amU
Aix Marseille Université

NNT : 0000AIXM0000

THÈSE DE DOCTORAT

Soutenue à Aix-Marseille Université
le 28 mai 2025 par

Stéphane ZAKARIAN

Mécanismes réactionnels de la formiate déshydrogénase ForCE1 : une approche intégrée par spectroscopie, DFT et dynamique moléculaire

Discipline
Sciences chimiques

École doctorale
ED 250 Sciences chimiques de Marseille

Laboratoire/Partenaires de recherche
Laboratoire Bioénergétique et Ingénierie des Protéines (BIP-UMR 7281) et Laboratoire de Chimie Bactérienne (LCB-UMR 7283)
Société Germe SA

Composition du jury

Carole DUBOC DR, Université Grenoble-Alpes, CNRS	Rapportrice
Aurélien DE LA LANDE DR, Université Paris Saclay, CNRS	Rapporteur
Mickaël CHERRIER MCF, Université Grenoble-Alpes	Examinateur
Barbara SCHOEPP-COTHENET DR, Aix-Marseille Université, CNRS	Présidente du jury
Stéphane GRIMALDI MCF, Aix-Marseille Université	Co-directeur de thèse
Axel MAGALON DR, Aix-Marseille Université, CNRS	Co-directeur de thèse
Julie PAUME PDG, Société Germe	Membre invité

Affidavit

Je soussigné, Stéphane Zakarian, déclare par la présente que le travail présenté dans ce manuscrit est mon propre travail, réalisé sous la direction scientifique de Stéphane Grimaldi et Axel Magalon, dans le respect des principes d'honnêteté, d'intégrité et de responsabilité inhérents à la mission de recherche. Les travaux de recherche et la rédaction de ce manuscrit ont été réalisés dans le respect à la fois de la charte nationale de déontologie des métiers de la recherche et de la charte d'Aix-Marseille Université relative à la lutte contre le plagiat.

Ce travail n'a pas été précédemment soumis en France ou à l'étranger dans une version identique ou similaire à un organisme examinateur.

Fait à Marseille, le 2 avril 2025



Cette œuvre est mise à disposition selon les termes de la Licence Creative Commons Attribution - Pas d'Utilisation Commerciale - Pas de Modification 4.0 International.

Liste de publications et/ou brevets et participation aux conférences

1) Liste des publications et/ou brevet réalisées dans le cadre du projet de thèse :
   1. Zakarian, S., Uzel, A., Gerbaud, G., Pierrel, F., Biaso, F., Magalon, A., Grimaldi, S. Studying molecular interactions between menaquinones and the quinone-reducing formate dehydrogenase ForCE1 of *Bacillus subtilis*. En préparation.

2) Participation aux conférences et écoles d'été au cours de la période de thèse :

   1. **European Federation of EPR groups meeting (EFEPR) Marseille 09/2024.** Poster : Stéphane Zakarian, Guillaume Gerbaud, Frédéric Biaso, Alexandre Uzel, Bruno Guigliarelli, Anne Walburger, Axel Magalon, Stéphane Grimaldi. The quinone binding site in the formate dehydrogenase from *Bacillus subtilis*: an EPR and DFT study.
   2. **Junior Scientists Microbiology Meeting of Marseille (JSM3), Marseille 05/2024.** Communication orale : Stéphane Zakarian, Alexandre Uzel, Frédéric Biaso, Anne Walburger, Axel Magalon, Stéphane Grimaldi. One way or another: the catalysis of formate and CO2 by FDHs.
   3. **Journées de l'association française de RPE (Arpe), Paris 03/2024.** Communication orale : Stéphane Zakarian, Guillaume Gerbaud, Frédéric Biaso, Anne Walburger, Axel Magalon, Stéphane Grimaldi. The quinone binding site and dynamics in the formate dehydrogenase from *Bacillus subtilis*: an EPR, DFT and molecular dynamics study**.**
   4. **Young Investigators in Magnetic Resonance Spectroscopy (YIMRS), Constance (Allemagne) 09/2023.** Poster : Stéphane Zakarian, Alexandre Uzel, Rodrigo Arias-Cartin, Guillaume Gerbaud, Frédéric Biaso, Anne Walburger, Marianne Broc, Farida Seduk, Bruno Guigliarelli, Axel Magalon, Stéphane Grimaldi. EPR characterisation of the active sites of the formate dehydrogenases from *Bacillus subtilis*.
   5. **European Bioenergetics Conference (EBEC) 2022, Aix en Provence 08/2022.** Poster : Stéphane Zakarian, Alexandre Uzel, Pascal Arnoux, Rodrigo Arias-Cartin, Guillaume Gerbaud, Fabien Pierrel, Anne Walburger, Marianne Broc, Farida Seduk, Bruno Guigliarelli, Axel Magalon, Stéphane Grimaldi. New insights into the reactivity of the formate dehydrogenases from *Bacillus subtilis.*
   6. **Journées de l'Arpe, Paris 03/2022.** Poster : Alexandre Uzel, Stéphane Zakarian, Rodrigo Arias-Cartin, Guillaume Gerbaud, Anne Walburger, Marianne Broc, Farida Seduk, Bruno Guigliarelli, Axel Magalon, Stéphane Grimaldi. EPR study of two non canonical formate dehydrogenases from *Bacillus subtilis.*
   7. Ecole de l'Arpe. 08/2023.

8. Ecole MetBio FrenchBic. 10/2022.
9. Ecole magnétisme et résonances magnétiques. 06/2022.

Résumé

Les formiate déshydrogénases (FDH) catalysent la réaction $HCOO^- \rightleftarrows CO_2 + 2e^- + 2H^+$. A ce jour, leurs mécanismes moléculaires restent encore mal compris, notamment le mécanisme catalytique et la résistance à l'oxygène. Face à la grande diversité de cette famille d'enzymes et au nombre limité de systèmes caractérisés, l'exploration de nouvelles FDHs apparait comme une approche prometteuse pour approfondir notre compréhension de ces enzymes.

La bactérie du sol *Bacillus subtilis* possède deux FDHs, ForCE1 et ForCE2, qui interviennent dans la chaine respiratoire aérobie et appartiennent à une nouvelle sous-famille de FDH. La structure de ForCE1, déterminée par cryo-microscopie électronique et diffraction des rayons X, révèle une organisation atypique. En particulier, la sous unité catalytique ForC se distingue par un site actif non-consensuel, un site de fixation pour une ménaquinone et une interaction avec un module partenaire inédit, ForE, qui sert de conduit pour les quinones.

Mon projet de thèse se concentre sur deux volets principaux : d'une part, le mécanisme catalytique d'oxydation du formiate et de réduction du CO_2 des FDHs, et d'autre part, le cycle des quinones dans ForCE1.

A partir de l'analyse de séquences des FDHs et des structures disponibles, j'ai démontré qu'il semble n'exister qu'un seul tunnel conservé pour l'accès au site actif, permettant dans la majorité des cas le transport à la fois du formiate et du CO_2. Mes analyses ont révélé que la mobilité d'un résidu His/Gln à l'extrémité de ce tunnel régule l'accès au site actif, et que sa conformation est contrôlée par l'établissement de liaisons hydrogènes avec les résidus voisins. Sur le plan mécanistique, j'ai étudié les relations entre la géométrie de la première sphère de coordination du métal au site actif et le biais catalytique. Les résultats indiquent notamment qu'une certaine orientation du ligand protéique pourrait défavoriser la réaction de réduction du CO_2. Le site actif de ForCE1 a été caractérisé en détail par spectroscopie RPE. J'ai également analysé un variant où la Gln392 du site actif est remplacée par le résidu His, conservé dans d'autres FDHs. Mes résultats sont interprétés à la lumière des mécanismes réactionnels proposés dans la littérature.

En ce qui concerne les quinones, j'ai d'une part confirmé que l'interaction du complexe ForCE1 avec la membrane via le domaine appelé HMP (helical membrane plug-in) est indispensable à l'échange de quinones entre ForCE1 et la membrane. D'autre part, j'ai caractérisé le mode de fixation de l'intermédiaire ménasemiquinone dans son site Q en étudiant ses interactions magnétiques avec les noyaux voisins.

Abstract

Formate dehydrogenases (FDH) catalyse the reaction $HCOO^- \rightleftarrows CO_2 + 2e^- + 2H^+$. To date, their molecular mechanism remains not well understood, particularly the catalytic mechanism and oxygen resistance. Given the great diversity of this family of enzymes and the limited number of characterised systems, the exploration of new FDHs appears to be a promising approach for furthering our understanding of these enzymes.

The soil bacterium *Bacillus subtilis* possesses two FDHs, ForCE1 and ForCE2, which are involved in the aerobic respiratory chain and belong to a new FDH subfamily. The structure of ForCE1 resolved by cryo-electron microscopy and X ray diffraction reveal an atypical organisation. In particular, the ForC catalytic subunit features a non-consensual active site, a menaquinone binding site and an interaction with an original partner module, ForE, which acts as a channel for quinones.

My thesis project focuses on two main topics: firstly, the catalytic mechanism of formate oxidation and CO_2 reduction, and secondly, the quinone cycle in ForCE1.

From sequence analysis of FDHs and available structures, I have shown there appears to be only one conserved tunnel for access to the active site, allowing in most cases the transport of both formate and CO_2. My analyses revealed that the mobility of a His/Gln residue at the end of this tunnel regulates access to the active site, and that its conformation is controlled by the establishment of hydrogen bonds with neighbouring residues. Mechanistically, I studied the relationship between the geometry of the metal first coordination sphere at the active site and catalytic bias. In particular, the results indicate that a certain orientation of the protein ligand may disadvantage the CO_2 reduction reaction. The active site has been characterised in detail using EPR spectroscopy. I have also analysed the variant in which the Gln392 of the active site is substituted by the His residue, conserved in other FDHs. My results are interpreted in the light of the reaction mechanisms proposed in the literature.

Regarding the quinones, I have confirmed that the interaction of ForCE1 complex with the membrane via the HMP domain (helical membrane plug-in) is essential for the exchange of quinones between ForCE1 and the membrane. In addition, I have characterised the binding mode of the menasemiquinone intermediates in its Q site by studying its magnetic interactions with neighbouring nuclei.

Remerciements

Aux membres de mon jury de thèse, pour avoir accepté de lire et d'évaluer ce manuscrit, je vous exprime toute ma gratitude.

Je me dois de remercier la Région Sud PACA, l'Université d'Aix-Marseille, l'ANR et le CNRS qui ont permis à ce sujet de thèse de voir le jour.

La thèse n'est pas une aventure en solo. Il y a plein de gens envers qui je suis reconnaissant :

Merci à mes deux directeurs de thèse, Axel (la légende veut qu'il ait placé un cierge à la Bonne Mère pour faire marcher la manip HYSCORE sur ForCE1 marquée au ^{15}N) et Stéphane (qui a dû gagner quelques cheveux blancs pendant l'écriture de ce manuscrit), qui m'ont accueilli au BIP et au LCB, qui m'ont appris, accompagné, écouté, guidé jusqu'au bout de ma thèse.

Merci à aux membres des deux équipes dans lesquelles j'ai travaillé pour les conseils qui m'ont été donnés, les nouvelles choses que j'ai apprises. Merci à tous mes collègues qui répandent la bonne humeur dans les labos.

Merci aux membres de ma famille qui savent pourquoi…

Table des matières

Affidavit....2
Liste de publications et/ou brevets et participation aux conférences....3
Résumé....5
Abstract....6
Remerciements....7
Table des matières....8
Introduction....9
Les objectifs de la thèse....43
Matériel et méthodes....44
Résultats....66
Le site actif à Mo/W chez les FDHs....67
Le mécanisme d'interaction de ForCE1 avec les quinones....111
Discussion....112
Annexes....167

Introduction

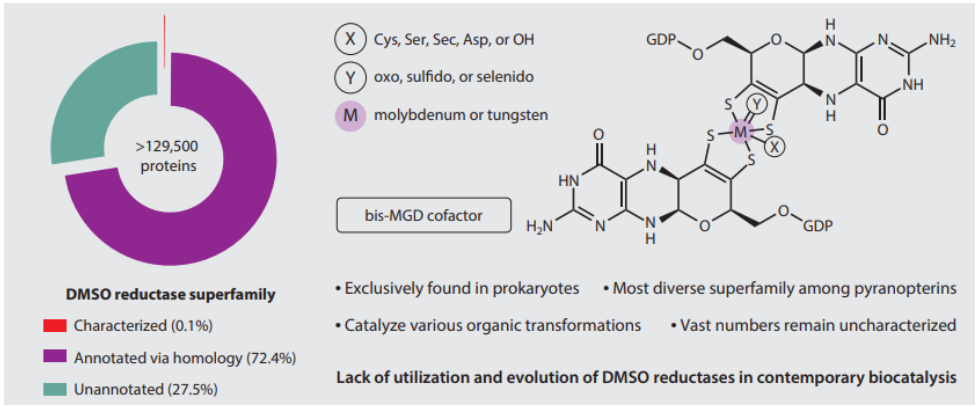
I) La catalyse des enzymes à Mo/W-bisPGD

1) Généralités

Les enzymes à Mo/W-*bis*PGD, également appelées enzymes de la famille de la DMSO (diméthylsulfoxyde) réductase, sont retrouvées exclusivement chez les bactéries et les archées. Elles possèdent un site catalytique composé d'un atome de Mo ou de W coordinné par deux pyranoptérines guanine dinucléotide (PGD), un ligand inorganique (atome de soufre ou d'oxygène) et, dans la plupart des cas, un ligand protéique dont la nature peut varier (sérine, cystéine, sélénocystéine ou aspartate) (Figure 1A). Le seul exemple connu d'enzyme sans ligand protéique est celui de l'arsénite oxydase[1]. La grande majorité des enzymes à Mo/W-*bis*PGD caractérisées jusqu'ici catalysent des réactions d'oxydo-réduction en tirant avantage de la capacité de l'atome de Mo ou de W à osciller entre 3 états d'oxydoréduction : l'état oxydé, l'état semi-réduit par l'ajout d'un électron ou l'état réduit par l'ajout d'un deuxième électron. Toutefois, d'autres types de catalyse ne faisant pas appel à un transfert d'électron sont identifiés parmi ces enzymes[2]. Les enzymes à Mo/W-*bis*PGD forment ainsi une superfamille rassemblant des enzymes exerçant des fonctions très différentes chez les procaryotes. Les réactions d'oxydoréduction catalysées par plusieurs de ces enzymes leur permettent d'intégrer des chaînes de transfert d'électrons contribuant ainsi à la production d'énergie par la cellule. C'est le cas notamment d'enzymes réduisant le nitrate, le DMSO ou encore oxydant le formiate.

Afin d'appréhender l'immense diversité existant dans la superfamille des enzymes à Mo/W-*bis*PGD, une analyse de similarité des 130.000 séquences protéiques (base de données Interpro IPR006657) a été réalisée[3] (Figure 1B). Schématiquement, les séquences de protéines partageant plus de 70% d'identité sont rassemblées en clusters et les enzymes qui ont été expérimentalement caractérisées sont représentées par des pastilles colorées. Un point tout à fait remarquable est le contraste entre la diversité des protéines identifiées dans les bases de données et le nombre relativement faible de protéines caractérisées (moins de 0,1%). Ainsi 99,9% des protéines séquencées n'ont pas été biochimiquement caractérisées et n'ont donc pas de fonction(s) attribuée(s). Comme schématisé sur la Figure 1B, l'activité peut être prédite par homologie de séquences dans un cluster comportant au moins un membre caractérisé. C'est le cas pour environ 73% des séquences. Cependant, près d'un tiers des séquences se rassemblent en une multitude de clusters sans aucun membre caractérisé, laissant ainsi la porte ouverte à la découverte de nouvelles activités enzymatiques. A titre d'exemple, une étude récente a décrit une nouvelle enzyme à Mo catalysant la déhydroxylation de la dopamine, un neurotransmetteur[4].

A



B

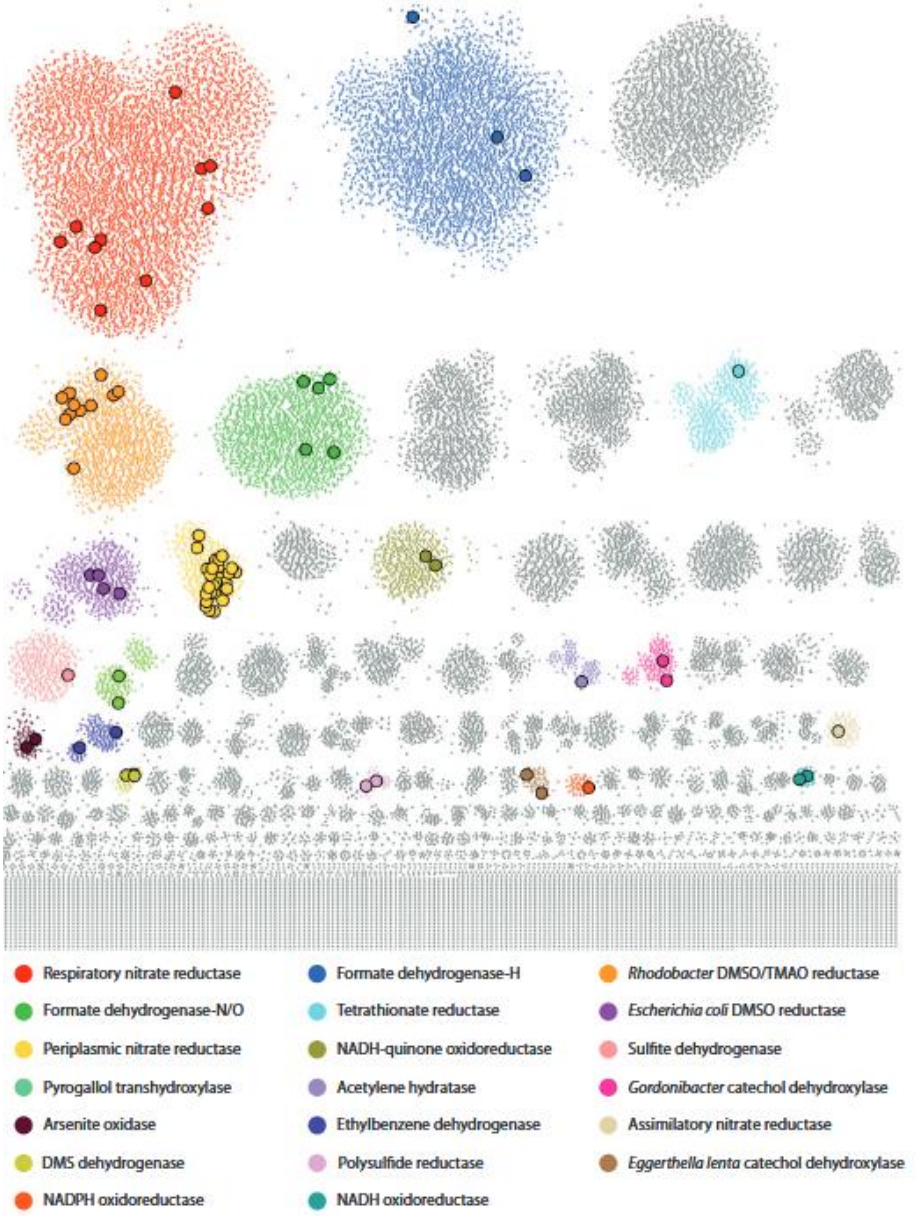


Figure 1. ***A***. *Gauche. Graphique en anneau représentant le pourcentage d'enzymes à cofacteur Mo/W-bisPGD caractérisées, annotées ou non. Droite. Représentation d'un cofacteur à Mo/W-bisPGD.* ***B***. *Analyse de similarité de séquence des Mo/W-bisPGD (Interpro IPR006657). Les nœuds regroupent des enzymes partageant 70% de similarité de séquence. Les enzymes caractérisées sont indiquées par de larges pastilles colorées. Extrait de*[3]

2) Une diversité remarquable de réactions catalysées

Les enzymes à Mo/W-*bis*PGD peuvent accommoder des substrats aux propriétés diverses et de tailles variées, allant de trois ou quatre atomes à des molécules plus grosses comme le cholestérol (Figure 2), pour catalyser des réactions qu'il est possible de regrouper en six catégories. En effet, il peut être distingué quatre types de réactions redox et deux types de réactions non redox. Les réactions redox comprennent les réactions de transfert d'un atome d'oxygène (OAT) ou de soufre (SAT) couplées à l'échange de deux électrons et de deux protons avec le substrat[2] (Eq. 1 et 2), des réactions de transfert d'un proton couplé à l'échange de deux électrons[2] (HAT) (Eq. 3) et des réactions d'hydroxylation[2] (Eq. 4). Ces réactions impliquent une conversion substrat/produit d'un couple d'oxydoréduction dont les potentiels peuvent aller d'environ -500 mV à +800 mV[2] (Tableau 1). Concernant les réactions non redox, elles concernent les réactions de transhydroxylation et d'hydratation[2]. Les mécanismes de ces réactions qu'elles soient redox ou pas ne sont pas toujours bien connus et les modèles proposés pour ces enzymes prévoient soit la liaison directe du substrat au métal ou bien une réaction se produisant en seconde sphère de coordination. Compte tenu de la faible diversité structurale au niveau de la première sphère de coordination, chaque réaction est tributaire de déterminants moléculaires spécifiques qui définissent la nature de la réaction catalysée et le substrat utilisé.

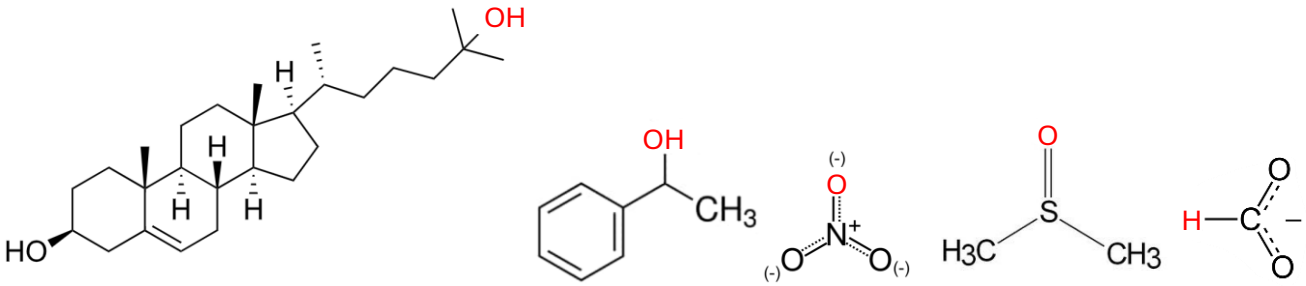


***Figure 2**. Illustration de quelques substrats d'enzymes à Mo/W-bisPGD. De gauche à droite : hydroxycholestérol, phényléthanol, nitrate, DMSO, formiate. Les groupe transférés lors de la réaction sont entourés en rouge*

$$R\text{-}O_n + 2H^+ + 2e^- \rightleftharpoons R\text{-}O_{n-1} + H_2O \quad \text{(Eq. 1)}$$

$$R\text{-}S_n + 2H^+ + 2e^- \rightleftharpoons R\text{-}S_{n-1} + H_2S \quad \text{(Eq. 2)}$$

$$R\text{-}H \rightleftharpoons R^+ + H^+ + 2e^- \quad \text{(Eq. 3)}$$

$$R\text{-}CH_3 + H_2O \rightleftharpoons R\text{-}CH_2OH + 2H^+ + 2e^- \quad \text{(Eq. 4)}$$

***Tableau 1**. Potentiels à pH 7 des couples d'oxydoréduction impliqués dans la catalyse des Mo/W-bisPGD. Quand il y a deux potentiels différents, c'est que les valeurs proviennent de deux références différentes. Extrait de[2].*

Couples d'oxydoréduction	Potentiel redox à pH 7 (mV)
Methanofurane/formylmethanofurane	−497 ; −530
Dioxyde de carbone/formiate	-430
$2H^+ / H_2$	-410
Thiosulfate/sulfure + sulfite	-400
Soufre/sulfure	-270
Pyrogallol/1,2,3,5-tetrahydroxybenzene	-84

Resorcinol/hydroxyhydroquinone	-33
Tetrathionate/thiosulfate	24 ; 170
1-Phenylethanol/ethylbenzene	30
C25-hydroxycholesterol/cholesterol	30
Arséniate/arsénite	60 ; 139
TMAO/TMA	130
DMSO/DMS	160
Nitrate/nitrite	433
Sélénate/sélénite	475
Chlorate/chlorite	708
Perchlorate/chlorate	788

3) Les déterminants moléculaires de la réaction catalysées par les enzymes à cofacteur Mo/WbisMGD

Plusieurs facteurs influencent vraisemblablement la réaction. Les premiers d'entre eux sont les ligands protéiques et inorganiques du métal dont le rôle précis reste difficile à déterminer. En effet, deux cas de figures ont été décrits : une même réaction est catalysée par des sites actifs à la première sphère de coordination différente ou à l'inverse, une même première sphère de coordination permet de catalyser des réactions distinctes. Par exemple, NapA et NarG, sont deux nitrate réductases qui catalysent un OAT et illustrent la situation où une même réaction est catalysée avec des sites actifs dont les premières sphères de coordination sont différentes : un ligand protéique de type Cys ainsi qu'un groupement sulfido pour Nap[5], un ligand protéique de type Asp ainsi qu'un groupement oxo pour Nar[6]. Pour le deuxième cas de figure, on peut citer l'exemple de Nar et de l'éthylbenzène déshydrogénase[7] qui font partie de la famille des Mo/W-bisPGD. En fait, la coordination du métal de ces enzymes est la même, mais Nar catalyse un OAT alors que l'éthylbenzène déshydrogénase catalyse une réaction d'hydroxylation.

Voici un cas un peu plus complexe. Les *S*- ou *N*-oxyde réductases ont un ligand protéique Ser et un atome d'oxygène comme sixième ligand du métal. Ces enzymes présentent une faible spécificité de substrats vis-à-vis d'une multitude de *S*- ou *N*-oxydes parmi lesquels le TMAO ou le DMSO montrent les plus fortes réactivités. Mais le TMAO peut être réduit également par la nitrate réductase NapA qui possède un ligand protéique Cys et un atome de soufre inorganique, mais avec une efficacité catalytique environ 3000 fois plus faible[8]. Cette enzyme ne réduit pas le DMSO. Est-ce qu'il est possible de convertir NapA en *S*- ou *N*-oxyde réductase en substituant la Cys par une Ser ? Ce n'est pas si évident. En substituant la Cys de la nitrate réductase NapA par une Ser, aucune activité DMSO réductase n'est détectée, et une activité TMAO réductase similaire à celle de NapA native est détectée[8]. Par contre, si la Cys est substituée par un Asp, ligand de la nitrate réductase NarG, une faible activité de réduction du DMSO est détectée, mais l'enzyme est inactive pour le TMAO[8], ce qui amène plus de questions que de réponses sur la fonction des ligands.

Ces exemples illustrent que la réaction ne repose pas uniquement sur la nature des ligands protéique et inorganique du métal. Le rôle du soufre inorganique sera abordé plus en détail dans le cas des formiate déshydrogénases (FDH). La géométrie des ptérines est proposée modifier les propriétés redox du cofacteur à Mo/W[9,10] ce qui permettrait de rendre compte de la grande diversité de substrats exploités par ce type de structure chimique (Tableau 1). Mais la géométrie des ptérines étant elle-même contrôlée par les acides aminés environnants en

particulier au travers des liaisons hydrogènes qu'ils forment avec certains atomes de la ptérine[9], il est essentiel de rechercher les déterminants de la sélectivité des enzymes dans l'environnement protéique plus lointain du métal. Par exemple, une étude sur la FDH de *Rhodobacter capsulatus* a visé à reproduire par mutagénèse dirigée l'environnement protéique du site actif de Nap au-delà de la première sphère de coordination du métal[11] : les résidus His387 et Arg 587 de la FDH ont été respectivement substitués par une Met et une Thr qui sont retrouvées chez Nap (double mutant) (Figure 3). La FDH native possède une faible activité nitrate réductase mais qui est deux fois plus grande que celle du variant [11]. Ces substitutions s'accompagnent aussi d'une activité d'oxydation du formiate quasiment inexistante de l'enzyme mutée[11]. Donc, les acides aminés sélectionés dans cette étude ne permettent pas de déterminer les réactions de formiate déshydrogénases et nitrate réductases.

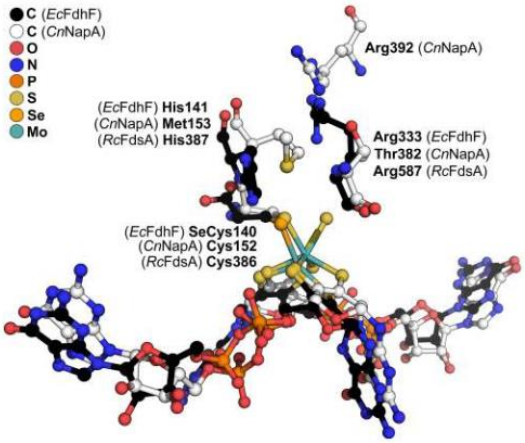


***Figure 3**. Superposition des sites actifs de la FDHF d'E. coli, de la FDH de R. capsulatus et de la nitrate réductase NapA de C. necator. Extrait de[11]*

Enfin, un autre élément capital est que l'architecture de l'enzyme doit permettre un accès au site actif adapté à la taille et aux propriétés électrostatiques du substrat, ce qui participe vraisemblablement à la sélectivité.

Mon but en terminant cette partie était de montrer que la catalyse au niveau du site actif des enzymes à Mo/W-*bis*PGD implique une architecture protéique particulière et spécifique qui va au-delà de l'environnement proche du site actif. Dans ma thèse, je m'intéresse aux formiate déshydrogénases (FDH) à Mo/W-*bis*PGD pour lesquelles l'importance des paramètres structuraux proches ou plus lointains du site actif dans la réaction reste mal comprise.

II) FDH

1) Généralités

Les FDHs à cofacteur Mo/W-bisPGD rassemblent des enzymes qui oxydent le formiate en CO_2 et des enzymes qui réduisent le CO_2 en formiate (dans ce cas, on les appelle des CO_2 réductases) selon la demi-équation : $HCOO^- \leftrightarrow CO_2 + H^+ + 2e^-$. La première sphère de coordination du métal est complétée par un ligand protéique (Cystéine ou Sélénocystéine) et par un ligand soufre inorganique. Comme indiqué précédemment, une sphère de coordination identique est retrouvée pour d'autres enzymes à Mo/W-bisPGD catalysant la réaction de réduction du nitrate en nitrite. La distinction de la sous-famille des FDHs repose sur la conservation de deux acides aminés dans le voisinage immédiat du site actif, un résidu His et

un résidu Arg (Figure 4). Comme on vient de le voir en I)3), la substitution de ces résidus montrés dans la Figure 3 entraîne une baisse de l'activité d'oxydation du formiate, ce qui est cohérent avec le rôle important de ces résidus dans la réaction.

Au-delà de ces caractéristiques communes aux FDHs et CO2R, cette sous-famille d'enzymes présente une grande diversité de séquences comme illustré dans l'analyse de similarité de séquences (Figure 1B) mais aussi dans les analyses phylogénétiques[2,12]. Ça s'illustre par le caractère modulaire de ces enzymes car la sous-unité catalytique peut comporter un ou plusieurs centres Fer-Soufre répartis dans différents sous-domaines, ces derniers définissant l'interface avec des sous-unités partenaires et des partenaires redox. Elles sont supposées être apparues tôt dans l'histoire de l'évolution de la vie, faisant partie du métabolisme des bactéries acétogènes et des archées méthanogènes qui fixent le CO_2[13], mais on les trouve aujourd'hui aussi dans des organismes aérobies, intégrées dans plusieurs voies métaboliques différentes.

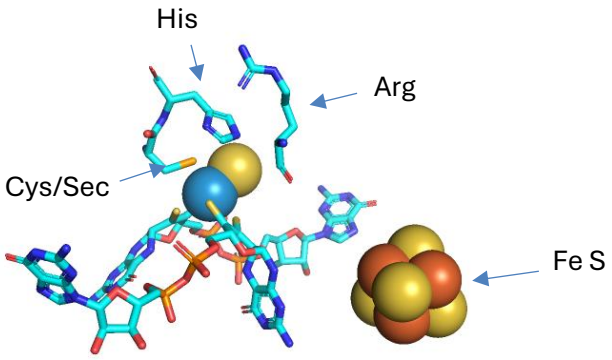


***Figure 4**. Site actif d'une FDH à cofacteur Mo/W-bisPGD (structure de la FDH de D. vulgaris, PDB : 6sdr)*

2) Insertion des FDHs dans le métabolisme

L'insertion des FDHs dans le métabolisme des cellules se fait en couplant l'oxydation du formiate ou la réduction du CO_2 à l'oxydation ou la réduction d'autres partenaires redox.

En raison du bas potentiel d'oxydoréduction du couple formiate/CO_2 (-430 mV), les FDHs peuvent participer à la respiration, en couplant l'oxydation du formiate à la réduction d'accepteurs d'électrons terminaux via le pool de quinones membranaires. Par exemple, c'est le cas de la FDH N *d'E. coli* liée à la membrane, dans laquelle les électrons issus de l'oxydation du formiate sont transférés de la sous unité catalytique au pool de quinones membranaires via deux sous unités partenaires contenant des centres FeS et des hèmes[14] (Figure 5). Les FdhAB de *D. gigas* et *D. desulfuricans* sont solubles et participent à la respiration de la bactérie en transférant les électrons issus de la réaction à des cytochromes solubles et alimentent la voie respiratoire[15,16]. Encore chez *E. coli*, la FDHF forme un complexe avec une hydrogénase (complexe FHL) et couple l'oxydation du formiate à la réduction de protons en dihydrogène, participant ainsi à la voie fermentative[17]. La FDH de *R. capsulatus* couple l'oxydation du formiate à la réduction du NAD^+ stabilisé dans une sous unité partenaire de la sous unité catalytique[18]. Le dernier rôle connu des FDHs, la fixation du CO_2, peut être abordé avec l'exemple de la formylmethanofurane déshydrogénase qui couple la réduction du CO_2 en formiate à la synthèse de formylméthanofurane, et qui s'intégre dans la voie méthanogène[19]. Le complexe HDCR (hydrogen dependent CO_2 reductase) utilise le dihydrogène pour réduire le CO_2 en formiate et l'intégrer dans le métabolisme de l'acétogénèse[20].

A travers ces exemples, on comprend que pour assurer ces fonctions, la sous unité catalytique est associée à une ou plusieurs sous unités partenaires qui permettent de coupler la réaction d'oxydation du formiate ou de réduction du CO_2 à une multitude de partenaires redox formant des complexes de tailles variées (Figure 5).

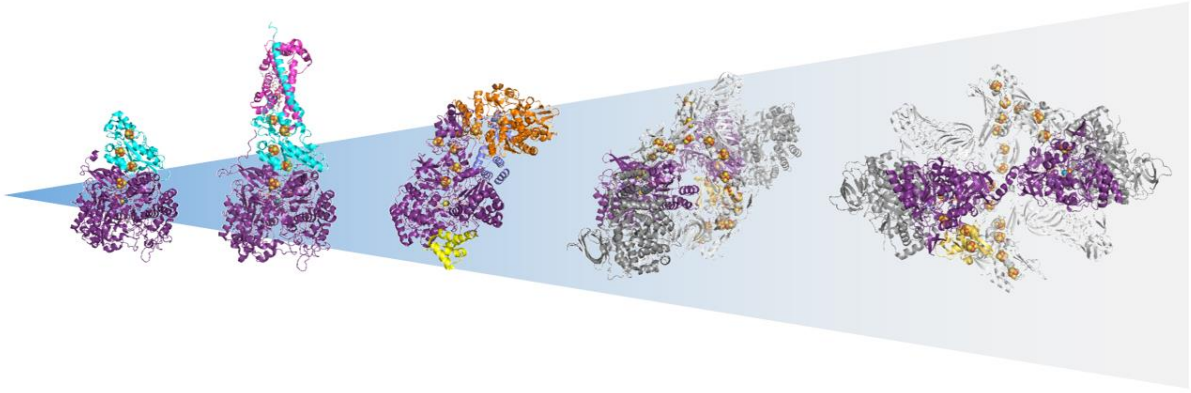


***Figure 5**. Illustration non exhaustive de la diversité des FDHs. De gauche à droite : , FdhAB de D. vulgaris (PDB : 6sdr), FDH N d'E. coli (PDB : 1kqf), FDH de R. capsulatus (PDB : 6tga), formylmethanofuran déshydrogénase de M. wolfeii (PDB : 5t5i) et HDCR de T. kivui (PDB : 7qv7). La sous unité catalytique FDH est en violet.*

Donc au niveau physiologique, les sous unités partenaires déterminent le rôle métabolique de la FDH. En particulier, elles vont définir le sens de la réaction catalysée (oxydation du formiate ou réduction du CO_2). En effet, la directionnalité physiologique ne s'explique pas par l'environnement immédiat du site actif puisqu'il est identique pour les FDHs et les CO_2 réductases. Par contre les sous unités partenaires peuvent lier des cofacteurs redox et interagir avec des partenaires redox dont les potentiels d'oxydoréduction vont favoriser la réaction dans un sens ou dans l'autre. De manière schématique, la différence de potentiel à l'équilibre entre le couple formiate/CO_2 (-430 mV à pH 7) et le couple du partenaire va influencer la réactivité de l'enzyme : un partenaire de plus bas potentiel va favoriser la réduction du CO_2 alors qu'un partenaire de plus haut potentiel va favoriser l'oxydation du formiate. Par exemple, il est proposé que le site actif de la CO_2 réductase de la formylméthanofurane déshydrogénase reçoive ses électrons depuis une ferrédoxine de potentiel -500 mV[19], donc significativement plus bas que celui du couple formiate/CO_2. Un autre élément qui influence le sens de la réaction est la concentration du substrat par rapport à celle du produit. Par exemple la FDH-H du complexe FHL fonctionne physiologiquement dans le sens de l'oxydation du formiate, mais il a été montré que le complexe peut réduire le CO_2 *in vivo* à haute pression de dihydrogène[21].

3) Sulfuration du Mo/W

Comme évoqué plus haut, la première sphère de coordination du métal inclut un atome de soufre inorganique qui est essentiel à l'activité des enzymes de la sous-famille des FDHs. L'insertion de cet atome s'effectue au cours du processus d'assemblage de l'enzyme grâce à l'activité d'une soufre transférase[22], la protéine FdhD, dont l'absence ou l'inactivation entraîne la synthèse d'une enzyme inactive[18,22]. Chez *E. coli*, la cystéine désulfurase (IscS dans la Figure 6) libère un atome de soufre inorganique à partir de la cystéine sous la forme d'un persulfure lié à un résidu cystéine catalytique. L'interaction de la protéine IscS avec FdhD permet un transfert protégé du soufre inorganique sous la forme d'un persulfure sur un résidu cystéine conservé (la Cys121 dans la Figure 6) et présent au sein d'une boucle flexible

catalytique de FdhD. Le soufre est alors directement transféré (probablement via la Cys124) au cofacteur Mo-*bis*PGD lié sur la protéine FdhD avant que ce dernier ne soit inséré dans l'apoenzyme[22]. La substitution de l'atome de soufre inorganique par un atome d'oxygène peut être en cause dans le mécanisme d'inactivation des FDHs par l'oxygène, comme je le décris plus loin dans la section portant sur la sensibilité à l'oxygène (paragraphe II)7)).

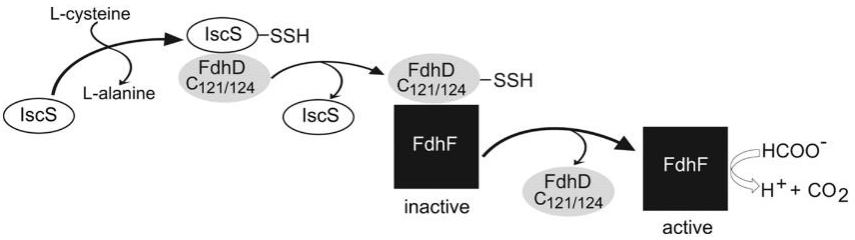


***Figure 6**. Modèle proposé pour la sulfuration du cofacteur à Mo/W. Extrait de[22]*

4) Les mécanismes catalytiques proposés pour les FDHs

En dépit d'études conduites depuis plusieurs décennies sur plusieurs enzymes de la sous-famille des FDHs, le mécanisme catalytique de l'oxydation du formiate et de la réduction du CO_2 n'est pas bien compris et son élucidation reste l'un des enjeux majeurs de l'étude des FDHs par différents groupes à travers le monde. En effet, ces enzymes sont des biocatalyseurs efficaces pour catalyser la réaction de réduction du CO_2 dans un contexte sociétal où il est primordial de contenir les émissions mais aussi de valoriser le CO_2[23]. A titre d'exemple, les systèmes FDH les plus efficaces connus à ce jour pour la réduction du CO_2 *in vitro* sont les FDH de *Desulfovibrio desulfuricans*[24] et *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough[25]. Elles présentent des efficacités catalytiques de 2968 $s^{-1}.mM^{-1}$ et 750 $s^{-1}.mM^{-1}$ respectivement. L'utilisation des FDHs en biotechnologies blanches apparaît ainsi comme une meilleure alternative à la RubisCO avec une efficacité catalytique plus faible (200 $s^{-1}.mM^{-1}$)[26].

Au fil des années, différents modèles catalytiques ont été proposés, qui cristallisent un point de débat : est-ce que le ligand protéique est décoordiné du métal pendant la réaction pour permettre la liaison directe du substrat au métal ?

a) La catalyse implique la décoordination du ligand protéique

L'origine du modèle impliquant la décoordination du ligand Cys ou Sec au cours de la catalyse repose sur la réinterprétation, en 2006, des données de diffraction des rayons X de la protéine FdhF d'*E. coli* réduite au formiate[27], qui présentaient une mauvaise correspondance entre le modèle structural et la carte de densité électronique sur la boucle comprenant le ligand Sec. Alors que dans la structure originale le ligand est lié au Mo[27], la structure réinterprétée montre le ligand à 12 Å du Mo[28] (Figure 7A et B). Sur cette base, il a été proposé que le métal est hexacoordiné dans l'état oxydé, et que l'arrivée du formiate entraîne la décoordination de la Cys/Sec selon le schéma montré sur la Figure 7C. Dans ce modèle, la fonction de l'His située à proximité est de récupérer le proton du formiate.

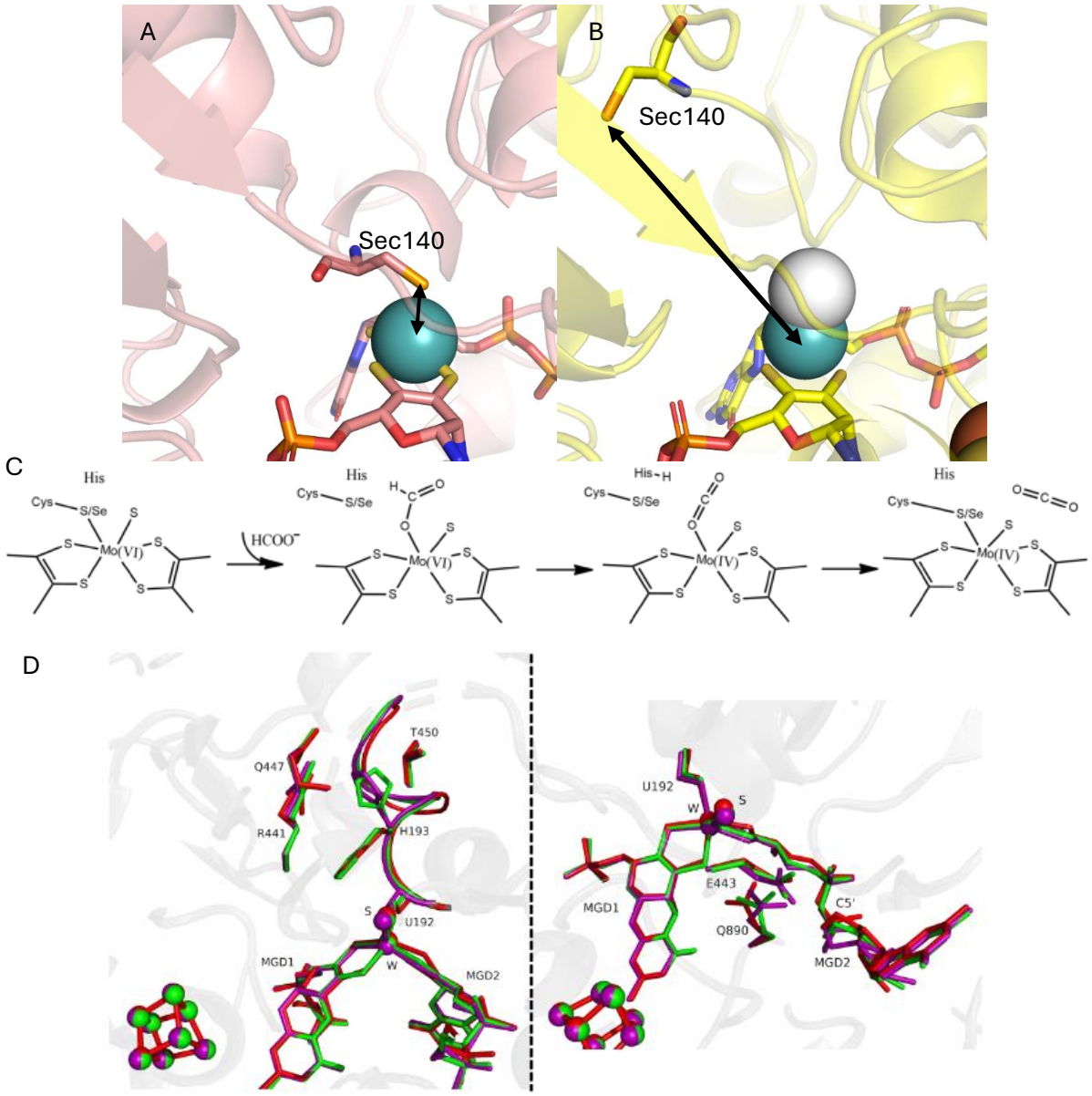


***Figure 7**. Zoom sur le site actif à Mo de la protéine FdhF d'Escherichia coli en état réduit tel qu'initialement publié (**A**, PDB : 1aa6) et réinterprété (**B**, PDB : 2iv2). **C**. Mécanisme proposé Extrait de [28]. **D**. Deux vues de la structure de la FDH de D. vulgaris dans l'état oxydé (rouge, PDB : 6sdr), dont les cristaux ont été incubés avec du formiate pendant 3 minutes (vert, PDB : 8bqi), et dans l'état totalement réduit (violet, PDB : 6sdv). Extrait de [29].*

Cependant, il s'agit d'un cas unique et aucune autre structure de FDHs obtenue par diffraction des rayons X ou par cryo-microscopie électronique a montré une décoordination du métal. Un cas intéressant est celui de la seule autre structure de FDH obtenue dans l'état oxydé ou réduite au formiate, en l'occurrence celle de *D. vulgaris*[25,29]. Dans ce cas , les structures d'enzymes dans l'état oxydé, en cours de réduction au formiate ou totalement réduites montrent une série de changements conformationnels de plusieurs acides aminés au voisinage du cofacteur à W et notamment de l'His193 conservée (Figure 7D, gauche), mais jamais de décoordination du ligand Sec192 (Figure 7D, droite)[29]. Pour les auteurs, les changements conformationnels de l'His suggèrent qu'elle aurait un rôle dans l'accès du substrat au site actif (voir partie sur les canaux d'accès).

La divergence des résultats structuraux peut s'expliquer par la possibilité que la décoordination du ligand soit un artefact des conditions de la cristallisation ou de l'irradiation, décrivant ainsi

un état qui n'est pas catalytiquement actif. Des structures d'enzymes représentant un état inactif ont déjà été obtenues, et c'est le cas par exemple de la DMSO réductase de *R. sphaeroides* dont la structure présente un PGD décoordiné du métal[30]. Les auteurs de cette étude avancent que les molécules de 2-methyl-2,4-pentanediol (MPD) ou de glycérol ou de HEPES en solution peuvent être la cause de la décoordination des PGD. D'un autre côté, il est difficile de connaître l'état redox d'un site actif cristallisé, et l'état réduit du complexe FdhAB de *D. vulgaris* (donc la coordination du métal) pourrait être remis en cause. Mais les spectres RPE des cristaux de l'enzyme FdhAB réduite au formiate montrent un signal attribué à un centre FeS réduit et l'absence de signature de W(V), ce qui suggère que le site actif est dans l'état W(IV) totalement réduit[25].

En dépit des réserves émises sur l'unique donnée structurale décrivant la décoordination du métal, d'autres approches expérimentales ont apporté des informations complémentaires, en particulier sur la coordination du Mo/W, telle que la spectroscopie d'absorption des rayons X (EXAFS). Cette technique sonde l'environnement local d'un atome particulier et permet de déterminer la nature, le nombre des liaisons et les distances des atomes liés à l'atome sondé. Une étude portant sur le site actif à Mo de la FDH de *R. capsulatus*[31] a été menée dans les trois états d'oxydation du Mo et ce, en absence d'oxygène. La Figure 8 montre les spectres EXAFS de la FDH réduite au formiate à pH 9 (pH optimal de catalyse) ou pH 7 (pH auquel l'enzyme présente seulement 6% d'activité) et réduite au dithionite à pH 9 (conditions conduisant à la formation d'environ 60% d'espèce Mo(V), la référence n'est pas explicitement mentionnée). L'interprétation des spectres en termes de coordination du Mo se fait en ajustant un spectre simulé sur le spectre expérimental. Les spectres EXAFS des deux dernières enzymes sont très similaires à celui du Mo(VI) (non représenté ici) et indiquent que la coordination du Mo par six soufre n'a pas été modifiée. En revanche l'ajout de formiate à pH 9 entraîne des modifications du spectre expérimental qui sont interprétées par l'ajout d'une liaison covalente entre le Mo(IV) et l'un des atomes d'oxygène du formiate au détriment de la liaison Mo-S(Cys). Cette étude suggère donc qu'un des atomes d'oxygène du formiate établirait une liaison directe avec le Mo après que la Cys se soit décoordinée[31]. La coordination du Mo(VI) par six atomes de soufre serait maintenue dans l'état Mo(V).

