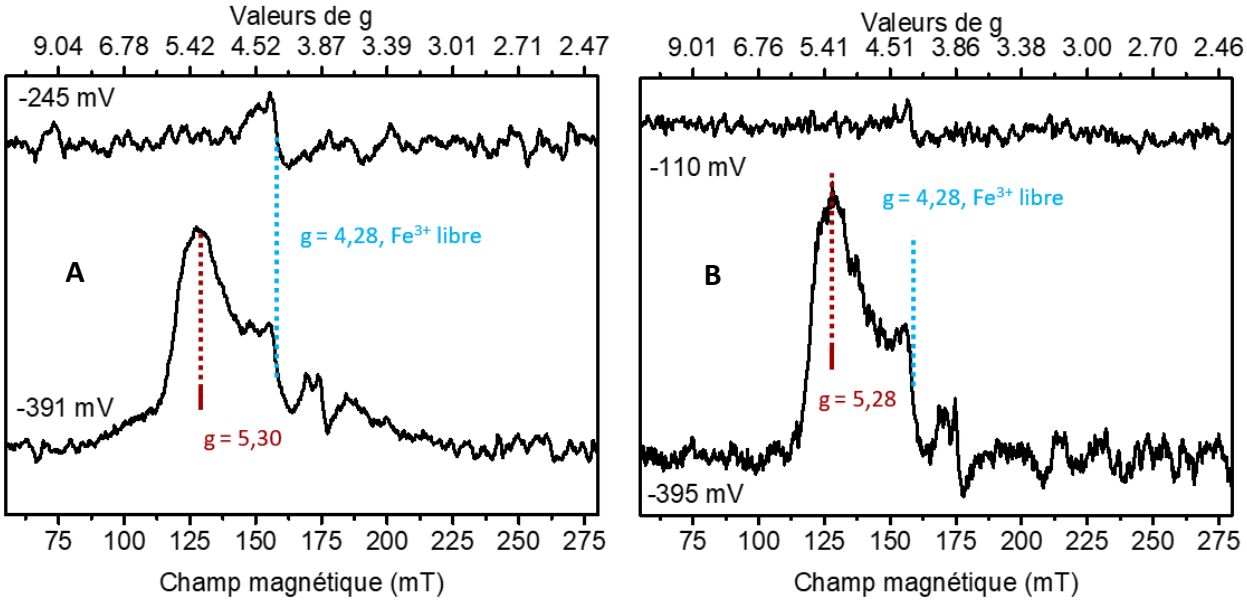


Figure III.21 : Spectres de la région bas-champ. Echantillon provenant des deux titrages à pH = 6,0 : tampon MES pH = 6,0. Conditions expérimentales : température : 8 K, puissance : 100 mW, amplitude de modulation : 30 G à 100 kHz, 4 accumulations. Titrage 1 (A), titrage 2 (B).

On constate la présence d'un signal provenant d'une espèce de bas potentiel caractérisé par un pic positif à g = 5,30.

Cette valeur de g ainsi que la forme du signal sont typiques de ce qu'on attend pour une signature provenant d'un centre FeS de spin $S > {}^{1}/_{2}$. (Voir Lanciano et al.[130])

L'étude de la dépendance en température de ce signal est montrée sur la figure III. 22. Le signal n'est visible qu'à des températures inférieures ou égales à 20 K, indiquant qu'il est

associé à un centre qui relaxe très rapidement comme attendu pour les centres [4Fe4S]$^{+}$ de spin S = 3/2. Les spectres ont donc été enregistrés à forte puissance (100 mW).

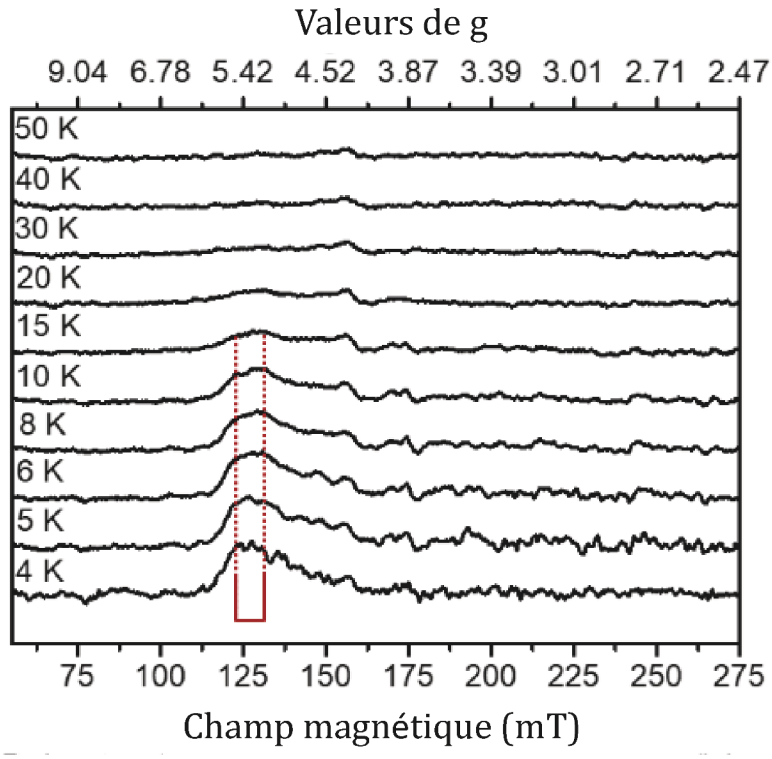


Figure III.22 : Etude en température du centre haut spin et mise en évidence de la structuration du signal (titrage 1). Conditions expérimentales : potentiel : -391 mV, puissance micro-onde : 100 mW, amplitude de modulation : 20 G à 100 kHz, 4 accumulations.

L'examen attentif de l'allure du signal laisse penser que ce dernier est possiblement hétérogène et constitué de deux raies positives très proches dont les maxima sont approximativement repérés par des pointillés sur la figure III. 22 et correspondent à g = 5,45 et g = 5,18. Les signaux peuvent être attribués aux deux pics bas champ du spectre rhombique associé aux deux doublets de Kramer d'un centre [4Fe4S]$^{+}$ de spin $S = {}^{3}/_{2}$ (voir matériels et méthodes).

L'évolution de l'amplitude des deux pics en fonction de la température est reportée dans la figure III. 23.

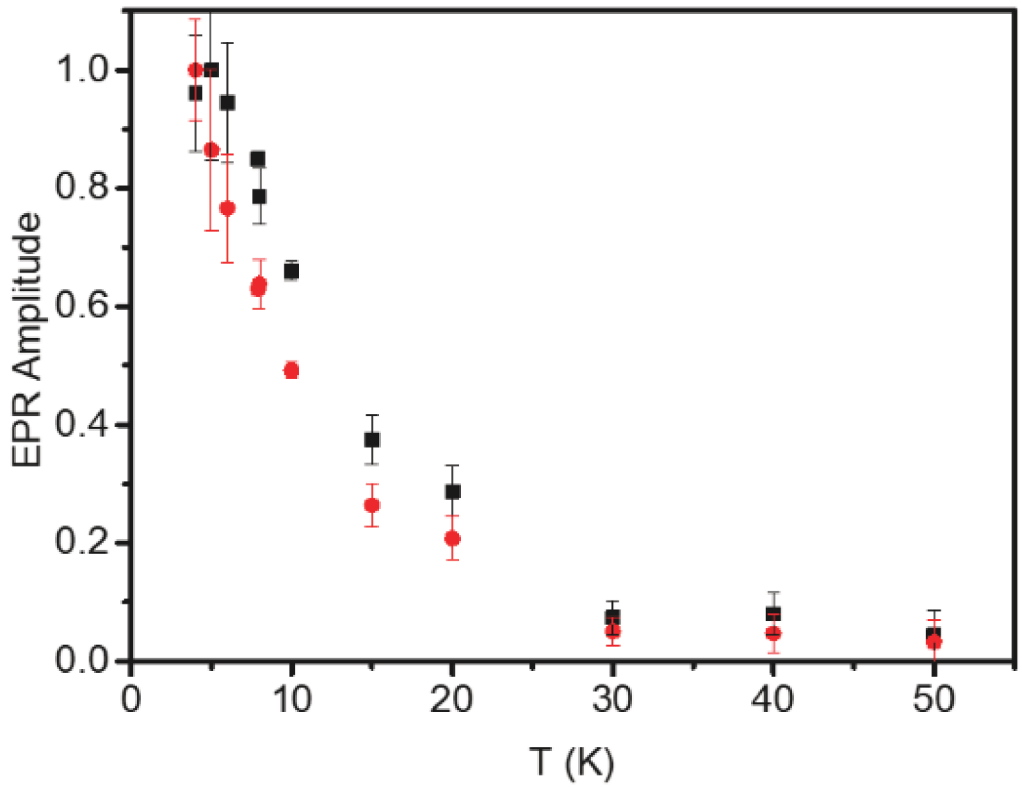


Figure III.23 : Evolution de l'amplitude RPE en fonction de la température. Conditions identiques à celles de la figure III.20. Les ronds rouges représentent les relevés d'amplitude effectués à g = 5,45 et les carrés noirs ceux effectués à g = 5,18

La figure III.23 montre ainsi deux comportements distincts pour chacun de ces deux signaux. Les ronds rouges représentent les relevés d'amplitude effectués à g = 5,45 et les carrés noirs représentent ceux effectués à g = 5,18. On constate que l'amplitude du pic à g = 5,45 ne fait que décroitre alors que celle du pic à g = 5,18 passe par un maximum autour de 5 K avant de décroitre à plus hautes températures. Ceci permet de proposer que le signal repéré à g = 5,45 correspond au doublet fondamental. Les carrés noirs correspondent ainsi au doublet excité.

Pour étudier plus avant ces signaux bas champ on va s'intéresser à l'évolution de l'intensité intégrée des deux pics en fonction de la température. En effet, le signal expérimental peut être modélisé comme la somme de deux gaussiennes de largeur de raie constante, notées $\sigma_1 = 6{,}7\ mT$ pour le pic à g = 5,45 et $\sigma_2 = 8\ mT$ pour le pic à g = 5,18. La figure III. 24 montre le rapport de la surface des deux gaussiennes en fonction de l'inverse de la température.

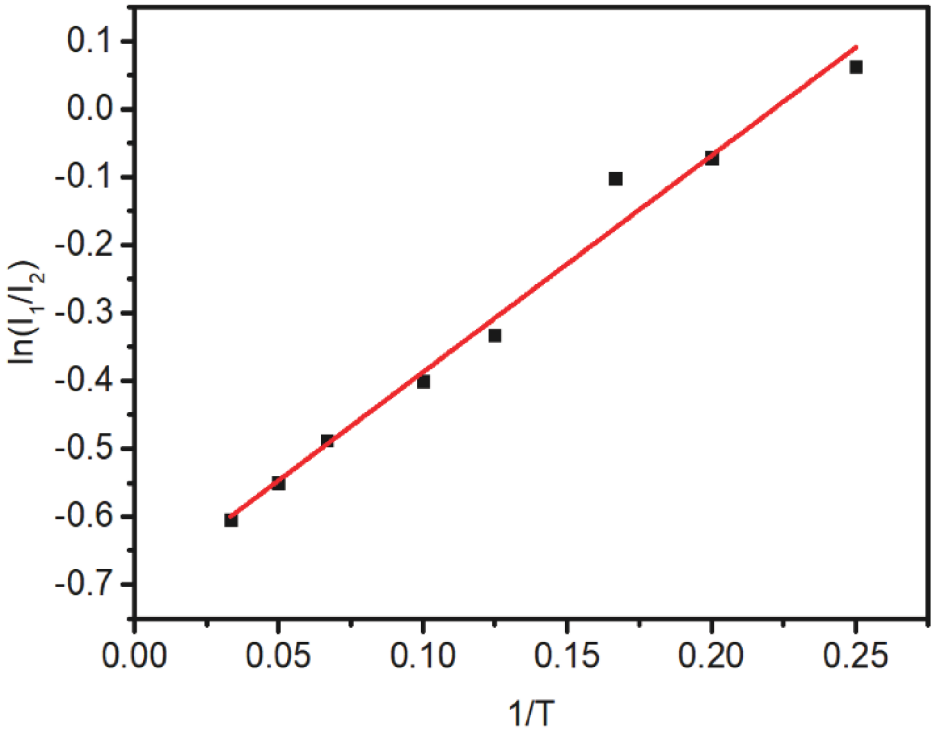


Figure III.24 : Etude en température du signal haut spin dans ForCE 1 en utilisant la méthode de simulation du signal par des gaussiennes sur les échantillons du titrage 1. Avec I1, l'intensité du pic à g = 5.45 et I2, l'intensité du pic à g_2 = 5.18. Conditions identiques à celles de la figure III.23.

On constate d'après la figure III. 24 que le comportement est modélisé par une droite comme attendu pour le comportement des raies bas champ de deux doublets de Kramer d'un centre de spin S = 3/2. Ceci permet également de calculer la pente de la droite, notée Δ/k_B permet d'avoir accès à Δ, l'écart énergétique entre les niveaux dû à la levée de dégénérescence en champ nul, soit Δ = 2,22 cm^{-1}. Ces résultats confirment l'attribution de ces signatures à un centre 4Fe4S de spin S = 3/2.

II.2 – Détermination des propriétés redox :

L'évolution de l'amplitude des pics à g_{1z} = 5,45 et g_{2y} = 5,18 a été étudiée en fonction du potentiel redox et est reportée dans la figure III. 25, dans ForCE 1 à pH = 6,0, à une température de 8 K, une puissance de 100 mW et une amplitude de modulation de 20 G qui sont les conditions optimales pour l'observation de ces signatures déterminées à partir des données présentées dans la figure III. 22.

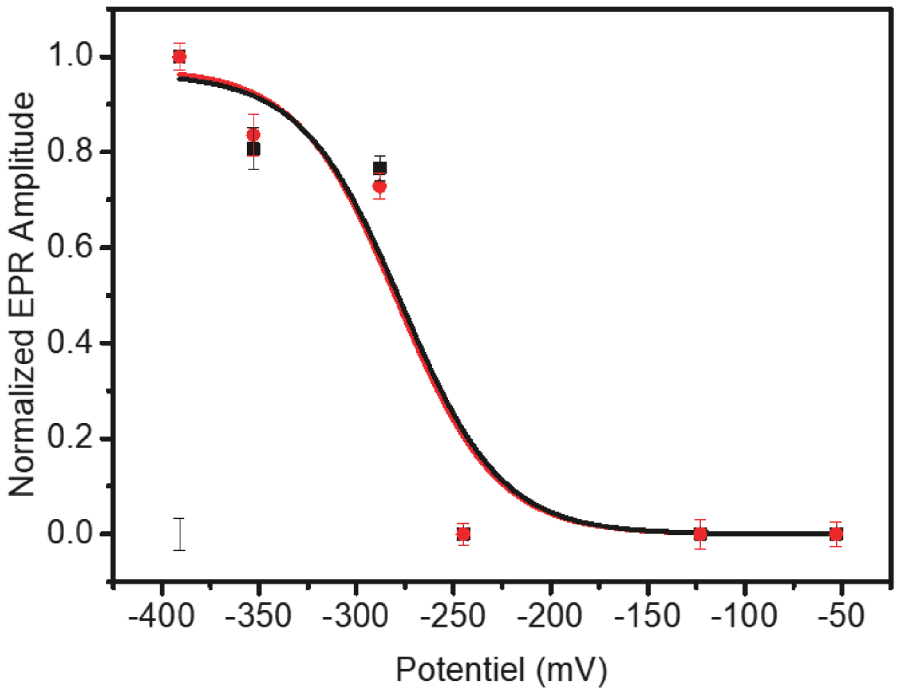


Figure III.25 : Titrage de l'espèce S = 3/2. Echantillons provenant du titrage 1. Conditions expérimentales : température : 8 K, puissance : 100 mW, amplitude de modulation : 30 G à 100 kHz, 4 accumulations. Les ronds rouges représentent les relevés d'amplitude effectués à g = 5,45 et les carrés noirs ceux effectués à g = 5,18

Un fit des points expérimentaux obtenus à partir du titrage avec une loi de Nernst a permis de déterminer le potentiel de ce centre, $E^0 = -280\ mV$ à pH = 6,0. Cette valeur est très proche de celle du centre C_2 (-260 mV au même pH), posant la question de l'origine de la signature S = 3/2. Une quantification de cette signature a été faite pour savoir si cette signature provenait du centre C_2 qui existerait alors dans deux états de spin différents ou d'un centre détectable uniquement sous un état de spin S = 3/2.

II.3 La quantification spin S = 3/2

La quantification de signaux provenant d'espèces de spin, $S = {}^3/_2$, n'est pas triviale. (Voir partie Matériels et Méthodes).

Elle a été menée en trois étapes :

1) La détermination théorique des valeurs de g de notre système à partir de celles connues.

2) Par la suite on doit déterminer les coefficients $g_{P1}D_1$, $g_{P2}D_2$, g_{Pmoy}. Ces trois coefficients sont respectivement celui attribué au pic à g = 5,45, au pic à g = 5,18 et à celui de la référence.

3) Enfin, la détermination de $\frac{I_1}{I_0}$ et $\frac{N}{N_0}$, qui sont respectivement le rapport de l'intensité du spectre dans des conditions précises par rapport à celle de la référence et le rapport entre le nombre de spin du centre S = 3/2 dans l'échantillon également en regard de la référence. Cette dernière est le centre C_3 à 30 K et – 288 mV présentée au chapitre I.2.3 et qui a permis la quantification présentée en figure III. 18.

D'après les rhombogrammes calculés pour un centre de tenseur $\tilde{g}$ isotrope avec g = 2,0, les valeurs de g attendues associées aux deux doublets de Kramer peuvent être prédites, conduisant à : pour le multiplet $\left|\pm {}^3/_2\right\rangle$ $g_{1z} = 5{,}45, g_{1y} = 2{,}00$, $g_{1x} = 1{,}46$ et pour le multiplet $\left|\pm {}^1/_2\right\rangle$ $g_{2y} = 5{,}18, g_{2z} = 2{,}51$, $g_{2x} = 1{,}69$. Les coefficients sont calculés $g_{P1}D_1 = 1{,}32$, $g_{P2}D_2 = 1{,}93$ et $g_{Pmoy} = 0{,}35$ (Voir Matériels et Méthodes paragraphe VII). Le tableau suivant récapitule les résultats des quantifications obtenus à différentes températures concernant le système S = 3/2 pour les raies à $(g_{1z} = 5{,}45)$ et à $(g_{2y} = 5{,}45)$.

A_1 (g_{1z} = 5,45)		A_2 (g_{2y} = 5,18)	
T (K)	N/N_0	T (K)	N/N_0
4	0,0058	4	0,0039
5	0,0064	5	0,0049
6	0,0069	6	0,0054
8	0,0067	8	0,0067
10	0,0068	10	0,0072
15	0,0054	15	0,0063

Tableau III.8 : Quantifications effectuées à différentes températures du centre de spin 3/2 basées sur le signal à $g_{1z} = 5.45$ et $g_{2y} = 5.18$.

A travers ces résultats, nous pouvons voir que la valeur moyenne obtenue pour la quantification de l'espèce haut spin est de $\overline{\left(N/N_0\right)}_{g_{1z}\,=\,5{,}45} = 0.0063$ spin et

$\overline{\left(N/N_0\right)}_{g_{2y}=5{,}18}$ = 0.0057 spin. Ici N est la quantité de spin de l'espèce S = 3/2 et N_0 celle de la référence (C_2 à 30 K et – 288 mV présentée au paragraphe I.2.3 et qui a permis la quantification présentée en figure III. 18). Ainsi, la quantification du signal de spin S = 3/2 montre que la proportion de ce centre représente moins de 1 % par enzyme. Ceci est donc cohérent avec l'attribution de ce dernier au centre C_2 dont une partie serait présente dans l'état S = 3/2.

III - Comparaison des signatures RPE dans ForCE 1 vs ForCE 2 :

L'étude conduite sur ForCE 2, bien que plus succincte, a donnée des résultats intéressants. ForCE 1 et ForCE 2 présentent 78 % d'homologie de séquence entre les sous-unités ForC et 28 % d'homologie entre les sous-unités ForE. De plus, le même contenu en cofacteur est prédit dans les deux enzymes. Afin de comparer les signatures RPE des centres paramagnétiques dans ForCE 1 et ForCE 2, trois états redox différents ont été explorés et sont successivement étudiés ci-après : l'enzyme réduite au dithionite de sodium, réduite au formiate de sodium et oxydée à l'air.

III.1 – Après réduction au dithionite de sodium :

La figure III. 26 montre la comparaison des spectres de ForCE 1 et ForCE 2 dans l'état réduit au dithionite à différentes températures à 1 mW (spectre 1) et 10 mW (spectres 2 à 6).

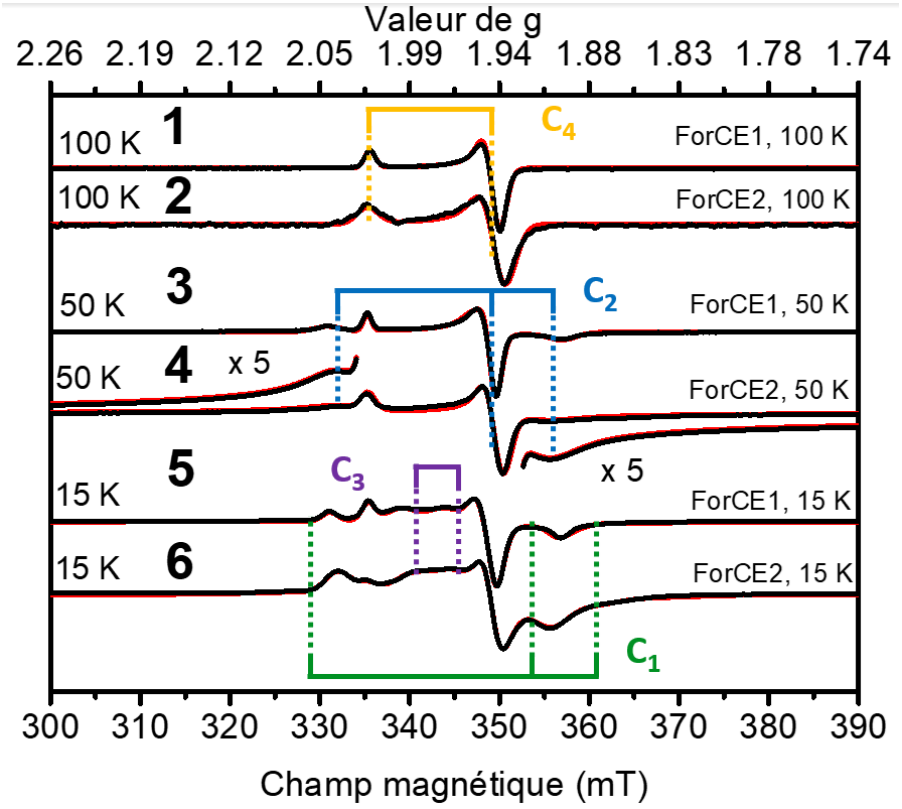


Figure III.26 : Signatures RPE des centres FeS dans ForCE 1 et ForCE 2 réduites au dithionite de sodium. Conditions expérimentales : pH = 6,0, puissance micro-onde : 1 mW (1), 10 mW (2-6), amplitude de modulation : 10 G (1-2, 4-6), 4 G (3) à 100 kHz, fréquence ≈ 9,48 GHz.

On constate alors que les centres FeS C_2, C_3, et C_4 sont retrouvés dans ForCE 2. Le centre C_1 est également retrouvé mais ayant des signaux de faibles intensités. C'est avec les simulations que sa présence est visible. En effet il est difficile d'isoler le signal du C_1 dans les échantillons réduits au dithionite dû au recouvrement partiel avec d'autres signaux. Toutefois, les simulations des spectres présentées ici en rouge sont réalisées en tenant compte de la présence de ce dernier qui rend compte de l'élargissement du spectre à g = 2,062 et g = 1,845 dans les signaux à 15 K (5 et 6). Ces centres ont, de plus, les mêmes propriétés de relaxation dans ForCE 1 et dans ForCE 2.

Les valeurs de g sont récapitulées dans le tableau III.9.

Centre (ForCE 2)	Type de centre	Symétrie	Valeurs de g			Vitesse de relaxation
			g_1	g_2	g_3	
C_1	4Fe4S	Rhombique	2,062	1,919	1,845	Rapide (< 30 K)
C_2	4Fe4S	Rhombique	2,040	1,940	1,903	Intermédiaire (< 50 K)
C_3	4Fe4S	Rhombique	1,991	1,958	1,879	Rapide (< 30 K)
C_4	2Fe2S	Axial	$g_{//} = 2,018$	$g_{\perp} = 1,937$		Lent (< 100 K)

Tableau III.9 : Caractéristiques spectroscopiques des centres FeS détectés dans ForCE 2.

On constate ainsi que les centres retrouvés dans ForCE 2 ont des valeurs de g tout à fait similaires à celles mesurées pour les centres de ForCE 1.

III.2 – Echantillon oxydé à l'air ou réduit au formiate de sodium :

La figure III.27 montre la comparaison des spectres de ForCE 1 et ForCE 2 à l'état oxydé et des enzymes réduites au formiate de sodium mesurés à différentes températures à une puissance de 4 mW.

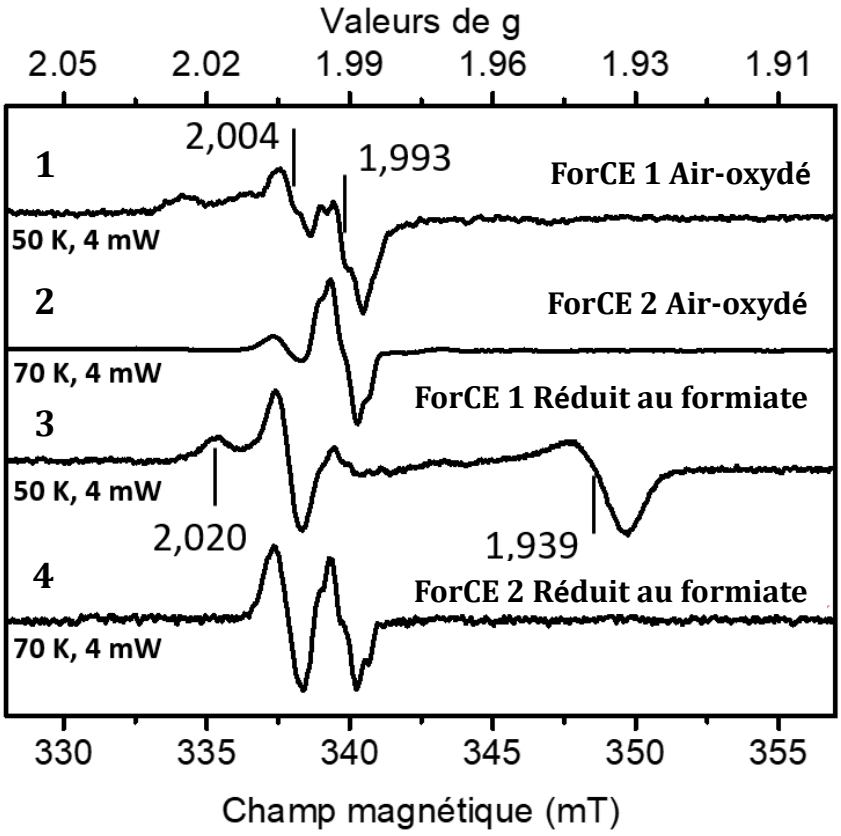


Figure III.27 : Spectres RPE des centres de ForCE 1 et ForCE 2 oxydés à l'air (1 et 2) et réduites au formiate de sodium (3 et 4). Conditions expérimentales : puissance micro-onde : 4 mW, amplitude de modulation :40 G (1-2), 2 G (3-4) à 100 kHz, fréquence ≈ 9,48 GHz.

Dans l'état oxydé à l'air, on observe des signaux à g = 2,004 et g = 1,993. Ces signatures sont attribuées à une espèce radicalaire (chapitre 2) et à une espèce de molybdène, Mo^{V} (chapitre IV). Ces signaux sont également retrouvés dans ForCE 2.

Dans les échantillons réduits au formiate, en plus du signal radicalaire et celui du Mo^{V} on observe le signal du centre C_4 visible dans ForCE 1. Ceci soulève la question de la différence entre les propriétés redox des espèces présentes dans ForCE 1 et ForCE 2.

V - Discussion

V.1 - Diagramme de corrélation des centres FeS

Les centres FeS partageant des structures communes, cubane pour les centres $[4Fe4S]^{+}$ et $[3Fe4S]^{+}$ ou losange pour les centres $[2Fe2S]^{+}$, ainsi qu'une première sphère de coordination similaire, avec des motifs de coordination de type quatre cystéines (4xCys) ou trois cystéines et une histidine (3xCys + 1xHis) pour les motifs les plus communs, on s'attendrait à ce que

leurs valeurs de g soient comparables parmi les formiate déshydrogénases et même parmi les enzymes à centres FeS.

Néanmoins les inhomogénéités conformationnelles et la présence d'un environnement chimique différent en dehors de la première sphère de coordination leur confèrent une richesse spectrale en termes de formes des signaux, largeurs des pics et propriétés de relaxation que nous avons pu constater dans la présente étude.

Nous avons ici réussi à isoler les signatures de quatre centres FeS de spin S = 1/2 sur les cinq prédits par la séquence. Par ailleurs la quantification de ces signatures a conduit à un nombre de spin total dans l'échantillon le plus réduit à pH = 7,5 de 4.7 ± 0.4 spins par enzyme plus 0,3 spin additionnel venant de l'intégration du signal provenant du 3Fe4S. Ce résultat montre que tous les centres ont été réduits et suggère que la signature du cinquième centre chevauche celles décrites dans ce chapitre.

Dans la figure III.28, les valeurs de g des centres FeS caractérisés dans les FDHs sont tracées en fonction de l'anisotropie ($g_1 - g_3$) de ces centres. Les valeurs correspondant aux centres C1, C2, C3 et C4 de ForCE 1 sont indiqués par des cercles. Le tableau 7 reprend les caractéristiques des systèmes présentés en figure III. 28 ainsi que les études dans lesquelles les centres FeS ont été caractérisés.

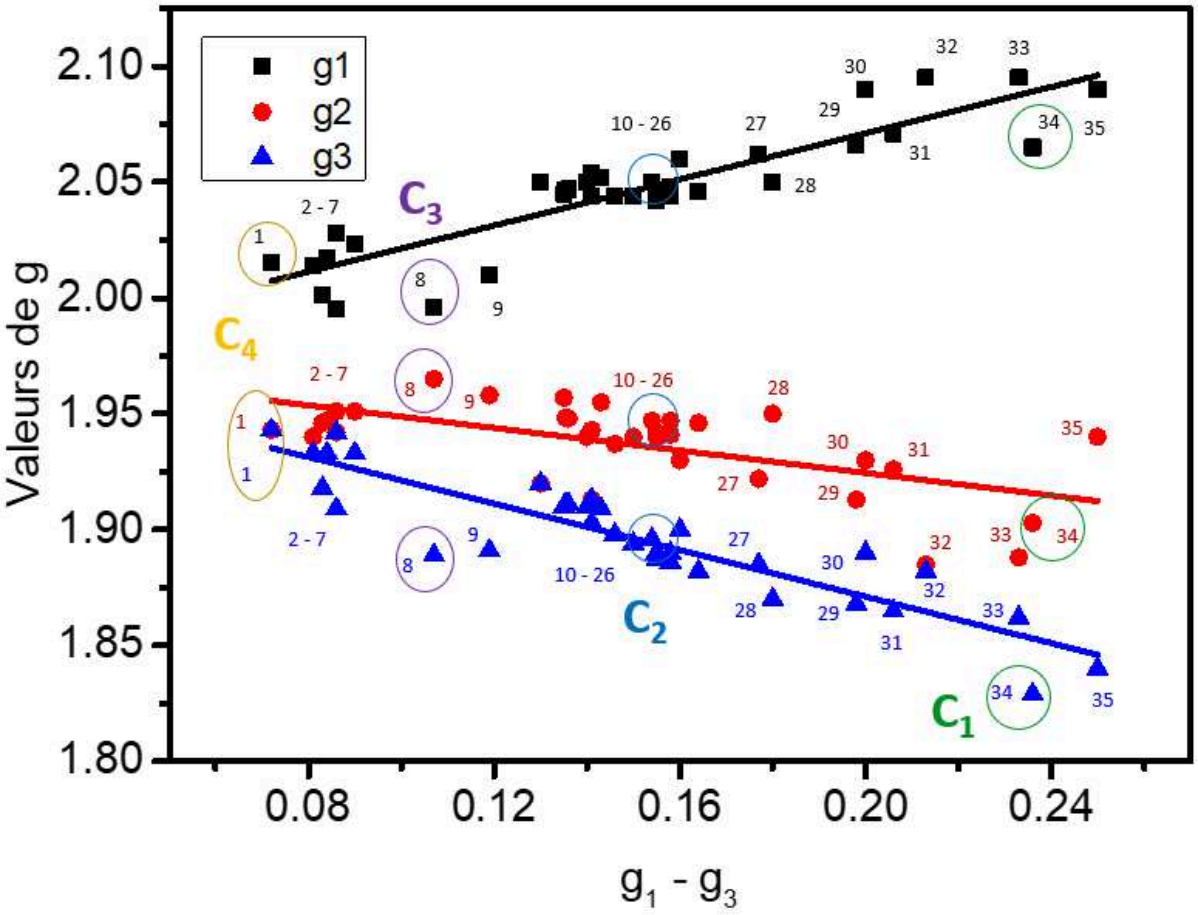


Figure III.28 : Diagramme de corrélation des centres FeS S = 1/2 de ForCE 1 et caractérisée dans les autres FDHs étudiées (code couleur utilisé au paragraphe I.2.2). Les FDHs sont numérotées est indexées dans le tableau 6. g_1 sont représentés par des carrés noirs, g_2 par des ronds rouges et g_3 par des triangles bleus.

Numéro	Valeurs de g			(g_1-g_3)	Organismes	Informations sur les centres	Références
	g_1	g_2	g_3				
1	2,018	1,937	1,937	0,072	*Bacillus subtilis*	C4 Bs	**This work**
2	2,014	1,940	1,933	0,081	*Methylosinus trichosporum*	Mt C3	Jollie et al.
3	2,001	1,946	1,918	0,083	*Cupriavidus necator*	C1 2Fe2S in FdsG	Niks et al.
4	2,017	1,947	1,933	0,084	*Cupriavidus necator*	C2	Niks et al.
5	1,995	1,951	1,909	0,086	*Methylosinus trichosporum*	C1 2Fe2S (Mössbaeur)	Jollie et al.
6	2,028	1,942	1,942	0,086	*Clostridium thermoaceticum*		Deaton et al.
7	2,023	1,951	1,933	0,090	*Methylobacterium sp RXM*	FeS I	Duarte et al.
8	1,998	1,960	1,894	0,107	*Bacillus subtilis*	C3 Bs	**This work**
9	2,010	1,958	1,891	0,119	*Costridium thermoaceticum*		Deaton et al.
10	2,050	1,920	1,920	0,130	*Clostridium pasteurianum*		Prince et al.
11	2,045	1,957	1,910	0,135	*E, coli*	FS0	Kangulov et al.
12	2,047	1,948	1,911	0,135	*Methanobacterium formicicum*		Barber et al.
13	2,047	1,948	1,911	0,136	*Methanobacterium formicicum*		Barber et al.
14	2,050	1,940	1,910	0,140	*E coli*	N7 FS0	Nakamura et al.
15	2,044	1,943	1,903	0,141	*Pseudomonas aeruginosa*		Godfrey et al.
16	2,054	1,913	1,913	0,141	*Methylobacterium sp RXM*	FeS II	Duarte et al.
17	2,052	1,955	1,909	0,143	*E, coli*	FS0	Nakamura et al.
18	2,044	1,937	1,898	0,146	*Cupriavidus necator*	C3 couplé au Mo	Niks et al.
19	2,044	1,940	1,894	0,150	*Methylosinus trichosporum*	Mt C4	Jollie et al.
20	2,050	1,947	1,896	0,154	*Desulfovibrio desulfuricans*	Center I	Costa et al.
21	2,045	1,944	1,894	0,155	*Bacillus subtilis*	C2 Bs	**This work**
22	2,047	1,948	1,911	0,155	*Desulfovibrio vulgaris*		Oliveira et al.
23	2,044	1,941	1,886	0,158	*Syntrophobacter fumaroxidans*	FDH2	de Bok et al.
24	2,048	1,947	1,890	0,158	*Desulfovibrio gigas*		Raajimaker et al.
25	2,060	1,930	1,900	0,160	*E coli CI*	N5 HisCys	Nakamura et al.
26	2,046	1,946	1,882	0,164	*Desulfovibrio alaskensis*	FeS I couplé au Mo	Brondino et al.
27	2,062	1,922	1,885	0,177	*Desulfovibrio gigas*		Raajimaker et al.
28	2,050	1,950	1,870	0,180	*Clostridium pasteurianum*		Prince et al.
29	2,066	1,913	1,868	0,198	*Desulfovibrio alaskensis*	FeS II	Brondino et al.
30	2,090	1,930	1,890	0,200	*E coli*	N4	Nakamura et al.
31	2,071	1,926	1,865	0,206	*Desulfovibrio desulfuricans*	Center II His ? (Mössbaeur)	Costa et al.
32	2,095	1,885	1,882	0,213	*Cupriavidus necator*	C4b	Niks et al.
33	2,095	1,888	1,862	0,233	*Cupriavidus necator*	C4a	Niks et al.
34	2,065	1,899	1,823	0,236	*Bacillus subtilis*	C1 Bs	**This work**
35	2,090	1,940	1,840	0,250	*Methylosinus trichosporum*	Mt C5	Jollie et al.

Tableau III.10 : Liste des formiates déshydrogénases présentées dans la figure III. 23 : Jollie et al.[97], Niks et al.[95], Dufor et al.[131], Duarte et al.[132], Prince et al.[133], Khangulov et al.[56], Barber et al.[98], Nakamura et al.[64], Godfrey et al.[134], Costa et al.[94], Oliveira et al.[92], De Bok et al.[135], Raajimaker et al.[39], Brondino et al.[82] et ce travail : Arias-Cartin R., A. Uzel[136]

V.2 - Centre C_4 (2Fe2S)

Ainsi on constate que l'anisotropie des centres FeS détectés dans les FDHs est comprise entre ~ 0,07 et ~ 0,25. De plus la figure III.28 reprend les études sur les centres [4Fe4S] et [2Fe2S] qui ne sont pas toujours faciles à distinguer.

Cette distinction a été faite dans l'étude menée par Jollie et al.[97] sur la FDH de *Méthylosinus trichosporium*. Dans cette étude, le signal observé à g_1 = 1.995, g_2 = 1,951, g_3 = 1,909, ligne 5

du tableau 10, est attribué à un centre [2Fe2S] puisqu'il présente une dépendance en température qui suit la loi de Curie sans élargissement des raies jusqu'à 90 K. Les auteurs remarquent également que cette signature possède néanmoins un spectre inhabituel pour un centre FeS de type [2Fe2S] puisque toutes ses valeurs de g sont inférieures à 2,0. Il est de plus intéressant de noter que le centre que les auteurs appellent C_3 (g_1 = 2,014 et g_2 = 1,940, ligne 2 du tableau III.10) est attribué à un centre [4Fe4S], mais reconnaissent que c'est toutefois inhabituel pour ce type de centre puisqu'il est toujours visible à des températures aussi élevées que 90 K. Ce dernier signal correspond en termes de valeurs de g, de formes spectrales et de propriétés de relaxation au centre C_4 présent dans les ForCEs qui est attribué à un centre [2Fe2S]. Cet exemple montre qu'il est délicat de distinguer entre [2Fe2S] et [4Fe4S]. L'étude menée par Niks et al[95]. sur la FDH de *C. necator* souligne également ces difficultés et décrit un centre attribué à un cluster [2Fe2S] (g_1 = 2,001, g_2 = 1,946, g_3 = 1,918 (ligne 3 du tableau III.10). Les auteurs l'attribuent sur la base des propriétés de relaxation de ce dernier. Néanmoins, un autre centre dans cette enzyme (g_1 = 2,017, g_2 = 1,947, g_3 = 1,933, ligne 4 du tableau III.10) est visible jusqu'à 120 K et présente des propriétés de relaxation similaires au précédent.

Il est intéressant de constater que le centre C_4 des ForCEs est également retrouvé dans la zone de faible anisotropie dans la figure III. 28 où les centres [2Fe2S] décrits dans le paragraphe précédent sont observés. C_4 possède également des propriétés de relaxation similaires aux études présentées dans le paragraphe précédent. Ceci appuie donc son attribution à un cluster de type [2Fe2S].

V.3 - Centre C_3

Concernant le centre C_3 décrit dans ce travail, certaines études font mention de centres avec des valeurs de g similaires et des propriétés de relaxation correspondant à un centre relaxant vite. Ainsi, l'étude menée par Jollie et al.[97] montre également le centre appelé 1 ayant pour valeur de g : g_1 = 1.995, g_2 = 1,951, g_3 = 1,909. Ce centre est attribué par les auteurs à un centre [2Fe2S] puisqu'il présente une dépendance en température qui suit la loi de Curie sans élargissement des raies jusqu'à 90 K. Ceci n'est cependant pas le cas dans l'étude présentée dans cette thèse puisque le seul centre visible à cette température ne présente pas de valeurs de g similaires. Ce centre C_1 décrit par Jollie et al est plus proche en termes de valeurs de g du centre C_3 dans ForCEs. Les auteurs remarquent également que cette signature possède

néanmoins un spectre inhabituel pour un centre FeS de type [2Fe2S] puisque toutes ses valeurs de g sont inférieures à 2,0. L'étude plus récente de Niks et al.[95] décrit également un centre avec les valeurs de g : g_1 = 2,001, g_2 = 1,946, g_3 = 1,918. Les auteurs l'attribuent à un centre [4Fe4S]. Néanmoins ses propriétés de relaxation sont bien différentes de celles de C_3 dans ForCEs car il est toujours visible à une température de 100 K. On constate avec ce qui vient d'être dit que c'est un cas limite entre le comportement attendu pour un centre [2Fe2S] et un centre [4Fe4S].

V.4 - Centre C_1 et C_2

Les centres appelés C_1 et C_2 dans ForCE 1 et ForCE 2 sont très proches en termes de valeurs de g, de formes de signaux et en termes de propriétés de relaxation de plusieurs centres retrouvés dans la littérature. Ainsi dans l'étude menée par Cristina Costa et al. sur la formiate déshydrogénase de *Desulfuvibrio desulfuricans* ATCC 27774[94], on constate la présence de deux centres FeS dont un signal large repéré par g_1 = 2,071, g_2 = 1,926, g_3 = 1,865 visible jusqu'à 20 K et un autre signal plus étroit repéré par g_1 = 2,050, g_2 = 1,947, g_3 = 1,896 présent seul à 30 K. Ces spectres sont donc analogues à ceux de C_1 et C_2 et sont décrits comme provenant tous deux de centres de type [4Fe4S]. L'attribution des centres C_1 et C_2 des ForCEs à deux centres de types [4Fe4S] est donc cohérente avec l'étude menée par Christina Costa et al.

Une deuxième étude venant appuyer l'attribution de centres FeS présents dans ForCE 1 et ForCE 2 est celle de Brondino et al[82] étudiant la formiate déshydrogénase de *Desulfovibrio alaskensis*. Dans cette étude on peut trouver deux signatures rhombiques de centres FeS attribuées à des centres [4Fe4S]. L'une d'entre elles présente un signal large repéré par g_1 = 2,066, g_2 = 1,913, g_3 = 1,868 (Fe/S II) et une autre associée à des raies plus étroites et caractérisée par g_1 = 2,046, g_2 = 1,946, g_3 = 1,882 (Fe/S I). Il est intéressant de noter ici que seuls deux centres FeS sur les quatre contenus dans cette FDH ont été caractérisés par spectroscopie RPE, cela venant selon les auteurs d'une perte du contenu en Fe de l'enzyme comme c'est également le cas pour la FDH de *Desulfovibrio gigas*[39]. En effet l'étude de la FDH de *D. gigas* n'a révélé que deux signatures attribuées à des centres 4Fe4S caractérisés par g_1 = 2,048, g_2 = 1,947, g_3 = 1,890 et g_1 = 2,062, g_2 = 1,922, g_3 = 1,885 sur les quatre attendues.

L'étude plus récente de Niks et al.[95] décrit l'analyse RPE de la formiate déshydrogénase de *Cupriavidus necator*. Cette étude nous montre la diversité en terme de valeurs de g des

centres FeS. En effet, la prédiction pour cette FDH est de quatre centres [4Fe4S]. Les auteurs observent quatre signatures qu'ils attribuent à ces centres FeS. Deux d'entre eux ont des valeurs de g et des caractéristiques très similaires aux centres C_1 et C_2 vues dans les ForCEs, nommés FeS3 (g_1 = 2,044, g_2 = 1,937, g_3 = 1,898) et FeS4 (g_1 = 2,095, g_2 = 1,888, g_3 = 1,862). Dans cet article la numérotation des centres utilisée traduit leur apparition des centres par ordre décroissant de température.

Enfin, les résultats obtenus dans l'étude réalisée sur la formiate-déshydrogénase de *Methylosinus trichosporum* OB3B par Jollie et al.[97] présentent beaucoup de points communs avec ceux obtenus dans cette thèse. En effet, les auteurs ont dans cette étude analysé et reproduit un spectre expérimental observé à travers une simulation faisant intervenir cinq centres : quatre centres [4Fe4S] et un centre [2Fe2S]. Deux des centres observés dans cette simulation, les centres alors appelés 4 et 5 sont caractérisés par des valeurs de g_1 = 2,044, g_2 = 1,940, g_3 = 1,894 pour FeS4 et g_1 = 2,09, g_2 = 1,94, g_3 = 1,84 pour FeS5 et sont observés pour des températures allant de 30 K et 50 K. Ces signatures sont attribuées à des centres [4Fe4S] et possèdent des propriétés similaires à ceux trouvés dans les ForCEs. .

V.5 - Centre de spin S = 3/2

Un centre de spin S = 3/2, attribué à un centre FeS a été détecté. Les deux composantes bas champ de chaque doublet de Kramer sont accessibles par l'analyse des signaux. Ce centre a un potentiel proche de celui de C2 (– 280 mV) et sa quantité par enzyme est faible. Cela suggère donc que ce signal pourrait provenir d'une hétérogénéité conformationnelle de C2 qui existerait sous la forme d'un spin S = 1/2 majoritaire et S = 3/2 minoritaire. Cela a déjà été observé dans plusieurs études sur des systèmes similaires par Rothery et al.[137] et Lanciano et al.[130] Elles montrent l'analyse en température d'un centre FeS de spin 3/2 dont l'allure de la courbe d'évolution de l'amplitude en fonction de la température est tout à fait comparable à celle observée dans ForCE 1. L'analyse détaillée que les auteurs en font a servi de base au travail mené ici sur ce centre. Néanmoins contrairement à ce que les auteurs ont fait dans la nitrate réductase nous n'avons pas pu déterminer les valeurs de g réelles pour le centre S = 3/2. La raison en est que pour déterminer les valeurs de g réelles d'un centre de ce type il faut avoir accès à au moins deux valeurs de g effectives pour un même doublet de Kramer. L'étude faite par Lanciano et al.[130] montre que les auteurs ont pu déterminer les trois valeurs de g

effectives pour chaque doublet à g_{1x} = 1,08, g_{1y} = 0,948, g_{1z} = 5,60 et g_{2x} = 2,79, g_{2y} = 5,00, g_{2z} = 1,75. Dans l'étude menée sur ForCE 1 seule une valeur de g effective par doublet a pu être détectée. Dans l'étude de Lanciano et al.[130], la quantification du centre de spin 3/2 donne 40%, c'est-à-dire que 40% du centre FS0 est présent dans un état de spin 3/2 et 60% est présent dans un autre état de spin vraisemblablement S = 1/2. L'attribution du centre haut spin dans ForCE 1 a été faite au centre C2 par comparaison de leurs potentiels standards. Elle se base sur la proximité des potentiels pour identifier le centre en question. La détermination des potentiels est délicate compte tenu des multiples erreurs pouvant être commises : erreurs dans la calibration des électrodes, erreurs dans la lecture du potentiel, erreurs dues aux changements des potentiels entre le prélèvement de l'échantillon et sa congélation, erreurs dans le relevé d'amplitude à partir des spectres RPE, etc. Il faut donc être prudent avec les attributions faites en fonction du potentiel. De plus, il existe dans les ForCEs un centre [4Fe4S] coordonné par 3 cystéines et 1 histidine. Comme c'est le cas dans l'étude de la nitrate réductase mentionnée avant, ces centres sont connus pour pouvoir générer des signaux bas champ provenant de ce centre dans un état de spin S = 3/2. De plus, compte tenu des incertitudes données sur les potentiels, une interprétation alternative est que le potentiel du centre de spin S = 3/2 est proche de celui du centre C_1. Ce dernier pourrait également être un candidat envisageable. Il est également important de noter qu'un signal attribué à un centre dans un état de spin 3/2 a été également trouvé dans la FDH de *Methylosinus trichosporum* avec comme valeurs de g effectives 4,4, 3,6 et 1,97. La quantification donne alors une valeur de 1,5 $\pm$ 0,5 spins par enzyme[97].

Chapitre IV

Etude du cofacteur à Molybdène dans ForCE 1 et ForCE 2

Table des matières

I – Analyse des signaux de Mo^{V} dans ForCE 1 et ForCE 2 174
II - Etude multifréquence de l'espèce 1 du Mo^{V} dans ForCE 2 176
III - Détections des isotopes du Mo 179
IV - Titrage du Mo^{V} dans ForCE 1 : 180
IV.1 - Observation de plusieurs signatures de Mo^{V} : 180
IV.2 - Titrage des espèces Mo^{V} : 182
IV.2.1 - Titrage à pH = 6,0 de l'espèce 1 du Mo^{V} : 182
IV.2.2 - Titrage à pH = 6,0 de l'espèce 2 du Mo^{V}: 184
IV.2.3 - Titrage à pH = 7,5 et quantification de l'espèce 2 du Mo^{V} 186
IV.2.3.1 - Titrage à pH = 7,5 de l'espèce 2 du Mo^{V} 186
IV.2.3.2 - Quantification de l'espèce 2 du Mo^{V} 187
V - Spectroscopie HYSCORE de l'espèce 1 du Mo^{V} dans ForCE 2 : 191
VI - Discussion : 194
VI.1 – Attribution des couplages hyperfins détectés par HYSCORE 194
VI.2 - Deux espèces de Mo^{V} dans ForCE 1 196
VI.3 - Potentiels standards des espèces Mo^{V} 197
VI.4 - Diagramme de corrélation des valeurs de g du Mo^{V} dans les FDHs 198

Dans ce chapitre, on s'intéresse à la détection et à la caractérisation spectroscopique et thermodynamique du cofacteur à molybdène de ForCE 1 et ForCE 2. Pour commencer, il est important de rappeler que l'espèce de molybdène visible en RPE est l'ion molybdène (V) noté Mo^{V}. C'est l'espèce mono-réduite de spin S = 1/2, porteuse d'un électron célibataire et donc visible en RPE qui est générée dans le cycle catalytique durant lequel le molybdène oscille entre les états d'oxydation (+ IV) et (+ VI).

I – Analyse des signaux de Mo^{V} dans ForCE 1 et ForCE 2

En général les espèces de type Mo^{V} relaxe plus lentement que les centres FeS et sont donc visibles dans les meilleures conditions à des température ≥ 50 K et à des puissances de l'ordre du mW. La figure IV.1 montre un spectre de l'échantillon oxydé à l'air enregistré à 50 K dans ForCE 1 (A) et ForCE 2 (B) à pH = 6,0.

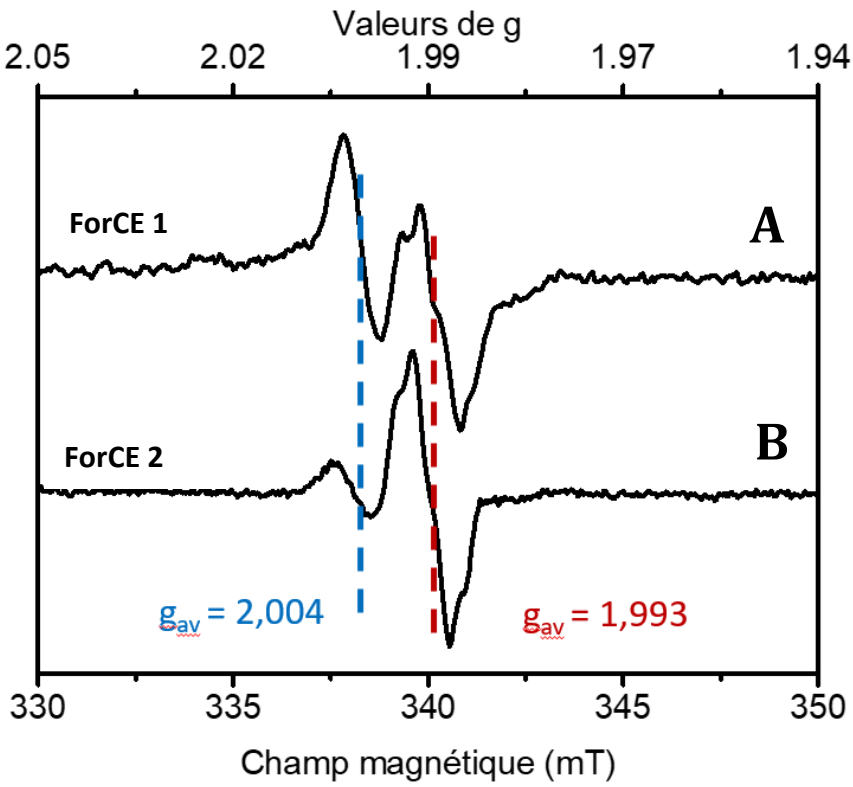


Figure IV.1 : Spectres RPE illustrant l'espèce 1 du molybdène dans ForCE 1 (A) et dans ForCE 2 (B). Conditions expérimentales : échantillon oxydé à l'air, pH = 6,0, puissance micro-onde : 4 mW, amplitude de modulation : 4 G à 100 kHz. Spectre (A) : température : 50 K, fréquence : 9.4810 GHz. Spectre (B) : température : 70 K, fréquence : 9.4787 GHz.

Deux signaux sont visibles sur la figure IV.1. Premièrement, un signal radicalaire non structuré à une valeur moyenne de g de g_{moy} = 2,004, de largeur pic-à-pic d'environ 12 G, qui sera étudié en détail dans le chapitre suivant.

Deuxièmement, on observe un signal structuré de profil quasi-isotrope avec une valeur moyenne de g de g_{moy}= 1,993 et de largeur pic-à-pic d'environ 10 G dans ForCE 1 et ForCE 2.

Les valeurs de g ainsi que les propriétés de relaxation des signaux à g ~ 1,993 sont caractéristiques d'espèces du Mo^{V}. Par la suite, ce signal sera désigné comme espèce 1. De plus, la figure IV.1 B montre que les signaux de radical et de Mo^{V} sont retrouvés dans ForCE 2 avec une amplitude relative différente, la contribution relative du Mo^{V} étant plus importante dans ForCE 2 que dans ForCE 1. Pour cette raison, les études détaillées sur le Mo^{V} ont été menées sur des échantillons de ForCE 2.

La figure IV.2 montre les spectres de l'espèce 1 de molybdène dans ForCE 1 (A) et ForCE 2 (B) en noir ainsi que les simulations de ces derniers en rouge. Ces spectres ont été enregistrés dans des conditions permettant une étude détaillée du profil du signal, révélant une structuration.

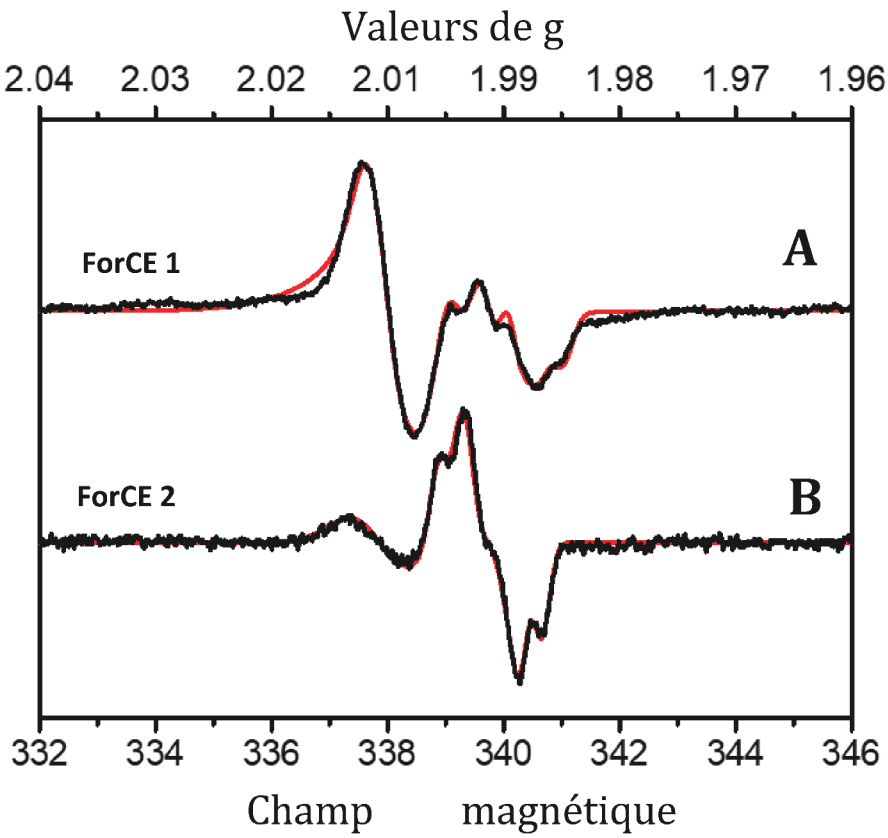


Figure IV.2 : Comparaison des spectres RPE de l'espèce 1 de molybdène dans ForCE 1 (A) et ForCE 2 (B) (en noir). Les simulations en rouge sont superposées aux spectres. Conditions expérimentales : potentiel : pH = 6,0, puissance micro-onde : 1 mW, amplitude de modulation : 1 G à 100 kHz. Spectre (A) : potentiel : - 288 mV, température : 50 K, fréquence : 9.4804 GHz, 36 accumulations. Spectre (B) : potentiel : oxydé à l'air, température : 70 K, fréquence : 9.4786 GHz, 12 accumulations. Paramètres des simulations : valeurs de g radical : g_1 = 2,0054, g_2 = 2,0051, g_3 = 2,0023, largeur de raie modélisée par des couplages hyperfins non résolus (HStrain) : H_1 = 13,7 MHz, H_2 = 100,3 MHz, H_3 = 13,4 MHz. Valeurs de g de l'espèce 1 du Mo^V : g_1 = 1,9999, g_2 = 1,9924, g_3 = 1,9874, couplage hyperfin avec 1 proton décrit par un tenseur de valeurs principales : A_1 = 18,9 MHz, A_2 = 12,3 MHz, A_3 = 11,3 MHz, largeur de raie modélisée par du HStrain : 9,9 MHz, 9,8 MHz, 10,7 MHz.

Les structurations sont observées dans ForCE 1 figure IV.2 (A) et dans ForCE 2 figure IV.2 (B). Elles peuvent être simulées en les modélisant par un couplage hyperfin avec un ^1H caractérisé par un tenseur hyperfin de valeurs principales A_1 = 18,8 MHz, A_2 = 12,3 MHz, A_3 = 11,3 MHz dans ForCE 1. Le même modèle conduit dans ForCE 2 à A_1 = 12,1 MHz, A_2 = 12,5 MHz, A_3 = 10,9 MHz. Les valeurs de g ainsi que le couplage hyperfin sont proches dans ForCE 1 et dans ForCE 2, on peut ainsi raisonnablement conclure que ces deux signatures sont associées à la même espèce de Mo^V qui est couplée à un proton.

II - Etude multifréquence de l'espèce 1 du Mo^V dans ForCE 2

Une étude multifréquence du signal de l'espèce 1 du Mo^V dans ForCE 2 a été menée en bande Q et W. La figure IV.3 compare le signal de l'espèce 1 de molybdène mesuré en bande X (A) avec celui en bande Q (B) sur une même échelle de valeurs de g. Les simulations de ces signaux sont en rouge.

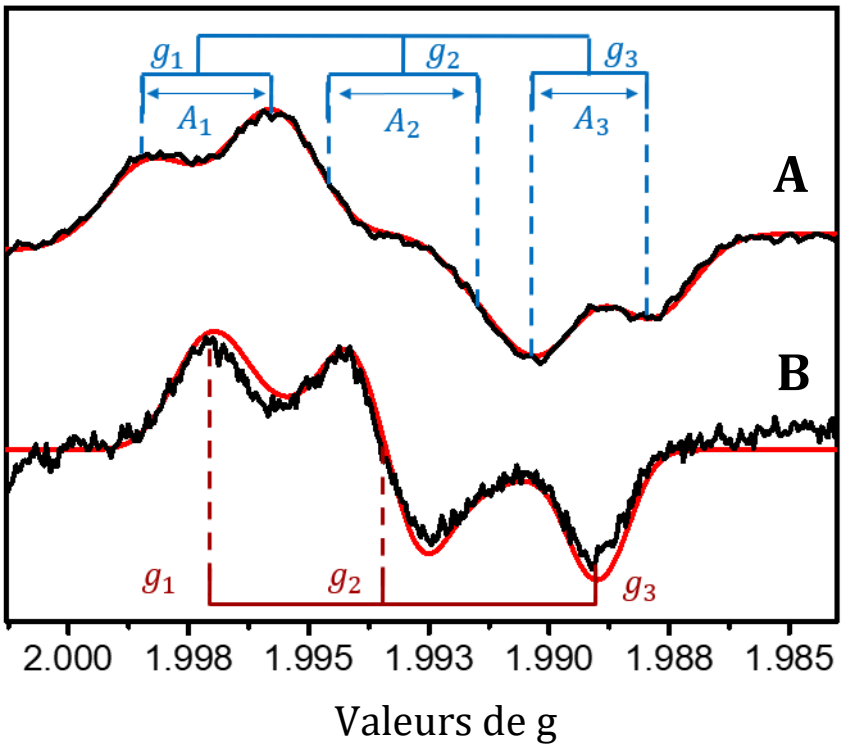


Figure IV.3 : Comparaison des spectres mesurés en bande X (A) et bande Q (B) de l'espèce 1 du Mo^V dans ForCE 2 avec les simulations (en rouge). Conditions expérimentales : échantillon oxydé à l'air, pH = 6,0. (A) : température : 50 K, puissance micro-onde : 0,1 mW, amplitude de modulation : 1 G à 100 kHz, 16 accumulations, fréquence : 9,4805 GHz. (B) : température : 70 K, puissance micro-onde : 1 mW, amplitude de modulation : 1 G à 100 kHz, 16 accumulations, fréquence : 34,119 GHz. Paramètres des simulations : valeurs de g Mo^V espèce 1 : g_1 = 1,9971, g_2 = 1,9934, g_3 = 1,9890, couplage hyperfin avec le proton : A_1 = 12,5 MHz, A_2 = 12,4 MHz, A_3 = 11,0 MHz. Pour le spectre A : largeur de raie modélisée via des couplages hyperfins non résolus (HStrain) : H_1 = 9,7 MHz, H_2 = 12,0 MHz, H_3 = 8,9 MHz. Spectre B : H_1 = 25,8 MHz, H_2 = 20,7 MHz, H_3 = 19,4 MHz.

Alors que l'éclatement hyperfin est bien visible sur le spectre mesuré en bande X, celui mesuré en bande Q ne montre aucun éclatement résolu mais un signal caractéristique d'une espèce Mo^V rhombique caractérisée par g_1 = 1,997, g_2 = 1,993 et g_3 = 1,989. La rhombicité de cette espèce est également bien résolue sur le spectre enregistré en bande W via la mesure de l'écho de spin à deux impulsions (figure IV.4).