Mais les données d'EXAFS ne sont pas faciles à interpréter. En effet, les données sur la coordination du Mo indique, même pour l'enzyme dans l'état oxydé, des liaisons du Mo avec de l'oxygène et moins de 1 Mo=S par enzyme, alors qu'on s'attend à avoir un Mo coordinné par six S avec 1 Mo=S par enzyme. De manière plus précise, sur la Figure 8, le spectre WT(formate) pH 7 est simulé avec 0,8 Mo=O,-O et 0,2 Mo=S par enzyme alors que le spectre WT(red) pH 9 est simulé avec 0,9 Mo=O,-O et 0,5 Mo=S (en supposant dans chaque cas que le métal est coordinné également par 4 atomes de soufre des PGD)[31]. Les auteurs proposent que seule une fraction des enzymes soit active avec une coordination du Mo par six S et donc que le spectre expérimental représente un mélange de différentes espèces. De plus, une autre étude d'EXAFS sur la même FDH inhibée avec de l'azoture et du cyanate a conclu que les deux inhibiteurs se lient directement au Mo[32] alors qu'une étude par spectroscopie infrarouge toujours sur cette FDH a conclu que les deux inhibiteurs se lient en seconde sphère de coordination[33]. Pour terminer, une étude d'EXAFS a aussi été menée sur la FDHF d'*E. coli* mais dans ce cas, les auteurs interprètent le sixième ligand du métal comme un Mo=O et pas un Mo=S quel que soit l'état d'oxydoréduction du métal[34]. Cet exemple montre la difficulté de conclure sur la nature de la première sphère de coordination en spectroscopie d'absorption des rayons X en raison du nombre important d'atomes dans la première sphère de coordination du métal qui conduit à un recouvrement de signaux expérimentaux et en raison de l'hétérogénéité de l'échantillon.

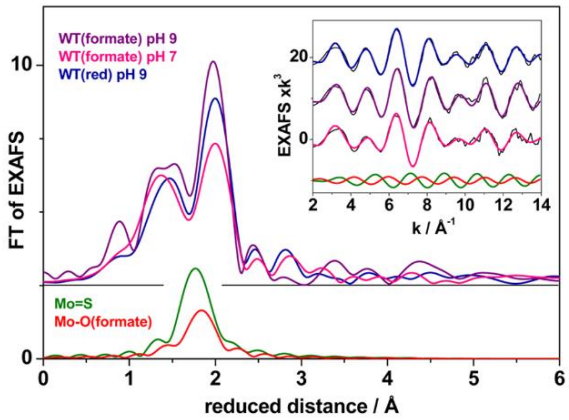


***Figure 8**. Transformée de Fourrier des spectres EXAFS (en encart) de l'enzyme WT incubée avec du formiate à pH 9 (violet) et à pH 7 (rose) et de l'enzyme WT pH9 réduite au dithionite (bleu). Extrait de[31].*

Un autre élément qui conforte l'hypothèse d'un déplacement de la Cys/Sec est l'inhibition de certaines enzymes par l'iodoacétamide, agent alkylant réagissant avec les thiols libres. Selon le modèle proposé, si la Cys/Sec se détache du métal au cours de la catalyse, le Se ou le S du résidu devrait être alkylé de manière irréversible par l'iodoacétamide, le site actif devenant alors incapable de remplir sa fonction de catalyseur. La protéine FdhF de *E. coli* est inhibée par l'iodoacétamide[35] uniquement lorsque le traitement est réalisé en présence de formiate, ce qui est cohérent avec l'hypothèse de la décoordination. Pour la FDH de *R. capsulatus*, l'inhibition par l'iodoacétamide ne se produit que si l'enzyme est incubée en présence de formiate et de nitrate, ce dernier jouant ici le rôle d'un inhibiteur compétitif. L'alkylation de la Cys a été confirmée par spectrométrie de masse dans le cas de *R. capsulatus*[11]. Sans nitrate, il n'y a pas d'inactivation et pas d'alkylation du ligand. Les auteurs interprètent cette situation comme due à la capacité du nitrate à déplacer le ligand protéique au cours de la catalyse avec le formiate. Mais, cette proposition va à l'encontre de l'étude EXAFS de ces mêmes auteurs indiquant que le formiate suffit à déplacer le ligand. Pour finir, la FdhAB de *D. vulgaris* est inhibée par l'iodoacétamide mais les cibles sont les ligands cystéine des clusters FeS (qui n'ont pas vocation à se décoordiner au cours du transfert d'électrons) et pas la Sec ligand du W[25]. Donc à ce stade, il est difficile de conclure sur la liaison du substrat en première sphère de coordination sur la base de ces données d'inhibition. En effet, il est attendu que le mécanisme catalytique soit commun pour l'ensemble des FDHs et qu'elles partagent un même comportement, ce qui n'est pas observé.

Plus tard, la spectrométrie de masse et la RMN ont été utilisées sur la FDH de *R. capsulatus* pour étudier la possibilité que le mécanisme de réaction soit un OAT[36] et non un HAT. Le principe de l'expérience consiste à observer un échange isotopique sur l'atome d'oxygène du produit de la réaction. La libération de $^{13}C^{16}O^{18}O$ résultant de la réaction enzymatique quand l'enzyme est incubée avec du $H^{13}C^{16}O_2^-$ dans un solvant enrichi (10-50%) en $H_2{}^{18}O$ (Figure 9A) a été observée par spectrométrie de masse. Ce résultat est interprété comme un transfert d'atome d'oxygène de $H_2{}^{18}O$ vers le formiate $H^{13}C^{16}O_2^-$. Il faut savoir qu'une publication antérieure[37], en 1998, présentait la même expérience sur la FDHF d'*E. coli* et concluait que la présence de ^{18}O dans le CO_2 n'était liée qu'à la réaction de transformation du CO_2 en bicarbonate HCO_3^-. Les auteurs de [36] rappellent que l'étude sur la FDHF, contrairement à la leur, a été faite en présence d'azoture (un inhibiteur du formiate dans les FDHs) et que ça pouvait expliquer les différences de résultats. Ensuite, le ratio HCO_3^-/CO_2 en fonction du temps a été mesuré par RMN. La prépondérance de HCO_3^- sur le CO_2 (Figure 9B) lors des premiers

points de mesure est interprétée comme le fait que du bicarbonate est produit avant le CO_2. Les auteurs proposent un mécanisme de réaction OAT dans lequel le bicarbonate est le premier produit de la réaction et le CO_2 un produit ultérieur issu de la déshydratation du bicarbonate. Sur la base de structures cristallographiques dans lesquelles une molécule d'eau est résolue à proximité de l'Arg conservée, cette dernière réaction aurait lieu à proximité de ce résidu conservée. Les auteurs ne précisent pas si l'Arg a un rôle actif dans la réaction de déshydratation. Aussi, ils suggèrent que la présence du formiate à proximité du Mo induit un changement conformationnel qui permet à une molécule d'eau de déplacer la Cys, et de réagir au Mo pour former un ligand hydroxo. Le schéma réactionnel proposé est montré en Figure 9C.

A ma connaissance il n'y a pas d'article qui discute de manière critique ces expériences. Pour ma part il y a quelques interrogations que je peux formuler. Pour l'expérience de spectrométrie de masse, afin de prendre en compte la formation de $^{13}C^{16}O^{18}O$ non spécifique à la catalyse (Figure 9A, uncatalyzed reaction), les auteurs mesurent le ratio $^{13}C^{16}O^{18}O/CO_2$ après avoir ajouté du bicarbonate dans la solution. Le fait que le ratio $^{13}C^{16}O^{18}O/CO_2$ soit plus important pour la réaction enzymatique (ronds rouges) que pour la réaction non catalysée (carrés noirs) est interprété dans l'article comme la production par l'enzyme de $^{13}C^{16}O^{18}O$ (après déshydratation du bicarbonate). Seulement, à pH 9 on peut penser que la transformation du CO_2 en bicarbonate est plus rapide que la transformation inverse, ce qui expliquerait la différence entre les ronds rouges et les carrés noirs dans la Figure 9A. Pour l'expérience de RMN qui a produit les données de la Figure 9B, la durée d'acquisition d'un scan est de 25 minutes. Mêmes si les auteurs précisent qu'ils ont essayé d'être le plus rapide possible et de ralentir la catalyse (réaction à 5°C et ajout d'azoture) pour mesurer les premiers turnovers, comment être sûr qu'après 25 ou 50 minutes de réaction, on mesure les premiers turnovers, et que le bicarbonate détecté est le premier produit de la réaction alors que le pH basique favorise la formation de bicarbonate sur celle du CO_2 ?

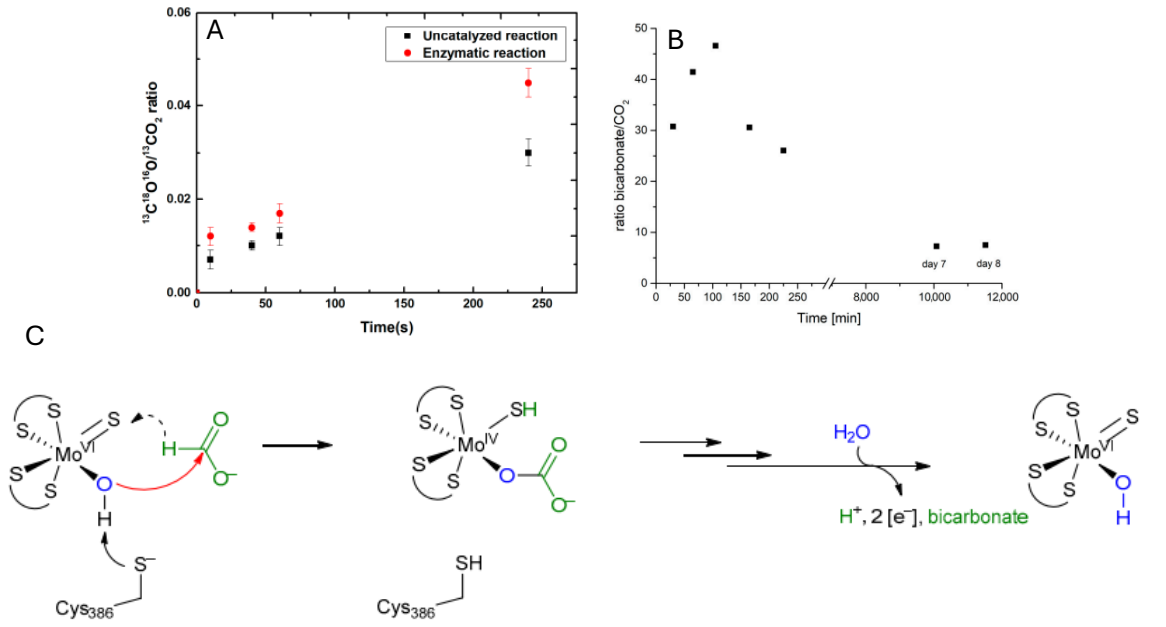


***Figure 9**. **A**. Ratio de $^{13}C^{16}O^{18}O/^{13}CO2$ au cours du temps de la réaction. **B**. Ratio de bicarbonate/CO2 au cours de la réaction. **C**. Schéma réactionnel proposé. Extraits de[38]*

Le mécanisme de réaction a aussi été abordé par des techniques de modélisation. Des modèles de calculs se basant sur la structure de la FDHF de *E. coli* ont été étudiés par DFT. Cette approche a permis d'obtenir des états de transition caractérisés par la décoordination de la Cys/Sec, ce qui laisse penser que c'est possible pendant la catalyse. Dans un cas, le formiate entraîne la décoordination de la Cys qui se recoordine au soufre inorganique[39] (Figure 10A) et dans l'autre, le formiate déplace le ligand protéique qui reste libre pendant la réaction[40] (Figure 10B).

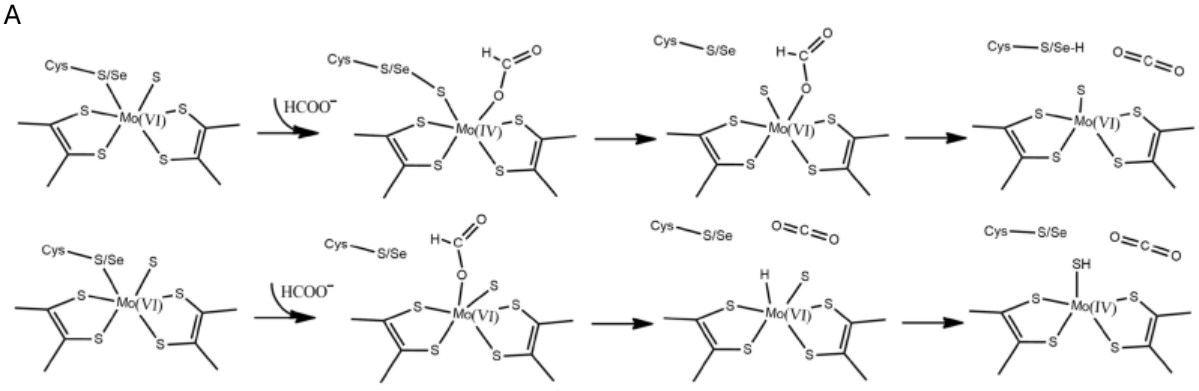


***Figure 10**. Schéma réactionnels proposés sur la base de calculs de DFT dans lequel le formiate se lie directement au métal. Extraits de [41]*

b) Le mécanisme du transfert d'hydrure

L'autre modèle implique un transfert direct d'un proton et de deux électrons du substrat au souffre inorganique du site actif sans déplacement du ligand protéique (Figure 11). Ce modèle repose sur le constat que le formiate est un bon donneur d'hydrure et que le cofacteur à Mo/W est un bon accepteur d'hydrure. En effet, l'oxydation du formiate par les FDHs non métalliques s'effectue par un transfert d'hydrure au cofacteur NAD^{+}[42,43]. Par ailleurs, le transfert d'hydrure est également observé dans deux familles d'enzymes à Mo, xanthine oxidase et aldehyde oxidase[44]. Il est suggéré que l'Arg conservée serve à guider et orienter le formiate à proximité du ligand soufre inorganique[45].

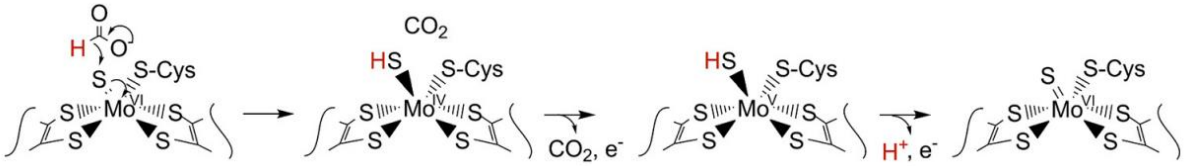


***Figure 11**. Mécanisme proposé pour le transfert d'hydrure. Extrait de[46]*

Des expériences de spectroscopie de résonance paramagnétique électronique (RPE) menées sur trois FDHs différentes soutiennent l'hypothèse d'un transfert d'hydrure[37,46,47]. Dans ces expériences, les enzymes sont incubées avec du $^{2}HCOO^{-}$. Un couplage hyperfin fort résolu sur la signature du Mo(V) et attribué à un proton disparaît après 5 secondes d'incubation avec du $^{2}HCOO^{-}$ (Figure 12b) puis réapparaît après 15 minutes d'incubation. Ce résultat suggère que le proton responsable du couplage hyperfin a été échangé avec le deutérium du formiate dans les 5 secondes après l'ajout de formiate, puis que le deutérium a été échangé par un

proton du solvant dans les 15 minutes après l'ajout de formiate. La Figure 12a montre que l'expérience inverse est aussi possible. Les valeurs principales du tenseur hyperfin Mo(V) protons déterminées par simulations numériques des spectres Mo(V) sont : 7.5, 18.9, 21 MHz pour la FDHF d'*E. coli*[37], 23.1, 30, 27.9 MHz pour celle de *D. desulfuricans*[47] et 18, 21, 18 MHz pour la FDH de *C. necator*[46]. L'intensité du couplage peut correspondre à un proton lié au S inorganique du site actif selon [46]. Cette interprétation est soutenue par des études sur des systèmes de synthèse analogues de site actif à Mo[48]. Ainsi, le mécanisme du transfert d'hydrure implique une stabilité de la première sphère de coordination du métal au cours de la réaction puisque le formiate transfère un hydrure directement au S inorganique sans entraîner de décoordination du ligand protéique.

Concernant la coordination du métal, il a pu être observé par RPE, sur la protéine FdhF de *E. coli,* après enrichissement de la protéine en ^{77}Se, un couplage hyperfin fort ($A_{1,2,3}$= 13.2, 75, 240 MHz) entre le Mo(V) et le ^{77}Se de la Sec ligand[37]. L'intensité du couplage suggère que le Se est directement lié au Mo(V).

Ce qui peut être opposé à ce modèle est que ces observations sont faites sur un état Mo(V), seule espèce paramagnétique accessible à la technique de RPE, qui ne prédit en rien la situation pour les autres états d'oxydation alors que le Mo(V) est supposé être coordinné par six soufre (ou cinq S et un Se) selon les expériences d'EXAFS dont j'ai parlé plus tôt. Donc, pour les expériences avec le formiate, la RPE ne permet de détecter qu'un intermédiaire du cofacteur à Mo(V) après que le formiate ait réagi : s'il y a eu décoordination de la Cys/Sec pendant la réaction dans un autre état que le Mo/W(V), on ne peut pas le voir. A titre de rappel, l'une des études structurales qui a permis d'évaluer la coordination du métal dans différents états redox montre l'absence de décoordination dans les états W(IV) et W(VI) [25,29]. Par ailleurs, le couplage hyperfin fort n'est pas systématiquement observé avec les FDHs analysées. C'est par exemple le cas de la FDH à Mo de *Pseudomonas aeruginosa*[49] et celle à W de *D. vulgaris*[50].

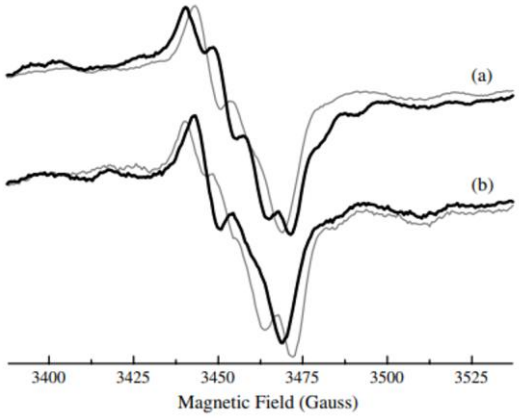


***Figure 12**. Signatures RPE Mo(V) de la FDH de D. desulfuricans inhibée avec de l'azoture. (a) FDH dans du tampon deutéré incubée avec $HCOO^-$. (b) FDH dans tampon aqueux incubée avec $^2HCOO^-$. Spectres noir : incubation avec du formiate pendant 5 s. Spectres gris : incubation avec du formiate pendant 15 min. Extrait de[47].*

Par ailleurs, l'étude de la variation des potentiels catalytiques (qui dépendent notamment du potentiel à l'équilibre et de la concentration en substrat) en fonction de la concentration en formiate et des potentiels à l'équilibre en fonction du pH peut apporter des éléments de

réponse sur le mécanisme catalytique. Donc des expériences d'électrochimie[51] ont été faites sur une FDH à Mo, ForCE1 de *B. subtilis* et une FDH à W FdhAB de *D. vulgaris*. Les auteurs suggèrent que la faible dépendance du potentiel de transition Mo/W(V) Mo/W(VI) vis à vis de la concentration en formiate soutient un mécanisme dans lequel le formiate ne se lie pas directement au métal (Figure 13A). De plus, la dépendance en pH des potentiels du Mo et W indique une réaction de transfert d'électron couplée à un transfert de proton, soutenant les expériences de RPE mentionnées plus tôt qui indiquent que le Mo(V) est couplé à un proton échangeable. Par exemple, pour ForCE1, le potentiel de la transition Mo(IV)/Mo(V) varie d'environ -60 mV par unité de pH ce qui indique l'existence d'un événement de protonation au cours du changement d'état redox (Figure 13B). Les potentiels représentés dans la Figure 13 ont été calculés par simulation des voltamogrammes expérimentaux. Ces expériences n'apportent pas la preuve expérimentale de la coordination du substrat en seconde sphère de coordination, mais ne sont pas en faveur d'une coordination directe du formiate au métal.

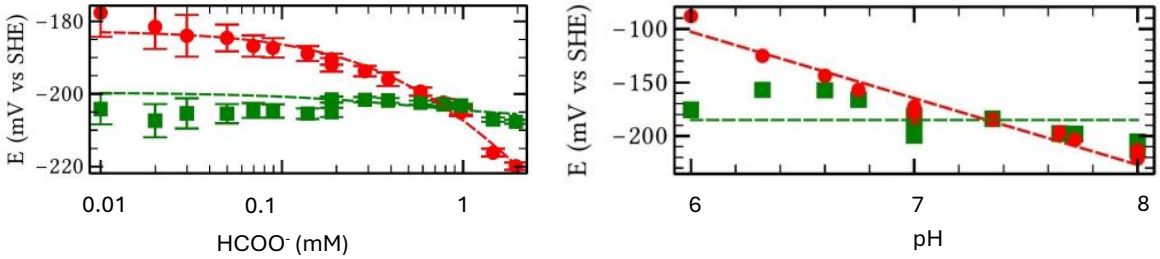


***Figure 13**. **A**. Potentiel catalytique de ForCE1 en fonction de la concentration en formiate. **B**. Potentiel à l'équilibre de ForCE1 en fonction du pH. Potentiels de la transition Mo(IV)/Mo(V) (ronds rouges) et Mo(V)/Mo(VI) (carrés verts). Extrait de[51]*

Pour finir, une des études les plus récentes en DFT a comparé les mécanismes de réaction proposés en Figure 7C, 10A et B et 11 d'un point de vue énergétique[41,52]. La DFT est une technique de modélisation qui utilise les lois de la mécanique quantique pour simuler des réactions chimiques, comme celles qui se produisent aux sites actifs à Mo/W. En incluant dans ce calcul un grand nombre d'atomes afin de simuler un environnement protéique plus réaliste, les auteurs concluent que le mécanisme le plus favorable est celui du transfert d'hydrure décrit plus haut.

En conclusion, aujourd'hui, il est impossible de trancher sur le mécanisme de réaction au site actif des FDHs. Pour cela, il faudrait multiplier les études centrées sur la détermination de la coordination du site catalytique réduit au formiate. Parmi les approches expérimentales à privilégier, la combinaison de la cristallographie aux rayons X ou de la cryo-microscopie électronique avec des techniques de spectroscopies qui peuvent sonder l'environnement du métal dans l'état réduit au formiate me semble une bonne solution.

5) La réduction du CO_2

Toutes les FDHs caractérisées *in vitro* sont bidirectionnelles[53] : sur une électrode ou purifiées en solution, elles peuvent catalyser l'oxydation du formiate et la réduction du CO_2[54] même si les vitesses de catalyse dans un sens ou dans l'autre sont inégales. Le Tableau 2 extrait de [54] rassemble les vitesses de catalyse de certaines FDHs.

***Tableau 2**. Les vitesses de catalyse (en molécule de substrat catalysée par seconde et par enzyme) pour l'oxydation du formiate (FO) et la réduction du CO_2 (CR). Tiré de[54].*

Enzyme	Organisme	Sous unités et poids moléculaire (kDa)	Accepteur/donneur d'électrons	v (s^{-1}) FO	v (s^{-1}) CR	pH FO	pH CR
*Aw*FDH (Mo, Sec)	*A. woodii*	αβγ, 169	BV^{2+}/MV^{+}	213	46	7	7
*Sf*FDH (W, Sec)	*S. fumaroxidans*	αβγ, 161	BV^{2+}/MV^{+}	1878	2415	8	7.3
*Dv*FDH (W, Sec)	*D. vulgaris*	αβ, 138	BV^{2+}/MV^{+}	1310	315	7.6	7.1
*Dd*FDH (Mo, Sec)	*D. desulfuricans*	αβγ, 135	BV^{2+}/MV^{+}	543	47	8	7
*Rc*FDH (Mo, Cys)	*R. capsulatus*	αβγ, 172	NAD^{+}/NADH	37	1.4	9	6.8
*Cn*FDH (Mo, Cys)	*C. necator*	αβγ, 178	NAD^{+}/NADH	201	11	8	6.5
*Ec*FDHF (Mo, Sec)	*E. coli*	α, 80	BV^{2+}/MV^{+} BV^{2+}/MV^{+}	160 200	<1 44	7.5 7.5	7.5 5.8
*Ec*FDHF-U140C (Mo, Sec)	*E. coli*	α, 80	BV^{2+}/MV^{+}	97	8.4	8	5.8

Pour les FDHs du Tableau 2, on observe que les FDHs à W/Sec ont des vitesses de catalyse plus élevées que pour les autres. Le Tableau 2 montre que la substitution du ligand Sec, présent dans la FDHF d'*E. coli* native par une Cys réduit l'activité d'oxydation du formiate et celle de réduction du CO_2. De manière générale pour les systèmes qui ont été étudiées, celles qui oxydent physiologiquement le formiate sont moins efficaces pour la réduction du CO_2. Par contre l'oxydation du formiate est moins efficace que la réduction du CO_2 pour la CO_2 réductase qu'est la formylmethanofurane déhydrogénase[55]. Les raisons de ces biais catalytiques restent incomprises mais ces biais soulignent que des différences structurales sont bien portées par ces enzymes. Une analyse bioinformatique des séquences et structures de plusieurs FDHs ou CO_2 réductase (CO2R) pourrait permettre d'extraire dans les séquences des sites de co-évolution d'acides aminés distincts selon que l'enzyme catalyse préférentiellement l'oxydation du formiate ou la réduction du CO_2. Le faible nombre de systèmes expérimentalement caractérisés pour dresser une liste précise des FDHs et des CO2R reste cependant insuffisant pour la conduite de ces analyses. Concernant la formylmethanofurane déshydrogénase, les auteurs proposent que la faible affinité de l'enzyme pour le formiate favorise la catalyse de la réaction de réduction du CO_2 et non de l'oxydation du formiate[55]. Ceci peut s'expliquer par la présence de canaux d'accès au site actif dont la largeur et l'hydrophobicité favorisent le transport du CO_2.

6) Les canaux d'accès au site actif

Un point commun à toutes les enzymes de la famille Mo/W-*bis*PGD est l'existence d'un site actif profondément enfoui dans la sous-unité catalytique. De toute évidence, la réaction avec le ou les substrats requiert l'existence d'un tunnel d'accès aboutissant au métal et ce, quel que soit le mécanisme catalytique qui opère. Mais aujourd'hui il y a peu d'études qui détaillent les trajets des tunnels qui permettent l'accès des substrats et la sortie des produits dans les enzymes à Mo/W-*bis*PGD. Par exemple, la structure de NarGHI d'*E. coli* (PDB 1Q16) présente

une cavité attribuée au transport du nitrate, mais le calcul des tunnels en utilisant l'outil CAVER montre que cette cavité est obstruée par certains acides aminés conservés éloignés du site actif. Le chemin d'accès du substrat a pu être mis en évidence par des simulations de dynamique moléculaire qui ont montré que le mouvement de ces acides aminés permettait de contrôler l'accès au site actif[56].

Pour la formylméthanofurane déshydrogénase dont je parlais plus tôt, la catalyse est rendue possible par la présence de deux tunnels révélés par la structure cristallographique. Cette enzyme possède en effet un tunnel d'accès pour le CO_2 (représenté en bleu sur la Figure 14) jusqu'au site actif à W. Ensuite, le formiate produit traverse un deuxième tunnel intramoléculaire (Figure 14, en rouge)) pour rejoindre un autre site actif Zn-Zn distant de 43Å du premier et où a lieu la condensation avec le méthanofurane[19]. Plusieurs autres études structurales de FDHs ont cherché à identifier des tunnels de transit du formiate et du CO_2 distincts sur la base de la capacité de ces enzymes à catalyser *in vitro* la réaction dans un sens ou dans l'autre[19].

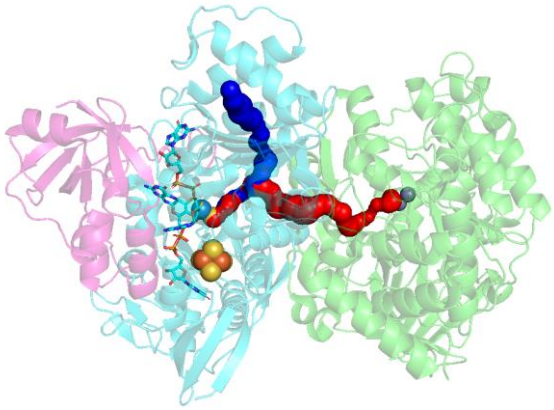


***Figure 14**. Structure tridimensionelle de la formylméthanofurane déshydrogénase (PDB : 5t5i). Les trois sous unités sont indiquées par des couleurs différentes. Le tunnel représenté en bleu conduit le CO2 depuis la surface jusqu'au site actif à W. Le tunnel en rouge conduit le formiate depuis le site actif à W jusqu'au deuxième site actif de l'enzyme.*

Alors que plusieurs structures tridimensionnelles de FDHs ont été déterminées à la résolution atomique, l'analyse précise des tunnels (composition en acides aminés, largeur, accès au site actif) n'a été conduite que sur quatre d'entre elles, à savoir les formylméthanofuranes de *M. wolfei* et *C. ethanoperedens*, la FdhAB de *D. vulgaris* et la Fds de *R. capsulatus*. De plus, aucune analyse comparative de la structure et de la conservation des tunnels n'a été faite.

Dans les FDHs de *D. vulgaris* (DvFdhAB) et *R. capsulatus* (RcFds) pour lesquelles les tunnels ont été explicitement calculés avec l'outil CAVER[25,57], on retrouve dans chaque structure un même tunnel attribué au transport du formiate (Figure 15A) car il est constitué pour partie d'acides aminés polaires. Mais l'analyse de similarité de séquences (Figure 1B) distingue les FDHs en différents clusters, ce qui indique des différences de séquences importantes qui peuvent influencer la structure des tunnels. Est-il envisageable que toutes les FDHs conservent ce même tunnel ?

De plus, dans les structures de DvFdhAB et RcFds, un autre tunnel constitué de plusieurs acides aminés hydrophobes a été calculé et attribué au transport (évacuation) du CO_2 [25,57]. Seulement, ce tunnel est différent dans les deux structures (Figure 15B). Est-ce que toutes les FDHs ont un tunnel pour le transport du CO_2 ? Si oui, est-ce que le tunnel est conservé dans toutes les FDHs ?

Dans le cas de la FdhAB de *D. vulgaris* un changement conformationnel de plusieurs acides aminés au voisinage du site actif est observé entre l'état oxydé et l'état réduit (que ce soit au dithionite ou au formiate) alors que la Sec reste coordinnée au métal quel que soit son état redox. Parmi ces changements, celui de l'His conservée est le plus frappant. En effet, les auteurs proposent que ce mouvement de l'His permette de contrôler l'ouverture et la fermeture des canaux formiate et CO_2 (Figure 15C) : dans l'état oxydé, le canal formiate est ouvert et le canal CO_2 est bloqué par l'His, puis, pendant la catalyse, l'His ferme le tunnel formiate et le CO_2 produit peut sortir par le tunnel CO_2. Le mécanisme inverse est imaginable pour la réduction du CO_2. Mais on peut déjà noter que le tunnel formiate de la FdhAB se rétrécit drastiquement au niveau de l'His. Ce point sera abordé plus en détail tard dans la partie I) des résultats.

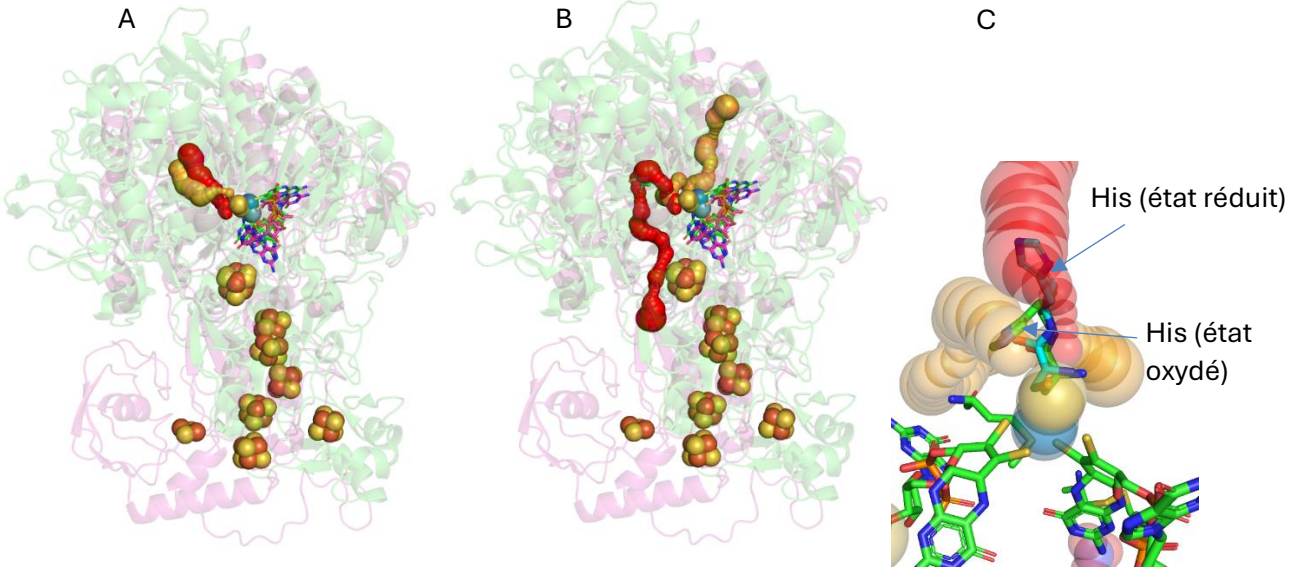


***Figure 15**. **A** et **B**. Superposition des structures de RcFdsA en rose (PDB : 6tg9) et de DvFdhAB en vert dans l'état oxydé (PDB : 6sdr, A) et réduit (PDB : 6sdv, B). Tunnels formiate (A) et CO_2 (B) de RcFdsA (rouge) et DvFdhAB (orange). **C**. Superposition des structures de DvFdhAB oxydée (vert) et réduite (bleu). Dans le panneau C, le tunnel formiate est en rouge et le tunnel CO_2 est en orange.*

A ce stade, la question de l'existence de deux tunnels distincts dans les FDHs reste ouverte. Dans le cas de la formylméthanofurane déshydrogénase, l'existence de deux tunnels pour le formiate et le CO_2 est justifiée par la fonction du complexe. L'existence de tunnels distincts peut-elle améliorer le turnover ? Est-ce que la présence ou l'absence d'un tunnel peut contribuer à la directionnalité de ces enzymes ? Autant de questions qu'il reste à adresser.

7) De la sensibilité des FDHs à l'oxygène

A une exception près, toutes les FDHs caractérisées expérimentalement sont sensibles à l'oxygène : elles perdent leur activité d'oxydation du formiate ou de réduction du CO_2 lorsquelles sont exposées à l'oxygène. Ceci constitue d'ailleurs un frein majeur à leur utilisation dans des applications biotechnologiques.

Les études conduites sur un nombre restreint de systèmes mettent cependant en évidence une diversité dans la nature des répercussions structurales associées à la perte d'activité.

Trois situations ont été décrites. La première est proposée par une étude de spectroscopie d'absorption des rayons X sur la FDH de *R. capsulatus*. L'augmentation du nombre de liaisons Mo=O au détriment des Mo=S quand l'enzyme est exposée à l'air indique, selon cette étude, la substitution du S inorganique du site actif par un O pour former un groupe Mo=O[32]. Cette hypothèse est également soutenue par la détection de sulfite (issu de l'oxydation directe par l'oxygène du soufre libéré) au cours du turnover de la FDH de *C. necator* exposée à l'air[58]. L'autre mécanisme d'inactivation à l'oxygène, proposé pour la FDH de *D. vulgaris*, a été mis en évidence par cristallographie aux rayons X[59] : en présence de formiate ou de CO_2, la Sec192 ligand du W est déplacée et sa ligation au métal est remplacée par du dioxygène (ou du peroxyde d'hydrogène) même quand le site actif est oxydé en présence de CO_2 (Figure 16), ce qui peut alimenter d'ailleurs la controverse sur le mécanisme réactionnel de la section II)1) puisque le ligand Sec se décoordinne. Les structures obtenues dans cette étude semblent toujours présenter un ligand soufre inorganique, mais les auteurs précisent que l'augmentation du facteur d'agitation thermique B de ce soufre pourrait signifier une substitution par un oxygène[59].

Il n'y a pas de protocole standardisé pour évaluer la sensibilité des FDHs à l'oxygène, et on ne connait pas précisément les paramètres (concentration ou pH par exemple) qui vont l'influencer. Ca rend l'analyse et la comparaison des FDHs difficile. Dans la littérature, il est important de souligner la variation de la sensibilité à l'oxygène des FDHs, allant de quelques dizaines de minutes à plusieurs dizaines d'heures voire plus avant que l'enzyme ne soit plus active. Je donne quelques exemples. La FDHF d'*E. coli* perd la totalité de son activité après 20 minutes d'incubation à température ambiante dans un mélange de tampon à pH 5.5 constitué de 95% de tampon sans oxygène et 5% de tampon préparé en aérobiose[60]. Le complexe FdnGHI d'*E. coli* préparé à une concentration de 0.9 µM perd 40% de son activité en 1 heure d'incubation en aérobiose à 20°C à pH 7 et 90% de son activité (concentration non spécifiée) après 24 heures en aérobiose à 0°C à pH 8[61] alors qu'elle ne perd pas d'activité jusqu'à plus de 9 mois après sa purification si elle est conservée en dessous de 4°C en anaérobiose[61]. La FDH de *C. necator* (1µM) perd 80% de son activité incubée à l'air pendant 24 heures à 4°C à pH 7.2[58]. La FdhAB de *D. vulgaris* (1µM) ne perd pas d'activité incubée en aérobiose pendant 10 heures à température ambiante à pH 7.6 et elle ne perd pas non plus d'activité pendant 30 jours à 4°C à pH 7.6[25]. Par contre, si elle est incubée à température ambiante en aérobiose avec du formiate, l'enzyme perd toute son activité en 4 heures[25]. Enfin, *D. vulgaris* possède une deuxième FDH qui est proposée être insensible à l'oxygène, même incubée avec du formiate[62].

Pour expliquer cette variabilité au niveau structural, nous ne disposons aujourd'hui que de deux exemples. On sait que le complexe FdhAB de *D. vulgaris* possède deux Cys situées à environ 20 Å du W qui forment un pont disulfure proche de la surface de la protéine. Il a été montré que l'absence de ce pont rend l'enzyme plus active pour la catalyse mais également plus sensible à l'oxygène[63]. En fait, la rupture du pont disulfure est accompagnée d'une série de réarrangements conformationnels qui aboutissent à plusieurs modifications de la géométrie du site actif, et notamment de l'His conservée qui conduit à élargir le canal formiate au niveau de son rétrécissement montré sur la Figure 15C. L'hypothèse avancée par les auteurs est que quand le pont disulfure est en place, le tunnel formiate se rétrécit et freine l'arrivée des molécules de dioxygène au site actif mais aussi celle du formiate. Quand le pont disulfure est absent, le tunnel formiate s'élargit et laisse passer le formiate mais aussi l'oxygène. Ces résidus Cys ne sont pas conservés dans toutes les FDHs. Par exemple, l'autre FDH à W de *D.vulgaris*, le complexe FDH2 ne possède pas ces résidus mais est pourtant insensible à l'oxygène[62]. Les auteurs ont montré que cette enzyme couple l'oxydation du formiate à la réduction du O_2 et produit du peroxyde d'hydrogène pendant la catalyse, ce qui prévient la

dénaturation du cofacteur à Mo/W par l'oxygène[62]. Ils proposent qu'un site de bifurcation électronique serait opérant et permettrait la réduction du dioxygène. Le cofacteur à W-*bis*PGD semble être le meilleur candidat pour effectuer cette bifurcation puisque l'oxygène y a probablement accès et que c'est aussi probablement le seul cofacteur de la FDH capable d'accueilir deux électrons à la fois. Cette FDH possède 61% d'identité de séquence avec le complexe FdhAB de la même bactérie. Pour expliquer que l'une est insensible à l'oxygène et l'autre non, les auteurs pointent quelques résidus au voisinage du site actif non conservés entre les deux enzymes comme potentiellement responsables de cette différence de sensibilité. Mais l'étude des mécanismes de tolérance sur d'autres FDHs semble nécessaire pour une meilleure compréhension du phénomène.

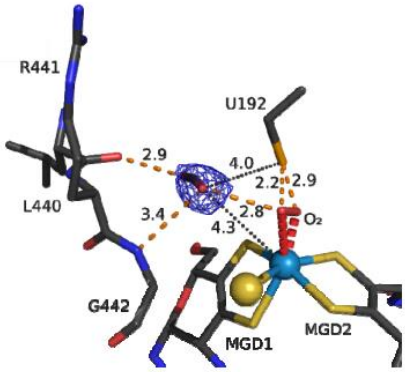


***Figure 16**. Structure du site actif à W de la FDH de D. vulgaris incubée avec du CO_2 et exposée à l'air. La Sec ligand décoordinée du métal, remplacée par une molécule de O_2 et une molécule de CO_2 est résolue dans le site actif. Extrait de [59]*

En conclusion, de nombreux aspects de la catalyse des FDHs restent inconnus. Une meilleure compréhension de ceux-ci peut passer par l'analyse de FDHs différentes de celles étudiées jusqu'à présent.

Appréhender la diversité existante au sein de la famille des FDHs passe par la comparaison de leur séquence primaire à l'aide d'outils bioinformatiques et la construction d'arbres phylogénétiques. Peuvent s'ajouter à cela des informations complémentaires comme l'examen de l'environnement génomique pouvant témoigner d'une conservation d'organisation, le terme synténie étant alors employé. Une autre information peut provenir des prédictions de structure par exemple par l'outil AlphaFold et qui peut permettre de rendre compte de repliements distincts au sein de certains membres de la famille. C'est en employant ces outils que l'équipe d'Axel Magalon a mis en évidence une nouvelle sous-famille de FDHs nommée ForCE et retrouvée chez plusieurs phyla bactériens et archéens[64]. La bactérie *Bacillus subtilis* possède deux FDHs, ForCE1 et ForCE2, composées des sous unités catalytiques ForC1 et 2 qui se ressemblent à 61% et des sous unités ForE1 et 2 qui partagent 20% d'identité de séquence. ForCE1 étant le focus de ce travail de thèse, elle est plus particulièrement présentée dans la suite.

III) ForCE1 de *Bacillus subtilis*

1) Sa structure inédite

Le complexe ForCE1 de *Bacillus subtilis* est le premier membre caractérisé d'une nouvelle famille de FDHs. La distinction des séquences de type ForC1 en sous-famille de FDHs repose

sur l'analyse phylogénétique de séquences de FDHs à multi-domaines ainsi qu'à l'organisation génomique conservée où les gènes forC et forE sont organisés en opéron[65]. Les travaux sur cette enzyme ont montré qu'elle couple l'oxydation du formiate à la réduction de quinones. Quand une suspension de cellules de *B. subtilis* est incubée avec du formiate, dans une solution saturée en oxygène, l'augmentation de la vitesse de consommation de l'oxygène est observée[65]. Cette augmentation rend compte du fait que les électrons issus de l'oxydation du formiate sont transférés à une chaîne de transfert d'électrons aboutissant à une oxydase terminale chargée de réduire le dioxygène en eau[65]. Le complexe ForCE1 fait donc partie de la chaîne respiratoire aérobie de la bactérie[65].

Nos collaborateurs, Pascal Arnoux (BIAM, Cadarache), Mickael Cherrier et Yvain Nicolet (IBS Grenoble), ont résolu la structure de ForCE1 par cristallographie aux rayons X et par cryo-microscopie électronique[65]. La Figure 17 montre la structure cristallographique du complexe ForCE1 déterminée à une résolution de 2.7 Å. L'enzyme est un hétéro-octamère composé de 4 sous-unités catalytiques ForC1 et de 4 sous-unités partenaires ForE1. La sous unité ForC1 fait partie d'une sous-famille de FDHs qui possèdent, en plus du domaine C-terminal conservé qui contient le cofacteur à Mo et un centre fer soufre (FeS), un module N-terminal capable de fixer 4 autres centres FeS et qui contient un motif spécifique lui permettant d'interagir avec la sous-unité partenaire ForE1. Les quatre sous-unités ForE1 s'enchevêtrent pour former une structure hélicoïdale constituant le cœur de la structure quaternaire. Une rupture locale de l'hélice définit un vestibule de plus grande taille entouré de quatre ouvertures qui définissent les zones d'interaction avec les modules N-terminaux des sous-unités catalytiques ForC1. La composition en acides aminés et la dimension interne du tube formé par le tétramère de ForE1 définit un conduit permettant la diffusion de quinones entre la bicouche lipidique et le site de fixation de la quinone situé à l'interface ForC1-ForE1.

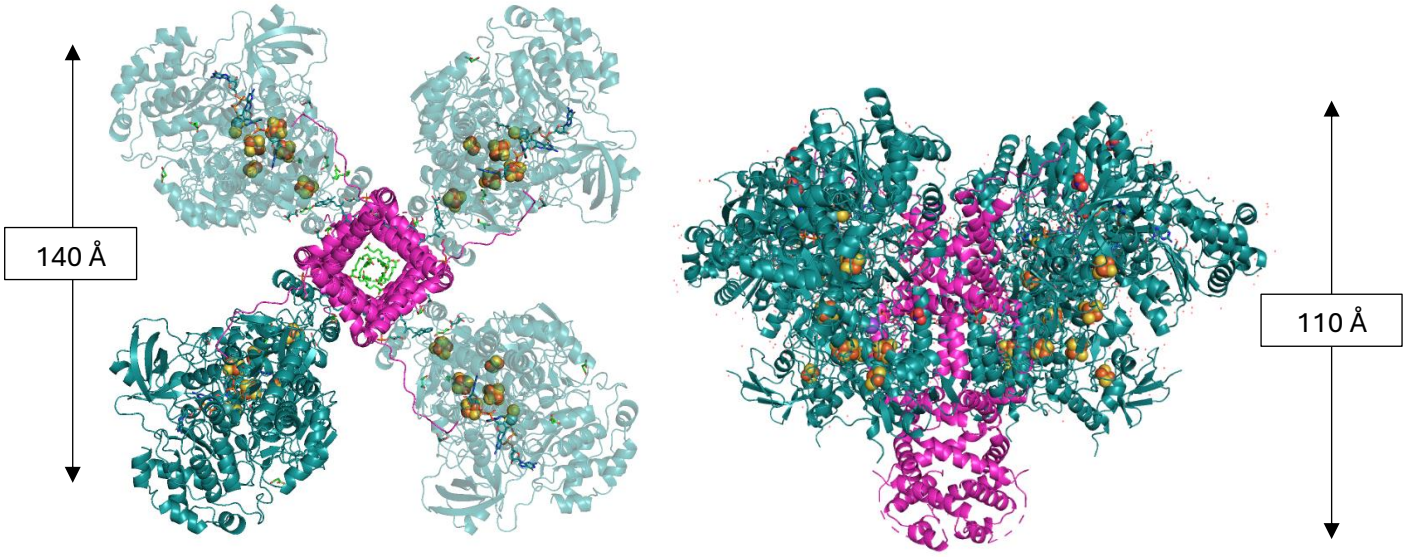


***Figure 17**. Deux vues de la structure cristallographique à 2.7 Å de ForCE1. Les sous unités ForC sont en turquoise, les sous unités ForE sont en rose. Des lipides (vert, panneau de gauche) sont résolus dans le tube ForE. Les centres FeS sont en sphères (Fe en orange, S en jaune)*

Chaque sous-unité ForC1 possède un cofacteur à Mo, quatre centres [4Fe-4S], un centre [2Fe-2S] et une ménaquinone-7. La distance moyenne entre ces centres se situe entre 8.1 et 18.5 Å, ce qui est compatible avec un transfert d'électrons rapide depuis le formiate jusqu'à la ménaquinone tel que schématisé sur la Figure 18[65].