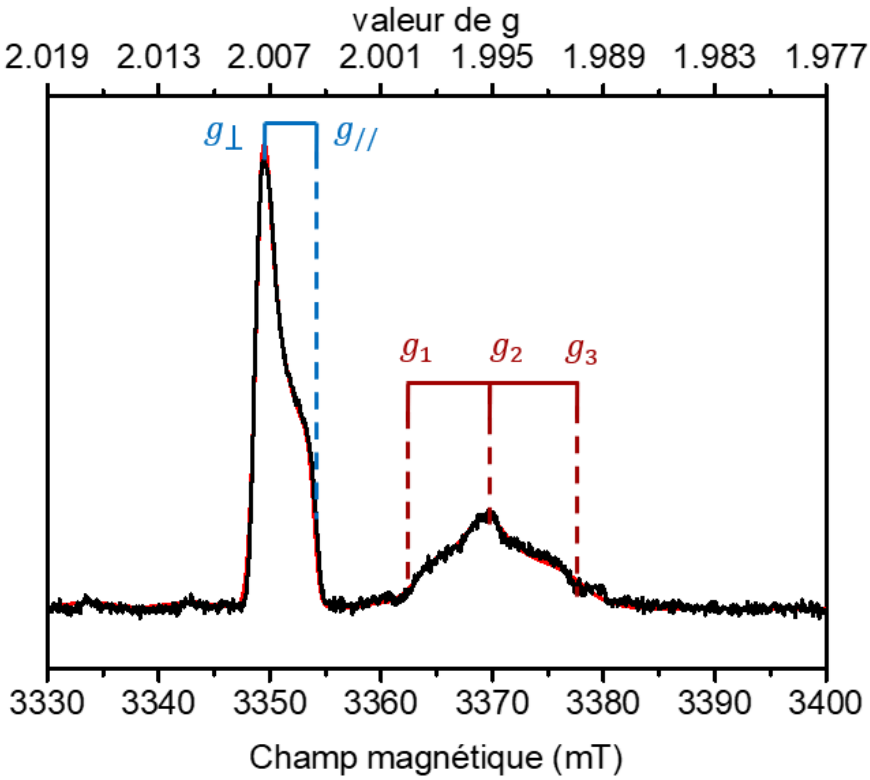


Figure IV.4 : Spectre RPE détecté par écho de spin en bande W de l'espèce molybdène 1 dans ForCE 2 et sa simulation (en rouge). Conditions expérimentales : échantillon oxydé à l'air, pH = 6,0. Spectre enregistré avec une séquence de Hahn ($^{\pi}/_{2} - \tau - \pi$) avec une durée d'impulsion $^{\pi}/_{2}$ = 20 ns, τ = 200 ns, π = 40 ns, puissance micro-onde : 5,0 nW, 16 accumulations, SRT = 500 µs, SPP = 160, fréquence : 94,00 GHz. Paramètres des simulations : valeurs de g du radical : g_1 = 2,0056, g_2 = 2,0052, g_3 = 2,0024, largeur de raie modélisée via des couplages hyperfins non résolus (HStrain) : H_1 = 20,0 MHz, H_2 = 56,9 MHz, H_3 = 36,1 MHz. Valeurs de g Mo^V espèce 1 : g_1 = 1,9971, g_2 = 1,9934, g_3 = 1,9890, largeur de raie espèce 1 modélisée par du HStrain : H_1 = 82,7 MHz, H_2 = 68,5 MHz, H_3 = 76,7 MHz, couplage hyperfin avec le proton : A_1 = 12,5 MHz, A_2 = 12,4 MHz, A_3 = 11,0 MHz.

La figure IV.4 montre que l'espèce 1 de molybdène isotrope en bande X apparait comme étant une espèce rhombique de faible anisotropie avec $g_1 - g_3$ = 0,0081. Les spectres ont tous été simulés en utilisant les valeurs de g, g_1 = 1,9971, g_2 = 1,9934, g_3 = 1,9890, déterminées à partir de la simulation du spectre mesuré en bande W, ainsi qu'en intégrant dans la simulation le couplage hyperfin avec un proton tel que déterminé à partir de la simulation de l'éclatement résolu sur le spectre en bande X, soit à A_1 = 12,5 MHz, A_2 = 12,4 MHz, A_3 = 11,0 MHz. Seule la largeur de raie a été ajustée en fonction de la fréquence et ont été modélisées par des couplages hyperfins non-résolus. Les largeurs utilisées pour chaque raie : H_1 = 9,7 MHz, H_2 = 12,0 MHz, H_3 = 8,9 MHz (bande X), H_1 = 25,8 MHz, H_2 = 20,7 MHz, H_3 = 19,4 MHz (bande Q) et H_1 = 82,7 MHz, H_2 = 68,5 MHz, H_3 = 76,7 MHz (bande W) augmentent en fonction de la fréquence d'enregistrement du spectre.

III - Détections des isotopes du Mo

La figure IV.5 montre le signal de l'espèce 1 de Mo^{V} dans ForCE 2 après 29 accumulations du signal et la simulation de ce dernier en rouge.

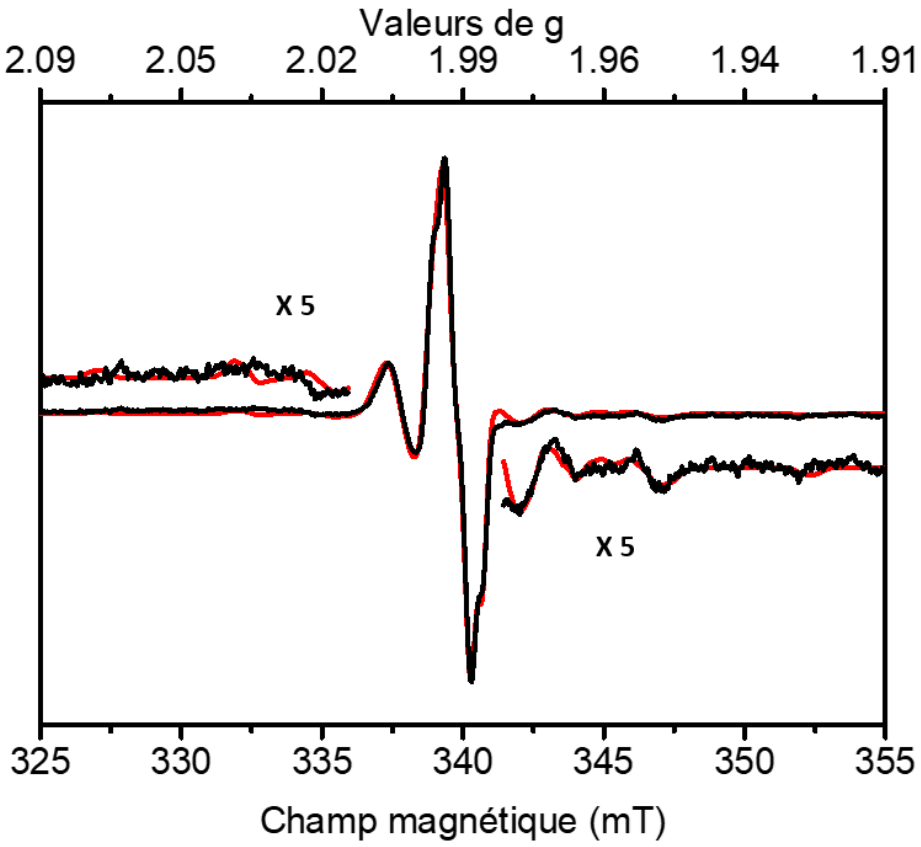


Figure IV.5 : Spectre de l'espèce 1 du Mo^{V} dans ForCE 2 permettant la mise en évidence la présence des isotopes du molybdène en abondance naturelle et sa simulation (en rouge). Conditions expérimentales : échantillon air-oxydé, pH = 6,0, température : 50 K, puissance micro-onde : 4 mW, amplitude de modulation : 4 G à 100 kHz, gain : 60 dB, 29 accumulations, fréquence : 9.4785 GHz. Paramètres des simulations : valeurs de g : g_1 = 1,9971, g_2 = 1,9934, g_3 = 1,9890, couplage hyperfin avec le proton : A_1 = 12,5 MHz, A_2 = 12,4 MHz, A_3 = 11,0 MHz, largeur de raie modélisée via des couplages hyperfins non résolus (HStrain) : H_1 = 14,1 MHz, H_2 = 14,4 MHz, H_3 = 10,0 MHz, couplage hyperfin avec les noyaux de molybdène : A_1 = 140 MHz, A_2 = 77 MHz, A_3 = 50 MHz, angles d'Euler entre le tenseur $\tilde{g}$ et le tenseur $\tilde{A}$: (ψ = 5°, ϑ = 20°, ϕ = 70°).

L'amélioration du rapport signal sur bruit permet de faire apparaitre des signaux de faible intensité de part et d'autre du signal principal.

Ces signaux peuvent être attribués à la présence des isotopes magnétiques du molybdène Mo (95, 97) dans leur abondance naturelle, ^{95}Mo = 15,92 %, ^{97}Mo = 9,55 %, tous deux de spin nucléaire I = 5/2.

La figure IV.5 montre également une simulation du signal de l'espèce 1 de Mo^{V} qui prend en compte i) le couplage avec un proton comme indiqué plus haut, ii) la contribution des deux isotopes, en utilisant un unique tenseur hyperfin pour le ^{95}Mo caractérisé par A_1 = 140 Mhz, A_2 = 77 MHz, A_3 = 50 MHz, la contribution du ^{97}Mo étant alors automatiquement prise en compte dans le programme utilisé. Ceci confirme l'attribution de cette espèce à du Mo^{V}.

IV - Titrage du Mo^{V} dans ForCE 1 :

IV.1 - Observation de plusieurs signatures de Mo^{V} :

Alors que l'espèce 1 du Mo^{V} est détectée dans ForCE 1 dans les titrages 1 et 2 réalisés à pH = 6,0 (figure IV.6 A et B), elle n'est pas présente dans le titrage réalisé à pH = 7,5. Un autre signal

rhombique caractérisé par g_1 = 2,019, g_2 = 1,984, g_3 = 1,967 est visible à 50 K (figure IV. 7 C) attribué à une seconde espèce de Mo^V dans ForCE 1, dénommée par la suite espèce 2.

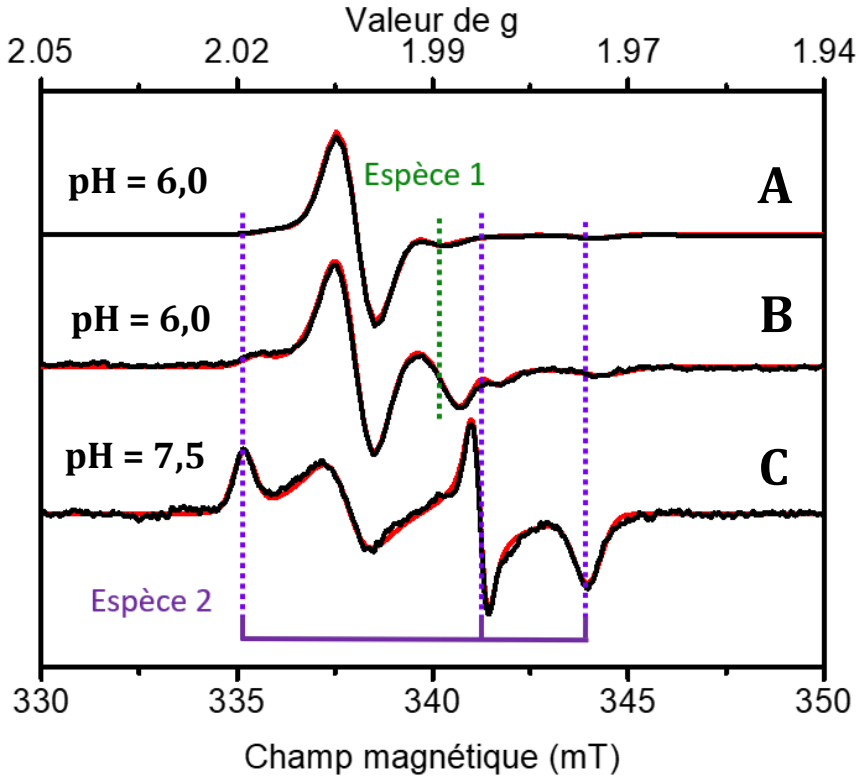


Figure IV.6 : Spectre des deux espèces de molybdène dans les préparations de ForCE 1 à pH = 6,0 (A et B) et pH = 7,5 (C). Conditions expérimentales : (A et B) température : 50 K, puissance micro-onde : 1 mW, gain : 60 dB, amplitude de modulation : 10 G à 100 kHz. (A) : potentiel : -123 mV, fréquence : 9.4802 GHz. (B) : potentiel : - 50 mV, fréquence : 9.4811 GHz. (C) : potentiel : 0 mV, température : 50 K, puissance micro-onde : 1 mW, 36 accumulations, amplitude de modulation : 5 G à 100 kHz, fréquence : 9.4807 GHz. Paramètres simulations : valeurs de g espèce radicalaire : g_1 = 2,0056, g_2 = 2,0052, g_3 = 2,0024, largeur de raie modélisée par des couplages hyperfins non résolus (HStrain) : (A) : H_1 = 31,1 MHz, H_2 = 22,3 MHz, H_3 = 56,9 MHz, (B) : H_1 = 63,5 MHz, H_2 = 24,7 MHz, H_3 = 28,6 MHz, (C) : H_1 = 44,0 MHz, H_2 = 24,9 MHz, H_3 = 128,6 MHz. Valeurs de g Mo^V espèce 1 : g_1 = 1,9971, g_2 = 1,9934, g_3 = 1,9890, Largeur de raie espèce 1 modélisée par du HStrain : (A) : H_1 = 26,8 MHz, H_2 = 26,8 MHz, H_3 = 26,8 MHz, (B) : H_1 = 47,9 MHz, H_2 = 49,1 MHz, H_3 = 24,5 MHz. Valeurs de g Mo^V espèce 2 : g_1 = 2,0192, g_2 = 1,9852, g_3 = 1,9692. Largeur de raie espèce 2 modélisée par du HStrain (A) : H_1 = 23,0 MHz, H_2 = 23,0 MHz, H_3 = 31,4 MHz, (B) : H_1 = 22,6 MHz, H_2 = 16,2 MHz, H_3 = 40,0 MHz, (C) : H_1 = 18,2 MHz, H_2 = 11,3 MHz, H_3 = 22,4 MHz.

Trois points sont à préciser concernant l'espèce 2 :

1) Elle n'est pas détectée dans ForCE 2 dans les préparations oxydées à l'air, réduites au formiate ou au dithionite à pH = 6,0.

2) Elle est détectée dans toutes les préparations de ForCE 1 titrées à pH = 6,0 et pH = 7,5 (figure IV.6). En effet, les faibles signaux juxtaposés à la signature de l'espèce 1 du

molybdène et du radical dans les titrages effectués à pH = 6,0 sont identifiés comme provenant de l'espèce 2 (figure IV.6 A et B).

3) Elle est la seule présente à pH = 7,5 dans ForCE 1 puisque l'espèce 1 n'est pas détectée dans le titrage associé (figure IV. 6 C).

IV.2 - Titrage des espèces Mo^{V} :

La détermination des potentiels pour les espèces 1 et 2 de molybdène a été faite par ajustement des points expérimentaux avec une loi de Nernst. Les espèces 1 et 2 du Mo^{V} ont été titrées en mesurant l'amplitude pic-à-pic du signal à g_{moy} = 1,993 pour l'espèce 1 et celles aux trois valeurs de g (g_1 = 2,019, g_2 = 1,984, g_3 = 1,967) pour l'espèce 2 en fonction du potentiel appliqué. Il est à noter que tous les potentiels donnés dans ce chapitre sont par rapport à l'Electrode Standard à Hydrogène (ESH).

IV.2.1 - Titrage à pH = 6,0 de l'espèce 1 du Mo^{V} :

La figure IV.7 montre les spectres expérimentaux obtenus au cours des deux titrages à pH = 6,0 (titrage 1 (A), titrage 2 (B)). Ces signatures ont été utilisées pour les relevés d'amplitude effectués lors des titrages.

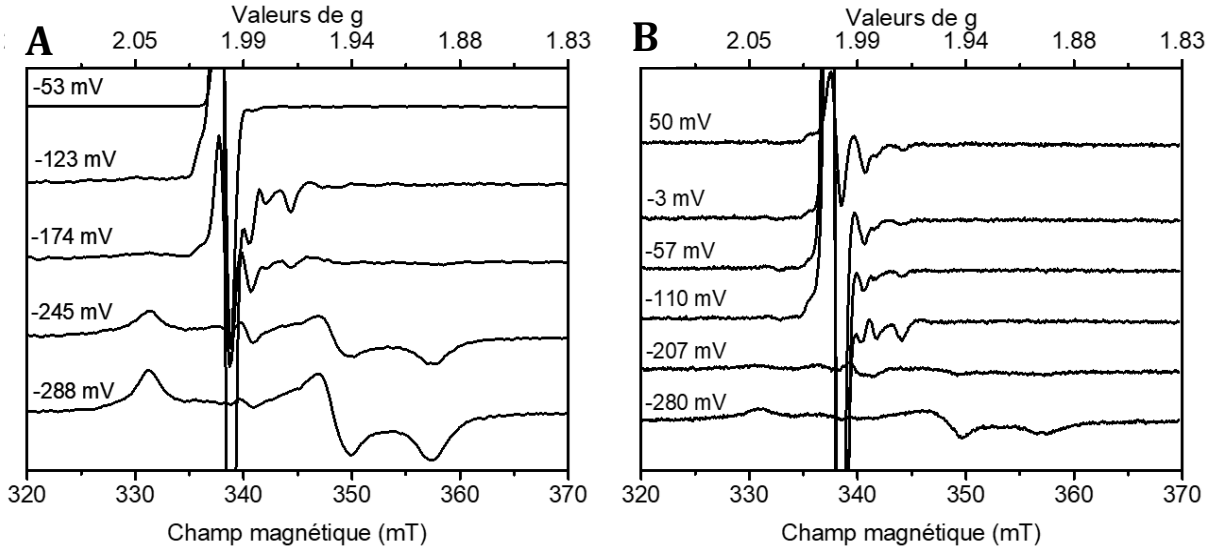


Figure IV.7 : Spectres RPE mettant en évidence les signatures des espèces Mo^{V} dans ForCE 1 au cours des deux titrages à pH = 6,0. Conditions expérimentales : température : 50 K, pH = 6,0, puissance micro-onde : 10 mW, amplitude de modulation : 10 G à 100 kHz, fréquence ≈ 9.48 GHz.

On constate avec la figure IV.7 qu'il est délicat de titrer les espèces 1 et 2 du Mo^{V} car ces dernières sont à proximité du signal très intense attribué au radical organique.

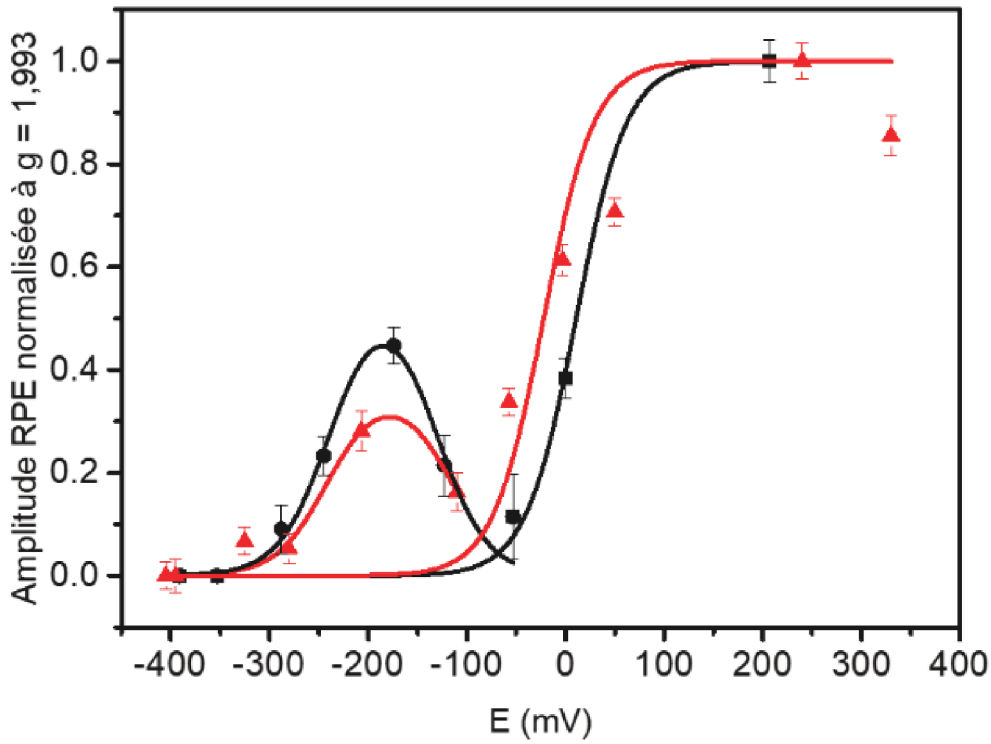


Figure IV.8 : Titrages du signal attribué à l'espèce 1 du Mo^{V} à pH = 6,0 à g ≈ 1,993 dans le titrage 1 (ronds noirs) et le titrage 2 (triangles rouges). Conditions expérimentales : température : 50 K, pH = 6,0, puissance micro-onde : 10 mW, amplitude de modulation : 10 G à 100 kHz, fréquence ≈ 9.48 GHz.

La figure IV.8 montre les relevés d'amplitude expérimentales à g = 1,993 pour le titrage 1 (en noir) et pour le titrage 2 (en rouge) effectué, à pH = 6,0, ainsi que l'ajustement d'une loi de Nernst sur ces derniers.

Le comportement redox observé apparait aberrant et difficile à relier à un comportement classique d'un cofacteur à molybdène présentant un profil de courbe en cloche. On peut néanmoins en distinguer deux. Un premier comportement redox modélisable avec une courbe en cloche caractéristique des espèces de Mo^{V} est visible à bas potentiel. Un deuxième comportement redox est observé à haut potentiel. Ce dernier est délicat à analyser. Toutefois, on peut le rationaliser dans deux cas de figure. Cette allure est typique des espèces paramagnétiques à l'état oxydé, comme les centres de type $[3Fe4S]^{+}$ dont une signature a été

isolée dans ForCE 1. La deuxième possibilité est qu'il s'agirait d'une deuxième espèce de Mo^V de haut potentiel dont on n'observerait que la partie « bas potentiel » de la courbe en cloche.

Ainsi on peut déterminer des potentiels standards $E^0_{Mo^{VI}/Mo^V}$ et $E^0_{Mo^V/Mo^{IV}}$ pour les première et deuxième transitions électroniques, notés respectivement E^0_1 et E^0_2, pour les courbes en cloche présentes entre – 50 mV et – 400 mV (tableau IV.1).

Titrages à pH = 6,0	Titrage espèce 1 Mo^V	
	E^0_1	E^0_2
Titrage 1	-131 mV	-239 mV
Titrage 2	-115 mV	-242 mV

Tableau IV.1 : Potentiels déterminés à partir du comportement entre -400 et -50 mV lors des titrages à pH = 6,0 pour l'espèce 1 du Mo^V

Les potentiels calculés pour le deuxième comportement redox sont respectivement pour les titrages 1 et 2, $E^0_{Mo^{VI}/Mo^V} = +11\ mV \pm 10\ mV$ et $E^0_{Mo^V/Mo^{IV}} = -42\ mV \pm 10\ mV$.

IV.2.2 - Titrage à pH = 6,0 de l'espèce 2 du Mo^V:

L'espèce 2 de molybdène présente aussi à pH = 6,0 est très difficile à titrer. Premièrement son signal est moins intense que celui de l'espèce 1 à ce pH. De plus les raies caractéristiques de ce dernier (g_1 = 2,019, g_2 = 1,984, g_3 = 1,967) sont partiellement recouvertes par les signaux de l'espèce 1 du Mo^V et du radical. Pour ces raisons le titrage 1 n'a pas permis d'obtenir des données satisfaisantes pour le calcul du potentiel de l'espèce 2. En revanche, le titrage 2 nous a permis de le faire. Au vu des spectres présentés en figure IV.7, la meilleure position pour effectuer un relevé d'amplitude apparait être en g_3 = 1,967 puisque ce pic est situé le plus à l'écart des autres signaux présents dans ces conditions et dans cette gamme de potentiel.

La figure IV.9 montre les relevés d'amplitude expérimentaux en g_3 = 1,967, à pH = 6,0. Ces données sont ajustées avec une équation de Nernst à deux transitions redox.

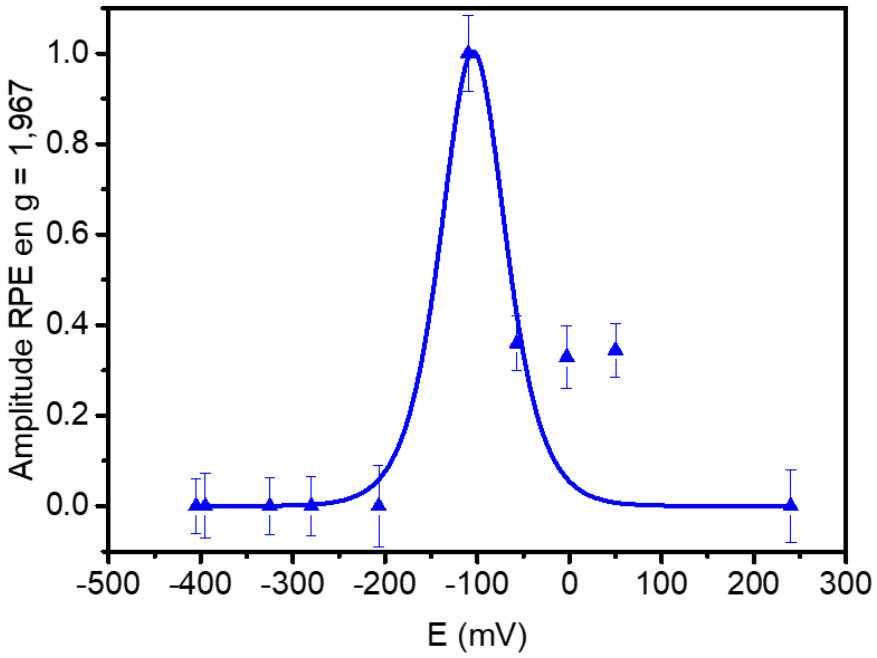


Figure IV.9 : Titrage de l'espèce 2 du Mo^{V} dans le titrage 2 à pH = 6,0. Conditions expérimentales : température : 50 K, pH = 6,0, puissance micro-onde : 10 mW, amplitude de modulation : 10 G à 100 kHz, fréquence ≈ 9.48 GHz.

Plusieurs choses sont à noter. Premièrement, on constate que les point expérimentaux peuvent être modélisés avec une loi de Nernst avec deux transferts d'électron, ce qui est attendu pour une espèce de type Mo^{V}. Toutefois, on constate également qu'il est délicat d'effectuer un titrage sur chacune des valeurs de g. En effet, l'espèce 2 de Mo^{V} est partiellement recouverte par les signaux du radical et de l'espèce 1 de Mo^{V} adjacents. Les potentiels standards calculés à partir de g = 1,96 sont : $E_1^0 = -98\,mV \pm 10\,mV$ *et* $E_2^0 = -110\,mV \pm 10\,mV$. Cette position, la plus éloignée des autres contributions spectrales, est utilisée pour la détermination des potentiels.

Les valeurs des potentiels calculés ici sont critiquables et devront être confirmées par ailleurs. En effet, comme il l'a été dit précédemment, le titrage de cette espèce s'est avéré compliqué compte tenu de la faible intensité et de la position de ces signaux. Néanmoins on constate que les potentiels calculés ici donnent un écart ΔE^0 de 12 mV qui ne correspond pas à la largeur observable sur la figure IV.9. Ce phénomène est compris et expliqué dans le paragraphe II.5 du chapitre Matériels et Méthodes. En effet, sur la figure II.3 de ce dernier on constate que la largeur à mi hauteur de la raie n'est pas nécessairement égale à l'écart en potentiel. Ceci est particulièrement vrai quand l'écart entre ces derniers, E_1^0 et E_2^0, est inférieur à 0,2 V. Si l'on compare l'écart en potentiel obtenu par l'ajustement numérique, de 12 mV, avec la courbe

théorique, on constate que l'on doit obtenir une largeurs à mi-hauteur de la courbe de titrage comprises entre 50 et 100 mV, ce qui est observé. De plus, cet écart nous permet d'estimer l'intensité maximale théoriquement observable pour l'espèce 2 de Mo^{V} à 0,3 spin.

IV.2.3 - Titrage à pH = 7,5 et quantification de l'espèce 2 du Mo^{V}

IV.2.3.1 - Titrage à pH = 7,5 de l'espèce 2 du Mo^{V}

L'espèce 2 du Mo^{V} a été titrée à pH = 7,5. La figure IV.10 montre les signaux de l'espèce 2 de Mo^{V} observés au cours du titrage effectué à pH = 7,5.

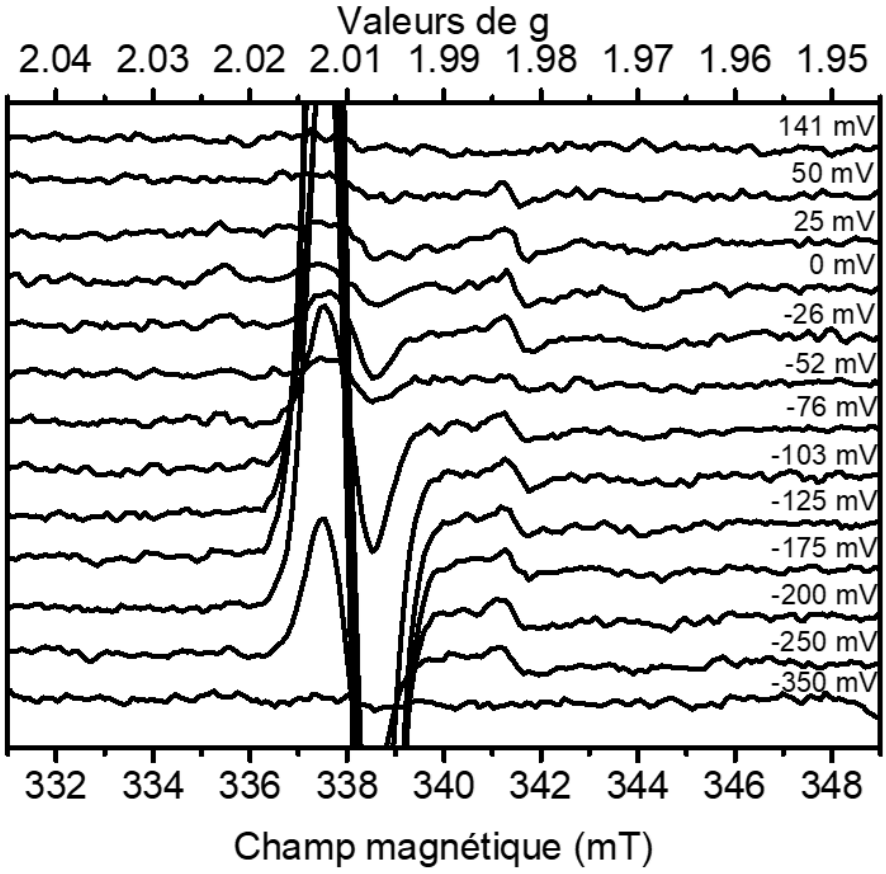


Figure IV.10 : Spectres RPE de la région g = 2,0. Conditions expérimentales : pH = 7,5, température : 50 K, puissance micro-onde : 10 mW, amplitude de modulation : 10 G à 100 kHz, fréquence ≈ 9.48 GHz.

Plusieurs choses sont à noter. On constate que cette espèce est difficile à titrer compte tenu de la faible intensité de ces signaux. De plus, il apparait que la position en g_2 = 1,985 est la meilleure pour faire un relevé d'amplitude sur cette signature. On constate également que les

signaux de l'espèce 2 de Mo^V sont présents sur une large gamme de potentiel d'au moins 300 mV allant de 50 mV à -250 mV.

La figure IV.11 montre les relevés d'amplitude effectués en g_2 = 1,985. Ces données expérimentales ont été ajustées avec une courbe en cloche construite à partir d'une équation de Nernst (Matériels et Méthodes paragraphe II.3.3).

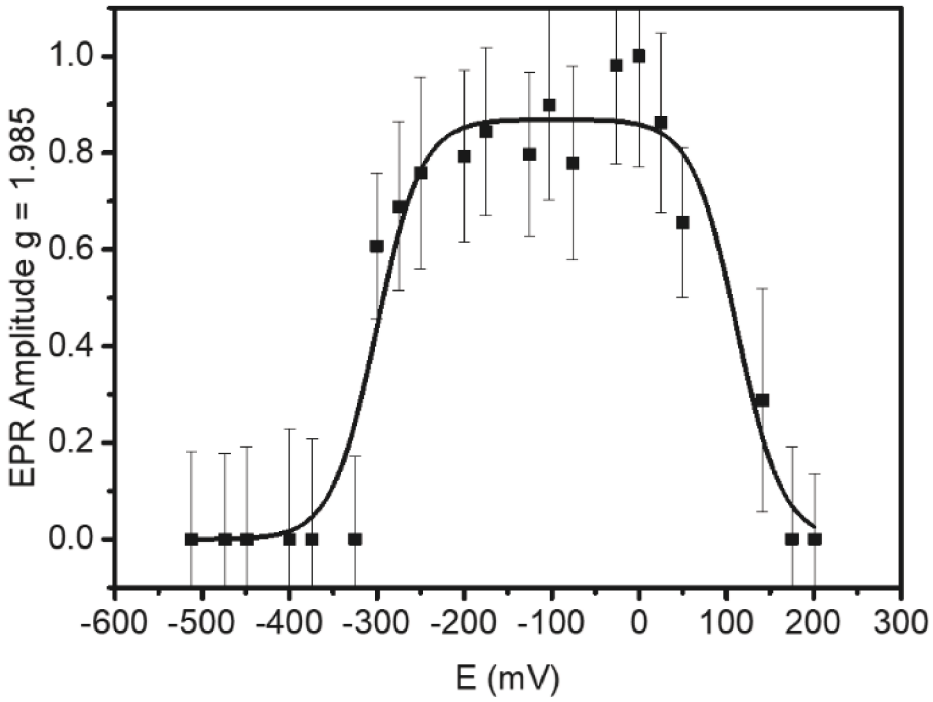


Figure IV.11 : Titrage de l'espèce 2 de molybdène dans ForCE 1 à pH = 7,5. Conditions expérimentales : température : 50 K, puissance micro-onde : 10 mW, amplitude de modulation : 10 G à 100 kHz, fréquence ≈ 9.48 GHz. (A) relevés d'amplitude réalisés à g = 1,985.

A partir de l'analyse de la courbe de titrage on peut déterminer les potentiels standards $E_1^0 = 112\ mV\ \pm\ 10\ mV$ *et* $E_2^0 = -300\ mV\ \pm\ 10\ mV$.

IV.2.3.2 - Quantification des espèces 1 et 2 du Mo^V

La quantification de l'espèce 2 de Mo^V a été effectuée à pH = 6,0 et pH = 7,5 selon la méthode utilisée en I.2.3 du chapitre précédent pour la quantification des clusters FeS.

Pour le titrage à pH = 6,0 la double intégrale du signal du centre C2 enregistré à -288 mV, 15 K, 0,1 mW sert de référence interne et on considère que la valeur de cette double intégrale vaut 0,5 spin par ForCE 1. Le titrage à pH = 6,0 a été très difficile à mener et doit être considéré de manière critique. En effet, comme on le voit sur la figure IV.7 (B), les quantités d'espèces 1

et 2 de Mo^{V} sont très faibles. De plus, leurs signaux ainsi que celui du radical se recouvrent partiellement. Néanmoins, à titre indicatif nous pouvons intégrer le signal de l'espèce 1 du Mo^{V}, puis celui du radical et enfin toute la région autour de g = 2,0. Ensuite, par soustraction des deux premières valeurs à la troisième on obtient une estimation du nombre de spin de l'espèce 2. Pour minimiser la contribution de l'espèce radicalaire on se place à un potentiel de 50 mV. Ainsi on estime que la région autour de g = 2,0 dans ces conditions contribue pour environ 0,06 spin par ForCE 1, l'espèce 1 du Mo^{V} contribue pour environ 0,0019 spin par ForCE 1, l'espèce radicalaire pour environ 0,016. Ainsi on peut estimer la contribution de l'espèce 2 à ≈ 0,042 spin par ForCE 1. La figure IV.12 montre une comparaison entre le spectre à 50 mV où le signal du Mo^{V} est maximum (en rouge) avec le spectre d'un échantillon enregistré à -50 mV, condition où le signal du radical est maximum.

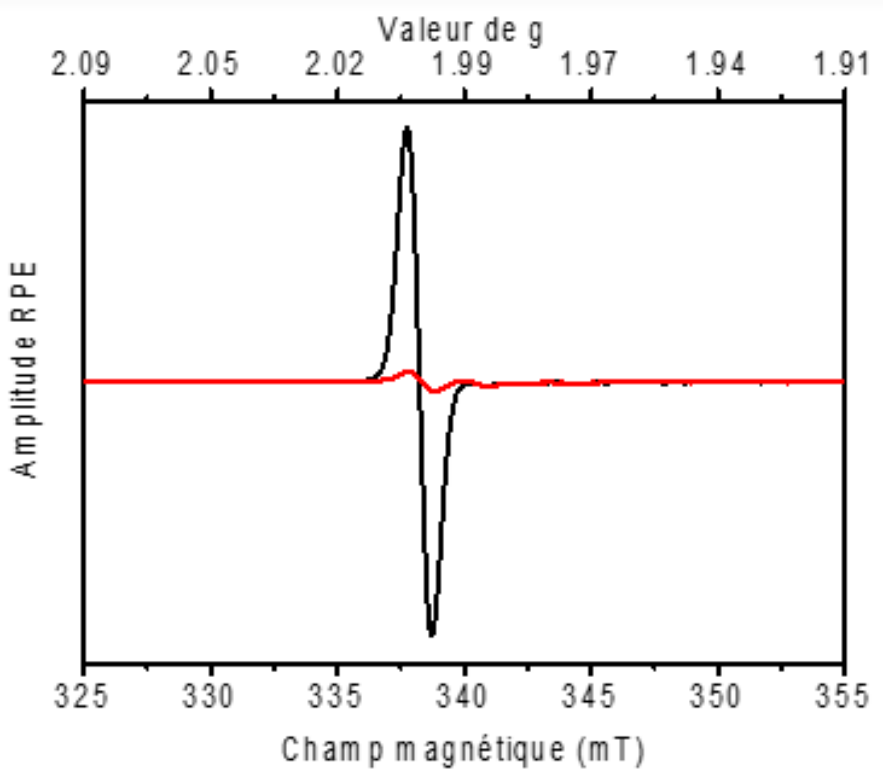


Figure IV.12 : Comparaison entre les spectres à 50 mV (en rouge) et à -57 mV (en noir) issus du titrage à pH = 6,0. Conditions expérimentales : idem que la figure IV. 8.

On constate alors qu'à plus bas potentiel, par exemple à -57 mV, les signatures des espèces Mo^{V} deviennent très minoritaires par rapport à celle du radical et peuvent ainsi être négligées. A -57 mV, le radical autour de g = 2,0 contribue à hauteur de ≈ 0,35 spin par ForCE 1.

Pour le titrage à pH = 7,5, le signal du centre FeS C_4 a été pris comme référence, on considère que la double intégration de son spectre mesuré à 100 K et 81 mW dans l'échantillon préparé au potentiel de – 512 mV traduit la présence d'un centre C_4 par enzyme. La quantification du signal s'effectue par double intégration du spectre expérimental. Ensuite une comparaison avec la référence interne permet de déterminer le nombre de spins par ForCE 1.

La figure IV.13 montre la quantification réalisée à 50 K, 1 mW de l'espèce 2 de Mo^V. L'ajustement expérimental (en rouge) est réalisé par l'ajustement de plusieurs courbes construites à partir de lois de Nernst, deux comportant deux échanges électroniques rendant compte du comportement redox de l'espèce 2 de Mo^V et du radical et trois à un transfert électronique rendant compte de C_2, C_4, qui sont les centres FeS présent à 50 K et C_5 dont on ne connait pas les propriétés de relaxation mais dont on fait l'hypothèse de sa présence dans ces conditions.

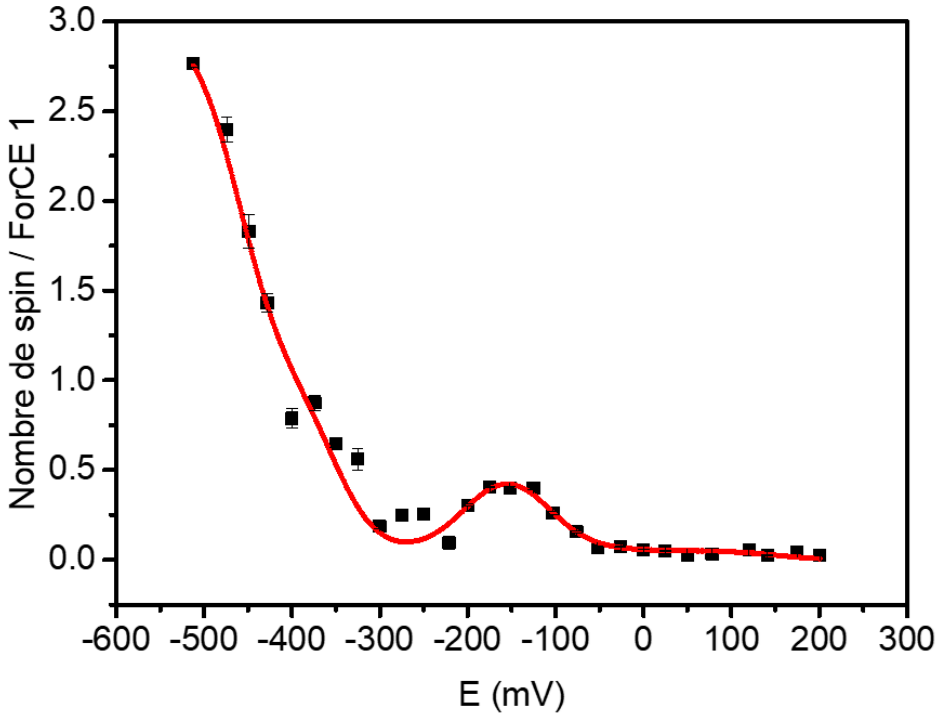


Figure IV.13 : Quantification des signaux des centres FeS, radical et Mo^V espèce 2 en utilisant pour référence interne le signal du centre C_4 (pH = 7,5, température : 100 K, puissance : 81 mW amplitude de modulation : 10 G, 4 accumulations, gain : 60 dB). Conditions expérimentales des spectres utilisés : température : 50 K, puissance : 1 mW, amplitude de modulation : 5 G à 100 kHz, pH = 7,5.

En procédant de la même façon qu'à pH = 6,0, on choisit de se positionner à 0 mV, où le signal du radical contribue de manière minoritaire par rapport à celui de l'espèce 2 du Mo^{V}. De plus, à ce potentiel, le signal du Mo^{V} est toujours à son maximum d'intensité (figure IV.11). Ainsi on estime que la région autour de g = 2,0 contribue pour ≈ 0,11 spin par ForCE 1. L'espèce radicalaire contribue à hauteur de ≈ 0,009 spin par ForCE 1. Ainsi l'espèce 2 du Mo^{V} contribue pour ≈ 0,10 spin par ForCE 1. La présence d'une espèce Mo^{V} dans ces proportions est cohérente avec ce qui est vu dans la littérature comme par exemple l'étude de Ceccaldi et al.[138]. A plus bas potentiel (i.e. – 175 mV par exemple) l'espèce radicalaire est majoritaire et est considérée comme largement dominante par rapport aux signaux du Mo^{V}, on est de plus, toujours sur le plateau de la courbe de titrage (p. 188). La figure IV.14 compare deux signatures, en rouge celle du titrage à pH = 7,5 enregistrée à 0 mV et en noir celle enregistrée à -175 mV issus du titrage à pH = 6,0.

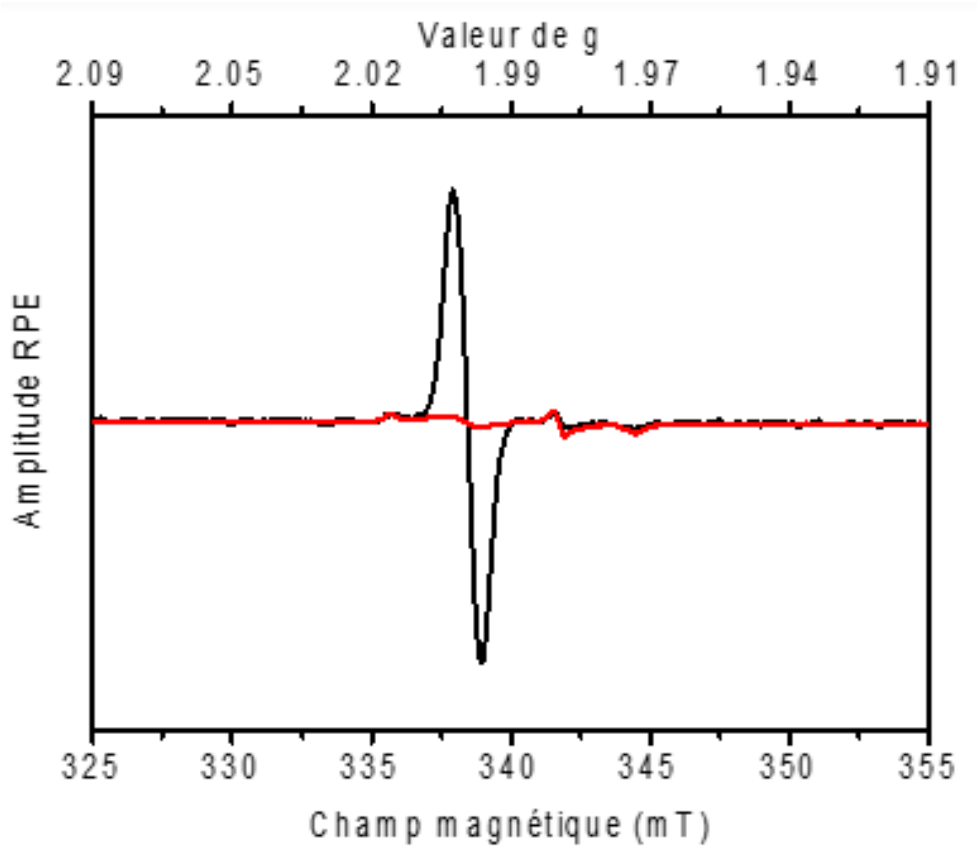


Figure IV.14 : Comparaison entre les spectres à 0 mV (en rouge) issus du titrage à pH = 7,5 et à -175 mV (en noir) issus du titrage à pH = 6,0. Conditions expérimentales : idem que la figure IV. 8.

A -175 mV, les signaux du Mo^{V} sont très minoritaires (< 0,1 spin) et peuvent être négligés par rapport à celui du radical qui contribue ainsi pour ≈ 0,41 spin par ForCE 1.

Les potentiels utilisés pour les ajustements de la figure IV.13 sont rassemblés dans le tableau IV.2 :

Détermination des potentiels		Titrage à pH = 7,5	Analyse quantification de spin
Espèce 2 de Mo^V	E^0_1	112 mV	150 mV
	E^0_2	-300 mV	- 270 mV
Radical organique	E^0_1	-140 mV	-110 mV
	E^0_2	-180 mV	- 200 mV
C_2		-350 mV	- 390 mV
C_4		- 430 mV	- 450 mV
C_5		/	- 470 mV

Tableau IV.2 : Potentiels déterminés par titrage (pH = 7,5) et déterminés par l'analyse de la quantification (figure IV.12) des espèces présentes à 50 K.

On fait ici l'hypothèse raisonnable que le centre C_5 est toujours visible à 50 K, ce qui permettrait de rendre compte de la quantité de spin > 2,0 détectée à – 512 mV. Il apparait alors avec la figure IV.13 que les potentiels calculés par ajustement de plusieurs lois de Nernst sur les points expérimentaux de la quantification sont en adéquation avec ceux déterminés depuis les relevés d'amplitude et ne diffèrent de ces derniers que d'environ 30 à 40 mV.

Les taux d'occupation des espèces 1 et 2 de Mo^V sont calculés avec

$\tau_{occ} = \frac{[Mo^V]_{/protéine}}{[Mo]_{théo\ normalisé\ à\ 1}} . 100$ (chapitre Matériels et Méthodes, paragraphe II.5)

Pour l'espèce 1, $\tau_{occ}^{pH=6,0} = \frac{0,002}{0,3} . 100 \approx 0,7\ \%$, à pH = 6,0

Pour l'espèce 2, $\tau_{occ}^{pH=6,0} = \frac{0,042}{0,3} . 100 \approx 14\ \%$, à pH = 6,0

Pour l'espèce 2, $\tau_{occ}^{pH=7,5} = \frac{0,1}{0,3} . 100 \approx 33\ \%$, à pH = 7,5

V - Spectroscopie HYSCORE de l'espèce 1 du Mo^V dans ForCE 2 :

Les spectres RPE mesuré en bande X de l'espèce 1 du Mo^{V} montrent un éclatement du signal attribué à une interaction forte avec un noyau ^{1}H. Afin de compléter la caractérisation de ce couplage, des expériences HYSCORE ont été menées sur les échantillons de ForCE 2 présentés plus tôt à pH = 6,0. La figure IV.15 montre les résultats obtenus pour l'espèce 1 de Mo^{V} (A) avec un zoom sur la partie basse fréquence (B) et un zoom sur la partie haute fréquence (C).

La figure IV.15 montre plusieurs types de signaux.

Des signaux dans la région haute fréquence (panneau C) sont présents. Ils sont attribués à deux groupes de noyau ^{1}H. Ils traduisent la présence d'un couplage entre le Mo^{V} et des protons. Le couplage entre le Mo^{V} et le groupe 1 est caractérisé par une valeur de A = 13,1 MHz (en bleu). Le couplage avec le groupe 2, plus faible, est caractérisé par une valeur de A = 2,6 MHz. Ces signaux sont attribués, pour le groupe 1 à un groupe de noyau ^{1}H proches du Mo^{V}, potentiellement un ligand -SH situé directement sur le Mo^{V} (voir partie discussion) et pour le groupe 2 à des protons situés plus loin du Mo^{V}, potentiellement attribuables à des protons situés sur les pyranoptérines ou le ligand cystéine. En effet ces signatures dans la région haute fréquence sont situées autour de la fréquence de Larmor du proton $\vartheta_I^H \approx 14{,}9\ \mathrm{MHz}$ et sont caractéristiques de ce dernier.

De plus, des pics visibles dans la région basse fréquence (panneau B) témoignent d'un couplage attribué à un noyau de carbone 13 avec une valeur de couplage de A = 4,5 MHz (en violet) situé autour de la fréquence de Larmor de ce dernier, $\vartheta_I^{13C} \approx 3.7\ \mathrm{MHz}$.

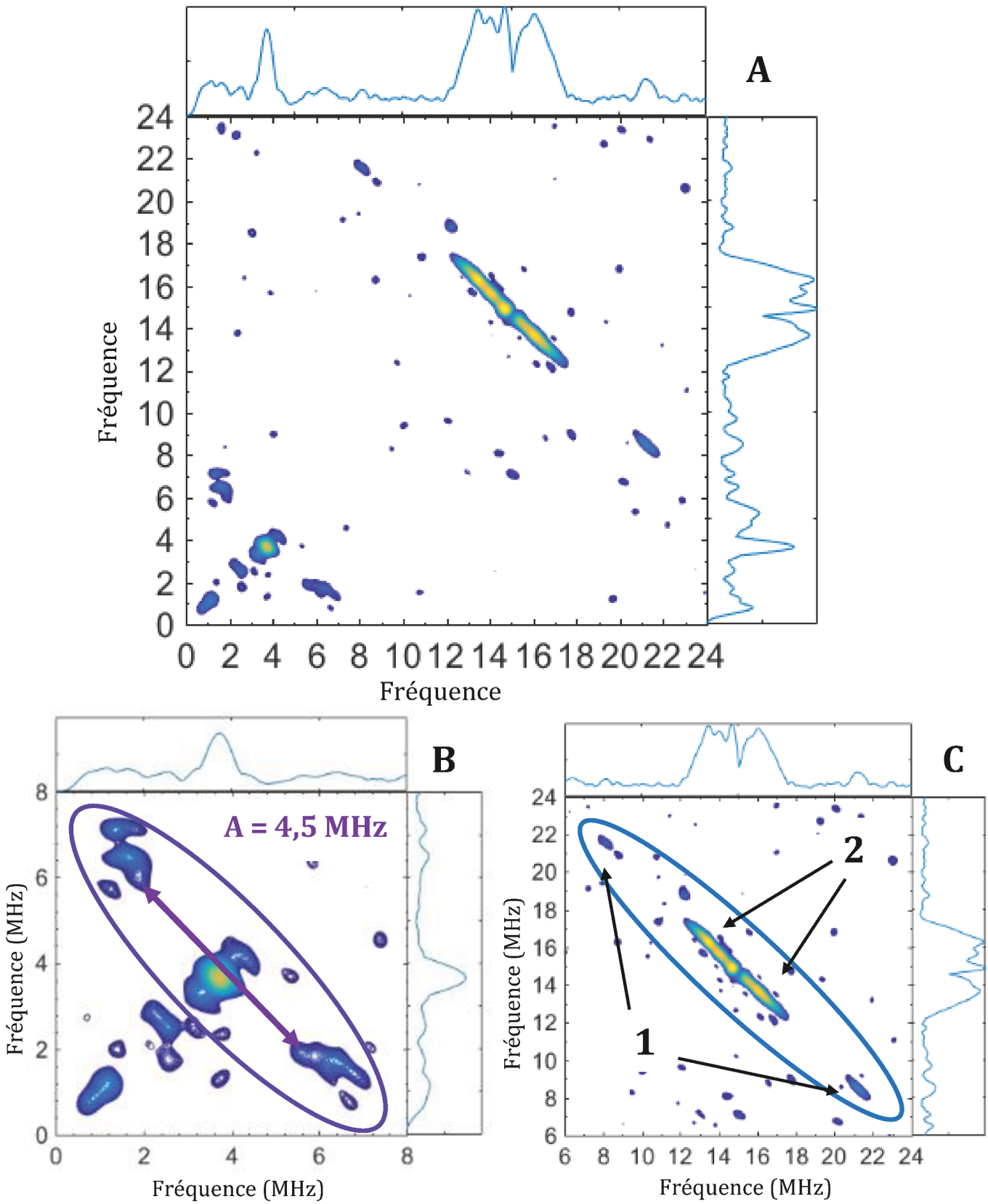


Figure IV.15 : Spectres HYSCORE de l'espèce 1 du Mo^{V} dans ForCE 2 à pH = 7,5. Conditions expérimentales : température : 50 K, τ = 200 ns, d30 = 12 ns, HPA = 7 dB, SRT = 400 µs, SPP = 32, champ magnétique en g = 1,993 : 387,47 mT, 24 accumulations, puissance micro-onde : 0,15 µW, fréquence : 9,7066 GHz. (A) : spectre HYSCORE cadrant (+ , +) intégral, (B) : zoom spectre (A) entre 0 MHz et 8 MHz. (C) zoom spectre (A) entre 6 MHz et 24 MHz.

VI - Discussion :

VI.1 – Attribution des couplages hyperfins détectés par HYSCORE

L'étude menée par Niks et al.[95] détaille l'identification et l'attribution d'un couplage proton observé dans la FDH de *C. necator*. Dans cette dernière les auteurs observent le couplage hyperfin entre une espèce Mo^{V} et un proton sur des expériences en bande X dans une préparation réduite au dithionite. Le couplage quasi isotrope a pour valeurs principales $A_{1,2,3}$ = 18, 21, 18 MHz. En comparant les résultats obtenus au cours de cette thèse avec ceux de l'étude FDH de *C. necator*, mais aussi les travaux menés sur d'autres enzymes à molybdène (i.e. Xanthine Oxydase[139] et DMSO reductase[140]), le couplage observé dans ForCE 2 peut être raisonnablement attribué à un proton présent au niveau du cofacteur à molybdène. Niks et al.[95] constate également que lors de l'ajout de formiate deutéré à la solution d'enzyme, le couplage proton disparait des spectres RPE enregistrés dans les échantillons rapidement congelés après ajout. En revanche, après un délai d'une minute après l'ajout, les spectres RPE sont indistinguables de ceux enregistrés avec les échantillons réduits au dithionite. Ceci montre clairement que le noyau ^{1}H couplé au Mo^{V} est celui provenant du formiate selon un mécanisme de transfert d'hydrure décrit par les auteurs et repris en figure IV.16.

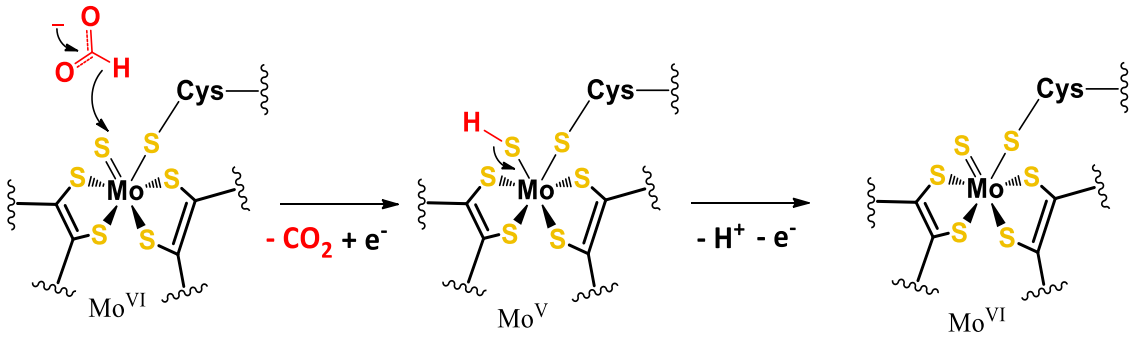


Figure IV.16 : Mécanisme réactionnel proposé par Niks et al.[95] pour l'oxydation du formiate en CO_2 par la FDH de C. necator. Adapté de Niks et al.[95]

Les expériences réalisées par Niks et al.[95] permettent de faire la distinction avec un autre mécanisme proposé par Raajimakers et al.[141] dans le cas de la FDH de *C. necator*. Cette étude propose un mécanisme faisant intervenir le départ d'un ligand thiol passif présent au niveau du molybdène (figure IV.17).

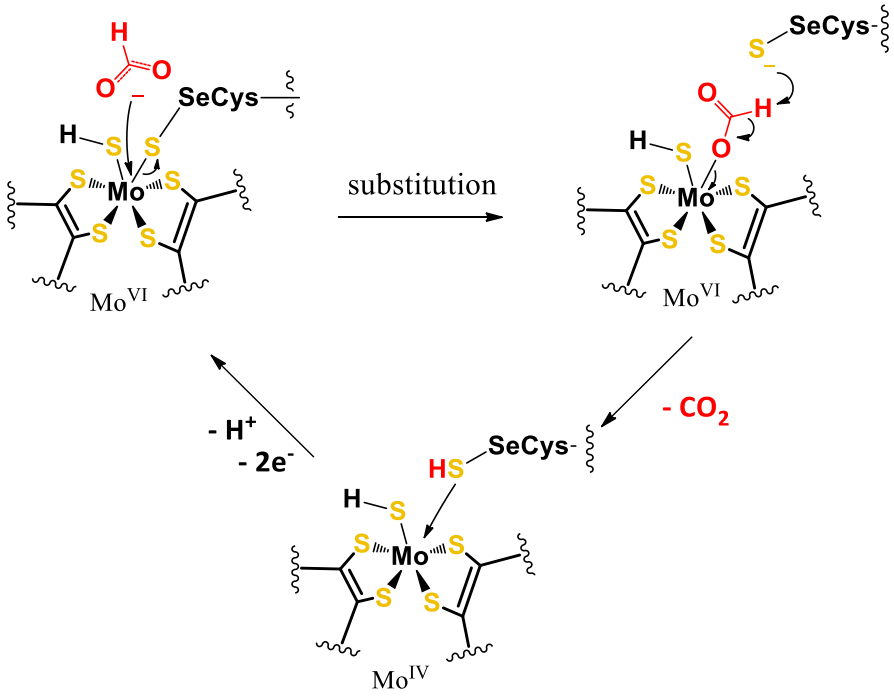


Figure IV.17 : Mécanisme réactionnel proposé par Raajimakers et al.[141] pour l'oxydation du formiate en CO_2 par la FDH-H d'E. coli.

Cependant, comme le mentionne Maia et al.[1], toutes les études menées sur les FDHs, à l'exception de celle décrite par Raajimakers et al.[141], montrent la sélénocystéine restant liée au molybdène. Gardant à l'esprit que plusieurs mécanismes catalytiques peuvent exister pour différentes FDHs, il est cependant raisonnable de penser que le mécanisme proposé par Niks et al.[95] est celui à l'œuvre dans les ForCEs.

Le couplage avec le noyau ^{1}H observés dans ForCE 2 peuvent être attribués selon cette hypothèse à ceux situés sur le ligand thiol (-SH) directement lié au molybdène. On constate, de plus, que la force du couplage observé dans ForCE 2 est du même ordre de grandeur que celui observé par Niks et al.[95] dans la FDH de *C. necator*. Ceci renforce l'attribution de ce couplage à un proton situé sur le cofacteur à molybdène. Les couplages vus avec un carbone 13 peuvent être attribués à la cystéine tout comme aux pyranoptérines liant le molybdène. La figure IV.18 illustre l'attribution faite des couplages détectés en HYSCORE sur l'espèce 1 du Mo^{V} dans ForCE 2.

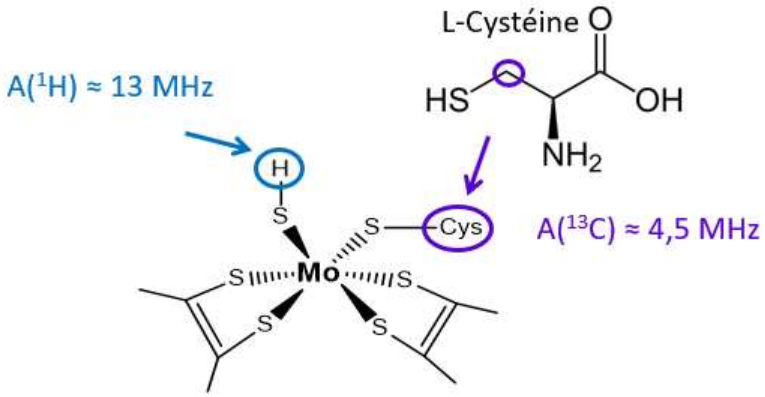


Figure IV.18 : Représentation du modèle postulé dans cette thèse pour l'attribution des couplages ^{1}H et ^{13}C détectés par HYSCORE dans ForCE 2.

De plus, les couplages ^{95,97}Mo déterminés par Niks et al.[95] sont de $A_{1,2,3}$ = 138, 82, 45 MHz. Ils sont ainsi tout à fait similaires à ceux observés dans ForCE 2, à savoir, A_1 = 140 MHz, A_2 = 77 MHz, A_3 = 50 MHz. Ceci permet de conforter l'attribution des raies de faibles intensités aux isotopes du Mo et les valeurs calculées par simulation.

Pour pouvoir déterminer plus en détail le mécanisme catalytique mis en jeu dans les ForCEs nous avons commencé au laboratoire des études sur ForCE 1 inspirées des travaux menés par Niks et al.[95] en présence de formiate de sodium isotopiquement enrichi en carbone 13 et deutérium. Ainsi la visualisation de signaux de deutérium dans l'environnement du molybdène ainsi que l'absence des signaux venant des protons ne pourrait provenir que de l'abstraction du deutérium du formiate et permettrait de savoir si le mécanisme catalytique dans les ForCEs est le même que celui postulé par Niks et al.[95]. De même, le couplage entre le carbone 13 et le molybdène serait une preuve de la présence du formiate dans l'environnement du métal. La force de ce dernier renseignerait si le formiate est, ou non, directement lié au cofacteur à molybdène.