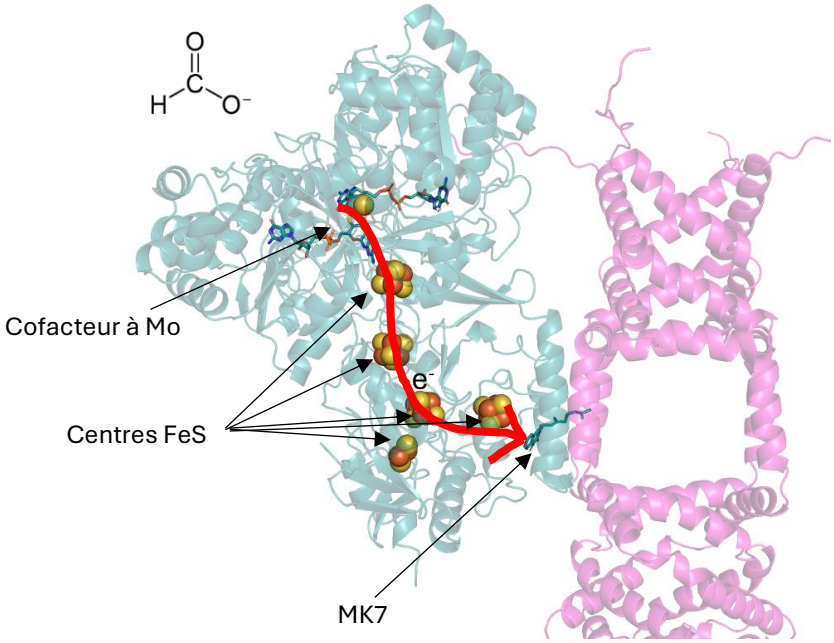


***Figure 18**. Trajet électronique supposé dans la sous unité catalytique*

2) Site actif non consensuel

L'une des différences les plus marquantes entre les enzymes de la sous-famille ForCE et les autres FDHs est le changement de l'environnement immédiat du site actif à Mo. En effet, le résidu histidine retrouvé conservé dans la totalité des FDHs caractérisées jusqu'ici est remplacé chez les ForCE par un résidu glutamine[64] (Figure 19).

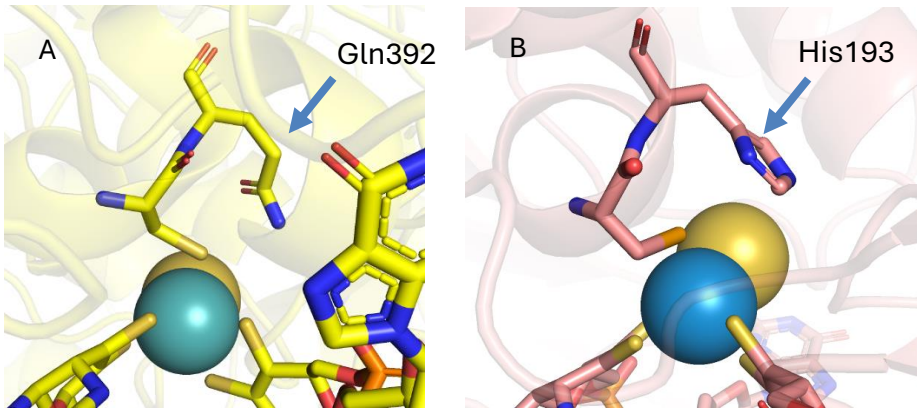


***Figure 19**. Comparaison du site catalytique de ForCE1 (**A**) et de FdhAB de D. vulgaris (**B**, PDB : 6sdr)*

Même si le site actif de ForCE1 est différent des autres FDHs, ForCE1 possède un k_{cat}, mesuré par des tests d'activité formiate :benzyl viologen oxydoréductase de 96 s^{-1}, comparable à celui d'autres FDHs (FDH de *R. capsulatus* : 37 s^{-1} à pH 9, FDH de *C. necator*: 201 s^{-1}, Tableau 2)[64]. De la même manière, le pH optimal pour la catalyse *in vitro* est basique (pH 10)[64].En fait, le paramètre le plus pertinent est celui de l'efficacité catalytique qui se traduit par le rapport k_{cat}/K_m mais peu d'études donnent accès à ce paramètre en fonction du pH. Toutefois, une étude récente[66] conduite sur la FDH de *R. capsulatus* indique que l'efficacité catalytique est maximale à pH 7, c'est à dire au pH physiologique. En résumé, la substitution de l'His par une Gln ne change pas de façon drastique les propriétés cinétiques d'oxydation du formiate de ForCE1 en comparaison avec les autres FDHs. Par contre, aucune activité de réduction du CO_2 n'a pu être montrée par des mesures de cinétique enzymatique en solution ou par électrochimie (Figure 20), contrairement aux autres FDHs caractérisées jusqu'à présent. Le voltamogramme cyclique représenté sur la Figure 20 montre qu'il n'y a pas de courant dû à la réduction du CO_2 quand l'enzyme est incubée avec du CO_2 et le courant détecté après l'ajout de formiate indique que l'enzyme est active. ForCE1 de *B. subtilis* serait la première FDH purement monodirectionnelle. Ce constat conduit inévitablement à s'interroger sur le rôle du résidu Gln dans cette sous-famille de FDHs, une question qui sera abordée dans la section Résultats du manuscrit.

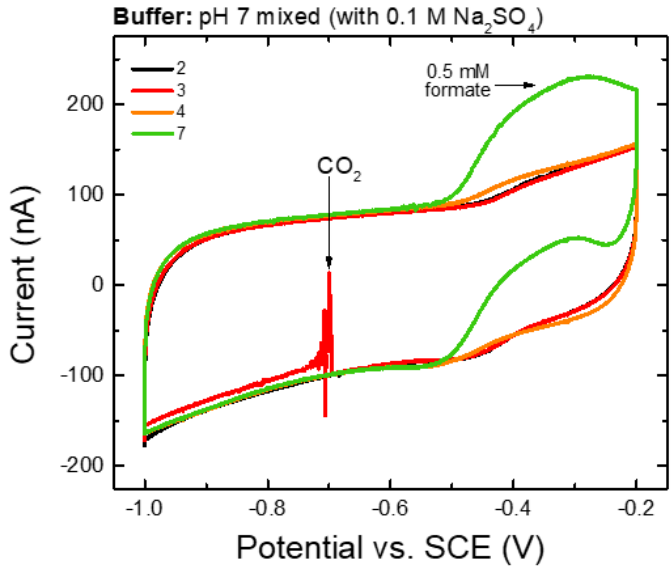


***Figure 20**. Voltamogramme cyclique de ForCE1 incubée avec du CO_2 (injecté sous forme de Na_2CO_3) et du formiate. Le potentiel est rapporté par rapport à une électrode calomel. Sont montrés les balayages 2, 3, 4 et 7. Données obtenues par Marta Meneghello et Vincent Fourmond au BIP.*

Le site actif en état Mo(V) de ForCE1 a été caractérisé par spectroscopie de RPE en onde continue (RPE CW)[64,67]. Deux espèces de Mo(V) ont pu être identifiées : une première (nommée espèce 1) de valeurs de $g_{1,2,3}$= 1.9999, 1.9924, 1.9874 et une deuxième espèce (nommée espèce 2) présentant une rhombicité plus grande de valeurs de $g_{1,2,3}$=2.021, 1.9852, 1.9692 (Figure 21A et B). Ces spectres montrent aussi un signal radicalaire attribué à une semiquinone stabilisée dans le complexe de valeurs de $g_{1,2,3}$= 2.0054, 2.0051, 2.0023 et dont la signature chevauche celle des espèces Mo(V). L'espèce 1 présente une structuration qu'il est possible de simuler par un couplage hyperfin avec un proton dont les valeurs principales du tenseur sont $A_{1,2,3}$= 18.9, 12.3, 11.3 MHz. Il s'agit d'un couplage fort et interprété comme provenant d'un proton présent dans l'environnement immédiat du métal. L'une des questions posées est si ces deux signatures Mo(V) diffèrent par la nature chimique de la première sphère de coordination du Mo. Le diagramme de corrélation de la Figure 21C représente les valeurs de g en fonction de l'anisotropie g_1-g_3 pour plusieurs espèces de Mo(V) détectées dans

différentes enzymes à Mo/W-*bis*PGD dans lesquelles le métal est coordiné par une Cys/Sec (la liste des enzymes correspondantes est donnée dans [67]). Ce diagramme permet ainsi de mettre en évidence des corrélations dans la nature de la première sphère de coordination du Mo(V)[68]. Il montre que les espèces chimiques associées aux deux signatures de Mo(V) dans ForCE1 corrèlent avec des espèces Mo(V) coordinées par deux molécules de PGD, un soufre inorganique et un ligand protéique de type Cys/Sec. Les différences de valeurs de g des deux espèces de Mo(V) de ForCE1 seraient donc principalement dues à une géométrie différente du cofacteur à Mo mais avec une première sphère de coordination du métal par six atomes de soufre conservée. Mais alors dans quelles conditions ces deux espèces sont-elles générées ?

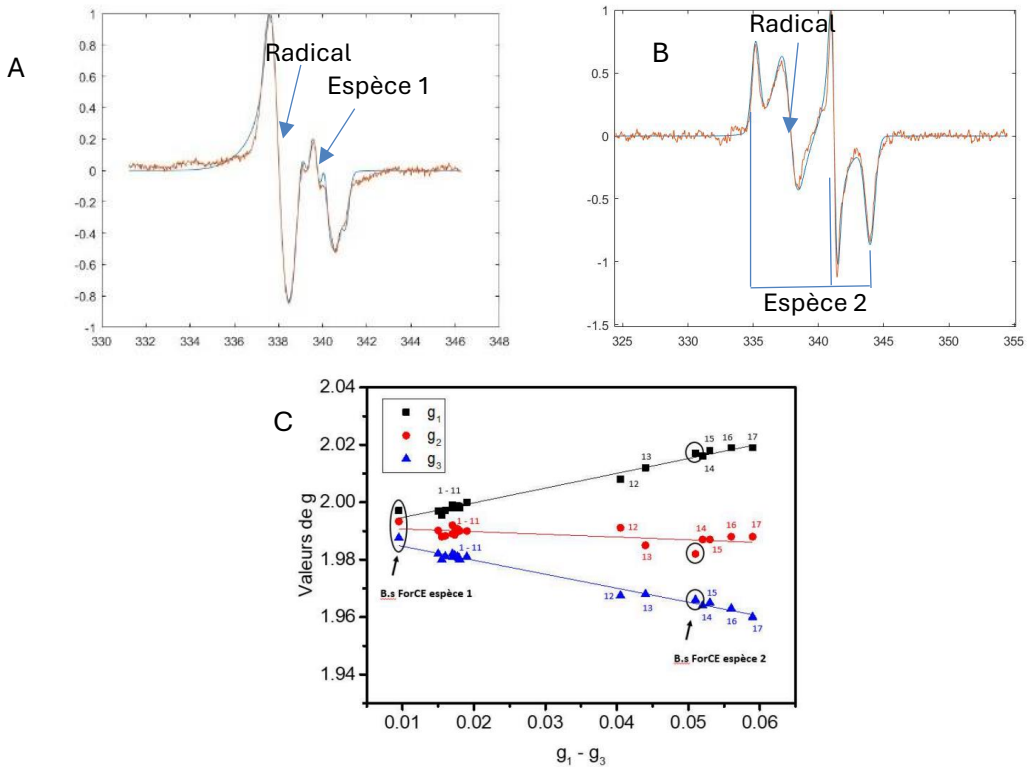


***Figure 21**. **A**. Spectre RPE en onde continu de l'espèce 1 du Mo(V). Paramètres expérimentaux : pH 6, 50 K, -288 mV, 1 mW, 1G, gain 60 dB. Paramètres de simulation : largeur de raie du radical simulé par HStrain (13.7, 100.3, 13.4 MHz), largeur de raie du Mo simulé par un couplage hyperfin avec un proton dont les valeurs principales du tenseur sont $A_{1,2,3}$= 18.9, 12.3, 11.3 MHz et HStrain (9.9, 9.8, 10.7 MHz). **B**. Spectre de l'espèce 2 du Mo(V). Paramètres expérimentaux : pH 7.5, 50 K, 0 mV, 1 mW, 5G à 100 kHz, gain 60 dB. Paramètres de simulation : largeur de raie du radical simulé par HStrain (44.0359, 24.9454, 128.639 MHz), largeur de raie du Mo simulé par HStrain (18.2, 11.3, 22.4 MHz). **C**. Diagramme de corrélation des valeurs de g en fonction de l'anisotropie (g_1 - g_3) d'espèces MoV. Extrait de[67]*

Une autre interrogation porte sur l'origine du proton responsable du fort couplage hyperfin résolu sur le signal RPE de l'espèce 1. La valeur de ce couplage est du même ordre de grandeur que celle mesurée dans d'autres FDHs[37,46,47]. Comme proposé dans plusieurs études, ce proton pourrait être attribué au ligand sulfhydryle. De manière intéressante, les données d'électrochimie obtenues sur ForCE1 indiquent que l'atome de soufre inorganique n'est pas protoné dans l'état Mo(V)[51]. On peut également s'interroger sur l'existence d'un couplage similaire dans le cas de l'espèce 2, et sur le caractère échangeable de ce proton et, plus généralement, sur la pertinence catalytique des espèces Mo(V) détectées.

3) Similitudes et différences structurales avec les FDHs à multi-domaines

Comme indiqué précédemment, la famille ForC appartient à une sous-famille de FDHs à multi-domaines parmi lesquelles seuls deux autres membres sont caractérisés sur le plan structural, à savoir les FDHs de *R. capsulatus* et de *Methylorubrum extorquens* AM1 (Figure 22). Avec un RMSD de 1.16 Å et 1.43 Å entre ForC et les sous unité catalytique FdsA de *R. capsulatus* et *M. extorquens* respectivement, le repliement global de la sous unité catalytique est conservé (Figure 22A). La différence principale porte sur le module N-terminal qui définit la zone d'interaction avec les sous-unités partenaires (entouré en rouge dans la Figure 22A). Le partenaire structural ForE se lie ainsi en un site distinct de celui des sous-unités partenaires de FdsA chez *R. capsulatus* et *M. extorquens*. Il en résulte des trajets électroniques différents (Figure 22B et C). D'ailleurs, le module partenaire de ForC1 a une structure et des caractéristiques inédites que je vais détailler un peu plus dans la partie suivante.

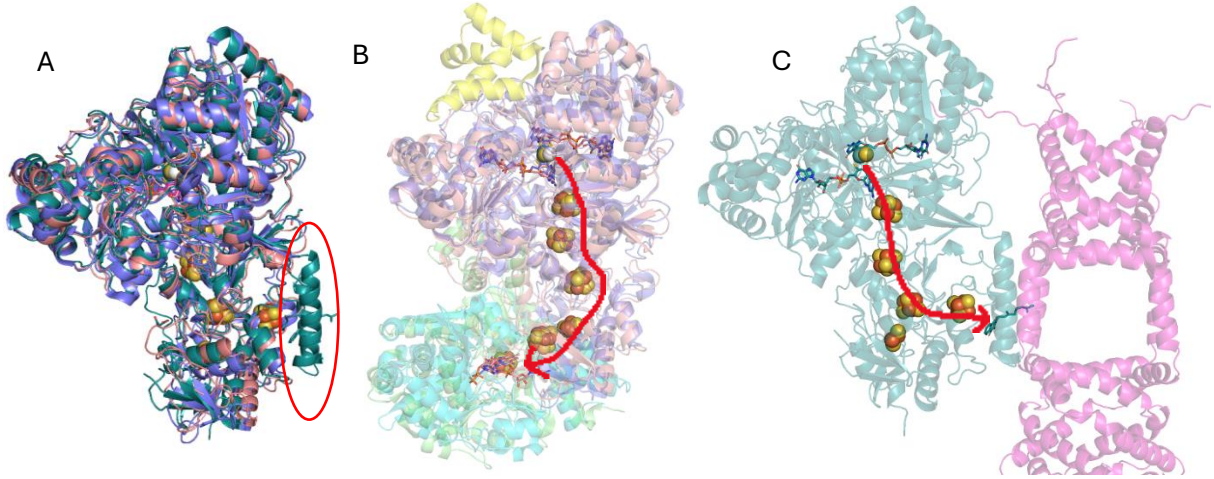


***Figure 22**. **A**. Superposition des sous unités ForC1 (turquoise) et FdsA de R. capsulatus (PDB : 6tg9, beige) et FdsA de M. extorquens (PDB : 7vw6, violet). Les trajets électroniques sont indiqués par des flèches rouges dans les FDH de R. capsulatus et M. extorquens (**B**) et ForCE1 (**C**)*

Les analyses phylogénétiques de chaque domaine N- et C-terminal indiquent que les protéines ForC sont distinctes des autres types de FDHs étudiées jusqu'à présent[65] (Figure 23A et B). La divergence du module C-terminal des protéines ForC des autres FDHs indique qu'un nombre important de substitutions définit une protéine ForC en dépit d'un repliement structural conservé comme indiqué plus haut. Cette distinction pourrait s'accompagner de propriétés catalytiques distinctes comme celle de ne pas présenter d'activité de réduction du CO_2. Pour le module N-terminal, la différence se comprend en tenant compte de la nature variable de la ou des sous-unités partenaires pouvant conduire à définir des interfaces de contact distinctes.

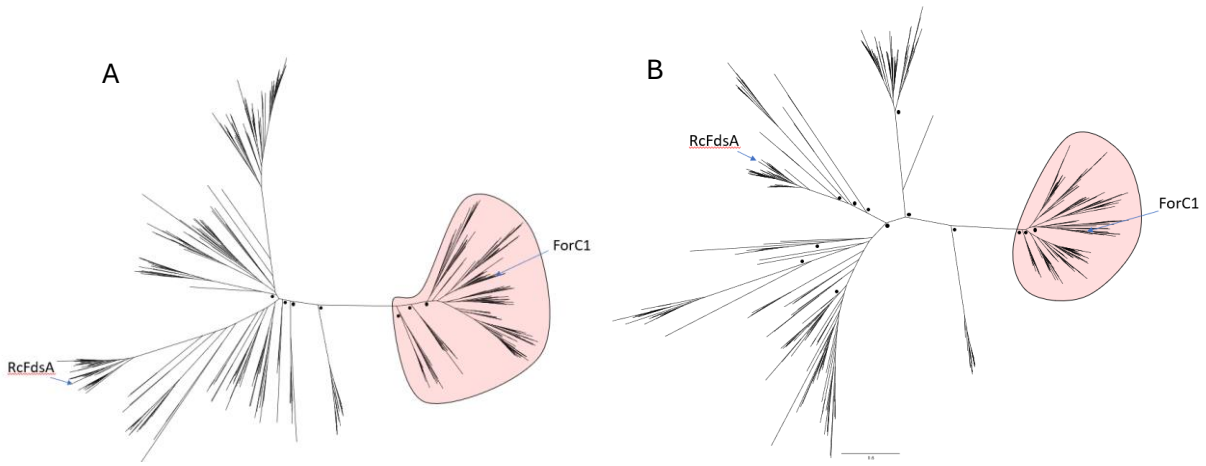


***Figure 23**. Arbre phylogénétique généré à partir de l'alignement multiple de séquences du domaine C-terminal (**A**) et N-terminal (**B**) de 442 séquences de la sous-unité catalytique de FDHs multi-domaines en utilisant une approche de probabilité maximale. La séparation entre les moules N et C-terminaux se fait deux acides aminés avant la première Cys coordinant le FeS proximal (le plus proche du site actif à Mo). L'identité inter-séquences a été réduite à un maximum de 90 % entre deux séquences. Chaque pointe de branche représente une seule séquence. L'arbre a été construit avec IQ-TREE en utilisant le modèle WAG+I+G4. Les branches dont le support UFBoot est supérieur à 95 % sont indiquées par un cercle noir. Les séquences ForC sont colorées en rose. Extrait de[65].*

4) Un module partenaire inédit

Les sous-unités partenaires ForE1 s'entrelacent pour former une structure hélicoïdale. Ce tube d'environ 100 Å de long et 20 Å de large (Figure 24 A et B) présente dans sa longueur quatre fenêtres d'environ 25 Å de large, au niveau desquelles viennent se fixer les sous-unités catalytiques ForC1. L'extrémité C-terminale de ForE1 se compose d'un domaine dont la fonction était inconnue jusqu'alors, annoté DUF1641 dans les bases de données, et qui se replie sous la forme de deux hélices à caractère amphipathique (Figure 24 B). Des lipides ou des acides gras sont résolus dans la structure obtenue par cryo-microscopie électronique. Ils sont localisés à trois endroits. D'abord, au niveau de l'extrémité C-terminale où on en retrouve la plus grande quantité. Ensuite, des lipides sont présents au niveau des fenêtres, et enfin niveau de l'extrémité N-terminale du tube où ils semblent jouer le rôle de bouchons, empêchant le solvant d'entrer dans le tube.

La présence de lipides à l'extérieur du tube et au niveau du domaine DUF amphipathique, laisse supposer que l'enzyme doit interagir avec la membrane par le DUF. Cette hypothèse est renforcée par l'étude de l'activité respiratoire de variants du complexe dépourvu du domaine DUF ou dont le caractère amphipathique du domaine a été modifié par la substitution de résidus clefs. Dans chacun des cas, aucune accélération de la vitesse de consommation d'oxygène est observée après l'ajout de formiate, contrairement à l'enzyme native[65], ce qui renforce l'hypothèse de l'interaction de ForCE1 à la membrane via le DUF, qui est renommé HMP (pour helical membrane pug-in)[65]. De plus, la présence de lipides à l'intérieur du tube hydrophobe et ses dimensions (Figure 24 A et B) permettent d'imaginer que des molécules hydrophobes comme des quinones peuvent circuler à l'intérieur de la structure formée par les ForE1.

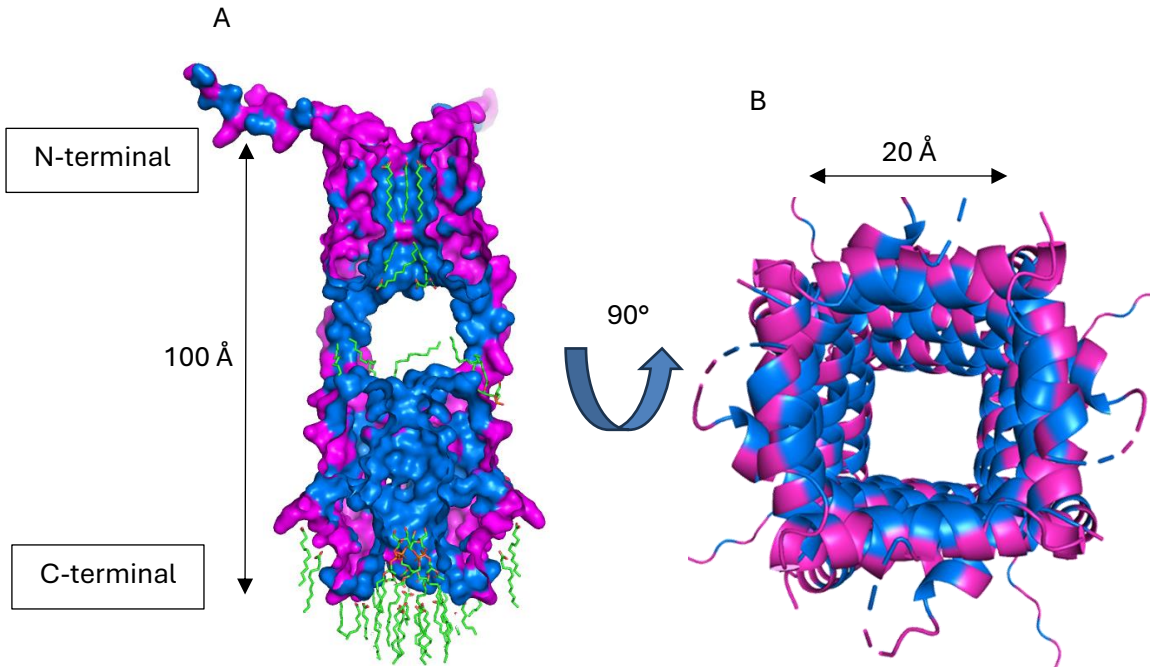


***Figure 24**. **A**. Vue en coupe du tube formé par l'enchevêtrement des sous-unités ForE. Les lipides et acides gras sont représentés en bâtons. **B**. Vue par l'extrémité C-terminale. Les acides aminés hydrophobes sont coloriés en bleu, les acides aminés polaires sont en rose*

Avant d'énoncer les questions en suspens sur la MK7 de ForCE1, je dois d'abord écrire quelques généralités sur les quinones et les modalités d'interaction avec les complexes protéiques.

IV) Généralités sur les quinones dans le contexte de la bioénergétique

1) La quinone, ça sert à quoi ?

On peut considérer les quinones comme des centres redox liposolubles. Leur chaîne isoprénoïde apolaire, dont le nombre d'unités et la saturation peuvent varier, leur permette circuler dans des environnements hydrophobes, et plus particulièrement dans les membranes des cellules. La nature chimique de la tête polaire peut varier, définissant différents types de quinones, parmi lesquelles les naphtoquinones (bicycliques) et les benzoquinones (monocycliques) sont les plus communes, mais surtout, elle leur confère leurs propriétés redox. La quinone peut ainsi osciller entre trois états d'oxydoréduction : oxydé (quinone), semi-réduit (semiquinone) par l'ajout d'un électron à la forme oxydée et réduit (quinol) par l'ajout d'un deuxième électron. Les transferts d'électron sont couplés au transfert d'un ou plusieurs protons qui s'opère de façon simultanée ou non aux transferts d'électrons. Ces transferts se produisent à des potentiels redox qui varient en fonction de la nature des quinones et de leur environnement. D'une manière générale, on distingue les quinones de bas potentiel (environ -70 mV), de potentiel moyen (environ -40 mV) et de haut potentiel (environ +100 mV) (Figure 25). A ce titre, le site protéique de liaison de la quinone peut conduire à stabiliser, sur le plan thermodynamique, l'intermédiaire semi-réduit des quinones. Pour donner des ordres de grandeurs, la constante de stabilité (qui dépend de l'écart en potentiel des deux transitions redox) d'une ubisemiquinone dans les membrane est de l'ordre de 10^{-10} et peut atteindre plusieurs dizaines dans un site de fixation[69].

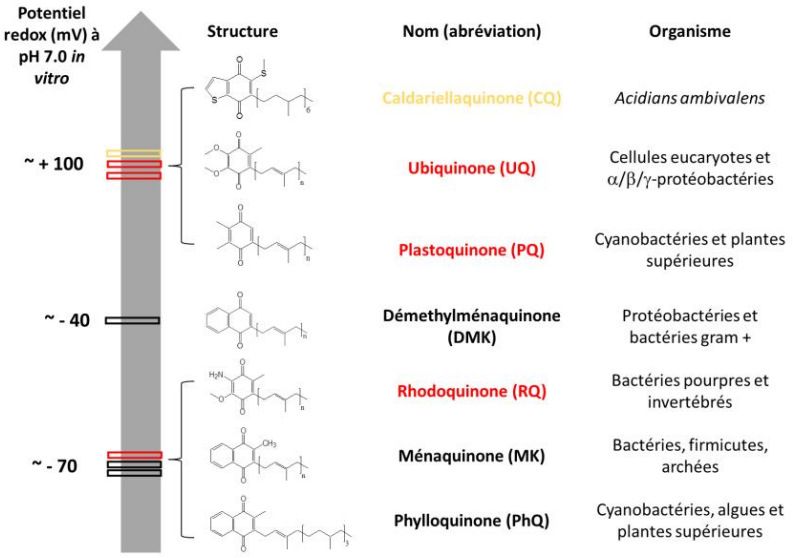


***Figure 25**. Structures, potentiels redox moyens et exemples d'organismes d'origine des différentes quinones prépondérantes dans les membranes biologiques. Les différentes catégories de quinones sont distinguées par les couleurs : quinone à noyau aromatique soufré (jaune), benzoquinones (rouge) et naphtoquinones (noir). Extrait de [70].*

Les quinones peuvent assurer le rôle de navettes à électrons et à protons dans des chaînes de transfert d'électrons, entre des complexes protéiques. Pour récupérer ou transmettre les électrons, les quinones interagissent dans des sites protéiques spécifiques (sites Q) qui vont stabiliser, via des liaisons hydrogènes, le cycle aromatique de la quinone le temps de la réaction redox. Les quinones n'ont pas vocation à rester fixées dans ces sites : elles vont et viennent et sont alors désignées comme échangeables.

Cependant, dans des cas plus rares, les quinones participent en qualité de relai électronique au sein même d'un complexe protéique, intervenant alors dans un processus de transfert d'électrons intramoléculaire. Elles transfèrent des électrons d'un centre redox à un autre à l'intérieur d'un complexe sans se dissocier. Ici, la fixation de la quinone est plus pérenne que dans le cas des quinones échangeables. On dit que les quinones sont résidentes (même s'il n'existe pas de quinones strictement non échangeables). C'est le cas de la quinone du site Q_A du photosystème II[71] : les électrons libérés par la photo excitation des chlorophylles au niveau du donneur primaire sont transférés à Q_A qui transfère à son tour les électrons sans se déplacer à une quinone échangeable Q_B, comme le ferait par exemple un groupement prosthétique de type centre fer soufre.

La Figure 26 résume la multitude de rôles attribués aux quinones bactériennes. Les quinones sont impliquées dans le métabolisme, la régulation de gènes, la résistance au stress des bactéries[72]. Elles servent à synthétiser des hèmes, à la prédation ou la colonisation, ou encore permettent de façonner les écosystèmes bactériens en alimentant, par la libération de quinones extracellulaires, les organismes auxotrophes en quinones.

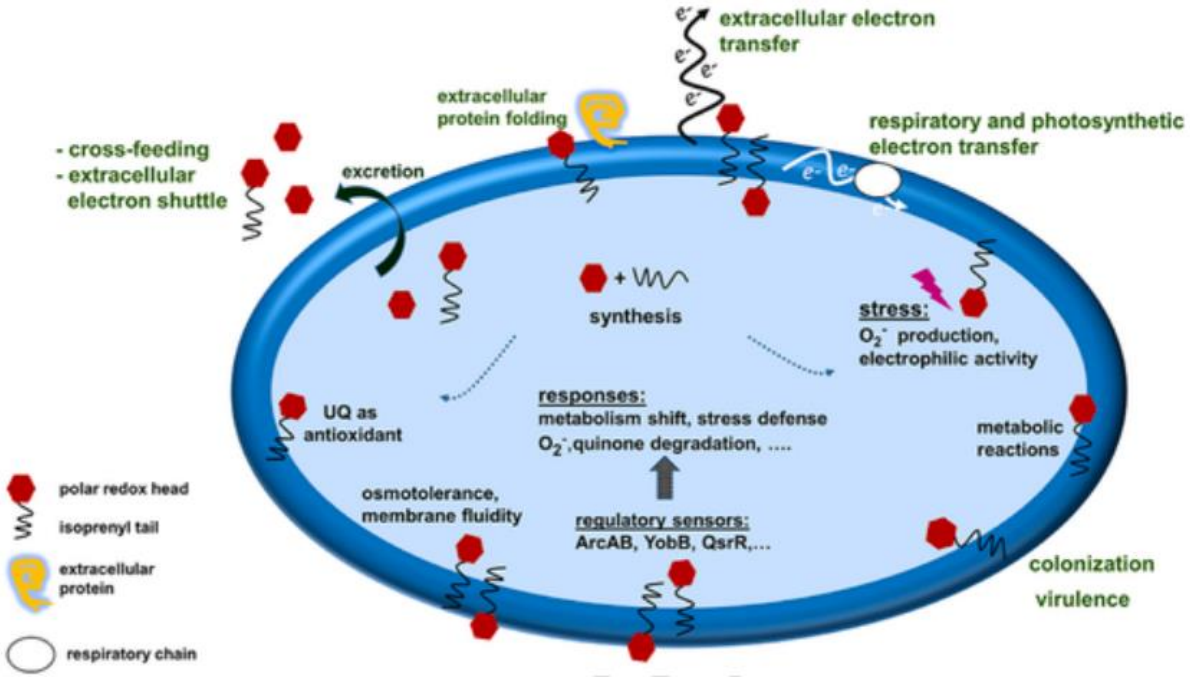


***Figure 26**. Schéma résumant les différents rôles attribués aux quinones bactériennes. Extrait de [72].*

2) Comment identifier un site Q ?

Comme indiqué plus haut, l'interaction d'un complexe protéique avec une quinone est fondamentale pour assurer le transfert efficace d'électrons. Cependant, aucun motif consensus ne permet de définir un site Q à partir d'une séquence primaire en acides aminés. L'information provient le plus souvent de données structurales et notamment de la cryo-EM qui a permis ces dernières années de résoudre la structure d'un grand nombre de complexes protéiques en interaction avec des quinones. C'est le cas par exemple de plusieurs complexes de cytochromes dont les structures ont été résolues par cristallographie aux rayons X et par cryo-EM (voir [73] pour la revue). Toutefois, la localisation de ces quinones ne décrit pas systématiquement celle d'un site Q mais peut-être celle d'un site de plus forte affinité pour ce type de molécule. Par exemple, dans la structure cryo-EM du complexe bcc-aa3 de *C. glutamicum*, deux ménaquinones sont résolues à proximité d'un hème[73] (Figure 27 A et B). Dans ce cas, comment savoir laquelle est impliquée dans le transfert électronique et définit ainsi le site Q ? C'est difficile de trouver un consensus et les approches pour répondre à cette question sont souvent indirectes, par exemple en comparant les positions de quinones ou d'inhibiteurs dans des structures analogues, ou bien encore par des expériences de mutagénèse dirigée.

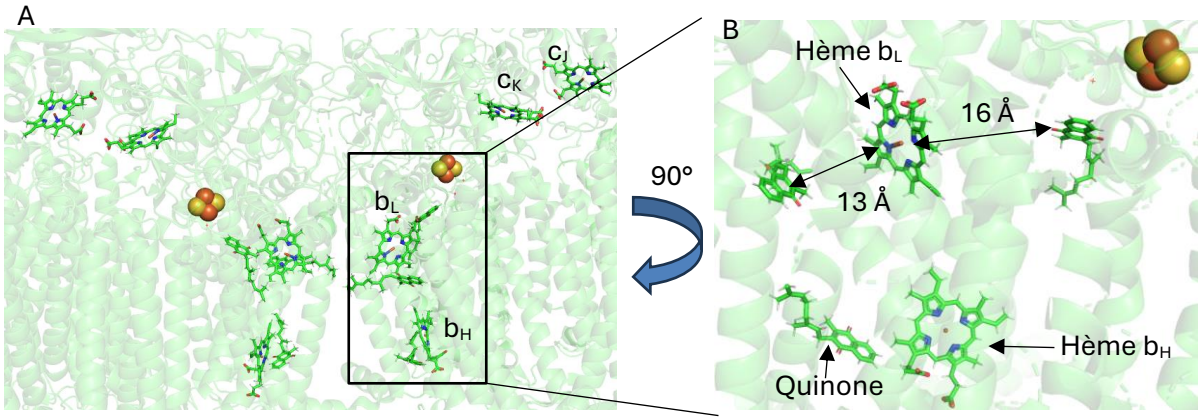


***Figure 27**. **A**. Structure obtenue par cryo-microscopie électronique du complexe cytochrome bcc-aa3 de C. glutamicum (PDB : 7qho). Les hèmes et les quinones sont en bâtons. **B**. Zoom.*

Par exemple, pour le cytochrome b6f qui participe à la photosynthèse oxygénique, sur la base de données structurales obtenues en présence d'un analogue de quinone (tridecyl-stigmatellin) résolu dans un site de fixation putatif, les substitutions de résidus proches de ce site de fixation, et supposées rétrécir le canal des quinones, ont entrainé une diminution de la vitesse de croissance des bactéries étudiées[74]. Mais il reste difficile de savoir si les acides aminés substitués font bien partie du site Q : une substitution pourrait boucher le canal d'accès des quinones loin du site de fixation, ou alors les mutations pourraient avoir des effets à longue distance.

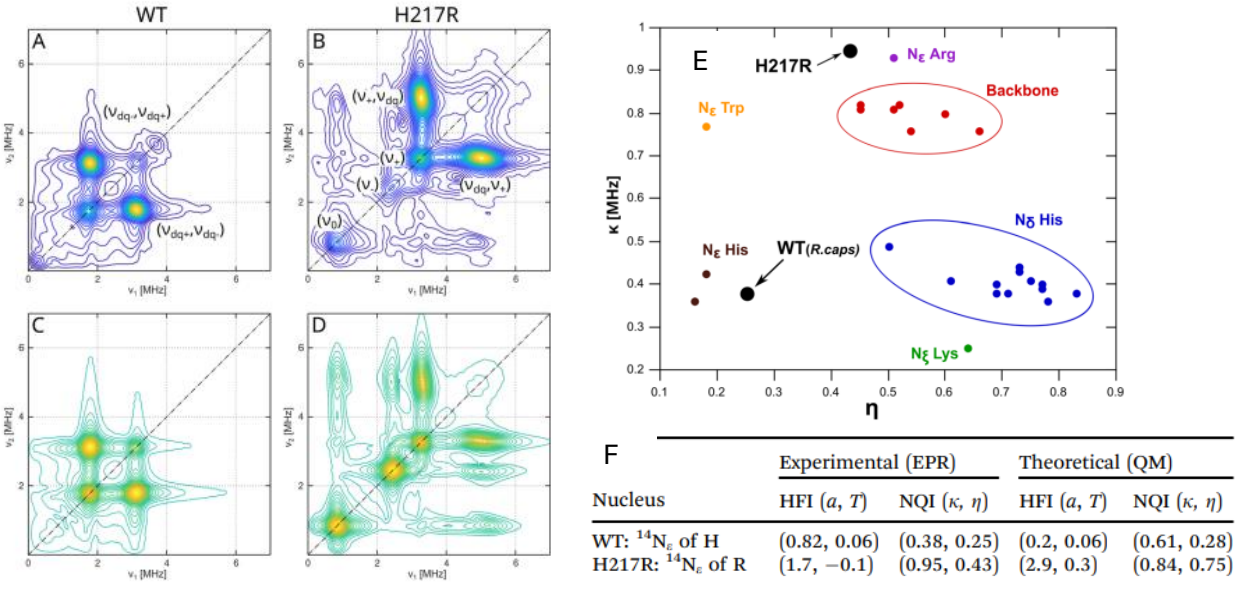
On peut aussi sonder le site de fixation des quinones par la spectroscopie RPE qui fournit des informations sur les propriétés redox de la quinone dans le site Q et sur son environnement chimique. Cela suppose qu'un intermédiaire semiquinone (le seul état rédox paramagnétique de la quinone) puisse être stabilisé cinétiquement ou par potentiométrie. En condition de turnover, la quinone reçoit ou donne des électrons un à un, donc l'état semiquinone traduit celui d'un intermédiaire catalytique dans un site Q. Si l'état semi-réduit est stable, alors la quinone est stabilisée physiquement et thermodynamiquement dans un site protéique qui est vraisemblablement le site Q. On peut alors utiliser la spectroscopie hyperfine pour sonder le site de fixation et renseigner sur l'environnement chimique du radical comme décrit dans la section suivante.

3) Caractérisation des sites de fixation des quinones par RPE couplée à la DFT

La RPE en onde continue ne permet pas de résoudre les faibles couplages hyperfins qui sont pourtant utiles pour sonder l'environnement nucléaire immédiat des semiquinones. Parmi les techniques de spectroscopies hyperfines, la spectroscopie HYSCORE (Hyperfine Sub level Correlation) est particulièrement bien adaptée pour mesurer les interactions hyperfines entre une semiquinone et certains noyaux (noyaux de spin non nul), et notamment avec les ^{14}N (voir Matériel et Méthodes). Ces noyaux de spin égal à 1 sont riches en informations sur le mode de fixation des quinones puisqu'il est possible d'extraire, en plus des couplages hyperfins, les paramètres quadrupolaires des ^{14}N. Ces paramètres peuvent permettre d'attribuer la nature du groupement chimique qui porte l'atome d'azote couplé au radical (par exemple azote de

backbone d'acide aminé, ou de différentes chaines latérales) en les comparant à des données expérimentales obtenues sur d'autres sites quinoniques et une attribution plus fine dans la structure protéique peut être faite en calculant par DFT les paramètres de couplage hyperfin et quadrupolaire.

On peut prendre l'exemple de l'article de Kuleta et al.[75], dans lequel les auteurs sondent les interactions moléculaires de la quinone du cytochrome bc1 dans le site de fixation du complexe natif et un variant dans lequel une His du site quinonique est remplacée par une Arg. Les spectres HYSCORE de la région basse fréquence (<6MHz) montrent des signaux dus au couplage entre la quinone et un noyau ^{14}N pour la protéine WT (Figure 28A). La contribution du couplage hyperfin et du couplage quadrupolaire au spectre rend difficile la détermination directe à partir des fréquences mesurées des paramètres associés. Pour le variant, les signaux sont typiques d'un ^{14}N en condition de compensation qui permet d'obtenir directement les paramètres quadrupolaires du noyau ^{14}N au travers de la mesure des fréquences de transitions quadrupolaires nucléaires pures (voir Matériel et Méthodes) (Figure 28B). Les auteurs parviennent à simuler ces signaux (Figure 28C et D), et à extraire en particulier les paramètres quadrupolaires κ et η de ces noyaux d'azote (Figure 28E). Ils comparent ces paramètres avec les données expérimentales de la littérature pour faire une première attribution des noyaux sondés (Figure 28B). Ensuite, à partir d'un modèle structural du site quinonique issu de la structure, les auteurs ont calculé par DFT les paramètres de couplages hyperfin et quadrupolaire des noyaux d'azotes dans le cas du WT et du variant (Figure 28F) afin de consolider leur attribution des noyaux.



F

	Experimental (EPR)		Theoretical (QM)	
Nucleus	HFI (a, T)	NQI (κ, η)	HFI (a, T)	NQI (κ, η)
WT: $^{14}N_\varepsilon$ of H	(0.82, 0.06)	(0.38, 0.25)	(0.2, 0.06)	(0.61, 0.28)
H217R: $^{14}N_\varepsilon$ of R	(1.7, −0.1)	(0.95, 0.43)	(2.9, 0.3)	(0.84, 0.75)

***Figure 28**. Région basse fréquence des spectres HYSCORE de la semiquinone du cytochrome bc1 natif (**A**) et du variant H217R (**B**) et leur simulation (**C** et **D,** respectivement). **E**. Représentation des couples (κ, η) de noyaux ^{14}N en couplage magnétique avec des semiquinones. Les paramètres des ^{14}N détectés sur les spectres des panneaux A et B sont indiqués par des flèches. **F**. Comparaison des paramètres hyperfins et quadrupolaires expérimentaux des noyaux détectés (panneaux A et B) et calculés par DFT. Extrait de[75].*

Il arrive parfois que les signaux HYSCORE soient difficiles à interpréter à cause d'un encombrement spectral important induisant des recouvrements de pics, notamment s'il résulte de signaux produits par plusieurs noyaux de spins nucléaires supérieurs à 1/2. Une méthode

pour faciliter la lecture du spectre et pour distinguer les signaux issus de différents noyaux, est de réaliser un enrichissement isotopique (sélectif ou pas) de l'échantillon. L'idée est qu'en changeant de spin nucléaire, les signaux de certains noyaux se déplacent sur une autre région du spectre ou bien se simplifient. Pour les noyaux d'azote, l'enrichissement en ^{15}N (I=1/2, abondance naturelle 0,4%), permet non seulement d'obtenir un spectre avec une seule paire de pics de corrélation par noyau, donc une diminution potentielle de l'encombrement spectral mais également de supprimer l'interaction quadrupolaire, ce qui simplifie la détermination des paramètres hyperfins. Dans le cas d'un enrichissement sélectif, un seul type d'atome d'azote est enrichi, par exemple les azotes des His ou des Lys.

Par exemple, Seif Eddine *et al*[76] ont sondé l'environnement nucléaire de la ménasemiquinone fortement stabilisée dans la nitrate réductase respiratoire d'*E. coli.* Sur la Figure 29A on observe un couplage hyperfin entre la semiquinone et un noyau ^{14}N (I=1) qui a été mis en évidence par Grimaldi et al. dans une étude précédente[77]. La Figure 29B montre le cadran positif du spectre obtenu pour l'enzyme uniformément enrichie en ^{15}N (I=1/2). On observe une paire de pics de corrélation centrés sur un troisième pic à la fréquence de Larmor du ^{15}N. L'enrichissement sélectif en ^{15}N des His (pics 2, Figure 29C) puis des Lys (pic 3', Figure 29D) a permis de montrer que la quinone est en interaction avec ces deux acides aminés.

En bref, la spectroscopie HYSCORE est un bon outil pour sonder l'environnement des centres paramagnétiques, en particulier des semiquinones stabilisées dans leur site Q, et donner des informations sur leur localisation et leur mode de stabilisation dans les structures protéiques.

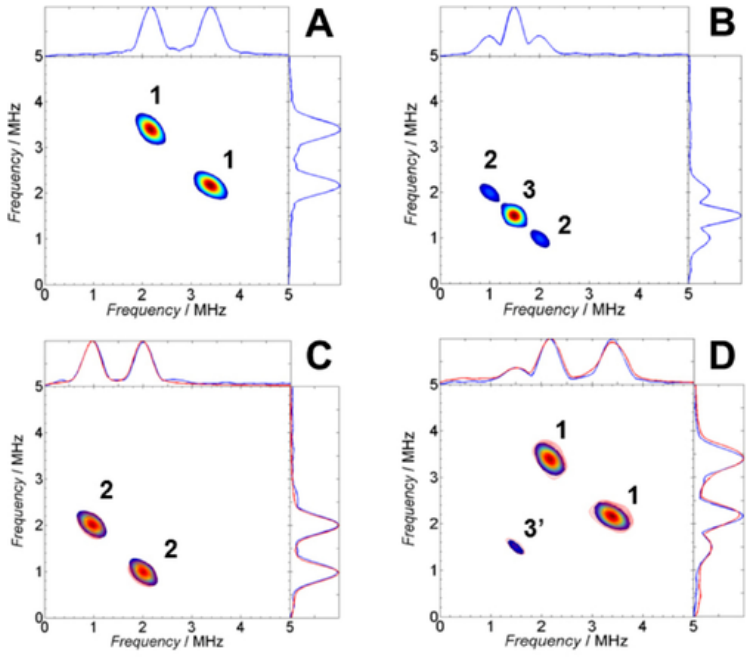


***Figure 29**. Région basse fréquences des spectres HYSCORE de la semiquinone de la nitrate réductase non isotopiquement enrichie (**A**), uniformément enrichie en ^{15}N (**B**), avec les His enrichies en ^{15}N (**C**), avec les Lys enrichies en ^{15}N (**D**). Les spectres expérimentaux des figure **C** et **D** sont superposés à des simulations spectrales (en rouge). Extrait de[76].*

4) Localisation de l'intermédiaire semiquinone

Mais si on a une structure de protéine avec une quinone résolue dans son site de fixation, pourquoi vouloir chercher à localiser l'intermédiaire semiquinone ?

Pour donner une réponse, on peut prendre l'exemple de la succinate déshydrogénase d'*E. coli* qui couple l'oxydation du succinate à la réduction d'ubiquinones[78]. Dans la structure initiale, une quinone est résolue dans ce qui pourrait être son site Q. Par ailleurs, une étude de docking a permis de proposer qu'une position différente de la quinone dans le site de fixation est possible et de décrire un mécanisme reposant sur les changements conformationnels associés à la réduction de la quinone dans le site Q[78] (Figure 30). On remarquera grâce à cette figure qu'une étude des couplages hyperfins entre la semiquinone (si elle est stable) et les noyaux environnants (surtout les azotes, vu l'His) pourrait donner des indices expérimentaux solides sur la position de la semiquinone pendant la catalyse.

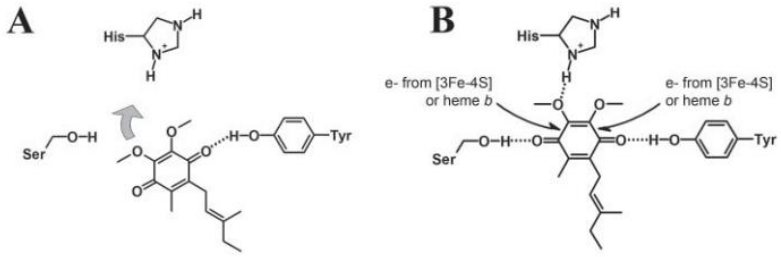


***Figure 30**. Mode de fixation de la quinone résolue dans la structure du complexe II d'E. coli (**A**) ou obtenue par docking (**B**). Le panneau A représente l'arrivée de la quinone dans le site et le panneau B illustre la fixation de la quinone en position catalytique selon l'hypothèse des auteurs. Extrait de[78].*

5) La quinone de ForCE1

Les données structurales obtenues sur ForCE1 par diffraction des rayons X ou par cryo-EM indiquent la présence d'une densité attribuée à une ménaquinone-7 positionnée à l'interface entre les sous-unités ForC1 et ForE1, à environ 50 Å de la membrane. La tête polaire de la quinone est située dans une poche de ForC1 à environ 10 Å du dernier centre FeS de la chaîne de transfert d'électrons, c'est à dire à une distance compatible avec un transfert d'électrons rapide depuis le site d'oxydation du formiate jusqu'à la quinone. Elle établit des liaisons hydrogènes avec la Thr100, la Lys234 et le Glu237 (Figure 31A et B). La queue hydrophobe est orientée vers le tube formé par les sous unités ForE1. Les analyses HPLC-MS de notre collaborateur Fabien Pierrel (TIMC, Grenoble) indiquent que la quinone présente en majorité dans l'échantillon de ForCE1 purifiée est une ménaquinone 7 (MK7)[64]. Par ailleurs, les données HPLC-ECD sur un extrait lipidique du complexe ForCE1 purifié indiquent que les quinones sont co-purifiées avec le complexe en proportions stoechiométriques[64] (environ 1 MK7 par complexe $ForC_1E_1$). Ensuite, il a été montré dans des travaux précédents réalisés dans nos laboratoires[64] que l'on pouvait stabiliser un radical ménasemiquinone dans ForCE1 et que l'intensité du signal RPE associé augmente quand on ajoute du formiate à un échantillon oxydé à l'air[64], ce qui montre que la quinone reçoit les électrons issus de l'oxydation du formiate. En dépit d'incertitudes sur l'orientation exacte de la quinone dans la cavité[65] (Figure 31A et B), la stœchiométrie de liaison de la quinone au complexe et la détection d'un signal radicalaire par spectroscopie RPE font de ce système un cas d'étude pour déterminer l'orientation et l'environnement immédiat de l'intermédiaire catalytique, la semiquinone.