VI.2 - Deux espèces de Mo^{V} dans ForCE 1

Deux espèces de Mo^{V} ont été étudiées dans ce chapitre. La question de la pertinence catalytique de ces espèces se pose. En effet toutes les préparations enzymatiques ont fait l'objet de tests d'activité formiate:benzyl viologène oxydoréductase à pH = 10,0, permettant de s'assurer que l'enzyme purifiée était active. Cette situation fait écho aux études menées par Ceccaldi et al.[138] et Rendon et al.[142] sur la nitrate réductase d'*E. coli*, où il est mis en

évidence que deux formes du cofacteur à molybdène sont présentes ; entre 20 et 40 % d'une espèce inactive devenant catalytiquement active après une première réaction non redox réversible suivie d'une réaction rédox irréversible. En effet on peut faire l'hypothèse que les enzymes purifiées et étudiées au cours des titrages à pH = 6,0 contiennent deux formes de cofacteur à molybdène dont une représentant une espèce inactive et une deuxième représentant l'espèce catalytiquement pertinente s'activant selon un processus similaire. Cette hypothèse est soutenue par le fait qu'à pH 7,5 il ne reste qu'une seule espèce qui représenterait l'espèce active. De plus les tests d'activité sont réalisés à pH = 10,0, ce qui permettrait au cofacteur à molybdène présent dans toutes les préparations de ForCEs réalisées jusqu'ici d'être activé. Une différence avec la nitrate réductase est illustrée dans l'étude réalisée par Vincent et al.[138], dans le cas de la nitrate réductase d'*E. coli* où les auteurs suggèrent que, entre la forme haut pH et la forme bas pH, une des deux formes seulement est active, celle bas pH, ce qui serait le contraire de ce qui est postulé dans le cas des ForCEs. Il est toutefois commun d'avoir des optimums de pH plutôt élevés dans le cas des FDHs ce qui renforce l'hypothèse envisagée ici.

VI.3 - Potentiels standards des espèces Mo^{V}

La comparaison entre les valeurs déterminées dans ce travail et celles trouvées dans la littérature pour d'autres enzymes à Mo-*bis*PGD montre des résultats similaires. Dans la revue de Cordas et al.[143], on constate que les potentiels standards pour les transitions Mo^{VI}/Mo^{V} et Mo^{V}/Mo^{IV} s'étalent sur une large gamme de potentiels. Ainsi, dans le cas de NapA de *R. sphaeroides* les potentiels standards calculés pour les couples Mo^{VI}/Mo^{V} et Mo^{V}/Mo^{IV} sont respectivement +200 mV et -200 mV, alors que dans les NapA d'*E. coli* et *D. desulfuricans* les potentiels sont calculés comme étant respectivement < -400 mV pour Mo^{VI}/Mo^{V} et < -500 mV pour Mo^{V}/Mo^{IV}. La NarB de chez *S. Sp PCC 7942* présente des potentiels standards de -150 mV (Mo^{VI}/Mo^{V}) et < -500 mV (Mo^{V}/Mo^{IV}). Dans la revue de Hille et al.[45] il est décrit que les potentiels standards des couples Mo^{VI}/Mo^{V} et Mo^{V}/Mo^{IV} sont respectivement de +470 mV et -50 mV dans NarGH de *P. pantrotrophus*.

Concernant les FDHs, l'étude menée par Costa et al.[94] sur la FDH de *D. desulfuricans* montre des potentiels pour les transitions Mo^{VI}/Mo^{V} et Mo^{V}/Mo^{IV} de -160 mV et -330 mV respectivement, déterminés par RPE et de -171 mV et -262 mV, déterminés par voltamétrie

cyclique. Enfin, l'étude menée par Barber et al.[98] montre quant à elle des potentiels standards pour les transitions Mo^{VI}/Mo^{V} et Mo^{V}/Mo^{IV} de -330 mV et -470 mV.

On constate ainsi avec ces différentes études que les potentiels déterminés dans le cas des ForCEs sont cohérents avec ceux retrouvés dans la littérature pour d'autres FDHs et plus généralement d'autres enzymes à Mo-*bis*PGD.

VI.4 - Diagramme de corrélation des valeurs de g du Mo^{V} dans les FDHs

Le diagramme de corrélation présenté dans la figure IV.19 adapté de l'étude menée par Biaso et al.[144] présente les valeurs de g en fonction de l'anisotropie ($g_1 - g_3$) des espèces de Mo^{V} détectées dans les Naps, FDHs et Psr qui ont toutes en commun d'appartenir à la même sous-famille de Mo-*bis*PGD. Ce type de représentation permet de mettre en évidence des corrélations dans la nature de la première sphère de coordination de l'ion Mo^{V}.

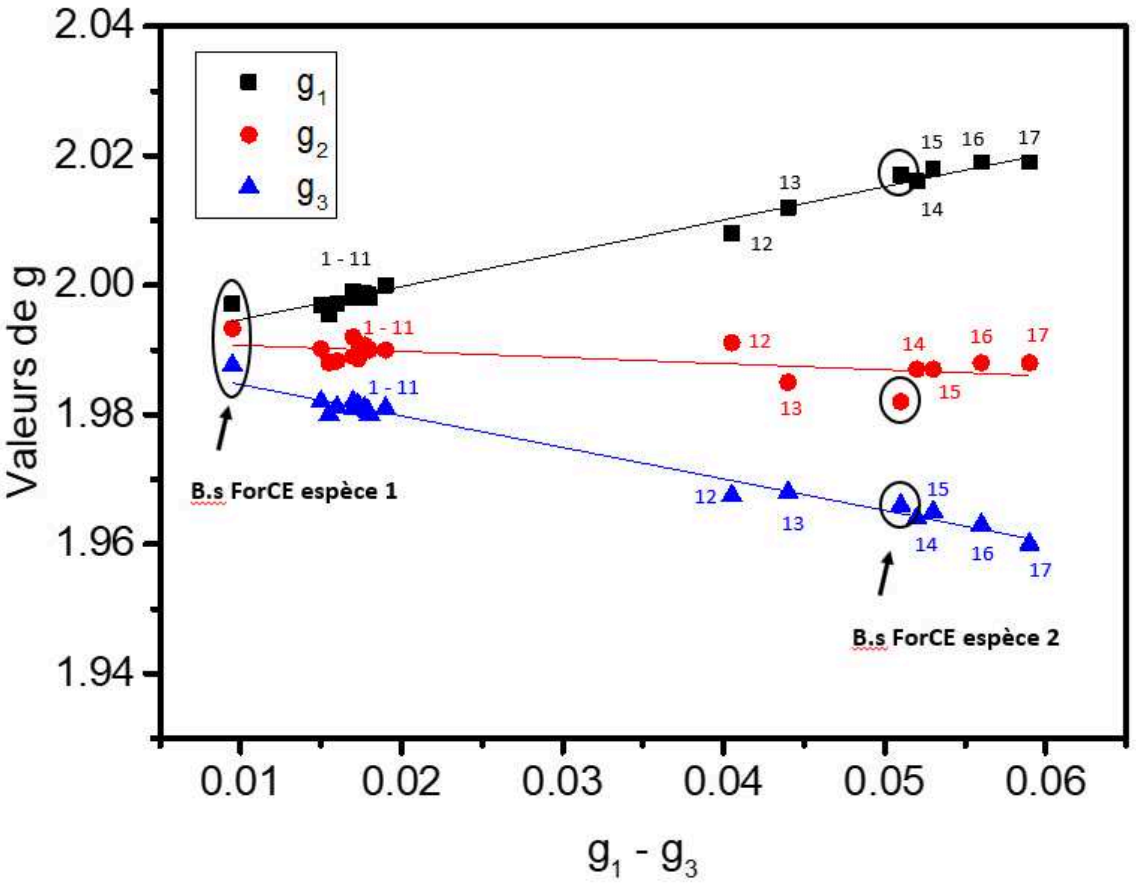


Figure IV.19 : Diagramme de corrélation des valeurs de g en fonction de l'anisotropie (g_1 - g_3) d'espèces Mo^{V} « High g » détectées dans des enzymes de la famille des Mo-bisPGD à ligand

protéique cystéine et sélénocystéine et listées dans le tableau 1. Les valeurs correspondant aux espèces de Mo^V 1 et 2 détectées dans les ForCEs sont entourées.

Numéro	(g_1-g_3)	Sphère de coordination	Organismes	Enzymes	Commentaires
1	0,015	*Bis* -PGD / Cys	*S. sphaeroides*	NarB	High g
2	0,0155	*Bis* -PGD / SeCys	*M. formicicum*	FDH	/
3	0,016	*Bis* -PGD / Cys	*E. coli*	NapA	High g
4	0,017	*Bis* -PGD / Cys	*A. vinelandii*	Nas	High g nitrate
5	0,0173	*Bis* -PGD / Cys	*P. denitrificans*	NapAB	High g nitrate
6	0,0174	*Bis* -PGD / Cys	*R. sphaeroides*	NapA	High g resting
7	0,0177	*Bis* -PGD / Cys	*R. sphaeroides*	NapAB	High g resting
8	0,0179	*Bis* -PGD / Cys	*S. gelidimarina*	NapA	High g
9	0,018	*Bis* -PGD / Cys	*P. pantotrophus*	NapAB	High g resting
10	0,019	*Bis* -PGD / Cys	*D. desulfuricans*	NapA	High g nitrate
11	0,0405	*Bis* -PGD / Cys	*W. succinogenes*	Psr	High g
12	0,044	*Bis* -PGD / SeCys	*P. aeruginosa*	FDH	/
13	0,052	*Bis* -PGD / Cys	*D. desulfuricans*	NapA	Low potential
14	0,053	*Bis* -PGD / SeCys	*D. alaskensis*	FDH	/
15	0,056	*Bis* -PGD / SeCys	*D. desulfuricans*	FDH	/
16	0,058	*Bis* -PGD / SeCys	*D. desulfuricans*	FDH	/
17	0,059	*Bis* -PGD / Cys	*D. desulfuricans*	NapA	High potential

Tableau IV.3 : Liste des espèces Mo^V présentés en figure IV. 19. Adapté de Biaso et al[144].

Ainsi, ce diagramme illustre que les espèces 1 et 2 du Mo^V détectées dans les ForCEs possèdent des valeurs de g corrélant avec celles associées à des enzymes possédant 2 pyranoptérines et une cystéine/sélénocystéine comme ligand protéique du Mo. Les numéros sous chacun des systèmes présentés sont associés à des enzymes listées dans le tableau 3.

Les enzymes appartenant à la famille des Mo-*bis*PGD peuvent être classés en trois sous-familles en fonction de leurs valeurs de g. Ce sont les familles appelées « Low g », « High g » et « Very High g ». On se concentrera ici sur les sous-familles des « High g » et « Very High g ». Il est intéressant de regarder à quel type de sous-famille ForCE 1 et ForCE 2 appartiennent. Le graphique présenté dans la figure IV. 19 a été construit avec les systèmes répertoriés dans le tableau IV.3 font partie de la famille des High g. Le tableau IV.4 et la figure IV.20 récapitulent les systèmes appartenant à la famille des Very High g.

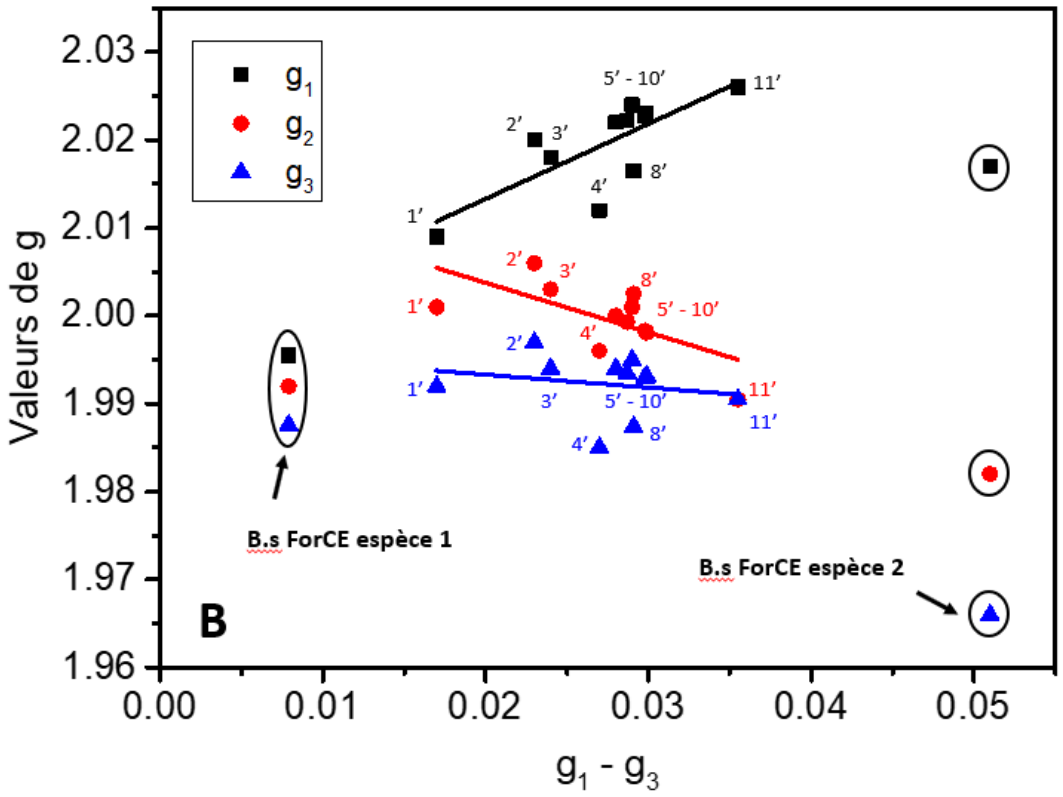


Figure IV.20 : Diagramme de corrélation des valeurs de g en fonction de l'anisotropie g_1 - g_3 d'espèces Mo^V « Very High g » détectées dans des enzymes de la famille des Mo-bisPGD à ligand protéique cystéine et sélénocystéine et listées dans le tableau IV.4. Les valeurs correspondant aux espèces de Mo^V 1 et 2 détectées dans les ForCEs sont entourées.

Numéro	(g_1-g_3)	Sphère de coordination	Organismes	Enzymes	Commentaires
1'	0,017	*Bis* -PGD / Cys	*C. necator (R.eutropha)*	FDH	/
2'	0,023	*Bis* -PGD / SeCys	*M. formicicum*	FDH	Very high g
3'	0,024	*Bis* -PGD / SeCys	*M. formicicum*	FDH	/
4'	0,027	*Bis* -PGD / SeCys	*D. desulfuricans*	FDH	/
5'	0,028	*Bis* -PGD / Cys	*R. sphaeroides*	NapAB	Very high g
6'	0,0287	*Bis* -PGD / Cys	*P. denitrificans*	NapAB	Very high g
7'	0,029	*Bis* -PGD / Cys	*D. desulfuricans*	NapA	Very high g
8'	0,0291	*Bis* -PGD / Cys	*W. succinogenes*	Psr	Very high g
9'	0,0298	*Bis* -PGD / Cys	*S. sphaeroides*	NarB	Very high g
10'	0,0299	*Bis* -PGD / Cys	*A. vinelandii*	Nas	Very high g
11'	0,0355	*Bis* -PGD / Cys	*W. succinogenes*	Psr	Very high g split

Tableau IV.4 : Liste des espèces Mo^V présentés en figure IV. 20. Adapté de Biaso et al[144].

On constate que les espèces 1 et 2 du Mo^V ne corrèlent pas avec des espèces Very High g nonobstant une valeur élevée de g_1 pour la seconde espèce. Toutefois il est intéressant de noter que plusieurs espèces n'ayant pas été définies comme appartenant à la famille des Very High g corrèlent cependant avec ces dernières. C'est le cas ici par exemple pour les FDHs de

C. necator, *M. formicicum* et *D. desulfuricans*. Nous pouvons ainsi raisonnablement penser que ces dernières appartiennent à la famille des Very High g.

Il apparait que les espèces 1 et 2 du Mo^{V} appartiennent à la famille des signaux de type « High g ». La même conclusion peut alors être faite pour les autres systèmes (1-17) référencés sur la figure IV. 19 mais n'étant pas référencés dans la littérature comme appartenant à la famille des signaux de type « High g ».

Chapitre V

Etude du radical organique observé dans ForCE 1 et ForCE 2

Table des matières

I – Etude du radical organique à pH = 6,0 204
I.1 - Titrages et détermination des potentiels par RPE 204
I.2 - Etude multifréquence de l'espèce semiquinone 206
I.3 - Titrage à pH = 7,5 et effet du pH sur les propriétés redox du radical dans ForCE 1 207
II - Calcul du taux d'occupation 209
III - Identification de ce même radical dans ForCE 2 210
IV - Etude de l'intermédiaire ménasemiquinone par HPLC GC/MS 213
V - Analyse par RPE pulsée de l'environnement chimique de l'espèce semiquinone à pH = 6,0 216
V.1 – Analyse par spectroscopie RPE pulsée 3-pulse ESEEM 216
V.2 – Analyse par spectroscopie HYSCORE 218
V.2.1 - Analyses HYSCORE effectuées dans H_2O 218
V.2.1.1 – Analyse des signaux de ^{14}N 220
V.2.1.2 – Analyse des signaux ^{1}H 226
V.2.1.3 - Analyse quadratique 228
V.2.2 - Analyses HYSCORE effectuées dans D_2O 232
V.2.2.1 – Analyses HYSCORE 232
V.2.2.2 – Analyses quadratiques 235
V.3 – Analyse par spectroscopie ESEEM à 4 impulsions 236
V.3.1 – Etudes ESEEM à 4 impulsions dans H_2O 236
V.3.2 – Etudes ESEEM à 4 impulsions dans D_2O 238
VI - Discussion 239
VI.1 – Identification par RPE d'une ménasemiquinone stabilisée dans ForCE 1 239
VI.3 – Nombre et nature des noyaux d'azote couplé à la ménasemiquinone 241
VI.4 - Etude des couplages avec les protons 243
VI.5 – Rôle physiologique 244

Dans ce chapitre est présentée la caractérisation spectroscopique et redox d'un radical organique détecté au cours des titrages de ForCE 1.

I – Etude du radical organique à pH = 6,0

I.1 - Titrages et détermination des potentiels par RPE

Au cours des deux titrages de ForCE 1 réalisés à pH = 6,0, une espèce paramagnétique présentant un signal isotrope centré à g = 2,0 est générée dans une gamme de potentiel comprise entre 0 mV et - 200 mV et toujours visible à 50 K (figure III.2).

Une telle espèce peut être artéfactuelle, par exemple générée par les médiateurs rédox présents dans l'échantillon, mais peut également provenir d'une espèce intrinsèque à l'enzyme telles que des radicaux FAD (Flavin Adénine Dinucléotide), FMN (Flavin MonoNucléotide), ou quinoniques (de type ménasemiquinone par exemple). Il convient alors de mener une étude plus approfondie de cette signature pour déterminer sa nature.

La mesure de l'amplitude pic-à-pic de ce signal à g = 2,0 est représentée en fonction du potentiel redox du milieu sur la figure V.1 à pH = 6,0. Un premier titrage (en rouge) a été fait à ce pH et un second en noir pour étudier la reproductibilité des résultats (en noir). Les courbes sont construites à partir d'équations de Nernst sur les relevés d'amplitude expérimentaux.

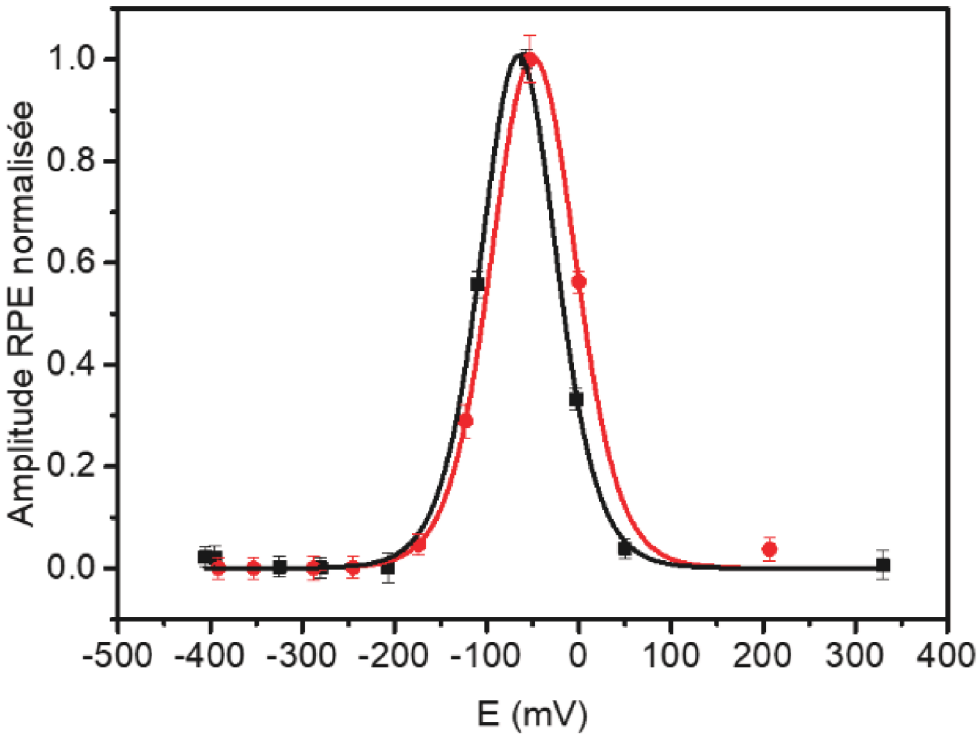


Figure V.1 : Courbes des titrage 1 (cercles rouges) et titrage 2 (carrés noirs) de l'espèce radicalaire réalisés à pH = 6,0 dans ForCE 1. L'ajustement d'une loi de Nernst sur les points expérimentaux permet une détermination des potentiels standards de l'espèce radicalaire.

Le comportement observé de type « courbe en cloche » est caractéristique de celui d'un radical organique qui subit deux étapes de transfert d'un électron entre une forme oxydée (à haut potentiel) et une forme réduite (à bas potentiel) non paramagnétiques via un intermédiaire semi-réduit paramagnétique. Ceci est illustré dans le cas des espèces organiques de type ménaquinone sur la figure V.2.

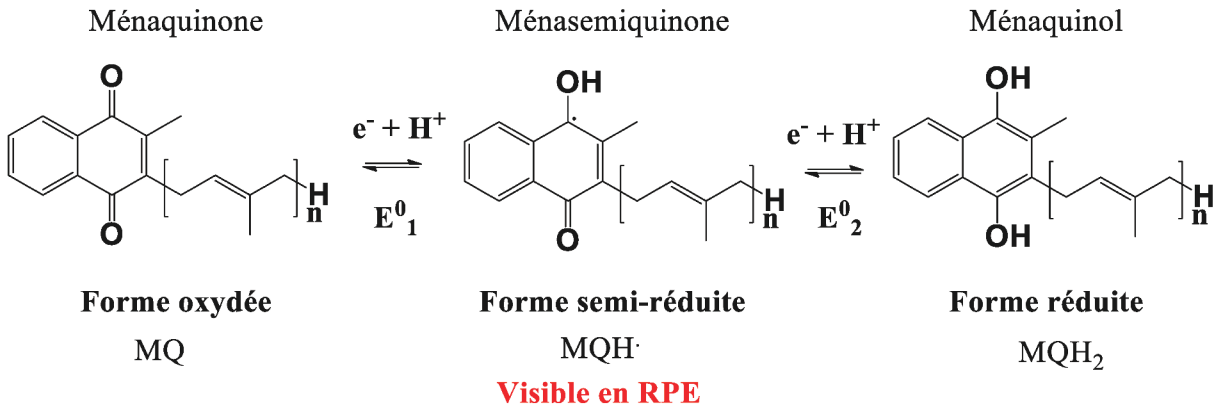


Figure V.2 : Schéma illustrant les différents états redox d'une espèce ménaquinone qui en milieu biologique oscille généralement entre trois états obtenus par transfert mono-électronique d'une forme à l'autre en passant par un intermédiaire radicalaire visible en RPE.

A pH = 6,0 on considère les formes totalement protonées des espèces. La modélisation des données expérimentales à l'aide d'une courbe en cloche telle que décrite dans le Matériels et Méthodes (paragraphe II.3.3) permet d'obtenir les potentiels redox suivants : $E^0_{Oxydée/Semi-réduite} = -10\ mV \pm 10\ mV$, $E^0_{Semi-réduite/Réduite} = -87\ mV \pm 10\ mV$ et donc un potentiel médian de $E^0_m = -50\ mV \pm 10\ mV$ (respectivement repérés dans la figure V.1 par E^0_1 et E^0_2). Au cours du second titrage au même pH les potentiels suivants ont été obtenus : $E^0_1 = -40\ mV \pm 10\ mV$, $E^0_2 = -92\ mV \pm 10\ mV$ et $E^0_m = -65\ mV \pm 10\ mV$. On constate que le comportement redox et les valeurs des potentiels standards calculés pour cette espèce sont reproductibles entre le titrage 1 et le titrage 2.

I.2 - Etude multifréquence de l'espèce semiquinone

Pour avoir plus d'information quant à la nature de cette espèce, une analyse RPE multifréquence du signal radicalaire a été réalisée. Ainsi, des expériences en bande Q et en bande W aux fréquences micro-ondes respectives de 34 GHz et 94 GHz ont été menées. Comme mentionné dans le paragraphe VI du chapitre Matériels et Méthodes, ces expériences, en augmentant la fréquence et proportionnellement le champ magnétique de travail par rapport à la bande X, permettent une meilleure résolution des valeurs principales du tenseur $\tilde{g}$ de l'espèce concernée. La figure V.3 montre trois spectres de l'espèce radicalaire (en noir) enregistrés à différentes fréquences A (bande X : 9,5 GHz), B (bande Q : 34 GHz) et C (bande W = 94 GHz) et leur simulation (en rouge).

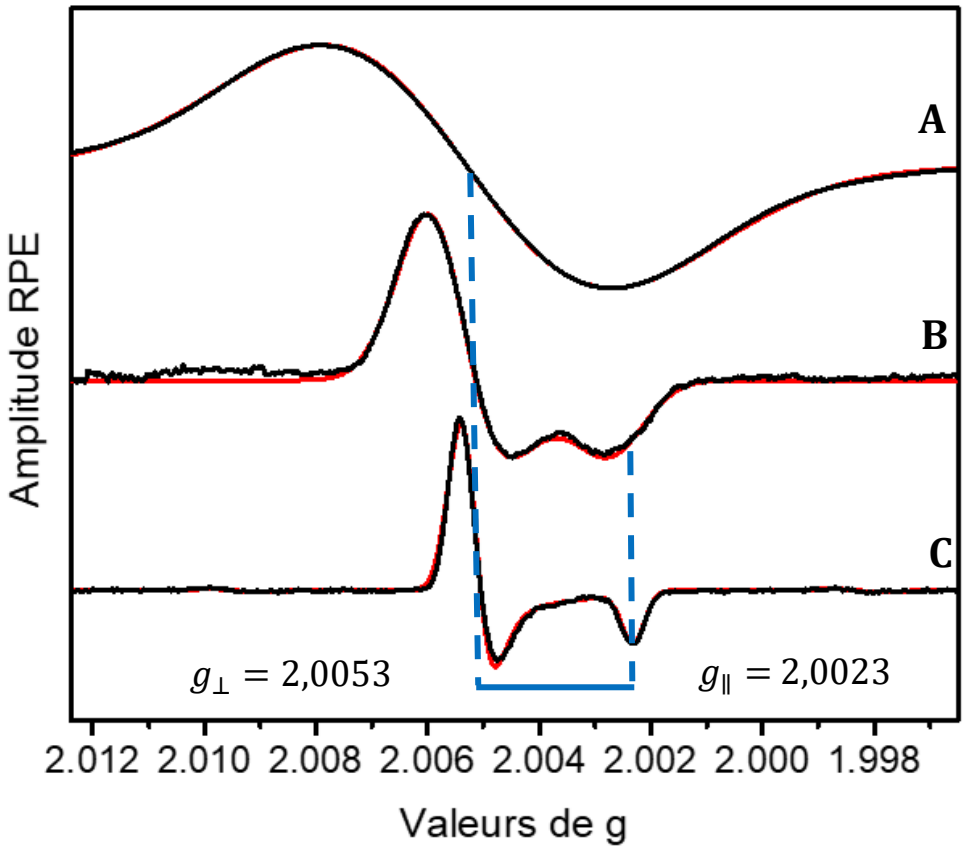


Figure V.3 : Etude multifréquence du signal RPE du radical organique stabilisé par titrage potentiométrique dans ForCE 1. Echantillons issus du titrage à pH = 6,0 mesuré à 50 K. (A) : bande X (9,4812 GHz), potentiel : -53 mV, puissance micro-onde : 4 mW, amplitude de modulation : 4 G à 100 kHz. (B) : bande Q (34,0944 GHz), potentiel : -174 mV, puissance micro-onde : 0.1 mW, amplitude de modulation : 5 G à 100 kHz. (C) : bande W (94,24408 GHz), potentiel : -174 mV, puissance micro-onde : 0.05 mW, amplitude de modulation : 4 G à 100 kHz, 2 accumulations. Paramètres simulations : valeurs de g : g_1 = 2,0054, g_2 = 2,0051, g_3 = 2,0023, largeur de raie modélisée par des couplages hyperfins non résolus (HStrain) : $H_{1,2,3}$ = 28,5 MHz, 25,5 MHz, 26,9 MHz (A). $H_{1,2,3}$ = 25,8 MHz, 25,8 MHz, 24,2 MHz (B). $H_{1,2,3}$ = 22,2 MHz, 28,4 MHz, 28,1 MHz (C).

En effet, alors que le signal mesuré en bande X apparait isotrope (figure V.3A), ce signal apparait axial en bande Q (figure V.3B) et les valeurs de $g_{\perp}$ et $g_{//}$ sont bien résolues en bande W. Les simulations permettent de calculer g_1 = 2,0053, g_2 = 2,0051 et g_3 = 2,0023. Les valeurs de g, la forme du signal ainsi que les propriétés de relaxation de ce centre sont cohérentes avec celles attendues pour un radical de type quinonique (voir la discussion en fin de chapitre).

I.3 - Titrage à pH = 7,5 et effet du pH sur les propriétés redox du radical dans ForCE 1

Un titrage de ForCE 1 dans du tampon CHES pH = 7,5 a été réalisé afin de sonder l'effet du pH sur les propriétés redox du radical étudié. La figure V.4 représente le titrage à pH = 7,5 (en rouge) en le comparant au titrage 1 (en noir). Les points expérimentaux sont obtenus par relevé de l'amplitude pic-à-pic du signal. Une courbe est ensuite ajustée sur les points expérimentaux avec une loi de Nernst donnant ainsi accès aux potentiels standards à pH = 7,5 qui sont donnés dans le tableau V.1.

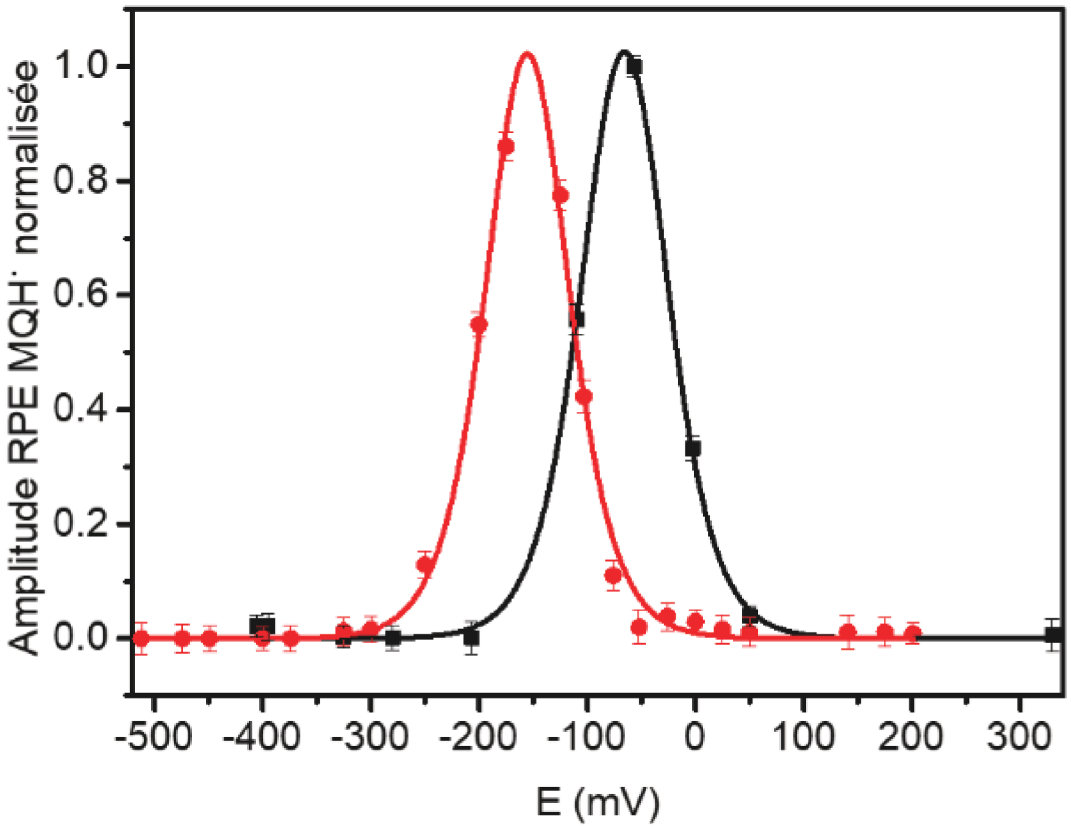


Figure V.4 : Titrages de l'espèce ménasemiquinone dans ForCE 1 à pH = 6,0 (noir) et pH = 7,5 (rouge). Conditions expérimentales : température 50 K, puissance micro-onde 10mW, amplitude de modulation : 10 G à 100 kHz (noir), amplitude de modulation 5 G à 100 kHz (rouge).

	$E^0_{MQ/MSQ}$	E^0_{MSQ/MQH_2}	E_m
pH = 6,0 Titrage 1	-10 mV ± 10 mV	- 90 mV ± 10 mV	-50 mV ± 10 mV
pH = 6,0 Titrage 2	-40 mV ± 10 mV	-90 mV ± 10 mV	-65 mV ± 10 mV
pH = 7,5	-140 mV ± 10 mV	-180 mV ± 10 mV	-160 mV ± 10 mV

Tableau V.1 : Potentiels déterminés pour l'espèce quinonique étudiée dans ForCE1 lors des titrages à pH = 6,0 et 7,5.

On observe une dépendance des potentiels redox du radical en fonction du pH ce qui suggère un processus de couplage entre le transfert d'électron et le transfert de proton au niveau de cette espèce.

On constate également que l'espèce étudiée ici serait vraisemblablement une quinone de bas potentiel i.e. une ménaquinone. De plus, Sato et al.[145] a montré que la ménaquinone 7 (MK7) est la principale ménaquinone produite par *Bacillus subtilis* (90 % – 96 %). Ainsi, il apparait raisonnable d'attribuer le signal radicalaire étudié dans ForCE 1 à un radical porté par une MK-7.

La comparaison entre les données obtenues à pH = 6,0 et pH = 7,5 montre une variation de -95 mV environ pour le potentiel redox médian qui varie en effet de ≈ - 65 mV à pH = 6,0 à ≈ -160 mV à pH = 7,5. Ceci correspond à une variation de ≈ - 60 mV par unité de pH soit la valeur attendue pour un transfert couplé de $1H^+$ par e^-. En conséquence, l'espèce semiquinone stabilisée apparait être une forme radicalaire neutre $MKH^\cdot$ dans la gamme de pH explorée.

II – Quantification et calcul du taux d'occupation

Comme il l'a été présenté au chapitre 3 (paragraphe IV.2.3.2) des quantifications ont été faites sur le signal du radical et sur celui des espèces Mo^V. Ainsi, comme on l'a montré en figure IV.12 et IV.14, l'espèce radicalaire a été quantifiée à pH = 6,0 et pH = 7,5 et contribue à son maximum d'intensité respectivement pour ces deux pH à hauteur de 0,35 et 0,41 spin par ForCE 1. L'étude en stabilité de la quinone présentée dans le Matériels et Méthodes (paragraphe II.5) nous permet de déterminer le nombre maximal théorique de ménasemiquinone que l'on peut observer dans ForCE 1 en fonction de l'écart entre les deux potentiels standards. Ces valeurs théoriques sont pour le titrage à pH = 6,0 et pH = 7,5 de 0,45

spin par ForCE 1. Avec ces quantifications on peut ainsi calculer un taux d'occupation de la quinone dans ForCE1.

$$\tau_{occ} = \frac{[MSQ\cdot]_{/prot\acute{e}ine}}{[MSQ\cdot]_{th\acute{e}o\ normalis\acute{e}\ \grave{a}\ 1}} . 100 \qquad \text{(Eqn 1)}$$

Il représente le pourcentage de sites protéiques occupés par une quinone quel que soit son état redox. Le numérateur est obtenu par intégration du signal RPE de la ménasemiquinone en comparaison de celle donnée par une référence interne que l'on considère comme stœchiométrique par rapport à l'enzyme, i.e. le centre C_4. Le dénominateur s'obtient à partir de la plage de stabilité du radical $E^0_2 - E^0_1$ (paragraphe II.5 du chapitre Matériels et Méthodes). Ici $E^0_2 - E^0_1 = E^0_{MQ/MSQ} - E^0_{MSQ/MQH_2}$. Les écarts en potentiel permettant de calculer la quantité de ménasemiquinone théorique sont pour le titrage à pH = 6,0 et pH = 7,5 de 50 et 40 mV respectivement.

On obtient ainsi pour le titrage à pH = 6,0 (titrage 1) et pour le titrage à pH = 7,5 un taux d'occupation de :

$$\tau_{occ}^{pH\,=\,6{,}0} = \frac{0{,}35}{0{,}45} . 100 \approx 80\ \%$$

$$\tau_{occ}^{pH\,=\,7{,}5} = \frac{0{,}41}{0{,}45} . 100 \approx 90\ \%$$

On a ainsi entre 0,8 et 0,9 ménaquinone par enzyme quel que soit son état redox. Par conséquent on en conclue que la très grande majorité des sites Q (site à quinone) sont occupés dans la gamme de pH [6,0 – 7,5].

III - Identification de ce même radical dans ForCE 2

Bien que pour des raisons de disponibilité d'échantillon de ForCE 2 un titrage n'a pas pu être réalisé sur cette enzyme, la figure V.5 compare les signatures mesurées à 50 K et 10 mW dans un échantillon de ForCE 1 stabilisé à -3 mV (A) avec celles mesurées dans un échantillon de ForCE 2 (B) réduit au formiate.

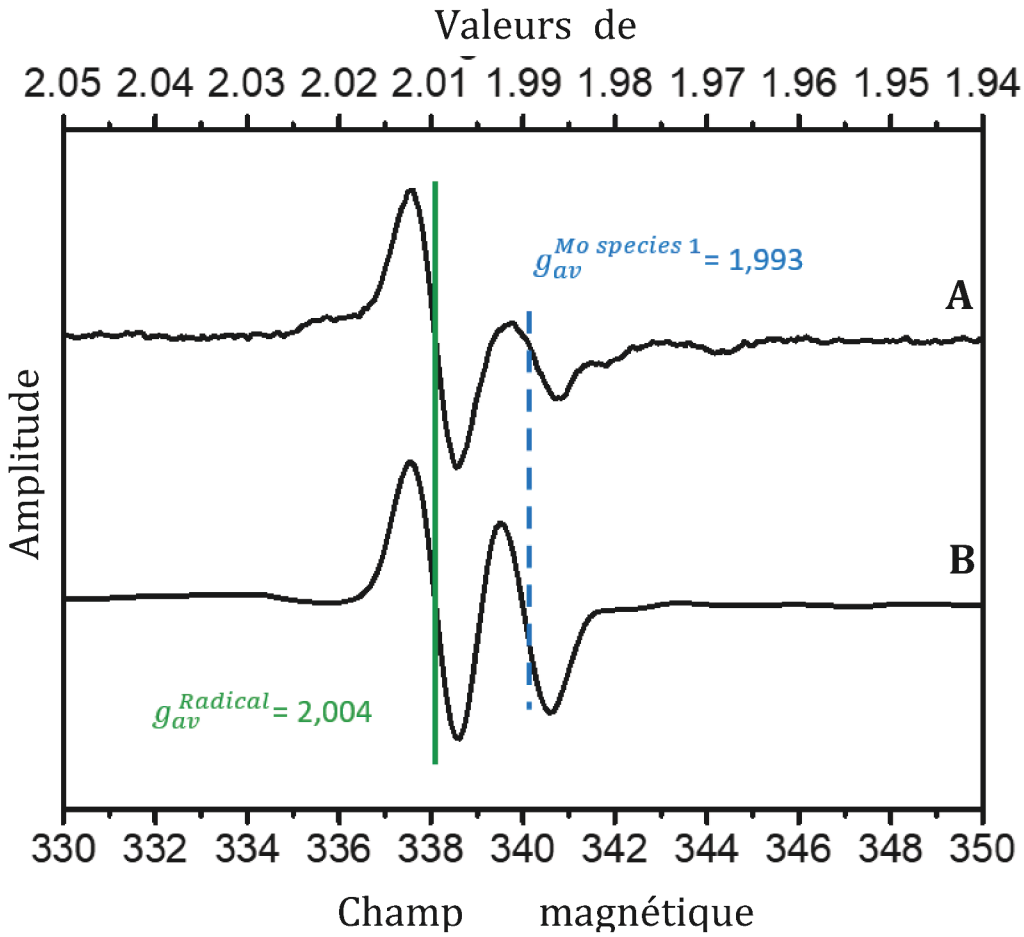


Figure V.5 : Comparaison des signatures RPE à pH = 6,0 mesurées à 50 K dans un échantillon de ForCE 1 stabilisé à -3 mV (A) ou de ForCE 2 réduit au formiate (B) à pH = 6,0. Paramètres expérimentaux : amplitude de modulation 10 G à 100 kHz, puissance micro-onde : 10 mW, fréquence : 9,48 GHz.

Il apparait qu'un signal radicalaire intense à g_{av} = 2,004 et de même largeur que celui analysé dans ForCE 1 est détecté dans ForCE 2 et témoignerait de la présence de l'espèce semiquinone dans ForCE 2.

Pour soutenir cette hypothèse, une caractérisation par spectroscopie RPE en bande W du radical dans ForCE 1, ForCE 2 et du radical ménasemiquinone de la nitrate réductase membranaire (NarGHI) d'*E. coli*, enzyme largement étudié au sein du BIP (Grimaldi et al.[146], Lanciano et al.[147], Rendon et al.[148]) a été faite. La figure V.6 montre le spectre correspondant est représenté sur la figure V.6C et comparé à celui du radical dans ForCE 1 (figure V.6A) et ForCE 2 (figure V.6B).

Les spectres expérimentaux sont en noirs et les simulations de ces derniers sont superposées en rouge. Les paramètres utilisés sont dans le tableau V.2.

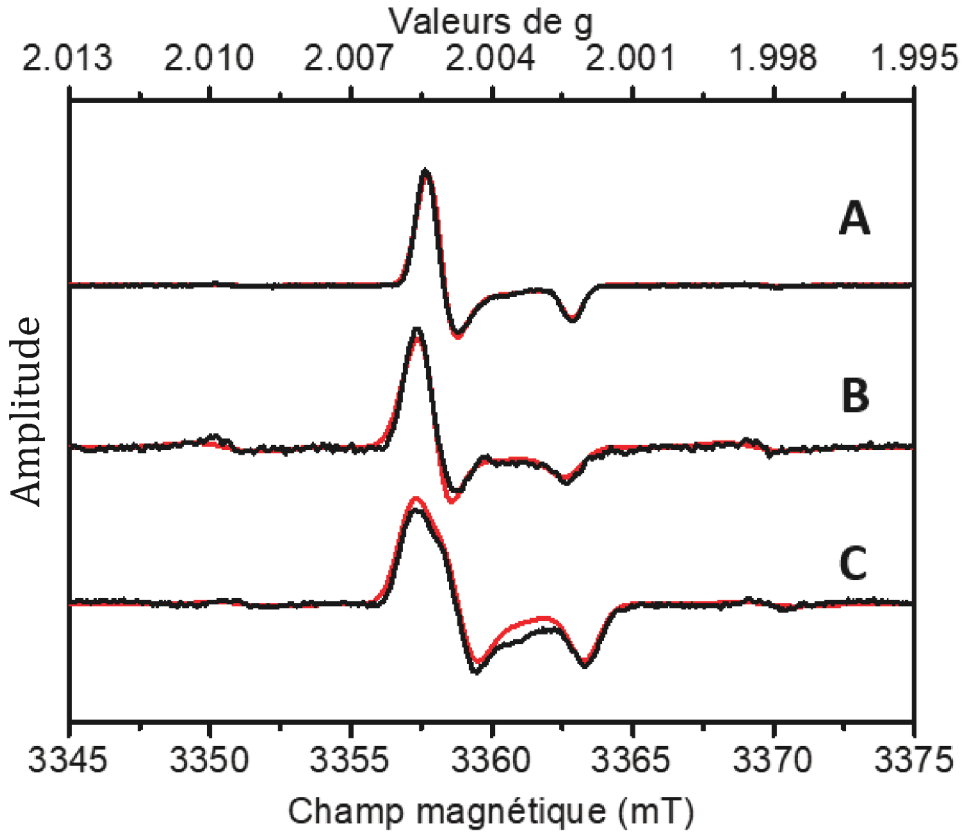


Figure V.6 : Spectres RPE mesurés en bande W du radical ménasemiquinone généré dans ForCE 1 (A), ForCE 2 (B) et dans la nitrate réductase (Nar) (C). Conditions expérimentales : pH = 6,0, température : 50 K, amplitude de modulation 4 G à 100 kHz. (A) 2 accumulations, fréquence : 94,24 GHz. (B) : 12 accumulations, fréquence : 94,00 GHz. (C) : 100 accumulations, fréquence : 94,25 GHz.

	Valeurs de g			Largeur de raie (Hstrain) en MHz			Anisotropie (g_1 - g_3)
	g_1	g_2	g_3	H_1	H_2	H_3	
ForCE 1	2,0054	2,0051	2,0023	25,8	25,8	24,2	0,0031
ForCE 2	2,0056	2,0051	2,0023	33,6	27,2	38,1	0,0033
Nar	2,0058	2,0048	2,0022	34,4	36,5	34,2	0,0036

Tableau V.2 : Paramètres électroniques des espèces ménasemiquinones étudiées dans ForCE 1, ForCE 2 et Nar et déterminés par simulation numérique des spectres présentés dans la Figure V.6.

On constate que les signaux de ForCE 1 (figure V.6A) et ForCE 2 (figure V.6B) en bande W ont des formes spectrales, des valeurs de g ainsi que des largeurs de raies très similaires. Il semblerait ainsi que ces deux signaux proviennent de la même espèce. Le même travail a été effectué sur le radical ménasemiquinone dans Nar d'*E. coli* précédemment étudié au BIP où l'on peut constater une résolution de g_1 et g_2 (figure V.6C). De plus, il apparait que les spectres,

les valeurs de g ainsi que les largeurs de raies sont similaires à celles trouvées dans ForCE 1 et ForCE 2. L'espèce radicalaire observée dans Nar est associée à une ménasemiquinone. Cela renforce l'attribution faite des espèces observées dans ForCE 1 et ForCE 2 à une espèce de type ménasemiquinone.

IV - Etude de l'intermédiaire ménasemiquinone par HPLC GC/MS

L'attribution des signaux radicalaires à une MK7 a été vérifiée par une analyse HPLC par détection électrochimique des échantillons utilisés par la RPE. Celle-ci a été effectuée par le Dr. Fabien Pierrel (TIMC, Grenoble). La HPLC (High Performance Liquid Chromatography) est une méthode d'analyse et de préparation d'échantillon basée sur la séparation de molécules présentes dans un mélange. Cette séparation se fait par l'entrainement des composés par une phase liquide (mobile) à travers une colonne contenant une phase stationnaire. Cette dernière est composée d'une phase fixe qui en fonction de la taille des grains la composant, de leurs charges ou de leurs polarités, vont retenir avec plus ou moins d'affinité les différents composants et ainsi les séparer. Les détecteurs électrochimiques exploitent les propriétés d'oxydoréduction des espèces présentes dans le mélange. Ils ont une excellente sensibilité et sont spécifiques d'un analyte ou d'un groupe d'analyte.

La figure V.7 montre la superposition des chromatogrammes HPLC de ForCE 1 (en bleu) et d'un standard de ménaquinone 7 (MK-7) commercial (en noir).

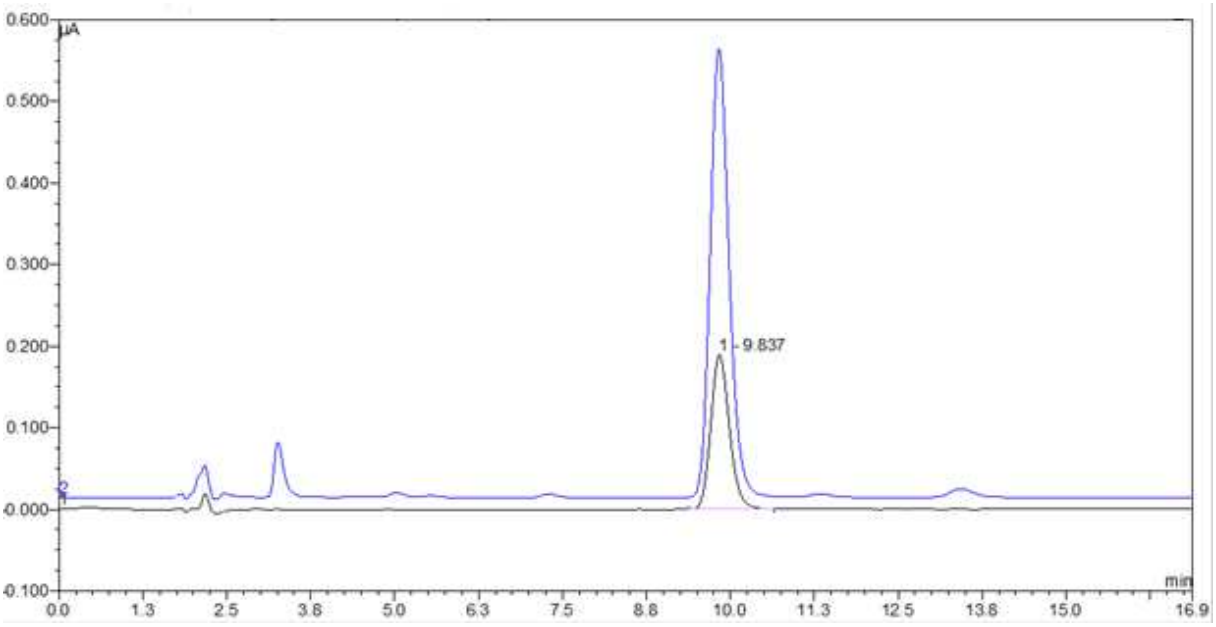


Figure V.7 : Superposition de chromatogrammes HPLC par détection électrochimique d'un extrait lipidique de ForCE 1, en bleu et d'un standard de ménaquinone 7 (MK-7) commercial (en noir).

On constate avec la figure V.7 que le pic présent à 9,8 minutes présent dans ForCE 1 est superposable avec celui d'un standard commercial de MK-7. De plus le profil HPLC de ce pic est similaire à celui du standard de MK-7. On en conclut alors que l'espèce radicalaire présente dans ForCE 1 est bel et bien associée à une espèce MK7. De plus, pour confirmer ce résultat, une analyse par spectrométrie de masse du composé présent à 9,8 minutes a été réalisée. Cette technique très sensible permet la détection et l'identification de composés d'intérêt par mesure de leur masse. Une étape d'ionisation du composé est réalisée au cours de l'analyse et permet donc la détection d'adduits formés à partir du composé ionisé et des ions présents dans l'analyte. La figure V.8 montre cette analyse.

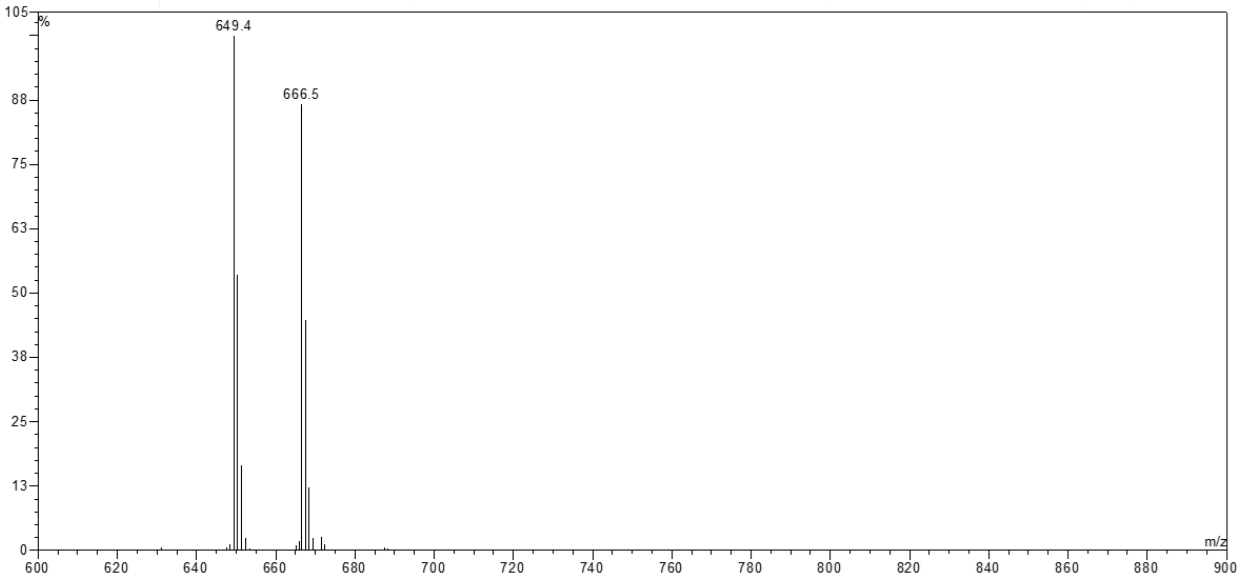


Figure V.8 : Spectre de masse du composé à 9,8 minutes présent dans les extraits de ForCE 1.

Sur la figure V.8 on constate la présence de deux pics à m/z = 649,4 et m/z = 666,5. Ces derniers sont respectivement attribués aux adduits H^+ et NH_4^+ de la MK-7.

Toutefois, on remarque que d'autres pics sont présents sur le chromatogramme. En effet un pic minoritaire à 13,7 minutes est présent. La figure V.9 montre l'analyse par spectrométrie de masse de ce dernier pic.

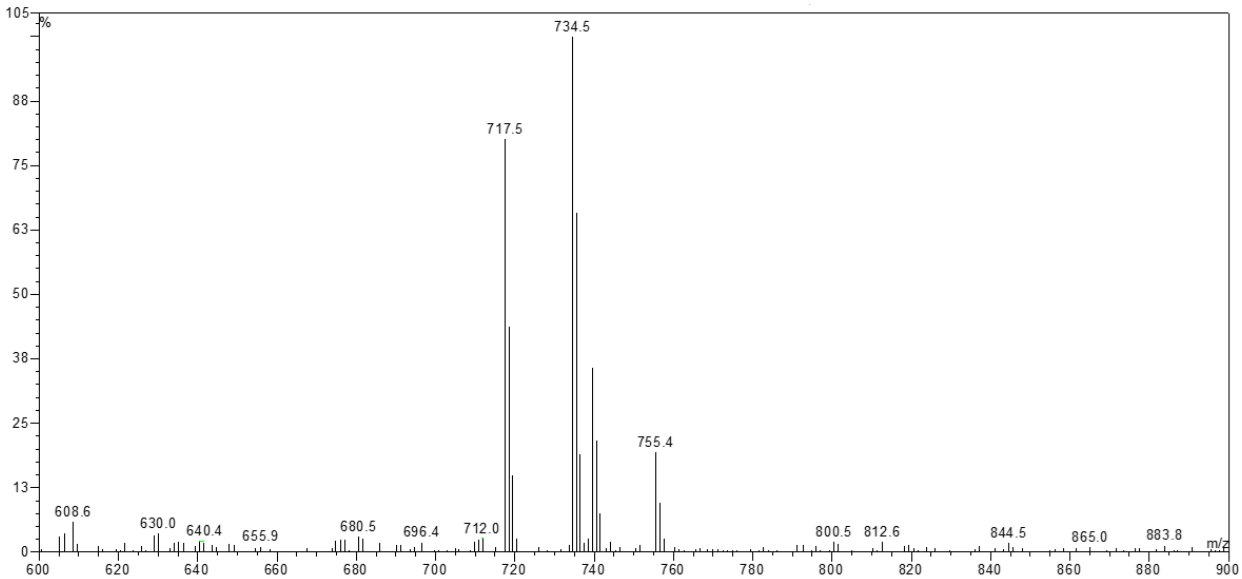


Figure V. 9 : Spectre de masse du composé à 13,7 minutes présent dans les extraits de ForCE 1.

La figure V.9 permet de montrer que le spectre de masse du pic présent à 13,7 minutes est composé de trois pics majoritaires distincts à m/z = 717,5, m/z = 734,5 et m/z = 755,4. Les

deux premiers sont majoritaires et sont attribués respectivement aux adduits H^+ et NH_4^+ de la ménaquinone 8 (MK-8), présente de manière minoritaire chez *Bacillus subtilis*. En effet, cette différence de masse entre le spectre de masse de la MK-7 et de la MK-8 est de m/z = 68 ce qui correspond à la différence d'une unité isoprényle. Le dernier pic à m/z = 755,4 est un pic minoritaire que l'on peut attribuer à l'adduit formé par la MK-8 et un ion potassium (K^+).

V - Analyse par RPE pulsée de l'environnement chimique de l'espèce semiquinone à pH = 6,0

Afin de caractériser plus en détail le mode de fixation du radical dans ForCE 1, une étude par RPE impulsionnelle a été effectuée et est présentée ci-après. Les techniques de spectroscopie hyperfine de type ESEEM/HYSCORE ont été mises en place afin de sonder l'environnement nucléaire direct de l'espèce semiquinone via la mesure des couplages magnétiques faibles entre cette dernière et les noyaux magnétiques situés dans son environnement immédiat.

V.1 – Analyse par spectroscopie RPE pulsée 3-pulse ESEEM

Les expériences d'ESEEM à 3 impulsions permettent d'avoir accès aux fréquences fondamentales des transitions des noyaux couplés. Dans le cas d'un système en condition de compensation ces expériences donnent accès à $\vartheta_0, \vartheta_-, \vartheta_+, \vartheta_{dq}$, et ϑ_I^H.

La figure V. 10 montre les spectres ESEEM 3-pulse de la MSK stabilisée dans ForCE 1, préparée dans H_2O et enregistrés à différentes valeurs de τ comprises entre 100 et 590 ns.

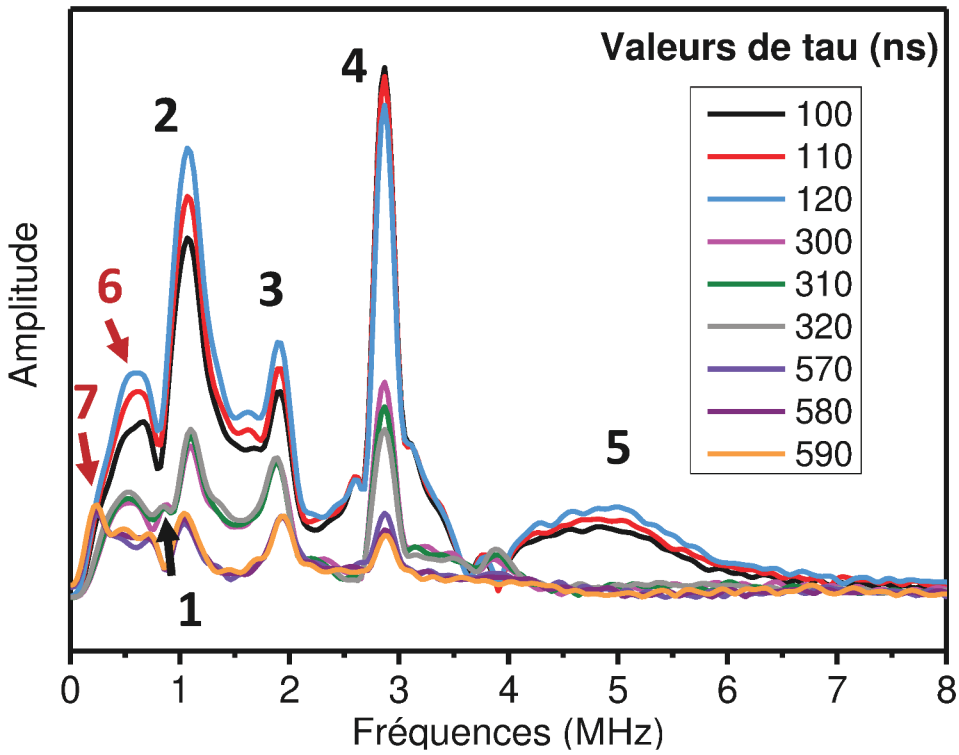


Figure V.10 : superposition de spectres ESEEM 3-p enregistrés à différentes valeurs de τ dans H_2O. Conditions expérimentales : température : 50 K, fréquence micro-onde : 9,71 GHz, champ magnétique : 346 mT, 34 accumulations, pH = 6,0.

On retrouve les pics de corrélation observés dans les analyses HYSCORE aux fréquences $\vartheta_1 \approx 0{,}80$ MHz (1), $\vartheta_2 \approx 1{,}10$ MHz (2), $\vartheta_3 \approx 1{,}90$ MHz (3), $\vartheta_4 \approx 2{,}90$ MHz (4), $\vartheta_5 \approx 4{,}90$ MHz (5). On constate que la somme des fréquences des pics (1) et (2) est égale à celle du pic (3). De plus, il apparait que la somme des fréquences des pics (2) et (3) est proche de celle du pic (4). Ceci traduit la présence d'au moins deux noyaux de ^{14}N en condition de compensation. Cela conduit à la possibilité d'observer directement sur le spectre les fréquences quadripolaires pures ϑ_0, ϑ_- et ϑ_+ dans ce multiplet ainsi que la transition double quanta ϑ_{dq} de l'autre multiplet. Ainsi les pics les plus intenses (2), (3) et (4) sont associés à un premier noyau de ^{14}N et les pic (1), (2) et (3) à un second donc les contributions spectrales recouvrent partiellement celles du premier. Le pic (5) est attribué à la transition double quanta ϑ_{dq}. Néanmoins il apparait que pour toutes les valeurs de τ, un sixième pic apparait à $\vartheta_6 \approx 0{,}55\ MHz\ (6)$. Pour des valeurs de τ supérieures à 570 ns, un septième pic est détecté. Ce pic visible à $\vartheta_7 \approx 0{,}25\ MHz$ n'est pas considéré plus avant car situé dans une zone de fréquence

sensible à l'apparition d'artéfacts consécutifs au traitement du spectre avant transformation de Fourier.

V.2 – Analyse par spectroscopie HYSCORE

V.2.1 - Analyses HYSCORE effectuées dans H_2O

Une étude du signal semiquinone généré dans le titrage 1 de ForCE 1 à pH = 6,0 est réalisée par spectroscopie HYSCORE en utilisant l'échantillon stabilisé à un potentiel de – 50 mV présentant un signal de ménasemiquinone d'intensité maximale. Les quadrants (-,+) et (+,+) des spectres HYSCORE du radical enregistrés à τ = 204 ns (A) et τ = 136 ns (B) sont montrés dans la figure V.11.

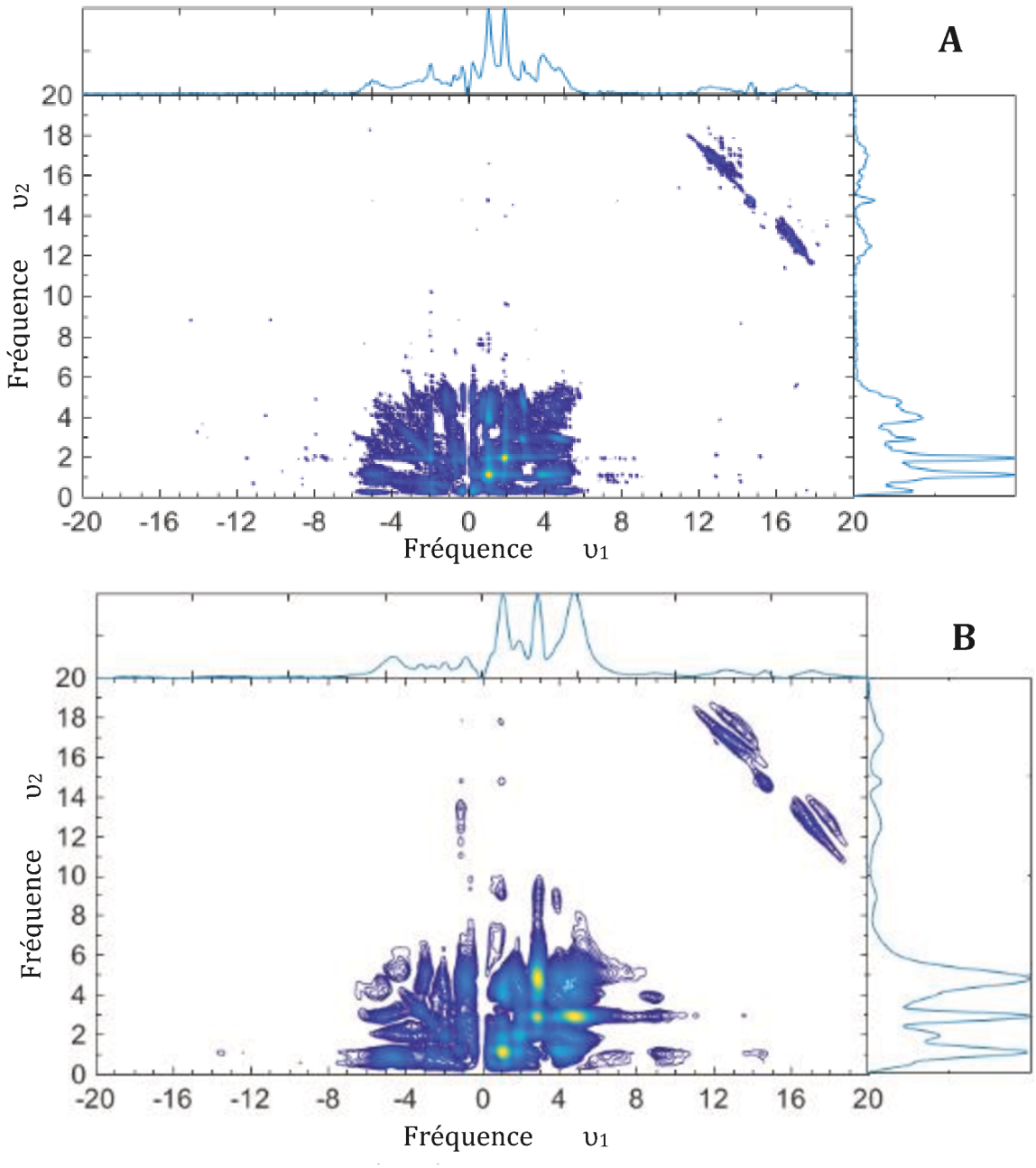


Figure V.11 : Quadrants (- +) et (+ +) des spectres HYSCORE enregistrés à τ = 204 ns (A) et τ = 136 ns (B) un échantillon de ForCE 1 préparé dans H_2O. Paramètres expérimentaux : température : 50 K, potentiel : - 50 mV, fréquence micro-onde : 9,71 GHz, champ magnétique : 346 mT (maximum d'absorption du spectre de MK-7 détecté par écho de spin), accumulation : n = 11 (A), n = 11 (B). Concentration : 80 µM.

On distingue des signaux de corrélation :

1) Dans la partie « haute fréquence » du quadrant (+,+) que l'on attribue à des interactions du radical ménasemiquinone avec des protons car ces signaux sont centrés sur la fréquence de Larmor des protons $\vartheta_I^{^1H} \approx 15$ MHz.

2) Dans le partie « basse fréquence » des deux quadrants (-,+) et (+,+) où sont attendus les contributions des noyaux de plus faibles rapports gyromagnétiques tels que ^{14}N et ^{13}C.

V.2.1.1 – Analyse des signaux de ^{14}N

La figure V.12 présente un zoom de la zone basse fréquence du quadrant (+,+) pour τ = 204 ns (A) et τ = 136 ns (B). On observe des signaux intenses cohérents avec l'observation d'une amplitude de modulation élevée du signal dans le domaine temporel qui suggère une situation de « cancellation condition ». Cette condition traduit une situation où la contribution de l'interaction hyperfine compense l'effet Zeeman nucléaire dans l'un des multiplets électroniques. Cela conduit à la possibilité d'observer directement sur le spectre les fréquences quadripolaires pures ϑ_0, ϑ_- et ϑ_+ dans ce multiplet ainsi que la transition double quanta ϑ_{dq} de l'autre multiplet. Ceci est caractéristique d'une interaction avec un ou plusieurs noyau(x) ^{14}N pour lesquels A_{iso} (^{14}N) ≈ $2\vartheta_I^{^{14}N} \approx 3{,}0$ MHz, cohérent avec l'apparition de signaux basses fréquences dans les deux quadrants.

Les spectres HYSCORE présentés sur la figure V.12 montrent la présence de pics de corrélation. Les fréquences sont données dans les tableaux 3 et 4 pour les deux valeurs de tau, τ = 204 ns (A) et τ = 136 ns (B).

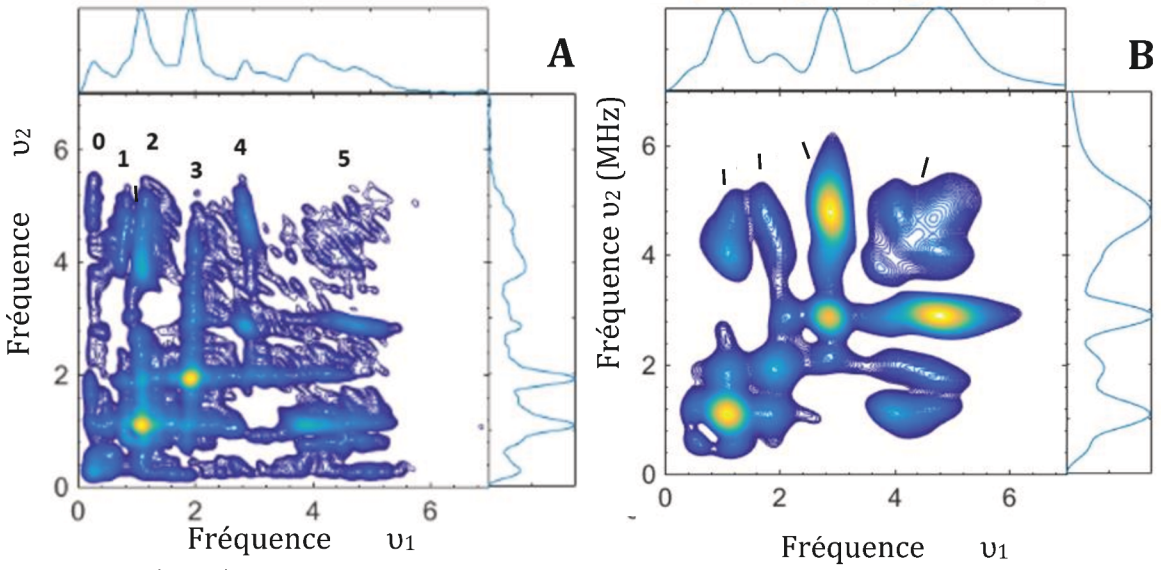


Figure V.12 : Spectres HYSCORE des régions basses fréquences des quadrants (+ +) mesurés à τ = 204 ns (A) et τ = 136 ns (B). Paramètres expérimentaux : idem figure V. 11. Concentration : 80 µM.

τ = 204 ns	1	2	3	4	5
ν_1 (MHz)	0,80	1,10	1,95	2,95	3,95
ν_2 (MHz)	4,35	4,30	3,15	4,75	1,10

Tableau V.3 : Coordonnées des pics de corrélation $(\vartheta_1, \vartheta_2)$ observés sur le spectre de la figure V. 12 A.

τ = 136 ns	2	3	4	5
ν_1 (MHz)	1,15	1,85	2,95	4,55
ν_2 (MHz)	4,25	4,40	4,90	4,90

Tableau V.4 : Coordonnées des pics de corrélation $(\vartheta_1, \vartheta_2)$ observés sur le spectre de la figure V. 12 B.

On constate que deux jeux de trois pics semblent être liés par la relation $\vartheta_0 + \vartheta_- = \vartheta_+$. Il apparait donc un possible recouvrement partiel des signaux de deux noyaux d'azote. Pour τ = 136 ns (tableau V.4) on retrouve que la somme des fréquences des pics 2 et 3 est proche de

la fréquence du pic 4. Ces trois fréquences peuvent donc appartenir à un premier noyau d'azote à N_1. On retrouve ces dernières également à τ = 204 ns (tableau V.3). De plus, la somme des fréquences des pics 2 et 3 est égale à celle du pic 4 appartenant à un second noyau d'azote, noté N_2. Le pic repéré par le chiffre zéro est de très faible intensité. On ne peut ainsi l'attribuer avec certitude à un pic de corrélation puisqu'il peut provenir d'un artéfact du au faible rapport signal sur bruit.

Dans la condition de compensation, les fréquences quadripolaires pures ainsi que les doubles quanta sont liées aux paramètres quadripolaires κ et η par :

$$\vartheta_0 = 2\kappa\eta$$

$$\vartheta_- = \kappa(3 - \eta)$$

$$\vartheta_+ = \kappa(3 + \eta)$$

où κ et η sont les constantes de couplage quadripolaire. Une détermination de ces constantes est alors facile et donne pour le noyau N_1 : $\kappa = 0{,}80$ et $\eta = 0{,}70$. Ces résultats sont résumés dans le tableau V.5.

Noyaux	κ	η
N_1 (τ = 136 ns)	0,80	0,70
N_1 (τ = 204 ns)	0,82	0,66
N_2 (τ = 204 ns)	0,51	0,84

Tableau V.5 : Tableau récapitulatif des valeurs des paramètres quadrupolaires K (kappa) et n (eta) calculées pour τ = 204 ns et pour τ = 136 ns.

Pour vérifier la répétabilitéo des résultats obtenus, les mêmes expériences ont été réalisées sur une nouvelle préparation de ForCE 1 (préparation B) dans des conditions identiques de pH (pH = 6,0) et sur un échantillon stabilisé à un potentiel de E = - 55 mV, mais à une concentration de 110 µM (80 µM précédemment). La figure V.13 présente les quadrants (-,+) et (+,+) où l'on observe les motifs spectraux dus aux noyaux d'azote pour τ = 204 ns (A) et τ = 136 ns (B).

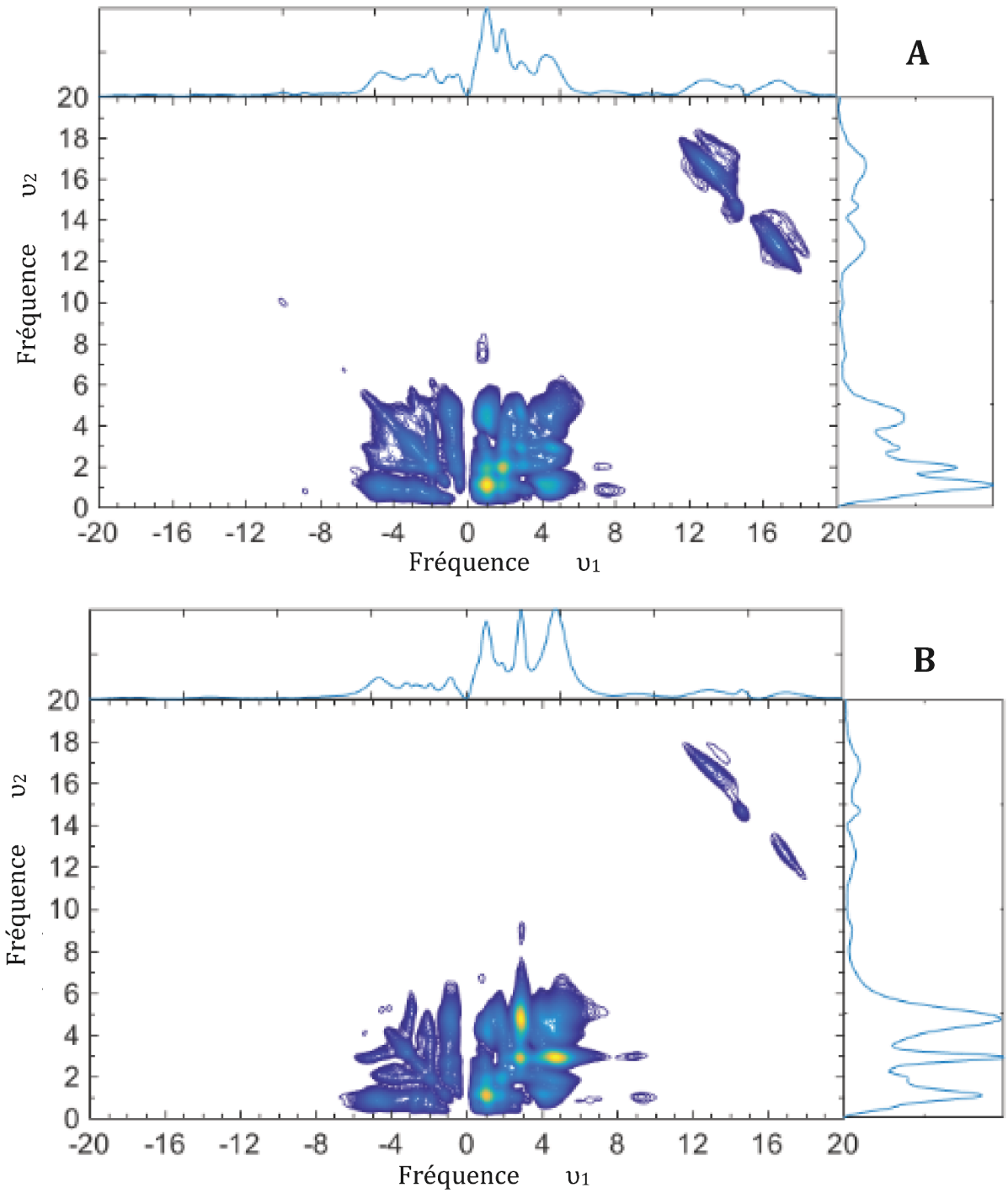


Figure V.13 : Spectres HYSCORE des quadrants (- +) et (+ +) à τ = 204 ns (A) et τ = 136 ns (B) dans H_2O. Paramètres expérimentaux : température : 50 K, potentiel : - 55 mV, impulsion π/2 = 12 ns, fréquence micro-onde : 9,68 GHz, champ magnétique : 346 mT, puissance micro-onde : 0,15 µW, incrément en temps : 12 ns, accumulation : n = 22 (A), n = 18 (B). Concentration : 110 µM.

Comme le montre la figure V.13 on retrouve les corrélation dans la partie hautes fréquences du quadrant (+,+) que l'on attribue à des interactions ménasemiquinone-proton. De même dans la partie basses fréquences des deux quadrants (-,+) et (+,+) on retrouve les signatures

attendues pour les noyaux de ^{14}N précédemment observés. La figure V.14 présente les zones basses fréquences du quadrant (+,+) à τ = 204 ns (A) et à τ = 136 ns (B) où l'on observe les motifs spectraux dus à ^{14}N

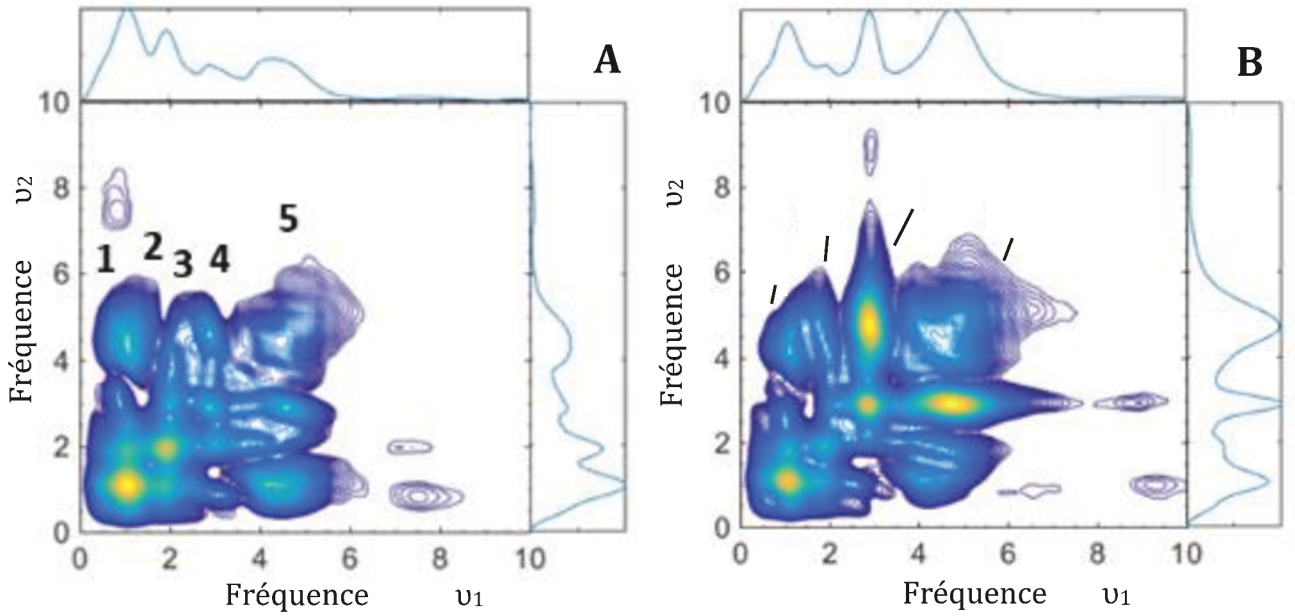


Figure V.14 : Spectres HYSCORE des régions basses fréquences et hautes fréquences (C, D) des quadrants (+ +) à τ = 204 ns (A) et τ = 136 ns (B). Paramètres expérimentaux : température : 50 K, potentiel : - 55 mV, impulsion π/2 = 12 ns, fréquence micro-onde : 9,68 GHz, champ magnétique : 346 mT, puissance micro-onde : 0,15 µW, incrément en temps : 12 ns, accumulation : n = 22 (A), n = 18 (B). Concentration : 110 µM.

En raison de la présence et du recouvrement de plusieurs signaux à τ = 204 ns, une analyse détaillée est difficile. En revanche, à τ = 136 ns on retrouve les signaux caractéristiques de l'azote N_1 dont les fréquences des pics de corrélation sont récapitulés dans le tableau V.6.

τ = 136 ns	**2**	**3**	**4**	**5**
ν_1 (MHz)	1,10	1,80	2,90	4,85
ν_2 (MHz)	4,10	4,60	4,60	4,40

Tableau V.6 : Coordonnées des pics $(\vartheta_1, \vartheta_2)$ observés sur le spectre HYSCORE de la MSK (préparation B, τ = 136 ns).

On constate que la somme des fréquences des pics 2 et 3 est égale la fréquence du pic 4. Ces trois fréquences sont donc associées au noyau d'azote à N_1.

Il a été observé au cours des expériences d'ESEEM à 3 impulsions un pic à $\vartheta_6 \approx 0.55\ MHz\ (6)$. La figure V.15 montre le spectre HYSCORE illustrant la présence du pic (6) dans la préparation A (80 µM) et dans la préparation B (110 µM).

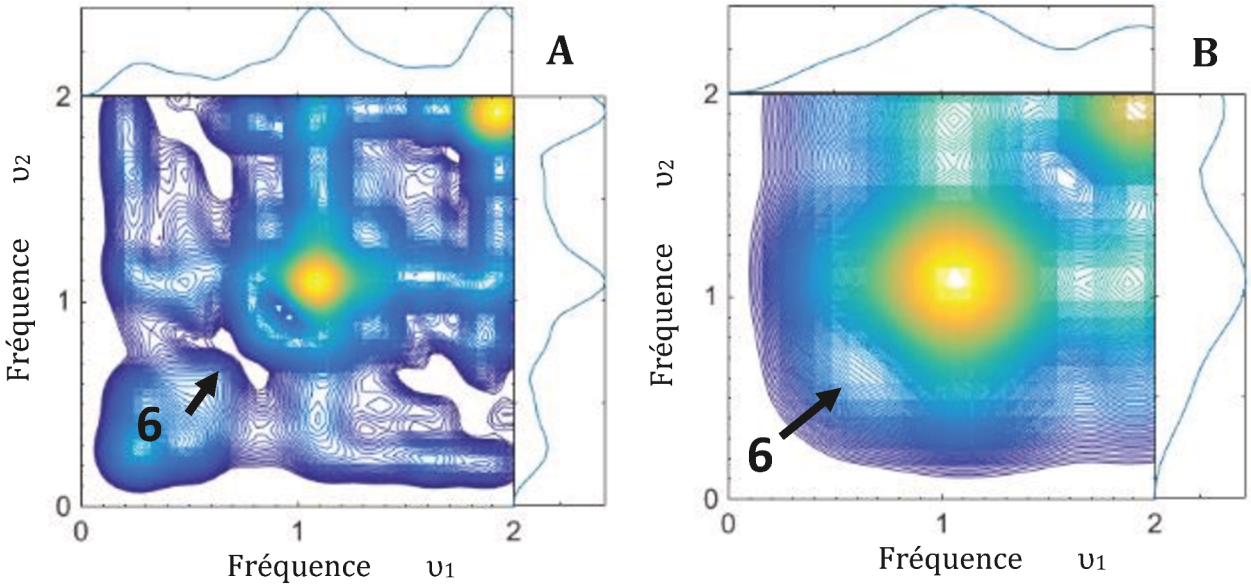


Figure V 15 : Zoom sur la région [0-2 MHz] des spectres HYSCORE présentés en (A) et (B) à τ = 204 ns pour la préparation 80 µM (A) et à 110 µM (B) dans H_2O à 50 K, pH = 6,0.

Un pic à $\vartheta_6 \approx 0.55$ MHz (6) est visible dans la région basse fréquence des spectres d'ESEEM à 3 impulsions (figure V.10). L'examen attentif du spectre HYSCORE de la préparation 1 révèle un signal faible à cette fréquence situé sur la diagonale (figure V.15 A) mais qui n'est pas visible sur le spectre correspondant mesuré sur la MSK issue de la préparation B (figure V.15 B). Ce signal corrèle possiblement avec une fréquence autour de 4 MHz comme indiqué dans le spectre montré en rouge sur la figure V.16 sur une plus large plage de fréquences.

Ces signaux pourraient être associés à un couplage hyperfin supplémentaire avec un noyau d'azote qui ne satisferait pas la condition de compensation mais ceci reste à confirmer compte tenu de leur faible intensité et du fait qu'ils ne sont pas visibles dans l'échantillon issu de la préparation B pourtant plus concentrée.

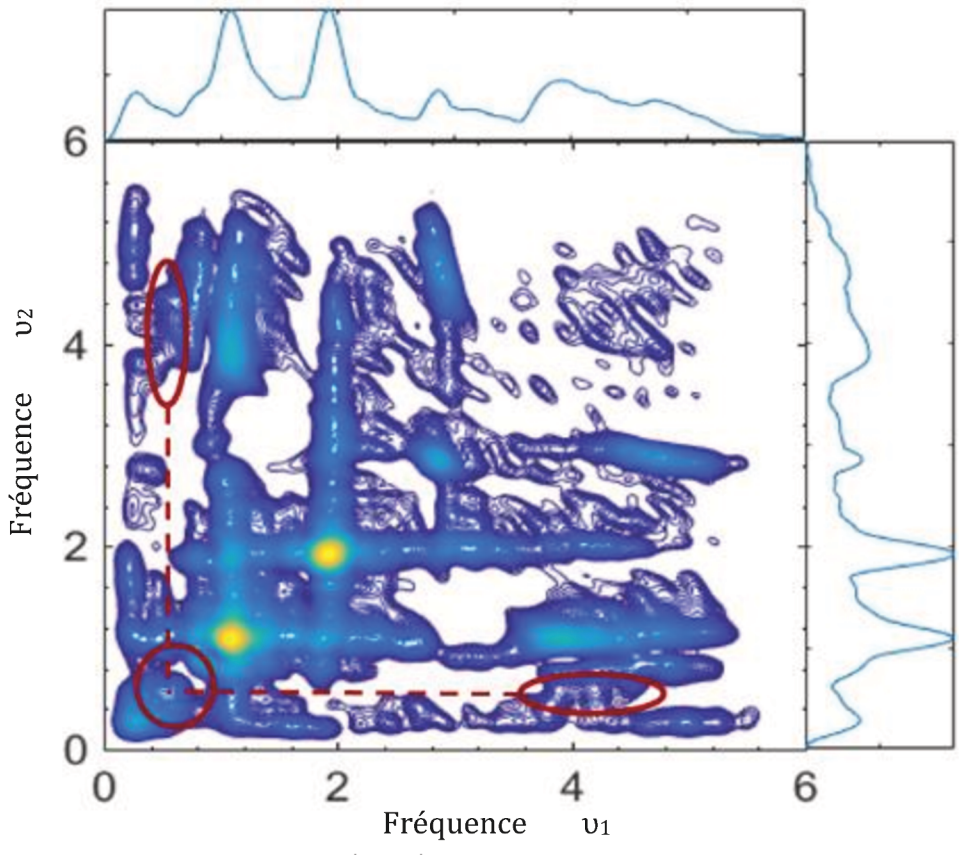


Figure V. 16 : Zoom sur la région [0-6 MHz] du spectre HYSCORE présenté sur la figure V.11 A) à τ = 204 ns. Température : 50 K, pH = 6,0. Concentration : 80 µM.

V.2.1.2 – Analyse des signaux ^{1}H

La deuxième zone du spectre HYSCORE du radical MSK où des signaux sont visibles est celle située autour de la fréquence de Larmor du proton. La figure V.17 présente la zone « haute fréquence » du quadrant (+,+) comprise entre 10 MHz et 20 MHz pour les valeurs τ = 204 ns (A) et τ = 136 ns (B).

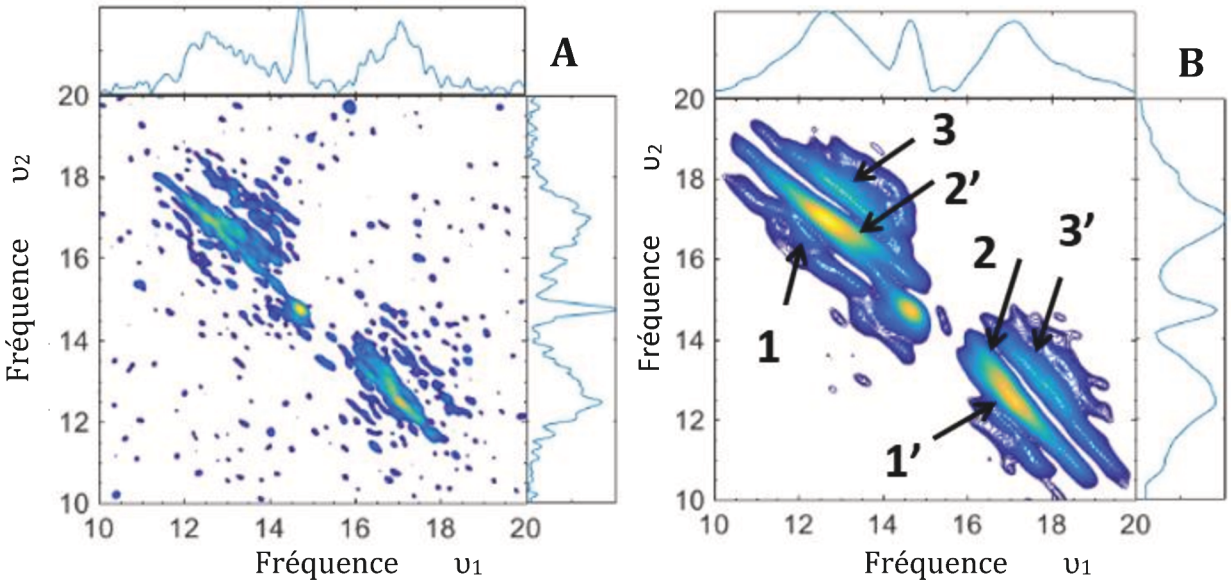


Figure V.17 : Spectres HYSCORE des régions hautes fréquences des quadrants (+ +) mesurés à τ = 204 ns (A) et τ = 136 ns (B). Paramètres expérimentaux : idem figure V.11. Concentration : 80 µM.

Plusieurs signaux symétriques par rapport à l'antidiagonale sont visibles. Premièrement, il y a les signaux numérotés 1 et 1' qui sont bien visibles à τ = 204 ns et τ = 136 ns. Deuxièmement, il y a les signaux numérotés 2, 3 et 2', 3', bien visibles à τ = 136 ns.

De même que précédemment, l'étude de la reproductibilité de ces signaux a été effectuée. La figure V.18 montre les zones hautes fréquences du quadrant (+,+) où l'on observe les motifs spectraux dus aux ^{1}H pour τ = 204 ns (A) et τ = 136 ns (B).

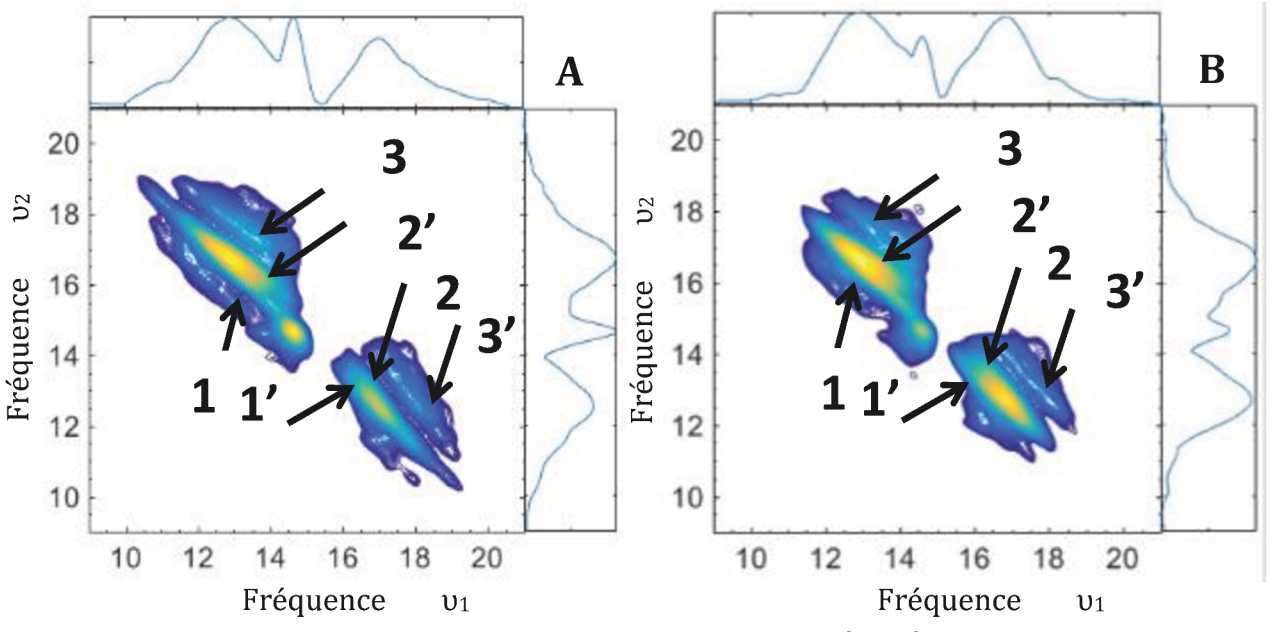


Figure V.18 : Spectres HYSCORE des régions hautes fréquences des quadrants (+ +) à τ = 204 ns (A) et τ = 136 ns (B). Paramètres expérimentaux : idem que la figure V. 13. Concentration : 110 µM.

V.2.1.3 - Analyse quadratique

Entre les deux préparations, les mêmes signaux ont été observés. J'ai donc choisi de mener l'analyse quadratique à partir de la préparation à 80 µM, celle pour laquelle les signatures des protons se recouvraient le moins possibles, i.e. la première préparation à 80 µM. Cette analyse quadratique est réalisée en pointant les coordonnées en fréquence des maxima des crêtes des pics de corrélation dus aux protons, et en les représentant en fonction du carré des fréquences associées $\vartheta_\alpha^2 = f(\vartheta_\beta^2)$. On obtient une droite si ces signaux sont associés à un même groupe de protons et il est alors possible de déterminer les constantes hyperfines associées à ces signaux à partir du coefficient directeur de la droite ajustée sur les points relevés et de l'ordonnée à l'origine (voir chapitre Matériels et Méthodes II.5.3).

La figure V.19 montre les analyses quadratiques réalisées pour les signaux **2, 3** (A) et **2', 3'** (B) à τ = 136 ns puisque c'est à cette valeur de τ que ces couplages sont le mieux observés.

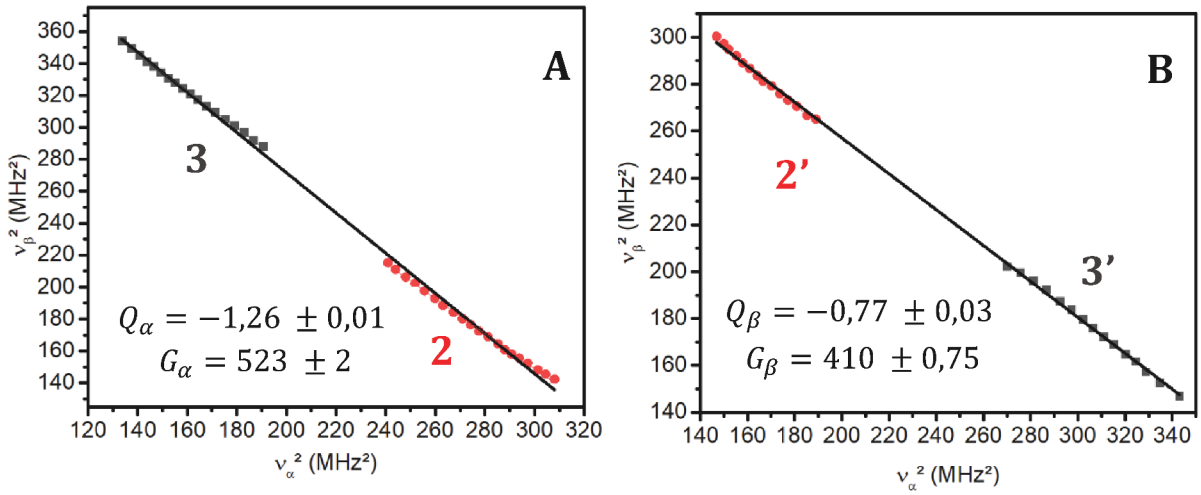


*Figure V.19 : Représentation quadratique des fréquences relevées sur les maxima de la crête des pics de corrélation présentés dans la figure V. 17 (B) pour les signaux **2-3** (A) et **2'-3'** (B). Préparation à pH = 6,0.*

De ces analyses quadratiques, nous pouvons raisonnablement conclure que les signaux **2** et **3** se positionnent sur une même droite ainsi que les signaux **2'** et **3'**. Ceci signifie que les signaux **2, 3** et **2', 3'** proviennent d'un même couplage associé à un ou plusieurs protons équivalents que l'on désigne comme H_1. On détermine également les coefficients Q_α et G_α qui sont respectivement la pente et l'ordonnée à l'origine de ces droites. Dans le cas du couplage **2-3** on obtient $Q_{\alpha 1} = -1{,}26$ et $G_{\alpha 1} = 523\ \mathrm{MHz}^2$ et dans le cas du couplage **2-3** on obtient $Q_{\alpha 2} = -0{,}77$ et $G_{\alpha 2} = 410\ \mathrm{MHz}^2$. On constate que la relation $Q_{\alpha 1} = \frac{1}{Q_{\alpha 2}}$ et $G_{\alpha 1} = -Q_{\alpha 1} G_{\alpha 2}$ est vérifiée, confirmant que **2-3** et **2'-3'** sont associés au même couplage. Ces valeurs sont regroupées dans le tableau V.7.

Couplages	Valeur de τ (ns)	Q_α	G_α (MHz^2)
2-3	136	-1,26	523
2'-3'		-0,77	410

Tableau V.7 : Valeurs des Q_α et G_α déterminés lors de l'analyse des couplages 2-3 et 2'-3'.

Pour des raisons de simplification d'analyse on considérera uniquement les signaux **2'-3'** du couplage.

L'analyse quadratique permet la détermination de A_{iso} et $|T|$ ($T < 0$ ou $T > 0$). Le calcul de ces derniers en utilisant différentes valeurs de τ permet ainsi la détermination d'incertitude sur

ces valeurs. Pour la détermination de A_{iso} et T deux cas de figure sont à distinguer. En regard des équations 82 à 84 du chapitre Matériels et Méthodes

- Si $\vartheta_1 = \vartheta_\alpha$, on détermine $|T|$. On calcule ainsi les deux valeurs possibles, $\pm T$. Pour chaque valeur de T on peut calculer une valeur de a_{iso}. On a ainsi, le jeu 1 (a_{iso} ; T) donnés en MHz : $\mp 6{,}69 \pm 5{,}51$ pour τ = 136 ns.
- Si $\vartheta_1 = \vartheta_\beta$, le même protocole est appliqué et on a ainsi le jeu 2 : $= \pm 1{,}18$; $\pm 5{,}51$ pour τ = 136 ns.

De plus, on observe une paire de pics de corrélation dans la région proche de la fréquence de Larmor, notés **1, 1'** sur la figure V.18. La figure V.20 montre l'analyse quadratique effectuée sur ces signaux. En rouge sont représentés les maxima des crêtes du signal situés au-dessus de la diagonale ($\vartheta_\alpha^2 < \vartheta_\beta^2$) sur le spectre HYSCORE et notés **1**. En noir sont représentés les maxima des crêtes du signal situé en dessous de la diagonale ($\vartheta_\alpha^2 > \vartheta_\beta^2$) sur le spectre HYSCORE et notés **1'**. L'analyse quadratique de ces signaux est faite à τ = 204 ns puisque c'est à cette valeur de τ que ces couplages sont le mieux observés.

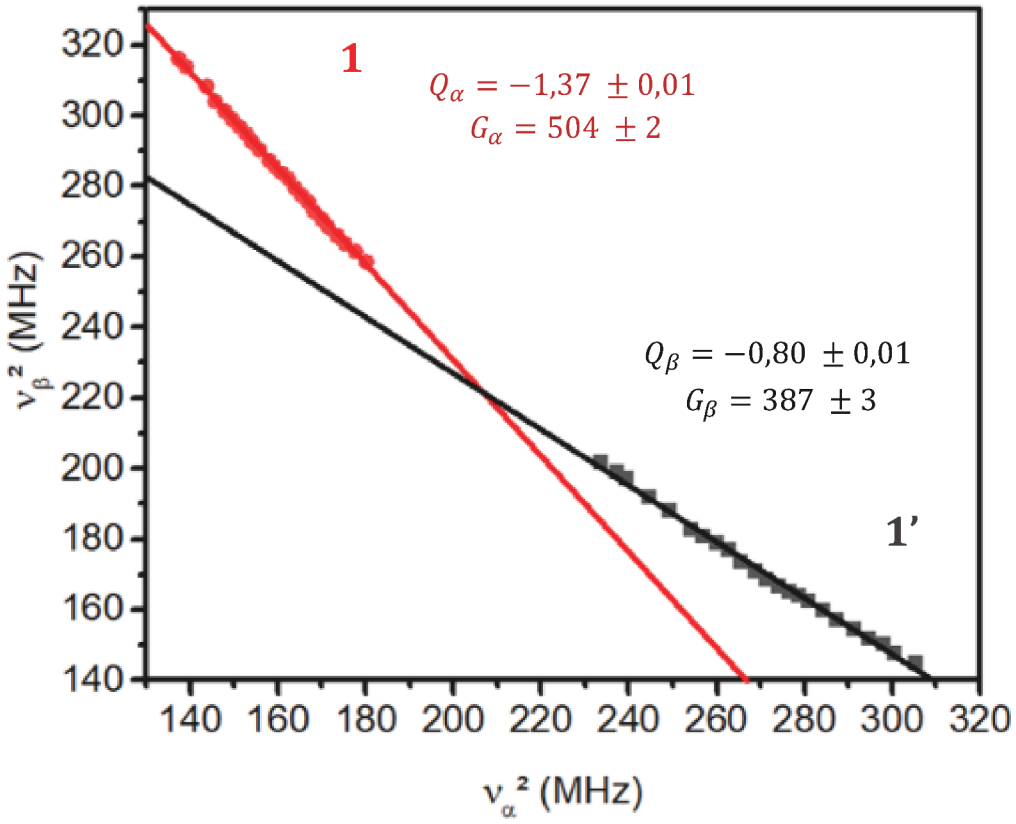


Figure V. 20 : Représentation quadratique des points expérimentaux pris sur les maxima de la crête des pics de corrélation présentés dans la figure V. 17 (A) pour les signaux 1-1'. En rouge sont les points représentant les maxima des pics du signal 1 et en noir ceux du signal 1'.

Une droite peut être ajustée sur les points relevés sur **1** ou **1'**. Ceci indique qu'ils sont associés à un groupe de protons faiblement couplés noté H_2. Les valeurs de (a_{iso} ; T) données en MHz déterminées sont (a_{iso} ; T) : $\mp 3{,}45 \pm 0{,}31$ pour la corrélation 1 et $\pm 3{,}10 \pm 0{,}31$ pour la corrélation 1' pour τ = 204 ns. Compte tenu de la symétrie du signal HYSCORE par rapport à la diagonale, seule l'analyse de **1** ou **1'** aurait été suffisante pour attribuer ce signal à un groupe de protons. Il est néanmoins intéressant de constater que les signaux **1, 1'** ne sont pas alignés bien qu'ils soient issus du même groupe de protons. Ceci est dû à plusieurs facteurs. Premièrement cela peut être dû à une anisotropie du signal. En effet le paramètre d'anisotropie T est responsable de l'élongation des pics parallèlement à l'antidiagonale. Il influence également l'amplitude de la projection des arcs sur la diagonale (voir chapitre Matériels et Méthodes II.5.3). Deuxièmement cet écart est aussi dû à une contrainte matérielle. En effet, des pics de corrélation théoriquement symétriques par rapport à la diagonale peuvent apparaitre asymétriques. Ceci peut s'expliquer par la non-idéalité des impulsions utilisées dans les expériences. Toutefois, les coefficients $Q_{\alpha(\beta)}$ et de $G_{\alpha(\beta)}$,

respectivement coefficient directeur et ordonnée à l'origine des droites obtenues par l'analyse quadratique présentées en figure V.19 pour **2-3** et **2'-3'** sont égaux à $Q_\alpha = -1{,}37, G_\alpha = 504\ \mathrm{MHz}^2, Q_\beta = -0{,}80$ et $G_\beta = 387\ \mathrm{MHz}^2$. Ils sont de plus liés par $Q_\alpha = \frac{1}{Q_\beta}$ et $G_\alpha = -Q_\alpha G_\beta$. Ainsi on constate que ces relations sont vérifiées confirmant que 1 et 1' sont associés au même couplage.

A partir de l'analyse quadratique on calcule les valeurs de A_{iso} et T ainsi que $A_\perp$ et $A_{//}$ pour les couplages précédents. Ces données sont reprises dans le tableau V.8.

Couplages	Valeur de τ (ns)	Constantes de couplage		$A_\perp$ (MHz)	$A_{//}$ (MHz)
		A_{iso} (MHz)	T (MHz)		
Couplage 1-1'	204	∓ 3,5	± 0,3	3,8	2,8
		± 3,1	± 0,31	2,8	3,7
Couplage 2'-3'	136	∓ 6,7	± 5,5	12,2	4,3
		± 1,2	± 5,5	4,3	12,2

Tableau V.8 : Constantes de couplage hyperfin déterminées par l'analyse quadratique des signaux protons mesurés par HYSCORE reproduite en figure V. 8.

On constate avec le tableau V.8 et de l'étude menée par Seif-Eddine et al.[149,150] que les valeurs de A_{iso} présentées sont en accord compte tenu un couplage entre la ménasemiquinone et les protons du groupe méthylique de la ménasemiquinone (voir la discussion).

V.2.2 - Analyses HYSCORE effectuées dans D_2O

Pour identifier d'éventuels protons échangeables parmi ceux à l'origine des signaux détectés sur les spectres HYSCORE, des études ont été réalisées sur un échantillon de ForCE 1 préparé dans D_2O selon le même protocole de culture/purification que les échantillons préparés dans H_2O, dont le potentiel a été stabilisé à - 41 mV à pH = 6,0.

V.2.2.1 – Analyses HYSCORE

La fréquence de Larmor du deutérium étant ≈ 6,5 fois plus faible que celle du proton, la disparition des signaux des protons échangeables autour de la fréquence de Larmor des protons ($\vartheta_I^H \approx 15\ MHz$) devrait être visible de manière concomitante à l'apparition de ceux du deutérium dans la région du spectre proche de $\vartheta_I^D \approx 3\ MHz$.

La figure V.21 compare le signal RPE CW de l'échantillon de ForCE 1 équilibré dans H_2O (en noir), et celui de l'échantillon équilibré dans D_2O (en rouge).

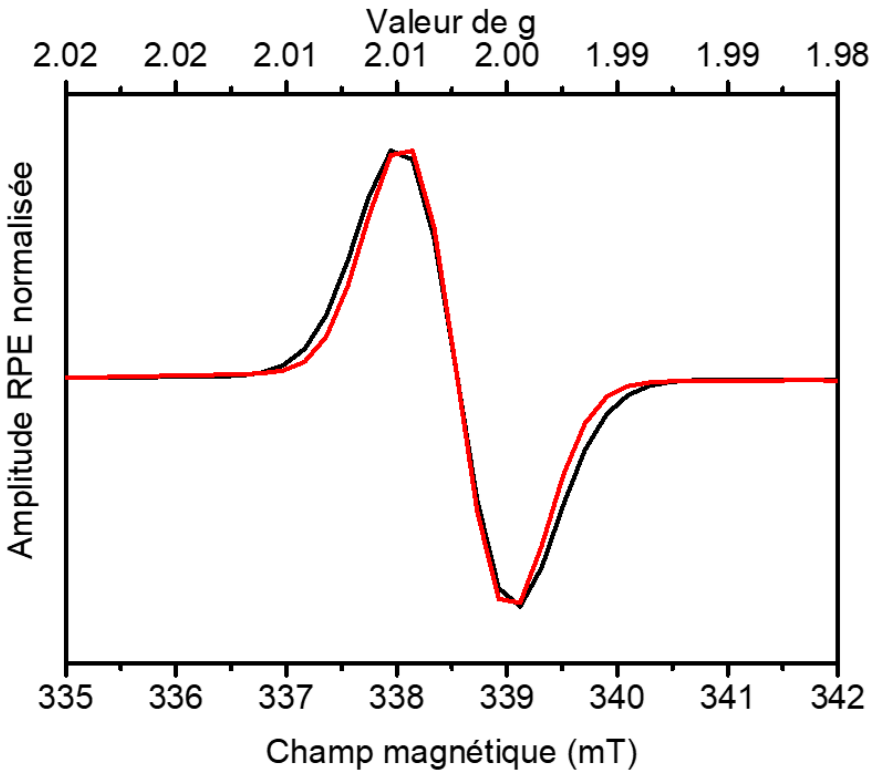


Figure V.21 : Spectres RPE de la ménasemiquinone dans ForCE 1 à pH = 6,0 équilibrée dans H_2O (en noir) et dans D_2O (en rouge). Paramètres expérimentaux : température : 50 K, fréquence micro-onde : 9,48 GHz, puissance micro-onde : 10 mW, amplitude de modulation : 10 G à 100 kHz.

La figure V.21 montre une légère diminution de la largeur de raie pic-à-pic témoignant de couplages hyperfins non-résolus de plus faibles intensités dans l'échantillon D_2O par rapport à celui équilibré dans H_2O. Ceci est caractéristique de la présence d'au moins un proton échangeable dans l'environnement de la ménasemiquinone. Ces couplages diminuent d'un facteur $\frac{\gamma^H}{\gamma^D} = 6{,}5$, avec γ^H et γ^D respectivement les rapports gyromagnétiques du proton et du deutérium, conduisant à la diminution de la largeur de la raie observée.

Des analyses HYSCORE ont alors été menées sur l'échantillon stabilisé dans D_2O. La figure V.22 montre les quadrants (+ +) des spectres HYSCORE (figure V.22 A, D, G), ainsi qu'un zoom sur la partie basses fréquences (B, E, H) et hautes fréquences (figure V.22 C, F, I) à et τ = 204 ns (figure V.22 A, B, C) et à τ = 136 ns (figure V.22 D, E et F), ainsi que leur comparaison avec ceux enregistrés dans H_2O à τ = 204 ns (figure V.22 G, H, I).

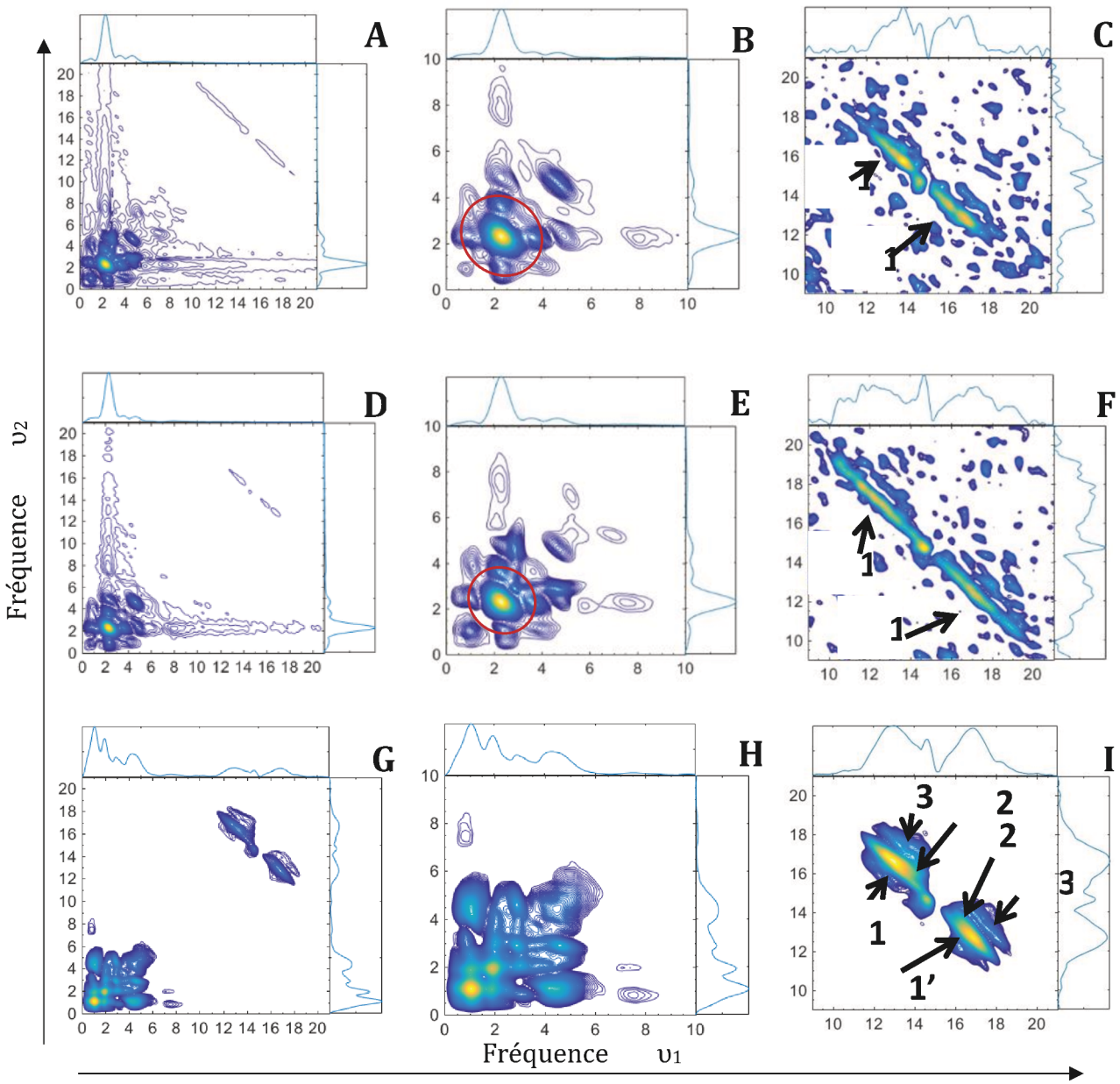


Figure V.22 : Quadrants (+ +) des spectres HYSCORE de la MSK dans ForCE 1 (A, D, G), ainsi qu'un zoom sur la partie basses fréquences (B, E, H) et hautes fréquences (C, F, I) enregistrés dans D_2O à τ = 204 ns (A, B, C) et à τ = 136 ns (D, E et F), ainsi que leurs comparaison avec ceux enregistrés dans H_2O τ = 204 ns (G, H, I). En rouge sont entourés les signaux provenant du couplage hyperfin entre la ménasemiquinone et un noyau de deutérium. Paramètres expérimentaux : spectres (A, B, C, D, E, F, G, H, I) : 50 K, pH = 6,0, potentiel : - 41 mV, puissance micro-onde : 0,15 µW, impulsion π/2 = 12 ns, fréquence micro-onde : 9,70 GHz (A, B, C, D, E, F), 9,68 GHz (G, H, I), champ magnétique : 346 mT (A, B, C, D, E, F), 345 mT (G, H, I), accumulation : n = 22 (A, B, C), n = 23 (D, E, F).

Autour de $\vartheta_I^H \approx 15$ MHz, on constate qu'à τ = 136 ns et τ = 204 ns les signaux associés aux protons et identifiés précédemment comme **2, 3** et **2', 3'** (figure V.22 C, F, I) ont disparu. De

plus les signaux protons notés **1** et **1'** sont toujours présents. L'apparition de signaux dans la région $\vartheta_I^D = \frac{15}{6,5} \approx 2,3\ MHz$ où sont attendues les signatures des noyaux de spin nucléaire I = 1 (tels que les noyaux de deutérium) est montrée en rouge sur la figure V.22 B, E. Ces signaux sont attribués à l'interaction avec un noyau de deutérium.

V.2.2.2 – Analyses quadratiques

La figure V.23 montre en noir l'analyse quadratique des protons **1** ($\vartheta_\alpha^2 < \vartheta_\beta^2$) et en rouge **1'** ($\vartheta_\alpha^2 > \vartheta_\beta^2$) dans D_2O à τ = 136 ns, valeur pour laquelle les signaux sont le mieux visibles.

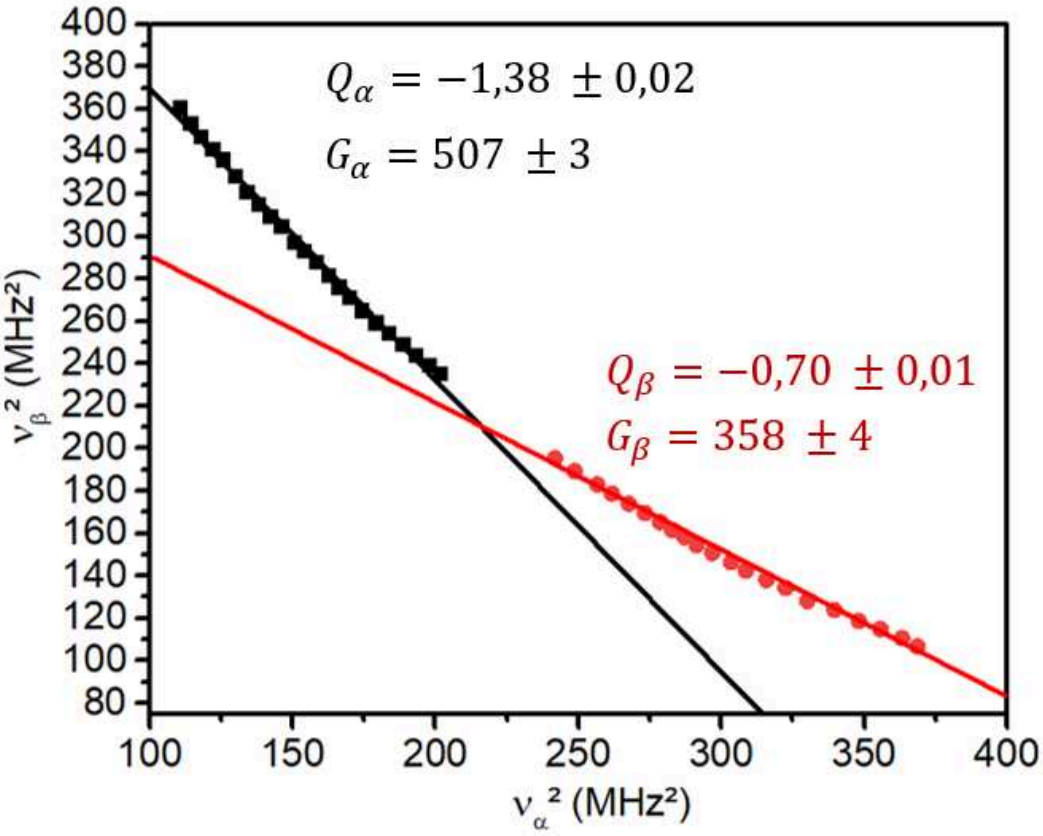


*Figure V.23 : Représentation quadratique des fréquences relevées sur les maxima de la crête des pics de corrélation présentés dans la figure V. 22 (C) pour les signaux **1-1'**. En rouge sont les points représentant les maxima des pics du signal **1** et en noir ceux du signal **1'**.*

On constate que les relations entre $Q_{\alpha(\beta)}$ et de $G_{\alpha(\beta)}$ sont encore vérifiées avec une erreur inférieure à 10 % par rapport aux résultats théoriques. De plus ces signaux étant toujours visible dans le D_2O, on peut raisonnablement conclure qu'ils proviennent d'un groupe de protons non échangeables.

On remarque aussi que les signaux **1** et **1'** proviennent du même groupe de proton. On constate aussi que les valeurs de $Q_{\alpha(\beta)}$ et de $G_{\alpha(\beta)}$ sont similaires à celles déterminées dans H_2O (tableau V.7).

Solvants	Q_α	Q_β	G_α (MHz^2)	G_β (MHz^2)
H_2O	-1,37	-0,80	504	387
D_2O	-1,38	-0,70	507	358

*Tableau V.9 : Comparaison des valeurs des pentes $Q_{\alpha(\beta)}$ et d'ordonnées à l'origine $G_{\alpha(\beta)}$ déterminées à partir de l'analyse quadratique des pics **1-1'** du spectre HYSCORE de la MSK préparée dans H_2O ou D_2O.*

On constate que la relation $Q_\alpha = \frac{1}{Q_\beta}$ et $G_\alpha = -Q_\alpha G_\beta$ est vérifiée, confirmant que **1** et **1'** sont associés au même couplage. L'analyse quadratique de ces signaux en utilisant le même protocole qu'au paragraphe V.2.1.3. permet la détermination des valeurs de (A_{iso} ; T) données en MHz $\mp 4{,}9 \pm 2{,}6$ et $\pm 2{,}3 \pm 2{,}6$ pour τ = 136 ns (tableau V.10).

Couplages	Valeur de τ (ns)	Constantes de couplage		$A_\perp$ (MHz)	$A_{//}$ (MHz)
		A_{iso} (MHz)	T (MHz)		
Couplage 1-1'	136	∓ 4,9	± 2,6	7,5	0,3
		± 2,3	± 2,6	0,4	7,5

Tableau V.10 : Constantes de couplage hyperfin déterminées par l'analyse quadratique des signaux protons mesurés par HYSCORE reproduite en figure V. 23.

V.3 – Analyse par spectroscopie ESEEM à 4 impulsions

V.3.1 – Etudes ESEEM à 4 impulsions dans H_2O

Les expériences de 4-p ESEEM ont été menées dans le but d'observer les pics de combinaison des protons dans la région spectrale située à proximité de $2\vartheta_I^H$ avec une résolution améliorée par rapport aux spectres ESEEM à 2 impulsions. Ces expériences sont particulièrement adaptées à la détection des couplages caractérisés par une forte anisotropie telle que celle mesurée pour les noyaux de ^1H (tableau V.8). Elles permettent donc une estimation directe de la valeur de l'anisotropie T du couplage (Matériels et Méthode paragraphe V.5.2). La figure V.24 présente un zoom sur la partie hautes fréquences de 25 MHz à 35 MHz du spectre ESEEM

à 4 impulsions où les signaux provenant des protons sont visibles dans l'échantillon équilibré dans H_2O pour des valeurs de τ comprises entre 98 ns et 178 ns.

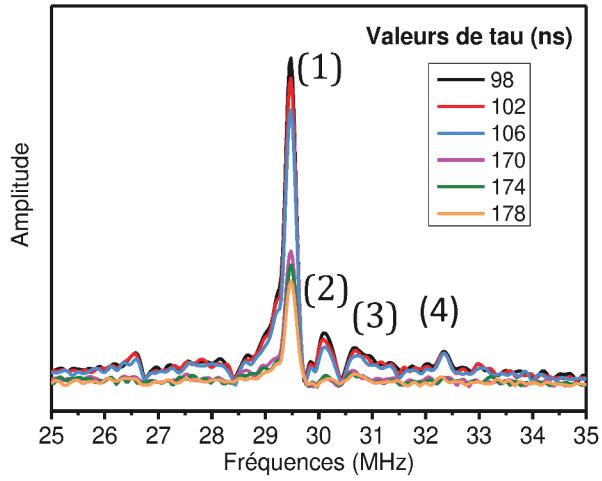


Figure V.24 : Spectres de 4-p ESEEM enregistrés et dans H_2O à différentes valeurs de τ. Conditions expérimentales : spectre (B) potentiel : -50 mV, impulsion π/2 = 12 ns, fréquence micro-onde : 9,71 GHz, champ magnétique : 346 mT, puissance micro-onde : 0,15 µW, incrément en temps : 4 ns, accumulation : n = 55. Température : 50 K, pH = 6,0.

On peut voir plusieurs pics dans la région autour de $2\vartheta_I^H \approx 28 - 30$ MHz, notés (1), (2), (3) et (4), caractéristiques de couplage avec des protons. On constate également la présence d'au moins trois groupes de protons. Les différences de fréquence entre le pic majoritaire situé à $2\vartheta_I^H$, noté (1), et les pics, (2), (3) et (4), sont notés $\Delta\vartheta_I^H$ et donnés dans le tableau V.11. La détermination de ces écarts permet de calculer la valeur pour la constante de couplage dipolaire T associée. Les valeurs calculées sont récapitulées dans le tableau V.11 (chapitre Matériels et Méthodes, équation 79).

Pics	$\Delta\upsilon_i$ (MHz)	T (MHz)
(2)	0,6	4,1
(3)	1,2	5,6
(4)	2,9	8,7

Tableau V.11 : Récapitulatif des écarts de fréquence entre le pic situé à $2\vartheta_I^H$ et les pics satellite notés (2), (3) et (4). Les valeurs de T calculées à partir de ces derniers sont également données.

On constate que les valeurs de T obtenues depuis le spectre ESEEM à 4 impulsions correspondent à celles calculées à partir de l'analyse quadratique pour les corrélations **2-3** et **2'-3'**. En effet, dans le cas du couplage **2'-3'** étudié plus haut on retrouve pour $\tau = 204$ ns, $\mathrm{T} = 4{,}1$ MHz et pour $\tau = 136$ ns, $\mathrm{T} = 5{,}5$ MHz (tableau V.8). La présence de deux signaux ((1) et (2)) sur les spectres ESEEM à 4 impulsions alors que l'attribution HYSCORE du couplage 2'-3' est faite à un unique proton couplé de manière très anisotrope peut s'expliquer par un recouvrement des signaux HYSCORE de deux noyaux ayant des constantes A_{iso} et T significativement différentes (figure V.24). Enfin le signal (4) est plus délicat à analyser. En effet ce dernier et le signal (4') apparaissent comme symétriques par rapport à la position $2\vartheta_I^H \approx 29{,}5$ MHz, ce comportement n'étant pas celui attendu et observé pour les couplages avec des protons, comme le montrent les analyses des autres pics. De plus, les expériences de ESEEM 4-p donnent accès aux pics de combinaisons des fréquences fondamentales ω_α et ω_β des noyaux couplés ainsi qu'aux combinaisons $\omega_\alpha + \omega_\beta$ et aux combinaisons $|\omega_\alpha - \omega_\beta|$ de ces fréquences. Il est donc possible que les pics (4) et (4') proviennent de pics de combinaison. Toutefois, on ne peut pas exclure totalement que ce soit un pic lié à un couplage avec un autre groupe de protons dont l'anisotropie importante le rendrait indétectable sur le spectre HYSCORE.