Des titrages potentiométriques de l'échantillon suivis par RPE en mode continu (Figure 31C) ont permis de déterminer le potentiel moyen (E_m) de la transition entre la MK7 oxydée et la MK7 réduite à pH 6 (-66 mV) et à pH 7.5 (-156 mV)[64]. Les potentiels des deux transitions, quinone/semiquinone et semiquinone/quinol, varient de -60 mV par unité de pH, ce qui signifie que chaque transfert d'électron est couplé au transfert d'un proton, indiquant que la

semiquinone est sous forme monoprotonée neutre. Enfin, la différence de constante de fixation à l'enzyme entre la quinone oxydée et la quinone réduite est calculée à partir de la différence des potentiels moyens de la quinone liée à la protéine et libre selon $E_m(lié) - E_m(libre) = -55\ mV \propto \ln(\frac{K_{MKH_2}}{K_{MK}})$, où E_m(lié) et E_m(libre) sont les potentiels moyens de la MK7 liée à la protéine et libre (dans le pool de quinones) respectivement, et K_{MKH2} et K_{MK} sont les constantes de liaison des quinones à l'enzyme pour des MK7 réduites et oxydées respectivement. Ce résultat montre que la quinone sous sa forme oxydée est 80 fois plus affine pour ForCE1 que sous sa forme réduite[64]. Le modèle le plus vraisemblable est que le complexe ForCE1 fasse partie de la chaîne respiratoire de la bactérie en interagissant de manière périphérique avec la membrane et en connexion avec le pool des quinones. La quinone oxydée est réduite dans le site de fixation par les électrons issus de l'oxydation du formiate, puis rejoint la membrane pour alimenter le reste de la chaine respiratoire de la bactérie. Cependant, la quinone est co-purifiée dans des proportions stœchiométriques avec le complexe à l'issue de multiples étapes de lavage, traduisant une liaison suffisamment forte de la quinone à l'enzyme. Ajouté à la position singulière qu'occupe la quinone à 50 Å de la membrane, ces observations conduisent à interroger le caractère échangeable de la quinone au site Q : s'échange-t-elle avec le pool de quinones ou est-elle résidente ?

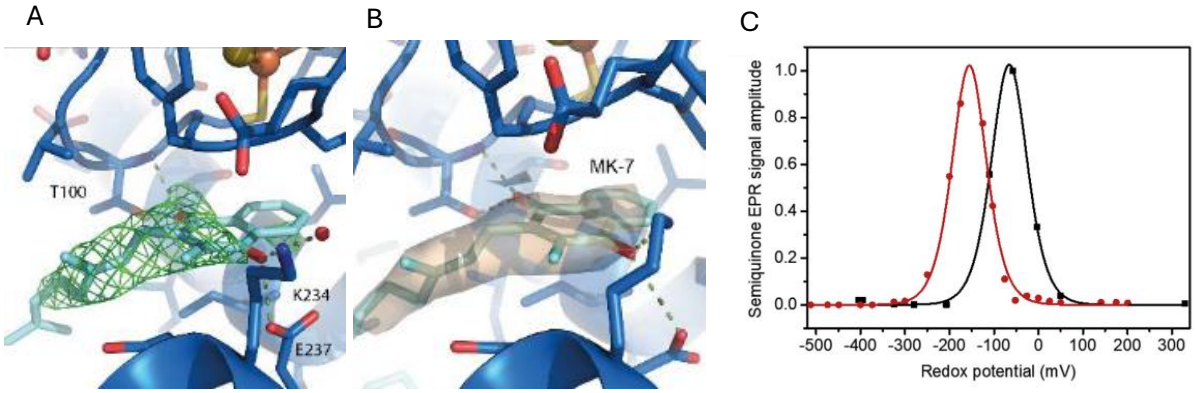


***Figure 31**. Structure du site de fixation de la quinone de ForCE1 résolue par cristallographie au rayons X (**A**) et cryo-EM (**B**). La carte de densité électronique est en grille verte et la carte des potentiels de coulomb en surface orange transparente. Extrait de[65]. **C**. Courbe de titrage potentiométrique suivi par spectroscopie RPE du radical stabilisé dans ForCE1 à pH 6 (noir) et pH 7.5 (rouge). Conditions expérimentales : 50 K, 10 mW, 10 G (pH 6), 5 G (pH 7.5). Extrait de[64]*

Les objectifs de la thèse

Au moment où je suis arrivé en thèse, ForCE1 avait déjà fait l'objet d'une caractérisation biochimique et par spectroscopie RPE[64,67]. Les structures cristallographique et cryo-em ont été disponibles, et il a été démontré que l'enzyme fait partie de la chaîne respiratoire aérobie de *Bacillus subtilis*, couplant l'oxydation du formiate à la réduction des quinones[65]. ForCE1 s'est révélée être un cas d'étude unique en raison de son organisation structurale, de la substitution du résidu His (jusqu'alors supposé conservé) au site actif par une Gln, ainsi que de l'absence de détection d'activité de réduction du CO_2.

ForCE1 offrait alors l'opportunité de devenir un nouveau modèle d'étude dans deux thématiques distinctes. La première concerne le mécanisme réactionnel des FDHs, encore mal compris, auquel l'enzyme pourrait apporter un éclairage nouveau. La seconde porte sur l'étude de la connexion du complexe à la chaîne respiratoire via les quinones.

Les résultats présentés dans le manuscrit sont organisés selon ces deux thématiques principales, réparties en deux chapitres :

Chapitre 1 : Le mécanisme catalytique au site actif à Mo/W chez les FDHs

- Quels sont les chemins d'accès des substrats/produits au site actif chez les FDHs ? Ces chemins sont-ils distincts et conservés ?
- Quels sont les résidus clés qui déterminent les propriétés catalytiques de ces enzymes ?
- Comment caractériser l'espèce Mo(V) de ForCE1 au niveau structural ?
- Quel est l'impact du variant Q392H, où la Gln392 du site actif est substituée par le résidu His conservé dans les autres FDHs caractérisées ?

Chapitre 2 : Le mécanisme d'interaction du complexe ForCE avec les quinones

- Comment l'interaction du complexe avec la membrane joue-t-elle un rôle crucial dans le processus d'échange des quinones ?
- Quel est le mode d'interaction de l'intermédiaire catalytique semiquinone dans le complexe ?

Matériel et méthodes

I) Cultures de *Bacillus subtilis*

Les souches de *Bacillus subtilis* 168 utilisées au cours de la thèse pour permettre la surexpression de l'opéron *forCE*1 sont la souche 4088 pour la version sauvage (*B. subtilis* 168 *tprC*2, *amy*E::pSHP1-6his*yjg*CD) et la souche xxxx pour la version dépourvue du domaine HMP (*B. subtilis* 168 *tprC*2, *amy*E::pSHP1-6his*yjg*CDdeltaHMP). Ces souches permettent la surproduction du complexe ForCE1 avec une étiquette 6 histidines à l'extrémité N-terminale de la sous-unité catalytique ForC1. La construction est placée sous le contrôle d'un promoteur inductible au xylose au site *amy*E[1]. Mes travaux ont conduit à l'utilisation de trois milieux de culture distincts : un milieu riche, LB, et deux milieux contrôlés. Les milieux CE et M9 ont été spécifiquement utilisés pour contrôler et assurer la production du complexe ForCE1 marqué isotopiquement avec de l'azote 15. Les compositions des milieux utilisés sont données dans l'Annexe.

La souche d'*Escherichia coli* MG1655 a été utilisée pour assurer la production de vésicules de membrane interne. Elle a été cultivée en aérobiose dans du milieu LB.

1) Cultures de *B. subtilis* en milieux LB et CE

A partir de plusieurs colonies isolées sur une boite de pétri, un tube contenant une dizaine de ml de milieu LB est ensemencé et incubé à 37°C sur la nuit. Les milieux de culture (LB ou CE) sont ensemencés avec la préculture à une densité optique (DO) initiale de 0,05. La culture est réalisée à 37°C. Quand la DO atteint 0.4, l'expression de l'opéron est induite par l'addition de xylose (9 g/L final pour les cultures en LB et 18 g/L final pour les cultures en CE). Lorsque la culture atteint la phase stationnaire, les bactéries sont récoltées par centrifugation (20 minutes à 8000 rpm et à 4°C) puis lavées dans du tampon A (composition donnée en Annexe). Les cellules sont alors conservées à -70°C.

2) Cultures de *B. subtilis* en milieu M9

Pour prendre en compte le risque que la biomasse finale soit plus faible en milieu M9 que pour les autres milieux, donc afin de diminuer la proportion de matériel non marqué dans la culture finale, la préculture LB de jour est diluée au 10ème dans une préculture en milieu M9 de nuit. Le milieu de culture M9 est ensemencé à DO 0.05. Quand la DO atteint 0.4, l'expression de l'opéron est induite avec 18 g/L final de xylose. Les bactéries sont récoltées lorsque la culture a atteint la phase stationnaire. L'unique source d'azote 15 introduite dans le milieu est du NH_4Cl.

II) Purification de ForCE1

Les bactéries récoltées sont remises en suspension dans du tampon A, traitées avec un cocktail d'inhibiteurs de protéases, du lysozyme à 1 mg/mL final par culot et de la DNAse, puis incubées pendant 35 minutes à 37°C. Ce traitement permet ainsi de fragiliser la paroi bactérienne et de faciliter la casse à l'étape suivante. Elles sont ensuite cassées par l'utilisation

de la presse de French à 1 bar et centrifugées (40 minutes à 40000 rpm et à 4°C). Le surnageant correspondant à la fraction soluble est filtré (cut-off 0.45 µm) et chargé sur des colonnes d'affinité Ni-NTA (HisTrap) disposées sur un appareil de purification FPLC-Akta maintenu à 4°C. Puis, les colonnes sont lavées dans du tampon A et 50 mM d'imidazole, ensuite l'enzyme est éluée avec 500 mM d'imidazole. Le tampon B est échangé avec du tampon D2 (composition en Annexe) par plusieurs cycles de centrifugation avec des Amicon ultra (cut-off 100 kDa) avant conservation de l'échantillon à -70°C. Le choix du tampon D2 est justifié par son pH 6, auquel l'enzyme est le plus stable, la présence de nitrate qui permet de protéger l'enzyme de l'oxygène et de glycérol qui est un cryo-protecteur. Pour les échantillons de ForCE1 en solvant deutéré, l'échange de tampon est réalisé avec du D2 deutéré.

III) Tests d'activité

Le test d'activité formiate : benzyl viologen (BV) oxydoréductase est réalisé en boite à gants (~1ppm O_2). L'oxydation du formiate par le complexe enzymatique est couplée à la réduction du BV observée à 600 nm avec un spectromètre AvaSpec-2048L à température ambiante. Pour cela, 5 µL d'échantillon sont mélangés dans 2 ml de tampon CHES 25mM pH 10 contenant 17.5 mM de BV et 50 mM de formiate de sodium sous agitation magnétique. Le pH du tampon est celui pour lequel le k_{cat} de l'enzyme est maximal[1]. Une unité d'activité est définie comme étant la quantité de complexe ForCE1 capable d'oxyder 1 µmole de formiate par minute et par milligramme de complexe.

Les tests d'activité de réduction du CO_2 sont réalisés en boite à gants. 5 µL d'échantillon de ForCE1 sont mélangés dans 2 mL de tampon (CHES pH 10, ou MOPS pH 7.5 ou D2 pH 6) contenant 8 µM d'éthyl viologen réduit au dithionite. Le CO_2 est ajouté sous forme de bicarbonate. L'oxydation de l'éthyl viologen est observée à 600 nm.

IV) Détermination de la concentration de l'enzyme

La concentration de l'échantillon en ForCE1 après purification est déterminée par un dosage de Lowry. La gamme étalon est réalisée en utilisant une solution d'albumine de sérum bovin à 1 mg/mL ajoutée à un mélange de Solution A Lowry (2.94 mL par échantillon étalon) et de Solution B Lowry (0.06 mL par échantillon étalon). En parallèle, les échantillons de ForCE1 sont préparés en ajoutant l'enzyme purifiée dans la même solution mélange A+B. Puis la gamme étalon et les échantillons sont placés 10 minutes à l'abri de la lumière. Ensuite, 300 µL de réactif de Folin-Cioccalteu dilué au demi sont ajoutés, et le tout est placé à l'abri de la lumière pendant 35 minutes. Le dosage est réalisé à 750 nm. La quantité de ForCE1 est déterminée en rapportant l'absorbance des échantillons sur la courbe étalon réalisée avec la gamme étalon.

V) Test d'échangeabilité de la quinone

1) Préparation des vésicules de membranes d'*E. coli*

Les culots d'une culture d'*E. coli* (souche MG1655) sont remis en suspendu dans du tampon MOPS (100 mM pH 7.5), puis traitées avec un cocktail d'inhibiteurs de protéases, du lysozyme à 1 mg/mL final par culot et de la DNAse, puis incubées pendant 35 minutes à 37°C. Les bactéries sont cassées à la presse de French. Les gros débris sont éliminés par une centrifugation à 4°C, 15000 rpm pendant 10 minutes. Le surnageant est ultra centrifugé à 45000 rpm à 4°C pendant 1 heure. Le culot est remis en suspension dans du tampon MOPS et centrifugé à nouveau dans les mêmes conditions. Le culot final est remis en suspension

dans 2 mL de tampon MOPS à l'aide d'un homogénéiseur de Potter. On obtient une solution épaisse de vésicules de membranes inversées.

2) Protocole de test

En boîte à gants, 100 µL de ForCE1 à 100 µM sont incubés sous agitation magnétique dans 400 µL de solution de vésicules. Dans les échantillons contrôle, j'ajoute 50 µL de tampon MOPS et dans les échantillons tests, j'ajoute 50 µL de formiate à 100 mM. Après 30 min, les échantillons sont sortis de la boîte à gant, dilués 5 fois dans du tampon MOPS, équilibrés pour être ultra centrifugés à 100000 rpm pendant 30 minutes à 4°C. Le surnageant est chargé sur une colonne d'affinité Ni-NTA, lavé avec du tampon A, puis ForCE1 est éluée avec du tampon B.

Le contenu en quinone des échantillons de ForCE1 est analysé par HPLC-ECD[64]. Les mesures sont réalisées par notre collaborateur Fabien Pierrel (TIMC, Grenoble).

VI) Titrages d'oxydoréduction

1) Principe de l'expérience

Les titrages sont réalisés en boite à gants, dans une cellule de titrage avec agitation magnétique. Le potentiel redox des échantillons est ajusté par ajout progressif de solutions de hydrosulfite de sodium (réducteur) ou de ferricyanure de potassium (oxydant). A l'échantillon sont ajoutés des médiateurs à une concentration de 10 µM finale afin d'assurer un transfert électronique efficace entre l'électrode combinée et l'oxydant ou le réducteur. Les médiateurs utilisés pour couvrir la plage de potentiel souhaitée sont : Benzoquinone (180 mV), Naphtoquinone (145 mV), Phénazine méthosulfate (80 mV), Phénazine éthosulfate (50 mV), Bleu de méthylène (11 mV), Résorufine (-51 mV), Indigo carmin (-125 mV), Anthraquinone 2,6-disulfonate (-184 mV).

Le potentiel redox des échantillons de ForCE1 est mesuré à température ambiante avec une microélectrode combinée Pt-Ag/AgCl/KCl (3M). L'électrode est calibrée, à une température donnée, dans un tampon redox (220 mV à 25°C pH 7) en mesurant la différence entre le potentiel théorique du tampon par rapport à l'électrode standard à hydrogène (ESH) et le potentiel lu par l'électrode. La mesure du potentiel redox de l'échantillon de ForCE1 vs ESH est effectuée alors en ajoutant la valeur de la correction au potentiel lu.

Les échantillons préparés au potentiel souhaité sont congelés dans des tubes RPE en boite à gants dans de l'éthanol refroidis avec de l'azote liquide, puis stockés dans l'azote liquide.

2) La loi de Nernst

La loi de Nernst lie, pour un couple redox, le potentiel électrochimique E à la quantité d'espèces oxydée [Ox] et réduite [Red] :

$$E = E^0 + \frac{RT}{nF}\ln\left(\frac{[Ox]}{[Red]}\right) \quad (Equation\ 1)$$

E^0 est le potentiel standard du couple redox, R la constante des gaz parfaits, T la température absolue, n le nombre d'électrons transférés et F la constante de Faraday. On peut l'approximer en :

$$E = E^0 + \frac{0.06}{n}\log\left(\frac{[Ox]}{[Red]}\right) \quad (Equation\ 2)$$

3) Titrage suivi par RPE

On calcule le potentiel standard des espèces titrées en analysant l'évolution de l'amplitude des signaux RPE d'intérêt des échantillons congelés en boîte à gants. On obtient ainsi un relevé d'amplitudes pour un même signal en fonction du potentiel ambiant. En ajustant ces points à une loi de Nernst, on peut déterminer le potentiel standard de l'espèce étudiée.

Dans ce travail, j'ai titré des signaux de centres [4Fe-4S] caractérisés par un transfert à 1 électron et dont seule l'espèce réduite est visible en RPE. Donc, à partir de l'Equation 2, on obtient :

$$[Red] = \frac{1}{1 + 10^{\frac{E-E^0}{0.06}}} \quad (Equation\ 3)$$

Et puisque [Red] est proportionnelle à l'amplitude RPE A, cette relation devient :

$$A = \frac{A_{max}}{1 + 10^{\frac{E-E^0}{0.06}}} \quad (Equation\ 4)$$

Avec A_{max} l'amplitude RPE maximale du signal étudié. C'est cette équation qui est ajustée aux relevés d'amplitudes.

J'ai aussi titré des signaux de quinone et de Mo, caractérisés par deux transitions électroniques (Ox + e^- ⇄ SR + e^- ⇄ Red) et dont seule l'espèce semiréduite SR (semiquinone ou Mo(V)) est visible en RPE. A partir de l'Equation 2, pour les deux transitions, on obtient :

$$[SR] = \frac{1}{1 + 10^{\frac{E-E_1^0}{0.06}} + 10^{\frac{E_2^0-E}{0.06}}} \quad (Equation\ 5)$$

E^0_1 est le potentiel standard de la transition Ox + e^- ⇄ SR et E^0_2 le potentiel standard pour la transition SR + e^- ⇄ Red. [SR] étant proportionnelle à l'amplitude RPE A, cette équation s'écrit également :

$$A = \frac{A_{max}}{1 + 10^{\frac{E-E_1^0}{0.06}} + 10^{\frac{E_2^0-E}{0.06}}} \quad (Equation\ 6)$$

C'est cette équation qui est ajustée aux relevés d'amplitudes.

VII) La spectroscopie par résonance paramagnétique électronique (RPE) en onde continue

La RPE permet de détecter des centres paramagnétiques, c'est-à-dire des centres qui possèdent un ou plusieurs électrons non appariés. Ces centres peuvent être des ions de métaux de transition comme le Fe(III), le Cu(II) ou le Mo(V), ou des radicaux organiques ou inorganiques. En effet, les propriétés magnétiques des électrons célibataires des centres paramagnétiques dépendent des caractéristiques de l'objet sondé. En présence d'un champ

magnétique externe, les niveaux d'énergie accessibles au spin de l'électron sont modélisés par le hamiltonien de spin :

$$\widehat{H} = \widehat{H}_{ZE} + \widehat{H}_{ZN} + \widehat{H}_{HF} + \widehat{H}_{QN} + \widehat{H}_{NN} + \widehat{H}_{ZFS} \quad (Equation\ 6)$$

Il est constitué d'une somme de plusieurs hamiltoniens qui décrivent l'interaction Zeeman électronique ($\widehat{H}_{ZE}$), l'interaction Zeeman nucléaire ($\widehat{H}_{ZN}$), l'interaction hyperfine ($\widehat{H}_{HF}$), l'interaction quadrupolaire nucléaire ($\widehat{H}_{QN}$), l'interaction entre paires de spins nucléaires ($\widehat{H}_{NN}$) et le terme d'éclatement en champ nul (zero field splitting) ($\widehat{H}_{ZFS}$).

Dans la suite je vais détailler un peu plus les termes $\widehat{H}_{ZE}$, $\widehat{H}_{ZN}$, $\widehat{H}_{HF}$, $\widehat{H}_{QN}$.

1) Interaction Zeeman électronique

Un électron célibataire d'un centre paramagnétique possède un moment magnétique intrinsèque lié au spin et un moment magnétique orbitalaire lié au moment cinétique orbitalaire. Le moment magnétique total est :

$$\vec{\mu} = -\tilde{g}.\beta_e.\vec{S} \quad (Equation\ 7)$$

$\tilde{g} = g_e\mathbf{1} + 2\lambda\Lambda$, avec g_e le facteur g de l'électron libre, **1** la matrice unité, λ la constante de couplage spin-orbite et Λ un tenseur symétrique qui décrit les interactions entre l'état fondamental et les états excités. β_e est le magnéton de Bohr électronique et $\vec{S}$ est le moment cinétique de spin.

L'effet Zeeman électronique décrit la levée de dégénérescence des niveaux d'énergies de l'électron dans un champ magnétique. Les énergies possibles pour l'électron dans le champ magnétique $\vec{B}$ sont décrites par le hamiltonien $\widehat{H}_{ZE}$:

$$\widehat{H}_{ZE} = \beta_e.\vec{S}.\tilde{g}.\vec{B} \quad (Equation\ 8)$$

Dans son référentiel propre, le tenseur $\tilde{g}$ peut être représenté sous la forme d'une matrice diagonale de valeur propres g_{xx}, g_{yy} et g_{zz} :

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

Les valeurs propres sont aussi appelées g_1, g_2 et g_3 ou g_{max}, g_{moy} et g_{min} et sont liées aux axes moléculaires du centre paramagnétique.

La projection de $\vec{S}$ selon l'axe du champ magnétique ne peut prendre que deux valeurs +1/2 ou -1/2 et les énergies possibles sont :

$$E_{\pm} = \pm\frac{1}{2}.\beta_e.\tilde{g}.B \quad (Equation\ 9)$$

$$\Delta E = \beta_e.\tilde{g}.B \quad (Equation\ 10)$$

Le principe de la RPE en onde continue est de mesurer l'écart entre les niveaux d'énergie électronique. Dans ce but, le système est irradié par des ondes électromagnétiques, généralement dans le domaine des micro-ondes de fréquence fixe et le champ magnétique appliqué au système est balayé. Les transitions de spin électronique sont possibles lorsque l'énergie $h\nu$ des micro-ondes vérifie $h\nu = \Delta E$ (Figure 32A). Donc, si le tenseur g n'est pas isotrope, le spin de l'électron peut effectuer des transitions à des valeurs de champ magnétique différents (Equation 10) selon l'orientation du centre paramagnétique par rapport au champ appliqué. Ainsi, dans le cas où les centres paramagnétiques sont en solution gelée (ce qui est le cas dans cette thèse), la distribution de leur orientation par rapport à la direction du champ magnétique appliqué est aléatoire. Donc la condition de résonance des spins des électrons va être distribuée sur une certaine plage de champ magnétique, qui se traduira sur un spectre par différentes raies (Figure 32B).

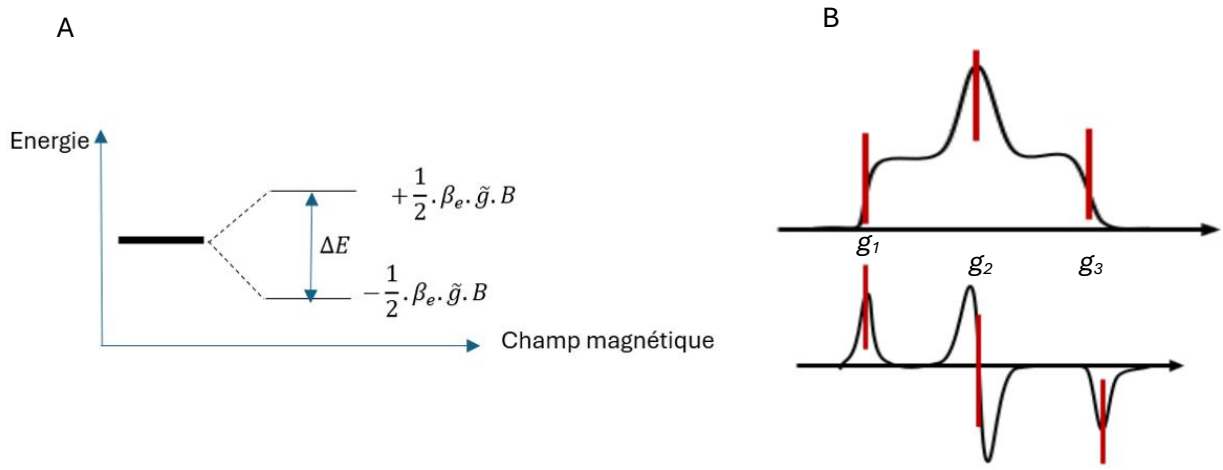


***Figure 32**. Condition de résonance RPE dans le cas d'un spin ½ avec un balayage du champ magnétique. **A**. Niveaux d'énergies associés au spin électronique dans un champ magnétique appliqué. **B**. Spectre RPE attendu pour un tenseur g rhombique. Haut. Spectre d'absorption. Bas, première dérivée du spectre d'absorption (voir partie 5).*

2) Interaction Zeeman nucléaire.

Cette interaction entraine la levée de dégénérescence des niveaux d'énergies du spin nucléaire dans un champ magnétique. Les énergies possibles pour le spin du noyau dans le champ magnétique $\vec{B}$ sont décrites par le hamiltonien $\hat{H}_{ZN}$:

$$\hat{H}_{ZN} = -g_n.\beta_n.\vec{I}.\vec{B} \quad (Equation\ 11)$$

g_n est le facteur g nucléaire du noyau considéré, β_n le magnéton de Bohr nucléaire, $\vec{I}$ le spin nucléaire.

3) Interaction hyperfine

Elle décrit l'interaction entre un spin électronique et les spins nucléaires dans son environnement immédiat (typiquement jusqu'à 4 ou 5 Å) et est donnée par :

$$\widehat{H}_{HF} = \sum_{i=1}^{n} \vec{S}\,\widetilde{A}_{\iota}\overrightarrow{I_{\iota}} = \widehat{H}_{F} + \widehat{H}_{DD} \quad (Equation\ 12)$$

$\widetilde{A_{\iota}}$ est le tenseur de couplage hyperfin entre le spin $\vec{S}$ et le spin $\overrightarrow{I_{\iota}}$ du i^{ème} noyau. On peut séparer l'interaction en deux contributions : une partie isotrope qui s'appelle l'interaction de contact de Fermi modélisée par $\widehat{H}_{F}$ et une partie dipolaire qui est l'interaction dipôle électronique-dipôle nucléaire décrite par $\widehat{H}_{DD}$.

$$\widehat{H}_{F} = A_{iso}.\vec{S}.\vec{I} \quad (Equation\ 13)$$

A_{iso} (MHz) est la constante de couplage isotrope qui traduit le fait qu'un électron peut avoir une probabilité de présence non nulle à la position d'un noyau.

$$\widehat{H}_{DD} = \vec{S}.\tilde{T}.\vec{I} \quad (Equation\ 14)$$

où $\tilde{T}$ est le tenseur de couplage dipolaire. Dans le cadre de l'approximation des dipôles ponctuels, le tenseur $\tilde{T}$ prend la forme simplifiée suivante :

$$\tilde{T} = \begin{pmatrix} -T & 0 & 0 \\ 0 & -T & 0 \\ 0 & 0 & 2T \end{pmatrix} \quad (Equation\ 15)$$

où T (MHz) est la constante de couplage dipolaire qui décrit l'anisotropie du couplage.

Pour un tenseur hyperfin axial, on a donc :

$$\tilde{A} = \begin{pmatrix} A_{iso} - T & 0 & 0 \\ 0 & A_{iso} - T & 0 \\ 0 & 0 & A_{iso} + 2T \end{pmatrix} \quad (Equation\ 16)$$

L'interaction hyperfine d'un électron avec un noyau de spin I conduit à une levée de dégénérescence supplémentaire qui se traduit sur un spectre RPE en onde continue par l'éclatement de chaque raie en 2I+1 raies.

4) Interaction quadrupolaire nucléaire

Elle n'est possible que pour les noyaux de spin supérieur à ½ et représente l'interaction entre le moment quadrupolaire Q du noyau (induit par la répartition anisotrope des charges du noyau) et le gradient de champ électrique créé au niveau du noyau par les charges environnantes.

$$\widehat{H}_{QN} = \vec{I}.\tilde{Q}.\vec{I} \quad (Equation\ 17)$$

Les éléments du tenseur quadrupolaire nucléaire $\tilde{Q}$ dépendent du moment quadrupolaire Q du noyau (valeur intrinsèque à la nature de chaque noyau). On peut aussi écrire :

$$\widehat{H}_{QN} = \kappa\left(3I_z^2 - I^2 + \eta\left(I_x^2 - I_y^2\right)\right) \quad (Equation\ 18)$$

Avec $\kappa = \frac{e^2.q.Q}{4I.(2I-1).h}$ la constante de couplage quadrupolaire (en Hz, généralement exprimée en kHz ou MHz) et $\eta = \frac{Q_{xx}-Q_{yy}}{Q_{zz}}$ le paramètre d'asymétrie qui mesure la déviation du gradient de champ électrique de la symétrie axiale.

La Figure 33 résume les contributions de ces quatre interactions aux niveaux d'énergie du spin électronique.

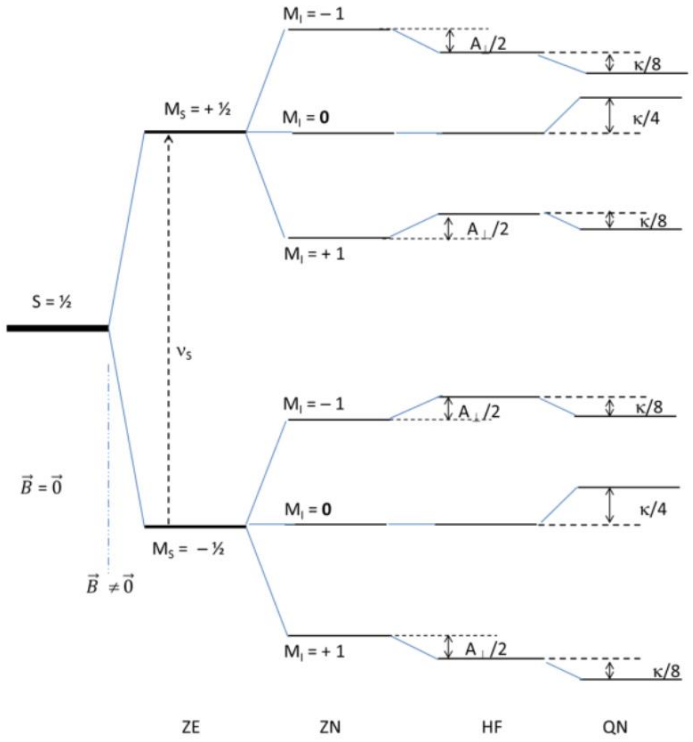


***Figure 33**. Diagramme d'énergie des interactions entre un électron S=1/2 et un noyau I=1. ν_s est la fréquence de Larmor de l'électron. $A^{\perp}$ est la constante de couplage hyperfin et κ la constante de couplage quadripolaire. M_s et M_I sont les valeurs que peuvent prendre $\vec{S}$ et $\vec{I}$. Les tenseurs hyperfins et quadripolaires sont supposés colinéaires et de symétrie axiale avec $|H_{NZ}| >> |H_{HF}| >> |H_{QN}|$. Extrait de [70].*

5) Le spectromètre RPE en onde continue

Les spectres RPE en onde continue ont été enregistrés sur un spectromètre Bruker EleXsys E500 en bande X (fréquence micro-onde de l'ordre de 9.6 GHz) avec une cavité rectangulaire ER4012ST équipée d'un cryostat à flux d'Hélium ESR900 (Oxford Instruments). Le dispositif comprend un bras de référence qui permet de régler le gain du récepteur, la phase du signal et le courant de polarisation de la diode de détection (Figure 34). De façon schématique, les micro-ondes produites par une source sont dirigées dans une cavité résonante qui contient l'échantillon. Quand la condition de résonance est atteinte, l'échantillon absorbe une partie des ondes et celles qui sont réfléchies par la cavité sont dirigées grâce à un circulateur vers une diode de détection. Le champ magnétique est généré par un électroaimant. La présence de bobines de modulation qui créent un champ magnétique sinusoïdal qui s'ajoute au champ magnétique principal permet de mesurer la dérivée première de l'absorption par rapport au

champ magnétique appliqué. La fréquence du champ oscillant est fixée dans ce travail à 100 kHz.

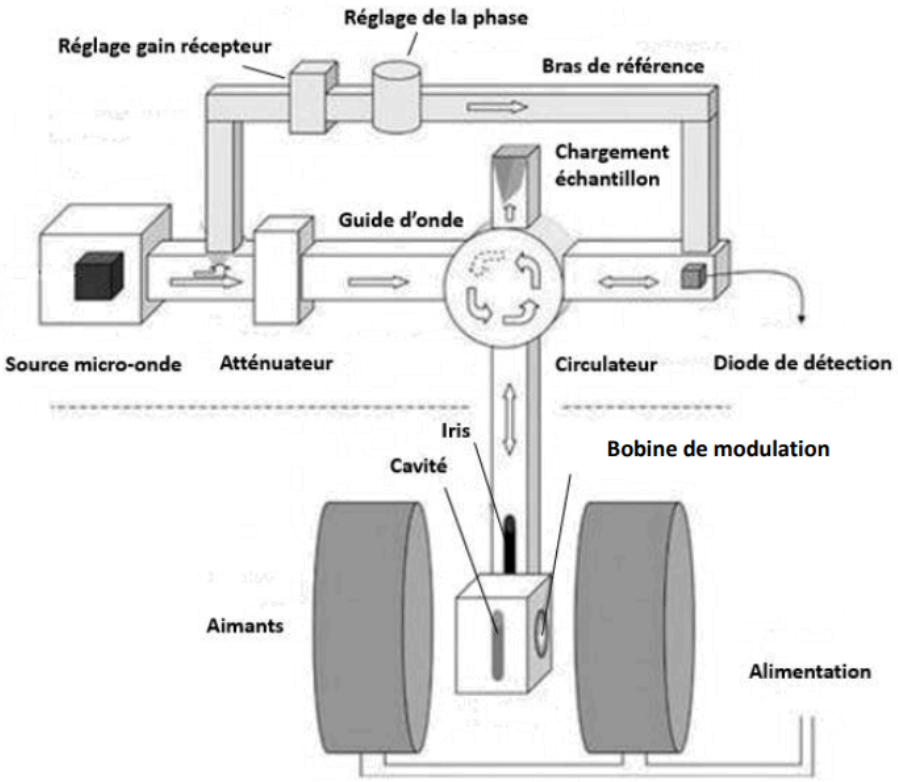


***Figure 34**. Schéma simplifié d'un spectromètre RPE opérant en bande X. Extrait de [67].*

6) Les paramètres expérimentaux

Les paramètres expérimentaux que j'ai ajustés pour l'acquisition des spectres sont la température, la puissance microonde, l'amplitude de modulation et le nombre d'accumulations. L'ajustement de ces paramètres permet d'optimiser le rapport signal sur bruit et le gain du récepteur permet d'amplifier le signal mesuré (et le bruit avec).

a) Température et puissance

Les moments magnétiques électroniques excités des centres paramagnétiques ont des temps de relaxation qui dépendent de la nature du centre. Typiquement, des centre fer soufre (FeS) relaxent plus rapidement que les sites actifs à Mo ou que les quinones. Aussi, selon la loi de Curie, l'intensité d'un signal RPE pour une espèce de spin S=1/2 est inversement proportionnelle à la température. Tout ceci implique que certains centres aux temps de relaxation courts ne seront visibles qu'à basse température (typiquement en dessous de 50 K pour la plupart des centres FeS) alors que d'autres avec des temps de relaxation plus longs pourront être visibles à plus haute température, voire à température ambiante.

Pour les échantillons de ForCE1 je me suis concentré sur l'étude du site actif à Mo et de la quinone. Par exemple, le choix d'utiliser une température de mesure de 50 K a permis d'effacer les signaux des centres FeS (élargis par relaxation) au profit de ceux des centres paramagnétiques des deux sites actifs.

Il faut aussi ajuster la puissance des micro-ondes : si la puissance est trop grande, les populations de spins s'égalisent entre le niveau fondamental et celui excité, il y a alors autant de photons absorbés que de photons émis, ce qui conduit à la disparition du signal RPE dont l'intensité est en effet proportionnelle à la différence de population entre les deux niveaux. C'est le phénomène de saturation. Les centres qui relaxent lentement seront saturés à plus faible puissance comparé aux centres qui relaxent rapidement. En général, les spectres sont enregistrés dans des conditions de puissance non saturantes définies par $A \propto \sqrt{P}$ où A est l'amplitude du signal RPE et P la puissance micro-onde utilisée pour l'expérience.

b) L'amplitude de la modulation

L'amplitude de modulation doit être plus petite que la largeur des raies qu'on veut détecter. Typiquement, un éclatement de raies causé par un couplage hyperfin ne sera pas détecté avec une amplitude de modulation trop grande. Une faible amplitude de la modulation du champ magnétique va donner un signal à l'amplitude plus faible comparé aux signaux acquis avec une modulation plus grande, mais une grande amplitude de modulation peut entrainer une déformation du signal. On dit que le signal est surmodulé. Le rapport signal/bruit plus faible du signal obtenu avec une amplitude de modulation plus petite pourra être augmentée par le nombre d'accumulations du spectre.

7) Simulation des spectres

Les spectre RPE en onde continue sont simulés en utilisant la fonction « pepper » de Easyspin 5.2.36[79]. Dans cette thèse, j'ai simulé des systèmes de spin ½ correspondant au site actif à Mo(V) et à la semiquinone de ForCE1. Les largeurs de raies sont données en MHz et sont simulées en utilisant la fonction HStrain donnés en MHz, qui simule des couplages hyperfins non résolus. Les couplages hyperfins résolus avec un proton sont simulés en donnant les valeurs principales du tenseur hyperfin qu'on suppose être colinéaire avec le tenseur g.

VIII) Introduction à la spectroscopie RPE impulsionnelle

Les interaction hyperfines et quadrupolaires sont riches en informations et permettent de caractériser l'environnement immédiat du centre paramagnétique. La RPE en onde continue ne permet pas toujours de résoudre l'éclatement des raies causé par les interactions hyperfines et quadrupolaires. La caractérisation précise de ces interactions requiert des techniques de RPE à haute résolution.

1) Echo de Hahn

En RPE impulsionnelle, contrairement à la RPE en onde continue, le système est mis hors équilibre par des impulsions électromagnétiques qui entrainent le basculement de l'aimantation macroscopique de l'échantillon dans le référentiel du laboratoire. Le vecteur aimantation macroscopique $\vec{M}$ est défini comme le moment magnétique total par unité de volume :

$$\vec{M} = \frac{1}{V}\sum_{i=1}^{n}\overrightarrow{\mu_i} \qquad (Equation\ 19)$$

A l'équilibre, dans un champ magnétique appliqué $\vec{B}$, $\vec{M}$ est aligné avec $\vec{B}$.

Quand l'échantillon est irradié par une impulsion micro-onde de fréquence satisfaisant la condition de résonance, la durée de l'impulsion et la puissance de l'onde vont définir l'angle de basculement de $\vec{M}$ par rapport à $\vec{B}$: $\frac{g\beta_e B_1 t_p}{\hbar} = \theta$, avec ν la fréquence micro-onde, B_1 le module du champ magnétique de l'onde, t_p la durée de l'impulsion et θ l'angle de basculement de l'aimantation de l'échantillon.

Ainsi on définit :

- les impulsions $\pi/2$ qui vont entrainer un basculement de $\vec{M}$ de 90° par rapport à $\vec{B}$, autrement dit elles permettent l'égalisation des populations sur les niveaux énergétiques dégénérés.

- les impulsions π qui vont entrainer un basculement de $\vec{M}$ de 180° qui correspond à l'inversion des populations de ces niveaux d'énergies.

La génération d'un écho de spin peut être réalisée en irradiant un échantillon par la séquence d'impulsions $\pi/2$, τ, π, τ (Figure 35) où τ est une durée pendant laquelle le système relaxe librement[80]. Les impulsions $\pi/2$ vont exciter des spins qui possèdent des fréquences de Larmor différentes, ce qui conduit à une défocalisation des moments magnétiques microscopiques pendant le temps τ. L'écho de Hahn est le résultat de la refocalisation qui suit l'impulsion π après le temps τ [80]. En général, les échos sont détectés dans des échantillons en phase solide ou solutions gelées parce que les processus de relaxation sont trop rapides en phase liquide pour en détecter un.

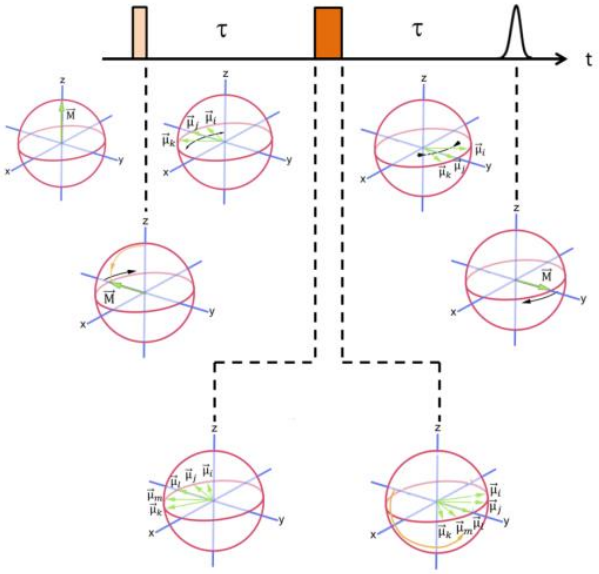


***Figure 35**. Séquence de Hahn décrivant l'évolution de l'aimantation induite par les impulsions. Extrait de [70].*

Une expérience consiste à mesurer l'évolution de l'amplitude de l'écho de spin électronique (l'enveloppe de l'écho) en fonction du temps τ qui est incrémenté. Si l'électron est faiblement couplé à des noyaux, l'enveloppe suit une décroissance exponentielle qui traduit les processus de relaxation irréversibles (Figure 36A). Si l'électron est fortement couplé à un ou plusieurs noyau (I≠0), une modulation de l'amplitude de l'écho (Figure 36B) se superpose à sa décroissance exponentielle. La modulation de l'amplitude de l'écho N(τ) dépend notamment des fréquences de transitions nucléaires et de la constante de couplage dipolaire (qui implique

qu'une condition indispensable à la modulation de l'écho est que l'interaction électron-noyau doit être anisotrope). C'est ce qu'on appelle l'ESEEM (electron spin echo envelope modulation en anglais).

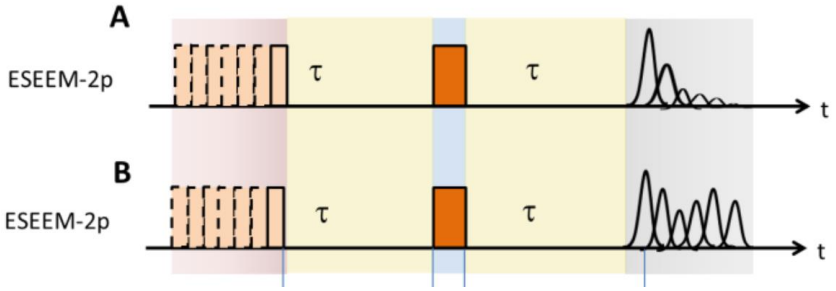


***Figure 36**. Représentation schématique d'une expérience d'ESEEM à 2 impulsions dans le cas d'un électron faiblement couplé à des noyaux magnétique (**A**) ou fortement couplé à des noyaux magnétiques (**B**). Extrait de [70].*

2) Introduction à la spectroscopie HYSCORE

La spectroscopie HYSCORE (hyperfine sublevel correlation, en anglais)[81] permet d'obtenir un spectre fréquentiel en deux dimensions. La séquence HYSCORE est constituée d'une impulsion $\pi/2$ qui bascule l'aimantation dans le plan transverse. Après le temps τ, il y a une autre impulsion $\pi/2$ qui génère des cohérences nucléaires qui évoluent dans chaque multiplet électronique pendant le temps t_1. L'impulsion π permet de transférer les cohérences nucléaires d'un multiplet électronique à l'autre. Enfin, après un temps t_2 durant lequel les cohérences nucléaires continuent d'évoluer, une impulsion $\pi/2$ permet de détecter l'écho inversé par l'impulsion π (Figure 37). Dans l'expérience HYSCORE, τ est fixé et la modulation de l'écho est enregistrée en fonction de t_1 et t_2 qui sont incrémentés successivement, ce qui conduit à l'obtention d'un spectre à deux dimensions. Après une transformée de Fourrier bidimensionnelle, on obtient un spectre en fréquence en deux dimensions.

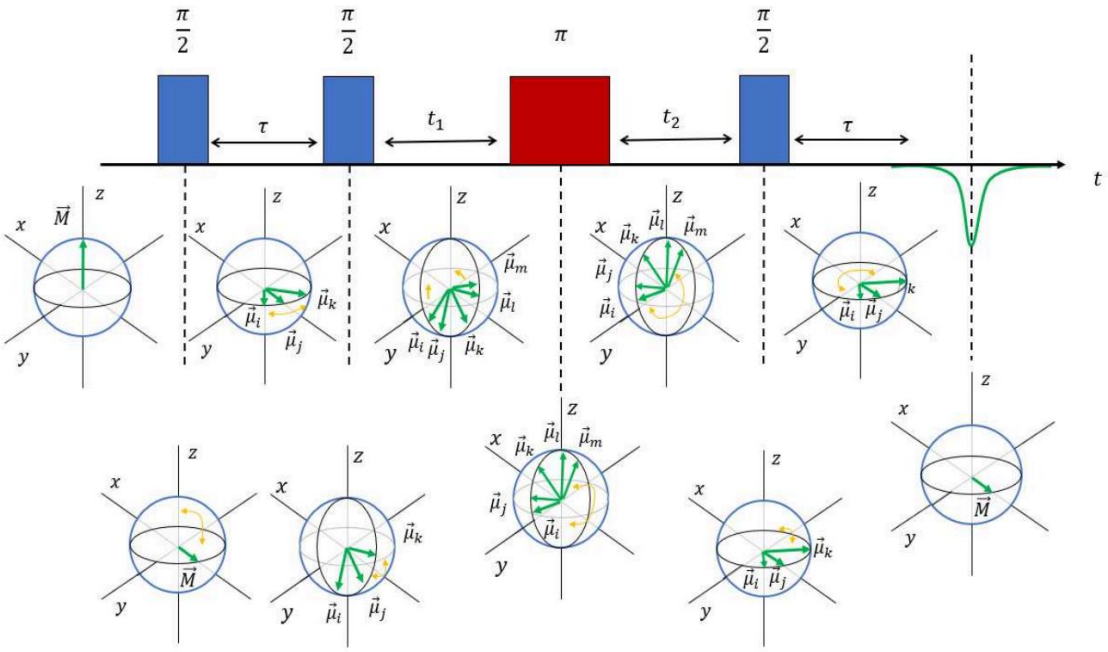


***Figure 37**. La séquence d'impulsion HYSCORE et représentation de l'évolution de l'aimantation de l'échantillon au cours de l'expérience. Extrait de [67].*

Le spectre fréquentiel est constitué de quatre cadrans symétriques par rapport à l'origine et donc deux cadrans suffisent à l'analyse des spectres HYSCORE, (- +) et (+ +) par exemple. Les pics non diagonaux visibles sur le spectre fréquentiel sont des pics de corrélations qui proviennent du transfert de cohérences nucléaires d'un multiplet électronique à l'autre. Je vais détailler un peu plus deux cas de figures : le cas d'un système de spins couplés (S=1/2, I=1/2) et celui d'un système de spins couplés (S=1/2, I=1).

a) Spectroscopie HYSCORE d'un système de spins couplés (S=1/2, I=1/2)

Dans le cas où un spin électronique est couplé à un noyau de spin I=1/2, le spectre en fréquence présente des pics de corrélations hors diagonaux. Pour un couplage faible ($|A_{iso}| < 2\omega_I, \omega_I$ étant la fréquence de Larmor du noyau couplé), ces pics sont aux coordonnées $(\omega_\alpha;\omega_\beta)$ et $(\omega_\beta;\omega_\alpha)$ dans le cadran (+ +), où ω_α et de ω_β sont les fréquences des transitions nucléaires associées aux deux multiplets électroniques (-1/2 et +1/2). L'approximation au premier ordre de $\omega_\alpha = -\frac{A_{iso}}{2} + \omega_i$ et de $\omega_\beta = \frac{A_{iso}}{2} + \omega_i$, et donc la mesure de l'écart en fréquence entre les deux pics de corrélation donne une estimation de la valeur de A_{iso}. Pour un couplage fort ($|A_{iso}| > 2\omega_I$, les pics de corrélations sont dans le cadran (- +) et ont pour coordonnées $(-\omega_\alpha;\omega_\beta)$ et $(-\omega_\beta;\omega_\alpha)$. L'écart en fréquence entre ces pics vaut 2 fois ω_I. Dans le cadran (+ +), des pics peuvent aussi apparaitre aux coordonnées $(\omega_\alpha;\omega_\alpha)$ et $(\omega_\beta;\omega_\beta)$, indiquant un transfert des cohérences nucléaires incomplet du fait d'une impulsion π non idéale. En effet, la forme, la puissance et la phase des impulsions ne sont pas totalement contrôlées, ce qui peut entrainer l'apparition d'artefacts sur un spectre. Par ailleurs, dans le cas d'enzymes en solution aqueuse ou deutérée, l'existence de multiples couplages très faibles entre un spin électronique et plusieurs protons et/ou noyaux de deutérium se traduit par la présence de pics intenses à la fréquence de Larmor de ces noyaux (Figure 38). Le choix

de la valeur du temps τ est important dans ce cas puisqu'il existe des *blind spots* aux fréquences $\nu_n = n/\tau$ (n=0, 1, 2, …), c'est à dire que les signaux à ces fréquences sont supprimés. Cette propriété peut être exploitée en ajustant la valeur de τ de sorte à supprimer spécifiquement les signaux à une fréquence spécifique, par exemple celle correspondant à la fréquence de Larmor d'un noyau. Typiquement, en bande X, une valeur de $\tau = 134\,ns$ supprime le pic à la fréquence de Larmor des protons et une valeur de $\tau = 440\,ns$ supprime le pic à la fréquence de Larmor du deutérium. Dans nos expériences, il est utile de supprimer ces signaux car ils sont intenses et peuvent recouvrir d'autres pics hors de la diagonale.