V.3.2 – Etudes ESEEM à 4 impulsions dans D_2O

Des expériences ESEEM à 4 impulsions ont également été réalisées dans un échantillon équilibré dans D_2O. Ces dernières ont pour but de déterminer le caractère échangeable des

protons associés aux résonances détectées en ESEEM à 4 impulsions. La figure V.25 montre un zoom sur la partie haute fréquence de 25 MHz à 35 MHz où les pics de combinaison des protons sont visibles pour l'échantillon équilibré dans H_2O (A) et dans D_2O (B).

On constate ici que les signaux (2) et (3) dans l'échantillon préparé dans H_2O (figure V.25 A)

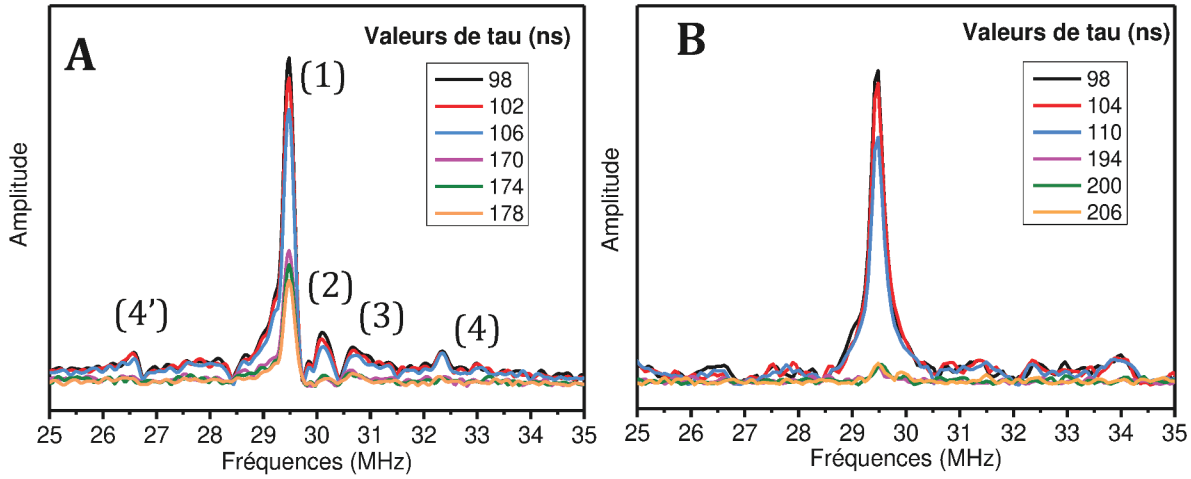


Figure V.25 : Comparaison de spectres d'ESEEM à 4 impulsions de la ménasemiquinone dans ForCE 1 enregistrés dans H_2O (A) et dans D_2O (B) à différentes valeurs de τ . Conditions expérimentales : spectre (B) potentiel : - 41 mV (A), - 50 mV (B), impulsion $\pi/2$ = 12 ns, fréquence micro-onde : 9,70 GHz (A), 9,71 GHz (B), champ magnétique : 346 mT, incrément en temps : 6 ns (A), 4 ns (B), accumulation : n = 67 (A), n = 55 (B). Température : 50 K, pH = 6,0.

ne sont plus présents sur le spectre de l'échantillon équilibré dans D_2O (figure V.25 B). Ceci montre bien que ces signaux proviennent de protons échangeables situés dans l'environnement de la quinone. Cette expérience renforce l'attribution des signaux (2) et (3) au(x) proton(s) échangeables qui produisent ces pics de corrélation 2, 3 et 2', 3' dans les spectres HYSCORE de la ménasemiquinone (figure V.17 et V.18).

VI - Discussion

VI.1 – Identification par RPE d'une ménasemiquinone stabilisée dans ForCE 1

L'attribution de l'espèce présente dans les ForCEs à une ménaquinone a été faite sur la base de la forme du signal, des valeurs de g (g_1 = 2,0054, g_2 = 2,0051, g_3 = 2,0023) ainsi que par le titrage redox de cette espèce montrant une espèce de bas potentiel (E_m = -60 mV à pH = 6,0

et E_m = -165 mV à pH = 7,5). De plus, la comparaison avec les études menées par Grimaldi et al.[146,151], Dorlet et al.[152], MacMillan et al.[153], Plato et al.[154], Isaacson et al.[155], Gardiner et al.[156] montre que la forme spectrale ainsi que les valeurs de g du signal observées dans les ForCEs sont cohérentes avec son attribution à une espèce de type quinone. Le tableau V.12 compare ces résultats.

Organismes	*E. coli*		Epinard		*Rb. Sphaeroides*		*Rps. Viridis*
Enzymes	Nar	Cyt bo	PSII	PSI	C. R.		C. R.
Type quinone	MSQ	USQ Q_H	PlastoSQ Q_A	PhylloSQ A_1	USQ Q_A	USQ Q_B	MSK Q_A
g_x	2,0061	2,0059	2,0066	2,0061	2,0066	2,0063	2,006
g_y	2,0051	2,0054	2,0051	2,005	2,0054	2,0053	2,0049
g_z	2,0023	2,0022	2,0022	2,0021	2,0022	2,0021	2,0022
Références	Grimaldi et al. **2005**	Grimaldi et al. **2003**	Dorlet et al. **2000**	MacMillan et al. **1997**	Burghaus et al. **1993**	Isaacson et al. **1995**	Gardiner et al. **1999**

Tableau V.12 : Valeurs du tenseur $\tilde{g}$ pour différentes quinones présentes dans différents organismes.

Il n'est pas possible de distinguer sans ambiguïté une ménaquinone d'un autre type de quinones (ubiquinone, déméthylménaquinone, …) par la simple comparaison des valeurs de g car elles sont structuralement suffisamment proches pour que les différences n'influent pas de manière significative sur ces dernières. Néanmoins, une distinction peut être faite via le couplage avec les protons notés β-CH_2 présents sur la chaine isoprényle. Ceci est mis en évidence dans l'étude menée par Seif-Eddine et al[150]. Dans cette étude, il est montré que les quinones sont réparties en deux classes, les quinones de type I et les quinones de type II. Ces classes représentent respectivement les quinones ayant un groupe méthyle en position 2 comme les ménaquinones, les phylloquinones et les ubiquinones et celles n'en ayant pas comme les plastoquinones et les déméthylmenaquinones.

Les quinones de classe I (ayant un groupe méthyle) sont caractérisées par l'existence dans la conformation de plus basse énergie d'un couplage avec les protons β-CH_2 de l'ordre de 1 MHz à 4 MHz. Pour les quinones de classe II (ayant un hydrogène à la place du méthyle), ce couplage est de l'ordre de 7 MHz. Dans le cas des ForCEs, le couplage A_{iso} calculé pour les protons non échangeables, noté 1-1' (voir tableau V.8) est de l'ordre de 3 MHz à 4 MHz, ce qui correspond bien à une espèce de type quinone de classe I.

Il est intéressant de noter que lors des titrages à pH = 6,0 et 7,5 effectués sur ForCE 1, un potentiel moyen E_m (MK/MKH_2) inférieur de 55 mV par rapport au pool de ménaquinone a été observé dans les deux cas. Un tel décalage peut être expliqué par une stabilisation de l'espèce ménaquinone (espèce oxydée) plus grande d'un facteur ~ 80 par rapport à l'espèce ménaquinol (espèce réduite). Cette situation est similaire à celle décrite par De Causmaeker et al.[157] sur l'étude de la plastosemiquinone présente dans le photosystème II observant dans leur cas un écart de 50 mV.

VI.2 – Nombre et nature des noyaux d'azote couplés à la ménasemiquinone

Concernant le nombre de noyaux d'azote qui contribuent au spectre HYSCORE, un premier noyau N_1 en condition de compensation a été détecté. Les fréquences quadripolaires pures peuvent directement être lues sur le spectre HYSCORE, on a alors pour ce dernier $\vartheta_2 \approx 1{,}10\ \mathrm{MHz}\ (2), \vartheta_3 \approx\ 1{,}90\ \mathrm{MHz}\ (3), \vartheta_4 \approx 2{,}90\ \mathrm{MHz}\ (4)$. Le deuxième noyau d'azote, N_2, également en condition de compensation est repéré avec les fréquences quadripolaires suivantes : $\vartheta_1 \approx 0{,}80\ \mathrm{MHz}\ (1), \vartheta_2 \approx 1{,}10\ \mathrm{MHz}\ (2), \vartheta_3 \approx\ 1{,}90\ \mathrm{MHz}\ (3)$. Ce dernier a été plus délicat à étudier compte tenu du recouvrement partiel des signaux avec ceux du noyau N_1. Finalement le noyau additionnel observé via le pic à $\vartheta_6 \approx 0{,}55\ \mathrm{MHz}\ (6)$ est celui pour lequel nous avons le moins de confiance quant à son existence. Ce pic est observé en 3p-ESEEM et en HYSCORE mais pas à toutes les valeurs de τ et pas dans toutes les préparations compte tenu du recouvrement total de ce dernier par des signaux plus intenses. On peut néanmoins faire l'hypothèse qu'il s'agit d'un noyau d'azote n'étant pas en condition de compensation. Il est intéressant de noter que dans la littérature des études rapportent des noyaux d'azote couplés à une quinone dont une de leurs fréquences quadripolaires est $\vartheta_6 \approx 0{,}50\ \mathrm{MHz}$ comme par exemple les études menées par A. P. Spoyalov et al.[158], J. M. Peloquin et al.[159] ou encore J. Hanley et al.[153]. Ceci ajoute un peu plus de crédit à l'hypothèse concernant l'existence d'un troisième couplage avec un noyau de ^{14}N.

Ces indéterminations sur le nombre de noyaux d'azote couplés à la ménasemiquinone dans ForCE 1 peuvent être levées par des expériences d'enrichissement isotopique de la protéine à l'azote 15 (^{15}N). En effet, le spin nucléaire de ^{15}N étant de $I = {}^1/_2$, on a une réduction du nombre de transition et donc une réduction du nombre de pics observables. De plus, il n'y a

plus d'interaction quadripolaire détectable. Les spectres HYSCORE et ESEEM 3-p sont ainsi plus faciles à analyser. Les noyaux en condition de compensation (^{14}N) se retrouvent dans ce qui est appelé la « matching condition » (^{15}N), où il ne reste alors sur le spectre que deux fréquences corrélant ensemble pour chaque noyau d'azote, au lieu de quatre pour le noyau ^{14}N dans le cas étudié ici (voir étude de Grimaldi et al.[160]). Ces fréquences sont attendues à $\vartheta \approx 2\vartheta_I^{15_N}$ et $\vartheta \approx \frac{3T}{4}$ MHz. Ceci permet de pouvoir compter plus facilement les noyaux d'azote détectables dans la poche à quinone et étant couplés avec celle-ci. Ces expériences sont en cours de réalisation au laboratoire.

La figure V.27 montre une représentation de κ (constante quadripolaire) en fonction de η (paramètre d'asymétrie) de plusieurs études portant uniquement sur des quinones[153,158,159,161–165], en noir, dont les κ et η ont été déterminés par spectroscopie ESEEM et HYSCORE. En rouge sont montrés les noyaux d'azote ^{14}N (N_1 et N_2) en interaction avec la ménasemiquinone identifiés dans ForCE 1 à partir de l'analyse du spectre HYSCORE mesuré à τ = 204 ns et en orange à τ = 136 ns.

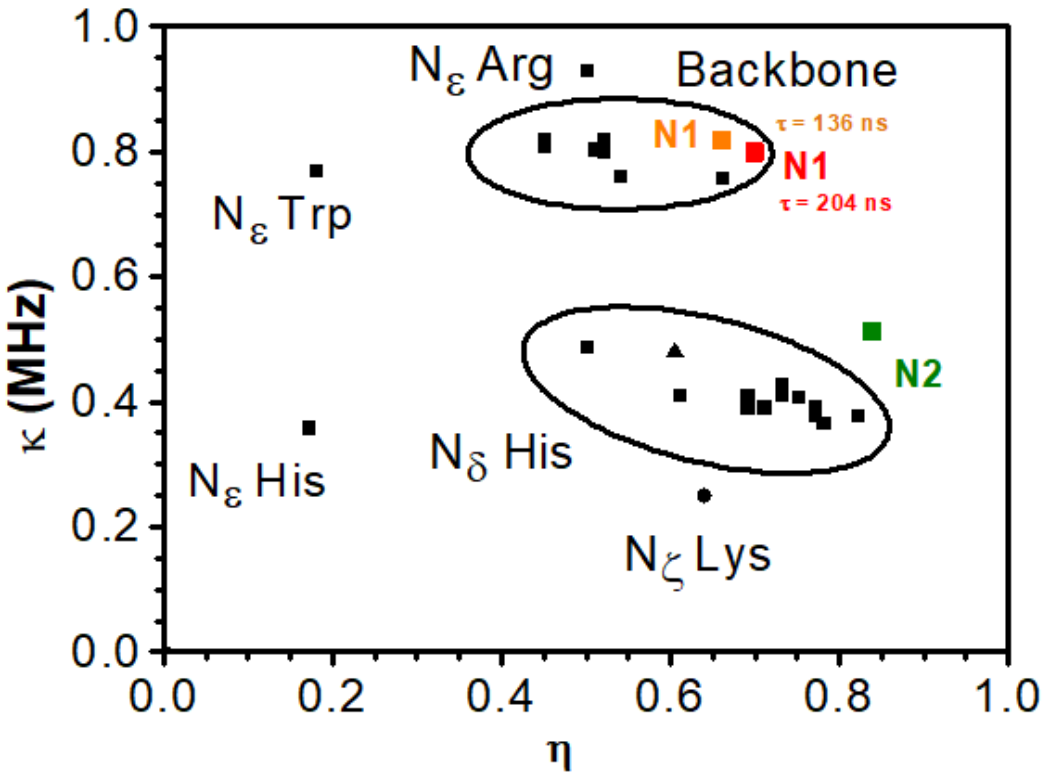


Figure V.26 : Représentation des κ (constante quadripolaire) en fonction de η (paramètre d'asymétrie) permettant à partir des données issues de la littérature de faire une attribution des noyaux d'azote présents dans l'environnement proche de la ménasemiquinone étudiée dans ForCE 1.

La figure V.26 permet d'attribuer le noyau N_1 à un noyau d'azote du squelette protéique. Le noyau N_2 est proche de la zone d'attribution des noyaux d'azote N_δ des histidines, on peut donc faire l'hypothèse raisonnable qu'il proviendrait de ce type d'atome. Cependant, il est important de noter que c'est une méthode d'attribution empirique provenant de la comparaison du système étudié ici avec d'autres systèmes de la littérature. Il convient donc d'être prudent quant à ce qu'on pourrait conclure avec un tel diagramme.

VI.3 - Etude des couplages avec les protons

Le premier groupe correspondant aux signaux **1** et **1'** est attribué aux protons non échangeables de la ménasequinone à savoir ceux du groupement méthyle en position 2 ainsi que ceux des protons de la chaine vinylique en position 3. La figure V.26 montre ces positions et les groupes de protons mentionnés dans cette attribution.

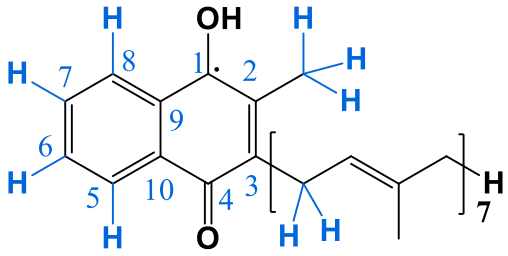


Figure V.27 : Représentation de l'intermédiaire ménasemiquinone avec en bleu les quatre différents groupes de protons non échangeables.

Le deuxième groupe correspondant aux signaux 2, 3 et 2', 3' est attribué à un groupe de protons échangeables. En effet, les analyses HYSCORE de la ménasemiquinone dans ForCE 1 ont montré que ces mêmes couplages avaient disparu des spectres enregistrés dans D_2O. Les valeurs de A_{iso} déterminées dans ForCEs pour les protons échangeables sont compris dans une large gamme de valeurs (entre 1,1 et 6,7 MHz). En regard des études menées par Seif-Eddine et al.[150] et Grimaldi et al.[160], on ne peut distinguer entre un groupe de protons échangeables et non-échangeables. Toutefois, la valeur de T déterminée dans l'étude des ForCEs, comprise entre 4,0 et 5,5 MHz, est compatible avec celles attribuées dans ces deux études à un groupe de protons échangeables, T = 5,73 MHz dans Grimaldi et al.[160] et T = 5,6 MHz dans Seif-Eddine et al.[150]. De plus, ce groupe est attribué dans les deux études à une liaison hydrogène avec le groupement carbonyle de la ménaquinone. Il est donc raisonnable d'attribuer les couplages

associés au signaux (2,3) et (2',3') à des groupes de protons engagés dans des liaisons hydrogène dans la poche à quinone.

L'analyse quadratique des signaux des protons non échangeables a donné les valeurs de A_{iso} présentées dans le tableau 8. Dans l'étude menée par Seif-Eddine et al.[150] on constate que la constante de couplage A_{iso} est de l'ordre d'environ A_{iso} = 5,4 MHz pour les protons méthyliques et comprise entre 11 et 18 MHz pour les protons de la chaine latérale. Dans l'étude menée par Grimaldi et al.[160] on constate que pour ces mêmes groupes les constantes de couplage sont respectivement comprises entre 5,5 et 6,8 MHz et entre 1,0 et 2,1 MHz. On remarque alors que les valeurs de couplage déterminées dans l'étude menée sur ForCE 1 (≈ 3,3 MHz) est compatible avec un couplage entre le ménasemiquinone et les protons méthyliques. Toutefois, on ne peut pas exclure complètement que ce couplage provienne des protons présents sur le cycle benzénique de la ménasemiquinone. En effet, les valeurs de A_{iso} calculées par Seif-Eddine et al.[5] sont comprises entre 0,2 et 2,6 MHz, ce qui est proche de la valeur obtenue dans le cas de la ménasemiquinone dans ForCE 1.

Enfin, aux vues des similarités observées dans cette étude entre ForCE 1 et ForCE 2 en termes de valeurs de g, de forme de signaux, de propriétés de relaxation, on peut raisonnablement penser que ForCE 1 et ForCE 2 possèdent toutes deux une poche à quinone stabilisant une MK-7 et que ces dernières sont dans un environnement similaire dans les deux enzymes.

VI.4 – Rôle physiologique

Le fait d'avoir identifié une espèce de type ménaquinone dans les ForCEs soulève plusieurs questions quant à son rôle physiologique. En effet, si la ménasemiquinone est dans un site échangeable alors il doit y avoir une interaction des ForCEs avec la membrane qui héberge le pool de quinones. Si en revanche la ménaquinone est dans un site non échangeable alors la question se pose de savoir quel est l'accepteur final qui va échanger des électrons avec la quinone. Plusieurs interrogations se posent quant aux possibles voies métaboliques dans lesquelles les ForCEs seraient impliquées. Par exemple, interviennent-elles dans le catabolisme des acides organiques, comme le formiate en ce qui nous concerne ? Font-elles partie de la chaine respiratoire de *B. subtilis* quand cette dernière est dans un environnement riche en formiate ? Ou les deux en même temps ? Ces questions font actuellement l'objet d'études au laboratoire.

Chapitre VI

Etude enzymatique menées sur ForCE 1 et ForCE 2

Table des matières

I – Résultats préliminaires. Etude de l'activité formiate oxydoréductase pour ForCE 1 et ForCE 2 : 248

II - Détermination des pH optimum et étude cinétique pour les activités formiate:BV oxydoréductases pour ForCE 1 et ForCE 2 : 248

III - Etude de l'activité enzymatique avec un inhibiteur de quinone : la ménadione : 250

III.1 - Détermination des pH optimums dans ForCE 1 et ForCE 2 251

III.2 - Etude cinétique des activités formiate:ménadione oxydoréductases pour ForCE 1 et ForCE 2 : 253

IV - Etude de la tolérance à l'oxygène : 254

V - Discussion : 254

V.1 - Tolérance à l'oxygène des FDHs 254

V.2 – Efficacité catalytique des ForCEs 256

V.3 – Optimum de pH dans les ForCEs et le lien avec le cycle catalytique 258

Une étude enzymologique et biochimique a été menée pour compléter les analyses biophysiques présentées dans les trois premiers chapitres. Je vais m'intéresser dans cette partie à l'étude des cinétiques enzymatiques pour différents substrats i.e. la détermination des concentrations saturantes et le calcul des constantes catalytique K_M et k_{cat}.

Il est à noter que dans ce chapitre les barres d'erreurs ont été calculées à partir d'expériences réalisées en triplicats techniques.

I – Résultats préliminaires. Etude de l'activité formiate oxydoréductase pour ForCE 1 et ForCE 2 :

Il a été préalablement établi par le Dr. Rodrigo Arias Cartin, que les enzymes ForCEs peuvent oxyder le formiate *in vitro* en présence d'un accepteur artificiel d'électrons, le Benzyl Viologène (BV). Des études enzymatiques sont alors nécessaires pour déterminer les paramètres cinétiques de la réaction formiate : BV oxydoréductase pour définir la concentration minimale à partir de laquelle la vitesse limite est atteinte et ainsi trouver les conditions optimales pour les mesures d'activité.

II - Détermination des pH optimum et étude cinétique des activités formiate/BV oxydoréductase pour ForCE 1 et ForCE 2 :

Le comportement de l'activité formiate : BV oxydoréductase a été étudiée en fonction du pH. La réaction est illustrée en figure VI.1.

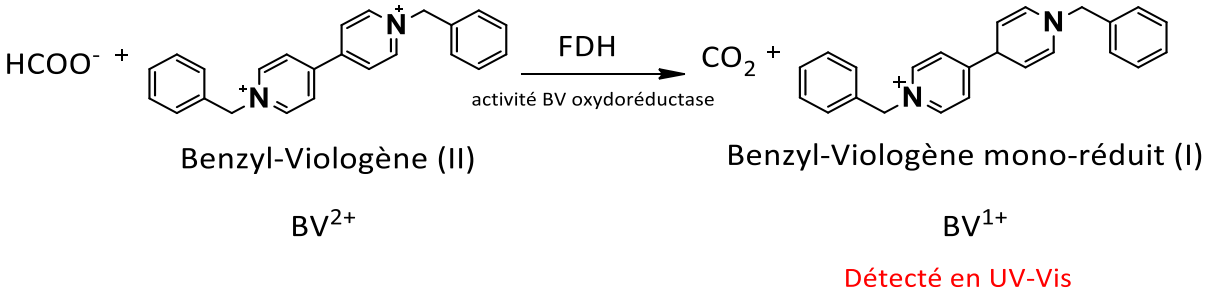


Figure VI.1 : Equation bilan de la réaction d'oxydation du formiate en CO_2 par ForCE 1 et ForCE 2 en présence de Benzyl-Viologène (BV).

Dans un premier temps on va s'intéresser aux optimums de pH des ForCEs puis à la détermination de la concentration saturante en formiate et en BV

La figure VI.2 montre l'évolution du k_{cat} en fonction du pH pour les mesures d'activité formiate : BV oxydoréductase effectuées sur ForCE 1 (A) et ForCE 2 (B).

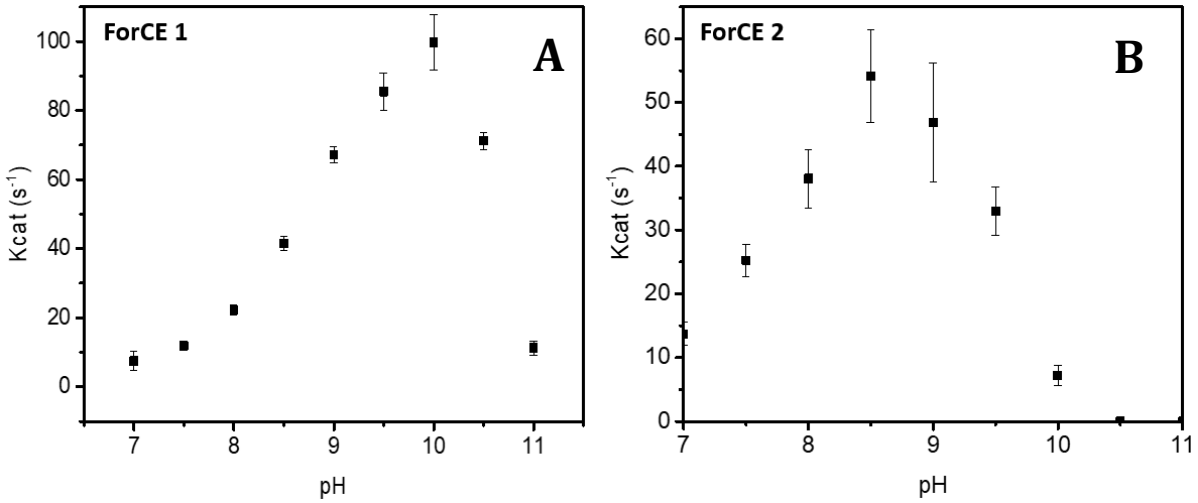


Figure VI.2 : Dépendance en pH du k_{cat} (s^{-1}) pour ForCE 1 (A) et pour ForCE 2 (B).

Pour déterminer la concentration saturante en formiate et en BV, la concentration d'un des substrats doit être fixe (1,75 mM de BV) alors que nous faisons varier la seconde (le formiate) au cours de l'expérience. La figure VI.3 nous montre les études de saturation en formiate effectuées sur ForCE 1 (à gauche) et ForCE 2 (à droite).

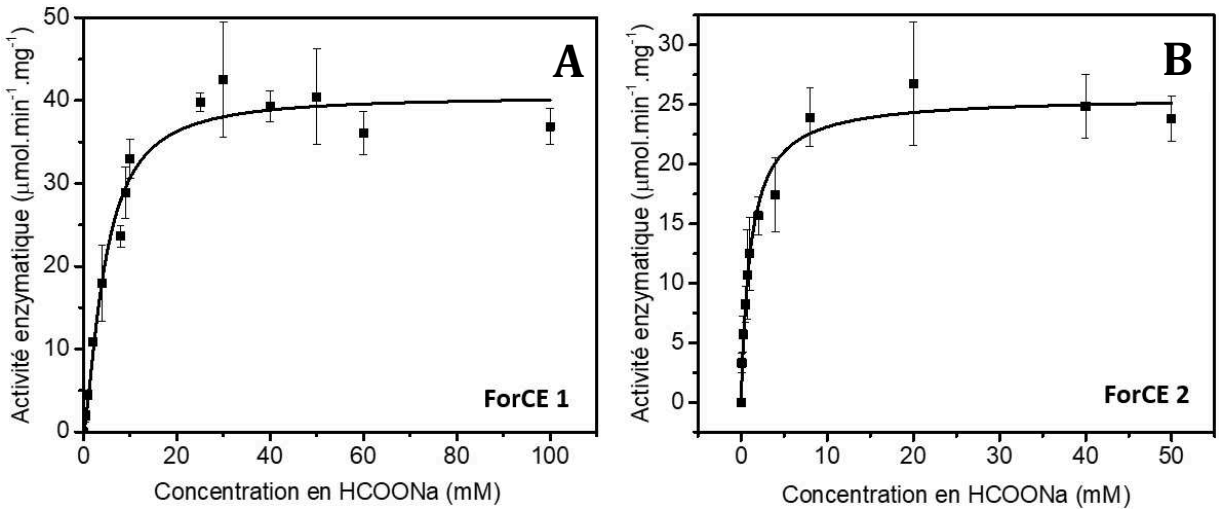


Figure VI.3 : Mesures de l'activité formiate:Benzyl-Viologène (BV) oxydoréductase de ForCE 1 (A) et ForCE 2 (B). Tests d'activité réalisés à pH = 10,0 pour ForCE 1 et pH = 8,5 pour ForCE 2. Les données expérimentales ont été ajustées à l'aide d'une courbe de Michaelis Menten (Eq. 34 du Matériels et Méthodes).

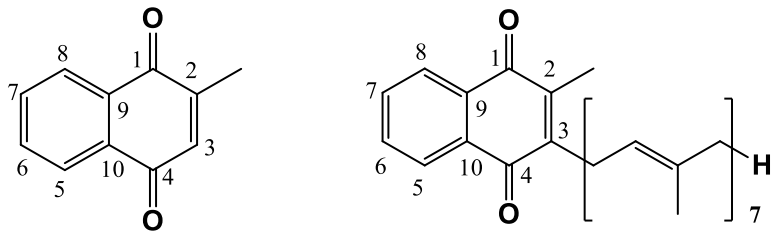
Nous pouvons déterminer à partir de la figure VI.3, le k_{cat} et le K_M de ForCE 1 et ForCE 2 pour le formiate. Le tableau VI.1 récapitule ces données.

FDH	$K_M^{formiate}\ (mM)$	$k_{cat}\ (s^{-1})$	V_{max}	pH	$k_{cat}/K_M\ (s^{-1}.mM^{-1})$
ForCE 1	5,1 ± 0,9	96,1 ± 4	43,7 ± 1,9	10	18,8 ± 4,1
ForCE 2	1,1 ± 0,1	55,8 ± 1,6	26,6 ± 0,8	8,5	50,7± 6,7

Tableau VI.1 : Constantes catalytiques enzymatiques pour la réaction d'oxydation du formiate par ForCE 1, et ForCE 2 en utilisant le Benzyl-Viologène (BV) comme accepteur final d'électrons. Vmax donnés en µmol.min^{-1}.mg^{-1}.

III - Etude de l'activité enzymatique avec un inhibiteur de quinone : la ménadione :

Il a été vu dans les chapitres précédents que les enzymes ForCE 1 et ForCE 2 ont la capacité remarquable de stabiliser une ménasemiquinone 7. L'hypothèse que je formule est qu'il s'agit du partenaire redox physiologique au complexe enzymatique. Dans le but de vérifier cette hypothèse, j'ai entrepris la détermination de la concentration saturante en ménadione, un homologue structural des quinones contenant le bicycle naphtoquinone ainsi que le groupement méthyl sur la position 5, mais n'ayant pas de chaine latérale isoprénique (figure VI.4).



Ménadione Ménaquinone 7

Figure VI.4 : Structure de la ménadione homologue de quinone utilisé dans les expériences de cinétique présentées dans ce chapitre et de la ménaquinone 7.

III.1 - Détermination des pH optimums dans ForCE 1 et ForCE 2

Comme précédemment, avant de réaliser l'étude cinétique de la réaction, on doit déterminer le pH optimal de cette dernière. La figure VI.5 représente l'équation du bilan global de cette réaction.

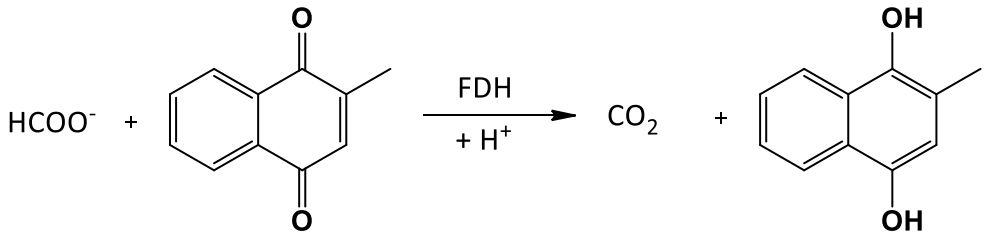


Figure VI.5 : Equation bilan de la réaction d'oxydation du formiate en CO_2 par ForCE 1 et ForCE 2 en présence de ménadione (analogue du substrat physiologique).

La figure VI.6 présente ainsi le k_{cat} en fonction du pH pour ForCE 1 (voir le chapitre Matériels et Méthodes pour le protocole détaillé).

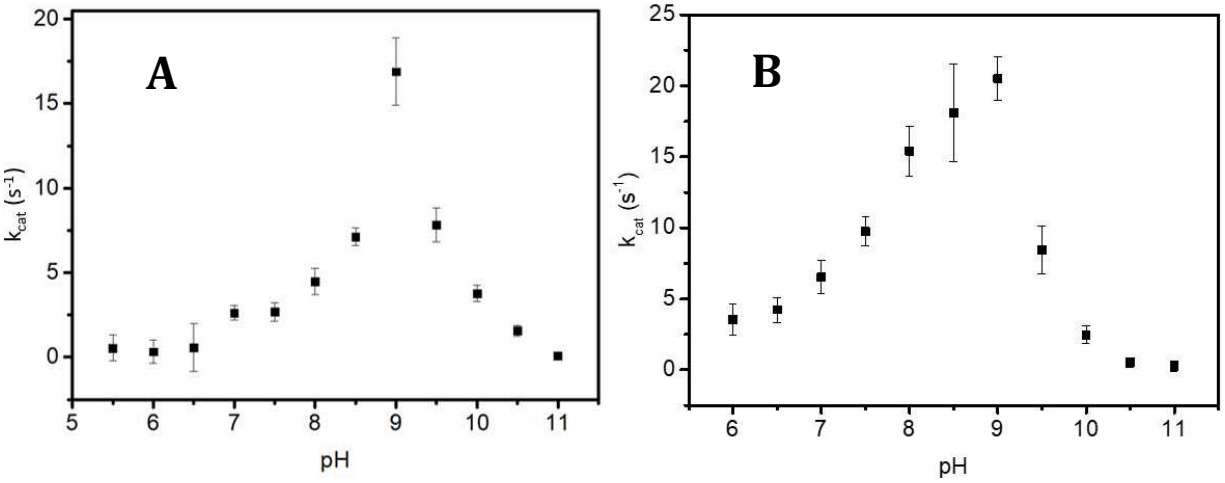


Figure VI.6 : Détermination de l'optimum de pH pour la réaction d'oxydation du formiate en présence de ménadione par ForCE 1 (A) et pour ForCE 2 (B).

Comme le montre la figure VI.6, l'optimum de pH pour l'activité formiate/ménadione oxydoréductase est à pH = 9,0 pour ForCE 1 et ForCE 2.

Les profils des courbes présentées en figure VI. 6 montrent que ForCE 1 et ForCE 2 passent d'un état inactif à bas pH à un état actif à leur optimum de pH pour ensuite redevenir inactive à haut pH, probablement en raison de la dégradation de l'enzyme. Cette activation/désactivation avec le pH est représentée schématiquement en figure VI.7.

$$E^{R_1-H}_{R_2-H} \underset{pK_{A_1}}{\rightleftarrows} E^{R_1^-}_{R_2-H} \underset{pK_{A_2}}{\rightleftarrows} E^{R_1^-}_{R_2^-}$$

Figure VI.7 : Schéma représentant les trois états enzymatiques possibles lors d'une activation par le pH avec une forme inactive di-protonée (gauche), une forme active mono-protonée (centre) et une forme déprotonée inactive (droite). E représente l'Enzyme, R_1 et R_2 les résidus impliqués et pK_{A1} et pK_{A2} les pK_A pour les deux transferts d'électron.

Il est à noter que le modèle présenté est simplifié. En effet, bien que la déprotonation d'un résidu peut effectivement être responsable d'une variation de l'activité enzymatique, il reste toutefois possible que ce phénomène soit dû au changement d'un réseau de liaisons hydrogène impliquant plusieurs résidus, auquel cas le pK_A mesuré est un pK_A apparent.

De plus, la représentation des log(k_{cat}) en fonction du pH permet, en prenant le point situé à $\left(\frac{\log(kcat)_{max}}{2}; pH\right)$, d'avoir accès au pH moyen des résidus participant à la réaction de déprotonation. La figure VI.8 montre ces analyses pour ForCE 1 (A) et ForCE 2 (B).

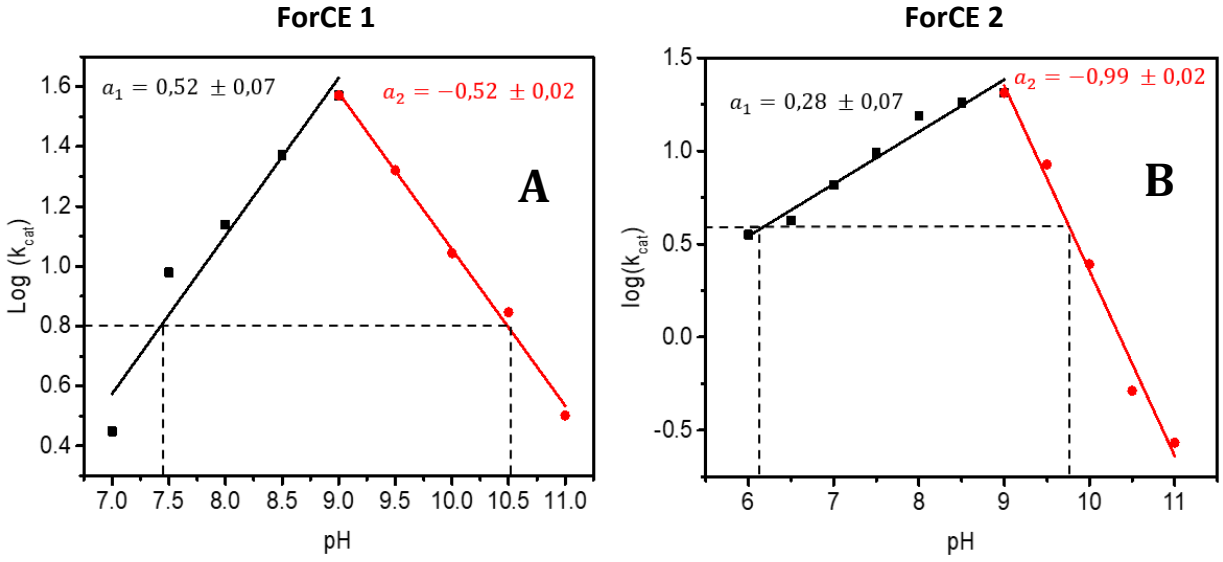


Figure VI.8 : Détermination du pK_A moyen des résidus impliqués dans les deux étapes de déprotonation pour l'activité ForCEs :ménadione oxydoréductase. Les pentes de ces droites valent : a_1 = 0,52 et a_2 = - 0,52 pour ForCE 1 (A) et a_1 = 0,28 et a_2 = - 0,99 pour ForCE 2 (B).

On peut voir ici que la première étape de déprotonation dans ForCE 1 (A) fait intervenir un ou plusieurs résidus ayant un pH moyen de ≈ 7,5. De même, la seconde étape de déprotonation fait intervenir un ou plusieurs résidus de pH moyen ≈ 10,5. Dans ForCE 2 en revanche les pH

des deux étapes de déprotonation sont légèrement différents de ceux de ForCE 1 et sont respectivement ≈ 6,2 et ≈ 9,8.

III.2 - Etude cinétique pour les activités formiate/ménadione oxydoréductases pour ForCE 1 et ForCE 2 :

Les analyses cinétiques de l'activité formiate:ménadione oxydoréductase pour ForCE 1 et ForCE 2 sont présentées dans la figure VI.9.

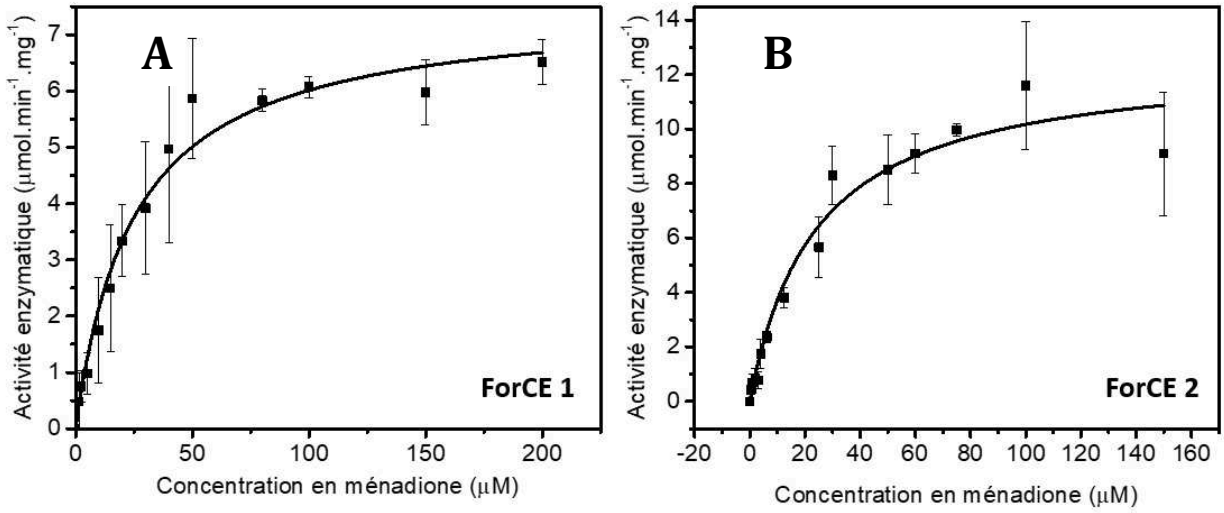


Figure VI.9 : Courbes de Michaelis-Menten pour les activités formiate :ménadione oxydoréductase pour ForCE 1 (A) et ForCE 2 (B). Tests d'activité réalisés à pH = 9,0. Les données expérimentales ont été ajustées à l'aide d'une courbe de Michaelis Menten (Eq. 34 du Matériels et Méthodes). [formiate] = 50 mM.

Nous pouvons ainsi déterminer le k_{cat} et le K_M de ForCE 1 et ForCE 2 pour la ménadione. Les résultats sont récapitulés dans le tableau VI.2.

FDH	$K_M^{ménadione}$ (mM)	k_{cat} (s^{-1})	V_{max}	pH	k_{cat}/K_M $(s^{-1}.mM^{-1})$
ForCE 1	0,025 ± 0,003	16,5 ± 0,6	7,5 ± 0,3	9	660 ± 103
ForCE 2	0,023 ± 0,005	26,4 ± 1,8	12,6 ± 0,9	9	1147 ± 328

Tableau VI.2 : Récapitulatif des constantes catalytiques enzymatiques pour la réaction d'oxydation du formiate par ForCE 1 et ForCE 2 en utilisant la ménadione comme accepteur final d'électrons. Vmax donnés en µmol.min^{-1}.mg^{-1}.

IV - Etude de la tolérance à l'oxygène :

Une autre étape importante dans la caractérisation biochimique de ForCE 1 et ForCE 2 est l'étude de leur tolérance à l'oxygène. En effet, ceci est une propriété cruciale pour envisager l'utilisation de ces enzymes dans des procédés biotechnologiques dans le cadre de la valorisation du CO_2. J'ai donc mesuré l'activité formiate:BV oxydoréductase de ForCE1 dans diverses conditions, en particulier d'exposition à l'oxygène. Ces études ne sont pas présentées dans ce manuscrit car elles font actuellement l'objet d'une demande de brevet.

V - Discussion :

V.1 - Tolérance à l'oxygène de ForCE 1

Plusieurs points sont à discuter ici. Beaucoup de FDHs sont connues pour être sensibles à l'oxygène comme la FDH de *M. formicicum*[98], la FDH-H d'*E. coli*[56] qui perd toute son activité après 30 minutes d'exposition à l'air, ou encore celle de *C. pasteurianum*[44]. Néanmoins certaines FDHs présentent une bonne tolérance à l'oxygène comme celles de *C. necator*[53] et de *R. capsulatus*[166]. Ces études confirment le rôle inhibiteur et protecteurs du nitrate tel que mis en évidence par Niks et al.[95] et Friedebold et al.[167] pour la FDH de *C. necator* (microorganisme anciennement nommé *Alcaligenes eutrophus)* venant se fixer au niveau du site actif et permettant ainsi à l'enzyme d'être protégée de l'action du dioxygène. L'action de ce dernier est une inactivation de l'enzyme par la substitution du groupement sulfido-sulfhydryle par un groupement oxo ou hydroxyle dans la sphère de coordination du métal. Il est évoqué dans ces études que l'inhibition par le nitrate est de type mixte, compétitive – non compétitive et qu'un excès de formiate ne suffit pas à lever complètement l'inhibition. Il est également postulé que la ligation du nitrate au niveau du site actif à molybdène bloque le remplacement par l'oxygène du ligand soufre apical, essentiel pour la catalyse. En l'absence d'un donneur d'électrons, ForCE1 est incapable de réagir avec le nitrate. Cela explique pourquoi l'état oxydé est maintenu en présence de nitrate alors qu'un état réduit est obtenu avec le formiate, rendant l'enzyme plus sensible à l'action de l'oxygène. Cette étude fait écho à celle menée par A. R. Oliveira et al[92] dans laquelle est montrée l'existence de deux tunnels, l'un étant proposé pour l'acheminement du formiate jusqu'au site actif et l'autre pour le

départ du CO_2 dans la FDH de *D. vulgaris Hildenborough*. La figure VI.10 extraite de A. R. Oliveira et al[92] montre les tunnels d'accès du formiate calculés à partir de la forme oxydée (vert) et celui de sortie du CO_2 calculé à partir de la forme réduite (magenta). Dans cette représentation le cofacteur à molybdène et son environnement sont représentés en couleurs chaudes pour la forme oxydée et en couleurs froides pour la forme réduite.

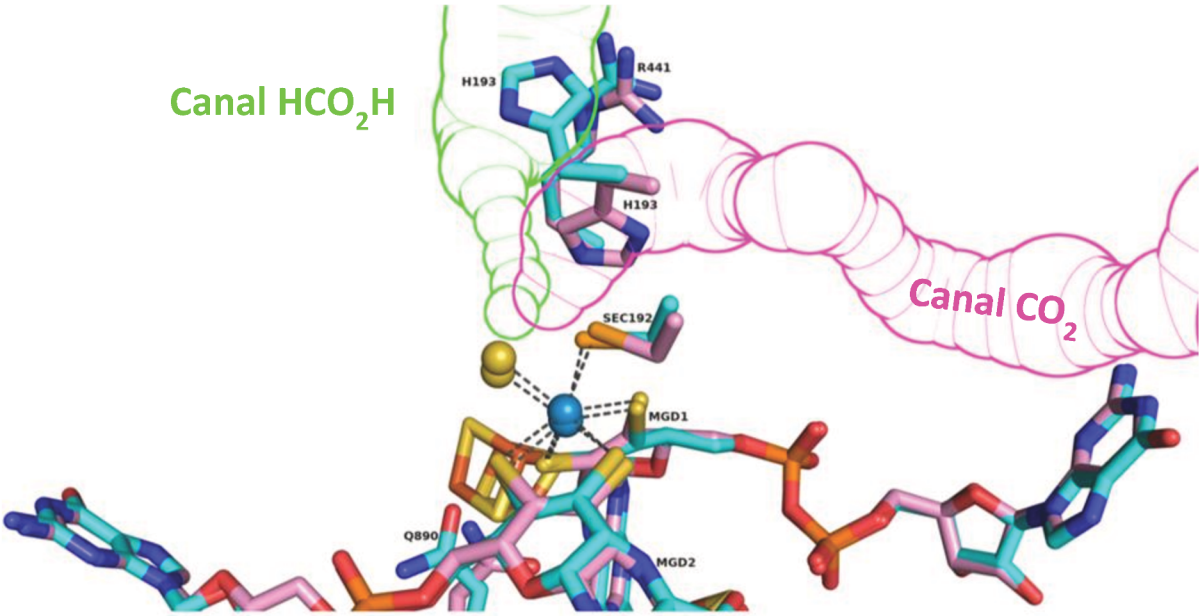


Figure VI.10 : Illustration des tunnels du formiate (en vert) et du CO_2 (en magenta) proposés dans la FDH de Desulfovibrio vulgaris. La fonction imidazole présent sur le résidu His193 est montré en rose (forme oxydée) et en bleu (forme réduite). Issue de Oliveira et al.[92]

Dans la forme oxydée, le tunnel d'accès observé est positivement chargé et aurait un diamètre minimal de 1,4 Å pour une longueur de 13,2 Å. Ceci est compatible avec le transport du formiate. Dans la forme réduite de l'enzyme, le tunnel principalement composé de résidus hydrophobes aurait quant à lui un diamètre minimal de 1,8 Å pour une longueur de 39,7 Å, compatible cette fois-ci avec le transport du CO_2. L'existence de tunnels d'accès distincts selon l'état rédox de l'enzyme rend compte de changements conformationnels à proximité du site actif. En particulier, le groupement imidazole de la chaine latérale de l'histidine 193 (His 193) se situe dans deux positions différentes dans les formes réduites et oxydées. Le modèle de travail proposé par les auteurs est le suivant : le positionnement de l'His193 a pour effet, dans la forme oxydée, de bloquer le tunnel de sortie du CO_2 et de laisser libre le tunnel d'accès pour le formiate. Réciproquement, dans la forme réduite cela permet de bloquer l'accès au site actif du formiate en fermant son tunnel d'accès et de laisser le tunnel de sortie du CO_2 libre. Sur la base de ces observations, la sensibilité accrue de l'enzyme dans un état réduit à l'action

du dioxygène peut être expliquée de la manière suivante. L'exposition à l'air conduit à une forme oxydée de l'enzyme, le seul tunnel d'accès est celui pour la libération du CO_2 qui par son caractère hydrophobe est aussi compatible avec le transport de O_2. Cette explication est soutenue par le fait que le dioxygène étant une molécule apolaire et non chargée, elle ne présente pas de moment dipolaire et préfèrera un tunnel d'accès hydrophobe (tel que celui du CO_2) plutôt que positivement chargé (comme celui du formiate). Ceci a été observé dans le cas de la cytochrome *bd* oxydase de *Mycobacterium smegmatis*[168] et la cytochrome *c* oxydase de *Rhodobacter sphaeroides*, *Paracoccus denitrificans*, *Thermus thermophilus* et *Bos taurus*[169,170]. En effet dans ces enzymes, les tunnels d'accès de l'oxygène au centre catalytique sont des tunnels plutôt hydrophobes.

Ce modèle n'est pas totalement satisfaisant car il ne permet pas d'expliquer la capacité du nitrate à protéger l'enzyme oxydée de l'action du dioxygène. On peut faire l'hypothèse qu'en plus d'occuper la place que pourrait prendre l'oxygène dans la première sphère de coordination du métal, le fort pouvoir oxydant du nitrate permettrait de maintenir l'enzyme dans un état oxydé et de maintenir ainsi le tunnel du CO_2 clos. On constate également une perte progressive d'activité pour la préparation maintenue en aérobiose, alors que selon le modèle évoqué, l'histidine devrait dans cet état d'oxydation bloquer le tunnel du CO_2. Cette observation peut être rationalisée en gardant à l'esprit que même si le tunnel hydrophobe est le plus à même de transporter O_2, il n'est pas exclu qu'une petite proportion puisse passer par le tunnel positivement chargé. De plus, les phénomènes de dynamique moléculaire auxquels l'histidine est soumise peuvent induire l'ouverture temporaire du tunnel hydrophobe permettant ainsi l'accès du dioxygène au site actif et donc l'inactivation de l'enzyme.

La situation est plus complexe dans le cas des enzymes ForCE puisque le résidu Histidine est substitué par une Glutamine. Nous ne disposons pas d'information structurale à ce stade sur les changements structuraux associés aux différents états rédox de l'enzyme. Toutefois, notre attention devra se porter sur de tels changements et sur le rôle que pourrait jouer le résidu Gln392 dans le contrôle d'accès aux substrats.

V.2 – Efficacité catalytique des ForCEs

Concernant les activités déterminées dans le cas des ForCEs, le tableau VI.3 récapitule les valeurs des constantes catalytiques K_M et k_{cat} pour ForCE 1, ForCE 2 et différentes FDHs caractérisées dans la littérature.

FDHs	Cofacteur	Accepteur	$K_M^{formiate}$ (μM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_M ($s^{-1}.\mu M^{-1}$)
S fumaroxidans FDH 1	W-Se	BV^{2+}	10	5600	560
S fumaroxidans FDH 2	W-Se	BV^{2+}	40	1900	47,5
A. woodii	Mo-Se	NADH	1000	28	0,03
C. necator	Mo-S	NADH	310	201	0,65
C. oxalaticus	Mo-S	NADH	100	90	0,90
R. capsulatus	Mo-S	NADH	280	38	0,14
D. vulgaris Hildenborough	Mo-Se	BV^{2+}	17	1310	77,5
D. desulfuricans	Mo-Se	MV^{2+}	55	550	10,0
B. subtilis ForCE 1	Mo-S	BV^{2+}	5100	96	0,02
B. subtilis ForCE 2	Mo-S	BV^{2+}	1100	56	0,06
FDHs	**Cofacteur**	**Accepteur**	$K_M^{ménadione}$ (μM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_M ($s^{-1}.\mu M^{-1}$)
B. subtilis ForCE 1	Mo-S	Ménadione	25	17	0,66
B. subtilis ForCE 2	Mo-S	Ménadione	23	26	1,15

Tableau VI.3 : Présentation des $K_M^{formiate}$, $K_M^{ménadione}$, k_{cat} et k_{cat} / K_M pour différentes FDHs. Données issues de la littérature[40,43,94,95,135,171].

L'analyse comparative des k_{cat} et K_M dans les FDHs est rendue compliquée par la nature variable des partenaires redox employés pour les tests d'activités. On constate néanmoins que pour les activités formiate:BV oxydoréductases les valeurs de K_M pour ForCE 1 et ForCE 2 sont respectivement de 5,1 et 1,1 mM et sont comparables à celles de la FDHs d'*A. Woodii* et dans une moindre mesure à celles de *C. necator*, et *R. capsulatus*. Néanmoins, ces dernières semblent plus efficaces que les ForCEs pour l'oxydation du formiate. Il est alors important de noter ici que le Benzyl-Viologène n'est pas le substrat physiologique des ForCEs, alors que les activités des FDHs de *C. necator*, et *R. capsulatus* sont mesurées en présence de leur substrat physiologique, le NAD^+. De plus, on suppose que le Benzyl-Viologène a plusieurs sites d'interactions possibles avec l'enzyme ce qui est cohérent avec la valeur élevée déterminée pour le K_M dans le cas des ForCEs. Cette dernière conduit à une diminution de l'efficacité catalytique k_{cat}/K_M. On sous-estime ainsi l'efficacité des ForCEs pour la réaction d'oxydation du formiate mesurée avec le BV. Toutefois, des études cinétiques ont été effectuées avec de la ménadione, un analogue de quinone, comme accepteur final d'électrons. Comparé aux tests effectués avec le BV, on observe une nette diminution de la valeur du K_M avec la ménadione.

Ceci peut s'expliquer par le fait qu'avec un analogue structural du partenaire redox, on s'attend à une meilleure interaction entre l'enzyme et ce dernier, ce qui est observé par une valeur de K_M plus basse. Une fois encore, il faut être prudent sur la comparaison et l'interprétation de ces données puisque les systèmes mentionnés ci-dessus sont respectivement des systèmes contenant un cofacteur à tungstène ou molybdène, tous étant chélatés par une sélénocystéine, ce qui est différent de ce qui observé dans le cas des ForCEs. On peut toutefois constater que les efficacités catalytiques des ForCEs déterminées à partir de la ménadione (analogue du substrat physiologique) sont bien meilleures, d'au moins un ordre de grandeur que celles déterminées en utilisant le BV.

V.3 – Optimums de pH dans les ForCEs et le lien avec le cycle catalytique

La présente étude des ForCEs montre que leurs pHs optimums sont plutôt élevés (pH = 9,0 pour les activités ménadione et pH = 10,0 pour les activités avec le BV). On constate que c'est le cas de la plupart des formiate déshydrogénases étudiées jusqu'ici. En effet, les FDHs de *C. necator*[95] et *R. capsulatus*[171] ont un optimum de pH respectivement à 7,5 et 9,0 pour l'activité formiate:NAD^+ oxydoréductase. Les études réalisées par Mortenson et al.[44] et par Sebban et al[40]. montrent respectivement un optimum de pH pour l'activité formiate :MéthylViologène compris entre 8,3 et 8,5 et entre 6 et 9. On constate ainsi que l'optimum de pH pour les activités formiate oxydoréductase est souvent supérieur à 7,0. Toutefois, il convient de rester prudent sur les comparaisons faites ici car les activités ne sont ni mesurées avec le même accepteur d'électron ni dans les mêmes conditions (tampon, température, …).

La figure VI.11 reprend le mécanisme catalytique exposé précédemment dans le chapitre IV figure IV.16. Ce mécanisme proposé par Niks et al.[95] est considéré comme celui reflétant le mieux la catalyse à l'œuvre dans les FDHs. Pour ces raisons et celles évoquées au paragraphe IV.2, il est raisonnable de penser que c'est ce mécanisme qui est également à l'œuvre dans les ForCEs.

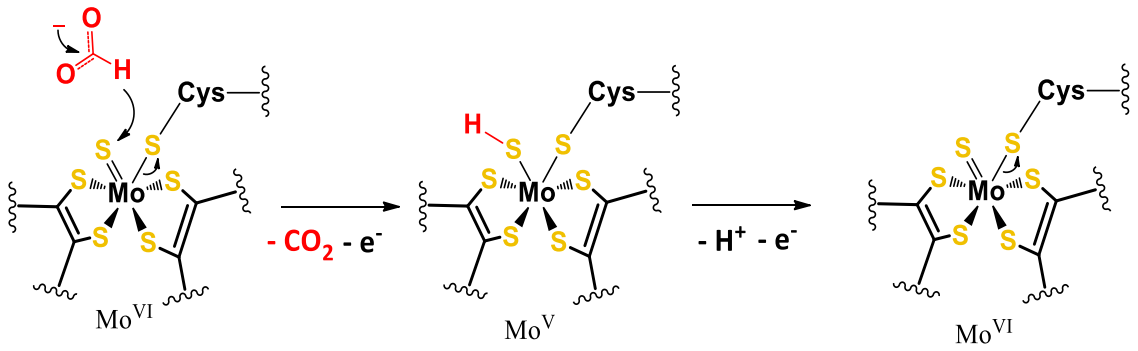


Figure VI.11 : Mécanisme réactionnel proposé pour l'oxydation du formiate en CO_2 par la FDH de C. necator. Adapté de Niks et al.[95]

Compte tenu du mécanisme réactionnel présenté en figure VI.11, on comprend que pour clôturer le cycle catalytique, la déprotonation du ligand -SH doit avoir lieu pour reformer le ligand =S. On peut faire l'hypothèse, raisonnable, que cette étape de déprotonation implique les résidus situés à proximité du site catalytique se protonant et se déprotonant successivement pour pouvoir accepter les protons des cycles suivants. Ainsi les optimums de pH plutôt élevés observés dans les FDHs et dans les ForCEs sont cohérents avec l'intérêt catalytique d'avoir une déprotonation rapide des résidus. Si on regarde plus en détail les acides aminés de la première sphère de coordination potentiellement impliqués dans la catalyse, on constate que trois d'entre eux, la cystéine, l'arginine et l'histidine ont des chaines latérales ionisables qui ont un pKa de 8,3, 12,5 et 6,0 respectivement. Il est raisonnable de penser que les chaines latérales de ces acides aminés et plus précisément leur état de protonation participent vraisemblablement à la réactivité chimique. Toutefois seuls les résidus histidine et arginine peuvent être considérés ici puisque, dans ce modèle, la cystéine reste liée au molybdène. De plus, il a été montré dans l'étude des ForCEs que les pH de déprotonation étaient respectivement de ≈ 7,5 et ≈ 10,5 pour ForCE 1 et de ≈ 6,2 et ≈ 9,8 pour ForCE 2. Pour ForCE 1, ces valeurs sont en accord avec l'implication de l'histidine dans la première étape de déprotonation et avec l'implication de l'arginine dans la deuxième étape de déprotonation. Pour ForCE 2, les valeurs calculées sont en accord avec l'implication de l'histidine dans la première étape de déprotonation. Il est néanmoins plus délicat d'attribuer les résidus pour la deuxième étape de déprotonation puisque cette dernière a un pK_A significativement plus bas que celui de l'arginine. Il est d'autant plus difficile d'attribuer les résidus jouant un rôle dans les réactions de déprotonation car il est possible que ces derniers soient impliqués dans des réseaux de liaisons hydrogène ce qui a pour effet d'entrainer une dépendance du pK_A des

résidus en fonction de l'environnement. Il faut, de plus, garder à l'esprit que le second processus de déprotonation diminue l'efficacité de la catalyse mais peut aussi rendre compte de la dénaturation de l'enzyme à haut pH. La compréhension des résidus impliqués dans la catalyse nécessite des études complémentaires actuellement menées au laboratoire. Un autre point intéressant est que les pentes des droites obtenues sur la figure VI. 8 pour ForCE 1 (0,52 et -0,52) et ForCE 2 (0,28 et -0,99) sont différentes d'une enzyme à l'autre. Cela suggère que des processus différents sont à l'œuvre entre ForCE 1 et ForCE 2. En effet, si ces différences sont considérées comme significatives, alors il faut prendre en compte d'autre résidus dans le phénomène. Ces résidus devraient être différents dans les deux enzymes ou alors concevoir que des changements structuraux subtils existent entre ces deux enzymes et donc des changements dans les réseaux de liaisons hydrogène. On peut également émettre l'hypothèse de l'existence d'une coopérativité en fonction du pH. Des études approfondies seront nécessaires pour répondre à cette question.

Chapitre VII

Conclusions et perspectives

Afin de mieux comprendre à l'échelle moléculaire le fonctionnement de systèmes enzymatiques complexes, tels que les formiate déshydrogénases, pour d'éventuelles applications biotechnologiques ainsi que l'étude de leur rôle métabolique, je me suis intéressé dans ces travaux de thèse à la caractérisation par RPE des deux FDHs présentes chez *Bacillus subtilis.*

Dans la première partie, une analyse des centres FeS a été détaillée montrant l'isolement de quatre signatures attribuées à trois centres de type [4Fe4S] et un centre de type [2Fe2S] sur les cinq centres prédits par la séquence. Trois titrages à deux pH différents (pH = 6,0 et 7,5) ont permis l'étude des propriétés redox de ces centres et la détermination de leurs potentiels standards. Une quantification a également été faite en utilisant le centre [2Fe2S], ayant des propriétés spectroscopiques et redox favorables, comme référence interne et permettant d'estimer le nombre de clusters FeS à 5 centres. Ces signatures spectrales complexes ont également révélé la présence de raies larges et très peu intenses situées de part et d'autre des signatures des centres FeS. Ces raies ont été décrites comme provenant d'un couplage inter-centres impliquant le centre C_1 et le centre C_3 tous deux associés à des centres de type [4Fe4S]. Enfin, des signatures RPE caractéristiques des centres [4Fe4S] haut spin (S = 3/2) ont été étudiées dans la région bas champ. Un titrage de cette espèce ainsi que sa quantification a permis de l'associer à la présence très minoritaire d'une partie du centre C_2 dans un état de spin S = 3/2. Tous les centres FeS présentés dans cette étude effectuée sur ForCE 1 sont également présents dans ForCE 2.

Dans la seconde partie, une étude détaillée du cofacteur à molybdène également prédit par l'analyse des séquences ForCE 1 et ForCE 2 comme étant stabilisé dans ces enzymes a été effectuée. Deux signatures de Mo^V ont été observées dans ForCE 1, l'une faiblement rhombique, visible uniquement à pH = 6,0 appelée espèce 1 et l'autre rhombique visible à pH = 6,0 et pH = 7,5 appelée espèce 2. Une comparaison avec d'autres espèces à l'aide d'un diagramme de corrélation a permis de proposer que ces deux espèces sont vraisemblablement associées à des ions Mo^V possédant une coordination de type $[MoS_6]$. Dans ForCE 2, seule l'espèce 1 est observée. Cette dernière est de plus détectée dans ForCE 2 avec une intensité relative par rapport à la signature radicalaire plus importante que dans ForCE 1 et est caractérisée par une structuration de son signal associé à un couplage hyperfin fort avec un proton. Cet échantillon a ainsi été sélectionné pour les études HYSCORE qui ont

permis de mettre en évidence plusieurs couplages avec au moins deux groupes de protons. L'un est attribué à des protons situés à proximité du Mo, vraisemblablement ceux présents sur les pyranoptérines ou sur le ligand protéique cystéine. L'autre est associé au proton situé sur le ligand (-SH) directement lié au molybdène et proposé comme provenant du formiate après une réaction de transfert d'hydrure se produisant durant le cycle catalytique.

Dans la troisième partie une étude détaillée du signal radicalaire détecté dans ForCE 1 et ForCE 2 a été effectuée. La caractérisation redox de cet intermédiaire ainsi que son analyse par RPE multifréquence ont permis de l'associer à un intermédiaire de type ménasemiquinone et plus précisément une ménasemiquinone 7 (MSK-7). Cette attribution a été confortée par la caractérisation d'une MK-7 dans ForCE 1 par HPLC couplée à de la spectrométrie de masse. La MK-7 est retrouvée dans ForCE 1 et ForCE 2. L'étude de la structure électronique de la MSK-7 a été menée dans ForCE 1 préparée dans H_2O et D_2O. Elle a permis de mettre en évidence la présence d'au moins deux groupes de protons dont un échangeable et attribué à une liaison hydrogène avec la quinone. De plus, un couplage avec des protons non échangeables a été associé aux protons du groupe méthylique, un proton vinylique ou aromatique portés par la MK-7.

Enfin, dans la dernière partie une étude enzymologique de ForCE 1 a été conduite. Les paramètres cinétiques associés à l'activité formiate:BV oxydoréductase de ForCE 1 ont été déterminés, de même que le pH associé à l'optimum d'activité. Durant ma thèse je me suis également intéressé à la résistance à l'oxygène de ForCE 1 dans diverses conditions : en anaérobie, en aérobie, en présence de nitrate ou de formiate. Ces résultats ne sont toutefois pas présentés dans ce manuscrit puisqu'ils s'insèrent dans le cadre d'une demande de brevet européen en cours.

Les résultats obtenus dans le cadre de cette thèse permettent d'envisager de nombreuses perspectives.

La figure VII.1 montre un modèle structural de la sous-unité ForC 1 basé sur la structure résolue de la FDH de *Rhodobacter capsulatus*[57] et généré avec i-tasser[172].

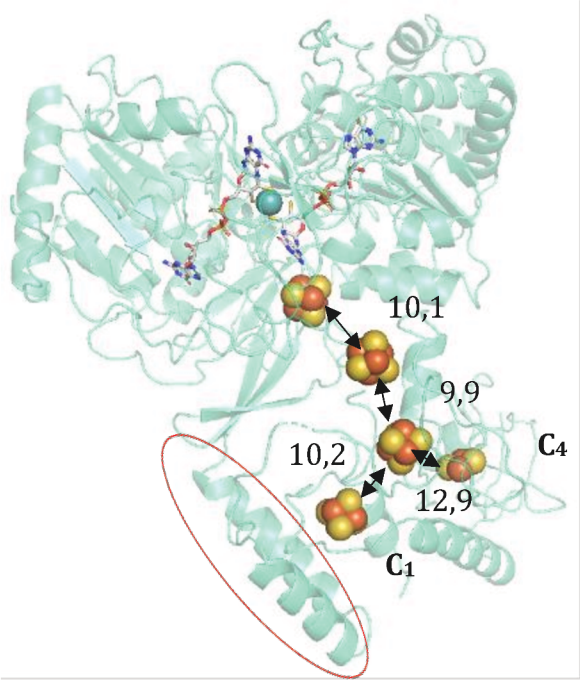


Figure VII.1 : Modèle de la sous-unité ForC 1. En noir sont indiquées les distances inter-centres en Å. Modèle généré en utilisant i-tasser[168] à partir de la structure de FdsA de R. capsulatus (PDB : 6TGA)

Concernant les centres FeS, des analyses par spectroscopie DEER (Double Electron Electron Resonance) ont été initiées. Cette technique permet la mesure de la distance entre deux centres paramagnétiques présents dans la protéine. Des mesures en bande X et en bande Q à des potentiels différents permettant d'observer de manière isolée le centre C1 et le centre C2 ont été faites.

L'échantillon alors préparé à bas potentiel permettrait d'affiner ainsi l'attribution des centres FeS dans ForCE 1. Pour ce faire, une simulation des spectres DEER des différentes possibilités d'attribution sera nécessaire pour pouvoir finir l'attribution. Cette stratégie a été par exemple mise en place avec succès pour l'étude des centres FeS dans le complexe I respiratoire de *B. taurus* par Roessler et al.[173] réalisée à partir de celle de *T. thermophilus*[174–176] qui a servi de base à l'élaboration de ces expériences. J'ai également commencé des expériences RPE sur ForCE 1 en présence d'HQNO, un analogue de ménaquinone. Cet inhibiteur, en venant se fixer dans la poche à quinone devrait venir éteindre le signal RPE du radical MSK et peut-être modifier la signature du centre FeS situé le plus près de cette dernière. La figure VII.2 montre les résultats des études préliminaires menées avec le HQNO.

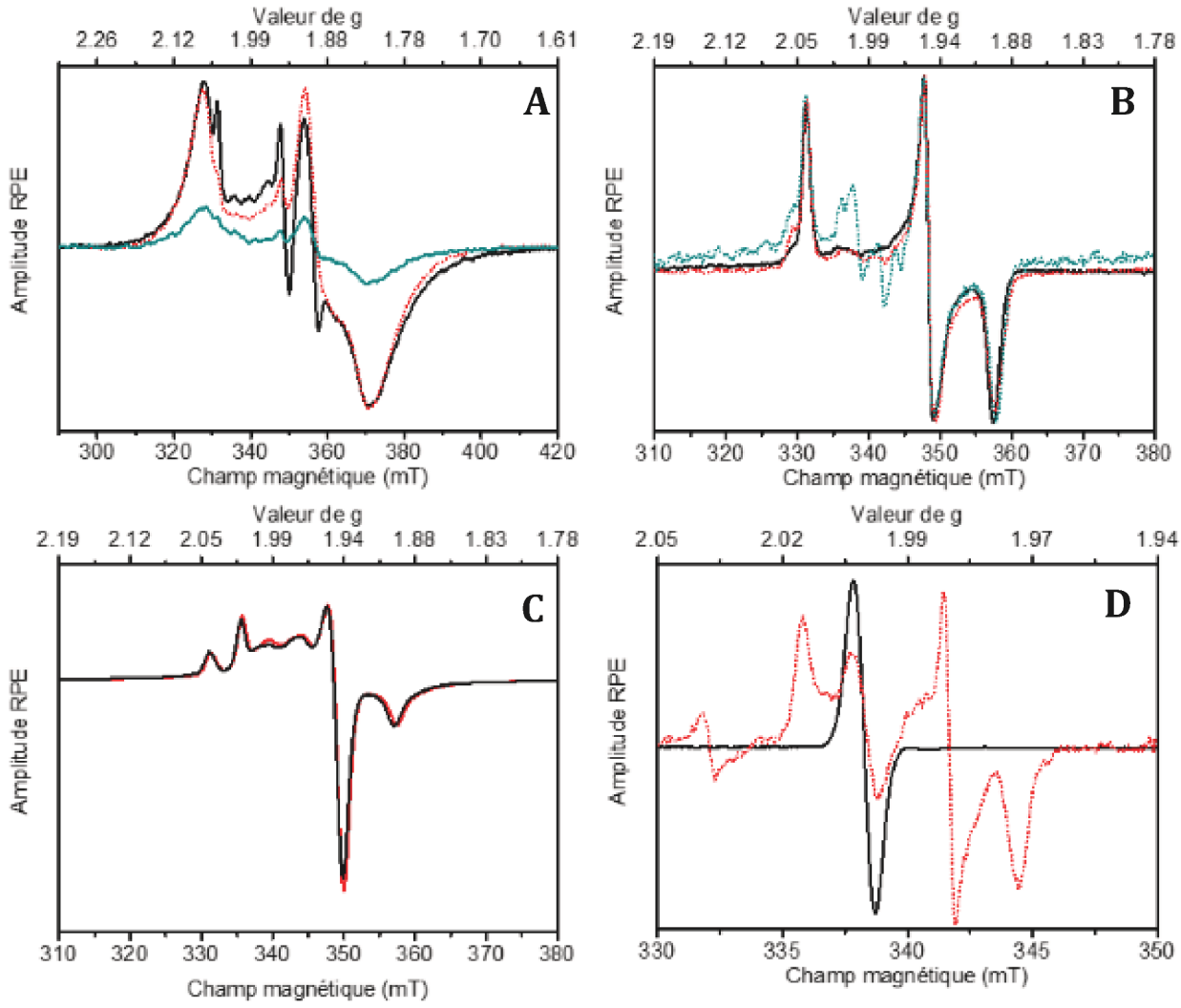


Figure VII.2 : Spectres RPE des centres paramagnétiques (FeS, Mo^V et ménasemiquinone) dans ForCE 1 en présence de HQNO (solubilisé dans EtOH) (en rouge) ou en l'absence de HQNO (en noir). En vert sont représentés les spectres sans HQNO avec la même quantité d'éthanol. (A) : signatures des centres C_1 et C_2. (B) : signature du centre C_2 seul. (C) signatures des centres C_2, C_3 et C_4. (D) signatures des espèces MK-7 et Mo^V espèce 2. Conditions expérimentales : pH = 6,0, potentiel : (A et B) -276 mV (rouge et vert), -280 mV (noir), (C) : -427 mV (en rouge) -405 mV (en noir), (D) : -57 mV (en rouge), -53 mV (en noir), température 15 K (A et C), 30 K (B) et 50 K (D) : puissance micro-onde : 10 mW, amplitude de modulation : 10 G à 100 kHz, fréquence micro-onde ≈ 9,48 GHz.

On remarque que les amplitudes relatives des signaux des centres C_1 et C_2 varient beaucoup selon que l'HQNO est présent ou pas (figure VII.2A). Les largeurs de raie de ces deux centres ne semblent pas affectées de manière significative par la présence de HQNO (figure VII.2 A et B). De même, les signaux des centres C_3 et C_4 n'apparaissent pas avoir été modifiés au cours de l'expérience (figure VII.C). Il est alors raisonnable de penser que, en tant qu'analogue de quinone, le HQNO vienne se fixer dans la poche à quinone. Les résultats précédents appuient

ainsi l'hypothèse que le centre C_1 est celui localisé au niveau de la poche à quinone. Enfin on constate que le spectre enregistré avec le HQNO présente une quantité de radical semiquinone plus faible lorsque l'HQNO est présent (figure VII.D). Dans ces conditions la seule signature de Mo^V visible est celle de l'espèce 2. Ces résultats sont préliminaires et nécessiteront une attention particulière dans les recherches effectuées par la suite pour savoir si ces modifications sont une cause de l'ajout d'HQNO ou pas. Pour cela un titrage avec l'inhibiteur est à envisager. Concernant le cofacteur à molybdène, j'ai initié des études sur ForCE 1 en présence de formiate de sodium marqué ($D^{13}COONa$). Malgré une intensité relative plus faible des signaux de Mo^V par rapport à ceux du radical dans ForCE 1 comparé à ForCE 2, une structuration des signaux de l'espèce 1 y est néanmoins visible. De plus cette étude avec le formiate doublement marqué (^2H, ^{13}C) va être menée aux deux pH de travail (pH = 6,0 et 7,5) pour voir si la signature de l'espèce 2 du Mo^V présente des couplages protons similaires à ceux de l'espèce 1. Le but de ces expériences menées dans H_2O est de voir si un couplage deutérium est visible de même qu'un couplage ^{13}C. Ainsi, si le proton couplé observé dans ForCE est celui provenant du formiate, un signal HYSCORE du deutérium devrait être visible, dans un premier temps, puis progressivement disparaitre au profit d'un couplage proton à la suite d'un échange avec H_2O. Ces études basées sur celles de Niks et al.[86] permettront de mieux comprendre le mécanisme réactionnel en jeu dans ForCE 1.

Enfin concernant la ménasemiquinone, j'ai commencé des études de marquage isotopique uniforme de ForCE 1 à l'azote 15 en utilisant des conditions de culture que j'ai optimisées en milieu minimum (M9). Le milieu est par la suite supplémenté avec du $^{15}NH_4Cl$. L'objectif de ces expériences est d'étudier par spectroscopie ESEEM et HYSCORE le signal de la MSK-7 dans ces conditions afin d'identifier l'environnement azoté du radical et le localiser dans l'enzyme. En effet, le ^{15}N ayant un spin nucléaire I = 1/2, au lieu de I = 1 dans le cas du ^{14}N, il n'y a plus la contribution de l'interaction quadripolaire (présente pour les noyaux de spin $I \geq 1$). Les spectres sont moins encombrés et l'analyse des signaux est ainsi simplifiée. Les spectres HYSCORE donneraient ainsi une paire de corrélation par noyau ^{15}N en interaction, ce qui permettrait ainsi de les dénombrer plus précisément et de pouvoir avoir une visualisation plus précise des acides aminés présents au niveau de la poche à quinone. Ces données seront confrontées aux données structurales obtenues par diffraction des rayons dans le cadre d'une collaboration en cours avec le Dr. Pascal Arnoux (CEA Cadarache).

ForCE 1 et ForCE 2 sont également des FDHs atypiques du point de vue de la configuration de leurs site actif. Comme on l'a vu dans l'introduction, les acides aminés présents dans la seconde sphère de coordination du Mo sont inversés par rapport à la configuration canonique observée dans les autres FDHs. Une question importante soulevée ici est de savoir qu'elle serait l'influence d'une configuration classique des acides aminés sur l'activité formiate oxydoréductase des ForCEs et sont-ils tous nécessaires à l'efficacité de la catalyse ? Des études par mutagénèse dirigée sont en cours pour répondre à cette question.

De plus, ForCE 1 et ForCE 2 sont des enzymes cytoplasmiques présentes dans la fraction soluble. Toutefois elles interagissent avec des quinones, ce qui soulève également la question de leur interaction avec la membrane. En effet, les quinones sont des composés lipophiles stockés dans le pool de quinones situé au niveau de la membrane. Quelle est la nature des interactions entre les ForCEs et cette dernière ? Y a-t-il un échange de quinone entre les ForCEs et le pool de quinones ou plutôt un transfert électronique avec un partenaire encore non identifié ? Pour répondre à ces questions des expériences de microscopie électronique ont été mises au point dans l'équipe du Dr. Axel Magalon (CNRS Marseille). Ces expériences de microscopie sont basées sur la technique dite de TIRF (total internal reflection fluorescence) permettant, dans notre cas, de visualiser une protéine fluorescente qui serait située au niveau de la membrane.

Enfin, le fait que les ForCEs interagissent avec les quinones questionne sur leur implication dans le métabolisme de *Bacillus subtilis* et notamment dans les voies bioénergétiques. La question de leur implication dans la respiration aérobie est alors légitime. Des expériences d'oxygraphie menées également dans l'équipe du Dr. Axel Magalon sur différentes souches de *Bacillus subtilis* sont en cours.

Bibliographie

(1) Maia, L. B.; Moura, I.; Moura, J. J. G. Molybdenum and Tungsten-Containing Formate Dehydrogenases: Aiming to Inspire a Catalyst for Carbon Dioxide Utilization. *Inorganica Chimica Acta* **2017**, *455*, 350–363. https://doi.org/10.1016/j.ica.2016.07.010.

(2) *Climate Change 2014: Synthesis Report*; Pachauri, R. K., Mayer, L., Intergovernmental Panel on Climate Change, Eds.; Intergovernmental Panel on Climate Change: Geneva, Switzerland, 2015.

(3) Doney, S. C.; Fabry, V. J.; Feely, R. A.; Kleypas, J. A. Ocean Acidification: The Other CO_2 Problem. *Annu. Rev. Mar. Sci.* **2009**, *1* (1), 169–192. https://doi.org/10.1146/annurev.marine.010908.163834.

(4) Hernández, C. A.; Sangil, C.; Hernández, J. C. A New CO 2 Vent for the Study of Ocean Acidification in the Atlantic. *Marine Pollution Bulletin* **2016**, *109* (1), 419–426. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.05.040.

(5) Dorlet, P. APPLICATION DE LA RESONANCE PARAMAGNETIQUE ELECTRONIQUE A CHAMP INTENSE A L'ETUDE DE RADICAUX ORGANIQUES DANS LES METALLOPROTEINES. 206.

(6) Erb, T. J.; Zarzycki, J. A Short History of RubisCO: The Rise and Fall (?) Of Nature's Predominant CO2 Fixing Enzyme. *Current Opinion in Biotechnology* **2018**, *49*, 100–107. https://doi.org/10.1016/j.copbio.2017.07.017.

(7) Phillips, R.; Milo, R. A Feeling for the Numbers in Biology. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2009**, *106* (51), 21465–21471. https://doi.org/10.1073/pnas.0907732106.

(8) Andrews, T. J.; Lorimer, G. H. Rubisco: Structure, Mechanisms, and Prospects for Improvement. In *Photosynthesis*; Elsevier, 1987; pp 131–218. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-675410-0.50009-9.

(9) Norman, E. G.; Colman, B. Purification and Characterization of Phosphoglycolate Phosphatase from the Cyanobacterium *Coccochloris Peniocystis*. *Plant Physiol.* **1991**, *95* (3), 693–698. https://doi.org/10.1104/pp.95.3.693.

(10) Latzko, E. Abteilung Chemische Pflanzenphysiologie, Technische Universitat Munchen, 8050 Weihenstephan, Germany (BRD). **1977**, *60*, 5.

(11) Anderson, L. E. BBA 66295 CHLOROPLAST AND CYTOPLASMIC ENZYMES n. PEA LEAF TRIOSE PHOSPHATE ISOMERASES. 8.

(12) Sharkey, T. D. Estimating the Rate of Photorespiration in Leaves. *Physiol Plant* **1988**, *73* (1), 147–152. https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1988.tb09205.x.

(13) Sage, R. F.; Sage, T. L.; Kocacinar, F. Photorespiration and the Evolution of C_4 Photosynthesis. *Annu. Rev. Plant Biol.* **2012**, *63* (1), 19–47. https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042811-105511.

(14) Walker, B. J.; VanLoocke, A.; Bernacchi, C. J.; Ort, D. R. The Costs of Photorespiration to Food Production Now and in the Future. *Annu. Rev. Plant Biol.* **2016**, *67* (1), 107–129. https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-043015-111709.

(15) Buchanan, B. B.; Arnon, D. I. A Reverse KREBS Cycle in Photosynthesis: Consensus at Last. *Photosynth Res* **1990**, *24* (1), 47–53. https://doi.org/10.1007/BF00032643.

(16) Pnas.55.4.928.Pdf.

(17) Alissandratos, A.; Easton, C. J. Biocatalysis for the Application of CO_2 as a Chemical Feedstock. *Beilstein J. Org. Chem.* **2015**, *11*, 2370–2387. https://doi.org/10.3762/bjoc.11.259.

(18) Ljungdahl, L. G.; Wood, H. G. TOTAL SYNTHESIS OF ACETATE FROM CO_2 BY HETEROTROPHIC BACTERIA. *Annu. Rev. Microbiol.* **1969**, *23* (1), 515–538. https://doi.org/10.1146/annurev.mi.23.100169.002503.

(19) Ragsdale, S. W. Life with Carbon Monoxide. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **2004**, *39* (3), 165–195. https://doi.org/10.1080/10409230490496577.

(20) Ragsdale, S. W.; Pierce, E. Acetogenesis and the Wood–Ljungdahl Pathway of CO2 Fixation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* **2008**, *1784* (12), 1873–1898. https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2008.08.012.

(21) Wagner, T.; Ermler, U.; Shima, S. The Methanogenic CO2 Reducing-and-Fixing Enzyme Is Bifunctional and Contains 46 [4Fe-4S] Clusters. *Science* **2016**, *354* (6308), 114–117. https://doi.org/10.1126/science.aaf9284.
(22) Lemaire, O. N.; Jespersen, M.; Wagner, T. CO2-Fixation Strategies in Energy Extremophiles: What Can We Learn From Acetogens? *Front. Microbiol.* **2020**, *11*, 486. https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00486.
(23) Bertram, P. A.; Karrasch, M.; Schmitz, R. A.; Bocher, R.; Albracht, S. P. J.; Thauer, R. K. Formylmethanofuran Dehydrogenases from Methanogenic Archaea Substrate Specificity, EPR Properties and Reversible Inactivation by Cyanide of the Molybdenum or Tungsten Iron-Sulfur Proteins. *Eur J Biochem* **1994**, *220* (2), 477–484. https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1994.tb18646.x.
(24) Ragsdale, S. W.; Kumar, M. Nickel-Containing Carbon Monoxide Dehydrogenase/Acetyl-CoA Synthase [†,‡]. *Chem. Rev.* **1996**, *96* (7), 2515–2540. https://doi.org/10.1021/cr950058+.
(25) Lindahl, P. A. The Ni-Containing Carbon Monoxide Dehydrogenase Family: Light at the End of the Tunnel? [†]. *Biochemistry* **2002**, *41* (7), 2097–2105. https://doi.org/10.1021/bi015932+.
(26) Burton, R.; Can, M.; Esckilsen, D.; Wiley, S.; Ragsdale, S. W. Production and Properties of Enzymes That Activate and Produce Carbon Monoxide. In *Methods in Enzymology*; Elsevier, 2018; Vol. 613, pp 297–324. https://doi.org/10.1016/bs.mie.2018.10.005.
(27) Singer, S. W.; Hirst, M. B.; Ludden, P. W. CO-Dependent H2 Evolution by Rhodospirillum Rubrum: Role of CODH:CooF Complex. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **2006**, *1757* (12), 1582–1591. https://doi.org/10.1016/j.bbabio.2006.10.003.
(28) Abbanat, D. R.; Ferry, J. G. Resolution of Component Proteins in an Enzyme Complex from Methanosarcina Thermophila Catalyzing the Synthesis or Cleavage of Acetyl-CoA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1991**, *88* (8), 3272–3276. https://doi.org/10.1073/pnas.88.8.3272.
(29) Grahame, D. A. Catalysis of Acetyl-CoA Cleavage and Tetrahydrosarcinapterin Methylation by a Carbon Monoxide Dehydrogenase-Corrinoid Enzyme Complex. *Journal of Biological Chemistry* **1991**, *266* (33), 22227–22233. https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)54558-0.
(30) Hochheimer, A.; Linder, D.; Thauer, R. K.; Hedderich, R. The Molybdenum Formylmethanofuran Dehydrogenase Operon and the Tungsten Formylmethanofuran Dehydrogenase Operon from Methanobacterium Thermoautotrophicum. Structures and Transcriptional Regulation. *Eur J Biochem* **1996**, *242* (1), 156–162. https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1996.0156r.x.
(31) Thauer, R. K. Energy Metabolism of Methanogenic Bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1990**, *1018* (2–3), 256–259. https://doi.org/10.1016/0005-2728(90)90261-2.
(32) Boyington, J. C. Crystal Structure of Formate Dehydrogenase H: Catalysis Involving Mo, Molybdopterin, Selenocysteine, and an Fe4S4 Cluster. *Science* **1997**, *275* (5304), 1305–1308. https://doi.org/10.1126/science.275.5304.1305.
(33) Raaijmakers, H.; Macieira, S.; Dias, J. M.; Teixeira, S.; Bursakov, S.; Huber, R.; Moura, J. J. G.; Moura, I.; Romão, M. J. Gene Sequence and the 1.8 Å Crystal Structure of the Tungsten-Containing Formate Dehydrogenase from Desulfovibrio Gigas. *Structure* **2002**, *10* (9), 1261–1272. https://doi.org/10.1016/S0969-2126(02)00826-2.
(34) Maia, L. B.; Moura, J. J. G.; Moura, I. Molybdenum and Tungsten-Dependent Formate Dehydrogenases. *J Biol Inorg Chem* **2015**, *20* (2), 287–309. https://doi.org/10.1007/s00775-014-1218-2.
(35) Jormakka, M. Molecular Basis of Proton Motive Force Generation: Structure of Formate Dehydrogenase-N. *Science* **2002**, *295* (5561), 1863–1868. https://doi.org/10.1126/science.1068186.
(36) Schmitz, R. A.; Richter, M.; Linder, D.; Thauer, R. K. A Tungsten-Containing Active Formylmethanofuran Dehydrogenase in the Thermophilic Archaeon Methanobacterium

Wolfei. *Eur J Biochem* **1992**, *207* (2), 559–565. https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1992.tb17082.x.
(37) Durfor, C. N.; Wetherbee, P. J.; Deaton, J. C. BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS Pages 61-67. *BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS* **1983**, *115* (1), 7.
(38) Yamamoto, I.; Saiki, T.; Liu, S. M.; Ljungdahl, L. G. Purification and Properties of NADP-Dependent Formate Dehydrogenase from Clostridium Thermoaceticum, a Tungsten-Selenium-Iron Protein. *Journal of Biological Chemistry* **1983**, *258* (3), 1826–1832. https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)33062-X.
(39) Raaijmakers, H.; Teixeira, S.; Dias, J. M.; Almendra, M. J.; Brondino, C. D.; Moura, I.; Moura, J. J. G.; Romão, M. J. Tungsten-Containing Formate Dehydrogenase from Desulfovibrio Gigas: Metal Identification and Preliminary Structural Data by Multi-Wavelength Crystallography. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2001**, *6* (4), 398–404. https://doi.org/10.1007/s007750100215.
(40) Sebban, C.; Blanchard, L.; Bruschi, M.; Guerlesquin, F. Purification and Characterization of the Formate Dehydrogenase from *Desulfovibrio Vulgaris* Hildenborough. *FEMS Microbiology Letters* **1995**, *133* (1–2), 143–149. https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1995.tb07875.x.
(41) Borglin, S.; Joyner, D.; Jacobsen, J.; Mukhopadhyay, A.; Hazen, T. C. Overcoming the Anaerobic Hurdle in Phenotypic Microarrays: Generation and Visualization of Growth Curve Data for Desulfovibrio Vulgaris Hildenborough. *Journal of Microbiological Methods* **2009**, *76* (2), 159–168. https://doi.org/10.1016/j.mimet.2008.10.003.
(42) Laukel, M.; Chistoserdova, L.; Lidstrom, M. E.; Vorholt, J. A. The Tungsten-Containing Formate Dehydrogenase from Methylobacterium Extorquens AM1: Purification and Properties. *Eur J Biochem* **2003**, *270* (2), 325–333. https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2003.03391.x.
(43) Rusching, U.; Muller, U.; Willnow, P.; Hopner, T. CO2 Reduction to Formate by NADH Catalysed by Formate Dehydrogenase from Pseudomonas Oxalaticus. *Eur J Biochem* **1976**, *70* (2), 325–330. https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1976.tb11021.x.
(44) Liu, C. L.; Mortenson, L. E. Formate Dehydrogenase of Clostridium Pasteurianum. *Journal of Bacteriology* **1984**, *159* (1), 375–380. https://doi.org/10.1128/JB.159.1.375-380.1984.
(45) Hille, R.; Hall, J.; Basu, P. The Mononuclear Molybdenum Enzymes. *Chem. Rev.* **2014**, *114* (7), 3963–4038. https://doi.org/10.1021/cr400443z.
(46) Brosnan, M. E.; Brosnan, J. T. Formate: The Neglected Member of One-Carbon Metabolism. *Annu. Rev. Nutr.* **2016**, *36* (1), 369–388. https://doi.org/10.1146/annurev-nutr-071715-050738.
(47) Alekseeva, A. A.; Savin, S. S.; Tishkov, V. I. NAD+-Dependent Formate Dehydrogenase from Plants. *Acta Naturae* **2011**, *3* (4), 38–54. https://doi.org/10.32607/20758251-2011-3-4-38-54.
(48) Nielsen, C. F.; Lange, L.; Meyer, A. S. Classification and Enzyme Kinetics of Formate Dehydrogenases for Biomanufacturing via CO2 Utilization. *Biotechnology Advances* **2019**, *37* (7), 107408. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.06.007.
(49) Maia, L. B.; Fonseca, L.; Moura, I.; Moura, J. J. G. Reduction of Carbon Dioxide by a Molybdenum-Containing Formate Dehydrogenase: A Kinetic and Mechanistic Study. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138* (28), 8834–8846. https://doi.org/10.1021/jacs.6b03941.
(50) Bassegoda, A.; Madden, C.; Wakerley, D. W.; Reisner, E.; Hirst, J. Reversible Interconversion of CO_2 and Formate by a Molybdenum-Containing Formate Dehydrogenase. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136* (44), 15473–15476. https://doi.org/10.1021/ja508647u.
(51) Schuchmann, K.; Muller, V. Direct and Reversible Hydrogenation of CO2 to Formate by a Bacterial Carbon Dioxide Reductase. *Science* **2013**, *342* (6164), 1382–1385. https://doi.org/10.1126/science.1244758.
(52) Choe, H.; Joo, J. C.; Cho, D. H.; Kim, M. H.; Lee, S. H.; Jung, K. D.; Kim, Y. H. Efficient CO2-Reducing Activity of NAD-Dependent Formate Dehydrogenase from Thiobacillus Sp.

KNK65MA for Formate Production from CO2 Gas. *PLoS ONE* **2014**, *9* (7), e103111. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103111.

(53) Yu, X.; Niks, D.; Mulchandani, A.; Hille, R. Efficient Reduction of CO_2 by the Molybdenum-Containing Formate Dehydrogenase from *Cupriavidus Necator* (*Ralstonia Eutropha*). *J. Biol. Chem.* **2017**, *292* (41), 16872–16879. https://doi.org/10.1074/jbc.M117.785576.

(54) Altaş, N.; Aslan, A. S.; Karataş, E.; Chronopoulou, E.; Labrou, N. E.; Binay, B. Heterologous Production of Extreme Alkaline Thermostable NAD + -Dependent Formate Dehydrogenase with Wide-Range PH Activity from Myceliophthora Thermophila. *Process Biochemistry* **2017**, *61*, 110–118. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2017.06.017.

(55) Jormakka, M.; Byrne, B.; Iwata, S. Formate Dehydrogenase – a Versatile Enzyme in Changing Environments. *Current Opinion in Structural Biology* **2003**, *13* (4), 418–423. https://doi.org/10.1016/S0959-440X(03)00098-8.

(56) Khangulov, S. V.; Gladyshev, V. N.; Dismukes, G. C.; Stadtman, T. C. Selenium-Containing Formate Dehydrogenase H from *Escherichia Coli* : A Molybdopterin Enzyme That Catalyzes Formate Oxidation without Oxygen Transfer. *Biochemistry* **1998**, *37* (10), 3518–3528. https://doi.org/10.1021/bi972177k.

(57) Radon, C.; Mittelstädt, G.; Duffus, B. R.; Bürger, J.; Hartmann, T.; Mielke, T.; Teutloff, C.; Leimkühler, S.; Wendler, P. Cryo-EM Structures Reveal Intricate Fe-S Cluster Arrangement and Charging in Rhodobacter Capsulatus Formate Dehydrogenase. *Nat Commun* **2020**, *11* (1), 1912. https://doi.org/10.1038/s41467-020-15614-0.

(58) Hartmann, T.; Schwanhold, N.; Leimkühler, S. Assembly and Catalysis of Molybdenum or Tungsten-Containing Formate Dehydrogenases from Bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* **2015**, *1854* (9), 1090–1100. https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2014.12.006.

(59) Niks, D.; Hille, R. Molybdenum- and Tungsten-Containing Formate Dehydrogenases and Formylmethanofuran Dehydrogenases: Structure, Mechanism, and Cofactor Insertion: Molybdenum- and Tungsten-Containing Enzymes. *Protein Science* **2019**, *28* (1), 111–122. https://doi.org/10.1002/pro.3498.

(60) Bak, D. W.; Elliott, S. J. Alternative FeS Cluster Ligands: Tuning Redox Potentials and Chemistry. *Current Opinion in Chemical Biology* **2014**, *19*, 50–58. https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2013.12.015.

(61) Balk, J.; Lobréaux, S. Biogenesis of Iron–Sulfur Proteins in Plants. *Trends in Plant Science* **2005**, *10* (7), 324–331. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2005.05.002.

(62) Ayala-Castro, C.; Saini, A.; Outten, F. W. Fe-S Cluster Assembly Pathways in Bacteria. *MMBR* **2008**, *72* (1), 110–125. https://doi.org/10.1128/MMBR.00034-07.

(63) Frazzon, J. Formation of Iron–Sulfur Clusters in Bacteria: An Emerging Field in Bioinorganic Chemistry. *Current Opinion in Chemical Biology* **2003**, *7* (2), 166–173. https://doi.org/10.1016/S1367-5931(03)00021-8.

(64) Nakamaru-Ogiso, E.; Matsuno-Yagi, A.; Yoshikawa, S.; Yagi, T.; Ohnishi, T. Iron-Sulfur Cluster N5 Is Coordinated by an H *XXX* C *XX* C *XXXXX* C Motif in the NuoG Subunit of *Escherichia Coli* NADH:Quinone Oxidoreductase (Complex I). *J. Biol. Chem.* **2008**, *283* (38), 25979–25987. https://doi.org/10.1074/jbc.M804015200.

(65) Bandyopadhyay, S.; Chandramouli, K.; Johnson, M. K. Iron–Sulfur Cluster Biosynthesis. *Biochemical Society Transactions* **2008**, *36* (6), 1112–1119. https://doi.org/10.1042/BST0361112.

(66) Fontecave, M.; Choudens, S. O. de; Py, B.; Barras, F. Mechanisms of Iron–Sulfur Cluster Assembly: The SUF Machinery. *J Biol Inorg Chem* **2005**, *10* (7), 713–721. https://doi.org/10.1007/s00775-005-0025-1.

(67) Fontecave, M.; Ollagnier-de-Choudens, S. Iron–Sulfur Cluster Biosynthesis in Bacteria: Mechanisms of Cluster Assembly and Transfer. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **2008**, *474* (2), 226–237. https://doi.org/10.1016/j.abb.2007.12.014.

(68) Johnson, D. C.; Dean, D. R.; Smith, A. D.; Johnson, M. K. STRUCTURE, FUNCTION, AND FORMATION OF BIOLOGICAL IRON-SULFUR CLUSTERS. *Annu. Rev. Biochem.* **2005**, *74* (1), 247–281. https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.74.082803.133518.
(69) di Maio, D.; Chandramouli, B.; Yan, R.; Brancato, G.; Pastore, A. Understanding the Role of Dynamics in the Iron Sulfur Cluster Molecular Machine. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **2017**, *1861* (1), 3154–3163. https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2016.07.020.
(70) Bak, D. W.; Zuris, J. A.; Paddock, M. L.; Jennings, P. A.; Elliott, S. J. Redox Characterization of the FeS Protein MitoNEET and Impact of Thiazolidinedione Drug Binding. *Biochemistry* **2009**, *48* (43), 10193–10195. https://doi.org/10.1021/bi9016445.
(71) Zu, Y.; Couture, M. M.-J.; Kolling, D. R. J.; Crofts, A. R.; Eltis, L. D.; Fee, J. A.; Hirst, J. Reduction Potentials of Rieske Clusters: Importance of the Coupling between Oxidation State and Histidine Protonation State. *Biochemistry* **2003**, *42* (42), 12400–12408. https://doi.org/10.1021/bi0350957.
(72) Magliozzo, R. S.; McIntosh, B. A.; Sweeney, W. V. Origin of the PH Dependence of the Midpoint Reduction Potential in Clostridium Pasteurianum Ferredoxin:Oxidation State-Dependent Hydrogen Ion Association. *Journal of Biological Chemistry* **1982**, *257* (7), 3506–3509. https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)34807-5.
(73) Rothery, R. A.; Bertero, M. G.; Cammack, R.; Palak, M.; Blasco, F.; Strynadka, N. C. J.; Weiner, J. H. The Catalytic Subunit of *Escherichia Coli* Nitrate Reductase A Contains a Novel [4Fe-4S] Cluster with a High-Spin Ground State ′. *Biochemistry* **2004**, *43* (18), 5324–5333. https://doi.org/10.1021/bi049938l.
(74) George, S. J.; Armstrong, F. A. Electrochemical and Spectroscopic Characterization of the Conversion of the 7Fe into the 8Fe Form of Ferredoxin III from Desulfovibrio Africanus. **1989**, *264*, 10.
(75) Broach, R. B.; Jarrett, J. T. The Role of the [2Fe-2S]2+ Cluster in Biotin Synthase: **2008**, 22.
(76) Bak, D. W.; Elliott, S. J. Conserved Hydrogen Bonding Networks of MitoNEET Tune Fe-S Cluster Binding and Structural Stability. *Biochemistry* **2013**, *52* (27), 4687–4696. https://doi.org/10.1021/bi400540m.
(77) Nechushtai, R.; Conlan, A. R.; Harir, Y.; Song, L.; Yogev, O.; Eisenberg-Domovich, Y.; Livnah, O.; Michaeli, D.; Rosen, R.; Ma, V.; Luo, Y.; Zuris, J. A.; Paddock, M. L.; Cabantchik, Z. I.; Jennings, P. A.; Mittler, R. Characterization of *Arabidopsis* NEET Reveals an Ancient Role for NEET Proteins in Iron Metabolism. *Plant Cell* **2012**, *24* (5), 2139–2154. https://doi.org/10.1105/tpc.112.097634.
(78) Magalon, A.; Asso, M.; Guigliarelli, B.; Rothery, R. A.; Bertrand, P.; Giordano, G.; Blasco, F. Molybdenum Cofactor Properties and [Fe-S] Cluster Coordination in *Escherichia c Oli* Nitrate Reductase A: Investigation by Site-Directed Mutagenesis of the Conserved His-50 Residue in the NarG Subunit. *Biochemistry* **1998**, *37* (20), 7363–7370. https://doi.org/10.1021/bi972858f.
(79) Busch, J. L. H.; Breton, J. L.; Bartlett, B. M.; Armstrong, F. A.; James, R.; Thomson, A. J. [3Fe-4S]↔[4Fe-4S] Cluster Interconversion in Desulfovibrio Africanus Ferredoxin III: Properties of an Asp14→Cys Mutant. *Biochemical Journal* **1997**, *323* (1), 95–102. https://doi.org/10.1042/bj3230095.
(80) Mitra, S.; Elliott, S. J. Oxidative Disassembly of the [2Fe-2S] Cluster of Human Grx2 and Redox Regulation in the Mitochondria. *Biochemistry* **2009**, *48* (18), 3813–3815. https://doi.org/10.1021/bi900112m.
(81) Cotruvo, J. A. The Chemistry of Lanthanides in Biology: Recent Discoveries, Emerging Principles, and Technological Applications. *ACS Cent. Sci.* **2019**, *5* (9), 1496–1506. https://doi.org/10.1021/acscentsci.9b00642.
(82) Brondino, C. D.; Passeggi, M. C. G.; Caldeira, J.; Almendra, M. J.; Feio, M. J.; Moura, J. J. G.; Moura, I. Incorporation of Either Molybdenum or Tungsten into Formate Dehydrogenase from Desulfovibrio Alaskensis NCIMB 13491; EPR Assignment of the Proximal Iron-Sulfur

Cluster to the Pterin Cofactor in Formate Dehydrogenases from Sulfate-Reducing Bacteria. *J Biol Inorg Chem* **2004**, *9* (2), 145–151. https://doi.org/10.1007/s00775-003-0506-z.

(83) Seelmann, C. S.; Willistein, M.; Heider, J.; Boll, M. Tungstoenzymes: Occurrence, Catalytic Diversity and Cofactor Synthesis. *Inorganics* **2020**, *8* (8), 44. https://doi.org/10.3390/inorganics8080044.

(84) Hagen, W. R. Cellular Uptake of Molybdenum and Tungsten. *Coordination Chemistry Reviews* **2011**, *255* (9–10), 1117–1128. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.02.009.

(85) Moura, J. J. G.; Brondino, C. D.; Trinc**?**o, J.; Rom**?**o, M. J. Mo and W Bis-MGD Enzymes: Nitrate Reductases and Formate Dehydrogenases. *J Biol Inorg Chem* **2004**, *9* (7), 791–799. https://doi.org/10.1007/s00775-004-0573-9.

(86) Niks, D.; Hille, R. Molybdenum-Containing Enzymes. In *Metalloproteins*; Hu, Y., Ed.; Methods in Molecular Biology; Springer New York: New York, NY, 2019; Vol. 1876, pp 55–63. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8864-8_4.

(87) Grimaldi, S.; Schoepp-Cothenet, B.; Ceccaldi, P.; Guigliarelli, B.; Magalon, A. The Prokaryotic Mo/W-BisPGD Enzymes Family: A Catalytic Workhorse in Bioenergetic. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **2013**, *1827* (8–9), 1048–1085. https://doi.org/10.1016/j.bbabio.2013.01.011.

(88) May, H. D.; Patel, P. S.; Ferry, J. G. Effect of Molybdenum and Tungsten on Synthesis and Composition of Formate Dehydrogenase in Methanobacterium Formicicum. *Journal of Bacteriology* **1988**, *170* (8), 3384–3389. https://doi.org/10.1128/JB.170.8.3384-3389.1988.

(89) Mota, C. S.; Valette, O.; González, P. J.; Brondino, C. D.; Moura, J. J. G.; Moura, I.; Dolla, A.; Rivas, M. G. Effects of Molybdate and Tungstate on Expression Levels and Biochemical Characteristics of Formate Dehydrogenases Produced by Desulfovibrio Alaskensis NCIMB 13491. *J Bacteriol* **2011**, *193* (12), 2917–2923. https://doi.org/10.1128/JB.01531-10.

(90) Shaw, F. L.; Mulholland, F.; Le Gall, G.; Porcelli, I.; Hart, D. J.; Pearson, B. M.; van Vliet, A. H. M. Selenium-Dependent Biogenesis of Formate Dehydrogenase in *Campylobacter Jejuni* Is Controlled by the *FdhTU* Accessory Genes. *J Bacteriol* **2012**, *194* (15), 3814–3823. https://doi.org/10.1128/JB.06586-11.

(91) Taylor, A. J.; Kelly, D. J. The Function, Biogenesis and Regulation of the Electron Transport Chains in Campylobacter Jejuni. In *Advances in Microbial Physiology*; Elsevier, 2019; Vol. 74, pp 239–329. https://doi.org/10.1016/bs.ampbs.2019.02.003.

(92) Oliveira, A. R.; Mota, C.; Mourato, C.; Domingos, R. M.; Santos, M. F. A.; Gesto, D.; Guigliarelli, B.; Santos-Silva, T.; Romão, M. J.; Cardoso Pereira, I. A. Toward the Mechanistic Understanding of Enzymatic CO_2 Reduction. *ACS Catal.* **2020**, *10* (6), 3844–3856. https://doi.org/10.1021/acscatal.0c00086.

(93) Andreesen, J. R.; Makdessi, K. Tungsten, the Surprisingly Positively Acting Heavy Metal Element for Prokaryotes. *Annals of the New York Academy of Sciences* **2008**, *1125* (1), 215–229. https://doi.org/10.1196/annals.1419.003.

(94) Costa, C.; Teixeira, M.; LeGall, J.; Moura, J. J. G.; Moura, I. Formate Dehydrogenase from Desulfovibrio Desulfuricans ATCC 27774: Isolation and Spectroscopic Characterization of the Active Sites (Heme, Iron-Sulfur Centers and Molybdenum). *J Biol Inorg Chem* **1997**, *2* (2), 198–208. https://doi.org/10.1007/s007750050125.

(95) Niks, D.; Duvvuru, J.; Escalona, M.; Hille, R. Spectroscopic and Kinetic Properties of the Molybdenum-Containing, NAD^+-Dependent Formate Dehydrogenase from *Ralstonia Eutropha*. *J. Biol. Chem.* **2016**, *291* (3), 1162–1174. https://doi.org/10.1074/jbc.M115.688457.

(96) Hille, R.; Young, T.; Niks, D.; Hakopian, S.; Tam, T. K.; Yu, X.; Mulchandani, A.; Blaha, G. M. Structure: Function Studies of the Cytosolic, Mo- and NAD+-Dependent Formate Dehydrogenase from Cupriavidus Necator. *Inorganics* **2020**, *8* (7), 41. https://doi.org/10.3390/inorganics8070041.

(97) Jollie, D. R.; Lipscomb, J. D. Formate Dehydrogenase from Methylosinus Trichosporium OB3b. In *Journal of Biological Chemistry*; Elsevier, 1991; Vol. 188, pp 21853–21863. https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)88051-B.

(98) Barber, M. J.; Siegel, L. M.; Schauer, N. L.; May, H. D.; Ferry, J. G. Formate Dehydrogenase from Methanobacterium Formicicum. Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy of the Molybdenum and Iron-Sulfur Centers. *Journal of Biological Chemistry* **1983**, *258* (18), 10839–10845. https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)44351-1.

(99) Cerqueira, N. M. F. S. A.; Gonzalez, P. J.; Fernandes, P. A.; Moura, J. J. G.; Ramos, M. J. Periplasmic Nitrate Reductase and Formate Dehydrogenase: Similar Molecular Architectures with Very Different Enzymatic Activities. *Acc. Chem. Res.* **2015**, *48* (11), 2875–2884. https://doi.org/10.1021/acs.accounts.5b00333.

(100) Rothery, R. A.; Stein, B.; Solomonson, M.; Kirk, M. L.; Weiner, J. H. Pyranopterin Conformation Defines the Function of Molybdenum and Tungsten Enzymes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2012**, *109* (37), 14773–14778. https://doi.org/10.1073/pnas.1200671109.

(101) Glaser, P.; Danchin, A.; Kunst, F.; Zuber, P.; Nakano, M. M. Identification and Isolation of a Gene Required for Nitrate Assimilation and Anaerobic Growth of Bacillus Subtilis. *J Bacteriol* **1995**, *177* (4), 1112–1115. https://doi.org/10.1128/jb.177.4.1112-1115.1995.

(102) Nakano, M. M.; Hulett, F. M. Adaptation of Bacillus Subtilis to Oxygen Limitation. *FEMS Microbiology Letters* **2006**, *157* (1), 1–7. https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1997.tb12744.x.

(103) Vavrová, Ľ.; Muchová, K.; Barák, I. Comparison of Different Bacillus Subtilis Expression Systems. *Research in Microbiology* **2010**, *161* (9), 791–797. https://doi.org/10.1016/j.resmic.2010.09.004.

(104) Nakano, M. M.; Zuber, P. ANAEROBIC GROWTH OF A "STRICT AEROBE" (*BACILLUS SUBTILIS*). *Annu. Rev. Microbiol.* **1998**, *52* (1), 165–190. https://doi.org/10.1146/annurev.micro.52.1.165.

(105) Cruz Ramos, H.; Boursier, L.; Moszer, I.; Kunst, F.; Danchin, A.; Glaser, P. Anaerobic Transcription Activation in Bacillus Subtilis: Identification of Distinct FNR-Dependent and -Independent Regulatory Mechanisms. *The EMBO Journal* **1995**, *14* (23), 5984–5994. https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1995.tb00287.x.

(106) Hoffmann, T.; Troup, B.; Szabo, A.; Hungerer, C.; Jahn, D. The Anaerobic Life of *Bacillus Subtilis* : Cloning of the Genes Encoding the Respiratory Nitrate Reductase System. *FEMS Microbiology Letters* **1995**, *131* (2), 219–225. https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1995.tb07780.x.

(107) LaCelle, M.; Kumano, M.; Kurita, K.; Yamane, K.; Zuber, P.; Nakano, M. M. Oxygen-Controlled Regulation of the Flavohemoglobin Gene in Bacillus Subtilis. *J Bacteriol* **1996**, *178* (13), 3803–3808. https://doi.org/10.1128/jb.178.13.3803-3808.1996.

(108) Nakano, M. M.; Zuber, P.; Glaser, P.; Danchin, A.; Hulett, F. M. Two-Component Regulatory Proteins ResD-ResE Are Required for Transcriptional Activation of Fnr upon Oxygen Limitation in Bacillus Subtilis. *J Bacteriol* **1996**, *178* (13), 3796–3802. https://doi.org/10.1128/jb.178.13.3796-3802.1996.

(109) Front Matter. In *Bacillus subtilis and Other Gram-Positive Bacteria*; Sonenshein, A. L., Hoch, J. A., Losick, R., Eds.; ASM Press: Washington, DC, USA, 2014; pp i–xiii. https://doi.org/10.1128/9781555818388.fmatter.

(110) Sun, G.; Sharkova, E.; Chesnut, R.; Birkey, S.; Duggan, M. F.; Sorokin, A.; Pujic, P.; Ehrlich, S. D.; Hulett, F. M. Regulators of Aerobic and Anaerobic Respiration in Bacillus Subtilis. *J Bacteriol* **1996**, *178* (5), 1374–1385. https://doi.org/10.1128/jb.178.5.1374-1385.1996.

(111) Lehnik-Habrink, M.; Schaffer, M.; Mäder, U.; Diethmaier, C.; Herzberg, C.; Stülke, J. RNA Processing in Bacillus Subtilis: Identification of Targets of the Essential RNase Y: Targets of the Essential RNase Y in Bacillus Subtilis. *Molecular Microbiology* **2011**, *81* (6), 1459–1473. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07777.x.

(112) Petersohn, A.; Brigulla, M.; Haas, S.; Hoheisel, J. D.; Völker, U.; Hecker, M. Global Analysis of the General Stress Response of *Bacillus Subtilis*. *J Bacteriol* **2001**, *183* (19), 5617–5631. https://doi.org/10.1128/JB.183.19.5617-5631.2001.
(113) Nicolas, P.; Mader, U.; Dervyn, E.; Rochat, T.; Leduc, A.; Pigeonneau, N.; Bidnenko, E.; Marchadier, E.; Hoebeke, M.; Aymerich, S.; Becher, D.; Bisicchia, P.; Botella, E.; Delumeau, O.; Doherty, G.; Denham, E. L.; Fogg, M. J.; Fromion, V.; Goelzer, A.; Hansen, A.; Hartig, E.; Harwood, C. R.; Homuth, G.; Jarmer, H.; Jules, M.; Klipp, E.; Le Chat, L.; Lecointe, F.; Lewis, P.; Liebermeister, W.; March, A.; Mars, R. A. T.; Nannapaneni, P.; Noone, D.; Pohl, S.; Rinn, B.; Rugheimer, F.; Sappa, P. K.; Samson, F.; Schaffer, M.; Schwikowski, B.; Steil, L.; Stulke, J.; Wiegert, T.; Devine, K. M.; Wilkinson, A. J.; Maarten van Dijl, J.; Hecker, M.; Volker, U.; Bessieres, P.; Noirot, P. Condition-Dependent Transcriptome Reveals High-Level Regulatory Architecture in Bacillus Subtilis. *Science* **2012**, *335* (6072), 1103–1106. https://doi.org/10.1126/science.1206848.
(114) Symbolism and Terminology in Enzyme Kinetics Recommendations 1981: Recommendations 1981. *European Journal of Biochemistry* **2005**, *128* (2–3), 281–291. https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1982.tb06963.x.
(115) Briggs, G. E.; Haldane, J. B. S. L. A NOTE ON THE KINETICS OF ENZYME ACTION. 2.
(116) Briggs, G. E. A- 5~CXLIX. A FURTHER NOTE ON THE KINETICS OF ENZYME ACTION. 2.
(117) Stoll, S.; Schweiger, A. EasySpin, a Comprehensive Software Package for Spectral Simulation and Analysis in EPR. *Journal of Magnetic Resonance* **2006**, *178* (1), 42–55. https://doi.org/10.1016/j.jmr.2005.08.013.
(118) Hahn, E. L. Spin Echoes. *Phys. Rev.* **1950**, *80* (4), 580–594. https://doi.org/10.1103/PhysRev.80.580.
(119) Rowan, L. G.; Hahn, E. L.; Mims, W. B. Electron-Spin-Echo Envelope Modulation. *Phys. Rev.* **1965**, *137* (1A), A61–A71. https://doi.org/10.1103/PhysRev.137.A61.
(120) Mims, W. B. Envelope Modulation in Spin-Echo Experiments. *Phys. Rev. B* **1972**, *5* (7), 2409–2419. https://doi.org/10.1103/PhysRevB.5.2409.
(121) Höfer, P.; Grupp, A.; Nebenführ, H.; Mehring, M. Hyperfine Sublevel Correlation (Hyscore) Spectroscopy: A 2D ESR Investigation of the Squaric Acid Radical. *Chemical Physics Letters* **1986**, *132* (3), 279–282. https://doi.org/10.1016/0009-2614(86)80124-5.
(122) *High Resolution EPR*; Berliner, L., Hanson, G., Eds.; Biological Magnetic Resonance; Springer New York: New York, NY, 2009; Vol. 28. https://doi.org/10.1007/978-0-387-84856-3.
(123) Eichel, R.-A. Characterization of Defect Structure in Acceptor-Modified Piezoelectric Ceramics by Multifrequency and Multipulse Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy. *J American Ceramic Society* **2008**, *91* (3), 691–701. https://doi.org/10.1111/j.1551-2916.2008.02303.x.
(124) Dikanov, S. A.; Bogumil, R.; Witzel, H. Characterization of Histidine Coordination in V02+-Substituted D-Xylose Isomerase by Orientationally-Selected Electron Spin-Echo Envelope Modulation Spectroscopy. 11.
(125) Reijerse, E. J.; Keijzers, C. P. Model Calculations of Frequency-Domain ESEEM Spectra of Disordered Systems. *Journal of Magnetic Resonance (1969)* **1987**, *71* (1), 83–96. https://doi.org/10.1016/0022-2364(87)90129-6.
(126) Flanagan, H. L.; Singel, D. J. Electron Spin Echo Envelope Modulation Amplitudes: A Perturbation Treatment of *I* =1 Nuclei in Extreme Quadrupole Coupling Limits. *The Journal of Chemical Physics* **1988**, *89* (4), 2585–2586. https://doi.org/10.1063/1.455054.
(127) Flanagan, H. L.; Singel, D. J. Analysis of $^{1\,4}$ N ESEEM Patterns of Randomly Oriented Solids. *The Journal of Chemical Physics* **1987**, *87* (10), 5606–5616. https://doi.org/10.1063/1.453532.
(128) Pöppl, A.; Böttcher, R. Cross Peak Intensities in Two-Dimensional Four-Pulse Electron Spin Echo Modulation Spectra of Deuteriums in Single Crystals. *Chemical Physics* **1997**, *221* (1–2), 53–66. https://doi.org/10.1016/S0301-0104(97)00166-3.

(129) Gemperle, C.; Aebli, G.; Schweiger, A.; Ernst, R. R. Phase Cycling in Pulse EPR. *Journal of Magnetic Resonance (1969)* **1990**, *88* (2), 241–256. https://doi.org/10.1016/0022-2364(90)90181-8.

(130) Lanciano, P.; Savoyant, A.; Grimaldi, S.; Magalon, A.; Guigliarelli, B.; Bertrand, P. 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* **2007**, *111* (48), 13632–13637. https://doi.org/10.1021/jp075243t.

(131) Durfor, C. N.; Wetherbee, P. J.; Deaton, J. C. BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS Pages 61-67. *BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS* **1983**, *115* (1), 7.

(132) Duarte, R. O.; Reis, A. R.; Gírio, F.; Moura, I.; Moura, J. J. G.; Collaço, T. A. The Formate Dehydrogenase Isolated from the AerobeMethylobacteriumsp. RXM Is a Molybdenum-Containing Protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1997**, *230* (1), 30–34. https://doi.org/10.1006/bbrc.1996.5879.

(133) Prince, R. C. Formate Dehydrogenase from Chstridizm ~~~~e~~i~~~~. *FEBS LETTERS* **1985**, *189* (2), 4.

(134) Godfrey, C.; Coddington, A.; Greenwood, C.; Thomson, A. J.; Gadsby, P. M. A. Purification and Properties of Formate Dehydrogenase from Pseudomonas Aeruginosa. Characterization of Haem and Iron-Sulphur Centres by Magnetic-Circular-Dichroism and Electron-Paramagnetic-Resonance Spectroscopy. *Biochemical Journal* **1987**, *243* (1), 225–233. https://doi.org/10.1042/bj2430225.

(135) de Bok, F. A. M.; Hagedoorn, P.-L.; Silva, P. J.; Hagen, W. R.; Schiltz, E.; Fritsche, K.; Stams, A. J. M. Two W-Containing Formate Dehydrogenases (CO2-Reductases) Involved in Syntrophic Propionate Oxidation by Syntrophobacter Fumaroxidans. *Eur J Biochem* **2003**, *270* (11), 2476–2485. https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2003.03619.x.

(136) Arias-Cartín, R.; Uzel, A.; Seduk, F.; Gerbaud, G.; Pierrel, F.; Broc, M.; Lebrun, R.; Guigliarelli, B.; Magalon, A.; Grimaldi, S.; Walburger, A. Identification and Characterization of a Noncanonical Menaquinone-Linked Formate Dehydrogenase. *Journal of Biological Chemistry* **2022**, *298* (2), 101384. https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.101384.

(137) Rothery, R. A.; Bertero, M. G.; Cammack, R.; Palak, M.; Blasco, F.; Strynadka, N. C. J.; Weiner, J. H. The Catalytic Subunit of *Escherichia Coli* Nitrate Reductase A Contains a Novel [4Fe-4S] Cluster with a High-Spin Ground State †,‡. *Biochemistry* **2004**, *43* (18), 5324–5333. https://doi.org/10.1021/bi049938l.

(138) Ceccaldi, P.; Rendon, J.; Léger, C.; Toci, R.; Guigliarelli, B.; Magalon, A.; Grimaldi, S.; Fourmond, V. Reductive Activation of E. Coli Respiratory Nitrate Reductase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **2015**, *1847* (10), 1055–1063. https://doi.org/10.1016/j.bbabio.2015.06.007.

(139) Bray, R. C.; Vänngård, T. 'Rapidly Appearing' Molybdenum Electron-Paramagnetic-Resonance Signals from Reduced Xanthine Oxidase. *Biochemical Journal* **1969**, *114* (4), 725–734. https://doi.org/10.1042/bj1140725.

(140) Bennett, B.; Benson, N.; McEwan, A. G.; Bray, R. C. Multiple States of the Molybdenum Centre of Dimethylsulphoxide Reductase from Rhodobacter Capsulatus Revealed by EPR Spectroscopy. *Eur J Biochem* **1994**, *225* (1), 321–331. https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1994.00321.x.

(141) Raaijmakers, H. C. A.; Romão, M. J. Formate-Reduced E. Coli Formate Dehydrogenase H: The Reinterpretation of the Crystal Structure Suggests a New Reaction Mechanism. *J Biol Inorg Chem* **2006**, *11* (7), 849–854. https://doi.org/10.1007/s00775-006-0129-2.

(142) Rendon, J.; Biaso, F.; Ceccaldi, P.; Toci, R.; Seduk, F.; Magalon, A.; Guigliarelli, B.; Grimaldi, S. Elucidating the Structures of the Low- and High-PH Mo(V) Species in Respiratory Nitrate Reductase: A Combined EPR, ^{14,15} N HYSCORE, and DFT Study. *Inorg. Chem.* **2017**, *56* (8), 4422–4434. https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.6b03129.

(143) Cordas, C. M.; Moura, J. J. G. Molybdenum and Tungsten Enzymes Redox Properties – A Brief Overview. *Coordination Chemistry Reviews* **2019**, *394*, 53–64. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2019.05.005.
(144) Biaso, F.; Burlat, B.; Guigliarelli, B. DFT Investigation of the Molybdenum Cofactor in Periplasmic Nitrate Reductases: Structure of the Mo(V) EPR-Active Species. *Inorg. Chem.* **2012**, *51* (6), 3409–3419. https://doi.org/10.1021/ic201533p.
(145) Sato, T.; Yamada, Y.; Ohtani, Y.; Araki, S. Production of Menaquinone (Vitamin K2)-7 by Bacillus Subtilis. 5.
(146) Grimaldi, S.; Lanciano, P.; Bertrand, P.; Blasco, F.; Guigliarelli, B. Evidence for an EPR-Detectable Semiquinone Intermediate Stabilized in the Membrane-Bound Subunit NarI of Nitrate Reductase A (NarGHI) from *Escherichia Coli*. *Biochemistry* **2005**, *44* (4), 1300–1308. https://doi.org/10.1021/bi048009r.
(147) Lanciano, P.; Magalon, A.; Bertrand, P.; Guigliarelli, B.; Grimaldi, S. High-Stability Semiquinone Intermediate in Nitrate Reductase A (NarGHI) from *Escherichia Coli* Is Located in a Quinol Oxidation Site Close to Heme b_D. *Biochemistry* **2007**, *46* (18), 5323–5329. https://doi.org/10.1021/bi700074y.
(148) Rendon, J.; Pilet, E.; Fahs, Z.; Seduk, F.; Sylvi, L.; Hajj Chehade, M.; Pierrel, F.; Guigliarelli, B.; Magalon, A.; Grimaldi, S. Demethylmenaquinol Is a Substrate of Escherichia Coli Nitrate Reductase A (NarGHI) and Forms a Stable Semiquinone Intermediate at the NarGHI Quinol Oxidation Site. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **2015**, *1847* (8), 739–747. https://doi.org/10.1016/j.bbabio.2015.05.001.
(149) Seif Eddine, M.; Biaso, F.; Arias-Cartin, R.; Pilet, E.; Rendon, J.; Lyubenova, S.; Seduk, F.; Guigliarelli, B.; Magalon, A.; Grimaldi, S. Probing the Menasemiquinone Binding Mode to Nitrate Reductase A by Selective ^{2}H and ^{15}N Labeling, HYSCORE Spectroscopy, and DFT Modeling. *ChemPhysChem* **2017**, *18* (19), 2704–2714. https://doi.org/10.1002/cphc.201700571.
(150) Seif Eddine, M.; Biaso, F.; Rendon, J.; Pilet, E.; Guigliarelli, B.; Magalon, A.; Grimaldi, S. 1,2H Hyperfine Spectroscopy and DFT Modeling Unveil the Demethylmenasemiquinone Binding Mode to E. Coli Nitrate Reductase A (NarGHI). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **2020**, *1861* (8), 148203. https://doi.org/10.1016/j.bbabio.2020.148203.
(151) Grimaldi, S.; Ostermann, T.; Weiden, N.; Mogi, T.; Miyoshi, H.; Ludwig, B.; Michel, H.; Prisner, T. F.; MacMillan, F. Asymmetric Binding of the High-Affinity $Q_H^{\bullet -}$ Ubisemiquinone in Quinol Oxidase (Bo_3) from *Escherichia Coli* Studied by Multifrequency Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy. *Biochemistry* **2003**, *42* (19), 5632–5639. https://doi.org/10.1021/bi034010z.
(152) Dorlet, P.; Rutherford, A. W.; Un, S. Orientation of the Tyrosyl D, Pheophytin Anion, and Semiquinone $Q_A^{\bullet -}$ Radicals in Photosystem II Determined by High-Field Electron Paramagnetic Resonance. *Biochemistry* **2000**, *39* (26), 7826–7834. https://doi.org/10.1021/bi000175l.
(153) Hanley, J.; Deligiannakis, Y.; MacMillan, F.; Bottin, H.; Rutherford, A. W. ESEEM Study of the Phyllosemiquinone Radical $A_1^{\bullet -}$ in ^{14}N- and ^{15}N-Labeled Photosystem I $^{+}$. *Biochemistry* **1997**, *36* (39), 11543–11549. https://doi.org/10.1021/bi971360a.
(154) Plato, M.; Rohrer, M.; Mobius', K. 3-Mm High-Field EPR on Semiquinone Radical Anions Q'-Related to Photosynthesis and on the Primary Donor P*+and Acceptor QA*i-n Reaction Centers of Rhodobacter Sphaeroides R-26. 9.
(155) Isaacson, R. A.; Lendzian, F.; Abresch, E. C.; Lubitz, W.; Feher, G. Electronic Structure of Q-A in Reaction Centers from Rhodobacter Sphaeroides. I. Electron Paramagnetic Resonance in Single Crystals. *Biophysical Journal* **1995**, *69* (2), 311–322. https://doi.org/10.1016/S0006-3495(95)79936-2.
(156) Gardiner, A. T.; Zech, S. G.; MacMillan, F.; Käss, H.; Bittl, R.; Schlodder, E.; Lendzian, F.; Lubitz, W. Electron Paramagnetic Resonance Studies of Zinc-Substituted Reaction Centers from

Rhodopseudomonas Viridis. *Biochemistry* **1999**, *38* (36), 11773–11787. https://doi.org/10.1021/bi990661c.

(157) De Causmaecker, S.; Douglass, J. S.; Fantuzzi, A.; Nitschke, W.; Rutherford, A. W. Energetics of the Exchangeable Quinone, Q_B, in Photosystem II. *Proc Natl Acad Sci USA* **2019**, *116* (39), 19458–19463. https://doi.org/10.1073/pnas.1910675116.

(158) Spoyalov, A. P.; Hulsebosch, R. J.; Shochat, S.; Gast, P.; Hoff, A. J. Evidence That Ala M260 Is Hydrogen-Bonded to the Reduced Primary Acceptor Quinone QA−. in Reaction Centers of Rb. Sphaeroides. *Chemical Physics Letters* **1996**, *263* (5), 715–720. https://doi.org/10.1016/S0009-2614(96)01255-9.