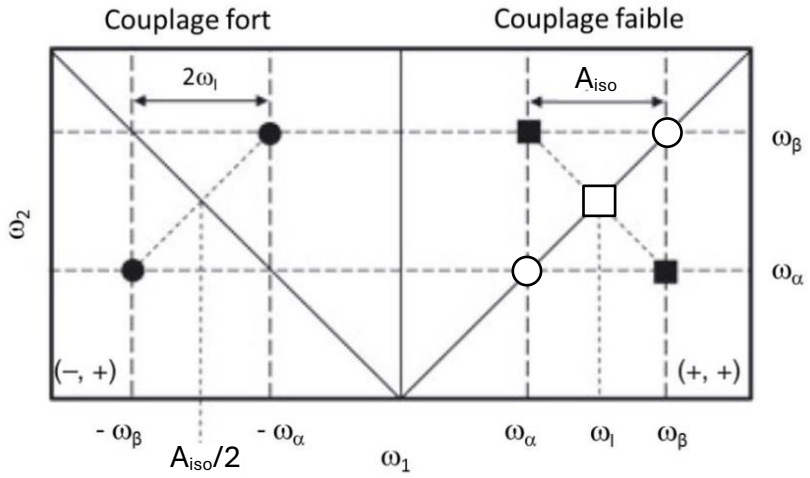


***Figure 38**. Représentation schématique de la position attendue des signaux détectés dans un spectre HYSCORE après transformée de Fourier. Extrait de [70]. Ronds noirs : pics de corrélations pour un couplage fort. Carrés noirs : pics de corrélation pour un couplage faible. Ronds blancs : pics dus à la non-idéalité de l'impulsion π. Carré blanc : pic à la fréquence de Larmor du noyau.*

b) Spectroscopie HYSCORE d'un système de spins couplés (S=1/2, I=1)

Dans le cas d'un spin électronique couplé à un noyau de spin I=1, comme les noyaux de ^{14}N par exemple, il y a trois transitions nucléaires possibles dans chaque multiplet électronique : deux transitions simple quanta, ν_{sq} entre deux niveaux d'énergies successif ($\Delta M_I = \pm 1$) et une transition double quanta, $\nu_{dq\pm}$ ($\Delta M_I = \pm 2$) (Figure 39). Il faut prendre en compte l'interaction quadrupolaire dans ces transitions puisqu'elle peut modifier significativement les énergies des niveaux hyperfins. Si $|A_{iso} - 2\nu i| > \frac{4\kappa}{3}$, le spectre présentera deux pics induits par les transitions double quanta (parce qu'elles sont faiblement anisotrope, donc plus facilement détectables) aux coordonnées ($\nu_{dq+}; \nu_{dq-}$) et (ν_{dq-} ; ν_{dq+}). Ce sera le cas si A_{iso} est grand ou petit devant $2\nu i$, donc pour des couplages forts et faibles.

$$\nu_{dq\pm} = 2({\nu_{ef\pm}}^2 + c)^{1/2} \qquad (Equation\ 20)$$

Avec $\nu_{ef\pm} = |\nu_I \pm A_{iso}/2|$, ν_I la fréquence de Larmor du noyau et $c = \kappa^2(3 + \eta^2)$.

Dans le cas d'un couplage d'intensité intermédiaire, où $A_{iso} \sim 2\nu_I$, les interactions hyperfines et Zeeman nucléaires se compensent dans l'un des multiplets électroniques (Figure 39). C'est la condition de compensation qui donne accès aux fréquences quadrupolaires nucléaires pures. En effet, sur le cadran (+ +) du spectre, les pics de corrélations entre les transitions $\nu_0 = 2\kappa\eta$,

$\nu_- = \kappa(3-\eta)$, $\nu_+ = \kappa(3+\eta)$ et la transition ν_{dq} de l'autre multiplet apparaissent. En pratique, on va aussi observer des pics sur la diagonale aux fréquences ν_0, ν_-, ν_+ qui vérifient $\nu_0 + \nu_- = \nu_+$. Et en général, on observe également des signaux dans le cadran (- +) car on est en situation de couplage d'intensité intermédiaire. L'observation de pics caractéristiques d'un couplage avec un noyau en conditions de compensation restera possible tant que $|A_{iso} - 2\nu i| < \frac{4\kappa}{3}$.

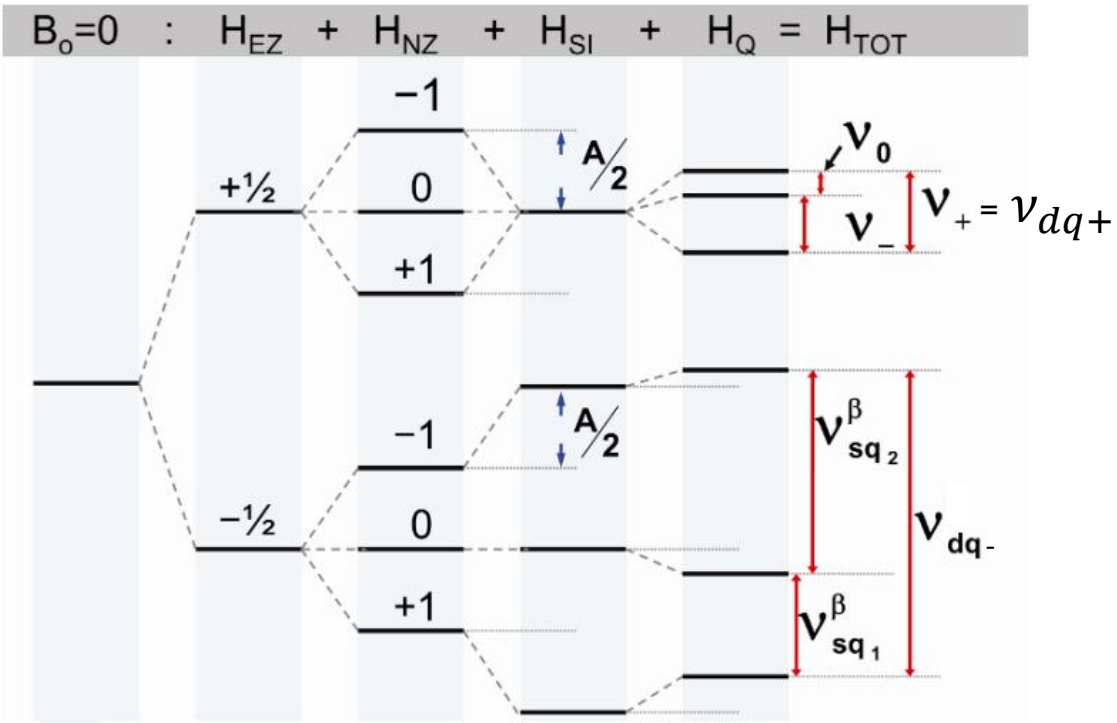


***Figure 39**. Diagramme d'énergie d'un spin électronique en interaction avec un noyau de spin I=1 dans le cas de la condition de compensation. A est la constate de couplage isotrope. Extrait de [70].*

On peut extraire : $\kappa = \frac{\nu_+ + \nu_-}{6} = \frac{2\nu_+ - \nu_0}{6} = \frac{2\nu_- + \nu_0}{6}$

Et : $\eta = \frac{3\nu_0}{2\left(\nu_- + \frac{\nu_0}{2}\right)} = \frac{3\nu_0}{2\left(\nu_+ - \frac{\nu_0}{2}\right)} = \frac{3\nu_+ - \nu_-}{\nu_+ + \nu_-}$

L'équation 20 permet alors de calculer :

$$A_{iso} = \pm 2\left(\sqrt{\frac{{\nu_{dq\pm}}^2}{4} - \kappa^2(3+\eta^2)} - \nu_I\right) \quad (Equation\ 21)$$

3) Le spectromètre RPE en ondes pulsées

Les spectre HYSCORE ont été enregistrés sur un spectromètre Bruker EleXsys E-580 en bande X avec une cavité équipée d'un cryostat CF 935 (Oxford Instruments).

4) Paramètres expérimentaux

Les paramètres expérimentaux à ajuster sont :

-Le champ magnétique qui est fixé dans les expériences de HYSCORE. Dans ce travail, la valeur du champ correspond à l'amplitude maximale du signal du Mo(V) ou de la semiquinone de ForCE1.

-La longueur des impulsions $\pi/2$ (entre 12 et 16 ns) et π (entre 24 et 32 ns). Ils conditionnent la plage de fréquences excitées et l'angle de basculement de l'aimantation de l'échantillon selon $\frac{g\beta_e B_1 t_p}{\hbar} = \theta$, où t_p est le temps de l'impulsion.

-La puissance micro-onde. Elle conditionne aussi l'angle de basculement de l'aimantation de l'échantillon selon $\frac{g\beta_e B_1 t_p}{\hbar} = \theta$ où B_1 est le module du champ magnétique de l'onde, qui dépend de sa puissance.

-La phase de détection. Le spectromètre permet une détection en quadrature. La phase est optimisée pour ne détecter le signal que dans un seul canal.

-Périodes d'échantillonnage temporel t1 et t2 définissent avec le nombre de points de mesure la résolution en fréquence du spectre.

-Le nombre de points de mesure définit le nombre de fois que t1 et t2 sont incrémentés. Généralement, un spectre HYSCORE inclue 256x256 points. Dans cette thèse, pour augmenter la résolution de certains spectres, ces derniers ont été acquis avec 512x512 points.

-Le nombre de mesure par point pour augmenter le rapport signal sur bruit.

-Le nombre d'accumulations qui permet d'augmenter le rapport signal sur bruit.

-Le temps de répétition de la mesure est le temps séparant deux séquences d'impulsions. Il doit être supérieur à 5 fois le T1, le temps de relaxation longitudinal au bout duquel l'aimantation revient alignée au champ magnétique appliqué.

-Le cyclage de phase. Une séquence de plus de deux impulsions conduit à la formation de plusieurs échos qui vont interférer avec l'écho souhaité. En ajustant la phase des impulsions, il est possible de supprimer ces interférences. Dans cette étude, un cyclage de phase en quatre étape a été suivi.

5) Traitement du signal

La décroissance de l'écho due aux processus de relaxation est éliminée par l'ajustement d'une fonction polynomiale à la décroissance. La résolution est diminuée d'un facteur 4 par l'ajout de zéros à la fin du spectre temporel. La transition douce entre les points expérimentaux et les zéros ajoutés est effectuée par une fonction Hamming. La transformée de Fourrier permet d'obtenir le spectre fréquentiel. Les spectres sont représentés en valeurs absolues.

6) Simulation des spectres HYSCORE

J'ai simulé les spectres HYSCORE avec la fonction « saffron » du logiciel Easyspin[82]. Les tenseurs $\tilde{g}$, $\tilde{A}$ et $\tilde{Q}$ sont supposés colinéaires. Pour les interactions hyperfines, on se place dans le cadre de l'approximation des dipôles ponctuels pour l'implémentation du $\tilde{T}$ et le tenseur $\tilde{A}$ est supposé axial. Les valeurs principales du tenseur $\tilde{A}$ sont données par l'Equation 16 et celles du tenseur $\tilde{Q}$ par l'Equation 18.

IX) Calcul de tunnel avec Caver

Les tunnels présents dans les structures des protéines sont calculés avec le logiciel Caver 3.0.3[83] pour PyMol et Caver Analyst 2[84] pour les graphiques représentant les largeurs des tunnels en fonction de leur longueur (https://caver.cz/). Les tunnels sont approximés à une série de sphères adjacentes de rayon variable. Les paramètres importants pour calculer les tunnels sont :

- probe radius : le rayon minimum qu'un tunnel doit avoir pour être calculé. Si un passage dans la protéine ne peut pas être traversé par la sonde (probe) de rayon défini par le probe radius, alors le tunnel ne passera pas par ce passage. Défaut : 0.9 Å

- shell depth : définit la profondeur de la région de surface (comprise entre la région solvant et la surface de la protéine). La ramification des tunnels n'est pas autorisée dans la région de surface (Figure 40). Défaut : 4 Å

- shell radius : définit l'épaisseur de la région de surface (Figure 40). Défaut : 3 Å

- clustering threshold : en raison de l'approximation des tunnels à une série de sphères et du fait qu'une cavité dans une protéine présente des aspérités, plusieurs tunnels peuvent être calculés dans la même cavité. Ces tunnels peuvent être regroupés en cluster plus ou moins grands selon la valeur du clustering threshold et un seul tunnel par cluster sera retenu. Défaut : 3.5 Å

- le point de départ initial : le point de départ est le point à partir duquel les tunnels vont se former pour rejoindre la surface. Le point de départ initial va ensuite être déplacé par les paramètres de maximum distance et desired radius. Dans ce travail, j'ai choisi comme point de départ le soufre inorganique ou l'atome de Mo/W en l'absence de soufre inorganique résolu.

- maximum distance : la distance maximale du point de départ initial à laquelle les tunnels vont se former jusqu'à la surface. Défaut : 3 Å

- desired radius : place le point de départ à la distance désirée des sphères qui constituent la structure protéique. Défaut : 5 Å

Chaque tunnel a un cout qui dépend de son rayon r en fonction de sa longueur L : $cout = \frac{L}{r^n}$, n est un nombre réel non négatif (sa valeur par défaut est 2 et je ne l'ai pas modifiée). Donc, plus le tunnel est large et court, plus faible sera le cout. Les tunnels sont classés par ordre de priorité grâce à un score $0<e^{-cout}<1$ qui implique que les tunnels les plus courts et larges auront les scores les plus élevés.

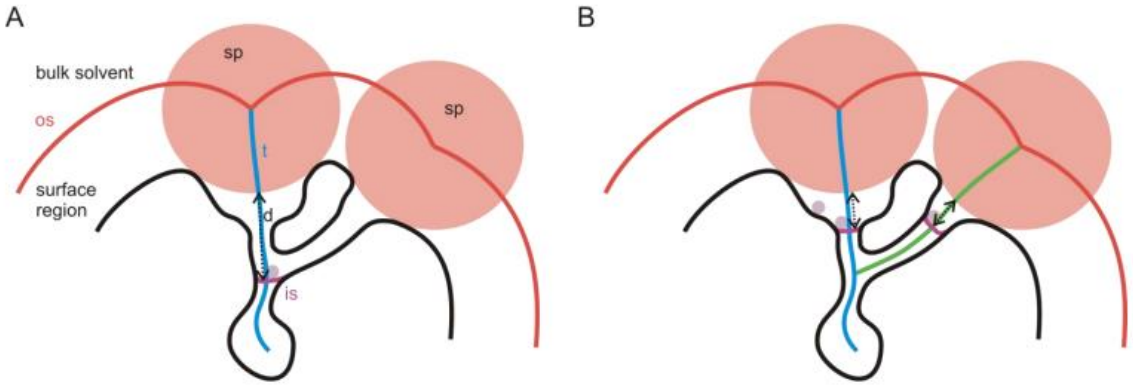


***Figure 40**. Paramètres de shell radius et shell depth. Le shell radius, c'est-à-dire le rayon de la shell probe (sp) définit la séparation entre la région de surface et le solvant. La ramification des tunnels n'est pas autorisée dans la région de surface. La distance d représente le shell depth qui définit la profondeur de la région de surface. Les panneaux A et B montrent des paramètres de shell depth différents. En A, un seul tunnel est calculé (ligne bleue), en B, deux tunnels sont calculés (lignes bleue et verte). Extrait du guide utilisateur.*

Dans les structures que j'étudie, si un tunnel a déjà été calculé dans une publication, j'ai utilisé les paramètres donnés dans la référence pour recalculer le tunnel. Si tous les paramètres ne sont pas donnés, j'ai utilisé les paramètres par défaut avec un probe radius à 0.6 Å. Si les tunnels d'une structure n'ont jamais été calculés, j'ai utilisé ces mêmes paramètres.

X) Dynamique moléculaire

1) Introduction à la dynamique moléculaire

La dynamique moléculaire (DM) est une technique de simulation numérique utilisée pour étudier l'évolution d'un système de particules, comme des protéines par exemple, au cours du temps.

Dans le cas de simulation de protéines en solution, la protéine étudiée est placée dans une boîte remplie de molécules d'eau. Afin d'éviter des artefacts créés par les effets de bords, on applique des conditions aux bornes périodiques. La boîte simulée est entourée par des copies translatées d'elle-même. Il faut garder à l'esprit que quand on simule des systèmes non périodiques (comme des protéines en solution), la périodicité du modèle est en soit un artefact, puisque les atomes dans la boîte peuvent interagir avec d'autres atomes dans une des copies de la boîte.

Dans ma thèse, j'ai utilisé le logiciel Gromacs. Le principe de la dynamique moléculaire avec Gromacs est de résoudre l'équation du mouvement de Newton :

$$\frac{d^2\vec{r_i}}{dt^2} = \frac{d\vec{v_i}}{dt} = \frac{\vec{F_i}}{m_i} \qquad (Equation\ 22)$$

Avec $\vec{r_i}$ le vecteur position de l'atome i de masse m_i soumis à une force $\vec{F_i}$ (somme de toutes les forces qui s'appliquent sur l'atome) et qui possède une vitesse $\vec{v_i} = \frac{d\vec{r_i}}{dt}$.

Donc les positions $\overrightarrow{r_i}$ et les vitesses $\overrightarrow{v_i}$ sont actualisées à partir de $\overrightarrow{F_i}$ qui dépend elle-même de l'énergie potentielle : $\overrightarrow{F_i} = -\frac{dV}{d\overrightarrow{r_i}}$.

L'énergie potentielle V est la somme de plusieurs contributions :

Les liaisons entre deux atomes i et j : $V_b = \sum \frac{1}{2} k_b (r_{ij} - r_0)^2$

Les angles entre trois atomes i, j et k : $V_a = \sum \frac{1}{2} k_\theta (\theta_{ijk} - \theta_0)^2$

Les dièdres impropres entre quatre atomes i, j, k et l : $V_i = \sum \frac{1}{2} k_\lambda (\lambda_{ijkl} - \lambda_0)^2$

Les angles dièdres : $V_d = \sum k_\varphi (1 + \cos(n\varphi - \varphi_0)$

Les interactions de coulomb entre deux atomes : $V_c = \sum \frac{q_i q_j}{4\pi\varepsilon r_{ij}}$

Les interactions de Lenard-Jones entre deux atomes : $V_{lj} = \sum 4\epsilon_{ij} \left(\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{6} \right)$

Le potentiel de Lenard-Jones contient un terme de potentiel répulsif $\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12}$ et un terme qui traite de l'énergie de dispersion $\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{6}$.

Les paramètres $k_{b,\theta,\lambda,\varphi}$, r_0, θ_0, λ_0, φ_0, $q_{i,j}$, ϵ_{ij} et σ_{ij} sont les paramètres implémentés (ou à implémenter) dans le champ de force Amber.

En réalité, les interactions coulombiennes et de Lenard-Jones ne sont pas calculées entre toutes les paires d'atomes car, pour les gros systèmes moléculaires, le calcul deviendrait trop couteux. C'est pourquoi des cut-offs sont introduits : les interactions sont calculées entre chaque paire d'atomes à l'intérieur du cut-off (1 Å dans ce travail). A noter que les interactions de coulomb et de Lenard-Jones ne sont pas calculées pour les atomes séparés par une ou deux liaisons covalentes qui sont donc exclus de la liste des paires.

Dans ce travail, la simulation d'un système périodique permet de calculer les interactions coulombiennes à longue distances (au-delà du cut-off) par la méthode Particle Mesh Ewald[85] (PME). Les charges sont interpolées sur une grille périodique qui permet de faire une transformée de Fourrier rapide des charges sur la grille et de calculer l'énergie dans l'espace réciproque.

Pour les interactions de Lenard-Jones, l'application du cut-off entraine des erreurs sur l'énergie et la pression puisque les interactions ne sont plus calculées au-delà du cut-off. Il est admis que l'effet du potentiel répulsif peut être négligé, donc une correction de la dispersion seulement est appliquée pour tenir compte de l'effet de dispersion au-delà du cut-off. Dans ce travail, la correction de la dispersion se fait sur l'énergie potentielle et la pression.

Dans une simulation de dynamique moléculaire, les équations du mouvement de chaque atome sont intégrées au cours du temps. L'intégrateur par défaut de Gromacs est l'intégrateur leap-frog. L'actualisation des positions des atomes au temp $t + \Delta t$ s'effectue grâce à leur position au temps t et à leur vitesse au temps $t + \frac{1}{2}\Delta t$:

$$\vec{v}\left(t+\frac{1}{2}\Delta t\right)=\vec{v}\left(t-\frac{1}{2}\Delta t\right)+\frac{\Delta t}{m}\vec{F}(t) \quad (Equation\ 23)$$

$$\vec{r}(t+\Delta t)=\vec{r}(t)+\Delta t\vec{v}\left(t+\frac{1}{2}\Delta t\right) \quad (Equation\ 24)$$

Dans ce travail, le but des simulations de DM est de modéliser notre protéine dans les conditions du laboratoire. Donc la protéine est solvatée dans de l'eau, et la température (300 K) et la pression (1 bar) ambiantes sont maintenues constantes.

Le thermostat utilisé dans la thèse, V-rescale, ajuste la vitesse des atomes pour réduire la déviation de la température calculée par rapport à la température de référence (300 K). Un terme stochastique est ajouté qui permet une distribution de l'énergie cinétique conforme à un ensemble canonique.

Pour la pression, on a utilisé un barostat de Parrinello-Raman. La taille de la boîte contenant le système et les positons des particules sont ajustées en fonction de la pression. Les vecteurs qui caractérisent la boîte suivent une équation du mouvement qui dépend de l'écart entre la pression calculée et la pression de référence (1 bar). L'équation du mouvement des particules dans la boîte est aussi modifiée par l'ajout d'un terme qui dépend de la modification des vecteurs qui caractérisent la boîte.

2) Mode opératoire

Les calculs de DM ont été réalisés au Mésocentre d'AMU en utilisant un GPU Volta et 32 cœurs.

Les simulations de dynamique moléculaire (DM) sont réalisées avec le logiciel Gromacs et le champ de force Amber03. Les paramètres de champs de force des centres fer soufre (FeS), du cofacteur à Mo, de la MK7, du formiate et du CO_2 n'étant pas implémentés par défaut dans Amber, je les ai ajoutés au champ de force existant. Les paramètres de champ de force pour les centres FeS sont issus de [86]. Ceux pour le cofacteur à Mo dans l'état Mo(VI) sont donnés dans [87,88]. Les paramètres de Van der Waals pour les atomes de Fe et de Mo proviennent de [89]. Les paramètres de champ de force pour la MK7, et les molécules de formiate et de CO_2 ont été obtenus avec le logiciel Antechamber[90].

Les calculs ont été menés à partir de la structure cristallographique d'une sous-unité ForC1 (PDB : 8rqz). Les résidus Arg, Lys, Asp et Glu sont supposés chargés. Toutes les Tyr et Cys sont supposées protonées à l'exception de la Cys ligand du Mo. Les His sont supposées être protonées sur le Nε (choix arbitraire). Les molécules d'eau résolues dans la structure ont été incluses dans la simulation. La protéine est placée dans une boite remplie de molécules d'eau (modèle TIP3P), et le système globalement négatif a été neutralisée par l'ajout de contre ions Na^+.

Avant la dynamique, l'énergie du système est minimisée sur 10000 pas suivant un algorithme steepest descent. Ensuite, une étape d'équilibration de la température à 300 K avec un thermostat V-rescale sur 1 ns puis de la pression à 1 bar avec un barostat Parinello-Raman sur 1 ns supplémentaire a été effectuée avec un algorithme leap-frog. Pendant les étapes d'équilibration de la température et de la pression, des contraintes de position sont appliquées

aux atomes de la protéine ($V_r = \frac{1}{2} k_r (r_i - R)^2$, avec R, la position de référence de l'atome contraint). Les contraintes sont relâchées lors de la production.

Les interactions de coulomb sont calculées dans l'espace réel avec un seuil de 1 nm. Au-delà, la méthode PME est utilisée. Les interactions de van der Waals sont calculées dans l'espace réel avec un seuil de 1 nm et une correction de la dispersion à longue distance. Le pas des simulations est de 2 fs. L'algorithme LINCS est utilisé pour figer les distances des liaisons covalentes qui impliquent un atome d'hydrogène. La température est maintenue à 300 K par un thermostat V-rescale et la pression est maintenue à 1 bar par un barostat Parinello-Raman.

Pour toutes les simulations réalisée, le RMSD atteint un plateau qui ne dépasse pas 5 Å.

XI) Théorie de la fonctionnelle de la densité (DFT)

1) Introduction à la DFT

En mécanique quantique, la connaissance des propriétés d'un système passe par la connaissance des fonctions d'ondes $\psi(\vec{r})$ qui satisfont l'équation de Schrödinger, qui, sous sa forme non relativiste et indépendante du temps s'écrit :

$$\hat{H}\psi(\vec{r}) = E\psi(\vec{r}) \qquad (Equation\ 25)$$

$\hat{H}$ est l'opérateur hamiltonien et E est l'énergie du système.

Le problème est que cet hamiltonien dépend de l'énergie cinétique des électrons et des noyaux et des interactions électron-noyaux, électron-électron et noyau-noyau, ce qui rend l'équation irrésolvable pour des système de plus de quelques particules.

L'approximation de Born-Oppenheimer néglige l'énergie cinétique des noyaux. On considère que les électrons évoluent dans un potentiel externe V_{ext} créé par les noyaux. Cela permet de considérer une fonction d'onde électronique $\varphi(\vec{r})$.

La DFT repose sur deux théorèmes de Hohenberg et Kohn[91].

Le premier stipule que le potentiel externe V_{ext} est déterminé de manière unique par la densité électronique $\rho(\vec{r})$. Donc, si on connait $\rho(\vec{r})$, il n'y a qu'un V_{ext} pour lequel $\rho(\vec{r})$ est la densité de l'état fondamental. Le corolaire est que puisque $\rho(\vec{r})$ détermine V_{ext} et que V_{ext} permet de déterminer la fonction d'onde, alors, $\rho(\vec{r})$ détermine $\varphi(\vec{r})$ de manière unique.

D'après le second, l'énergie $E(\rho)$ est une fonctionnelle de la densité et l'énergie de l'état fondamental peut être obtenue en minimisant $E(\rho)$.

$$\min E(\rho) = T(\rho) + E_{ee}(\rho) + \int \rho(\vec{r}) V_{ext}(\vec{r}) d^3\vec{r} \qquad (Equation\ 26)$$

Mais ni l'énergie cinétique des électrons T ni l'énergie de répulsions entre les électrons E_{ee} ne sont connues.

Pour outrepasser ce problème, Kohn et Sham[92] introduisent un système fictif d'électrons indépendants (qui n'interagissent pas entre eux) possédant la même densité $\rho(\vec{r})$ que le système réel.

$$E_S(\rho) = T_S(\rho) + \int \rho(\vec{r}) V_S(\vec{r}) d^3\vec{r} \qquad (Equation\ 27)$$

Ce qui permet d'écrire :

$$E(\rho) = T_S(\rho) + E_H(\rho) + \int \rho(\vec{r}) V_{ext}(\vec{r}) d^3r + E_{xc}(\rho) \qquad (Equation\ 28)$$

$E_H(\rho)$ est l'interaction de répulsion coulombienne entre les électrons et E_{xc} est l'énergie d'échange corrélation qui prend en compte le principe d'exclusion de Pauli (l'échange) et l'influence des électrons entre eux (la corrélation).

En pratique, on résout un système d'équations différentielles :

$$\left[\frac{-\hbar^2}{2m}\nabla^2 + V_{ext}(\vec{r}) + V_H(\vec{r}) + V_{xc}(\vec{r})\right]\varphi_i(\vec{r}) = E_i\varphi_i(\vec{r}) \qquad (Equation\ 29)$$

Le seul terme inconnu est $V_{xc}(\vec{r})$. Alors, il existe des approximations de E_{xc}.

Une des fonctionnelles très utilisée en chimie computationnelle est la fonctionnelle B3LYP dont le rôle est d'approximer l'énergie d'échange corrélation. Le terme d'échange contient 20% d'énergie d'échange exacte[93]. L'énergie de corrélation inclue la corrélation non locale et locale[94,95].

Les fonctions d'onde électroniques $\varphi(\vec{r})$ sont exprimées dans une base comme une combinaisons linéaire de fonctions de bases. Dans ce travail, on utilise des bases d'orbitales atomiques def2svp, def2tzvp[96,97] et EPR II[98] dans lesquelles les électrons de valence sont décrits par deux ou trois ensembles d'orbitales atomiques. Pour inclure les effets relativistes des électrons dans les atomes lourds (comme le Mo) dans les calculs qui nécessitent une plus grande précision, la base zora[99] est utilisée.

2) Mode opératoire

Les calculs d'optimisation de géométrie ont été réalisés avec le logiciel Gaussian en utilisant la fonctionnelle B3LYP[93,94] et la base def2-tzvp[97] pour le site actif à Mo et def2-svp pour la quinone. Les calculs des propriétés nucléaires et hyperfines ont été réalisés avec le logiciel Orca[100]. Pour la quinone, j'ai utilisé la fonctionnelle B3LYP et la base EPR-II[98] ainsi que le modèle de solvatation CPCM[101] en prenant une constante diélectrique égale à 4. Pour le site actif à Mo, la méthode est identique si ce n'est la base : zora[99] def2-tzvpp[96].

Résultats

Le site actif à Mo/W chez les FDHs

I) Les chemins d'accès au site actif chez les FDHs

Comme décrit dans l'introduction, le site actif des FDHs ne pas fait exception au sein de la superfamille des enzymes à Mo/W-*bis*PGD, il est profondément enfoui dans l'enzyme. Toutefois, la description du ou des chemins d'accès des substrats et produits de la réaction reste très largement incomplète. Elle se limite, dans la majorité des cas, à la description sommaire du tunnel d'accès au formiate sans préciser d'éventuelles constrictions le long du trajet, et au bout duquel sont retrouvés les acides aminés conservés His et Arg ainsi que le métal Mo/W[15,20,27,102,103]. En utilisant l'outil CAVER, des tunnels ont été calculés pour les FDHs de *R. capsulatus*[57] et *D. vulgaris*[25] permettant de relier le site actif à la surface du complexe enzymatique. Un même tunnel est attribué au transport du formiate dans ces deux enzymes tandis que les tunnels CO_2 proposés sont différents. Au regard de la diversité existante dans la famille des FDHs, ces données ne permettent pas de se faire une idée précise de la conservation de ce tunnel et requièrent une analyse plus systématique. Dans cette partie, je vais donc étudier la conservation du tunnel formiate et CO_2 dans toutes les structures de FDHs disponibles et tenter de caractériser par des outils de simulation de dynamique moléculaire (DM) les différents trajets que peuvent prendre les molécules dans ces tunnels, déterminer si ces tunnels sont distincts ou non et évaluer si la présence ou l'absence d'un tunnel fournit des éléments concernant la directionnalité.

Avant toute chose, les interactions électrostatiques sont importantes dans les protéines. En l'occurrence, elles sont impliquées dans les mouvements et les conformations des acides aminés des tunnels. Ainsi, pour simuler une dynamique de manière réaliste, il faudrait prendre en compte ces interactions fidèlement. Or, il me parait important de souligner les limites des études de dynamique moléculaire, principalement en ce qui concerne le traitement des interactions électrostatiques. Ces interactions sont modélisées par des approximations : interaction de coulomb, potentiels de Lenard-Jones qui prennent en compte des charges ponctuelles. Néanmoins, on peut se servir de la DM en appui de données expérimentales pour trouver de nouvelles pistes de recherche ou élaborer de nouvelles hypothèses sur les mécanismes de réaction.

1) Tunnel formiate
    a) Un tunnel conservé

En utilisant l'outil Caver (voir Matériel et Méthodes), j'ai calculé les tunnels d'accès au site actif à Mo/W de la sous-unité catalytique de ForC1 et des FDHs dont les structures sont disponibles, y compris de celles pour lesquelles les tunnels ont déjà été calculés[19,25,57,104] (Tableau 3). Pour faciliter cette première analyse des résultats, lorsque plusieurs structures d'une même enzyme ont été obtenues, j'ai choisi la structure obtenue avec la meilleure résolution. Si des traitements ont été effectués à l'enzyme (incubation au formiate, au DTT ou oxydation à l'air par exemple), j'ai choisi la structure de l'enzyme qui n'a pas subi de traitement. Enfin, à l'exception de la CO_2 réductase du complexe HDCR (Hydrogen Dependent CO_2 Reductase), les structures d'enzymes dont les cofacteurs à Mo/W n'ont pas été résolus (donc ne figurent pas dans les structures) n'ont pas été incluses. La structure cryo-EM du complexe

HDCR présente une anisotropie dans la résolution de la structure qui varie de 2.7 Å au cœur du complexe à des valeurs excédant 5 Å à la périphérie[20]. Dans la structure disponible, seule une partie de la structure de la sous-unité catalytique FdhF a été résolue et le cofacteur à W est absent. J'ai alors construit un modèle AlphaFold de la sous-unité FdhF du complexe HDCR et inclus le cofacteur à W par alignement avec d'autres structures dans lesquelles ce cofacteur était résolu. A l'exception des FDHs multidomaines, j'ai inclus la ou les sous-unités partenaires en interaction avec la sous-unité catalytique (FDH) pour éviter le calcul de tunnels erronés aboutissant à une zone de la surface qui devrait être occupée par les sous-unités partenaires. Pour les formylméthanofurane déshydrogénases (Fwd et Fmd dans le Tableau 3), j'ai inclus trois sous unités parce que le domaine catalytique est en réalité composé de deux sous-unités distinctes. La liste des structures et des sous-unités incluses dans l'analyse des tunnels est représentée dans le Tableau 3. L'analyse des similarités de séquences des domaines catalytiques de ces onze structures (Tableau 4) permet de montrer qu'on dispose de séquences très diverses, avec le pourcentage d'identité qui varie de 65% à 11%. Ces séquences se divisent en trois familles : une qui rassemble les FDHs multidomaines et les FDHF d'*E. coli* et *T. kivui*, une qui contient la FdnG d'*E. coli*, et les FdhA de *D. vulgaris* et *D. gigas* et le troisième qui regroupe les sous-unités FDH des formylméthanofurane déshydrogénases.

Tableau 3. *Description des structures utilisées pour la caractérisation du tunnel formiate. Les sous-unités catalytiques sont indiquées en rouge.*

FDH	PDB	Sous unites incluses
B. subtilis ForCE1	8rqz	ForC
R. capsulatus Fds	6tg9	FdsA
M. extorquens Fds	7vw6	FdsA
D. vulgaris FdhAB	6sdr	FdhAB
D. gigas FdhAB	1h0h	FdhAB
E. coli FdnGHI	1kqf	FdnGH
E. coli FHL	7z0t	FdhF, HycB
M. wolfei FwdABCDFG	5t5i	FwdBDG
C. methanodenaceae FwdABCGI	8rja	FwdBDG
M. hungatei FmdABCDGF	7bkb	FmdBDG
T. kivui HDCR	7qv7	FdhF, HycB3

***Tableau 4**. Pourcentage d'identité entre les domaines catalytiques des FDHs données dans le Tableau 3. Pour les FDHs multidomaine, la séparation entre le domaine catalytique C-terminal et le domaine N-terminal se fait 2 acides aminés avant la première Cys du FeS proximal.*

	EcFdhF	TkHDCR	RcFdsA	MeFdsA	BsForC1	DgFdhA	DvFdhA	EcFdnG	CeFwd	MwFwd	MhFmd
EcFdhF		45%	37%	35%	34%	19%	18%	18%	16%	17%	16%
TkHDCR	45%		36%	40%	36%	21%	21%	21%	16%	17%	16%
RcFdsA	37%	36%		36%	36%	17%	18%	17%	15%	16%	15%
MeFdsA	35%	40%	36%		35%	20%	19%	18%	15%	17%	15%
BsForC1	34%	36%	36%	35%		20%	19%	19%	17%	17%	14%
DgFdhA	19%	21%	17%	20%	20%		65%	43%	11%	12%	11%
DvFdhA	18%	21%	18%	19%	19%	65%		44%	11%	11%	11%
EcFdnG	18%	21%	17%	18%	19%	43%	44%		12%	12%	13%
CeFwd	16%	16%	15%	15%	17%	11%	11%	12%		51%	41%
MwFwd	17%	17%	16%	17%	17%	12%	11%	12%	51%		43%
MhFmd	16%	16%	15%	15%	14%	11%	11%	13%	41%	43%	

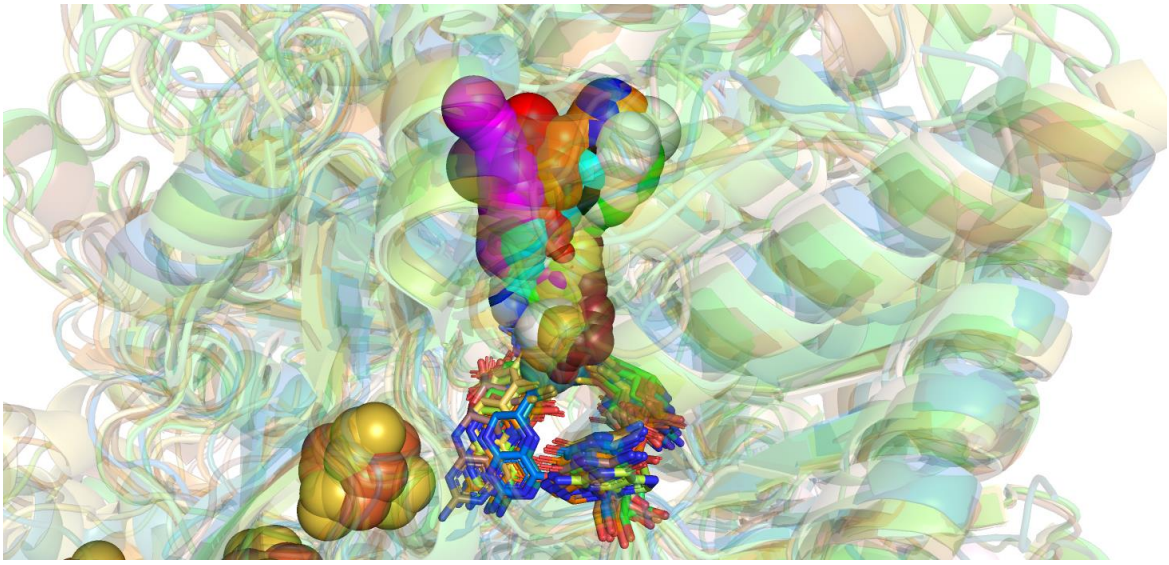
Pour calculer les tunnels, j'ai utilisé les paramètres donnés dans le Matériel et Méthodes, avec une sonde de 0.6 Å de rayon pour maximiser les chances de trouver un tunnel qu'on pourra attribuer au transport du formiate. Parmi tous les tunnels qui sont calculés dans chaque structure, un tunnel m'a semblé être le plus prometteur puisqu'il s'agit du tunnel le plus court et le plus large et qui permet l'accès le plus direct au site actif. Ce même tunnel est retrouvé dans toutes les structures sélectionnées, FDH et CO_2 réductases (Figure 41A), et proposé être le tunnel formiate pour *Dv*FdhAB, *Dg*FdhAB[25] et *Rc*Fds[57]. On observe ce tunnel aussi dans la sous-unité FDH du complexe HDCR. Cette sous-unité est capable de réduire le CO_2 produisant du formiate qui doit être évacué par un tunnel. Chez les formylméthanofurane déshydrogénases, ce tunnel correspond au début du tunnel intramoléculaire attribué au transport du formiate[19,104] (voir Introduction II)6)). Ces observations sont complétées par les cartes des potentiels électrostatiques à la surface des sous unités FDHs (Figure 41B). Ces cartes permettent de distinguer les zones plutôt chargées positivement (bleu) ou négativement (rouge). Leur examen indique que l'entrée du tunnel à la surface de la protéine, indiquée par une flèche bleue sur la Figure 41B, est plutôt chargée positivement, ce qui la rend favorable au transport du formiate qui lui, possède une charge négative. Aussi, dans deux études sur des cristaux de la FDH de *D. vulgaris*, une molécule de formiate[105] et de formamide[63] (analogue du formiate) ont été résolues dans ce tunnel, à proximité de l'Arg conservée. Dans la suite, pour simplifier, j'appellerai ce tunnel le « tunnel formiate ».

J'ai sélectionné les acides aminés qui forment le tunnel formiate de chaque structure (Figure 41C et D). L'analyse de la composition en acides aminés du tunnel de ForC1 nous apprend qu'il est composé majoritairement d'acides aminés polaires (10 sur 16 marqués en bleu ciel, Figure 41C), comptant notamment deux Arg et plusieurs Thr et Ser qui peuvent former des liaisons électrostatiques avec les molécules de formiate pour les guider et peuvent favoriser leur accumulation dans le tunnel. Sur les structures des autres FDHs, le tunnel formiate est également constitué pour partie d'acides aminés polaires répartis le long du tunnel pouvant jouer le même rôle (en bleu ciel, Figure 41D). Afin d'étudier la conservation des acides aminés du tunnel de ForC1, je me suis intéressé d'abord exclusivement au sous-groupe des enzymes de type ForC. En choisissant un seuil d'identité de 90%, l'examen de l'alignement multiple de 174 séquences indique que seulement six acides aminés du tunnel sont conservés sur les seize qui forment le tunnel de ForC1, parmi lesquels deux Arg (Tableau 5). Ensuite je me suis intéressé au groupe entier des FDHs multi-domaines auquel appartient le sous-groupe ForC. En choisissant le même seuil d'identité de 90%, l'examen de l'alignement multiple de 442 séquences de FDHs incluant les enzymes de type ForC indique que cinq acides aminés sont conservés sur les seize qui forment le tunnel de ForC1, dont quatre déjà conservés chez les ForC (Tableau 5). A ce stade, nos résultats permettent de conclure que la conservation du

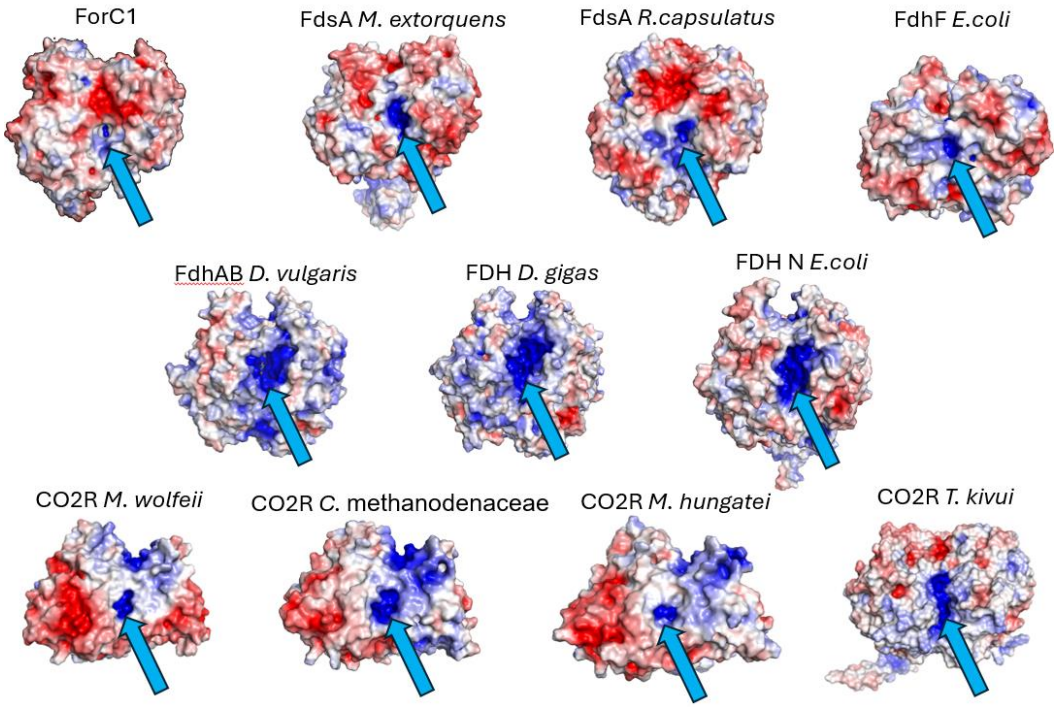
tunnel formiate commun aux FDHs et CO2R est due à un repliement conservé des enzymes qui sculpte une cavité jusqu'au site actif et à la présence d'acides aminés polaires capables de former des liaisons électrostatiques avec le formiate.

Dans toutes les structures, le tunnel se termine au niveau du site actif par les résidus His/Gln, Ser/Ala et par les résidus conservés Arg et Val, qu'on appellera pour simplifier « passage A » (Figure 41E). Pour avoir une idée de la taille minimale que la cavité doit avoir pour laisser passer une molécule de formiate, j'ai réalisé une optimisation de géométrie dans le vide d'une molécule de formiate par DFT et j'ai mesuré la plus petite distance entre deux de ses atomes. Donc le formiate, pour arriver au site actif, doit disposer d'un passage de dimension caractéristique supérieure à 2 Å (encart Figure 41F). La Figure 41F décrit le rayon du tunnel formiate de chaque FDH depuis le site actif. Avec un rayon d'au minimum 1 Å pour sept tunnels sur onze on peut admettre que le formiate peut traverser le passage A. Mais, pour le tunnel formiate de quatre enzymes, ForCE1 de *B. subtilis* (en orange) et les FDHs de *D. vulgaris* (en rouge), *D. gigas* (en noir) et la FdhF d'*E.coli* (gris) il y a un rétrécissement du tunnel de telle sorte qu'il semble difficile pour une molécule de formiate d'accéder au site actif (Figure 41F).