(159) Peloquin, J. M.; Tang, X.-S.; Diner, B. A.; Britt, R. D. An Electron Spin−Echo Envelope Modulation (ESEEM) Study of the Q_A Binding Pocket of PS II Reaction Centers from Spinach and *Synechocystis* $^{+}$. *Biochemistry* **1999**, *38* (7), 2057–2067. https://doi.org/10.1021/bi982033l.

(160) Grimaldi, S.; Arias-Cartin, R.; Lanciano, P.; Lyubenova, S.; Szenes, R.; Endeward, B.; Prisner, T. F.; Guigliarelli, B.; Magalon, A. Determination of the Proton Environment of High Stability Menasemiquinone Intermediate in Escherichia Coli Nitrate Reductase A by Pulsed EPR. *Journal of Biological Chemistry* **2012**, *287* (7), 4662–4670. https://doi.org/10.1074/jbc.M111.325100.

(161) Arias-Cartin, R.; Lyubenova, S.; Ceccaldi, P.; Prisner, T.; Magalon, A.; Guigliarelli, B.; Grimaldi, S. HYSCORE Evidence That Endogenous Mena- and Ubisemiquinone Bind at the Same Q Site (Q_D) of *Escherichia Coli* Nitrate Reductase A. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132* (17), 5942–5943. https://doi.org/10.1021/ja1009234.

(162) Dikanov, S. A.; Holland, J. T.; Endeward, B.; Kolling, D. R. J.; Samoilova, R. I.; Prisner, T. F.; Crofts, A. R. Hydrogen Bonds between Nitrogen Donors and the Semiquinone in the Qi-Site of the Bc1 Complex. *Journal of Biological Chemistry* **2007**, *282* (35), 25831–25841. https://doi.org/10.1074/jbc.M702333200.

(163) Grimaldi, S.; MacMillan, F.; Ostermann, T.; Ludwig, B.; Michel, H.; Prisner, T. QH•-Ubisemiquinone Radical in the Bo3-Type Ubiquinol Oxidase Studied by Pulsed Electron Paramagnetic Resonance and Hyperfine Sublevel Correlation Spectroscopy. 7.

(164) Lin, M. T.; Samoilova, R. I.; Gennis, R. B.; Dikanov, S. A. Identification of the Nitrogen Donor Hydrogen Bonded with the Semiquinone at the Q_H Site of the Cytochrome *Bo* $_3$ from *Escherichia Coli*. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (47), 15768–15769. https://doi.org/10.1021/ja805906a.

(165) MacMillan, F.; Kacprzak, S.; Hellwig, P.; Grimaldi, S.; Michel, H.; Kaupp, M. Elucidating Mechanisms in Haemcopperoxidases: The High-Affinity Q_H Binding Site in Quinol Oxidase as Studied by DONUT-HYSCOREspectroscopy and Density Functional Theory. *Faraday Discuss.* **2011**, *148*, 315–344. https://doi.org/10.1039/C005149G.

(166) Hartmann, T.; Schrapers, P.; Utesch, T.; Nimtz, M.; Rippers, Y.; Dau, H.; Mroginski, M. A.; Haumann, M.; Leimkühler, S. The Molybdenum Active Site of Formate Dehydrogenase Is Capable of Catalyzing C–H Bond Cleavage and Oxygen Atom Transfer Reactions. *Biochemistry* **2016**, *55* (16), 2381–2389. https://doi.org/10.1021/acs.biochem.6b00002.

(167) Friedebold, J.; Bowien, B. Physiological and Biochemical Characterization of the Soluble Formate Dehydrogenase, a Molybdoenzyme from Alcaligenes Eutrophus. *J Bacteriol* **1993**, *175* (15), 4719–4728. https://doi.org/10.1128/jb.175.15.4719-4728.1993.

(168) Wang, W.; Gao, Y.; Tang, Y.; Zhou, X.; Lai, Y.; Zhou, S.; Zhang, Y.; Yang, X.; Liu, F.; Guddat, L. W.; Wang, Q.; Rao, Z.; Gong, H. Cryo-EM Structure of Mycobacterial Cytochrome Bd Reveals Two Oxygen Access Channels. *Nat Commun* **2021**, *12* (1), 4621. https://doi.org/10.1038/s41467-021-24924-w.

(169) Buhrow, L.; Ferguson-Miller, S.; Kuhn, L. A. From Static Structure to Living Protein: Computational Analysis of Cytochrome c Oxidase Main-Chain Flexibility. *Biophysical Journal* **2012**, *102* (9), 2158–2166. https://doi.org/10.1016/j.bpj.2012.03.040.

(170) Luna, V. M.; Chen, Y.; Fee, J. A.; Stout, C. D. Crystallographic Studies of Xe and Kr Binding within the Large Internal Cavity of Cytochrome *Ba* $_3$ from *Thermus Thermophilus* : Structural Analysis and Role of Oxygen Transport Channels in the Heme−Cu Oxidases ′. *Biochemistry* **2008**, *47* (16), 4657–4665. https://doi.org/10.1021/bi800045y.

(171) Schrapers, P.; Hartmann, T.; Kositzki, R.; Dau, H.; Reschke, S.; Schulzke, C.; Leimkühler, S.; Haumann, M. Sulfido and Cysteine Ligation Changes at the Molybdenum Cofactor during Substrate Conversion by Formate Dehydrogenase (FDH) from *Rhodobacter Capsulatus*. *Inorg. Chem.* **2015**, *54* (7), 3260–3271. https://doi.org/10.1021/ic502880y.

(172) Yang, J.; Zhang, Y. I-TASSER Server: New Development for Protein Structure and Function Predictions. *Nucleic Acids Res* **2015**, *43* (W1), W174–W181. https://doi.org/10.1093/nar/gkv342.

(173) Roessler, M. M.; King, M. S.; Robinson, A. J.; Armstrong, F. A.; Harmer, J.; Hirst, J. Direct Assignment of EPR Spectra to Structurally Defined Iron-Sulfur Clusters in Complex I by Double Electron–Electron Resonance. *Proc Natl Acad Sci USA* **2010**, *107* (5), 1930–1935. https://doi.org/10.1073/pnas.0908050107.

(174) Ohnishi, T. Iron–Sulfur Clustersrsemiquinones in Complex I. 21.

(175) Ohnishi, T.; Nakamaru-Ogiso, E. Were There Any “Misassignments” among Iron–Sulfur Clusters N4, N5 and N6b in NADH-Quinone Oxidoreductase (Complex I)? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **2008**, *1777* (7–8), 703–710. https://doi.org/10.1016/j.bbabio.2008.04.032.

(176) Yakovlev, G.; Reda, T.; Hirst, J. Reevaluating the Relationship between EPR Spectra and Enzyme Structure for the Iron Sulfur Clusters in NADH:Quinone Oxidoreductase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2007**, *104* (31), 12720–12725. https://doi.org/10.1073/pnas.0705593104.

Annexes

Table des matières

I- Exemples de codes utilisés pour la simulation des spectres RPE CW 284

I.1 – Simulation et superposition des spectres en bande X, Q et W de la ménasemiquinone 284

I.2 – Simulation du signal de ménasemiquinone et de l'espèce 2 de Mo^{V} en bande W (spectre d'absorption) 285

I.3 – Simulation du signal de ménasemiquinone et de l'espèce 1 de Mo^{V} en bande X avec les couplages hyperfins associés aux protons 288

II - Liste de publications et participation aux conférences et écoles d'été 291

III - Formations suivies au cours du doctorat 293

IV - Liste des enseignements donnés au cours du doctorat 295

VI - CV scientifique 296

V – Article publié du cours de la thèse 302

I- Exemples de codes utilisés pour la simulation des spectres RPE CW

I.1 – Simulation et superposition des spectres en bande X, Q et W de la ménasemiquinone

```
clear all;
close all;

%%%%%% Bande W %%%%%%

%%%Spin System%%%

SysRad1.S=1/2;
SysRad1.g=[2.00543 2.00505 2.00232];
SysRad1.HStrain=[22.2172 28.3802 21.1417];
SysRad1.weight=83.2834;

SysMn.S=5/2;
SysMn.g=[2.00101];
SysMn.Nucs='55Mn';
SysMn.A=[262.905];
SysMn.gStrain=[0.00104798];
SysMn.weight=0.106047;

%%%Exp System%%%

[Bexp1,Specexp1,par1]=eprload('18b06_01');
Freqexp1=par1.MWFQ/1e9; % GHz
Bexp1=Bexp1/10; % en mT

deltaB1=2.2 ;
Breel1=Bexp1+deltaB1;


%%%Simulation%%%

Exp1.Range=[Breel1(1) Breel1(end)];
Exp1.mwFreq=Freqexp1;

[Bsim1,Specsim1]=pepper({SysRad1,SysMn},Exp1);


%%%Plot and Representation%%%

NormSpecsim1=rescale(Specsim1,Specexp1,'minmax');%renormalisat
ion spectre simulé


%%%%%% Bande Q %%%%%%
```

```
%%%Spin System%%%

SysRad2.S=1/2;
SysRad2.g=[2.00543 2.00505 2.00232];
SysRad2.HStrain=[25.8172 25.8164 24.233];

%%%Exp System%%%

[Bexp2,Specexp2,par2]=eprload('18B06Q_06');
Freqexp2=par2.MWFQ/1e9; % GHz
Bexp2=Bexp2/10; % en mT

deltaB2=-1.12;
Breel2 =Bexp2+deltaB2;


%%%Simulation%%%

Exp2.Range=[Breel2(1) Breel2(end)];
Exp2.mwFreq=Freqexp2;

[Bsim2,Specsim2]=pepper(SysRad2,Exp2);


%%%%%% Bande X %%%%%%

%%%Spin System%%%

SysRad3.S=1/2;
SysRad3.g=[2.00543 2.00505 2.00232];
SysRad3.HStrain=[28.5027 25.4622 26.8601];

%%%Exp System%%%

[Bexp3,Specexp3,par3]=eprload('18B08_07');
Freqexp3=par3.MWFQ/1e9; % GHz
Bexp3=Bexp3/10; % en mT
deltaB3=-0.29;
Breel3=Bexp3+deltaB3;

%%%Simulation%%%

Exp3.Range=[Bexp3(1) Bexp3(end)];
Exp3.mwFreq=Freqexp3;

[Bsim3,Specsim3]=pepper(SysRad3,Exp3);

%%%Plot and Representation%%%
```

```
%%%%%% Superposition %%%%%%

g1=(planck*Freqexp1*1e9)/bmagn./(Breel1*1e-3);

g1s=(planck*Freqexp1*1e9)/bmagn./(Bsim1*1e-3);

g2=(planck*Freqexp2*1e9)/bmagn./(Breel2*1e-3);

g2s=(planck*Freqexp2*1e9)/bmagn./(Bsim2*1e-3);

g3=(planck*Freqexp3*1e9)/bmagn./(Breel3*1e-3);

g3s=(planck*Freqexp3*1e9)/bmagn./(Bsim3*1e-3);

NormSim3=rescale(Specsim3,Specexp1,'minmax');
NormSexp3=rescale(Specexp3,Specexp1,'minmax');
NormSim2=rescale(Specsim2,Specexp1,'minmax');
NormSexp2=rescale(Specexp2,Specexp1,'minmax');

g3pr=g3+0.00100;
g3spr=g3s+0.0010;
g2pr=g2+0.00040;
g2spr=g2s+0.00042;
NormSim2b=NormSim2-5000000;
NormSexp2b=NormSexp2-5000000;
NormSpecsim1b=NormSpecsim1-11000000;
Specexp1b=Specexp1-11000000;

plot(g3spr,NormSim3,'g',g3pr,NormSexp3,'b',g2spr,NormSim2b,'g'
,g2pr,NormSexp2b,'r',g1s,NormSpecsim1b,'g',g1,Specexp1b,'k');%

set(gca,'xdir','reverse');
set(gca, 'fontsize', 13);

xlim([1.996,2.0124]);

h = findobj(gca,'Type','line');
x=get(h,'Xdata');
y=get(h,'Ydata');
```

I.2 – Simulation du signal de ménasemiquinone et de l'espèce 2 de Mo^{V} en bande W (spectre d'absorption)

```
clear all;
close all;

%%%Spin System%%%

SysRad.S=1/2;
SysRad.g=[2.00558 2.00515 2.00244];
```

```
SysRad.HStrain=[19.9587 56.9083 36.1292];
SysRad.weight=4.15203;

SysMo.S=1/2;
SysMo.g=[1.99707 1.99339 1.98897];
SysMo.Nucs='H';
SysMo.HStrain=[82.682 68.4531 76.734];
SysMo.A=[12.5015 12.4138 11.0202];
SysMo.weight=2.32279;

SysMn.S=5/2;
SysMn.g=[2.00101]; %[2.00306]
SysMn.Nucs='55Mn';
SysMn.A=[252.893];
SysMn.HStrain=[136.731];
SysMn.weight=0.0129894;

%%%Exp System%%%

[Bexp,Specexp,par]=eprload('18b11_fs_01blc3');
Freqexp=par.MWFQ/1e9; % GHz
Bexp=Bexp/10; % en mT

deltaB=4.2;
Br=Bexp+deltaB;

Specexpa=real(Specexp);

%%%Simulation%%%

Exp.Range=[Br(1) Br(end)];
Exp.mwFreq=Freqexp;
Exp.Harmonic = 0;

[Bsim,Specsim]=pepper({SysRad,SysMo,SysMn},Exp);

%%%Plot and Representation%%%

NormSpecsim=rescale(Specsim,Specexpa,'lsq0');

plot(Bsim,NormSpecsim,'k',Br,Specexpa,'b');

h = findobj(gca,'Type','line');
x=get(h,'Xdata');
y=get(h,'Ydata');
```

I.3 – Simulation du signal de ménasemiquinone et de l'espèce 1 de Mo^{V} en bande X avec les couplages hyperfins associés aux protons

```
clear all;
close all;

%%%%%% Système 1 %%%%%%

SysRad1.S=1/2;
SysRad1.g=[2.00543 2.00505 2.00232];
SysRad1.HStrain=[13.7454 100.293 13.3754];
SysRad1.weight=0.0730639;

SysMo1.S=1/2;
SysMo1.g=[1.99987 1.99243 1.98736];
SysMo1.Nucs='H';
SysMo1.A= [18.7933 12.2865 11.284];
SysMo1.HStrain= [9.8862 9.8056 10.7266];
SysMo1.weight=0.0334342;

%%%Exp System%%%

[Bexp1,Specexp1,par1]=eprload('18B04_19');
Freqexp1=par1.MWFQ/1e9; % GHz
Bexp1=Bexp1/10; % en mT

deltaB1=-0.36;
Breel1=Bexp1+deltaB1;

Exp1.Range=[Breel1(1) Breel1(end)];
Exp1.mwFreq=Freqexp1;

[Bsim1,Specsim1]=pepper({SysRad1,SysMo1},Exp1);

%%%%%% Système 2 %%%%%%

SysRad2.S=1/2;
SysRad2.g=[2.00543 2.00538 2.00244];
SysRad2.gStrain=[0.0070 0.0070 0.0070];
SysRad2.weight=1.40178;

SysMo2.S=1/2;
SysMo2.g=[1.99719 1.99353 1.98912];
SysMo2.Nucs='H';
SysMo2.A= [12.1217 12.5375 10.934];
SysMo2.HStrain= [10.0604 12.9728 8.5841];
SysMo2.weight=5.62987;

%%%Exp System%%%

[Bexp2,Specexp2,par2]=eprload('18B11_03');
Freqexp2=par2.MWFQ/1e9; % GHz
Bexp2=Bexp2/10; % en mT
```

```
deltaB2=-0.26;
Breel2=Bexp2+deltaB2;

Exp2.Range=[Breel2(1) Breel2(end)];
Exp2.mwFreq=Freqexp2;

[Bsim2,Specsim2]=pepper({SysRad2,SysMo2},Exp2);

%%%%%% Tracé %%%%%%

NormSpecexp1=rescale(Specexp1,Specexp2,'minmax');
NormSpecsim1=rescale(Specsim1,NormSpecexp1,'lsq0');
NormSpecsim2=rescale(Specsim2,Specexp2,'lsq0');

NormSpecexp1pr=NormSpecexp1-0;
NormSpecsim1pr=NormSpecsim1-0;
Specexp2pr=Specexp2-7000;
NormSpecsim2pr=NormSpecsim2-7000;

plot(Breel1,NormSpecexp1pr,'k',Bsim1,NormSpecsim1pr,'b',Breel2
,Specexp2pr,'k',Bsim2,NormSpecsim2pr,'b');

xlim([332,346]);

h = findobj(gca,'Type','line');
x=get(h,'Xdata');
y=get(h,'Ydata');
```

Pour les optimisations de paramètres la fonction esfit d'easyspin à été utilisée comme suit :

```
esfit('pepper',Specexpa,{SysRad,SysMo,SysMn},{VaryRad,VaryMo,V
aryMn},Exp);
```

Une ligne « Vary » doit être ajoutée pour chaque espèce et chaque paramètre à optimisé comme suit (exemple tiré du code présenté au paragraphe I.2)

```
SysRad.S=1/2;
SysRad.g=[2.00558 2.00515 2.00244];
SysRad.HStrain=[19.9587 56.9083 36.1292];
SysRad.weight=4.15203;
VaryRad.HStrain=[19.9587 56.9083 36.1292];
VaryRad.weight=4.15203;

SysMo.S=1/2;
SysMo.g=[1.99707 1.99339 1.98897];
SysMo.Nucs='H';
SysMo.HStrain=[82.682 68.4531 76.734];
SysMo.A=[12.5015 12.4138 11.0202];
SysMo.weight=2.32279;
VaryMo.g=[0.005 0.005 0.005];
VaryMo.HStrain=[132.682 58.4531 156.734];
VaryMo.A=[11.8917 11.5822 17.7203];
VaryMo.weight=2.32279;
```

II - Liste de publications et participation aux conférences et écoles d'été

1) Liste des publications réalisées dans le cadre du projet de thèse :

    1. Identification and characterization of a non-canonical menaquinone-linked formate dehydrogenase, *Journal of Biological Chemistry*, **2021**

2) Participation aux conférences et écoles d'été au cours de la période de thèse :

❖ Posters

- Alexandre Uzel, Rodrigo Arias-Cartín, Anne Walburger, Axel Magalon, Bruno Guigliarelli, Stéphane Grimaldi. EPR studies of new molybdenum-containing formate dehydrogenases for CO_2 valorization. *Journées scientifiques de l'ARPE*, **2019**.

- Alexandre Uzel,[1] Rodrigo Arias-CartÍn[2], Anne Walburger[2], Guillaume Gerbaud[1], Farida Seduk[2], Bruno Guigliarelli[1], Axel Magalon[2], Stephane Grimaldi[1]. EPR characterization of two molybdo-enzymes of a new formate dehydrogenase family. *Journées de Chimie de Coordination*, **2020**.

- Alexandre Uzel,[1] Rodrigo Arias-CartÍn[2], Anne Walburger[2], Guillaume Gerbaud[1], Farida Seduk[2], Bruno Guigliarelli[1], Axel Magalon[2], Stephane Grimaldi[1]. EPR characterization of two new bacterial formate dehydrogenases for CO2 valorization. *EPR ESR Congress of the Royal Chemical Society, Cardiff*. **2021.**

- Alexandre Uzel,[1] Rodrigo Arias-Cartin[2], Guillaume Gerbaud[1], Farida Seduk[2], Julia Rendon[1], Marianne Broc[2], Fabien Pierrel[3], Bruno Guigliarelli[1], Axel Magalon[2], Anne Walburger[2], Stéphane Grimaldi[1]. EPR identification of a new type of menaquinone-linked formate dehydrogenase. *GFB Congress*. **2021.**

- Alexandre Uzel[1], Rodrigo Arias-Cartin[2], Guillaume Gerbaud[1], Farida Seduk[2], Julia Rendon[1], Marianne Broc[2], Fabien Pierrel[3], Bruno Guigliarelli[1], Axel Magalon[2], Anne Walburger[2],

Stéphane Grimaldi1. EPR characterization of two non-canonical molybdenum-containing formate dehydrogenases in *Bacillus subtilis*. *12th MOTEC Congress*, **2021**

- Alexandre Uzel[1], Rodrigo Arias-Cartin[2], Guillaume Gerbaud[1], Farida Seduk[2], Julia Rendon[1], Marianne Broc[2], Fabien Pierrel[3], Bruno Guigliarelli[1], Axel Magalon[2], Anne Walburger[2], Stéphane Grimaldi1. EPR characterization of two menaquinone-linked molybdenum-containing formate dehydrogenases in *Bacillus subtilis*. *FrenchBIC Congress*, **2021**

- Alexandre Uzel[1], Rodrigo Arias-Cartin[2], Guillaume Gerbaud[1], Farida Seduk[2], Julia Rendon[1], Marianne Broc[2], Fabien Pierrel[3], Bruno Guigliarelli[1], Axel Magalon[2], Anne Walburger[2], Stéphane Grimaldi1. EPR identification of two menaquinone-linked molybdenum-containing formate dehydrogenases in the soil bacterium *Bacillus subtilis*. *IMM Days*, **2021**

❖ Oral presentations

- EPR characterization of two new menaquinone liked non canonical formate dehydrogenases (FDHs) from *Bacillus subtilis*. *FrenchBIC Congress*, 2021
  - **Oral presentation award**

III - Formations suivies au cours du doctorat

Catégorie : Compétences propres au métier de chercheur - Formations professionnalisantes

CIPE Dicactique des sciences (20 mars 2019 - 20 mars 2019) AMU-Marseille
4 heures enregistrées par : SCIENCES CHIMIQUES - Marseille.

CIPE Evaluation 1 (24 janvier 2019) AMU-Marseille
8 heures enregistrées par : SCIENCES CHIMIQUES - Marseille.

CIPE Evaluation 2 (04 mars 2019) AMU-Marseille
8 heures enregistrées par : SCIENCES CHIMIQUES - Marseille.

CIPE Evaluation 3 (29 mars 2021) AMU-Marseille
8 heures enregistrées par : SCIENCES CHIMIQUES - Marseille.

CIPE Pratiques d'enseignements (20 mars 2019) AMU-Marseille
12 heures enregistrées par : SCIENCES CHIMIQUES - Marseille.

Fête de la Science (08 octobre 2020) Pr. Valérie BELLE, Marseille.
3 heures enregistrées par : SCIENCES CHIMIQUES - Marseille.

Grant Writing (11 novembre 2019) Dr. Marianne Ilbert - Plinius Cursus - Marseille
21 heures enregistrées par : SCIENCES CHIMIQUES - Marseille.

Total du nombre d'heures pour la catégorie Compétences propres au métier de chercheur - Formations professionnalisantes : *64 h*

Catégorie : Séminaires disciplinaires et transdisciplinaires - Formations scientifiques

Ecole d'été du French BIC Jalila Simaan - Olga Iranzo -
15 heures enregistrées par : SCIENCES CHIMIQUES - Marseille.

Total du nombre d'heures pour la catégorie Séminaires disciplinaires et transdisciplinaires - Formations scientifiques : *15 h*

Catégorie : Compétences propres au métier de chercheur

Ethique Scientifique Université de Lyon
10 heures enregistrées par : SCIENCES CHIMIQUES - Marseille.

Intégrité Scientifique dans les métiers de la recherche / Research Integrity in scientific professions (04 mars 2019) En ligne / On line
10 heures

Total du nombre d'heures pour la catégorie Compétences propres au métier de chercheur : *20 h*

Catégorie : Conférences

Journée de l'ARPE A-RPE
6 heures enregistrées par : SCIENCES CHIMIQUES - Marseille.

Total du nombre d'heures pour la catégorie Conférences : *6 h*

Catégorie : Diffusion De La Recherche

Tous Chercheurs Jean Thimonier -Tous Chercheurs - Marseille
24 heures enregistrées par : SCIENCES CHIMIQUES - Marseille.

Total du nombre d'heures pour la catégorie Diffusion De La Recherche : *24 h*

Catégorie : Formations transversales

Présentation des plateformes de caractérisation en chimie expérimentale et théorique (04 décembre 2018 - 4 décembre 2018) Campus scientifique St Jérôme -13013 Marseille - Heure : 9h00
6 heures enregistrées par : SCIENCES CHIMIQUES - Marseille.

Total du nombre d'heures pour la catégorie Formations transversales : *6 h*

Catégorie : Journée Doctorale

Journées Scientifiques des Doctorants en Chimie de Marseille - 9ème édition (06 mai 2019 - 7 mai 2019) Campus de St Charles - Amphi sciences Naturelles/Espace Pouillon
8 heures enregistrées par : SCIENCES CHIMIQUES - Marseille.

Total du nombre d'heures pour la catégorie Journée Doctorale : *8 h*

Catégorie : Journée de rentrée école doctorale

Rentrée de l'ED des Sciences Chimiques 2018 (30 novembre 2018 - 30 novembre 2017) Campus St Jérôme - Avenue Escadrille Niemen - Amphi Pythéas - 13013 Marseille
3 heures enregistrées par : SCIENCES CHIMIQUES - Marseille.

Total du nombre d'heures pour la catégorie *: 3 h*

Total participation : 146 heures / 15 modules

IV - Liste des enseignements donnés au cours du doctorat

Cours donnés en Licence :

Licence 1 / Licence 2 / Licence 3

Chimie Bio-inorganique (TP 24h / TP 24h TD 12h / TP 24h TD 12h)

Chimie Expérimentale (TP 24h / TP 28h / TP 28h)

Thermochimie L3 (TP 12h)

Chimie Organique (TP 4h / TP 12h)

V - CV scientifique

Alexandre UZEL

23 Léon Gambetta St.

13001 Marseille

06.34.51.26.23
auzel@imm.cnrs.fr
1er Mai 1992

Current Situation :

PhD student at the Chemical Science Doctoral School (ED250), Aix-Marseille University, contractual teaching fellow and practical work supervisor at the chemistry department of Sciences faculty.

Research work at B.I.P Laboratory (Bioénergétique et Ingénierie des Protéines, UMR7281 CNRS/AMU) since the 1st October 2018, under the supervision of Dr. Stéphane Grimaldi (Metalloprotein Biophysics team headed by Prof. Bruno Guigliarelli). Research suject : Advanced EPR Study of two new Formate Dehydrogenases (FDHs) in the context of CO_2 valorization.

TRAINING :

- **2018 – 2022 :** PhD in Biophysics, B.I.P, Aix-Marseille University, Marseille
- **2017-2018** Master 2 in Alternative Chemistry, mention bien, *Clermont-Ferrand University,* Clermont-Ferrand.
- **2015-2016** Master 2 in Organic Chemistry, *Claude Bernard Lyon 1 University,* Lyon
- **2014-2015** Master 1 in Organic Chemistry. *Claude Bernard Lyon 1 University,* Lyon
- **2012-2014** Bachelor in Chemistry mention assez-bien, *Claude Bernard Lyon 1 University,* Lyon
- **2011-2012** Classes préparatoires, *Les Chartreux,* Lyon
- **2010-2011** Scientific Baccalauréat, mention bien, Perpignan

SCIENTIFIC WORK :

❖ **Internships**

- **2018** : **Research internship in Biocatalysis** - *Clermont-Auvergne (63) University –* headed by Dr. Christine Hélaine - ***January 2018 until June 2018***

  "Synthesis of new molecules of interest using biocatalytic ways "

- **2016** : **Internship in Organic Chemistry** - *Claude Bernard Lyon 1 University – Headed by Dr. Didier Bouyssi et Dr. Nuno Monteiro* - ***February 2016 - July 2016***

  " Hydrazones synthesis and reactivity "

- **2015** : **Internship in Organométallic Chemistry** - *Liege University – Belgium – Headed by Dr. Albert Demonceau* - ***April 2015 – June 2015***

"Synthesis and reactivity of Ruthenium-based catalysts"

❖ **Publications**

- Thiocyanation of N,N-Dialkylhydrazonoyl Bromides: An Entry to Sulfur-Containing 1,2,4-Triazole Derivatives.
  A. Prieto, A. Uzel, D. Bouyssi, N. Monteiro, *European Journal of Organic Chemistry*, **2017**, 28, 4201-4204.

- Exploration of Aldol Reactions Catalyzed by Stereoselective Pyruvate Aldolases with 2-Oxobutiric Acid as Nucleophile. V. Laurent, A. Uzel, V. Hélaine, L. Nauton, M. Traïka, T. Gefflaut, M. Salanoubat, V. de Bernardinis, M. Lemaire, C. Guerard-Hélaine, *Adv. Synth. Catal.*, **2019**, 361, 2713-2717

- Pyruvate Aldolases Catalyze Cross-Aldol Reactions between Ketones: Highly Selective Access to Multi-Functionalized Tertiary Alcohols, V. Laurent, L. Gourbeyre, A. Uzel, V.

Hélaine, L. Nauton, M. Traïkia, V. de Berardinis, M. Salanoubat, T. Gefflaut, M. Lemaire, C. Guérard-Hélaine, *ACS Catalysis*, **2020**, 10, 2538–2543

- Identification and characterization of a non-canonical menaquinone-linked formate dehydrogenase, Rodrigo Arias-Cartin[1,2#*†], Alexandre Uzel[2*], Farida Seduk[1], Guillaume Gerbaud[2], Fabien Pierrel[3], Marianne Broc[1], Régine Lebrun[4], Bruno Guigliarelli[2], Axel Magalon[1], Stéphane Grimaldi[2†] and Anne Walburger[1†], *Journal of Biological Chemistry*, **2021**

  * These authors contributed equally to this work.

❖ **Posters**

- Alexandre Uzel, Rodrigo Arias-Cartín, Anne Walburger, Axel Magalon, Bruno Guigliarelli, Stéphane Grimaldi. EPR studies of new molybdenum-containing formate dehydrogenases for CO_2 valorization. *Journées scientifiques de l'ARPE*, **2019**.

- Alexandre Uzel,[1] Rodrigo Arias-CartÍn[2], Anne Walburger[2], Guillaume Gerbaud[1], Farida Seduk[2], Bruno Guigliarelli[1], Axel Magalon[2], Stephane Grimaldi[1]. EPR characterization of two molybdo-enzymes of a new formate dehydrogenase family. *Journées de Chimie de Coordination*, **2020**.

- Alexandre Uzel,[1] Rodrigo Arias-CartÍn[2], Anne Walburger[2], Guillaume Gerbaud[1], Farida Seduk[2], Bruno Guigliarelli[1], Axel Magalon[2], Stephane Grimaldi[1]. EPR characterization of two new bacterial formate dehydrogenases for CO2 valorization. *EPR ESR Congress of the Royal Chemical Society, Cardiff*. **2021.**

- Alexandre Uzel,[1] Rodrigo Arias-Cartin[2], Guillaume Gerbaud[1], Farida Seduk[2], Julia Rendon[1], Marianne Broc[2], Fabien Pierrel[3], Bruno Guigliarelli[1], Axel Magalon[2], Anne Walburger[2], Stéphane Grimaldi[1]. EPR identification of a new type of menaquinone-linked formate dehydrogenase. *GFB Congress*. **2021.**

- Alexandre Uzel[1], Rodrigo Arias-Cartin[2], Guillaume Gerbaud[1], Farida Seduk[2], Julia Rendon[1], Marianne Broc[2], Fabien Pierrel[3], Bruno Guigliarelli[1], Axel Magalon[2], Anne Walburger[2], Stéphane Grimaldi1. EPR characterization of two non-canonical molybdenum-containing formate dehydrogenases in *Bacillus subtilis*. *12th MOTEC Congress*, **2021**

- Alexandre Uzel[1], Rodrigo Arias-Cartin[2], Guillaume Gerbaud[1], Farida Seduk[2], Julia Rendon[1], Marianne Broc[2], Fabien Pierrel[3], Bruno Guigliarelli[1], Axel Magalon[2], Anne Walburger[2], Stéphane Grimaldi1. EPR characterization of two menaquinone-linked molybdenum-containing formate dehydrogenases in *Bacillus subtilis*. *FrenchBIC Congress*, **2021**

- Alexandre Uzel[1], Rodrigo Arias-Cartin[2], Guillaume Gerbaud[1], Farida Seduk[2], Julia Rendon[1], Marianne Broc[2], Fabien Pierrel[3], Bruno Guigliarelli[1], Axel Magalon[2], Anne Walburger[2], Stéphane Grimaldi1. EPR identification of two menaquinone-linked molybdenum-containing formate dehydrogenases in the soil bacterium *Bacillus subtilis*. *IMM Days*, **2021**

❖ **Oral presentations**

- EPR characterization of two new menaquinone liked non canonical formate dehydrogenases (FDHs) from *Bacillus subtilis. FrenchBIC Congress*, 2021

➢ **Oral presentation award**

❖ **Enseignements :**

- Bio-inorganic Chemistry : TP : 72h / TD : 24h
- Expérimental Chemistry : TP : 80h

- Thermochemistry : TP : 24h
- Organic Chemistry : TP : 8h
- EPR for structural Biology : 1h

❖ Scientific Popularization

- Nuées Ardentes Festival, **édition 2018**, Clermont Ferrand.
- Tous Chercheurs : What are GMO's, Production of a fluorescent protein in *E. coli*, the GFP. **2018.**
- Fête de la Science, Marseille**, édition 2020**
- Fête de la Science, Marseille**, édition 2021**

PROFESSIONNAL EXPERIENCES :

- **2016 - 2017** : **Office Assistant in security and temporary work** – **from *October 2016 to September 2017*** - *Crit Intérim Oyonnax (01)*
  Team Organization, Planning and people management.

- **2014 - 2017** : **Seller and checkout manager at USO Rugby - from *September 2014 to September 2017* -** *USO Rugby Oyonnax (01)*

SKILLS :

- **Spectroscopy :**

  UV-Vis Spectroscopy, NMR (Nuclear Magnetic Resonance) et EPR (Electronic Paramagnetic Resonance- CW and pulsed)

- **Chemistry :**

Comprehension and execution of a synthesis by organic or biocatalytic ways.

- **Biology :**

  Production and purification of a desired protein. Biochemistry analysis such as (Kcat and Km determination of the pH optimum), study of the inhibition process.

- **Logiciels :**

  Use of Brucker EPR Sofware, Unicorn, MatLab, Origin, Chemdraw, MestreNova, Avasoft, PowerPoint, Word, Excel et leurs équivalents sur Mac.

LANGUES :

- **Langue 1 :** Français (langue maternelle).
- **Langue 2 :** Anglais (lu, parlé, écrit).
- **Langue 3 :** Espagnol (Intermédiaire).

VI – Article publié du cours de la thèse

JBC RESEARCH ARTICLE

Identification and characterization of a noncanonical menaquinone-linked formate dehydrogenase

Received for publication, July 15, 2021, and in revised form, October 18, 2021 Published, Papers in Press, November 6, 2021,
https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.101384

Rodrigo Arias-Cartín[1,2,‡,*], Alexandre Uzel[2,‡], Farida Seduk[1], Guillaume Gerbaud[2], Fabien Pierrel[3], Marianne Broc[1], Régine Lebrun[4], Bruno Guigliarelli[2], Axel Magalon[1], Stéphane Grimaldi[2,*], and Anne Walburger[1,*]

From the [1]Aix Marseille Université, CNRS, Laboratoire de Chimie Bactérienne (UMR7283), IMM, IM2B, Marseille, France; [2]Aix Marseille Université, CNRS, Laboratoire de Bioénergétique et Ingénierie des Protéines (UMR7281), IMM, IM2B, Marseille, France; [3]Grenoble Alpes Université, CNRS, Grenoble INP, TIMC, Grenoble, France; [4]Aix Marseille Université, CNRS, Plateforme Protéomique de l'IMM, IM2B Marseille Protéomique (MaP), Marseille, France

Edited by Ruma Banerjee

The molybdenum/tungsten—*bis*-pyranopterin guanine dinucleotide family of formate dehydrogenases (FDHs) plays roles in several metabolic pathways ranging from carbon fixation to energy harvesting because of their reaction with a wide variety of redox partners. Indeed, this metabolic plasticity results from the diverse structures, cofactor content, and substrates used by partner subunits interacting with the catalytic hub. Here, we unveiled two noncanonical FDHs in *Bacillus subtilis*, which are organized into two-subunit complexes with unique features, ForCE1 and ForCE2. We show that the formate oxidoreductase catalytic subunit interacts with an unprecedented partner subunit, formate oxidoreductase essential subunit, and that its amino acid sequence within the active site deviates from the consensus residues typically associated with FDH activity, as a histidine residue is naturally substituted with a glutamine. The formate oxidoreductase essential subunit mediates the utilization of menaquinone as an electron acceptor as shown by the formate:menadione oxidoreductase activity of both enzymes, their copurification with menaquinone, and the distinctive detection of a protein-bound neutral menasemiquinone radical by multifrequency electron paramagnetic resonance (EPR) experiments on the purified enzymes. Moreover, EPR characterization of both FDHs reveals the presence of several [Fe-S] clusters with distinct relaxation properties and a weakly anisotropic Mo(V) EPR signature, consistent with the characteristic molybdenum/bis-pyranopterin guanine dinucleotide cofactor of this enzyme family. Altogether, this work enlarges our knowledge of the FDH family by identifying a noncanonical FDH, which differs in terms of architecture, amino acid conservation around the molybdenum cofactor, and reactivity.

Formate dehydrogenases (FDHs) catalyze the oxidation of formate into CO_2 but have also been shown to catalyze the reverse reaction in methanogenic and/or acetogenic microorganisms, namely the reduction of CO_2 into formate (1). Metal-dependent FDHs (hereafter named FDHs) are exclusively found in prokaryotes, and 3D-structure–based phylogeny demonstrates that such enzymes were already present in the last universal common ancestor (2). In addition, paleogeochemistry suggests that in ancient times, compounds such as CO_2 and CH_4 were very abundant and that iron, molybdenum, and tungsten were available and in soluble forms (3, 4). Indeed, FDHs harbor molybdenum or tungsten at the active site as well as one to five iron–sulfur cluster(s) (1, 5–8). The molybdenum or tungsten atom is coordinated by the dithiolene sulfurs of two organic pyranopterin guanine dinucleotides (Mo/W-*bis*-PGD) (1, 9), a cysteine or a selenocysteine and a sulfido group, all being essential for the activity (10–12). In addition, an histidine and an arginine residue located in proximity to the Mo atom (13) are strictly conserved in all FDHs described so far (Fig. 1*A*) and required for activity (14). These residues have been proposed to be involved in correct orientation or stabilization of the formate in the active site (15–17), but their role in activity is still debated. They could also act as a switch to obstruct alternatively the substrate and the product tunnels during catalysis, as suggested by the 3D structure of the FDHs from *Rhodobacter capsulatus* and *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough and formylmethanofuran dehydrogenase from *Methanothermobacter wolfeii* (18–20). Altogether, there is still a need for clarifying the exact role of these conserved residues surrounding the catalytic site in FDH activity.

From a physiological point of view, FDHs are involved in a wide range of anaerobic metabolic pathways, such as energy harvesting and carbon fixation (6, 9). This is due to the interaction of the catalytic subunit that harbors the Mo/W-*bis*-PGD cofactor with partner subunits with the greatest diversity among the Mo/W-*bis*-PGD enzyme superfamily (9). In methanogenic archaea, FDH is part of a complex that facilitates a two-step reduction of CO_2 to formate and then to

‡ These authors contributed equally to this work.
* For correspondence: Anne Walburger, walburger@imm.cnrs.fr; Rodrigo Arias-Cartín, rodrigo.ariascartin@pasteur.fr; Stéphane Grimaldi, stephane.grimaldi@univ-amu.fr.
Present address for Rodrigo Arias-Cartín: Stress Adaptation and Metabolism Unit, Department of Microbiology, Pasteur Institute, CNRS, Microbiologie Integrative et Moléculaire (UMR 2001), Paris, France.

© 2021 THE AUTHORS. Published by Elsevier Inc on behalf of American Society for Biochemistry and Molecular Biology. This is an open access article under the CC BY license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

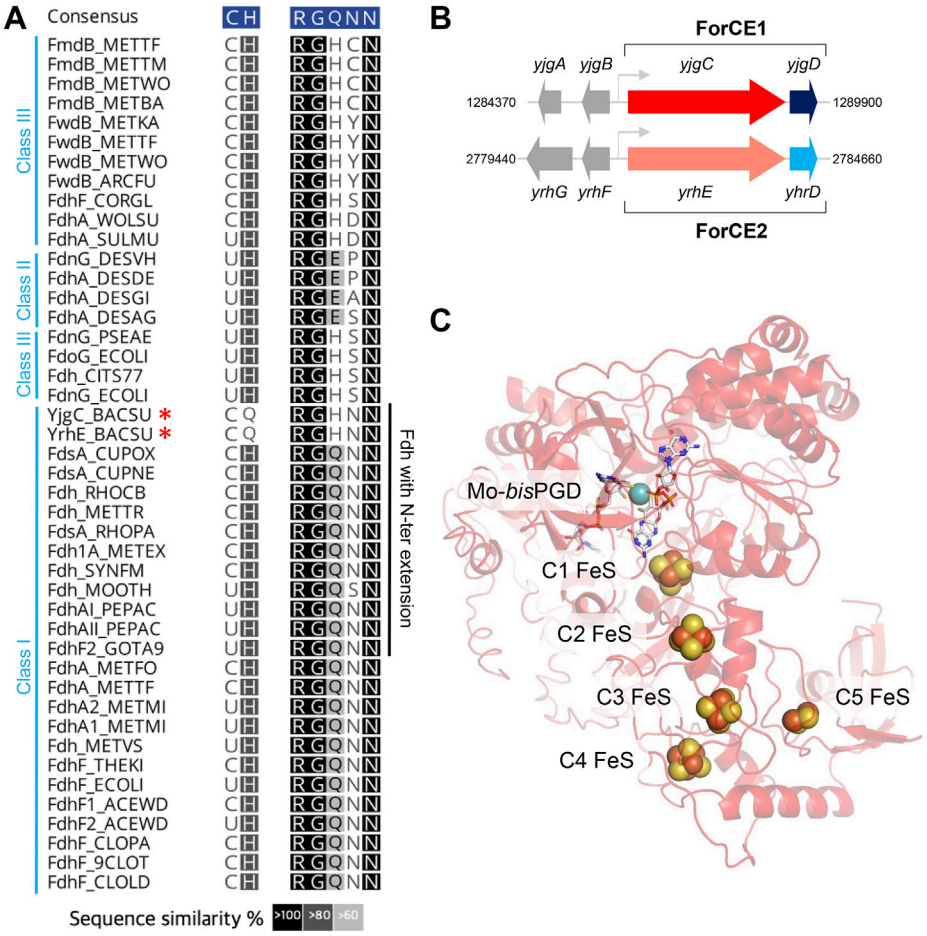


Figure 1. *Bacillus subtilis* genome encodes putative noncanonical FDHs. *A*, alignment of the amino acids involved in the active site of characterized FDH enzymes and the two putative FDH proteins from *B. subtilis* (*red asterisks*). Consensus sequence (*blue box*) shows which amino acids are conserved with a 50% threshold. FDHs have been organized into three classes according to the sequence and organization of their active site (Fig. S7): Class I: C/UH RGQ or C/UQ RGH, class II: C/UH RGE, and class III: C/UH RGH. Overview of the full sequence alignment is shown in Figure S1*B. B*, genomic organization of *yjgCD* (ForCE1) and *yrhED* (ForCE2) *in B. subtilis*. *C*, structural model of YjgC generated with I-TASSER (89) using FdsA from *R. capsulatus* (PDB ID: 6TGA). FeS clusters are named according to their proximity to the Mo cofactor in the 3D structural model. FDHs, formate dehydrogenases.

formyl-methanofuran (20). In bacteria, the membrane-bound FDH complex couples formate oxidation to quinols production in anaerobic respiratory chains (21), and the soluble FDH from *Cupriavidus necator* and *R. capsulatus* couples formate oxidation to NADH reduction that feed the reductive pentose phosphate cycle (22, 23). To summarize, FDHs are a group of heterogenous enzymes that display different subunit composition from the single monomeric subunit FdhF from *Escherichia coli* to the six-subunit complex formyl-methanofuran dehydrogenase (13, 20), and partner subunits hold a variety of redox cofactors ([Fe-S] clusters, hemes, F_{420}, FMN) that allow reaction with a wide variety of physiological redox partners, such as cytochromes, ferredoxins, NAD, and quinones (1, 5–8). Altogether, identification and characterization of FDHs with variations in the amino acids surrounding the catalytic site or new subunit composition could improve our understanding of catalysis and expand the metabolic pathway repertory in which FDHs are participating.

In the archetypal gram-positive bacterium, *Bacillus subtilis*, an FDH activity has been detected in cells grown aerobically in the rich medium (24). This is intriguing as FDHs are usually part of anaerobic metabolic pathways, and *B. subtilis* is not able to produce formate (25). These observations prompted us to search for the enzyme(s) involved in this activity. Combining bioinformatics with biochemistry, enzymology, and electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy, we have identified and characterized two atypical FDH enzymes in *B. subtilis* and members of a new subfamily of FDHs. Notably, formate oxidation activity is measured, whereas the conserved His residue in the active site is naturally substituted by a Gln. Moreover, both FDHs display a new architecture in which their catalytic subunit is associated with an unprecedented partner subunit that allows reactivity with menaquinone.

Results

The YjgC and YrhE sequences from B. subtilis *encode putative metal-dependent FDHs*

Scrutiny of the *B. subtilis* 168 genome indicates that it encodes for *yjgC* and *yrhE* genes, whose ∼110-kDa predicted

proteins are paralogous with 61% of identity. Both putative oxidoreductases contain a C-terminal domain typical for Mo/W-*bis*-PGD enzymes and characterized by motifs allowing the coordination of one Mo/W-*bis*-PGD cofactor and one [4Fe-4S] cluster (Fig. S1*A* and Table S1). Furthermore, both sequences contain an N-terminal extension with binding motifs for three [4Fe-4S] clusters and one [2Fe-2S] cluster as determined by similarities (Fig. S1*A*). In particular, this region shares homologies with the N-terminal domain of the NuoG subunit of the NADH:ubiquinone oxidoreductase (*i.e.*, complex I) and the catalytic subunit of NAD-dependent [NiFe]-hydrogenases (19, 26, 27). Such domain organization is also shared with other FDHs, notably FdsA from *C. necator* and *R. capsulatus* (Figs. S1*B* and S2*A*). A close-up alignment of the active site residues with previously characterized FDH sequences and YjgC and YrhE sequences is shown in Figure 1*A*. Whereas the typical metal Cys ligand and the strictly conserved Arg residue are present, the highly conserved His residue is substituted by a Gln in YjgC and YrhE. Phylogenetic analysis identified a large group of YjgC/YrhE-related sequences with the similar substitution in several bacterial and archaeal phyla, which are distinct from FdsA-related sequences (Fig. S2*A*). The presence of the Gln next to this Cys essential residue in the primary sequence questions the activity of these enzymes as FDHs. However, for the evidence that *B. subtilis* possesses at least one FDH is the existence of a putative *fdhD* gene encoding a sulfurtransferase crucial for FDH activity (12). In the *B. subtilis* genome, the *fdhD* gene is distant from the *yjgC* and *yrhE* loci (53′ *versus* 18′ and 39′, respectively). Interestingly, the *yjgC* gene is predicted to be organized in operon with *yjgD* as *yjgC* and *yjgD* are coexpressed with a positive correlation of 0.98 (28, 29). The same holds true for the gene *yrhE* predicted to be in operon with *yhrD* as both are adjacent and coexpressed with a positive correlation of 0.99 (Fig. 1*B*). The *yjgD* and *yrhD* genes encode 21-kDa and 17-kDa polypeptides, with weak sequence overall identity (20%), and contain a DUF1641 domain of 38 amino acids of unknown function (PFAM PF07849). While YjgC/YrhE are related to FdsA, as illustrated by the YjgC structural model based on the 3D structure of *R. capsulatus* FdsA (Fig. 1*C*) and the phylogenic analysis (Figs. 1*A* and S1), YjgD and YrhD are distinct from FdsD or any of the other partner subunits previously characterized for an FDH, the complex I and [Ni-Fe] hydrogenases (6). In addition, YjgD and YrhD are predicted to be cofactor-less and have a distinct sequence from the FdsC/FdhD sulfurtransferase or any specific chaperone involved in Mo-*bis*-PGD maturation (30, 31). Altogether, these *in silico* analyses suggest that YjgC and YrhE are the enzymes involved in the FDH activity previously detected in *B. subtilis* (24) and question the role of YjgD and YrhD.

The YjgCD and YrhED are protein complexes with formate-oxidizing activity

To test the activity of YjgC and YrhE as FDHs and the importance of YjgD and YrhD, the corresponding proteins were purified. First, the *yjgCD* and *yrhED* operons were expressed in *B. subtilis* under the control of an inducible promoter and a 6-histidine tag was added at the N terminus of the YjgC and YrhE proteins. Affinity purification of these proteins showed that YjgC and YrhE copurified with YjgD and YrhD, respectively, as identified by SDS-PAGE and MS analysis (Fig. 2*A*, Tables S2 and S3). MS data are available via ProteomeXchange with identifier PXD028742. These results suggest that proteins YjgD and YrhD interact physically with YjgC and YrhE, respectively. A full steady-state enzyme kinetic analysis of formate oxidation by YjgCD and YrhED using benzyl viologen (BV) as an artificial electron acceptor is shown in Figure 2*B*. Using the Michaelis–Menten plot, a k_{cat} of 96 s^{-1} was measured for the YjgCD heterodimer (MW = 132 kDa) and a k_{cat} of 56 s^{-1} for the YhrED heterodimer (MW = 125 kDa) (Table 1). Both values are in the same range as the ones determined for FDH of *R. capsulatus* (36 s^{-1}) and *C. necator* (201 s^{-1}) (22, 26). Apparent $K_M^{formate}$ of 5 mM for YjgCD and 1 mM for YrhED are larger than the values of 0.281 mM and 0.31 mM determined for FDH of *R. capsulatus* and *C. necator*, respectively. As observed for other FDHs (22, 32, 33), both enzyme preparations exhibit a basic pH optimum, pH 10 for the YjgCD complex and pH 8.5 for YrhED (Fig. 2*C*). In conclusion, the YjgCD and YrhED are protein complexes with formate-oxidizing activity with kinetic parameters comparable with other FDHs despite the fact that the amino acid sequence within the active site deviates from the consensus residues typically associated with FDH activity. Henceforth, the YjgC subunit was renamed ForC for formate oxidoreductase catalytic subunit and the YjgD subunit ForE for formate oxidoreductase essential subunit for reasons that will be presented at the end of the Results section. As *B. subtilis* encodes two FDHs, YjgCD was renamed ForCE1 and YrhED was renamed ForCE2.

EPR analysis of ForCE1 and ForCE2

To characterize the cofactor content of the two enzymes, we next examined the EPR properties of purified ForCE1 and ForCE2 enzymes, either in their air-oxidized state or after incubation with a large excess of sodium formate or sodium dithionite. When measured in the 50- to 70-K temperature range, the air-oxidized enzymes mainly display two essentially isotropic and partially overlapping EPR signals originating from two slow-relaxing S = ½ species with g-values centered at 2.004 and 1.993. Their relative intensities are different in the two enzymes (Fig. 3*A*, traces 1 and 2). In a first step, the g = 1.993 signal that exhibits a partially resolved structure in both enzymes was investigated in detail. Optimally detected in the air-oxidized ForCE2 sample, this signal was further characterized by performing echo-detected field-swept experiments at W-band (∼94 GHz) or continuous wave EPR measurements at Q-band (∼34 GHz) (Fig. 3*B*, inset and trace 2). At both frequencies, the g = 1.993 signal is well isolated and displays a rhombic shape well reproduced by considering a single species with g-values $g_{1,2,3}$ = 1.9971, 1.9933, and 1.9890. Whereas this model is unable to account for the resolved structure on the X-band EPR spectrum, the addition of a strongly coupled

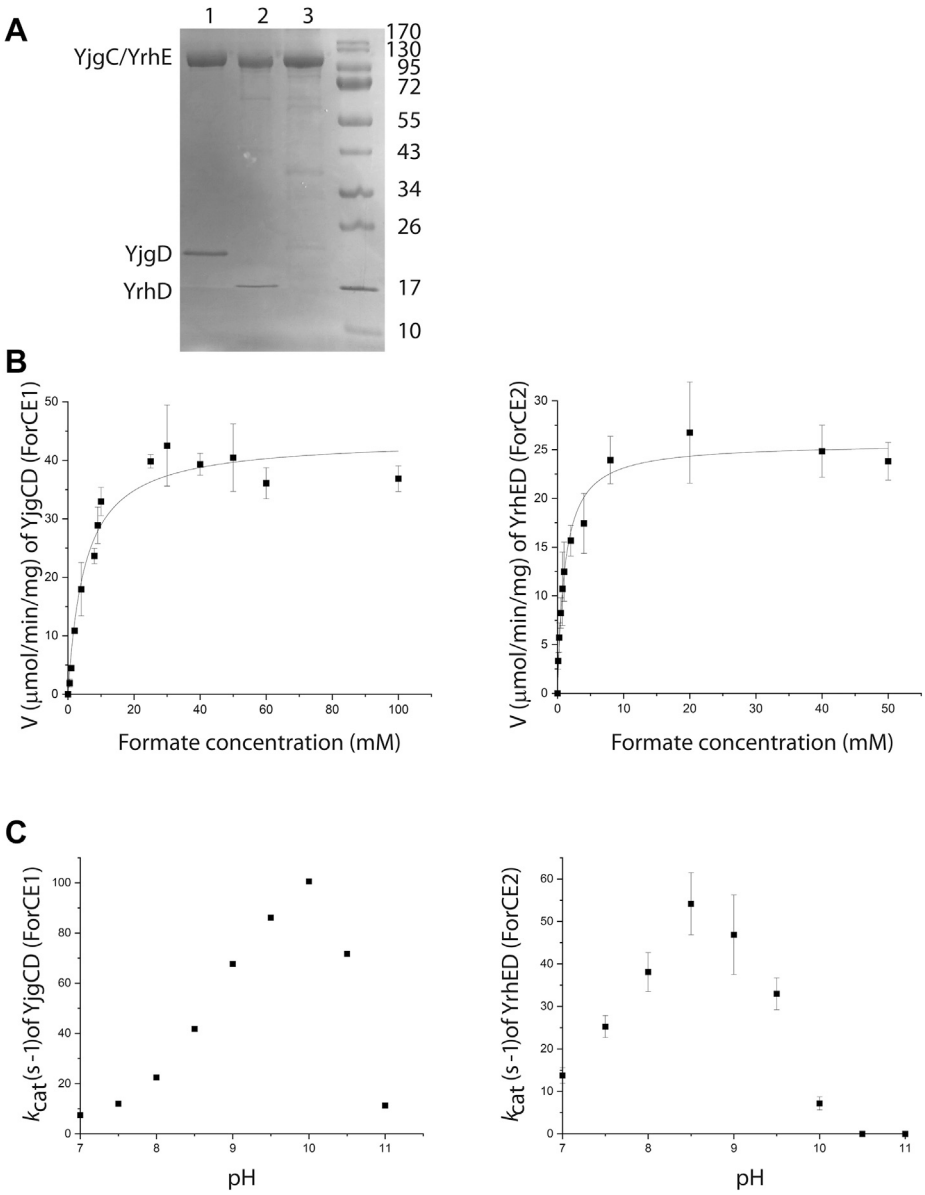


Figure 2. YjgCD (ForCE1) and YrhED (ForCE2) are formate-oxidizing enzymes. *A*, purified proteins are analyzed on Coomassie Brilliant Blue–stained 15% SDS-polyacrylamide gel. Molecular standards are indicated in kilodalton. *Lane 1*: YjgC N-terminus 6his-tagged copurifies with YjgD; *lane 2*: YrhE N-terminus 6his-tagged copurifies with YrhD; *lane 3*: YjgC C-terminus 8his-tagged was purified without YjgD. *B*, Michaelis–Menten plot for the formate:benzyl viologen oxidoreductase reaction of YjgCD (ForCE1) at pH 10 and YrhED (ForCE2) at pH 8.6. *C*, pH dependence of k_{cat} (s^{-1}) for YjgCD (ForCE1) and YrhED (ForCE2).

proton with nearly isotropic ^{1}H hyperfine coupling tensor having principal values $A_{1,2,3}$ = 13, 13, and 11 MHz allows reproducing the observed splittings (Fig. 3*B*, trace 1). Eventually, the multifrequency EPR spectra are well simulated using the same set of g- and A-tensors as given above (Fig. 3*B*). The signal-giving species displays g-values fully consistent with those of a 4 d^{1} Mo(V) ion with *bis*-pterin coordination (34). Notably, the corresponding g-tensor anisotropy (g_1 − g_3 ∼

Table 1
Enzymatic catalytic constants for formate oxidation by YjgCD, YjgC, and YrhED using either benzyl viologen (top) or menadione (bottom) as electron acceptors

FDH	$K_M^{formate}$ (mM)	k_{cat} (s^{-1})	V_{max} (U)	pH
YjgCD/ForCE1	5.1 ± 0.9	96.1 ± 4	43.7 ± 1.9	10
YrhED/ForCE2	1.1 ± 0.1	55.8 ± 1.6	26.6 ± 0.8	8.6
YjgC/ForC1	ND	2.13 ± 0.05	1.16 ± 0.03	10
	$K_M^{menadione}$ (mM)	k_{cat} (s^{-1})	V_{max} (U)	pH
YjgCD/ForCE1	0.025 ± 0.003	16.5 ± 0.6	7.5 ± 0.3	9
YrhED/ForCE2	0.023 ± 0.005	26.4 ± 1.8	12.6 ± 0.9	9
YjgC/ForC1	ND	0	0	9

Abbreviation: ND, not determined.

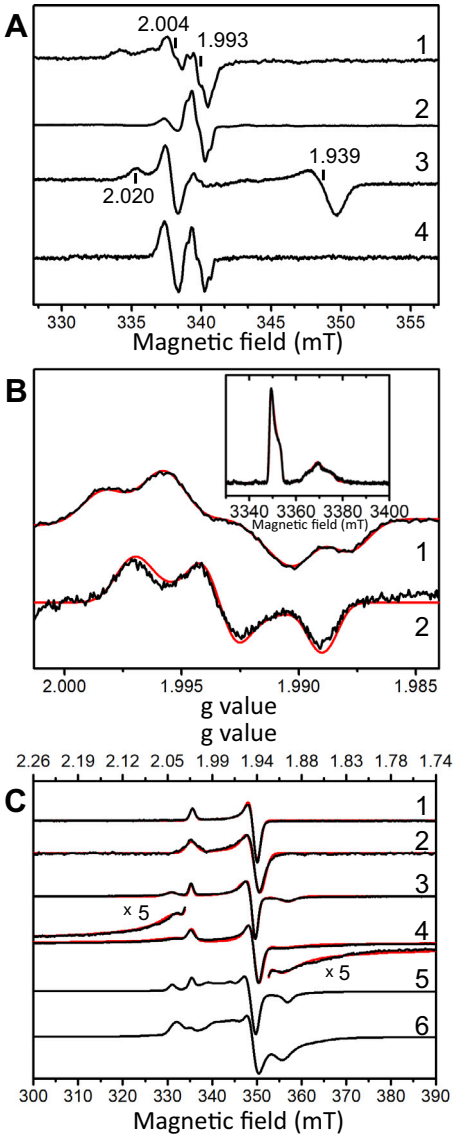


Figure 3. EPR characterization of the cofactors in ForCE1 and ForCE2. *A*, air-oxidized (1 and 2) and formate-reduced (3 and 4) ForCE1 (1 and 3) and ForCE2 (2 and 4) collected at 50 K (1) or 70 K (2–4). Other experimental conditions were as follows: microwave power, 4 mW, field modulation amplitude, 0.4 mT (1 and 2) or 0.2 mT (3 and 4) at 100 kHz, and microwave frequency, ∼9.48 GHz. *Vertical lines* indicate remarkable g values given in the figure and discussed in the main text. *B*, continuous wave Mo(V) EPR spectra in air-oxidized ForCE2 samples measured at X band (9.47864 GHz) (1) and Q band (34.1187 GHz) (2) frequencies. Other experimental conditions were as follows: temperature, 70 K (1) and 50 K (2), microwave power, 1 mW (1) and 0.1 mW (2), and field modulation amplitude, 0.1 mT (1) and 0.5 mT (2) at 100 kHz. The inset shows the echo-detected field-swept EPR spectrum measured at 50 K at W-band (94.0014 GHz) frequency. Other experimental conditions are as follows: microwave pulse lengths, 20 ns and 40 ns for π/2 and π pulses, respectively. *C*, EPR spectra of dithionite-reduced ForCE1 (1, 3, and 5) and ForCE2 (2, 4, and 6) measured at 100 K (1 and 2), 50 K (3 and 4), or 15 K (5 and 6). Other experimental conditions were as follows: microwave power, 1 mW (1) or 10 mW (2–6), modulation amplitude 1 mT (1, 2, 4–6) or 0.4 mT (3) at 100 kHz, microwave frequency, ∼ 9.48 GHz. Spectral simulations are displayed as *red traces* superimposed to the experimental spectra and have been performed using the parameters given in the main text and supporting information (Table S8).

0.008) is unusually low and most closely resembles that of the slow-type Mo(V) signal *Desulfovibrio alaskensis* NCIMB 13491 FDH ($g_1 - g_3 \sim 0.012$) (35). Moreover, the Mo(V) g-values in ForCE2 belong clearly to the correlation found for the variations of the g-tensor of Mo(V) species with a six-sulfur coordination (9, 34, 36) (Fig. S3). Finally, the magnitude of the proton hyperfine coupling tensor is comparable with that resolved on the Mo(V) EPR signal detected in *C. necator* FDH and assigned to a molybdenum-SH group (26). Therefore, the g = 1.993 signal similarly detected in ForCE1 and ForCE2 is unambiguously assigned to a Mo(V) species generated at their active site.

Interestingly, incubation of the enzymes with a large excess of sodium formate leads to an increase of the g = 2.004 signal relative to that of the Mo(V) species (Fig. 3*A*, traces 3 and 4). In addition, an axial signal with g-values 2.020 and 1.939 is detected in the ForCE1 spectrum measured at 50 K (Fig. 3*A*, trace 3). These observations are explained by partial reduction of the enzymes by sodium formate and are consistent with the fact that the latter is the physiological substrate. The same axial signal is observed on the EPR spectrum of the dithionite-reduced samples of ForCE1 and ForCE2 measured at 100 K, whereas the Mo(V) signal and the g = 2.004 species are no longer detected, consistent with further reduction of the latter and of the Mo(V) into the EPR-silent Mo(IV) state in these samples (Fig. 3*C*, traces 1 and 2). The slow relaxation properties of this axial signal and its g-values are typical for S = ½ $[2Fe\text{-}2S]^{1+}$ clusters (37) and very similar to those detected in related FDHs from *Clostridium thermoaceticum*, *Methylosinus trichosporium*, or *C. necator* (26, 38–40). Upon lowering the temperature to 50 K, new signals are detected peaking at g = 2.047 and 1.897 in ForCE1 (Fig. 3*C*, trace 3), and g = 2.030 and 1.912 in ForCE2 (Fig. 3*C*, trace 4). These are tentatively assigned to the g_1 and g_3 values of an additional slow relaxing S = ½ $[4Fe\text{-}4S]^{1+}$ cluster. The corresponding intermediate g_2 value is estimated by numerical simulations (shown as red solid lines in Fig. 3*C*, traces 3 and 4), yielding to $g_{1,2,3}$ = 2.047, 1.948, 1.897 and 2.030, 1.940, 1.912 for this cluster in ForCE1 and ForCE2, respectively. Further lowering the temperature to 15 K leads to the appearance of additional overlapping signals peaking at 1.99 and 1.96, which most likely arise from an additional fast-relaxing $[4Fe\text{-}4S]^{1+}$ center (Fig. 3*C*, traces 5 and 6). Being the sole EPR active center detected at 100 K, the [2Fe-2S] cluster was used as an internal reference for spin quantitation measurements. Double integration of the EPR spectrum of a dithionite-reduced ForCE1 sample buffered at pH 7.5 and measured at 15 K in nonsaturating conditions (*i.e.*, 0.1 mW) indicated that the detected signals contribute to about 4.7 ±0.4 spins/ForCE1, assuming one [2Fe-2S] center per enzyme.

Overall, the present EPR analysis allows identifying the signature of several metal centers in ForCE1 and ForCE2, including that of their Mo-*bis*-PGD cofactor, a [2Fe-2S] cluster and at least two other [4Fe-4S] centers with distinct relaxation properties. Importantly, the detected species have quite similar EPR signatures in both enzymes in agreement with the high identity percentage between ForC1 and ForC2 subunits.