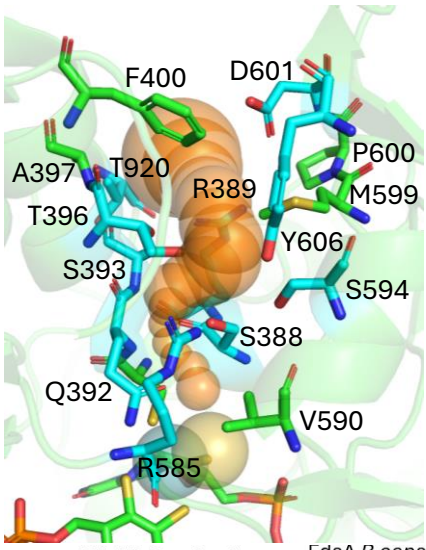
A



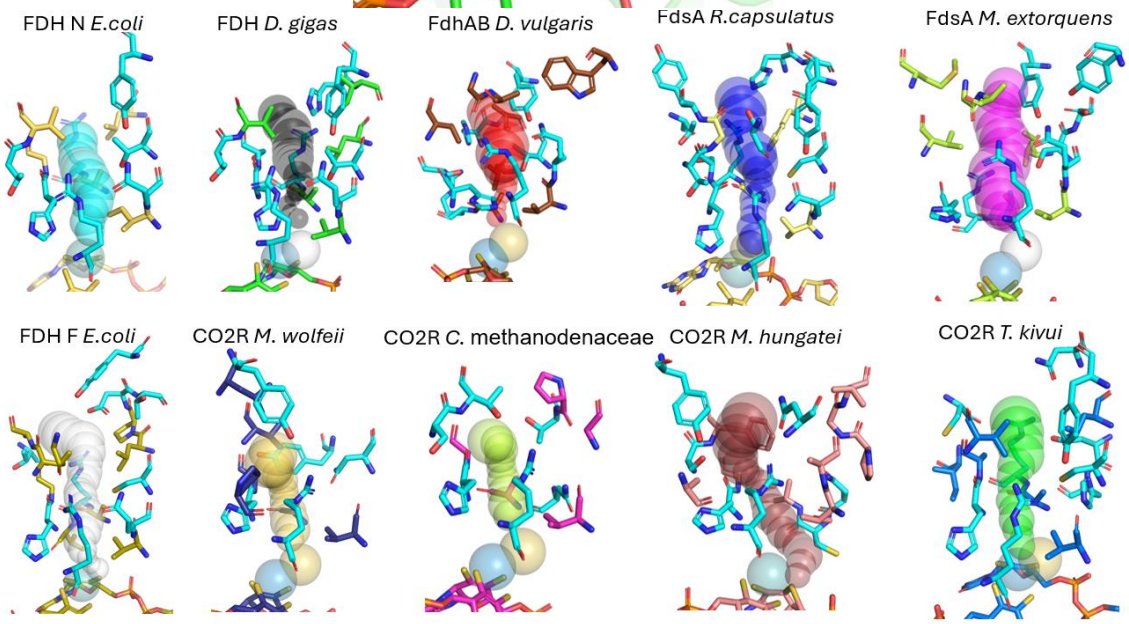
B


ForC1
FdsA *M. extorquens*
FdsA *R.capsulatus*
FdhF *E.coli*
FdhAB *D. vulgaris*
FDH *D. gigas*
FDH N *E.coli*
CO2R *M. wolfeii*
CO2R *C.* methanodenaceae
CO2R *M. hungatei*
CO2R *T. kivui*

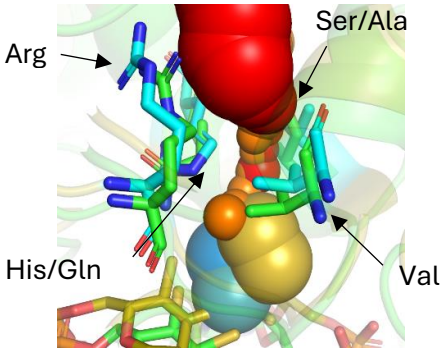
C


F400
D601
P600
A397
T920
R389
M599
T396
Y606
S393
S594
S388
Q392
V590
R585

D


FDH N E.coli
FDH D. gigas
FdhAB D. vulgaris
FdsA R.capsulatus
FdsA M. extorquens
FDH F E.coli
CO2R M. wolfeii
CO2R C. methanodenaceae
CO2R M. hungatei
CO2R T. kivui

E


Arg
Ser/Ala
His/Gln
Val

F

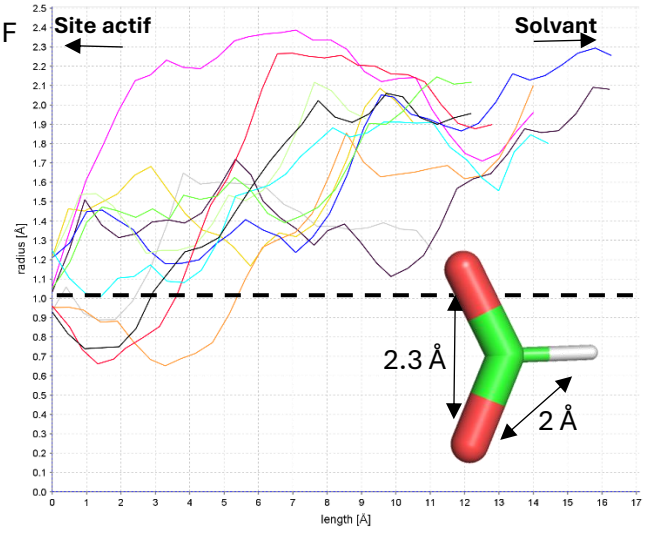

Site actif
Solvant
radius [Å]
length [Å]
2.3 Å
2 Å

***Figure 41**. Caractérisation du tunnel formiate. **A**. Superposition des tunnels formiate des structures de ForC1 et des FDHs de R.capsulatus FdsA (PDB : 6tg9), D. vulgaris FdhAB (PDB : 6sdr), D. gigas (PDB : 1h0h), T. kivui (PDB : 7qv7), la FDH N d'E. coli (PDB : 1kqf), la FdhF d'E. coli (PDB : 7z0t), de M. extorquens (PDB : 7vw6) et des sous unité FDH des formylméthanofuran déshydrogénases de M. wolfeii (PDB : 5t5i), C. methanodenaceae (PDB 8rja) et M. hungatei (PDB : 7bkb). **B**. Carte des potentiels électrostatiques de différentes FDHs. Les zones bleues sont positivement chargées, les zones rouges sont négativement chargées. Les flèches bleues indiquent l'entrée du tunnel formiate. **C**. Les 16 acides aminés (polaires : bleu, apolaires + Cys ligand : verts) composant le tunnel de ForC1. **D**. Les acides aminés composant les tunnels dans les autres FDHs (acides aminés polaire en bleu clair). **E**. Passage A formé par Ser/Ala, His/Gln, Arg et Val. **F**. Rayon des tunnels de A en fonction de la longueur. L'origine des abscisses correspond au S inorganique ou au Mo/W. Paramètres des tunnels : probe radius 0.6 Å, shell depth 4 Å, shell radius 3 Å, clustering threshold 3.5, maximum distance 3 Å, desired radius 5 Å. Encart : Molécule de formiate, les distances sont indiquées en pointillés jaunes.*

***Tableau 5**. Etude de la conservation des résidus du tunnel de ForC1. Les cases vertes représentent les résidus conservés à plus 90%, et les rouges ceux qui ne le sont pas.*

Acides aminés du tunnel de ForCE1	Conservé chez les ForC	Conservé chez les FDHs multidomaine
S388		
R389		
C391		
Q392		
S393		
T396		
A397		
F400		
R585		
V590		
S594		
M599		
P600		
D601		
Y606		
T920		

b) L'His/Gln semble contrôler l'accès au site actif

Pourquoi ce rétrécissement n'est pas présent dans toutes les FDHs ? Pour la FdhF d'*E. coli*, la raison est qu'il n'y a pas de S inorganique résolu dans la structure, et donc que le tunnel s'enfonce un peu plus loin, jusqu'au Mo. De manière générale, l'examen du voisinage immédiat du métal montre deux orientations possibles de la chaine latérale du résidu His. L'une montre que le noyau imidazole est proche du S inorganique, notée position 1 tandis que l'autre montre une orientation où le cycle est plus éloigné, dite position 2 (Figure 42A). Il apparait que les deux seules structures où l'His est en position 1 présentent un rétrécissement du tunnel : il s'agit de FdhAB de *D. vulgaris* (PDB : 6sdr)[25] et FdhAB de *D. gigas* (PDB : 1h0h)[15]. En fait, ces deux FDHs ont un pont disulfure formé par deux Cys et situé à une vingtaine d'angströms du site actif (ce sont les deux seules structures sélectionnées qui possèdent ce pont). L'ajout de DTT ou la substitution d'une des Cys du pont disulfure par une Ala (le variant C872A) dans la FDH de *D. vulgaris* rompt le pont disulfure et entraîne une série de réarrangements conformationnels qui aboutissent au basculement de la position 1 de l'His à la position 2[63]. Ce changement s'accompagne d'un k_{cat} formiate 10 fois plus grand et un k_m formiate 150 fois plus petit comparé au cas où le pont disulfure est présent[63,106]. Aussi, l'enzyme acquiert une activité de réduction du CO_2, qui n'est pas détectée quand le pont disulfure est présent [63,106]. Dans la suite, pour parler de cette enzyme, je maintiendrai la

nomenclature utilisée par les auteurs de ces articles : on dira que l'enzyme non réduite au DTT est « au repos ». La Figure 42B décrit le rayon du tunnel formiate de la FDH de *D. vulgaris* au repos (rouge) et du variant C872A (bleu) en fonction de la distance au site actif. Elle illustre que le changement de position de l'His s'accompagne de l'ouverture du passage A. Ces changements rendent la FDH plus active pour l'oxydation du formiate et la réduction du CO_2 mais aussi la rendent plus sensible à l'oxygène[25,63]. La même étude n'a pas été conduite sur la FDH de *D. gigas*, mais étant donné que le pont disulfure est retrouvé conservé dans cette FDH et qu'elle partage 65% d'identité de séquence avec celle de *D. vulgaris*, on peut facilement imaginer qu'un mécanisme similaire existe pour cette enzyme. En tout cas, les positions 1 et 2 de l'His semblent être stabilisées dans les structures des enzymes par des liaisons électrostatiques avec leur environnement, un point qui sera abordé plus en détail dans les parties suivantes.

Dans la structure de ForCE1, la Gln392 (équivalente de l'His discutée ci-avant) qui participe au rétrécissement du tunnel se trouve dans une position intermédiaire, entre la position 1 et la position 2 (en orange, Figure 42A) mais le passage A est bloqué comme pour la FDH de *D. vulgaris* non réduite au DTT. Or, il n'y a aucun pont disulfure dans ForCE1. Donc, déterminer par où passe le formiate n'est pas si évident quand le passage A est fermé. Dans ce cas, le changement de conformation d'un ou plusieurs acides aminés, qu'il soit spontané ou déclenché par le substrat, est nécessaire pour l'accès du substrat au site actif. L'un des candidats est la position occupée par le résidu His/Gln. Dans quelle mesure la chaine latérale du résidu Gln392 chez ForC1 est dynamique ? Les analyses de CAVER ne peuvent pas répondre à cette question.

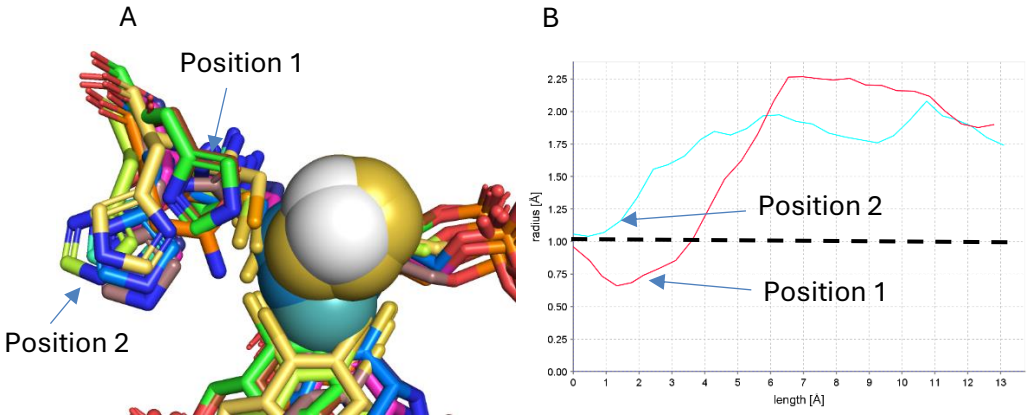


***Figure 42**. Les positions 1 et 2 de l'His. **A**. Superposition de toutes les structures de la Figure 41A. La Cys/Sec ligand, l'His et les PGD sont représentés en sticks. **B**. Rayons des tunnels formiate de FdhAB de D. vulgaris au repos (PDB : 6sdr, rouge) et du variant C872A (PDB : 8cm6, bleu).*

Afin d'apporter des éléments de réponse sur la nature des changements conformationnels pouvant exister dans l'environnement immédiat du site actif de ForC1, j'ai opté pour la méthode de dynamique moléculaire (DM). Cette approche permet de simuler l'évolution temporelle d'un système moléculaire (voir Matériel et Méthodes). Son utilisation a permis par exemple de révéler que la flexibilité d'un groupe de résidus conservés et localisés à longue distance du site actif à Mo dans une autre enzyme de la famille des Mo/W bis-PGD, la nitrate réductase NarGH, contrôle à la fois l'accès du substrat mais également le transfert de protons, modulant ainsi les propriétés catalytiques[56].

Donc j'ai réalisé une simulation de DM dans un solvant aqueux d'une durée de 400 ns (voir Matériel et Méthodes pour les paramètres). Le premier constat est que des molécules d'eau s'accumulent dans le tunnel formiate. Mais elles ne passent pas par le passage A (Ser388, Gln392, Arg585 et Val590) décrit comme la zone de rétrécissement du tunnel par Caver (Figure 41E). Elles cheminent entre les résidus Gln392, Thr396 et Arg585 (endroit désigné comme passage B) pour atteindre une poche située à côté du site actif, à environ 6 Å de celui-ci (Figure 43). Il est intéressant de noter le changement d'orientation de la chaine latérale du résidu Gln392 au cours de la simulation. Durant 110 ns, le résidu se maintient en position 1 avec les répercussions déjà décrites sur le trajet des molécules d'eau.

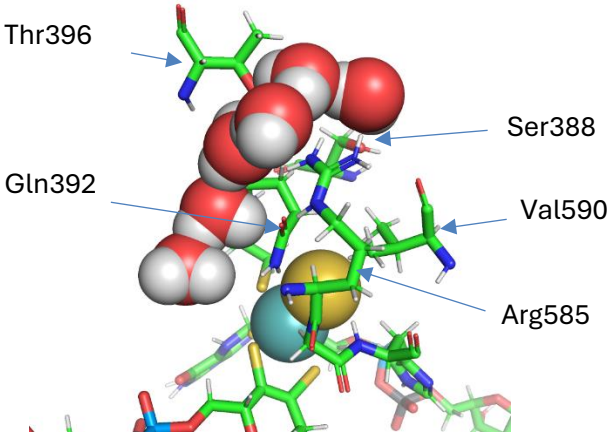


***Figure 43**. Snapshot représentant le chemin emprunté par les molécules d'eau (représentées en sphères rouges et blanches pour les atomes d'oxygène et d'hydrogène respectivement) dans le tunnel formiate au cours de la simulation de DM. La conformation des résidus Ser388, Gln392, Arg585 et Val 590 bloque le passage A.*

Après 110 ns, la chaîne latérale de la Gln392 adopte une nouvelle orientation différente des positions 1 et 2 (position 3, Figure 44A et B). Ce changement d'orientation s'accompagne d'une augmentation de la distance vis-à-vis du soufre inorganique (tracé rouge dans Figure 44C). Ce changement de conformation fait penser à celui de l'His193 de *Dv*FdhAB au repos entre l'état oxydé et l'état réduit[25] que j'ai mentionné dans la section II)4)a) de l'Introduction (Figure 7D et E). Il est important de rappeler que la forme de l'enzyme réduite en l'absence de DTT ne correspond pas à la forme la plus active de l'enzyme[63].

La distance S inorganique-solvant (tracé noir, Figure 44C) indique la distance entre le S inorganique et l'atome d'hydrogène le plus proche appartenant à la molécule d'eau la plus proche à chaque pas de la simulation. La Gln en position 3 bloque toujours le passage A empêchant l'accès des molécules d'eau au site actif (la distance S inorganique-solvant vaut entre 7 et 5 Å). Cependant, dans la suite de la simulation, bien que la Gln soit maintenue en position 3, les acides aminés du passage A (Ser388, Gln392, Arg585 et Val590) conservent une flexibilité latente qui entraîne de manière éphémère l'ouverture du passage A, et l'arrivée de molécules d'eau par ce passage (Figure 44F), mais aussi par la poche du site actif. La distance S inorganique-solvant diminue jusqu'à environ 2 Å quand une molécule d'eau atteint le site actif (Figure 44C). En d'autres termes, le résidu Gln392 est impliqué dans le contrôle de l'accès au site actif des molécules d'eau du tunnel formiate.

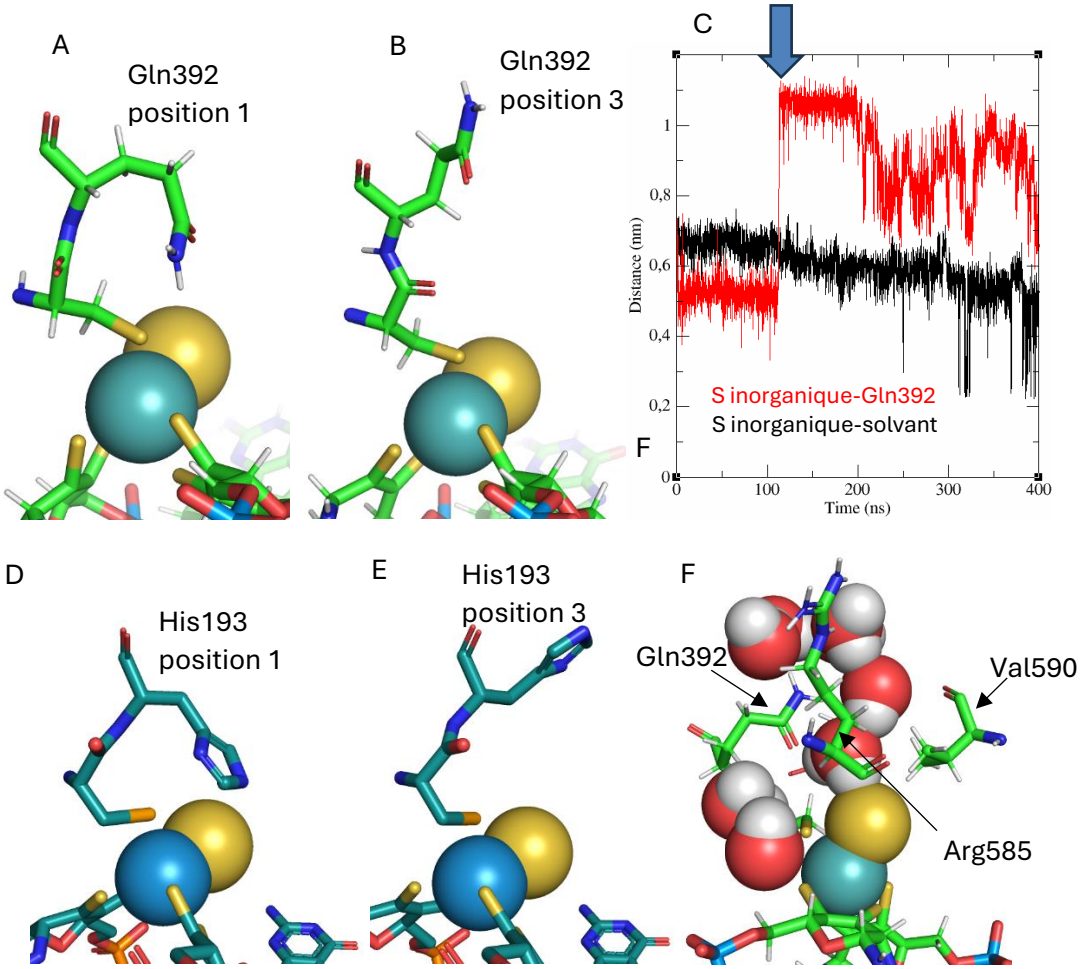


***Figure 44**. L'His/Gln est flexible. Snapshots de la DM sur ForC1 illustrant le changement de conformation de la Gln392, en position 1, juste avant 110 ns (**A**) et 3, peu après 110 ns (**B**). **C**. Evolution temporelle de la distance entre le S inorganique et le N de la chaine latérale de la Gln (rouge) et le solvant (noir) au cours du calcul de dynamique moléculaire. Structure de la FdhAB de D. vulgaris dans l'état oxydé (**D**, PDB : 6sdr) ou dans l'état réduit (**E**, PDB : 6sdv). **F**. Snapshot de la même DM illustrant le passage A qui s'est ouvert.*

A ce jour, il n'existe pas de série de structures résolues en temps qui permette de suivre le trajet du substrat dans l'enzyme. Les travaux dans [29] décrivent les structures de la FDH de *D. vulgaris* résolues à différents temps au cours de la réduction de l'enzyme par du formiate, mais n'ont pas permis de suivre le formiate à proximité du site actif, après le rétrécissement du tunnel. Si on fait l'hypothèse que les molécules de formiate peuvent emprunter le même chemin que les molécules d'eau, ces simulations de DM permettent de proposer un modèle de l'accès du formiate au site actif de ForCE1 par le passage A ou le passage B.

De manière générale, on pourrait questionner la flexibilité conformationnelle réelle de la Gln392 dans ForCE1 en solution. Est-ce que le formiate peut influencer la conformation de la Gln392, (en lui permettant d'acquérir la position 2, par exemple) ? Ce qui amène aussi à questionner la pertinence de la position 3 malgré le fait que la structure de la FDH de *D. vulgaris* en état réduit possède l'His du site actif en position 3. En tout cas, la DM indique que la Gln possède une flexibilité conformationnelle qui suggère qu'elle est le résidu principal qui doit changer de conformation pour permettre le passage du substrat au site actif.

Donc, pour voir si le formiate peut influencer la conformation de la Gln392, j'ai effectué deux simulations de DM. Dans l'une, j'ai placé une molécule de formiate à proximité de l'Arg conservée, juste avant le rétrécissement du passage A. Ce choix est soutenu par des structures de la FDH de *D. vulgaris* dans lesquelles une molécule de formiate[105] et de formamide[63] ont été résolues à proximité de l'Arg conservée. Le caractère polaire (chargé +) et conservé de l'Arg en fait un bon candidat pour maintenir le substrat à proximité du site actif. Le but est de voir si la présence du formiate va engendrer des changements conformationnels des acides aminés alentours. Mais dans cette simulation, la Gln reste en position 1 et la molécule de substrat remonte le tunnel jusqu'au solvant.

Dans l'autre simulation de 100 ns, sur la base de ce qu'on a vu avec les molécules d'eau qui empruntent le passage B jusqu'à la poche du site actif et avec le basculement de la Gln en position 3, j'ai placé une molécule de formiate dans la poche du site actif. J'ai orienté la molécule de formiate de façon à ce que ses atomes d'oxygène soient adjacents à la chaine latérale de la Gln392, parce qu'il me semble probable qu'une liaison électrostatique puisse s'établir entre les deux. Et en effet, dès le début de cette simulation le NH_2 de la chaîne latérale de la Gln392 établit une liaison électrostatique avec la charge négative portée par le formiate, ce qui décale la chaîne latérale de la Gln392 par rapport à sa position 1 (Figure 45A). Dans cette conformation, la distance S inorganique-Gln est d'environ 6.5 Å (tracé rouge, Figure 45B). Après environ 45 ns, de manière concomitante, le formiate sort de la poche du site actif, remonte le tunnel formiate et rejoint le solvant, comme l'indique l'augmentation rapide de la distance entre la Gln392 et le formiate, et la Gln bascule en position 1, indiqué par la diminution de la distance Gln-S inorganique à 4 Å. Ce qui est intéressant, c'est que la dynamique de la Gln semble être dépendante de la molécule de formiate tant que celle-ci reste dans la poche. Ceci peut être soutenu par le fait qu'il y ait quasiment toujours au moins une liaison hydrogène entre la Gln et le formiate tant que le formiate est dans la poche (Figure 45C). La molécule de formiate n'atteint pas le site actif dans cette simulation. De manière intéressante, la position de la Gln392 induite par le formiate semble entrainer de façon sporadique l'ouverture du passage A et l'accès de molécules d'eau au cours de la simulation (Figure 45A).

Ce résultat permet de faire l'hypothèse qu'une ou plusieurs molécules de formiate puissent entraîner un changement de la conformation de la Gln392.

Ainsi, à l'issue de cette première partie, on peut conclure que nous avons très probablement identifié et localisé le tunnel formiate pour chaque FDH dont la structure est disponible, et que ce tunnel est conservé à travers ces différentes structures qu'elles soient celles de FDH ou de CO2R. L'accès du formiate au site actif dépend de la position et de la conformation de quatre acides aminés : Ser/Ala, His/Gln, Arg et Val. L'analyse des structures, ainsi que des données de la littérature et des simulations de DM réalisées, soulignent l'importance de la flexibilité conformationnelle de l'His/Gln, laquelle semble jouer un rôle clef, agissant comme une porte permettant l'accès au site actif.

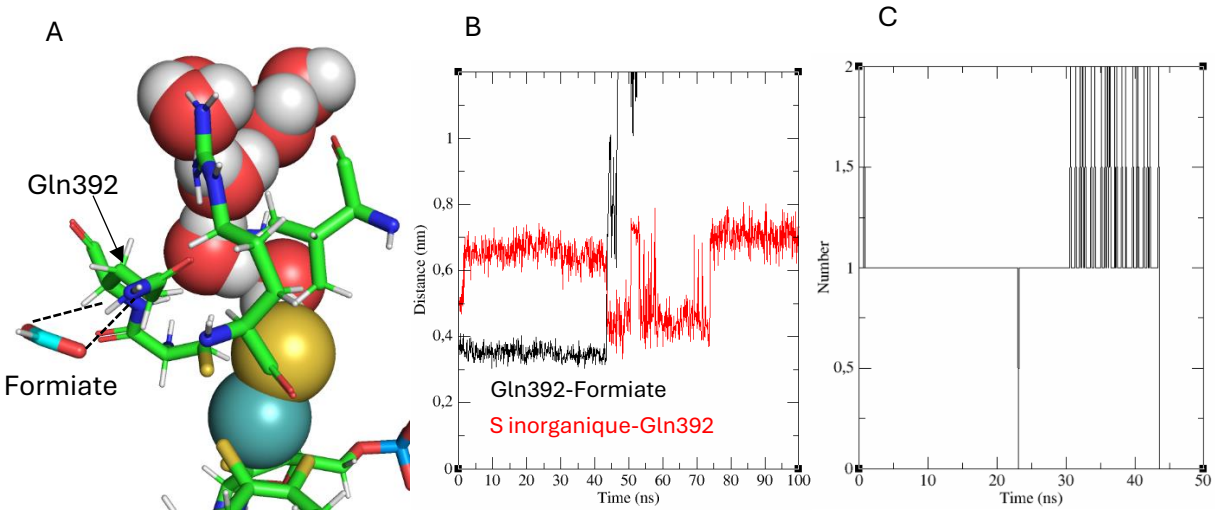


***Figure 45**. L'influence du formiate sur la Gln392. **A**. Snapshot illustrant l'interaction électrostatique entre le résidu Gln392 et le formiate et l'ouverture du passage A. **B**. Evolution temporelle de la distance entre l'azote de la chaîne latérale de la Gln392 et le carbone du formiate (noir) ou le S inorganique (rouge). **C**. Nombre de liaisons hydrogène entre la Gln392 et le formiate au cours des 50 premières ns de la simulation.*

c) Un chemin alternatif des molécules d'eau ?

Dans certaines simulations, j'ai pu voir que des molécules d'eau du solvant atteignent le site actif par un autre passage que les passages 1 et 2. En fait, ces molécules d'eau n'arrivent pas directement du tunnel formiate mais diffusent à travers la protéine par des voies alternatives. Ce phénomène semble être rendu possible par le changement de conformation de la Cys387, située à environ 4 Å du Mo et du soufre inorganique, qui, dans sa configuration initiale, bloque l'accès au site actif (Figure 46A et B). Bien qu'il soit envisageable que cela soit un artefact de simulation, l'observation de molécules d'eau le long d'un même PGD dans certaines structures de FDHs (Figure 46C, D, E, F et G) apporte un élément d'interrogation. Tandis que ce comportement n'est pas retrouvé dans la structure de ForCE1, les simulations de DM montrent que des molécules d'eau peuvent se répartir le long du même PGD, parviennent parfois jusqu'au site actif, puis repartent, laissant la place à d'autres molécules. En 2002, Raaijmakers et al[15] proposent qu'il s'agisse de la voie d'évacuation des protons issus de l'oxydation du formiate pour la FDH de *D. gigas*. Ce qui pose la question de l'utilité de cette voie d'eau alors qu'on pourrait penser que les protons puissent être évacués par le tunnel formiate. La Cys387 de ForCE1 est conservée à 99.3% dans les 443 séquences de FDHs multidomaines et peut être substituée par une Ser ou Thr. Les Cys, Ser et Thr occupent approximativement le même volume et sont tous les trois polaires. Dans les 11 structures que j'ai sélectionné pour l'analyse des tunnels, celles qui n'ont pas de Cys/Ser/Thr à cette position sont les FDH N d'*E. coli*, de *D. vulgaris* et de *D. gigas* qui possèdent une Gln.

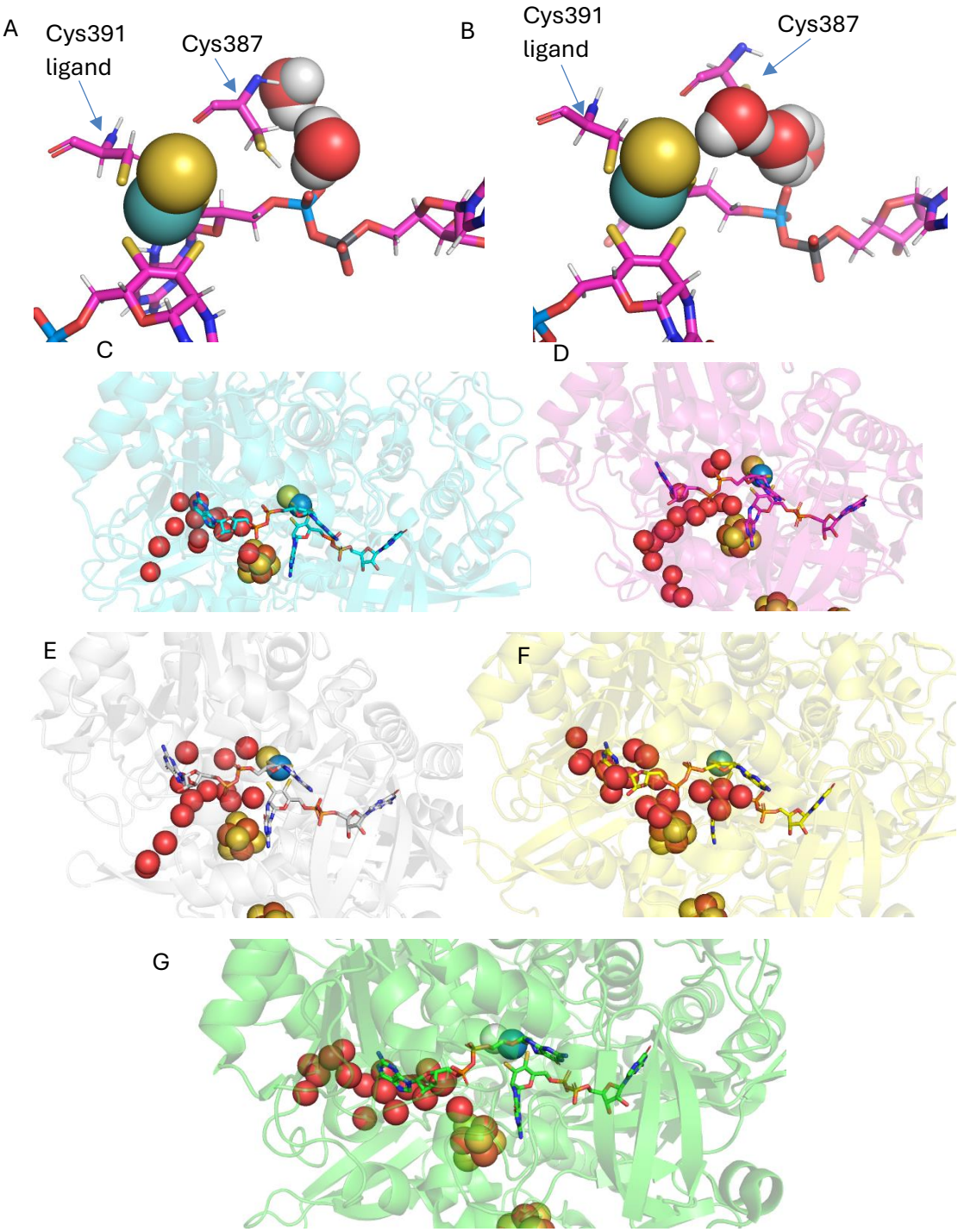


***Figure 46**. Le chemin alternatif des molécules d'eau. Snapshots de la simulation de DM avec la molécule de formiate qui montre la Cys387 bloquer les molécules d'eau (**A**) ou les laisser passer (**B**). Structures des FDHs de D. vulgaris (**C**, PDB : 6sdr), des formylméthanofurane déshydrogénases de M. wolfeii (**D**, PDB : 5t5i) et de E.peredens (**E**, PDB : 8rja), la FDH N d'E. coli (**F**, PDB 1kqf) et la FDH de D. gigas (**G**, PDB : 1h0h) dans lesquelles des molécules d'eau (représentées par des sphères rouges) sont résolues.*

2) Comment expliquer la différence de positions 1 et 2 ?

Comment expliquer la différence de positions 1 et 2 des His et de la Gln ? En position 1, la chaîne latérale de l'His/Gln ne semble pas être stabilisée par des liaisons hydrogène avec d'autres acides aminés, mais plutôt par une interaction électrostatique avec le site actif. En effet, le proton du NH du noyau imidazole de l'His ou le groupe NH2 de la chaîne latérale de la Gln semble établir une interaction avec le S/Se(Cys/Sec) et/ou le S inorganique. A l'inverse, la position 2 de l'His est stabilisée dans les structures par deux liaisons hydrogène : l'une avec l'oxygène du backbone d'une Leu ou Met, et l'autre avec le groupe hydroxyle de la chaîne latérale d'une thréonine ou d'une sérine située à environ 3 Å des azotes des His (Figure 47A). Par ailleurs, dans les alignements de séquences des FDHs multidomaines (hors type ForC), le résidu repéré à cet emplacement est systématiquement une sérine ou une thréonine. Dans le cas de ForCE1, la Gln pourrait potentiellement former une liaison hydrogène avec la Leu584, mais à la place d'une sérine ou d'une thréonine, on trouve une Ala395. Cette alanine, strictement conservée chez les enzymes de type ForC, ne permet pas la formation d'une liaison hydrogène avec la Gln (Figure 47B). Bien que la Thr396, adjacente à Ala395 dans ForCE1, soit présente, elle apparaît trop éloignée et mal orientée pour permettre à la Gln392 d'adopter la position 2.

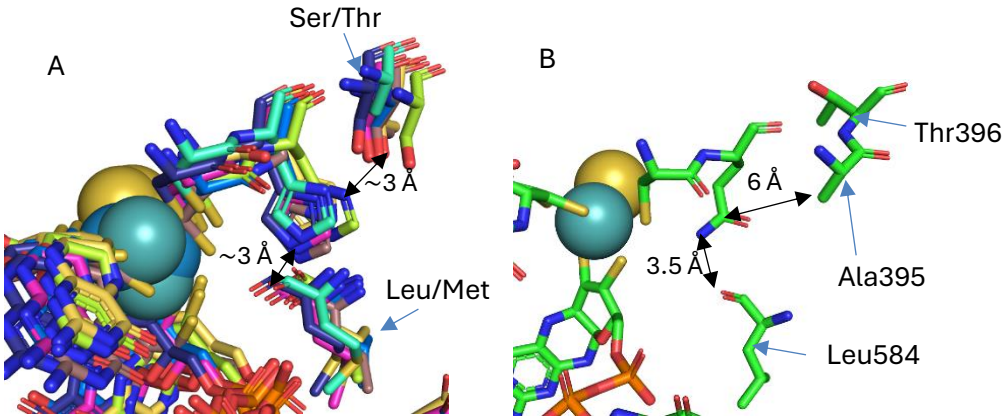


***Figure 47**. **A**. Superposition des structures de FDHs avec His en position 2 avec les acides aminés qui font des liaisons hydrogènes. **B**. Comme A mais pour la structure de ForCE1.*

Notre hypothèse est que la chaîne latérale du résidu Gln392 ne peut adopter la position 2 qui favoriserait un accès direct et facilité au site actif. En effet, la stabilisation de l'His/Gln en position 2 par des liaisons hydrogène pourrait augmenter les probabilités de passage des molécules de substrat, par rapport aux fluctuations aléatoires de l'His/Gln observées entre les positions 1 et 3.

Pour tester si la Gln392 peut prendre la position 2, j'ai substitué le résidu Ala395 par un résidu Ser dans la structure cristallographique de ForCE1 et conduit une simulations de DM d'une durée de 200 ns sur ce variant virtuel. Dans cette simulation, la Gln majoritairement en position

1, bascule en position 2 de 30 à 45 ns environ. Ce déplacement est accompagné de la formation d'une liaison hydrogène entre le groupe carboxyle de sa chaîne latérale et l'hydroxyle de la sérine, ainsi que d'une interaction entre l'amine de sa chaîne latérale et le carboxyle backbone de la Leu584 (Figure 48D). La Figure 48A montre l'évolution de la distance entre le N de la chaîne latérale de la Gln392 et l'oxygène de la chaîne latérale de la Ser395 ou le S inorganique. En position 1, la distance Gln-S inorganique est d'environ 4 à 5 Å. Le zoom (Figure 48B) couvrant la période entre 25 et 50 nanosecondes montre que la Gln, initialement en position 1, à environ 5 Å du S inorganique s'en éloigne jusqu'à 8 Å (basculement en position 2, tracé rouge) et se rapproche à environ 4 Å de la Ser395 (passage d'environ 6 Å à 4 Å, tracé noir). La distance S inorganique-solvant diminue légèrement lorsque la Gln passe en position 2, suggérant une ouverture partielle du passage A. Ces résultats indiquent qu'il est possible de reproduire, chez ForCE1, le comportement observé dans d'autres FDHs, par la substitution d'un résidu situé à une dizaine d'angström du Mo. L'objectif initial consiste à évaluer les activités d'oxydation du formiate et, plus particulièrement, de réduction du CO_2 de ce variant, afin de déterminer si l'accès direct au site actif est amélioré, et de comparer ces activités à celles de l'enzyme native.

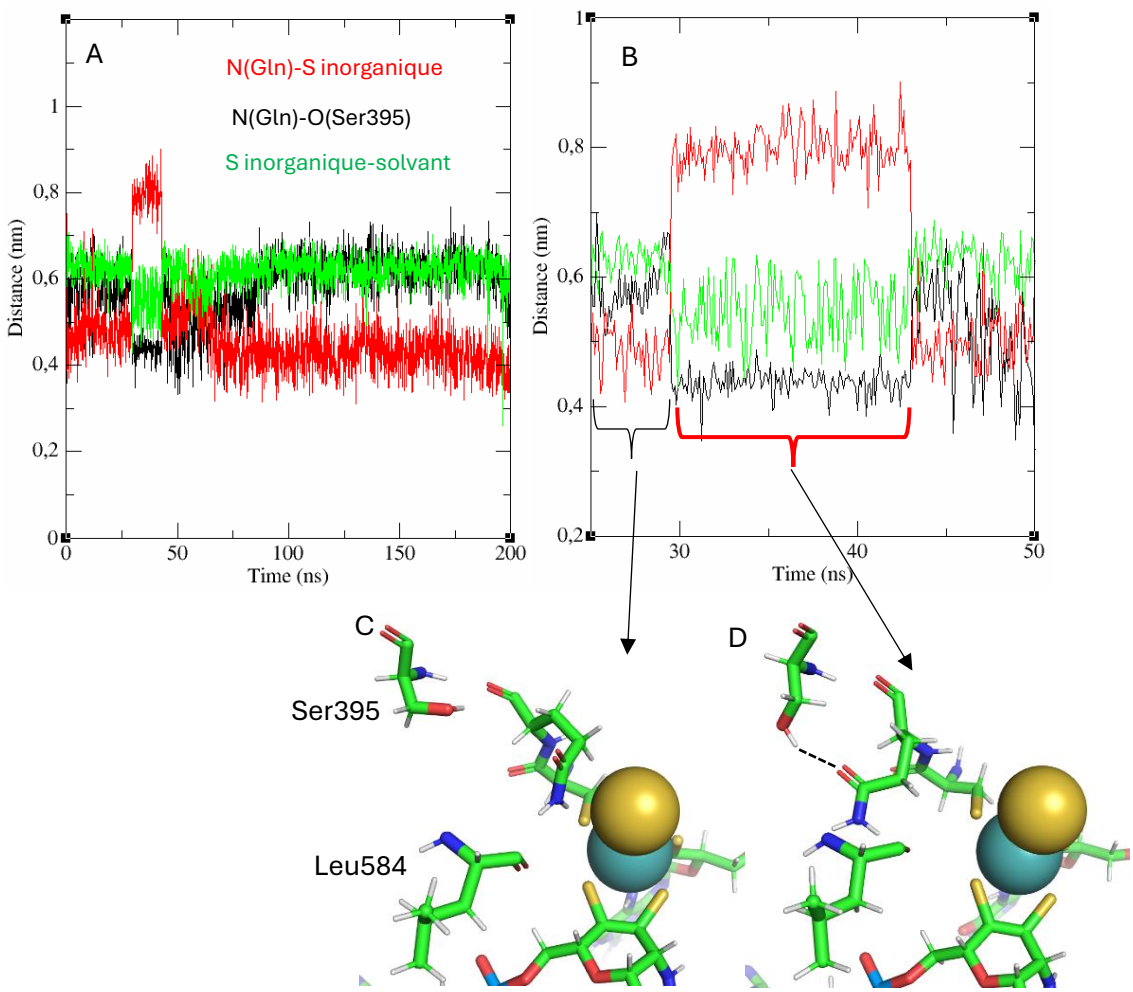


***Figure 48**. DM du variant A395S. **A**. Distance entre le N de la chaîne latérale de la Gln392 et le S inorganique (rouge) ou le O de la chaîne latérale de la Ser395 (noir) et entre le S inorganique et le solvant (vert) en fonction du temps. **B**. Zoom sur la plage entre 25 et 50 ns de A. Snapshot avant 30 ns de simulation (**C**) et après 30 ns (**D**).*

3) Tunnel CO_2

Des tunnels attribués au transport du CO_2 et distincts du tunnel formiate ont été calculés dans les structures des FDH de *D. vulgaris*[25], *R. capsulatus*[57], et les formylméthanofurane déshydrogénases de *M. wolfei*[19] et *C. methanodenaceae*[104]. En effet, dans ces cas, la présence d'un deuxième site actif dans le complexe de l'enzyme ou la possibilité d'un changement de conformation des acides aminés du site actif ont amenés à imaginer la nécessité d'un tunnel CO_2 différent du tunnel formiate (Introduction II)6)). A la lumière de ce qu'on a vu sur le tunnel formiate, le but de cette partie est de questionner cette nécessité pour l'ensemble des structures disponibles.

Alors, A l'aide du logiciel Caver, j'ai recherché, parmi les dix premiers tunnels ayant le meilleur score (Matériel et Méthodes), un tunnel conservé dans chaque FDH sélectionnée. Cependant, ces analyses ne m'ont pas permis d'identifier, pour toutes les structures, un tunnel commun susceptible d'assurer le transport du CO_2. Par ailleurs, l'analyse des tunnels de ForC1 n'a pas révélé de tunnel distinct pour le CO_2, aucun tunnel ne se distinguant par son profil, sa longueur ou son diamètre. Mais ce n'est pas la seule structure où on n'arrive pas à identifier facilement deux tunnels distincts : c'est le cas aussi de la structure de la FdhF d'*E. coli* par exemple, ou même de la sous unité CO_2 réductase du complexe HDCR (Hydrogen Dependant CO_2 Réductase) de *T. kivui* pour lequel le tunnel d'évacuation du formiate est connu, mais pas celui d'accès du substrat. La Figure 49A illustre quelques exemples de positions possibles du tunnel CO_2 pour certaines enzymes. Alors on va réduire la question aux enzymes qui doivent forcément avoir un tunnel CO_2 : est-ce que ces enzymes possèdent un tunnel CO_2 conservé ?

Pour répondre à cette question j'ai calculé les tunnels des structures des formylméthanofurane déshydrogénases et j'ai inclus la sous unité FDH du complexe HDCR parce que c'est la seule structure de CO_2 réductase qui semble avoir un tunnel formiate qui relie le site actif à Mo/W au solvant et pas à un autre site actif, une différence qui justifie son inclusion dans cette analyse. J'y ai aussi inclus les structures des FDH de *D. vulgaris* et *R. capsulatus* pour comparer les tunnels avec les tunnels CO_2 qui ont été attribués dans ces structures (Figure 49A).

Les tunnels des formylméthanofurane déshydrogénases de *M. wolfeii* et *C. methanodenaceae* ont déjà été étudié avec Caver[19,104] et les auteurs proposent les tunnels bleu et cyan comme tunnels CO_2 dans ces deux structures (Figure 49A). Ils sont presque localisés au même endroit et ont un profil en largeur similaire (Figure 49B). J'ai pu retrouver un même tunnel dans les structures de la sous-unité FDH du complexe HDCR et de la formylméthanofurane déshydrogénase de *M. hungatei* (tunnels rose et orange). C'est intéressant de trouver ce tunnel chez la FDH du HDCR, même si la Figure 49B indique qu'il est globalement plus étroit que les trois premiers. Tous ces tunnels sont distincts du tunnel formiate, mais ils empruntent tous le passage A pour arriver au site actif. On remarquera que ces tunnels ne correspondent ni à celui attribué au transport du CO_2 chez la FDH de *D. vulgaris* non réduite au DTT (tunnel marron) ni à celui de la FDH de *R. capsulatus* (tunnel jaune) (voir Introduction II)6)). Aussi, le tunnel CO_2 de la FDH de *D. vulgaris* au repos (tunnel marron) n'est pas retrouvé dans la structure de l'enzyme quand le pont disulfure est cassé (mutant C872A) : le tunnel est bloqué par un Trp (Figure 49C), c'est une conséquence du réarrangement conformationnel que j'ai mentionné au paragraphe I)1)b).

Mais il est difficile d'affirmer que les tunnels bleu, cyan, orange et rose (Figure 49A) des formylméthanofurane déshydrogénases et de la FDH du HDCR représentent un tunnel CO_2 conservé. D'abord, chez les formylméthanofurane déshydrogénases, on peut trouver d'autres tunnels potentiels pour le transport du CO_2, le tunnel rouge que j'ai identifié dans la structure

de celle de *M. hungatei* en guise d'exemple (Figure 49A). Ce tunnel rouge est globalement plus large et plus court d'environ 20 Å que le tunnel orange dans la même structure (Figure 49B), ce qui en fait bon candidat pour le transport de molécules de CO_2. Ensuite, le tunnel rose que j'ai pu mettre en évidence dans le modèle Alphafold de la FDH du HDCR me semble peu probable pour transporter le CO_2 quand on voit que le tunnel principal (tunnel formiate, vert, Figure 49A) de cette CO_2 réductase est plus court d'environ 40 Å et plus large que le tunnel rose de cette même structure (Figure 49B). Même si on garde à l'esprit qu'il s'agit d'un modèle Alphafold, le tunnel formiate parait plus avantageux pour le transport de molécules de formiate comme de CO_2 dans cette structure. Ce tunnel est constitué de sept acides aminés non polaires sur seize et il comprend les cinq acides aminés conservé dont j'ai parlé dans la partie I)1). Les acides aminés non polaires sont répartis tout au long du tunnel et on peut proposer qu'ils favorisent la présence de molécules apolaires à leur proximité, comme des molécules de CO_2 par exemple. Ce rôle des acides aminés hydrophobes a déjà été proposé pour les tunnels attribués au transport du CO_2 dans les FDHs de *D. vulgaris*[25] ou *R. capsulatus*[57].

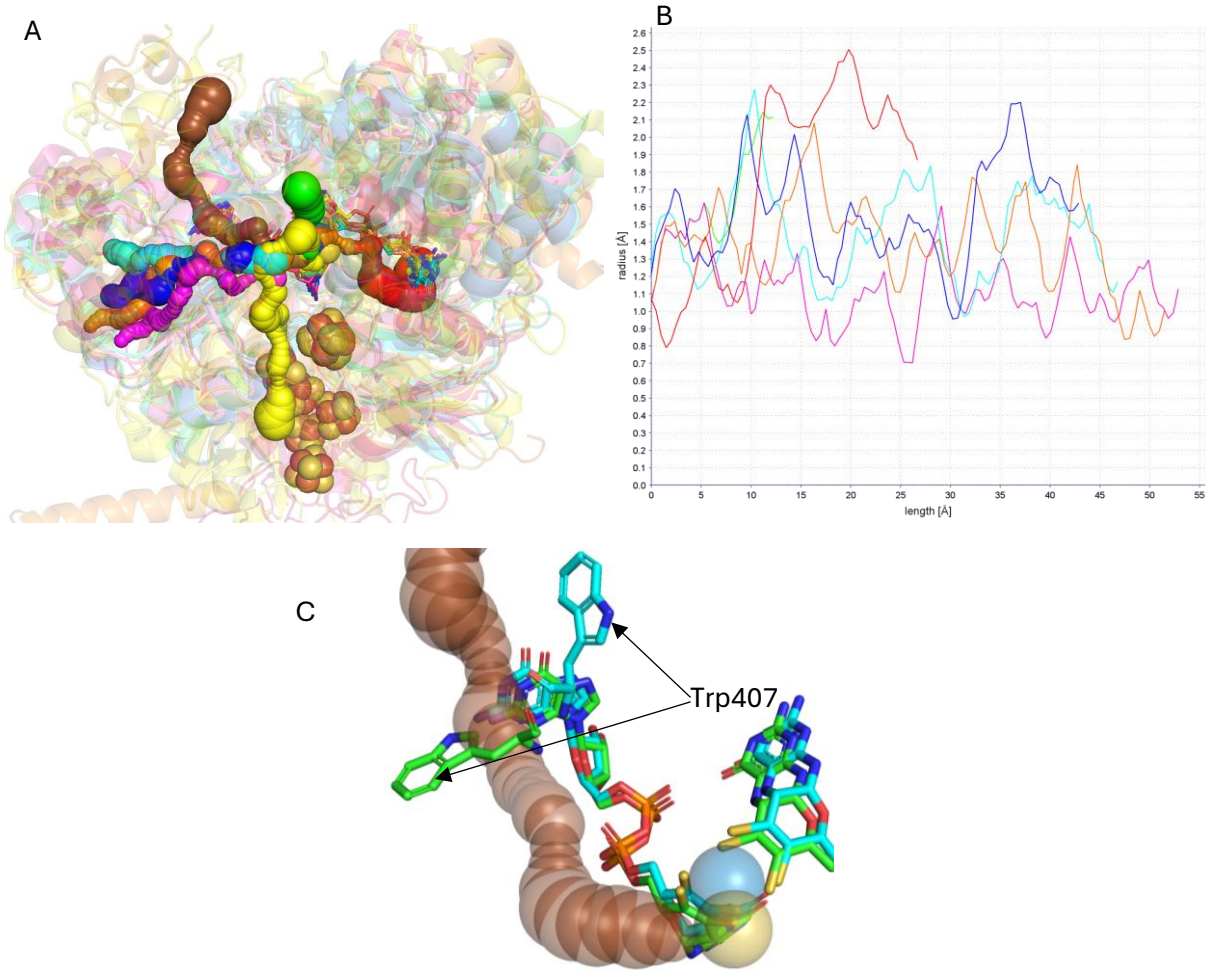


***Figure 49**. Tunnels putatifs pour le transport du CO_2. **A**. Superposition des tunnels CO_2 proposés pour les structures des formylméthanofuran déshydrogénases de M. wolfeii (PDB : 5t5i, tunnel bleu foncé), de C. methanodenaceae (PDB : 8rja, tunnel cyan), de M. Hungatei (PDB : 7bkb, tunnels rouge et orange), du modèle alphafold de la sous unité FDH du complexe HDCR (PDB : 7qv7, tunnels vert et rose), et des FDHs de D. vulgaris réduite (PDB : 6sdv, tunnel marron) et de R. capsulatus (PDB : 6tg9, tunnel jaune). Paramètres des tunnels : probe radius 0.6 Å, shell depth 4 Å (8 Å pour 6tg9), shell radius 3 Å, clustering threshold 3.5 (1 pour 6tg9), maximum distance 3 Å, desired*

*radius 5 Å. **B**. Rayon des tunnels représentés en A. **C**. Superposition des structures de la FDH de D. vulgaris réduite (PDB : 6sdv, en bleu, tunnel marron) et du mutant C872A (PDB : 8cm6, en vert)*

En résumé, il semble qu'il n'existe pas de tunnel CO_2 distinct et conservé du tunnel formiate dans les structures de FDHs, bien que le nombre limité de structures disponibles impose une certaine prudence dans cette conclusion. On peut imaginer que les FDHs des formylméthanofurane déshydrogénases partagent un même tunnel CO_2 commun, compte tenu de leur similarités structurales, malgré une identité de séquence entre 40 et 50%. Je rappelle que l'existence de deux tunnels distincts dans ces enzymes est probable : un tunnel pour transporter le CO_2 jusqu'au site actif de la sous unité FDH et un tunnel intramoléculaire pour amener le formiate produit à un autre site actif dans le complexe (Figure 14 dans II)6) de l'Introduction). Localiser de manière précise le(s) tunnel(s) CO_2 des formylméthanofurane déshydrogénases devrait requérir des simulations de DM.