A menasemiquinone radical stabilized within ForCE1 and ForCE2

An unexpected outcome of the EPR analysis presented above is the detection of an intense isotropic radical signal at

g = 2.004 in ForCE1 and ForCE2 after incubation with sodium formate (Fig. 3*A*, traces 3 and 4). The radical peak-to-peak linewidth (∼0.88 mT) is similar to that typically observed for protein-bound isoprenoid quinones (41, 42). To further identify its origin, its redox properties were investigated using EPR-monitored redox titration experiments performed on purified ForCE1 buffered at pH 6.0 and 7.5. The EPR amplitude of the radical measured against ambient redox potential changes according to a bell-shaped curve as expected for quinone species undergoing two successive one-electron reduction steps between the fully oxidized quinone and the fully reduced quinol state with an EPR-active semiquinone intermediate (Fig. 4*A*) (42–46). When the data were fitted using theoretical curves based on Equation 1, midpoint potential values (E_1, E_2) = (−42 mV, −90 mV) and (−136, −175 mV) were obtained at pH 6 and 7.5, yielding two-electron midpoint potential values E_m of −66 mV and −156 mV, respectively. Such values are consistent with those of low-potential menaquinones ($E_{m,\ pH\ 7.5}$ MK/MKH_2 = −100 ± 10 mV) (47) such as MK-7, the major quinone present in *B. subtilis* membranes (48). The −60 mV/pH unit dependence of E_m in the investigated pH range indicates a $2H^+/2e^-$ reaction as measured for semiquinone radicals stabilized in exchangeable Q sites (43–45). In addition, the similar −60 mV/pH unit dependence of both E_1 and E_2 indicates that the neutral menasemiquinone (MSK) form (*i.e.*, $MSKH^{\bullet}$) is stabilized in this pH range. The maximum concentration of the radical was estimated to be 0.5 MSK/ForCE1 from double integration of its EPR spectrum measured under nonsaturating conditions and using the [2Fe-2S] cluster as internal standard, assuming one [2Fe-2S]/enzyme.

The chemical nature of the radical was further confirmed by performing EPR experiments at higher microwave frequencies, as large unresolved hyperfine couplings typically obscure the g anisotropy of radicals measured at standard X-band frequencies (9–10 GHz) (49). Whereas the g tensor anisotropy of the radical in ForCE1 is only partially resolved at the Q band (∼34 GHz), its g_3 component is clearly resolved at the W band (∼94 GHz), the overall line shape remaining predominantly axial (Fig. 4*B*). Such features are again expected for protein-bound isoprenoid semiquinones (42, 50). In addition, EPR spectra recorded at X, Q, and W bands are well simulated using the same rhombic g-tensor with principal values $g_{1,2,3}$ = 2.0054, 2.0051, 2.0023. These are very close to those measured for other protein-bound MSK such as in the Q_D site of *E. coli* nitrate reductase (42, 46) (Fig. S4) or in the Q_A site of Zn-substituted reaction center from *Blastochloris viridis* (41). Therefore, the EPR signal of the radical detected in ForCE1 can be assigned to a neutral MSK radical bound to the enzyme based on its EPR properties evaluated at several microwave frequencies as well as on its redox characteristics. This assignment also holds for the radical species detected in ForCE2, which exhibits similar g-values, as concluded from the comparative analysis of the W band EPR spectra of the radical measured in ForCE1 and in ForCE2 (Fig. S4).

In addition, our data reveal that the detected MSK is highly stabilized in ForCE1 in the pH range from 6.0 to 7.5. The magnitude of the MSK stability constant is virtually independent of pH ($K_{S,\ pH\ =\ 6.0} \sim 7$, $K_{S,\ pH\ =\ 7.5} \sim 5$) and much larger than that expected for the unbound species, that is, $K_{S,\ free} \sim 10^{-15}$. Hence, the calculated occupancy level R_{occ} of the ForCE1 Q-site that corresponds to the fraction of the site occupied by MK, MSK, or MKH_2 (irrespective of their protonation state) is close to unity at both pH values ($R_{occ} \sim 0.8$ at pH = 6.0 and ∼ 0.9 at pH 7.5).

We confirmed the nature of the MK bound in purified ForCE1 and ForCE2 by analyzing lipid extracts with HPLC coupled to electrochemical detection and MS (HPLC-ECD-MS) (Fig. 4*C*). Lipid extracts from ForCE1 and ForCE2 show a predominant peak at 9.8 min, which coincides with the MK-7 standard. MS confirmed the identity of MK-7 (Fig. S6*A*). A minor peak of MK-8 was also detected (Fig. 4*C*), as supported by MS analysis (Fig. S6*B*). While the ForCE1-MK-7 ratio inferred by HPLC-ECD analysis shows a stoichiometric value of 1:0.87, the ForCE2-MK-7 ratio is above 1:1 stoichiometry (1:1.63) (Table S5). Nevertheless, the ForCE1-MK-7 ratio is in agreement with the amount of one MK-7 per complex quantified by EPR analysis.

ForCE1 and ForCE2 reduce MK-7 analogs

Having demonstrated that ForCE1 and ForCE2 enzymes are able to stabilize an MSK radical, we hypothesized that MK-7 is the electron acceptor during formate oxidation in *B. subtilis*. The enzymatic activity of purified ForCE1 and ForCE2 was analyzed in the presence of formate and menadione, a structural analog of MK-7. Full steady-state enzyme kinetic analyses are shown in Figure 4, *D* and *E*. To model experimental data, we used a Michaelis–Menten plot and found similar apparent low $K_M^{menadione}$ values for both enzymes (25 μM for ForCE1 and 23 μM for ForCE2) and a k_{cat} of 16.5 and 26.4 s^{-1} for ForCE1 and ForCE2, respectively (Table 1). The pH dependence of the formate:menadione oxidoreductase activity was determined and showed a pH optimum at ≈ 9 for both enzymes (Figs. 4*F* and S5). Altogether, our *in vitro* kinetic analyses show that ForCE1 and ForCE2 are able to couple formate oxidation to menadione reduction, and we propose that MK-7 is the physiological electron acceptor during formate oxidation.

ForE1 is an essential subunit for formate oxidoreductase activity of ForC1

To assess the importance of ForE1 or ForE2 in FDH activity, the *yjgC* (*forC1*) and *yrhE* (*forC2*) genes were expressed under the control of an inducible promoter in absence of *yjgD* (*forE1*) and *yrhD* (*forE2*), respectively. Despite many attempts, we were unable to purify the ForC2 subunit His-tagged in C-terminal when produced without ForE2. On the contrary, we were able to purify ForC1 His-tagged in C-terminal (Fig. 2*A*, Table S4). This protein was able to oxidize formate with BV as an artificial electron acceptor but at a residual k_{cat} = 2 s^{-1} compared with 96 s^{-1} for the ForCE1 complex (Table 1). HPLC-ECD analysis of ForC1 showed that very low quantities of MK-7 are associated with ForC1, as compared with ForCE1

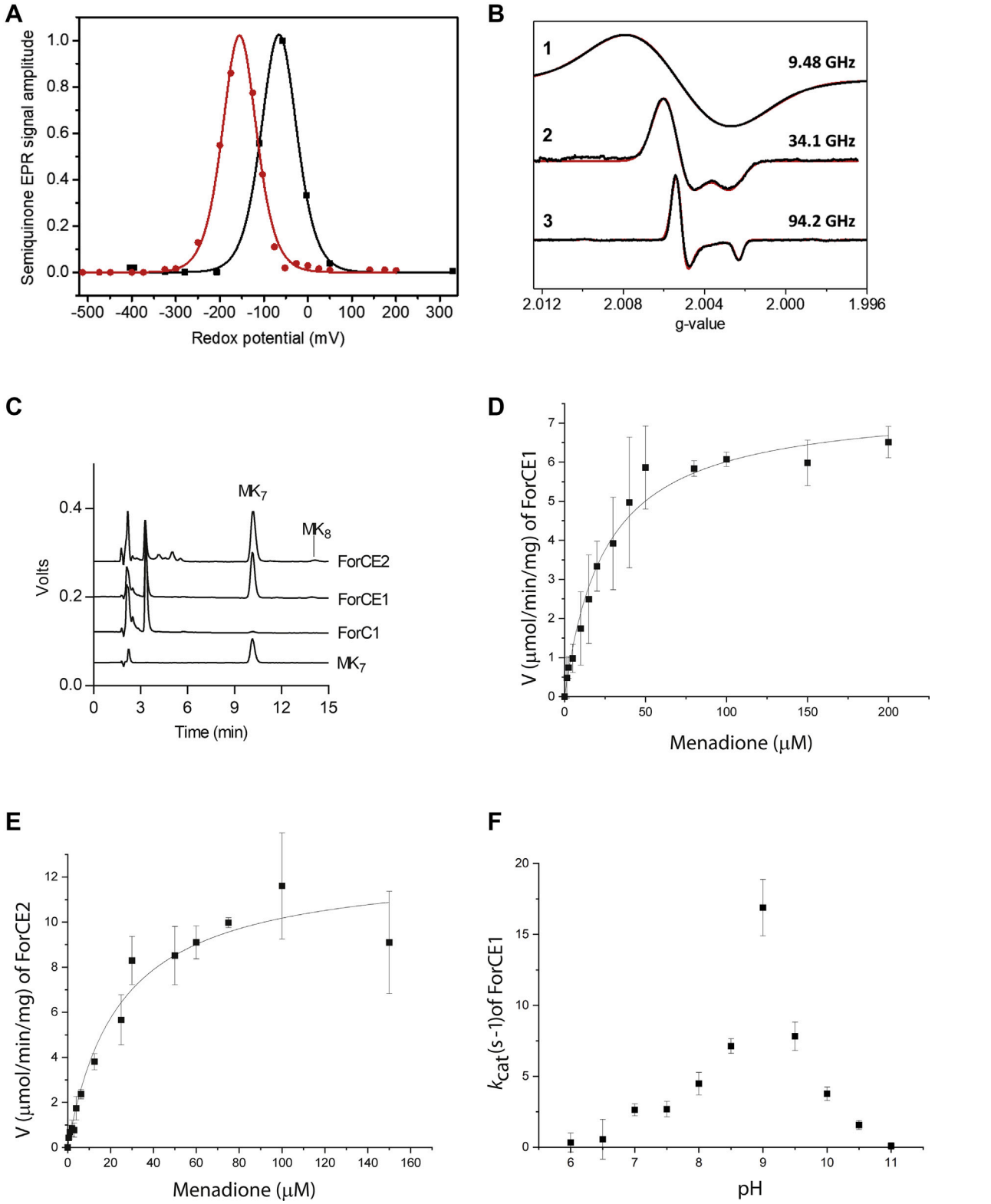


Figure 4. ForCE1 and ForCE2 bind MK-7 as an electron sink. *A*, normalized redox titration curves of the MSK radical in ForCE1 buffered at pH = 6 (*black*) or 7.5 (*red*). Experimental points (*filled squares* or *filled circles*) have been fitted to the theoretical curve as described in the Experimental procedures section. Experimental conditions were as follows: temperature, 50 K, microwave power, 10 mW, and modulation amplitude, 0.5 mT (pH 7.5) or 1 mT (pH 6) at 100 kHz. *B*, g-scale representation of the cw EPR spectra (*black traces*) and their simulation (*red traces*) of the $MSK^{\cdot}$ radical in ForCE1 buffered at pH = 6 and measured at X band (9.4812 GHz) (1), Q band (34.094 GHz) (2), and W band (94.244 GHz) (3). Spectra were simulated using the same rhombic g-tensor with principal values $g_{1,2,3}$ = 2.0054, 2.0051, and 2.0023 and the linewidths given in supporting information (Table S8). Experimental conditions were as follows: temperature, 50 K, microwave power, 4 mW (1), 0.1 mW (2), or 0.05 mW (3), and field modulation amplitude at 100 kHz, 0.4 mT (1 and 3) or 0.5 mT (2). *C*, ForCE1 and ForCE2, but not ForC1, bind large quantities of MK-7. HPLC-ECD analysis of the MK-7 standard (15 pmol) and of lipid extracts corresponding to ~40 pmol of purified proteins. *D*, Michaelis–Menten plot for the formate:menadione oxidoreduction reaction of ForCE1 at pH 9. *E*, Michaelis–Menten plot for the formate:menadione oxidoreduction reaction of ForCE2 at pH 9. *F*, pH dependence of k_{cat} (s^{-1}) for ForCE1.

(Fig. 4*C*, Table S5), and ForC1 is devoid of formate:menadione oxidoreductase activity (Table 1). Thus, the ForE1 subunit is required for formate:menadione oxidoreductase activity of ForC1 and most likely for MK-7 binding. Altogether, these results demonstrate the essential role of ForE1 in ForCE1 activity.

Discussion

FDHs have been widely studied as they reversibly catalyze formate oxidation into CO_2, CO_2 reduction being of high biotechnological interest. In contrast to other members of the Mo/W-*bis*-PGD enzyme superfamily, FDHs exhibit a plethora of quaternary structure, subunit, and redox center composition and cellular localization allowing their integration in several anaerobic metabolic pathways as reviewed (5, 7, 9, 51). Here, we report on the identification, isolation, and characterization of two atypical FDHs, ForCE1 and ForCE2, in the aerobic soil bacterium, *B. subtilis*. In contrast with other characterized FDHs, ForCEs (i) have a unique subunit composition, (ii) display modification of the hitherto conserved amino acid residues surrounding the metal active site, and (iii) bind MK-7 while being cytosolic enzymes as shown by the homologous expression system reported here. Notably, ForCE1 and ForCE2 have each a Mo-*bis*-PGD cofactor and bear up to 5 [Fe-S] clusters as determined by EPR spectroscopy. In addition, both enzymes are able to perform formate:menadione oxidoreduction and have the ability to strongly bind MK-7 as indicated by HPLC-ECD-MS analysis, which leads to the detection of an isotropic radical signal by EPR spectroscopy, assigned to an MSK signal.

Multimeric FDHs work in concert with other subunits to oxidize formate or receive electrons from a donor to reduce CO_2. In other terms, partner subunits allow FDH integration into a specific metabolic pathway. Gene(s) encoding partner subunit(s) are organized into operons with the gene encoding the catalytic subunit. In FDHs from *B. subtilis*, genes encoding catalytic and partner subunits are organized into *forCE1* and *forCE2* operons. Our results have shown that purified ForC1 produced in absence of ForE1 binds weakly to MK-7 and that it has lost formate:menadione oxidoreductase activity. Accordingly, we suggest that ForE is the partner subunit that allows coupling formate oxidation to quinone reduction. Such reaction has been demonstrated for the respiratory FDH complex exemplified in *E. coli* (21). However, the partner subunits FdnHI are very distinct from ForE at the sequence level. The Mo-*bis*-PGD containing the FdnG subunit is the formate oxidation site connected through a 5 [Fe-S] cluster electron wire (in FdnGH) to the quinone reduction site in the transmembrane cytochrome FdnI. In contrast, the ForC subunit harbors the Mo-*bis*-PGD cofactor formate oxidation site as well as 5 [Fe-S] clusters in the same polypeptide and the menaquinone reduction site hypothetically located at the ForCE interface. It must be noted that ForCE sequences are not predicted to contain any transmembrane segment, neither hemes, as confirmed by EPR analysis of ForCE1 and ForCE2. Therefore, we conclude that the way the formate:menaquinone oxidoreduction occurs into ForCEs is unprecedented.

The ForC catalytic subunit presents high sequence similarity with FdsA from *R. capsulatus* and *C. necator* (Fig. S1) and a ForC1 structural model using the former has been built (Fig. 1*C*). In this model, electrons are logically shuttled from the Mo-*bis*-PGD catalytic site along the [Fe-S] clusters (C1 to C4/C5) to the physiological electron acceptor. We hypothesize that MK-7 binds to the N-terminal region of ForC1 in such a way that the distance between the MK-7 and one of the two most N-terminus [Fe-S] clusters, namely the [4Fe-4S] (C4) or the [2Fe-2S] (C5) cluster (Fig. 1*C*), is compatible with physiological electron transfer (52). It is interesting to note that EPR-monitored redox titration experiments performed on purified ForCE1 buffered at pH 6.0 and 7.5 have provided values of E_m (MK/MKH_2) about 55 mV lower than that of the menaquinone pool. Such a shift can be explained by an ~ 80-fold tighter binding of oxidized MK than MKH_2 to the ForCE1 Q-site, which would be expected for a quinone reduction site in which binding of the substrate (menaquinone) is favored over that of the product (menaquinol). This situation is very similar to that described for the plastosemiquinone bound to the quinone reduction site QB in photosystem II (Δ = −50 mV) (53). In addition, similar values have been measured for the demethylmenasemiquinone stabilized at the quinol oxidation site of the membrane-bound nitrate reductase from *E. coli* (Δ = −30 or −80 mV) (54), and tighter binding of ubiquinol than ubiquinone has been discussed in the quinone reduction site of the bc_1 complex from yeast (Δ ~ +24 to +54 mV) (55) or from *Rhodobacter sphaeroides* (Δ ~ +60 mV) (56).

Within the enzymatic complex, the ForE1 subunit could help stabilize menaquinone binding by providing a structural interface with ForC1 as in its absence, the amount of copurified MK-7 drops dramatically to 1.6%. Moreover, ForE1 may participate to the structural integrity of ForC1 as its formate:BV oxidoreductase activity dropped by 50-fold when produced and purified in the absence of ForE1. Using several techniques, we have shown that MK-7 copurified with ForCE1 in a molar ratio (1:0.87). As discussed above, ForCE enzymes are not predicted to contain any transmembrane helices and are purified without detergents. Nevertheless, they bind menadione with an apparent affinity ($K_M^{menadione}$ = 20 μM) in the same range as the membrane integral nitrate reductase A from *E. coli* and the peripheral type-II NADH:quinone oxidoreductase from *Caldalkalibacillus thermarum* (57, 58). Finally, ForCE1 is also able to bind MK-8 at a low but significant ratio, consistent with low MK-8 abundance in *B. subtilis* membrane (48). To recruit menaquinone, it is reasonable to assume that ForCE contacts the membrane. Even if ForCE1 and ForCE2 have been purified without detergents, they could loosely bind the cytoplasmic side of the membrane through amphipathic helices similarly to the peripheral NdhII from *C. thermarum* that couples NADH oxidation to menaquinone reduction (59). Evaluation of this hypothesis is the object of undergoing studies in our laboratory.

ASBMB

ForC1 and ForC2 from *B. subtilis* are distinct from other members of the FDH family notably because of the residues at vicinity of the Mo atom such as the natural substitution of the strictly conserved His residue adjacent to Cys or Secys (C/UH) by a Gln (C/UQ) (Figs. 1*A* and S2*A*). This change from a positively charged and polar amino acid (His) by a polar one (Gln) is intriguing and prompted us to examine the active site region by sequence alignment and examination of the 3D structures of FDHs (Fig. S7). This scrutinous analysis allowed us to pinpoint an His residue located beside the strictly conserved Arg active residue and whose function may be to preserve at least one positive charge in close proximity to the active site (Fig. S7*A*). Furthermore, this analysis sheds light into the systematic occurrence of at least one His residue close to the active site with the occurrence of a Gln residue (Class I: C/UH RGQ or C/UQ RGH as in ForC, Fig. S7, *A*–*C*), a Glu residue (Class II: C/UH RGE, Fig. S7, *D* and *E*), or an His residue (class III: C/UH RGH, Fig. S7, *F* and *G*). As mentioned before, the importance of these residues and their mechanistic role at the active site are still unknown, and this will be investigated in detail in forthcoming studies.

Phylogenetic analysis indicates that the ForC proteins of *B. subtilis* are the first characterized representatives of a new subfamily of FDHs with a CQ RGH motif. Indeed, using the ForC1 sequence as bait, 377 sequences with an N-terminal extension allowing the coordination of 4 [Fe-S] clusters were identified. These sequences belong to the previously mentioned classes I and III. Strikingly, the 176 sequences with the CQ RGH catalytic motif (Fig. S2*A* sequences shown in blue) cluster distinctly from the 201 sequences with the CH RGQ/H catalytic motif (Fig. S2*A* sequences shown in gray). The 176 sequences are mainly found in Firmicutes, but some representatives are found in other bacterial phyla (Proteobacteria, Actinobacteria, Deinococcus, Acidobacteria, and Planctomycetes) or in Archaea (Fig. S2*B*). Furthermore, the vast majority of sequences with the CQ RGH motif are synteny encoded with a gene encoding a protein with a DUF1641 domain, presumably a homolog of ForE.

While the *forC1* and *forC2* genes are paralogous and proteins have 61 % of identity, ForE1 and ForE2 share weak sequence identity (20%). However, both enzymatic complexes achieve the same reaction with comparable kinetic behavior and most likely interact loosely with the membrane to recruit menaquinone. A notable difference between both complexes resides in the way the corresponding operons are regulated. While genes encoding FDHs are typically regulated by anaerobiosis, fermentation, and formate induction (60, 61), *forCE1* and *forCE2* do not seem expressed under these metabolic conditions (24, 28) and are upregulated by different environmental and cellular cues. Notably, the *forCE1* operon is part of the SigB-dependent general stress regulon and is upregulated in swarming conditions, in the presence of high salt or ethanol concentrations (28, 62, 63). On the other hand, the *forCE2* transcription is upregulated after germination and in exponential growth and downregulated by the ResED two-component system that activates genes in oxygen-limited conditions (28, 64).

Altogether, our results highlight the originality of these noncanonical FDHs, expand our knowledge on the FDHs' building blocks, and pave the way for developing new biocatalysts for CO_2 reduction.

Experimental procedures

Bacterial strains, media, and culture conditions

B. subtilis 168 (*trpC2*) strain and derivatives are described in Table S6. Genomic integration of reporter sequences was achieved using the pSPH1/pSPH2 plasmids (obtained by Dr Henrik Strahl von Schulten) by transformation at the *amyE* locus (65). Target integration was confirmed by amylase sensitivity. Chromosomic inactivation of target genes was obtained by transformation of gDNA from KO strains (source BGSC). Clones were verified by PCR. For routine growth, cells were propagated in LB medium (tryptone, 10 g/l, yeast extract, 5 g/l, NaCl, 5 g/l). When necessary, antibiotics were used at the following concentrations: spectinomycin (100 μg ml^{-1}), kanamycin (10 μg ml^{-1}), and erythromycin (1.25 μg ml^{-1}).

For overproduction of recombinant proteins, *B. subtilis* 168 derivatives (4088 *amyE*::pSHP1-6his*yjg*CD, 4233 *amyE*::pSHP2-*yjgC*8his, 4230 *amyE*::pSHP-6his*yrhED*, 4192 *amyE*::pSHP-*yrhE*8his) were grown in 4.8 L of the LB medium with 2 μM sodium molybdate at 37 °C until A_{600} = 0.3; cells were then submitted to a salt shock (0.4 M NaCl) for 30 min, followed by induction with 0.8% xylose for 3 h (4088 and 4233 strains) and expression overnight (4230 and 4192 strains) at 37 °C. Harvested cells were washed once in 20 mM sodium phosphate, pH 7.5, and 50 mM Na_2SO_4, and cells were kept at −80 °C until use.

Plasmid construction

Genes were cloned into pSPH1 and pSPH2 to allow induction with the xylose promoter at the *amyE* locus. Plasmids were constructed as follows: the pET28HT-YjgCD: *yjgCD* fragment was amplified with primers 898-899 using *B. subtilis* gDNA as the template and inserted by ligation into a previously excised pET28dHT-*gapR* at *Nde*I-*Kpn*I sites to add a 6-his tag sequence followed by a TEV cleavage site at the 5′ end of *yjgC*.; pSPH1-6his*yjg*CD: 6his-*yjgCD* was amplified with primers 941 to 952 using pET28HT-YjgCD as the template and introduced by ligation into pSHP1 at *Avr*II-*Xho*I sites; pSPH1-6his*yrhED*: *yrhED* was amplified with primers 967 to 968 using *B. subtilis* 168 gDNA as the template and introduced into pSPH1 at *Avr*II-*Eco*RI sites using Gibson Assembly Cloning kit NEB with the linker primer 966. Cloning of *yrhE* at this site adds a sequence encoding a 6-his tag followed by a TEV cleavage site at the 5′ end. pSPH2-*yjgC*8his: *yjgC* was amplified with primers 944 to 950 and introduced into pSPH2 at *Xho*I-*Spe*I sites. Cloning of *yjgC* at this site adds a sequence encoding an 8-his tag at the 3′ end; pSPH1-*yrhE*8his: pSPH2-*yjgC*8his was digested at *Xho*I-*Sfi*I sites to release *yjgC* fragment. Then, a *yrhE* fragment was amplified with primers 988 to 1042 using *B. subtilis* gDNA as the template and introduced by ligation.

All plasmids were verified by sequencing, and primers are listed in Table S7.

Protein purification

All steps were performed at 4 °C with an ÄKTA FPLC system (GE Healthcare). Frozen cells, typically 10 to 15 g of wet weight, were thawed and suspended in 90 ml of 20 mM sodium phosphate, pH 7.5, and 50 mM Na_2SO_4 (buffer A). Cell suspension was treated with protease inhibitor cocktail (Roche), lysozyme (1 mg/ml during 30 min at 37 °C), DNase I, and 0.5 mM EDTA and disrupted by 1 to 2 passages through a French pressure cell at 1 bar. Cells debris were removed by centrifugation for 40 min at 100,000*g*. The supernatant was applied onto 15 ml Ni-NTA affinity column (GE Healthcare). The column was washed with buffer A supplemented with 50 mM imidazole, and the enzyme eluted in buffer A supplemented with 500 mM imidazole and 10 mM KNO_3. The enzyme was washed in 50 mM MES, pH 6, 50 mM Na_2SO_4, 5% glycerol, and 10 mM KNO_3 using a PD-10 desalting column (Pharmacia), concentrated with Amicon 100 kDa (Millipore) and frozen in liquid nitrogen.

Activity assays and kinetic analysis

FDH activity was determined using an AvaSpec-2048L spectrophotometer, inside an anaerobic chamber, with an atmosphere of 100% N_2, at room temperature (RT), with stirring. For formate-BV oxidoreduction measurements, the reduction of BV was monitored at 600 nm ($\varepsilon_{600\ nm}$ (BV^+) = 7.0945 $mM^{-1}\ cm^{-1}$) with 1.75 mM BV in 25 mM CHES, pH 8.6 (6his-YrhED), or 17.5 mM BV in 25 mM CHES, pH 10 (YjgC-8his/6his-YjgCD), supplemented with 50 mM sodium formate at RT. One unit of activity is defined as the amount of FDH capable of oxidizing 1 μmol of formate per minute per milligram of the enzyme. Kinetic analysis was measured at substrate concentrations ranging from 0.5 μM to 150 mM sodium formate. For formate:menadione oxidoreduction measurements, the reduction of 60 μM menadione was monitored at 260 nm ($\varepsilon_{260\ nm}$ (menadione) = 17.2 $mM^{-1}\ cm^{-1}$) in 25 mM CHES, pH 9, and 50 mM sodium formate at RT. One unit of activity is defined as the amount of FDH capable of reducing 1 μmol of menadione per minute per milligram of the enzyme. Kinetic analysis was measured at substrate concentrations ranging from 0.5 μM to 200 μM menadione. Kinetic parameters were calculated by direct fitting of the Michaelis–Menten equation: $y = V_{max} \times S/(K_M + S)$ using OriginPro. The influence of pH on FDH activity was assessed using a buffer mix containing 20 mM MES, CHAPS, CHES, and Hepes at RT. The pH was adjusted from 6.5 to 11 with HCl and NaOH.

Quinone extraction and analysis

Quinones were extracted from solutions of purified ForCE1, ForCE2, or ForC1 essentially as described (66). Briefly, 20 to 50 μl of purified proteins (corresponding to 0.1–0.25 mg protein) was transferred into glass tubes and completed up to 200 μl with water. 50 μl KCl 3 M and 3 ml methanol were added, and the tubes were vortexed for 1 min. 2 ml petroleum ether (40–60° boiling range) was added, and vortex was repeated for 1 min. The tubes were centrifuged at 700 rpm for 1 min at RT, the upper phase was collected, and the methanol phase was extracted again with 2 ml petroleum ether. Both petroleum ether phases were combined in 5 ml Eppendorf tubes and dried under a nitrogen flow. Dried lipid extracts were resuspended in 100 μl ethanol, and fractions corresponding to 5 and 20 μg protein were analyzed by HPLC coupled to ECD and MS as previously described (67). The probe temperature was 400 °C, the cone voltage was 80 V, and MS spectra were recorded between *m/z* 500 and 900 with a scan time of 0.5 s.

Commercial MK-7 (Sigma) was used to generate standard curves ranging from 2 to 100 pmoles. The concentration of the MK-7 solution was determined using an extinction coefficient $\varepsilon_{248\ nm}$ = 18,900 $M^{-1}\ cm^{-1}$ (68). The standard curve for the ECD signal was used to quantify the peaks (MK-7 and MK-8) obtained for the protein samples. Technical duplicates (extraction and analysis) were performed for each protein preparation, and the quantifications of MKs represent the average of the four values obtained from two measurements (5 and 20 μg protein) for each duplicate.

Redox titrations

Preparation of EPR samples

Formate-reduced samples of ForCE1 were prepared in 50 mM MES buffer, pH 6.0, with 80 μM of protein as followed. The air-oxidized sample was incubated with 100 mM sodium formate in a glove box and frozen immediately. Subsequently, the sample was thawed in the glove box and further reduced with 13 mM sodium dithionite before freezing. Formate-reduced samples of ForCE2 were prepared in 20 mM Tris/propane, pH 6.5, and 5% glycerol containing 50 μM of protein as followed. The air-oxidized sample was incubated with 30 mM sodium formate in a glove box before freezing or incubated with 5 mM sodium dithionite in a glove box before freezing.

Redox titrations of the MSK radical in ForCE1 were carried out anaerobically at RT (about 25 °C) either in a glove box or in an airtight vessel flushed with oxygen-free argon. Redox potentials were measured with a combined Pt-Ag/AgCl/KCl (3M) microelectrode and are given in the text with respect to the standard hydrogen electrode. The following redox mediators were used at 10 μM final concentrations: phenazine methosulfate, phenazine ethosulfate, methylene blue, resorufin, indigo carmine, anthraquinone 2,6 disulfate, flavin mononucleotide, phenosafranine, neutral red, and methyl viologen. Reductive titrations were carried out by stepwise addition of an anaerobic sodium dithionite solution (100 mM or 1 mM). Samples were anaerobically transferred into calibrated EPR tubes that were rapidly frozen.

The normalized variation of the peak-to-peak amplitude of the MSK EPR signal was fitted to a theoretical curve corresponding to two successive one-electron redox processes:

$$A_{ptp} = \frac{1}{1+e^{\alpha(E-E_1)}+e^{\alpha(E_2-E)}} \quad (1)$$

Where E_1 and E_2 are the midpoint potentials of the MK/MSK and MSK/MKH_2 couples, respectively. α = F/RT where R and

F are the molar gas and Faraday constants, respectively, and T is the absolute temperature. The two-electron midpoint potential of the MK/MKH_2 couple, which corresponds to the redox potential for which the amount of MSK is maximum, is $E_m = (E_1 + E_2)/2$. The stability constant K_S of MSK defined with respect to the comproportionation reaction is as follows:

$$K_S = \frac{[MSK]^2}{[MK][MKH_2]} = e^{\alpha(E_1 - E_2)} \quad (2)$$

The occupancy level R_{occ} was calculated as the ratio between the normalized MSK concentration per enzyme inferred from spin quantitation experiments (assuming one [2Fe-2S] cluster taken as internal reference per enzyme) and the normalized maximal MSK concentration (MSK_{max}) given by the following equation.

$$MSK_{max} = \frac{1}{1+2e^{\alpha/2 \times (E_2 - E_1)}} \quad (3)$$

Differences in the binding constants of MK (K_{MK}) and MKH_2 (K_{MKH2}) manifest as a shift in the E_m from that of free MK/MKH_2 given by the following equation:

$$E_m(\text{bound}) - E_m(\text{free}) = \frac{1}{2}\alpha \times \ln\left(\frac{K_{MKH_2}}{K_{MK}}\right) \quad (4)$$

The affinity of the site for MSK is a determinant of E_1 and E_2 but not of E_m.

Multifrequency EPR spectroscopy

X and Q band EPR spectra were measured on a Bruker Elexsys E500 spectrometer. For X band measurements, the spectrometer was equipped with an ER4012ST rectangular cavity fitted to an ESR900 helium flow cryostat (Oxford Instruments). For Q band measurements, a standard resonator equipped with an CF 935 cryostat (Oxford Instruments) was used. W band experiments were performed on a Bruker Elexsys E680 spectrometer equipped with a 6 T superconducting magnet and a 2-kG high-resolution sweep coil. Spectra were recorded with the standard W-band resonator fitted with a Bruker cryogen-free system (Stinger). For the echo-detected field-swept experiment, the two-pulse echo intensity was measured as a function of magnetic field at fixed time interval τ = 200 ns between the two microwave pulses, using a shot repetition time of 500 μs.

A field correction was applied to the magnetic field by simulating the overlapping spectral contribution of Mn^{2+}, assuming $g(Mn^{2+}) = 2.00101 \pm 0.00005$ and an isotropic hyperfine coupling constant $a(Mn^{2+}) = -(8.710 \pm 0.003)$ mT (69).

Spectral simulations

Numerical simulations of EPR spectra were performed with the EasySpin package (release 5.0.12) using MATLAB (The MathWorks, Inc) (70). A field-independent (unresolved hyperfine couplings, H-strain) linewidth model was used to simulate the EPR signal of the MSK and the Mo(V) species, whereas those of the FeS centers were simulated using a field-dependent (g-strain) linewidth model. For H-strain, the full width at half maximum of Gaussian lines along the g-tensor principal axes was adjusted, whereas the corresponding g-strain distributions were considered uncorrelated. Parameters used for the simulations shown in this work are provided in Table S8.

MS analysis

Purified proteins were subjected to an SDS-PAGE, and the stacking gel band corresponding to total proteins was excised and submitted to in-gel trypsin digestion for proteomic analysis as described previously (71) and with the following adapted modifications. Spectra were processed by Proteome Discoverer software (ThermoFisher, version 2.4.1.15) using the Sequest HT algorithm with the *Bacillus subtilis* database (Taxonomy ID: 224308, version 2016-08-20, downloaded from the NCBI by Protein Center including 5573 entries). In this study, proteins were also filtered by a minimum number of Peptide Spectral Match of 10. The list of identified proteins is available in Tables S2–S4.

Data availability

The mass spectrometry proteomics data have been deposited to the ProteomeXchange Consortium (http://proteomecentral.proteomexchange.org) via the PRIDE partner repository (72) with the dataset identifier PXD028742 and 10.6019/PXD028742.

Supporting information—This article contains supporting information (73–87).

Acknowledgments—We thank Romain Mercier for providing plasmids pSPH1/pSPH2, originally constructed by H. Strahl von Schulten. We also thank Matt Cabeen, Elodie Foulquier-Khadaroo, and Anne Galinier for providing protocols and advice for *B. subtilis* genetics and culture. We thank Anne Galinier and Frédéric Biaso for scientific discussions. We also thank Genevieve Shirley Dobihal and David Rudner for providing genomic DNA *Bacillus subtilis* 168 *trpC2* Δ*yjgD*::ery, strain was originally constructed by Koo *et al.* (88). Marseille Protéomique (MaP) has been supported by IBiSA (Infrastructures en Biologie Santé et Agronomie) and Aix Marseille Université. We are grateful to the EPR facilities available at the French EPR network (RENARD, IR CNRS 3443) and the Aix-Marseille EPR center. This work was supported by the French National Research Agency (ANR MOLYERE project, Grant No. 16-CE29-0010-01), the CNRS, and the CNRS Energy unit (Cellule Energie) through the project MICROBIOCO2.

Author contributions—A. W., R. A.-C., and S. G. methodology; A. U., F. P., M. B., F. S., G. G., R. L., A. W., R. A.-C., and S. G. investigation; A. M., B. G., A. W., R. A.-C., and S. G. writing–review and editing; A. M., B. G., and S. G. resources; A. M., B. G., and S. G. funding acquisition.

Funding and additional information—A. U. and M. B. were supported by a French MESR fellowship and R. A.-C. by an ANR MOLYERE project post-doctoral fellowship.

Conflict of interest—The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

Abbreviations—The abbreviations used are: BV, benzyl viologen; ECD, electrochemical detection; EPR, electron paramagnetic resonance; FDHs, formate dehydrogenases; ForC, formate oxidoreductase catalytic; ForE, formate oxidoreductase essential; Mo/W-*bis*-PGD, molybdenum/tungsten–*bis*-pyranopterin guanine dinucleotide; MSK, menasemiquinone.

References

1. Niks, D., and Hille, R. (2019) Molybdenum- and tungsten-containing formate dehydrogenases and formylmethanofuran dehydrogenases: Structure, mechanism, and cofactor insertion. *Protein Sci.* **28**, 111–122
2. Schoepp-Cothenet, B., van Lis, R., Philippot, P., Magalon, A., Russell, M. J., and Nitschke, W. (2012) The ineluctable requirement for the trans-iron elements molybdenum and/or tungsten in the origin of life. *Sci. Rep.* **2**, 263
3. Anbar, A. D. (2008) Elements and evolution. *Science* **322**, 1481–1483
4. Catling, D. C., and Zahnle, K. J. (2020) The Archean atmosphere. *Sci. Adv.* **6**, 9
5. Maia, L. B., Moura, I., and Moura, J. J. G. (2017) Molybdenum and tungsten-containing formate dehydrogenases: Aiming to inspire a catalyst for carbon dioxide utilization. *Inorg. Chim. Acta* **455**, 350–363
6. Nielsen, C. F., Lange, L., and Meyer, A. S. (2019) Classification and enzyme kinetics of formate dehydrogenases for biomanufacturing via CO2 utilization. *Biotechnol. Adv.* **37**, 107408
7. Magalon, A., Ceccaldi, P., and Schoepp-Cothenet, B. (2016) *The prokaryotic Mo/W-bisPGD enzymes family, Molybdenum and Tungsten Enzymes* (pp. 143–191)
8. Hartmann, T., Schwanhold, N., and Leimkühler, S. (2015) Assembly and catalysis of molybdenum or tungsten-containing formate dehydrogenases from bacteria. *Biochim. Biophys. Acta* **1854**, 1090–1100
9. 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
10. Arnoux, P., Ruppelt, C., Oudouhou, F., Lavergne, J., Siponen, M. I., Toci, R., Mendel, R. R., Bittner, F., Pignol, D., Magalon, A., and Walburger, A. (2015) Sulphur shuttling across a chaperone during molybdenum cofactor maturation. *Nat. Commun.* **6**, 6148
11. Schrapers, P., Hartmann, T., Kositzki, R., Dau, H., Reschke, S., Schulzke, C., Leimkühler, S., and Haumann, M. (2015) Sulfido and cysteine ligation changes at the molybdenum cofactor during substrate conversion by formate dehydrogenase (FDH) from Rhodobacter capsulatus. *Inorg. Chem.* **54**, 3260–3271
12. Thomé, R., Gust, A., Toci, R., Mendel, R., Bittner, F., Magalon, A., and Walburger, A. (2012) A sulfurtransferase is essential for activity of formate dehydrogenases in Escherichia coli. *J. Biol. Chem.* **287**, 4671–4678
13. Boyington, J. C., Gladyshev, V. N., Khangulov, S. V., Stadtman, T. C., and Sun, P. D. (1997) Crystal structure of formate dehydrogenase H: Catalysis involving Mo, molybdopterin, selenocysteine, and an Fe4S4 cluster. *Science* **275**, 1305–1308
14. Maia, L. B., Moura, J. J. G., and Moura, I. (2015) Molybdenum and tungsten-dependent formate dehydrogenases. *J. Biol. Inorg. Chem.* **20**, 287–309
15. Hartmann, T., Schrapers, P., Utesch, T., Nimtz, M., Rippers, Y., Dau, H., Mroginski, M. A., Haumann, M., and Leimkühler, S. (2016) The molybdenum active site of formate dehydrogenase is capable of catalyzing C–H bond cleavage and oxygen atom transfer reactions. *Biochemistry* **55**, 2381–2389
16. Popov, V. O., and Lamzin, V. S. (1994) NAD+-dependent formate dehydrogenase. *Biochem. J.* **301**, 625–643
17. Yilmazer, B., Isupov, M. N., De Rose, S. A., Bulut, H., Benninghoff, J. C., Binay, B., and Littlechild, J. A. (2020) Structural insights into the NAD+-dependent formate dehydrogenase mechanism revealed from the NADH complex and the formate NAD+ ternary complex of the Chaetomium thermophilum enzyme. *J. Struct. Biol.* **212**, 107657
18. Oliveira, A. R., Mota, C., Mourato, C., Domingos, R. M., Santos, M. F. A., Gesto, D., Guigliarelli, B., Santos-Silva, T., Romão, M. J., and Cardoso Pereira, I. A. (2020) Toward the mechanistic understanding of enzymatic CO2 reduction. *ACS Catal.* **10**, 3844–3856
19. Radon, C., Mittelstädt, G., Duffus, B. R., Bürger, J., Hartmann, T., Mielke, T., Teutloff, C., Leimkühler, S., and Wendler, P. (2020) Cryo-EM structures reveal intricate Fe-S cluster arrangement and charging in Rhodobacter capsulatus formate dehydrogenase. *Nat. Commun.* **11**, 1912
20. Wagner, T., Ermler, U., and Shima, S. (2016) The methanogenic CO2 reducing-and-fixing enzyme is bifunctional and contains 46 [4Fe-4S] clusters. *Science* **354**, 114–117
21. Jormakka, M., Törnroth, S., Byrne, B., and Iwata, S. (2002) Molecular basis of proton motive force generation: Structure of formate dehydrogenase-N. *Science* **295**, 1863–1868
22. Hartmann, T., and Leimkühler, S. (2013) The oxygen-tolerant and NAD+-dependent formate dehydrogenase from Rhodobacter capsulatus is able to catalyze the reduction of CO2 to formate. *FEBS J.* **280**, 6083–6096
23. Oh, J. I., and Bowien, B. (1998) Structural analysis of the fds operon encoding the NAD+-linked formate dehydrogenase of Ralstonia eutropha. *J. Biol. Chem.* **273**, 26349–26360
24. Glaser, P., Danchin, A., Kunst, F., Zuber, P., and Nakano, M. M. (1995) Identification and isolation of a gene required for nitrate assimilation and anaerobic growth of Bacillus subtilis. *J. Bacteriol.* **177**, 1112–1115
25. Nakano, M. M., Dailly, Y. P., Zuber, P., and Clark, D. P. (1997) Characterization of anaerobic fermentative growth of Bacillus subtilis: Identification of fermentation end products and genes required for growth. *J. Bacteriol.* **179**, 6749–6755
26. Niks, D., Duvvuru, J., Escalona, M., and Hille, R. (2016) Spectroscopic and kinetic properties of the molybdenum-containing, NAD+-dependent formate dehydrogenase from Ralstonia eutropha. *J. Biol. Chem.* **291**, 1162–1174
27. Zuchan, K., Baymann, F., Baffert, C., Brugna, M., and Nitschke, W. (2021) The dyad of the Y-junction- and a flavin module unites diverse redox enzymes. *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* **1862**, 148401
28. Nicolas, P., Mäder, U., Dervyn, E., Rochat, T., Leduc, A., Pigeonneau, N., Bidnenko, E., Marchadier, E., Hoebeke, M., Aymerich, S., Becher, D., Bisicchia, P., Botella, E., Delumeau, O., Doherty, G., *et al.* (2012) Condition-dependent transcriptome reveals high-level regulatory architecture in Bacillus subtilis. *Science* **335**, 1103–1106
29. Zhu, B., and Stülke, J. (2018) SubtiWiki in 2018: From genes and proteins to functional network annotation of the model organism Bacillus subtilis. *Nucleic Acids Res.* **46**, D743–D748
30. Böhmer, N., Hartmann, T., and Leimkühler, S. (2014) The chaperone FdsC for Rhodobacter capsulatus formate dehydrogenase binds the bis-molybdopterin guanine dinucleotide cofactor. *FEBS Lett.* **588**, 531–537
31. Magalon, A., and Mendel, R. R. (2015) Biosynthesis and insertion of the molybdenum cofactor. *EcoSal Plus* **6**, 2
32. Axley, M. J., Grahame, D. A., and Stadtman, T. C. (1990) Escherichia coli formate-hydrogen lyase. Purification and properties of the selenium-dependent formate dehydrogenase component. *J. Biol. Chem.* **265**, 18213–18218
33. Schuchmann, K., and Müller, V. (2013) Direct and reversible hydrogenation of CO2 to formate by a bacterial carbon dioxide reductase. *Science* **342**, 1382–1385
34. Grimaldi, S., Biaso, F., Burlat, B., and Guigliarelli, B. (2016) *Electron paramagnetic resonance studies of molybdenum enzymes, Molybdenum and Tungsten Enzymes: Spectroscopic and Theoretical Investigations* (pp. 68–120)

ASBMB

35. Brondino, C. D., Passeggi, M. C. G., Caldeira, J., Almendra, M. J., Feio, M. J., Moura, J. J. G., and Moura, I. (2004) Incorporation of either molybdenum or tungsten into formate dehydrogenase from Desulfovibrio alaskensis NCIMB 13491; EPR assignment of the proximal iron-sulfur cluster to the pterin cofactor in formate dehydrogenases from sulfate-reducing bacteria. *J. Biol. Inorg. Chem.* **9**, 145–151
36. 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
37. Dermoun, Z., De Luca, G., Asso, M., Bertrand, P., Guerlesquin, F., and Guigliarelli, B. (2002) The NADP-reducing hydrogenase from Desulfovibrio fructosovorans: Functional interaction between the C-terminal region of HndA and the N-terminal region of HndD subunits. *Biochim. Biophys. Acta* **1556**, 217–225
38. Deaton, J. C., Solomon, E. I., Watt, G. D., Wetherbee, P. J., and Durfor, C. N. (1987) Electron paramagnetic resonance studies of the tungsten-containing formate dehydrogenase from Clostridium thermoaceticum. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **149**, 424–430
39. Jollie, D. R., and Lipscomb, J. D. (1991) Formate dehydrogenase from Methylosinus trichosporium OB3b. Purification and spectroscopic characterization of the cofactors. *J. Biol. Chem.* **266**, 21853–21863
40. Young, T., Niks, D., Hakopian, S., Tam, T. K., Yu, X., Hille, R., and Blaha, G. M. (2020) Crystallographic and kinetic analyses of the FdsBG subcomplex of the cytosolic formate dehydrogenase FdsABG from Cupriavidus necator. *J. Biol. Chem.* **295**, 6570–6585
41. Gardiner, A. T., Zech, S. G., MacMillan, F., Käss, H., Bittl, R., Schlodder, E., Lendzian, F., and Lubitz, W. (1999) Electron paramagnetic resonance studies of zinc-substituted reaction centers from Rhodopseudomonas viridis. *Biochemistry* **38**, 11773–11787
42. Grimaldi, S., Lanciano, P., Bertrand, P., Blasco, F., and Guigliarelli, B. (2005) Evidence for an EPR-detectable semiquinone intermediate stabilized in the membrane-bound subunit NarI of nitrate reductase A (NarGHI) from Escherichia coli. *Biochemistry* **44**, 1300–1308
43. Hastings, S. F., Kaysser, T. M., Jiang, F., Salerno, J. C., Gennis, R. B., and Ingledew, W. J. (1998) Identification of a stable semiquinone intermediate in the purified and membrane bound ubiquinol oxidase-cytochrome bd from Escherichia coli. *Eur. J. Biochem.* **255**, 317–323
44. Ingledew, W. J., Ohnishi, T., and Salerno, J. C. (1995) Studies on a stabilisation of ubisemiquinone by Escherichia coli quinol oxidase, cytochrome bo. *Eur. J. Biochem.* **227**, 903–908
45. Sato-Watanabe, M., Itoh, S., Mogi, T., Matsuura, K., Miyoshi, H., and Anraku, Y. (1995) Stabilization of a semiquinone radical at the high-affinity quinone-binding site (QH) of the Escherichia coli bo-type ubiquinol oxidase. *FEBS Lett.* **374**, 265–269
46. Lanciano, P., Magalon, A., Bertrand, P., Guigliarelli, B., and Grimaldi, S. (2007) High-stability semiquinone intermediate in nitrate reductase A (NarGHI) from Escherichia coli is located in a quinol oxidation site close to heme bD. *Biochemistry* **46**, 5323–5329
47. Liebl, U., Pezennec, S., Riedel, A., Kellner, E., and Nitschke, W. (1992) The Rieske FeS center from the gram-positive bacterium PS3 and its interaction with the menaquinone pool studied by EPR. *J. Biol. Chem.* **267**, 14068–14072
48. Sato, T., Yamada, Y., Ohtani, Y., Mitsui, N., Murasawa, H., and Araki, S. (2001) Production of menaquinone (vitamin K2)-7 by Bacillus subtilis. *J. Biosci. Bioeng.* **91**, 16–20
49. Un, S., Dorlet, P., and Rutherford, A. W. (2001) A high-field EPR tour of radicals in photosystems I and II. *Appl. Magn. Reson.* **21**, 341–361
50. Grimaldi, S., Ostermann, T., Weiden, N., Mogi, T., Miyoshi, H., Ludwig, B., Michel, H., Prisner, T. F., and MacMillan, F. (2003) Asymmetric binding of the high-affinity Q(H)(*)(-) ubisemiquinone in quinol oxidase (bo3) from Escherichia coli studied by multifrequency electron paramagnetic resonance spectroscopy. *Biochemistry* **42**, 5632–5639
51. Hille, R., Hall, J., and Basu, P. (2014) The mononuclear molybdenum enzymes. *Chem. Rev.* **114**, 3963–4038
52. Page, C. C., Moser, C. C., Chen, X., and Dutton, P. L. (1999) Natural engineering principles of electron tunnelling in biological oxidation–reduction. *Nature* **402**, 47–52
53. De Causmaecker, S., Douglass, J. S., Fantuzzi, A., Nitschke, W., and Rutherford, A. W. (2019) Energetics of the exchangeable quinone, QB, in Photosystem II. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **116**, 19458–19463
54. Rendon, J., Pilet, E., Fahs, Z., Seduk, F., Sylvi, L., Hajj Chehade, M., Pierrel, F., Guigliarelli, B., Magalon, A., and Grimaldi, S. (2015) Demethylmenaquinol is a substrate of Escherichia coli nitrate reductase A (NarGHI) and forms a stable semiquinone intermediate at the NarGHI quinol oxidation site. *Biochim. Biophys. Acta* **1847**, 739–747
55. Covian, R., Zwicker, K., Rotsaert, F. A., and Trumpower, B. L. (2007) Asymmetric and redox-specific binding of quinone and quinol at center N of the dimeric yeast cytochrome bc1 complex. Consequences for semiquinone stabilization. *J. Biol. Chem.* **282**, 24198–24208
56. Robertson, D. E., Prince, R. C., Bowyer, J. R., Matsuura, K., Dutton, P. L., and Ohnishi, T. (1984) Thermodynamic properties of the semiquinone and its binding site in the ubiquinol-cytochrome c (c2) oxidoreductase of respiratory and photosynthetic systems. *J. Biol. Chem.* **259**, 1758–1763
57. Giordani, R., Buc, J., Cornish-Bowden, A., and Cárdenas, M. L. (1997) Kinetics of membrane-bound nitrate reductase A from Escherichia coli with analogues of physiological electron donors. *Eur. J. Biochem.* **250**, 567–577
58. Blaza, J. N., Bridges, H. R., Aragão, D., Dunn, E. A., Heikal, A., Cook, G. M., Nakatani, Y., and Hirst, J. (2017) The mechanism of catalysis by type-II NADH:quinone oxidoreductases. *Sci. Rep.* **7**, 40165
59. Heikal, A., Nakatani, Y., Dunn, E., Weimar, M. R., Day, C. L., Baker, E. N., Lott, J. S., Sazanov, L. A., and Cook, G. M. (2014) Structure of the bacterial type II NADH dehydrogenase: A monotopic membrane protein with an essential role in energy generation. *Mol. Microbiol.* **91**, 950–964
60. Oh, J. I., and Bowien, B. (1999) Dual control by regulatory gene fdsR of the fds operon encoding the NAD+-linked formate dehydrogenase of Ralstonia eutropha. *Mol. Microbiol.* **34**, 365–376
61. Pinske, C., and Sawers, R. G. (2016) Anaerobic formate and hydrogen metabolism. *EcoSal Plus* **7**, 1
62. Höper, D., Völker, U., and Hecker, M. (2005) Comprehensive characterization of the contribution of individual SigB-dependent general stress genes to stress resistance of Bacillus subtilis. *J. Bacteriol.* **187**, 2810–2826
63. Petersohn, A., Brigulla, M., Haas, S., Hoheisel, J. D., Völker, U., and Hecker, M. (2001) Global analysis of the general stress response of Bacillus subtilis. *J. Bacteriol.* **183**, 5617–5631
64. Ye, R. W., Tao, W., Bedzyk, L., Young, T., Chen, M., and Li, L. (2000) Global gene expression profiles of Bacillus subtilis grown under anaerobic conditions. *J. Bacteriol.* **182**, 4458–4465
65. Dubnau, D., and Davidoff-Abelson, R. (1971) Fate of transforming DNA following uptake by competent Bacillus subtilis. I. Formation and properties of the donor-recipient complex. *J. Mol. Biol.* **56**, 209–221
66. Szyttenholm, J., Chaspoul, F., Bauzan, M., Ducluzeau, A.-L., Chehade, M. H., Pierrel, F., Denis, Y., Nitschke, W., and Schoepp-Cothenet, B. (2020) The controversy on the ancestral arsenite oxidizing enzyme; deducing evolutionary histories with phylogeny and thermodynamics. *Biochim. Biophys. Acta* **1861**, 148252
67. Pelosi, L., Vo, C.-D.-T., Abby, S. S., Loiseau, L., Rascalou, B., Hajj Chehade, M., Faivre, B., Goussé, M., Chenal, C., Touati, N., Binet, L., Cornu, D., Fyfe, C. D., Fontecave, M., Barras, F., *et al.* (2019) Ubiquinone biosynthesis over the entire O2 range: Characterization of a conserved O2-independent pathway. *mBio* **10**, e01319-19
68. McMillan, D. G. G., Marritt, S. J., Butt, J. N., and Jeuken, L. J. C. (2012) Menaquinone-7 is specific cofactor in tetraheme quinol dehydrogenase CymA. *J. Biol. Chem.* **287**, 14215–14225
69. Burghaus, O., Plato, M., Rohrer, M., Moebius, K., MacMillan, F., and Lubitz, W. (1993) 3-mm High-field EPR on semiquinone radical anions Q.cntdot.- related to photosynthesis and on the primary donor P.cntdot.+ and acceptor QA.cntdot.- in reaction centers of Rhodobacter sphaeroides R-26. *J. Phys. Chem.* **97**, 7639–7647
70. Stoll, S., and Schweiger, A. (2006) EasySpin, a comprehensive software package for spectral simulation and analysis in EPR. *J. Magn. Reson.* **178**, 42–55
71. Santin, Y. G., Doan, T., Lebrun, R., Espinosa, L., Journet, L., and Cascales, E. (2018) *In vivo* TssA proximity labelling during type VI secretion

biogenesis reveals TagA as a protein that stops and holds the sheath. *Nat. Microbiol.* **3**, 1304–1313
72. Perez-Riverol, Y., Csordas, A., Bai, J., Bernal-Llinares, M., Hewapathirana, S., Kundu, D. J., Inuganti, A., Griss, J., Mayer, G., Eisenacher, M., Pérez, E., Uszkoreit, J., Pfeuffer, J., Sachsenberg, T., Yilmaz, S., *et al.* (2019) The PRIDE database and related tools and resources in 2019: Improving support for quantification data. *Nucleic Acids Res.* **47**, D442–D450
73. Gumerov, V. M., and Zhulin, I. B. (2020) TREND: A platform for exploring protein function in prokaryotes based on phylogenetic, domain architecture and gene neighborhood analyses. *Nucleic Acids Res.* **48**, W72–W76
74. Letunic, I., and Bork, P. (2021) Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: An online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Nucleic Acids Res.* **49**, W293–W296
75. George, G. N., Hilton, J., Temple, C., Prince, R. C., and Rajagopalan, K. V. (1999) Structure of the molybdenum site of dimethyl sulfoxide reductase. *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 1256–1266
76. Jepson, B. J. N., Anderson, L. J., Rubio, L. M., Taylor, C. J., Butler, C. S., Flores, E., Herrero, A., Butt, J. N., and Richardson, D. J. (2004) Tuning a nitrate reductase for function. *J. Biol. Chem.* **279**, 32212–32218
77. Barber, M. J., May, H. D., and Ferry, J. G. (1986) Inactivation of formate dehydrogenase from *Methanobacterium formicicum* by cyanide. *Biochemistry* **25**, 8150–8155
78. Jepson, B. J. N., Mohan, S., Clarke, T. A., Gates, A. J., Cole, J. A., Butler, C. S., Butt, J. N., Hemmings, A. M., and Richardson, D. J. (2007) Spectropotentiometric and structural analysis of the periplasmic nitrate reductase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **282**, 6425–6437
79. 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., and Romão, M. J. (2008) Periplasmic nitrate reductase revisited: A sulfur atom completes the sixth coordination of the catalytic molybdenum. *J. Biol. Inorg. Chem.* **13**, 737–753
80. Gangeswaran, R., Lowe, D. J., and Eady, R. R. (1993) Purification and characterization of the assimilatory nitrate reductase of *Azotobacter vinelandii*. *Biochem. J.* **289**, 335–342
81. 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., and 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**, 9000–9012
82. Dementin, S., Arnoux, P., Frangioni, B., Grosse, S., Léger, C., Burlat, B., Guigliarelli, B., Sabaty, M., and Pignol, D. (2007) Access to the active site of periplasmic nitrate reductase: Insights from site-directed mutagenesis and zinc inhibition studies. *Biochemistry* **46**, 9713–9721
83. 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. Biol.* **10**, 928–934
84. Simpson, P. J. L., McKinzie, A. A., and Codd, R. (2010) Resolution of two native monomeric 90kDa nitrate reductase active proteins from *Shewanella gelidimarina* and the sequence of two *napA* genes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **398**, 13–18
85. Butler, C. S., Charnock, J. M., Garner, C. D., Thomson, A. J., Ferguson, S. J., Berks, B. C., and Richardson, D. J. (2000) Thiocyanate binding to the molybdenum centre of the periplasmic nitrate reductase from *Paracoccus pantotrophus*. *Biochem. J.* **352**, 859–864
86. Rivas, M. G., González, P. J., Brondino, C. D., Moura, J. J. G., and 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**, 1617–1622
87. Prisner, T., Lyubenova, S., Atabay, Y., MacMillan, F., Kröger, A., and Klimmek, O. (2003) Multifrequency cw-EPR investigation of the catalytic molybdenum cofactor of polysulfide reductase from *Wolinella succinogenes*. *J. Biol. Inorg. Chem.* **8**, 419–426
88. Koo, B.-M., Kritikos, G., Farelli, J. D., Todor, H., Tong, K., Kimsey, H., Wapinski, I., Galardini, M., Cabal, A., Peters, J. M., Hachmann, A.-B., Rudner, D. Z., Allen, K. N., Typas, A., and Gross, C. A. (2017) Construction and analysis of two genome-scale deletion libraries for Bacillus subtilis. *Cell Syst.* **4**, 291–305
89. Yang, J., and Zhang, Y. (2015) I-TASSER server: New development for protein structure and function predictions. *Nucleic Acids Res.* **43**, W174–W181

Résumé :

De nos jours un des plus grands défis environnementaux est la bioremediation du CO2 atmosphérique. Dans ce contexte, la réduction biocatalytique de ce dernier en formiate par les formiate déshydrogénases microbiennes (FDHs) apparaît très prometteuse. Dans ce travail est présentée une caractérisation RPE de deux FDHs similaires nommées ForCE 1 et ForCE 2 issues de la bactérie du sol *Bacillus subtilis*. Ces enzymes appartiennent à la superfamille des enzymes à cofacteur de type Mo/W-*bis*PGD (i.e. pyranopterine guanosine dinucleotide) retrouvées exclusivement chez les procaryotes et catalysant une grande variété de réactions chimiques. Ces deux FDHs sont d'un grand intérêt scientifique. En effet, les analyses de leurs séquences révèlent que leur site actif ne présente pas les résidus consensuels associés à l'activité formiate-déshydrogénase, définissant une sous-famille de FDHs encore non caractérisée. De plus, les voies métaboliques dans lesquelles ces FDHs s'intègrent au sein de cet organisme aérobie facultatif restent à élucider, ouvrant ainsi la voie à d'autres découvertes en biologie.

Le coeur catalytique de ForCE 1 et ForCE 2 est composé de deux sous-unités. Les analyses de sequences revèlent que la sous-unité catalytique ForC abriterait cinq centres FeS et un cofacteur de type Mo-*bis*PGD alors que ForE n'apparait pas héberger de cofacteur. En combinant potentiométrie d'oxydoréduction, spectroscopie de résonance paramagnétique électronique (RPE) multifréquence en onde continue et en mode pulsé, nous avons caractérisé les signatures RPE et les propriétés redox de plusieurs centres paramagnétiques dans l'enzyme ForCE1 purifiée, à savoir quatre centres FeS et deux signatures de type Mo(V) associées au cofacteur à molybdène. Un signal radicalaire intense a également été détecté. L'analyse de ses propriétés rédox et spectroscopiques par RPE multifréquence a permis de l'attribuer à une espèce ménasemiquinone (MSQ) hautement stabilisée dans l'enzyme. De plus, l'utilisation de la spectroscopie hyperfine a permis de caractériser le mode de fixation du radical dans son site protéique. Enfin, l'étude spectroscopique comparative de ForCE1 et ForCE2 confirme les similarités entre les deux enzymes tant du point de vue de la structure des centres métalliques que de celle du radical MSQ stabilisé. Ces résultats indiquent que ForCE1 et ForCE2 sont des ménaquinone:formiate oxydoréductases, ce qui a été confirmé par des études cinétiques utilisant des analogues de quinones, et suggèrent leur connexion avec la phosphorylation oxydative chez *Bacillus subtilis*.

Mots clés : Enzymes, Molybdene, Spectroscopie RPE, Formiate Deshydrogenase, Centres Fer Soufre, Quinone

Abstract :

Nowadays one of the biggest environmental challenges is the bioremediation of atmospheric CO2. The biocatalytic reduction of CO2 to formate by microbial formate dehydrogenases (FDHs) is very promising. In this work, we present the EPR characterization of two similar FDHs, named ForCE 1 and ForCE 2, from the soil bacterium *Bacillus subtilis*. These enzymes belong to the Mo/W-*bis*PGD (i.e. pyranopterin guanosine dinucleotide) superfamily, which is widespread in prokaryotes. These two FDHs appear to be of great scientific interest for several reasons : sequence analyses reveal that their active site harbours non-consensual residues for formate-dehydrogenase activity, defining a new FDH sub-familly not yet characterised. Moreover, the way in which these enzymes are integrated into the metabolism of this organism remains to be established, leaving the door open for new biological discoveries.

The catalytic core of ForCE1 and ForCE2 is composed of two subunits. From sequence analysis, the larger one (ForC) is thought to coordinate five iron-sulfur clusters and a Mo-*bis*PGD while ForE does not appear to harbor any cofactor. By combining redox potentiometry, multifrequency continuous wave (CW) and pulsed EPR spectroscopy, we were able to characterize the EPR signatures and redox properties of several paramagnetic cofactors in the purified enzymes including at least four FeS clusters (the fifth was detected by spin quantitation) and two MoV species associated to the molybdenum cofactor. An unexpectedly intense radical signal was also detected and could be attributed to a highly stabilized menasemiquinone species based on its redox and spectroscopic properties determined by a multi-frequency EPR approach. Moreover, we provide new insights into the binding mode of the radical using hyperfine spectroscopy. Finally, the comparative spectroscopic study of ForCE 1 and ForCE 2 confirms the similarities between the two enzymes regarding either the structure of the metal centers or that of the stabilized MSK radical. Our results identify the catalytic function of these atypical FDHs as menaquinone:formate oxidoreductases which was confirmed by kinetics studies using quinone analogues and suggest their connection to oxidative phosphorylation in *Bacillus subtilis*.

Keywords : Enzymes, Molybdenum, EPR Spectroscopy, Formate Dehydrogenase, Iron Sulfur Clusters, Quinone