Mais pour toutes les autres structures, l'existence de deux tunnels distincts ne semble pas nécessaire, les dimensions du tunnel formiate permettent aux molécules de CO_2 de passer par le passage A (sauf dans les trois structures où il y a un rétrécissement).

Pour tester cette hypothèse et étudier le trajet du CO_2 dans ForC1, j'ai effectué une simulation de DM de 100 ns sur la sous unité ForC1 en présence de CO_2. Au début de la simulation, toutes les molécules de CO_2 se trouvent dans le solvant, à l'extérieur de l'enzyme. Au cours de la simulation, le CO_2 pénètre dans le tunnel formiate jusqu'au rétrécissement décrit en I)1) avec Caver (Figure 50), à environ 6 Å du S inorganique. Pendant ce temps, la conformation de la Gln en position 1 demeure inchangée et le CO_2 n'atteint pas directement le site actif. Par ailleurs, aucun autre tunnel permettant le transport du CO_2 depuis le solvant jusqu'au site actif n'a été observé en dehors du tunnel formiate.

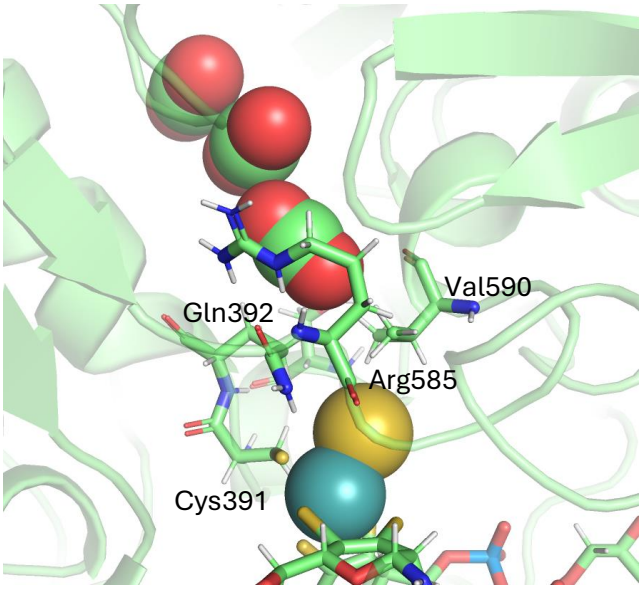


***Figure 50**. Snapshot de la DM en présence de CO_2 (représenté en sphères) dans le tunnel formiate.*

Sur la base de cette observation et des fortes similitudes entre le tunnel formiate de ForCE1 et celui des autres FDHs (hors formylméthanofurane déshydrogénases), on peut supposer

que le CO_2 peut aisément être transporté par ce tunnel dans les autres enzymes en passant par le passage A et donc que, hormis pour les formylméthanofurane déshydrogénases, un tunnel unique est suffisant pour que le formiate et le CO_2 puissent circuler dans les deux directions du tunnel. Par conséquent, on peut penser qu'il n'est pas nécessaire d'avoir deux tunnels différents pour qu'une enzyme fonctionne dans le sens de l'oxydation du formiate ou de la réduction du CO_2.

En résumé de cette partie, il apparaît qu'un unique tunnel permet l'accès au site actif pour les molécules de formiate dans les FDHs et que le CO_2 peut également atteindre ce site par ce passage (à l'exception des formylméthanofurane déshydrogénases). L'analyse des structures disponibles, complétée par des simulations de DM, suggère que l'orientation de la chaîne latérale de l'His/Gln détermine l'accès au site actif, cette conformation pouvant être contrôlée notamment par la présence d'un résidu polaire (Ser/Thr). Dans la partie suivante, j'examinerai dans quelle mesure la géométrie du site actif influence la réactivité de l'enzyme vis-à-vis des substrats, et notamment la directionnalité de la réaction.

II) La réactivité

En termes d'énergie, la réaction $HCOO^- \leftrightarrow CO_2 + H^+ + 2e^-$ nécessite dans un sens comme dans l'autre le passage d'une barrière d'énergie potentielle. Des diagrammes d'énergie du mécanisme réactionnel ont déjà été calculés par des modélisations utilisant la théorie de la fonctionnelle de la densité (DFT)[41,52]. Les travaux de Dong et Ryde[41] indiquent que le mécanisme du transfert d'hydrure (Figure 11) est énergétiquement plus favorable pour la réaction que les autres modèles proposés. Dans ces calculs, le passage de la barrière de potentiel correspond à la perte de la liaison C-H du formiate et à la formation de la liaison S_i-H (état de transition). Ces deux études ont été menées à partir de la structure cristallographique de FdnG d'*E. coli* (PDB : 1kqf) en prenant en compte en partie l'environnement protéique du site actif. L'implication de modifications géométriques de la structure du site actif dans l'énergie de la réaction n'a pas été abordée dans ces travaux. Dans mon étude, en considérant le mécanisme du transfert d'hydrure, j'ai choisi d'étudier, à l'aide de modèles plus simples, dans quelle mesure la géométrie du site actif modifie le profil et la hauteur de la barrière et donc peut contribuer aux biais catalytiques en faveur de l'oxydation du formiate ou de la réduction du CO_2 observés par cinétique enzymatique. Pour étudier cette barrière de potentiel en DFT, j'ai utilisé les structures PDB du mutant C872A de la FDH de *D. vulgaris* puisque cette structure correspond à l'enzyme dans sa forme active (pont disulfure réduit, voir partie I)1)b)) et de l'enzyme non réduite au DTT. Pour simplifier les calculs j'ai élaboré un modèle de site actif minimaliste dans lequel, j'ai remplacé le W par un atome de Mo, et la Sec par une Cys. J'ai tronqué les PGD au niveau de l'oxygène de la partie guanine dinucléotide et au niveau des azotes de la ptérine tandis que la Cys ligand a été tronquée au niveau du carbone et de l'azote de la chaîne polypeptidique (Figure 51). J'ai ajouté une molécule de formiate dont la géométrie a été au préalable optimisée (B3LYP, def2-tzvp) dans le vide. La charge totale a été ajustée pour correspondre à un état Mo(VI), c'est à dire à l'état oxydé du site actif. Le système est dans le vide.

Les facteurs géométriques possibles à étudier sont trop nombreux pour être tous considérés. J'ai choisi d'analyser l'angle formé par le S inorganique, le Mo et le S de la Cys (S_i Mo S_c). En effet, si on imagine quels changements de géométrie peuvent avoir un impact sur la réaction,

ceux impliquant la première sphère de coordination du métal sont les premiers auxquels on pense. De plus, quand on analyse des simulations de dynamique moléculaire menées sur ForCE1 dans l'eau, la variation de l'angle S_i Mo S_c (entre 60° et 80°) est, à mon sens, l'un des changements les plus évidents et à ce titre, c'est celui que j'ai choisi d'étudier.

Pour avoir une estimation du profil de la barrière d'énergie potentielle associée à la réaction, j'ai réalisé un balayage de la surface d'énergie potentielle selon une coordonnée de la réaction : la liaison C-H du formiate. Le profil de la surface d'énergie potentielle peut permettre une estimation de la valeur de la barrière d'énergie et de la géométrie de l'état de transition supposé. Voici le principe de cette méthode. La distance C-H du formiate est incrémentée d'une distance donnée sur un nombre de pas donné. A chaque pas, la distance C-H est donc gelée et une optimisation partielle de la géométrie du système est réalisée.

Les deux modèles que j'ai utilisés sont constitués du site actif minimaliste avec l'angle S_i Mo S_c choisi arbitrairement à 70°. Dans le modèle 1, aucune contrainte sur l'angle n'est appliquée. Dans le modèle 2, l'angle S_i Mo S_c est contraint de rester à 70°. J'ai ajouté une molécule de formiate. La distance entre le C du formiate et le S inorganique est 3.23 Å, ce qui correspond environ à la distance entre ces deux atomes dans l'état de transition dans [41] et [52]. La distance C-H est 1.14 Å et la distance entre le H et S inorganique est 2.1 Å. La distance C-H est incrémentée 8 fois de 0.1 Å de sorte que le H se rapproche du S_i pour simuler le mécanisme du transfert d'hydrure. Il y a 8 incréments pour que la distance finale entre le H et le S_i soit environ 1.3 Å, c'est à dire qu'elle corresponde environ à la distance H-S_i que j'obtiens sur des structures optimisées : 1.35 Å). Pour cela, j'ai dû geler la distance entre le S_i et le C du formiate car la molécule de formiate se déplaçait au cours de l'optimisation, et j'ai aussi gelé l'angle entre le S_i, le H et le C du formiate car le changement d'orientation du formiate rend impossible le transfert d'hydrure. De plus, dans le modèle 1, l'un des PGD subissait une torsion importante au cours du balayage, trop importante pour être réaliste dans une enzyme où les contraintes stériques et électrostatiques des acides aminés contraignent probablement la torsion des PGD. Pour l'éviter, j'ai gelé les quatre atomes de soufre des PGD dans le modèle 1.

La Figure 51A présente l'analyse réalisée sur le modèle 1 et la Figure 51B montre le balayage réalisé sur le modèle 2. Chaque point représente l'énergie du système optimisé à chaque incrément. J'ai attribué arbitrairement le zéro d'énergie à la structure initiale optimisée (appelé « état initial ») avant le premier incrément. Chacune des courbes passe par un maximum d'énergie qu'on va désigner par « maximum énergétique ».

Dans le modèle 1, on remarque tout d'abord que l'angle S_i Mo S_c n'est pas maintenu à 70°, mais vaut 91° pour l'état initial, puis diminue à chaque incrément pour atteindre 81° à l'état final. On observe aussi qu'au maximum énergétique (Figure 51A), la distance C-H est 1.44 Å, la distance H-S_i est 1.8 Å. Dans [41] (TPSS/def2svp), en état de transition, C-H = 1.32 Å et H-Si = 1.6 Å et dans [52] (B3LYP/LACVP*), en état de transition, C-H = 1.42 Å et H-S_i = 1.54 Å. Les distances relatives entre S_i, C et H du maximum énergétique sont comparables avec ce qui a été publié, même si les distances obtenues sont plus grandes que dans nos références. Les différences peuvent venir du fait que les modèles utilisés, le niveau de théorie et la méthode choisie sont différents. Au niveau énergétique, il y a un écart d'environ 5 kcal/mol entre l'état initial et le maximum énergétique et une différence d'environ -15 kcal/mol entre le maximum énergétique et l'état final. Je précise que ces énergies sont seulement les énergies électroniques du système sans les corrections (énergie du point zéro, thermodynamique, solvatation, dispersion). Dans Dong et al.[41] (B3LYP/def2tzvp), la différence d'énergie entre l'état initial et l'état de transition est de 6.6 kcal/mol et celle entre l'état de transition et l'état après transfert d'hydrure est -16 kcal/mol. Dans les travaux de Siegbahn[52] (B3LYP/cc-pvtz(−f),

LAV3P*), la différence entre l'état initial et l'état de transition est de 8.8 kcal/mol et la différence entre l'état de transition et l'état après transfert d'hydrure est aussi -16 kcal/mol. Là encore, les résultats obtenus sont comparables avec nos références. Nos calculs montrent que dans ces conditions, l'oxydation du formiate est thermodynamiquement plus favorable que la réduction du CO_2 puisque l'énergie de l'état initial vaut presque 10 kcal/mol de plus que celle de l'état final. On retrouve un biais thermodynamique en faveur de l'oxydation du formiate dans les travaux précédents [41,52]. Le Tableau 6 montre que le transfert du proton s'est accompagné d'un transfert de charges négatives des atomes du formiate (H, C, O, O) à ceux du site actif, et notamment à ceux de la première sphère de coordination du Mo entre l'état initial et l'état final. Cependant, le transfert de charge n'est pas complet. Si c'était le cas, la somme des charges de Mulliken sur les atomes C, O et O du Tableau 6 à l'état final devrait être nulle, correspondant à la formation d'une molécule de CO_2 qui est neutre. Or, la somme de ces charges est -0.171. Ceci est surement dû au fait que le CO_2 est maintenu proche du site actif à l'état final et donc il doit y avoir des interactions entre eux.

Dans le modèle 2, l'angle S_i Mo S_c est maintenu à 70°. Le calcul a rencontré des problèmes de convergence pour le dernier incrément, donc la Figure 51B présente le balayage de la surface d'énergie potentielle pour sept incréments. Dans cette Figure, on voit que l'énergie du système augmente lorsque la distance C-H augmente jusqu'à atteindre un maximum pour une distance C-H = 1.54 Å, puis diminue jusqu'au septième incrément. Le profil de la surface de potentiel a été modifiée par rapport au modèle 1 : il y a 12 kcal/mol entre l'état initial et le maximum énergétique et -10 kcal/mol entre le maximum énergétique et le septième incrément. Cette Figure illustre une situation plus défavorable pour l'oxydation du formiate que dans le modèle 1 puisque la barrière est environ deux fois plus grande que dans le modèle 1. La barrière pour la réduction du CO_2 (au septième incrément) est environ 3 kcal/mol plus basse que dans le modèle 1 (au septième incrément). Il faut noter que l'énergie de l'état initial du modèle 2 est 9 kcal/mol supérieure à celle de l'état initial du modèle 1, ce qui signifie que, dans ces modèles, la hauteur de la barrière augmente lorsque l'angle passe d'environ 80° à 70°. Pour la suite, il serait intéressant d'étudier le profil de l'énergie potentielle pour d'autres valeurs d'angle S_i Mo S_c, néanmoins, ces résultats permettent tout de même de mieux comprendre comment la barrière de potentiel de la réaction est modulée en considérant la variation de l'angle S_i Mo S_c dû à l'agitation thermique dans les enzymes. De manière intéressante, les charges de Mulliken de l'état initial du modèle 2 sont identiques à celles de l'état initial du modèle 1. Comme pour le modèle 1, on retrouve, un transfert de charges incomplet du formiate au site actif (la somme des charges de Mulliken sur les atomes C, O et O est -0.175) entre l'état initial et l'état final (ici, le septième incrément).

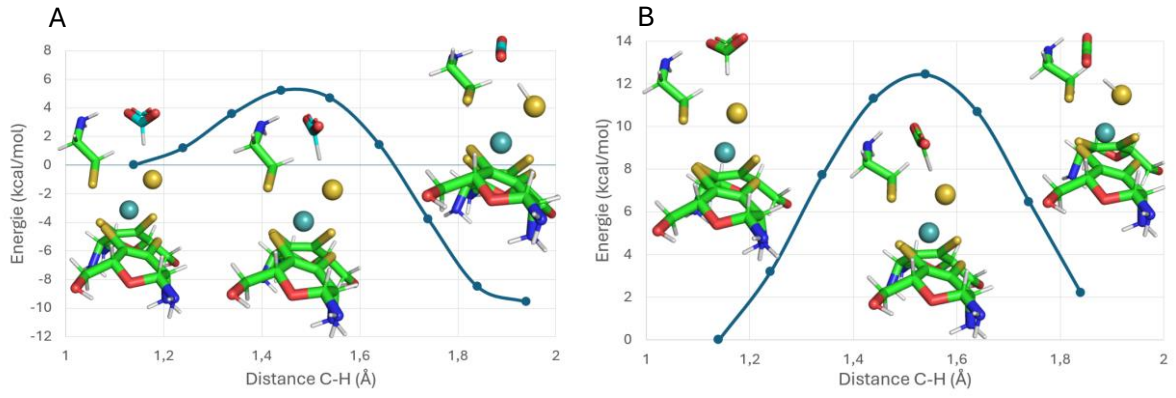


***Figure 51**. Balayage de la surface d'énergie potentielle pour le modèle 1 (**A**) et 2 (**B**). L'énergie du système est représentée en fonction de la distance C-H. Les structures représentées sont celles de l'état initial, du maximum*

énergétique et de l'état final (de gauche à droite). La barre orange du panneau B représente l'énergie de l'état final bis et les traits noirs représentent l'angle S_i Mo S_c.

***Tableau 6**. Charges de Mulliken des atomes du substrat (H, C, O, O) et de la première sphère de coordination du Mo (Mo, S_{PGD}, S_i, S_c) de l'état initial et final des modèles 1 et 2.*

		S_{PGD}	S_c	S_i	Mo	H	C	O	O
Modèle 1	Etat initial	-0.31<S<-0.26	-0.25	-0.23	0.40	-0.05	0.18	-0.50	-0.50
	Etat final	-0.31<S<-0.28	-0.40	-0.46	0.28	0.13	0.25	-0.19	-0.24
Modèle 2	Etat initial	-0.31<S<-0.26	-0.25	-0.25	0.40	-0.05	0.18	-0.50	-0.5
	Etat final	-0.35<S<-0.30	-0.38	-0.45	0.33	0.13	0.26	-0.20	-0.24

A partir des données structurales sur la FDH de *D. vulgaris*, on remarque que la Cys/Sec peut prendre deux orientations différentes. Pour étudier cette orientation, on va relever les valeurs de l'angle dièdre composé par le Mo/W, le S/Se, le Cβ et le Cα de la Cys/Sec (Figure 52) dans les structures cristallographiques des FdHs. Dans les cas de la FdhAB de *D. vulgaris* et de la FDH de *D. gigas* au repos (pont disulfure présent), la valeur de l'angle dièdre est de -121° (Cys/Sec en position 1) alors que pour toutes les autres structures, y compris celles de ForCE1, ces valeurs varient entre +107° et +163° (position 2). Mais l'angle dièdre est de +131° pour la structure du variant C872A de la FdhAB de *D. vulgaris* (pont disulfure rompu) avec l'His en position 2. C'est à partir de la structure du variant C872A que les modèles 1 et 2 ont été élaborés. Ces caractéristiques structurales (Sec et His en position 2) sont associées à une meilleure activité d'oxydation du formiate et de réduction du CO_2[63]. De plus, cette FDH a fait l'objet d'une autre mutation d'un résidu au voisinage du site actif, M405S[107]. La structure de ce mutant montre que l'His est en position 2 mais la Sec est toujours en position 1. L'activité formiate oxydase de ce mutant est divisée par 8 comparé à l'enzyme sauvage, et l'activité CO_2 réductase est divisée par 16[107]. Donc, ici, malgré le fait que le tunnel formiate et le passage A soient probablement ouverts, l'enzyme est moins active, et surtout moins active pour la réduction du CO_2 que l'enzyme réduite au DTT. Les auteurs de ces travaux font donc l'hypothèse que les changements conformationnels induits par la substitution M405S (comprenant celui de la Sec ligand) sont responsables de la baisse d'activité de ce variant[107].

Pour ForCE1 (pour laquelle aucune activité de réduction du CO_2 n'a été détectée), si la structure cristallographique montre le ligand Cys en position 2, la résolution de la structure (2.7 Å) est insuffisante pour que cette orientation soit déterminée de manière fiable. Ceci est illustré dans la Figure 52 par la superposition de la structure cristallographique de ForCE1 (vert) et de la carte des densités électroniques (grille rouge). Est-ce que l'orientation de la Cys ligand peut contribuer au biais catalytique en défaveur de la réduction du CO_2 observé chez ForCE1 ?

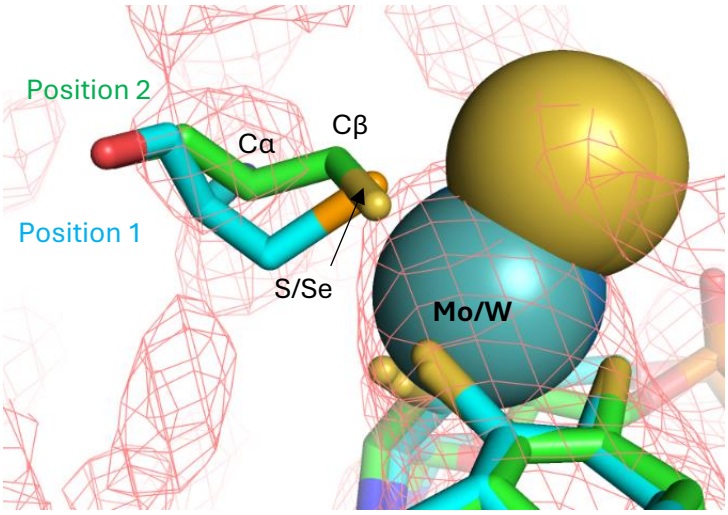


***Figure 52**. Superposition des sites actifs de ForCE1 (vert, PDB : 8rqz) et de la FDH de D. vulgaris au repos (bleu, PDB : 6sdr). Les Cys/Sec sont représentées en sticks. La carte de densité électronique résolue pour ForCE1 est représentée en grille rouge*

Pour tester l'effet de l'orientation de la Cys, j'ai effectué un balayage de la surface d'énergie potentielle selon la même coordonnée de la réaction que dans les modèles précédents, mais cette fois à partir du site actif de la FDH de *D. vulgaris* au repos (Sec en position 1), sans changer l'angle S_i Mo S_c (modèle 3). La délimitation du modèle et le mode opératoire sont les mêmes que précédemment. La distance entre le C du formiate et le S inorganique est 3.21 Å, la distance C-H est 1.14 Å et la distance entre le H et S inorganique est 2.1 Å.

L'énergie de l'état initial du modèle 3 est 10.6 kcal/mol inférieure à celle de l'état initial du modèle 1. Donc on peut considérer ce modèle 3 comme plausible dans une FDH.

La Figure 53 montre le balayage. Le maximum énergétique est atteint après 3 incréments. Donc, la distance C-H est 1.44 Å, la distance H-Si est 1.8 Å, comme pour le modèle 1. Il y a environ 1 kcal/mol entre l'état initial et le maximum énergétique et 18 kcal/mol entre le maximum énergétique et l'état final. Il y a donc, dans ce modèle 3, un biais catalytique en défaveur de la réduction du CO_2 plus marqué que pour le modèle 1. En effet, si la barrière énergétique pour réduire le CO_2 est un peu plus grande que dans le modèle 1, on constate également que dans ces conditions, la barrière pour oxyder le formiate est presque inexistante, ce qui indique que l'état initial est faiblement stabilisé. Il faut noter que si ce résultat permet de proposer que la position 1 de la Cys/Sec ligand joue un rôle dans la faible activité de réduction du CO_2, la question reste entière concernant la différence d'activité d'oxydation du formiate observée chez la FDH de *D. vulgaris* réduite ou non au DTT.

Comme pour les deux premiers modèles, l'analyse des charges de Mulliken (Tableau 7) montre un transfert de charge incomplet du formiate au site actif au cours du balayage (la somme des charges de Mulliken sur les atomes C, O et O est -0.105).

Ces résultats appellent d'autres simulations qui devraient prendre en compte un environnement plus large et la recherche d'états de transition pour modéliser plus précisément les différences énergétiques engendrées par l'orientation du ligand protéique.

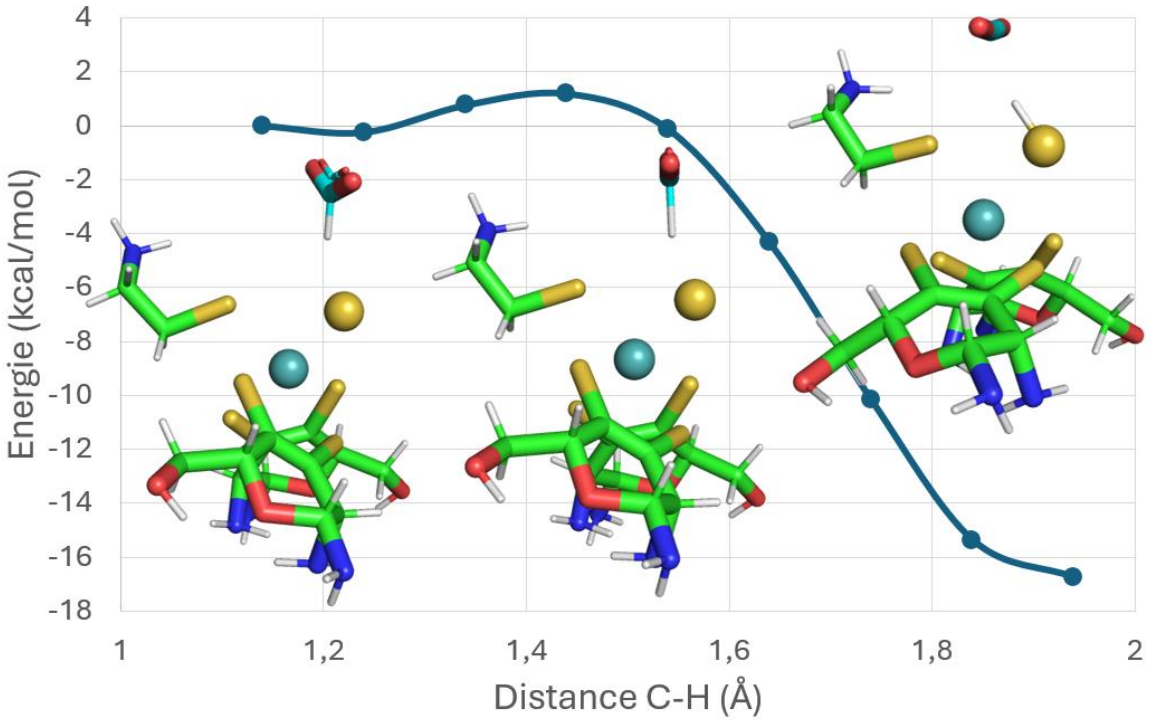


***Figure 53**. Balayage de la surface d'énergie potentielle pour le modèle 3. Les structures représentées sont celles de l'état initial, du maximum énergétique et de l'état final (de gauche à droite).*

***Tableau 7**. Charges de Mulliken des atomes du substrat et de la première sphère de coordination du Mo de l'état initial et final du modèle 3.*

		S_{PGD}	S_c	S_i	Mo	H	C	O	O
Modèle 3	Etat initial	-0.31<S<-0.21	-0.28	-0.30	0.40	-0.03	0.19	-0.48	-0.49
	Etat final	-0.33<S<-0.29	-0.35	-0.46	0.33	0.10	0.28	-0.19	-0.19

III) Site actif

1) Caractérisation de deux espèces de Mo(V) dans ForCE1

a) L'espèce 1 n'est pas couplée à un proton échangeable

On a vu dans la partie II)4) de l'Introduction que le mécanisme réactionnel des FDHs est en débat, en particulier concernant la question de la décoordination du ligand protéique et de la liaison directe du substrat au métal. On a aussi vu que dans les FDHs de *C. necator*[46], *D. desulfuricans*[47] et la FDH F d'*E. coli*[37], la détection d'un couplage hyperfin résolu par spectroscopie RPE CW entre du Mo(V) et un proton qui peut être échangé avec celui du formiate est un élément en faveur du mécanisme de transfert d'hydrure selon lequel le formiate transfère un hydrure au soufre inorganique du site actif (Figure 54)[46].

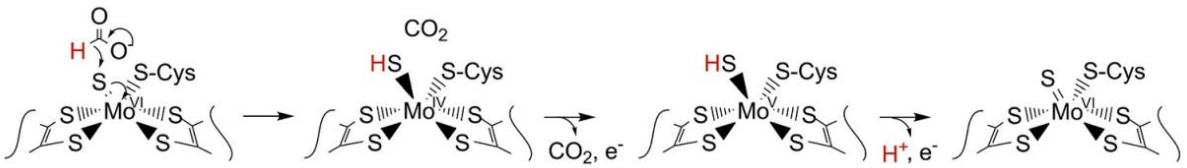


***Figure 54**. Mécanisme proposé pour le transfert d'hydrure. Extrait de [46].*

D'abord, j'ai voulu savoir si un couplage hyperfin Mo-proton avait été détecté dans d'autres FDHs et si le proton était forcément échangeable. Un examen d'études précédentes sur des FDHs montre une diversité de situations concernant le couplage Mo(V) proton. Le Tableau 8 donne des exemples non exhaustifs de valeurs de couplage Mo(V)-proton résolus par RPE CW pour des FDHs à Mo dans la littérature. A ma connaissance, aucune étude ne fait mention de couplage résolu entre du W(V) et des protons pour les FDHs à W. L'analyse de la littérature permet de tirer plusieurs conclusions. D'abord, il y a des couplages hyperfins avec des protons échangeables et non échangeables qui varient de 7.5 MHz (FDH F d'*E. coli*) à 30 MHz (FDH de *D. desulfuricans*). Ensuite, les valeurs de couplage ne permettent pas de distinguer les protons échangeables de ceux qui ne le sont pas. Par ailleurs, plusieurs travaux montrent que le Mo(V) peut être couplé à deux protons différents, l'un échangeable et l'autre non (Tableau 8). Seules deux études[37,46] décrivent des couplages hyperfins avec un unique proton échangeable. Je n'ai trouvé aucune étude sur FDHs qui montre un couplage hyperfin Mo-proton avec uniquement un proton non échangeable. Mais on trouve ce cas de figure par exemple chez NapA de *D. desulfuricans* qui possède la même première sphère de coordination du Mo que les FDHs. Donc si un proton est couplé à un Mo(V), ce n'est pas systématiquement un proton échangeable.

On a vu que les couplages hyperfins avec des protons échangeables peuvent varier sur une plage d'intensité relativement large. J'ai voulu savoir si la présence d'un proton lié au soufre inorganique peut générer un couplage hyperfin avec du Mo(V) dans cette plage d'intensité, comme cela est proposé dans les hypothèses du transfert d'hydrure ou du mécanisme OAT. Pour répondre à cette question, j'ai effectué un calcul de DFT sur un modèle tronqué de site actif à partir de la structure cristallographique de ForCE1 (Figure 55). Pour cela, j'ai réalisé une optimisation de géométrie sans contraindre les atomes, puis j'ai utilisé la géométrie optimisée pour calculer les paramètres de couplages hyperfins entre le Mo(V) et les protons environnants (Matériel et Méthodes X)). Les trois plus grandes valeurs obtenues associées aux protons désignés comme DFT H1, H2 et H3, sont rassemblées dans le Tableau 8. Les valeurs du couplage entre le Mo(V) et le proton du S_i-H (DFT H1) sont compatibles avec les valeurs de couplage entre le Mo(V) et le proton échangeable détecté dans les autres FDHs. Cependant, pour ce modèle, le couplage avec un des protons non échangeables de la Cys (DFT H2) n'est pas négligeable et est du même ordre que certaines valeurs trouvées dans la littérature. On observe un écart important concernant les intensités de couplage entre DFT H1 et H2 d'une part, et DFT H3 d'autre part.

***Tableau 8**. Valeurs principales du tenseur de couplage hyperfin Mo(V)-protons pour différentes enzymes. Les valeurs de couplage sont violettes si le proton concerné est échangeable, vertes s'il est non échangeable, et noires si l'échangeabilité n'a pas été déterminée.*

FDH	$A_{1,2,3}$ (MHz)	Attribution proposée	$g_{1,2,3}$	ref
Fds *C. necator*	18 21 18	Sulfhydrile	2.009 2.001 1.992	46
FDH F *E.coli*	7.5 18.9 21	His141	2.094 2.001 1.990	37
FDH *D. desulfuricans*	H1 23.1 30 27.9	Sulfhydrile ou hydroxile	2.012 1.996 1.985	47
	H2 35 ND ND	Cβ Sec ligand		
Fds *R. capsulatus*	H1 12.5 11.5 10.1	-	2.013 1.999 1.990	66
	H2 15 19.3 15.4	-		
FDH *M. formicium*	H1 12.6 15.4 14	-	2.020 2.006 1.997	108
	H2 12.6 15.4 14	-		
Nap A *D. desulfuricans*	12.9 14 12.9	Cβ Cys ligand	2.000 1.990 1.982	109
ForCE1 espèce 1	18.9 2.3 11.3	-	2.000 1.992 1.987	67
ForCE1 modèle DFT	H1 12.6 13.8 19.4	Sulfhydrile	2.013 1.992 1.982	**Ce travail**
	H2 8.9 9.3 13.2	Cβ Cys ligand		
	H3 3.0 3.2 4.8	PGD		

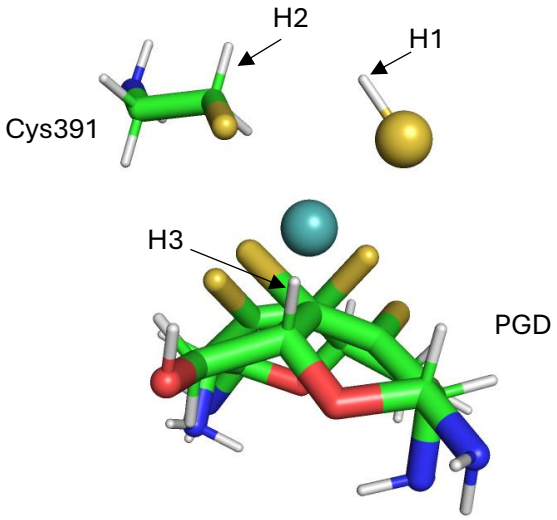


***Figure 55**. Modèle optimisé à partir de la structure cristallographique de ForCE1 utilisé pour le calcul des paramètres hyperfins par DFT. Les protons responsables des trois couplages hyperfins les plus intenses sont indiqués par des flèches.*

Etant donné, d'une part, le comportement catalytique étonnant de ForCE1 qui ne réduit pas le CO_2 et qui peut être le signe d'un mécanisme réactionnel différent de ceux qui ont été proposés jusqu'à présent, et d'autre part la détection d'un couplage hyperfin entre l'espèce 1 du Mo(V) de ForCE1 et un proton dont les valeurs principales sont $A_{1,2,3}$= 18.9, 12.3, 11.3 MHz, du même ordre que celles qui ont été mesurées pour d'autres FDHs, on a décidé d'étudier le caractère échangeable du proton responsable du couplage hyperfin avec l'espèce 1 du Mo(V) de ForCE1.

Les spectres de l'espèce 1 du Mo(V) ont été mesurés au pH auquel l'enzyme est la plus stable[64] (c'est-à-dire pH = 6), à une puissance de 1 mW et une amplitude de modulation de 1 G pour avoir une résolution suffisante pour étudier la structuration du signal, et à une température de 50 K pour supprimer la contribution spectrale des centres FeS qui relaxent rapidement. La Figure 56A montre le signal expérimental de l'espèce 1 dans H_2O ainsi que, à titre informatif, la simulation de ce signal attendu après substitution du proton par du deutérium dans le cas d'un couplage échangeable. J'ai également inclus le signal du radical de la semiquinone parce que sa proximité avec le signal du Mo(V) peut l'affecter. Dans cette simulation, le signal du Mo(V) de valeurs de $g_{1,2,3}$=1.9999, 1.9924, 1.9874 couplé à un noyau de deutérium ne présente plus la structuration hyperfine du couplage avec un proton parce que le couplage avec le deutérium (I = 1) est trop faible pour être détecté dans ces conditions de mesures. En effet, son intensité, comparée à celle du couplage Mo(V)-proton, est divisée par 6.5, correspondant au rapport des facteurs gyromagnétiques du deutérium et du proton.

La Figure 56B montre deux spectres RPE du Mo(V) de deux échantillons oxydés à l'air de ForCE1. Ces spectres ont été enregistrés à partir de deux échantillons issus de deux purifications différentes associées à deux cultures différentes de *B. subtilis* et ont été préparés dans de l'eau deutérée (Matériel et Méthodes II)). La structuration du signal RPE du Mo(V) causée par le couplage hyperfin dû au proton est bien présente dans les deux spectres, ce qui indique que le proton n'est donc pas échangé. Ce proton ne peut par conséquent pas être attribué à un hydrogène lié au S inorganique. Ce résultat indique que le soufre inorganique ligand du Mo(V) dans le site actif de ForCE1 est très probablement déprotoné. Cette

conclusion est en accord avec celle de [51] sur ForCE1. Dans cette étude, le potentiel de la transition Mo(V)-Mo(IV) décroit de -60 mV par unité de pH, alors que celui de la transition Mo(VI)-Mo(V) est indépendant du pH (Figure 13B, Introduction). Ceci indique qu'une déprotonation du site actif a lieu entre l'état Mo(IV) et Mo(V), donc que les états Mo(V) et Mo(VI) ne sont pas protonés.

On abordera la question de l'attribution de ce couplage par des calculs de DFT dans la partie c).

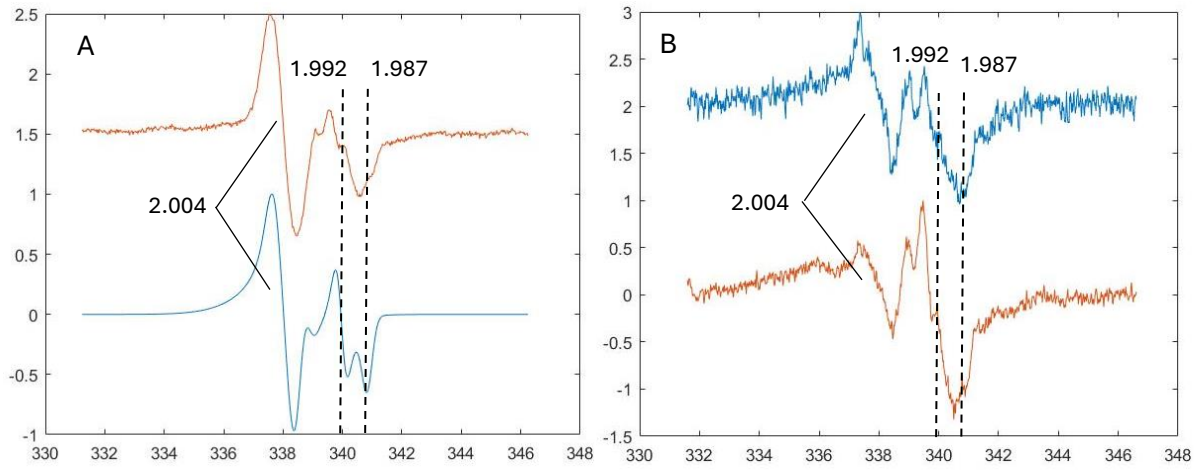


***Figure 56**. Spectres RPE de l'espèce 1 du Mo(V) d'échantillons de ForCE1 préparés en solvant aqueux (A) ou deutéré (B). **A**. **Orange**. Spectre expérimental de l'espèce 1 du Mo(V) de ForCE1 en solvant aqueux. Paramètres expérimentaux : pH 6, 50 K, 1 mW, 1G, 36 accumulations. **Bleu**. Simulation du spectre expérimental mais en prenant en compte un couplage Mo(V)-deutérium. Paramètres de simulation : largeur de raie du radical (g=2.004) simulé par HStrain (13.7, 100.3, 13.4 MHz), largeur de raie du Mo(V) simulé en prenant en compte un couplage hyperfin avec un noyau de deutérium dont les valeurs principales du tenseur sont $A_{1,2,3}$= 2.90, 1.89, 1.74 MHz et HStrain (9.9, 9.8, 10.7 MHz). **B**. Spectres expérimentaux de l'espèce 1 du Mo(V) de deux échantillons de ForCE1 oxydés à l'air. Paramètres expérimentaux : identiques qu'en A sauf 20 accumulations. Les lignes verticales en pointillés servent à repérer les valeurs de g. Les échantillons de B ont d'abord été réduits au dithionite à -220 mV (orange) et -193 mV (bleu) avant d'être réoxydés à l'air.*

Par la suite, il serait intéressant d'étudier ce signal d'espèce 1 en solvant deutéré en HYSCORE pour avoir une vision plus précise des couplages en jeux.

b) L'espèce 2 n'est pas couplée à un proton échangeable

Une deuxième espèce du Mo(V) avait été mise en évidence dans nos laboratoires[67]. Contrairement à l'espèce 1, l'espèce 2 ne montre pas de couplage hyperfin résolu sur son spectre en bande X (Figure 57A). On s'est aussi demandé si l'espèce 2 est couplée à un proton spécifique et s'il est échangeable le cas échéant. La Figure 57A montre le spectre RPE de l'espèce 2 en solvant aqueux. C'est un signal rhombique de valeurs de $g_{1,2,3}$=2.021, 1.9852, 1.9692. On peut y voir aussi le radical de la quinone. Pour vérifier s'il peut y avoir un couplage hyperfin significatif mais non résolu sur le signal, j'ai simulé ce spectre en intégrant dans la simulation un couplage hyperfin avec un proton. Ce travail montre qu'on peut simuler le spectre sans faire apparaître de structuration hyperfine avec un tenseur hyperfin dont les valeurs principales sont autour de 9 MHz. Par exemple, la simulation présentée a été réalisée avec les valeurs $A_{1,2,3}$=10, 7 et 11 MHz (Figure 57A). Bien qu'un peu plus faibles, ces valeurs sont

de l'ordre de celles mesurées précédemment sur l'espèce 1. Ceci indique qu'il pourrait y avoir un proton dans l'environnement proche de l'espèce 2 Mo(V) dont le couplage ne serait pas détecté sur le spectre. A noter que ces valeurs de couplage représentent les valeurs maximales associées à un proton putatif dans l'environnement de l'espèce 2 du Mo(V). Pour vérifier s'il peut s'agir d'un proton échangeable, j'ai comparé le signal de l'espèce 2 généré dans un échantillon préparé en solvant deutéré avec celui issu d'un échantillon préparé en solvant aqueux (Matériel et Méthodes II)). Dans l'échantillon en solvant deutéré, l'échange d'un proton par du deutérium dans l'environnement de l'espèce 2 devrait se traduire par la diminution de la largeur des raies sur le spectre comparé à l'échantillon en solvant aqueux. La Figure 57B montre la superposition des deux spectres correspondants enregistrés en conditions non saturante et non surmodulée (4mW, 4G). On peut voir qu'il n'y a pas de différence de largeur des pics dérivé et négatif de l'espèce 2 entre les deux échantillons. La Figure 57C montre la superposition de spectres de l'espèce 2 en solvant aqueux (bleu) et deutéré (orange) dans des conditions qui permettent une meilleure résolution en valeur de *g* (1mW, 1G), mais au détriment du rapport signal sur bruit par rapport aux conditions de la Figure 57B. En normalisant les signaux à la même intensité du pic positif, on voit qu'il n'y a pas d'élargissement du pic positif non plus. Mes résultats indiquent l'absence de couplage significatif entre l'espèce 2 du Mo(V) et un proton échangeable. La situation apparaît donc similaire à celle de l'espèce 1 dans le sens que le soufre inorganique est vraisemblablement déprotoné dans les 2 espèces.

Dans les spectres des panneaux B et C de la Figure 57, en plus de l'espèce 2, on identifie également un signal radicalaire à *g* = 2.004 attribué à une espèce semiquinone ainsi qu'un signal autour de *g*=1.99 attribuable à l'espèce 1. Par ailleurs, dans le panneau C, deux pics sont présents à *g*=1.987 et 1.977 qu'on attribuera par la suite aux pics dérivé et négatif d'une troisième espèce de Mo(V), l'espèce 3 (voir partie sur le mutant Q392H en 2) de cette partie).

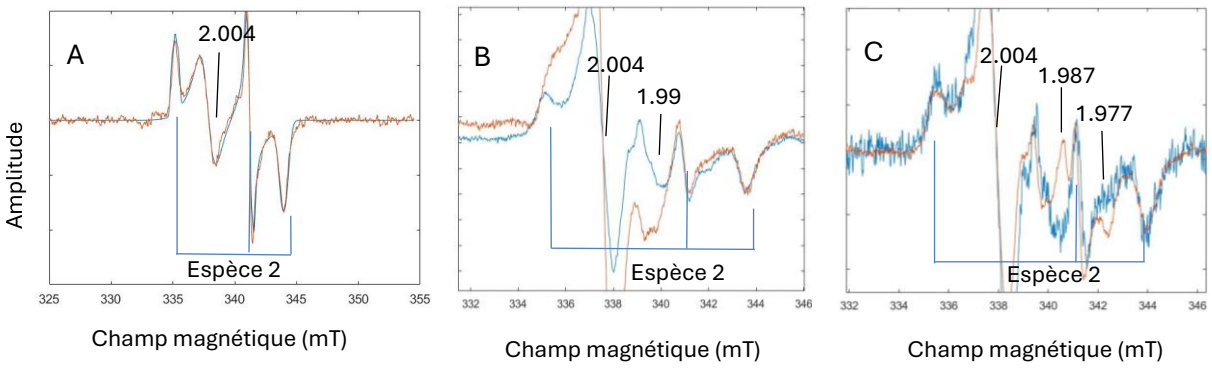


***Figure 57**. Spectres RPE de l'espèce 2 du Mo(V) de ForCE1. **A**. Spectre expérimental (**orange**) et simulation (**bleu**). Paramètres de simulation : largeur de raie du radical simulé par HStrain (44, 24.9, 128.6 MHz), largeur de raie du Mo(V) simulé par un tenseur hyperfin $A_{1,2,3}$= 10, 7, 11 MHz et HStrain (5, 5, 15MHz). **B** et **C**. Superposition des spectres RPE de ForCE1 en solvant aqueux (**bleu**) et deutéré (**orange**). Paramètres expérimentaux : pH 7.5 (**A**), pH 6 (**B**, **C**), 0 mV (**A**), -109 mV (**bleu, B, C**), -100mV (**orange, B**), -220 mV (**orange, C**), 1 mW, 5G (**A**), 4mW, 4G (**B**), 1mW, 1 G (**C**), 36 accumulations (**A**), 10 accumulations (**B**), 31 accumulations (**C**, **bleu**) et 36 accumulations (**C**, **orange**).*

Pour étudier plus en détail les couplages hyperfins entre le Mo(V) et les noyaux environnants, on a étudié l'échantillon deutéré de la Figure 57C par spectroscopie HYSCORE. C'est le même échantillon que celui de la Figure 56B (orange) avant sa réoxydation. Les signaux ne sont pas assez intenses pour étudier les couplages. Par contre, à τ =134 ns, la présence d'un pic

diagonal à la fréquence de Larmor du deutérium (Figure 58) indique la présence de deutérium à une distance typiquement inférieure à 10 Å du Mo(V) et donc que l'échange par du solvant deutéré est effectif.

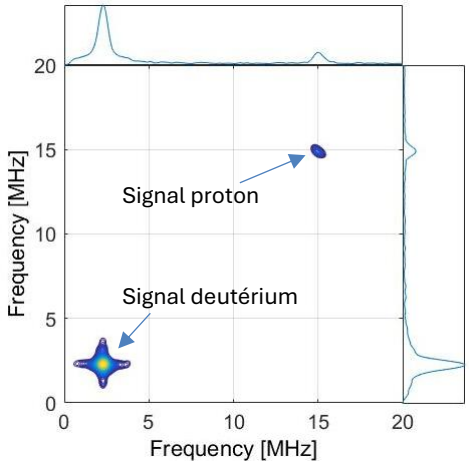


***Figure 58**. Spectre HYSCORE d'un échantillon de ForCE1 en solvant deutéré préparé à un potentiel de -220 mV. Température 50 K, τ =134 ns, durée de l'impulsion π 24 ns, durée de l'impulsion $\pi/2$ 16 ns, incrément de temps 16 ns, champ magnétique 350.4 mT, fréquence microonde 9.7012 GHz. Le spectre a été enregistré pour une valeur de g=1.978.*

Le potentiel redox de l'espèce 2 du Mo(V) dans ForCE1 a fait l'objet de titrages à pH 6 et 7.5 dans des travaux précédents[67] (Figure 59A et B). A pH 6, étant donné les difficultés rencontrées pour évaluer le potentiel rédox de la transition Mo(VI)-Mo(V), j'ai reproduit un titrage potentiométrique à pH 6. J'ai mesuré à chaque potentiel l'amplitude du pic négatif (*g*=1.969) de l'espèce 2 car c'est celui qui n'est pas perturbé par les autres signaux détectés. La Figure 59C montre l'évolution de l'amplitude de ce signal en fonction du potentiel ambiant de la solution. Ces mesures sont ajustées à une équation de Nernst à deux transitions électroniques comme attendu pour un atome de Mo effectuant des transitions entre les états Mo(VI), Mo(V) et Mo(IV). D'après les abaques sur les titrages de centre redox à deux transitions (Figure 59D), la largeur à mi-hauteur de la courbe de titrage (~160mV) indique que les potentiels des deux transitions ne sont pas croisés. Plus précisément, l'ajustement optimal avec la loi Nernst conduit à $E^0_{VI/V}$=-34±9 mV et $E^0_{V/IV}$=-198±8 mV. Précédemment dans nos laboratoires, l'espèce 2 avait été titrée à pH 7.5 (Figure 59B) et calculé les potentiels $E^0_{VI/V}$=112±10 mV et $E^0_{V/IV}$=-300±10 mV. La différence des $E^0_{V/IV}$ aux 2 valeurs de pH étudiées se traduit par une décroissance d'environ -70 mV par unité de pH, une valeur proche de celle de -60 mV par unité de pH associée au transfert couplé d'un électron et d'un proton. Donc il semblerait que le site actif subisse un évènement de protonation/déprotonation couplé à la transition rédox entre le Mo(V) et le Mo(IV). Dans l'hypothèse du transfert d'hydrure[46], le soufre inorganique est supposé protoné en état Mo(IV). Ce résultat suggère que la déprotonation a lieu entre les états Mo(IV) et Mo(V) dans ForCE1 à pH6, donc que le soufre inorganique est déprotoné dans l'état Mo(V). Il faut noter que ce raisonnement est indépendant d'un modèle de réactivité et pourrait s'appliquer aussi pour l'hypothèse du mécanisme OAT décrit dans [38] (voir la partie II)4)a) de l'introduction).

Concernant le potentiel $E^0_{VI/V}$, il y a une différence d'environ +150 mV du pH 6 au pH 7.5. Là, on pourrait faire l'hypothèse que l'augmentation du pH entraine des modifications de la

géométrie du site actif et/ou des acides aminés environnants qui ont pour conséquence d'augmenter le potentiel de la transition Mo(VI)/Mo(V). Compte tenu de cette hypothèse, on ne peut pas exclure que les mêmes raisons aient conduit au décalage de la transition $E^0_{V/IV}$ entre les pH 6 et 7.5. C'est un point qui reste à explorer plus en détail.

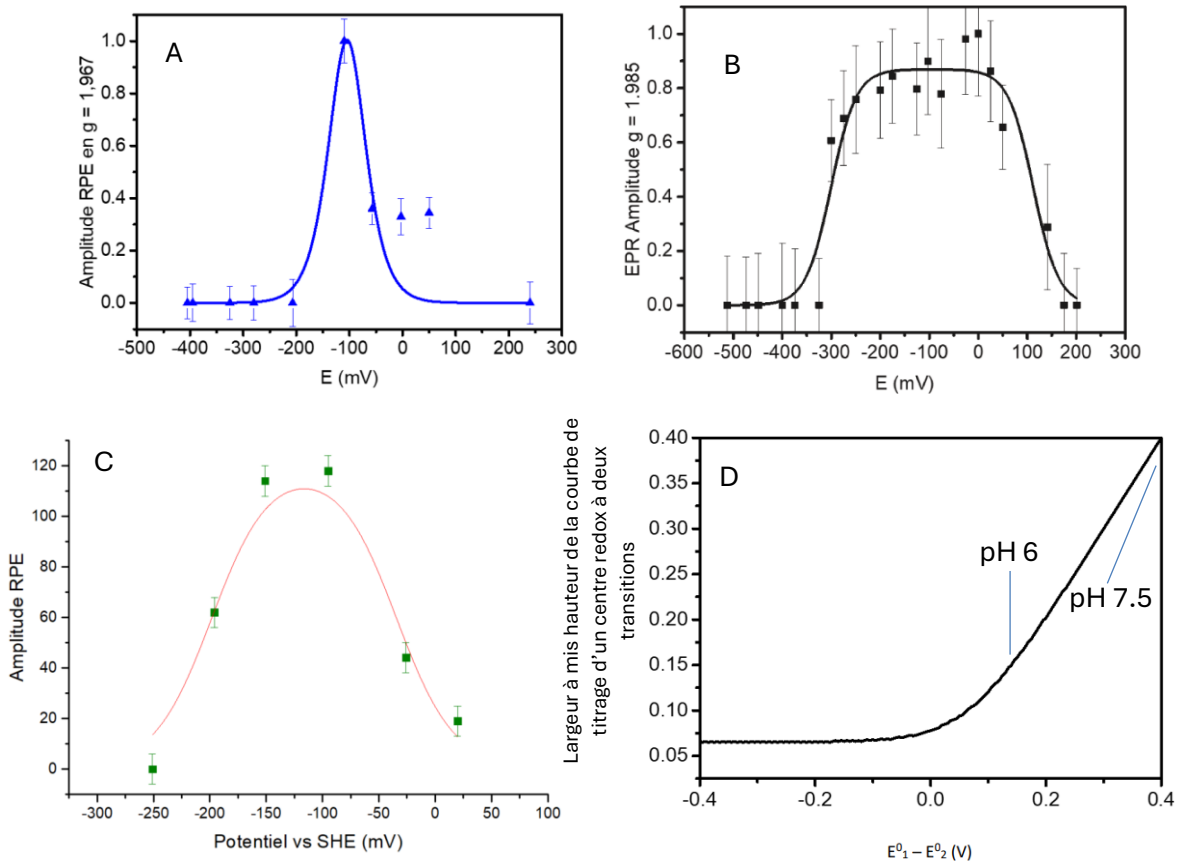


***Figure 59**. Titrage potentiométrique de l'espèce 2 du Mo(V) à pH 6 suivi par spectroscopie RPE. **A** et **B.** Titrages obtenus lors de travaux précédents à pH6 (A) et 7.5 (B). Paramètres expérimentaux : 50K, 10 mW, 10 G. Extraits de [67]. **C**. Titrage réalisé à pH 6 dans ce travail. Paramètres expérimentaux identiques à A. **D**. Abaque représentant la largeur à mi-hauteur d'une courbe de titrage d'un centre redox à deux transitions en fonction de la différence des potentiels de chaque transition. Extrait de [67]. Les valeurs de $E^0_{V/V}$-$E^0_{V/IV}$ de l'espèce 2 sont indiquées à pH6 et 7.5.*

c) Modélisation DFT des espèces 1 et 2 du Mo(V)

Ici, on utilise la DFT pour expliquer les valeurs de *g* et de couplages hyperfins des espèces 1 et 2 de Mo(V) de ForCE1 par des modèles structuraux.

D'abord, on commence par des modèles structuraux très simples, qu'on va complexifier à chaque fois un peu plus pour connaitre l'impact sur les valeurs de *g* et les couplages hyperfins de chaque étape de complexification, ce qui nous permettra ensuite de proposer des modèles pour rendre compte des observables magnétiques extraites de l'analyse des spectres RPE. Les caractéristiques des modèles étudiés sont rassemblées dans le Tableau 11).

En point de départ, j'ai utilisé la structure cristallographique de ForCE1 (PDB : 8rqz) pour élaborer un modèle tronqué du site actif : les PGD sont coupés au niveau de l'oxygène de la partie guanine dinucléotide et au niveau des azotes de la ptérine tandis que la Cys ligand est

tronquée au niveau du carbone et de l'azote backbone (modèle 1, Figure 60A). La charge est ajustée pour correspondre à un état Mo(V) avec le S_i déprotoné et j'ai calculé les valeurs de *g* et les couplages hyperfins entre les protons et le Mo(V) du système sans optimisation de géométrie et dans le vide car c'est la manière la plus simple de procéder. Les résultats sont rassemblés dans le Tableau 9. Pour les couplages hyperfins, je ne présente que les couplages Mo(V)-protons les plus proches des valeurs déterminées à partir des spectres RPE de l'espèce 1 (pas de l'espèce 2 car aucun couplage n'est résolu sur les spectres), et à défaut, les valeurs des deux ou trois couplages Mo(V)-proton les plus forts.

On se rend compte que les valeurs de *g* sont relativement proches de celles de l'espèce 2. En effet, l'écart maximum de valeurs de *g* est de 0.017 pour le g_1. Les valeurs de couplage hyperfin Mo(V)-proton les plus grandes, $A_{1,2,3}$=2.2, 2.9, 6 MHz, correspondent au couplage avec l'un des protons du Cβ du ligand Cys du Mo. Ces valeurs sont plus basses que les valeurs maximales qu'on peut déterminer à partir des simulations du spectre expérimental de l'espèce 2.

Maintenant, on peut complexifier un peu plus le modèle. Etant donné que dans les structures cristallographique et cryo-EM de ForCE1, la chaine latérale de la Gln392 en position 1 est très proche (environ 4 Å) du soufre de la Cys (S_c) et du soufre inorganique (S_i), j'ai réalisé les mêmes calculs en incluant la Gln dans le système pour voir son influence sur les valeurs calculées (modèle 2, Figure 60B). La valeur de g_3 est celle qui est la plus impactée par l'ajout de la Gln (écart de 0.007 comparé au modèle 1), alors que la valeur de g_1 ne l'est pas du tout. Pour ce modèle, les couplages hyperfins entre le Mo(V) et trois protons sont dominants : un proton du Cβ du ligand Cys (H1) et deux protons de la Gln (H2 et H3). Notons que le H2 n'existe pas dans la protéine et que je l'ai ajouté après avoir tronqué le modèle. Dans la réalité, à la place du H2, il y a l'azote de la Ser393 suivant la Gln392 dans la séquence.

Ensuite, j'ai optimisé la géométrie du modèle 2. Si aucune contrainte n'est appliquée sur les atomes, les PGD adoptent un angle de torsion (défini par les quatre soufres des PGD) qu'on ne retrouve dans aucune structure de FDH (-62° dans le modèle 2bis contre des angles dièdres allant de -22° à -38° dans les 11 structures de FDHs) et qui semble donc peu probable (modèle 2bis, Figure 60B). Quoi qu'il en soit, les valeurs de g_1 et g_3 sont nettement inférieures aux valeurs d'avant l'optimisation (-0.024 et -0.025 respectivement). Le couplage Mo(V)-proton du Cβ de la Cys ligand est dominant et les valeurs sont proches de celles calculées dans le modèle 1. Notons que dans ce modèle, le couplage hyperfin Mo-H2 est presque nul.

Pour mieux comprendre le lien entre les observable magnétiques et la géométrie des modèles, j'ai examiné les différences géométriques entre le modèle 2 avant optimisation et le modèle 2 optimisé (2bis). La Figure 60B permet de visualiser les différences structurales entre les modèles 2 et 2bis. Parmi ces différences, les distances Mo-S_i et Mo-S_c sont modifiées d'un modèle à l'autre. Je me suis focalisé sur l'impact de ces longueurs de liaisons entre le Mo et les S_c et S_i sur les observables magnétiques puisqu'on peut s'attendre à ce que des modifications du couplage spin-orbite se répercutent sur les valeurs de *g* du Mo(V). A partir du modèle 1 (pour retrouver un modèle simple), j'ai élaboré un modèle 3 en ajustant les distances Mo-S_c et Mo-S_i pour qu'elles correspondent environ à celles du modèle 2bis : la distance Mo-S_i est plus courte (2.23 Å contre 2.37 Å), la distance Mo-S_c est plus longue (2.6 Å contre 2.37 Å) que dans le modèle 1. Les valeurs de g_2 et g_3 du modèle 3 sont quasi inchangées par rapport à celles du modèle 1, mais la valeur de g_1 est diminuée de 0.025 par rapport au modèle 1 et est presque égale à celle du modèle 2bis. Donc ces changements suggèrent que les distances Mo-S_i et/ou Mo-S_c conditionnent majoritairement la valeur de g_1. Ces valeurs de *g* sont relativement proches des valeurs de *g* expérimentales de l'espèce 2. Pour modéliser l'environnement protéique, j'ai effectué un calcul de propriété du modèle 3 en considérant un

milieu de constante diélectrique égale à 4[52] (modèle 3bis, voir Matériel et Méthode X). On constate que les valeurs de *g* du Mo(V) et les couplages hyperfins avec le proton du Cβ de la Cys sont peu modifiées.

Dans la partie II), l'influence de l'angle S_i Mo S_c sur la réactivité de l'enzyme a été testée. Dans cette partie, j'examine l'influence de cet angle sur les valeurs de *g*. J'ai repris le modèle 1 et j'ai fait passer l'angle S_i Mo S_c de 78.6° (issu de la structure cristallographique) à 60°. A cet angle, S_c et S_i sont à une distance de 2.37 Å, compatible avec la formation d'une liaison covalente). Sans optimisation de géométrie (modèle 4) j'ai calculé les valeurs de *g* et les couplages hyperfins dans un solvant de constante diélectrique égale à 4. Les valeurs de *g* se rapprochent de celles de l'espèce 1 (Tableau 9). Les valeurs de couplage Mo(V)-proton du Cβ sont dominantes, mais éloignées des valeurs déterminées pour l'espèce 1 ($A_{1,2,3}$= 18.9, 12.3, 11.3 MHz).

On a vu que les couplages hyperfins calculés sur ces modèles ne correspondent pas aux valeurs déterminées à partir des spectres expérimentaux. En réalité, on peut se rendre compte que les couplages hyperfins sont très influencés par l'environnement protéique. A partir d'un snapshot de DM j'ai réalisé deux modèles dans lesquels je prends en compte des acides aminés différents pour le calcul des valeurs de *g* et des couplages hyperfins (sans optimisation de géométrie et dans le vide). Le modèle 5 prend en compte la Cys ligand et la Gln392 tandis que le modèle 6 inclut la Cys ligand tronquée, la Gly586 et l'His587 qui sont des résidus parmi les plus proches du Mo (Figure 60C). Les positions des atomes communs au modèle 5 et au modèle 6 (le Mo, le S_i, les PGD et le S_c, le Cβ et le Cα de la Cys ligand) sont identiques. Dans le modèle 5, les couplages calculés les plus forts proviennent de deux protons : le proton H1 appartenant au Cβ du ligand Cys et le H2 de la Gln392. Comme mentionné plus tôt, le proton H2 n'existe pas en réalité dans la protéine mais a été rajouté du fait de la troncature du système. Il est cependant intéressant de constater que le couplage hyperfin avec H2 est fort au niveau du noyau d'un atome pourtant situé à sept liaisons (8 Å) du Mo, tant au niveau du terme de contact de Fermi (A_{iso}=12.9 MHz) que de l'interaction dipôle-dipôle (puisque l'anisotropie est grande : A_1-A_3=14 MHz). Les caractéristiques particulières de ce couplage traduisent le fait que l'électron célibataire est fortement délocalisé pour avoir une probabilité de présence non négligeable à proximité du noyau H2. Cette délocalisation est probablement liée à la faible densité de spin (population de spin de Mulliken) sur le Mo comparé aux modèles 2 et 2bis.

Dans le modèle 6, le couplage avec l'un des protons du Cβ est dominant. Les valeurs sont données dans le Tableau 9 et on remarque que dans les modèles 5 et 6, la prise en compte de la Cys391 et de la Gln392 plutôt que la Gly586 et de l'His587 va changer les valeurs de couplage hyperfin entre le Mo et le proton du Cβ de la Cys de plusieurs MHz. Cela dit, pour le modèle 6, on remarque que les valeurs de $g_{2,3}$ sont proches de celles de l'espèce 1 (écart maximum de 0.005) et les couplages hyperfins entre le Mo(V) et l'un des protons du Cβ de la Cys ligand sont aussi plus proches des valeurs déterminées à partir des spectres expérimentaux de l'espèce 1. Comment expliquer cela ? Bien que la géométrie d'ensemble soit différente du modèle 3, l'angle S_i Mo S_c des modèles 5 et 6 est d'environ 60°, donc on peut supposer que cet angle a un rôle dans la diminution de l'anisotropie des valeurs de *g* et le rapprochement des valeurs de *g* vers celles de l'espèce 1.

En conclusion, l'étude DFT de ces modèles permet de proposer que l'espèce 2 correspond à un site actif dont la géométrie est relativement proche de celle de la structure cristallographique et que l'espèce 1 correspond à un site actif Mo(V) dans lequel le S_c et le S_i sont proches, à une distance compatible avec la formation d'une liaison entre les deux atomes de soufre.

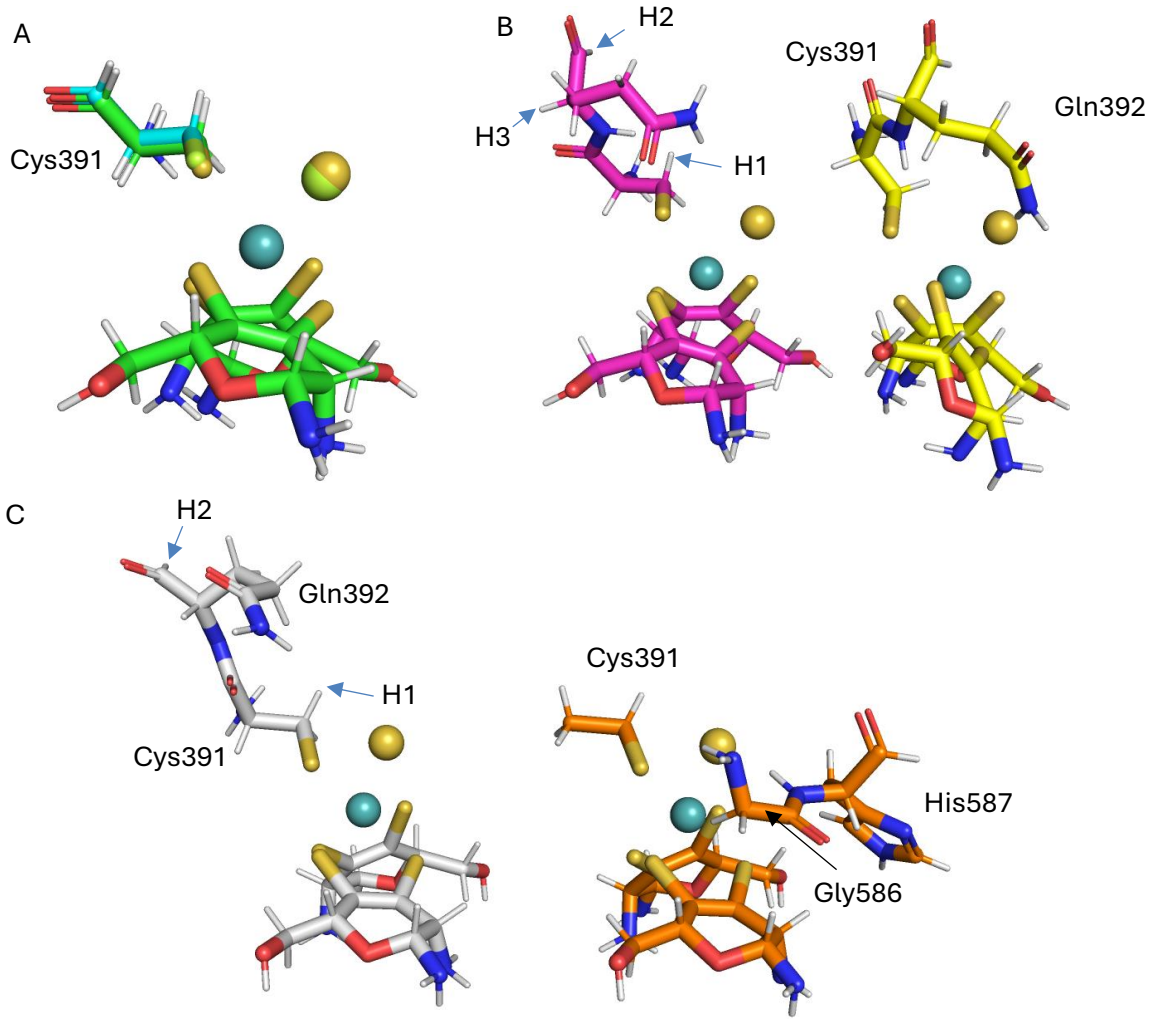


***Figure 60**. Les différents modèles utilisés pour le calcul des observables magnétiques des espèces de Mo(V). **A**. Superposition des modèles 1 (atomes de S en jaune) et 3 (S_c et S_i en vert). **B**. Modèle 2 avant optimisation de géométrie (rose) et après (2bis, jaune). **C**. Modèle 5 (gris) et 6 (orange).*

***Tableau 9**. Valeurs de g et de couplages hyperfins Mo(V)-proton pour les espèces 1 (en gras) issus de [67] et les modèles DFT. Dans tous les modèles explorés, le proton H1 représente l'un des deux protons du Cβ de la Cys391 qui donne le couplage le plus fort. L'origine des autres protons est indiquée sur la Figure 60.*

	$g_{1,2,3}$	$A_{1,2,3}$ (MHz)	A_{iso} (MHz)
Espèce 2	**2.021 1.985 1.969**	**-**	**-**
Modèle 1	2.038 1.988 1.970	H1 2.2 2.9 6	3.7
Modèle 2	2.039 1.991 1.977	H1 3.4 4.3 7.5 H2 2.6 4.7 8.8 H3 -5.2 -5.9 -7.2	5.1 5.4 -6.1
Modèle 2bis	2.015 1.985 1.952	H1 2.2 2.4 5.8	3.5
Modèle 3	2.013 1.987 1.972	H1 0.2 0.7 3.4	1.4
Modèle 3bis	2.013 1.989 1.971	H1 0.4 1.0 3.6	1.7
Espèce 1	**1.999 1.992 1.987**	**18.9 12.3 11.3**	**14.2**
Modèle 4	2.013 1.993 1.986	H1 2.9 5.2 10.1	6.1
Modèle 5	2.016 2.001 1.984	H1 10.1 11.3 15.4 H2 -6.7 -11.2 -20.6	12.3 -12.9
Modèle 6	2.013 1.993 1.982	H1 20.4 22.1 27.2	23.3

Jusqu'à présent, on a considéré que la Cys était en position 2, comme c'est le cas dans la structure cristallographique de ForCE1. Il n'est cependant pas exclu que la Cys de ForCE1 soit en position 1 (comme on l'a vu dans la partie II). Donc, pour vérifier s'il peut exister des modèles qui expliquent les espèces de Mo(V) présentes dans ForCE1 en considérant que la Cys est en position 1, j'ai réalisé des calculs à partir de la structure cristallographique du site actif de la FDH de *D. vulgaris* non réduite au DTT dans laquelle la Sec est en position 1. J'ai remplacé la Sec par une Cys et le W par du Mo. La charge du système a été ajustée pour que ce dernier rende compte de l'état Mo(V) de sorte que la charge, le nombre d'atomes et d'électrons soient les mêmes que pour le modèle 1. Ce modèle est désigné par la suite comme modèle 7. Ainsi, comme pour le modèle 1, je ne prends en compte que la Cys ligand dans l'environnement en acides aminés du métal et les PGD sont tronqués.

Les valeurs de *g* et de couplages hyperfins de ce modèle, calculées dans un solvant de constante diélectrique égale à 4 et sans optimisation de géométrie sont rassemblées dans le Tableau 10. Globalement, les valeurs calculées sont plus proches de celles de l'espèce 2 que de celles de l'espèce 1. Le couplage hyperfin dominant est entre le Mo(V) et l'un des protons du Cβ de la Cys. Ensuite, j'ai essayé d'obtenir des valeurs de *g* encore plus proches de celles associées à l'espèce 2. Les distances Mo-S_i et Mo-S_c du modèle 7 sont déjà proches du 3bis, et j'ai décidé de ne pas les modifier. Par contre, j'ai remarqué que l'angle entre le Mo, le S_c et le $C\beta_{cys}$ a un effet important sur les valeurs de *g*. J'ai donc modifié cet angle dans le modèle 8 : pour un angle de 160°, les valeurs de *g* sont relativement proches de celles de l'espèce 2 tandis que les valeurs de couplage hyperfin Mo(V)-proton dominantes ne sont pas celles des protons du Cβ (H1) mais du proton du Cα de la Cys (H2).

Donc pour conclure cette partie, on a vu que plusieurs modèles permettent d'expliquer les paramètres magnétiques des espèces 1 et 2 du Mo(V) de ForCE1 et notamment qu'au moins deux modèles différents peuvent rendre compte de l'espèce 2 : un modèle inclut la Cys ligand en position 1 et l'autre l'inclut en position 2.

Tableau 10. *Valeurs de g et de couplages hyperfins pour l'espèce 2 (en gras) et les modèles 7 et 8.*

	$g_{1,2,3}$	$A_{1,2,3}$ (MHz)	A_{iso} (MHz)
Espèce 2	**2.021 1.985 1.969**	-	-
Modèle 7	2.022 1.992 1.977	2.2 2.4 5.7	3.4
Modèle 8	2.023 1.982 1.971	H1 0.5 0.9 4.1 H2 1.7 2.0 3.7	1.8 2.5

Tableau 11*. Caractéristiques des différents modèles*

Modèles	Caractéristiques	Distance Mo-S_i (Å)	Distance Mo-S_c (Å)	Angle S_i-Mo-S_c (°)
1	Structure cristallographique ForCE1 Mo+PGD+Cys	2.37	2.37	78.6
2	Idem modèle 1 + Gln392	2.37	2.37	78.6
3	Idem modèle 1	2.23	2.60	78.6
4	Idem modèle 1	2.37	2.37	60.0
5	Idem modèle 1 + Gln392	2.42	2.25	60.6
6	Idem modèle 1 + Gly586 + His587	2.42	2.25	60.6
7	Structure cristallographique du site actif de la FDH de *D. vulgaris* non réduite au DTT MO+PGD+Cys	2.23	2.56	81.8
8	Idem modèle 7 + angle Mo-S_c-$C\beta_{Cys}$=160° au lieu de 105° (modèle 7)	2.23	2.56	81.8

2) Etude du variant Q392H

Comme décrit dans l'Introduction, l'une des spécificités de la sous-famille ForC est la substitution naturelle du résidu His situé au voisinage du site actif par un résidu Gln. Les données structurales obtenues sur ForCE1 ont confirmé la proximité entre ce résidu et le Mo, avec une distance estimée à 4 Å. Sur la base de mes conclusions précédentes concernant l'impact de la flexibilité conformationnelle de la Gln392 sur l'accès du substrat au site actif, il apparaît évident d'évaluer l'importance de ce résidu sur la catalyse et l'approche choisie a consisté à construire et produire le variant $ForC_{Q392H}E$.

Pour éviter que le variant soit inactivé par l'oxygène, le complexe a été purifié en anaérobiose. J'ai mesuré l'activité formiate:BV oxydoréductase à pH 9 sur une gamme de concentrations en formiate allant de 0.05 mM à 187 mM. L'ajustement de ces données préliminaires avec une équation de Michaelis-Menten (Figure 61) permet d'obtenir un k_M formiate de 0.2 mM et un k_{cat} de 0.8 s^{-1}. Dans des travaux précédents[64], à pH 10 pour ForCE1 native, le k_M formiate est de 5 mM et le k_{cat} de 96 s^{-1}. Ces résultats peuvent suggérer que la mutation rende le site catalytique moins actif que dans l'enzyme native.

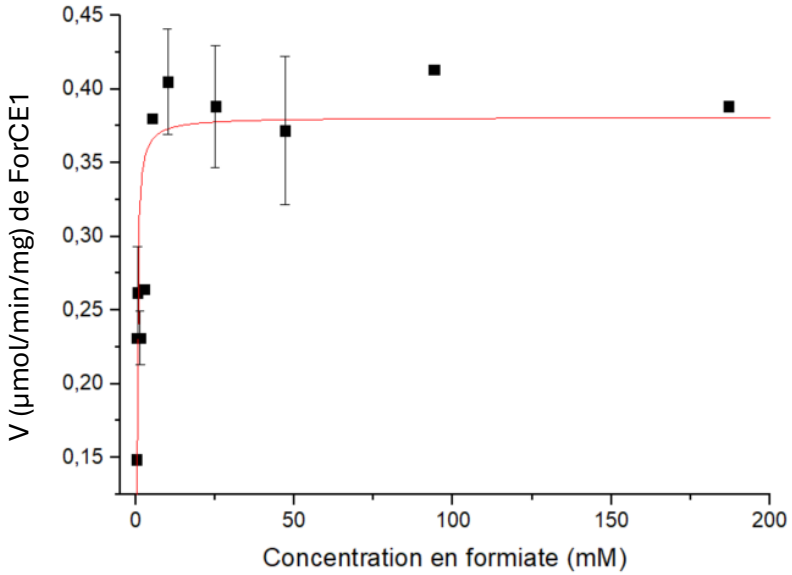


***Figure 61**. Courbe de Michaelis-Menten pour l'activité formiate:BV oxydoréductase du variant Q392H à pH 9.*

Si le variant présente une faible activité d'oxydation du formiate, la question reste entière concernant la réaction inverse. La mesure de l'activité CO_2 réductase en utilisant de l'ethyl viologen (EV) réduit (en raison de son plus bas potentiel, -480 mV, que le BV, -350 mV, ou le MV, -440 mV) n'a pas permis de détecter une activité du variant, comme pour l'enzyme sauvage.

Comme la substitution a un fort impact sur l'activité enzymatique, la première question à laquelle j'ai voulu répondre est : y a-t-il des répercussions sur les signatures spectrales et les propriétés rédox des centres au niveau du site actif et à proximité ? Pour répondre à ces questions, j'ai effectué un titrage redox suivi par spectroscopie RPE en onde continue comme cela a été décrit pour l'enzyme sauvage[67]. Mon attention s'est portée principalement sur le cofacteur à Mo, le centre FeS proximal et la quinone située à l'extrémité de la chaîne de transfert d'électrons. J'ai choisi d'étudier le mutant à pH 6, et la quantité de protéines disponible m'a permis de titrer sur la plage de potentiel de -40 à -248 mV, ce qui correspond à la plage de stabilité de l'espèce 2 du Mo(V) et à une partie la plage de stabilisation de la semiquinone et du centre FeS proximal[65] (le plus proche du Mo). Les conditions de titrage à 50 K permettent d'observer les signaux du Mo, de la quinone et aussi du FeS proximal qui relaxe plus lentement que les autres centres [4Fe-4S] de ForCE1.

Dans ce titrage, j'ai détecté les signaux correspondant à la semiquinone, au $[4Fe\text{-}4S]^{+}$ proximal, mais pas de l'espèce 2 du Mo(V). La Figure 62A montre un spectre du mutant à -184 mV, mesuré à 50K. On y voit un signal de type isotrope à g =2.003 que l'on peut attribuer à une espèce radicalaire. Il y a aussi un pic dérivé et un pic négatif aux valeurs de g=1.987 et 1.977 respectivement et des pics larges aux valeurs de g=1.991 et 2.02. La mesure de spectres à 10 mW et 100 mW (Figure 62B) montre que l'intensité relative des deux pics à g=1.987 et 1.977 ne change pas, contrairement aux amplitudes des autres signaux présents, ce qui indique qu'ils représentent probablement la même espèce. Ces pics à g=1.987 et 1.977 ont des valeurs de g qui sont proches de celles de l'espèce 2 et sont visibles à 50 K, ce qui indique des propriétés de relaxation lentes, surtout comparées à celles des centres FeS. Nous

avons donc attribué ce signal à une troisième espèce de Mo(V), désignée par la suite comme espèce 3. Bien qu'on ne voie que deux pics pour l'espèce 3, on ne peut pas exclure que le signal soit rhombique, avec le pic positif recouvert par les signaux à plus bas champ.

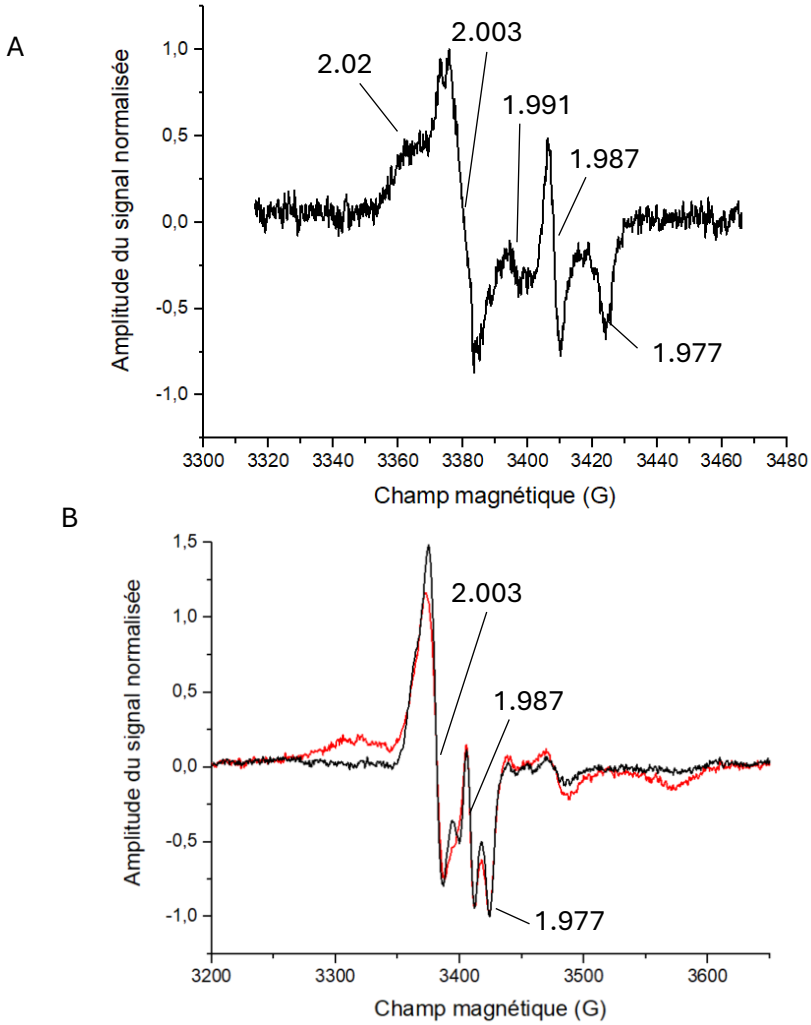


***Figure 62**. Spectre RPE du variant Q392H purifié en anaérobiose. Paramètres expérimentaux : 50K, -184 mV, 1mW (A), 10 mW (B, noir), 100 mW (B, rouge), 1G (A), 10 G (B), 15 accumulations (A). L'amplitude est normalisée par rapport à l'amplitude maximale en A et minimale en B.*

La Figure 63A montre les relevés d'amplitudes du signal du pic négatif à *g* = 1.977 de l'espèce 3 en fonction du potentiel. A -248 mV, les raies de l'espèce 3 sont recouvertes par d'autres signaux à *g* = 1.991 que nous n'avons pas attribués (Figure 64A). Les relevés d'amplitude sont ajustés à une courbe de Nernst à deux transitions électroniques, comme attendu pour un site actif à Mo, et qui conduit à $E^0_{VI/V}$=-128±6 mV et $E^0_{V/IV}$=-277±28 mV. Donc, comparé à l'espèce 2, les potentiels $E^0_{VI/V}$ et $E^0_{V/IV}$ dans l'espèce 3 sont décalés d'environ -94 mV et -79 mV respectivement.

La Figure 63B montre les relevés d'amplitude du pic négatif du signal non attribué à *g* = 1.991. Il apparait à -185 mV et augmente sur toute la plage de potentiels inférieurs explorée. Les données collectées ne me permettant pas d'atteindre un plateau d'amplitude aux plus bas

potentiels, seule une valeur limite supérieure du potentiel de la transition observée de cette espèce peut être évaluée, correspondant à E^0=-229±7 mV.

La Figure 63C montre les relevés d'amplitudes pic à pic à *g* = 1.944 du signal du FeS proximal caractérisé par les valeurs de $g_{1,2,3}$=2.045 1.944 1.894 (Figure 64A). Bien que la gamme de potentiel explorée ne permette pas de voir la réduction totale du FeS proximal, l'ajustement avec une loi de Nernst à une transition permet de conclure que le potentiel est inférieur à E^0=-223±6 mV. Le potentiel de ce centre à pH 6 a été mesuré à -288 mV sur l'enzyme sauvage dans des travaux précédents[67]. Un titrage de ForCE1 à plus bas potentiel permettrait d'avoir une valeur plus précise du potentiel de la transition pour le variant.

Enfin, la Figure 63D montre les relevés d'amplitudes pic à pic du signal à g=2.003. L'évolution de l'amplitude correspond à la semiquinone jusqu'à -185 mV, qui est caractérisée par cette valeur de *g* et une largeur pic à pic d'environ 10 G, en accord avec les études précédentes[64,67] (encart Figure 63D). L'ajustement avec une loi de Nernst à deux transitions donne $E^0_{Q/SQ}$=-6±21 mV et $E^0_{SQ/QH2}$=-121±9 mV et E^m=-63 mV ce qui est assez cohérent avec les valeurs obtenues précédemment[67] ($E^0_{Q/SQ}$=-42 mV et $E^0_{SQ/QH2}$=-90 mV et E^m=-66 mV) . Donc la mutation n'implique, à mon sens, pas de modifications significatives au niveau de la quinone, comme on pouvait s'y attendre étant donné la distance importante entre la quinone et l'His392 (environ 5 nm). En dessous de -185 mV, le signal de la semiquinone disparait et on observe de nouveaux signaux dans la même plage de champ. Ceci est visible sur les spectres des échantillons préparés aux trois potentiels les plus bas (-185, -217 et -248 mV) et mesurés à 10 mW 10 G (Figure 64A). Pour étudier plus précisément les signaux sous-jacents responsables de cette augmentation de l'amplitude à *g*=2003, j'ai mesuré ces trois spectres à 1 mW 1 G (Figure 64B). On voit un signal complexe partiellement structuré avec des épaulements (indiqués par des flèches) dus à des interactions ou à des recouvrements d'espèces.

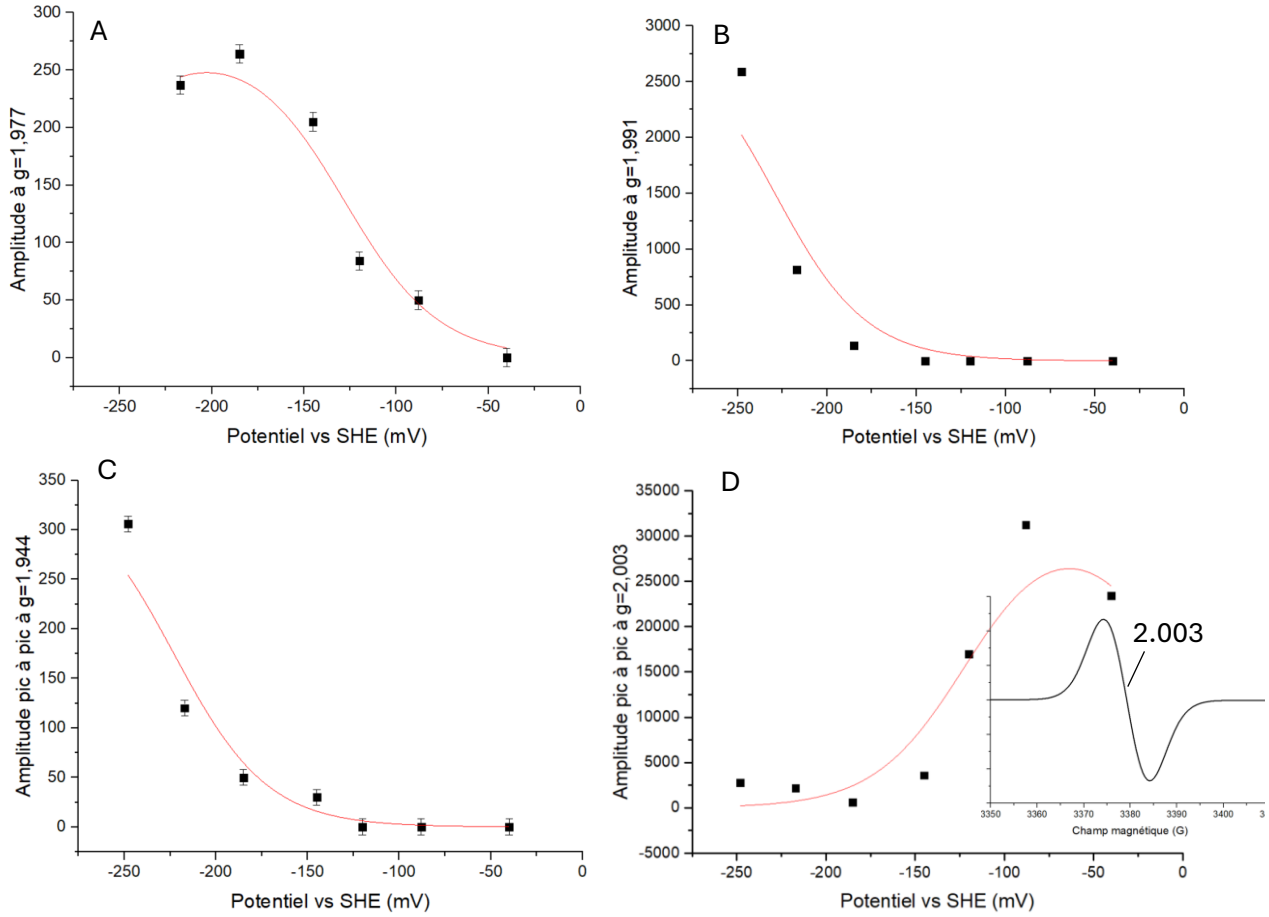


***Figure 63**. Titrage d'oxydoréduction du variant Q392H. Relevé d'amplitudes (carrés) et ajustement d'une loi de Nernst (courbe rouge) pour l'espèce 3 (**A**), le pic à g=1.991 (**B**), le centre FeS proximal (**C**), et le radical (**D**). Paramètres expérimentaux : 50 K, 10 mW, 10G à 100 kHz. Encart : spectre de la semiquinone (-88 mV) mesuré à 50 K, 10 mW, 10 G.*

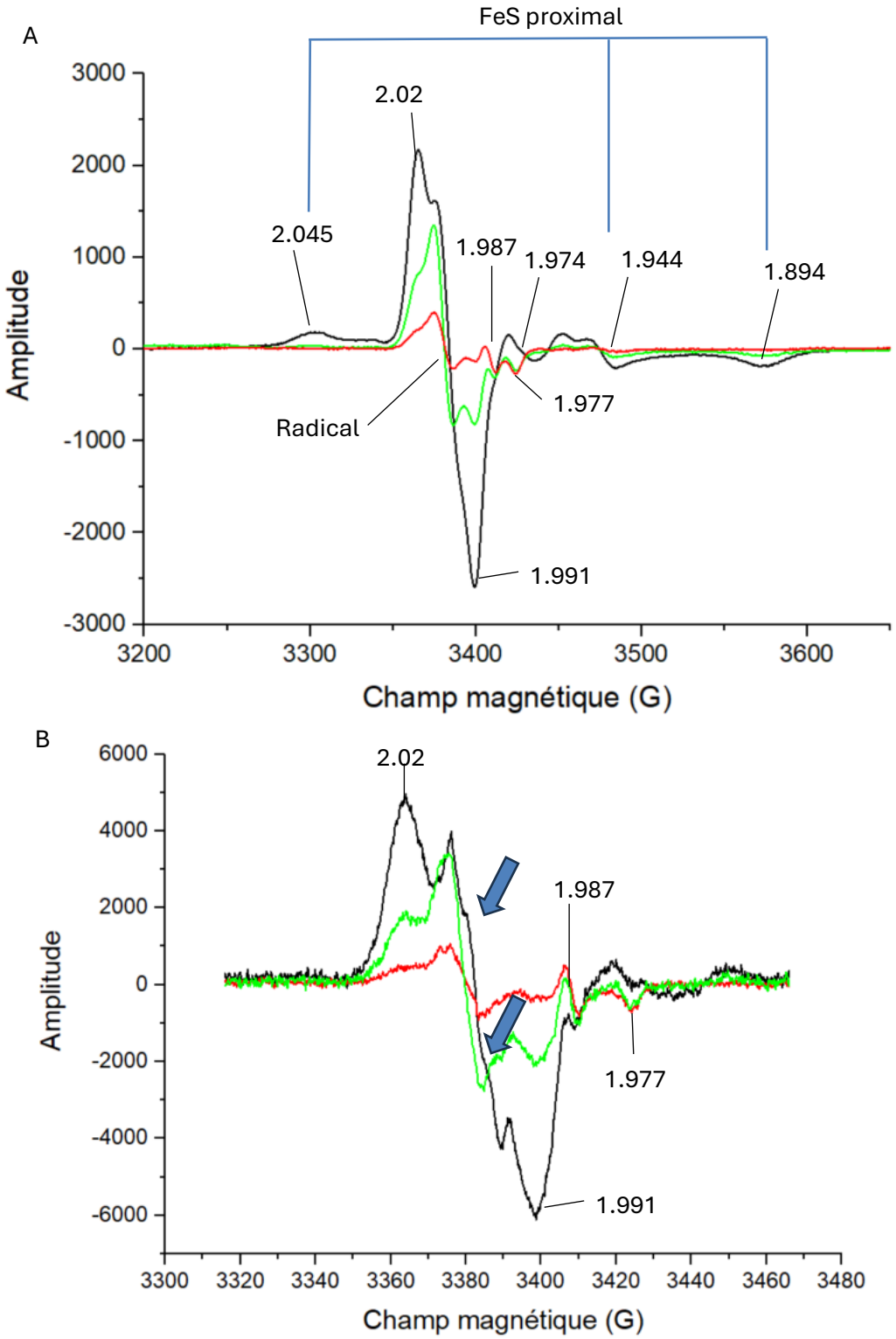


***Figure 64**. Spectres RPE des échantillons du mutant Q392H à -185 (rouge), -217 (vert) et -248 mV (noir) à 50 K, 10 mW, 10 G, 1 scan (**A**) et 1 mW, 1 G, 5 accumulations (**B**). Les flèches indiquent les épaulements autours de g=2.003.*

Pour étudier les effets possibles de la mutation Q392H sur la structure et la dynamique de ForCE1, j'ai effectué deux simulations de DM de 100 ns sur la sous-unité ForC1 dans laquelle j'ai substitué la Gln392 par une His. Le rotamère de l'His sélectionné est celui qui se rapproche le plus de la position 1. Le protocole de simulation du variant est le même que pour l'enzyme sauvage (Matériel et Méthodes X). Dans chacune de ces simulations, la chaine latérale du résidu His392 présente une forte mobilité et oscille entre les positions 1, 2 et 3. Dans les deux simulations, l'His392 adopte majoritairement la position 3.

Après avoir observé une dynamique conformationnelle importante de la chaine latérale du résidu His392, j'ai évalué l'accès au site actif au cours de ces simulations. La Figure 65 montre la distance entre le S inorganique et le solvant dans chacune des simulations. Dans l'une (tracé rouge), les molécules d'eau ont très peu accès au site actif. Dans l'autre (tracé noir), c'est le contraire, les molécules d'eau passent par les passages A et B. Ce résultat contraste avec les précédents qui indiquaient que la position 3 était plutôt associée au blocage du tunnel. En dehors des fluctuations aléatoires de la position 3 de l'His, aucun changement flagrant causé par la mutation Q392H autour du site actif n'est à signaler dans ces simulations.

Il est donc difficile de relier ces observations aux données cinétiques montrant une baisse importante de l'activité dans le variant Q392H. Une diminution de l'accès du formiate au site actif devrait s'accompagner d'une forte augmentation du k_M. Cependant, dans nos conditions expérimentales, les valeurs de k_M et de k_{cat} ont considérablement diminué. Il est alors important de se rappeler que dans la réaction enzymatique de conversion du formiate en dioxyde de carbone ou inversement, il est aussi question de protons. Il est possible que les répercussions cinétiques sur le k_M et le k_{cat} soient différentes selon la valeur du pH. D'autres études de cinétique à différents pH devront être conduites.

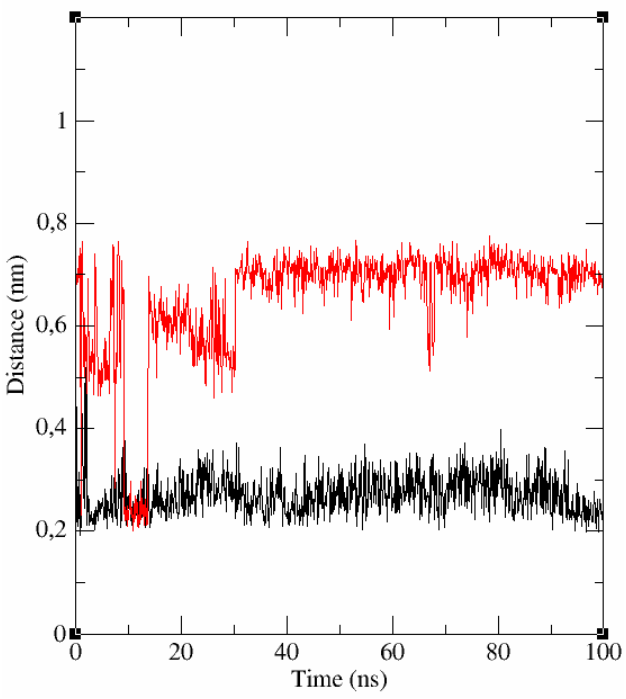
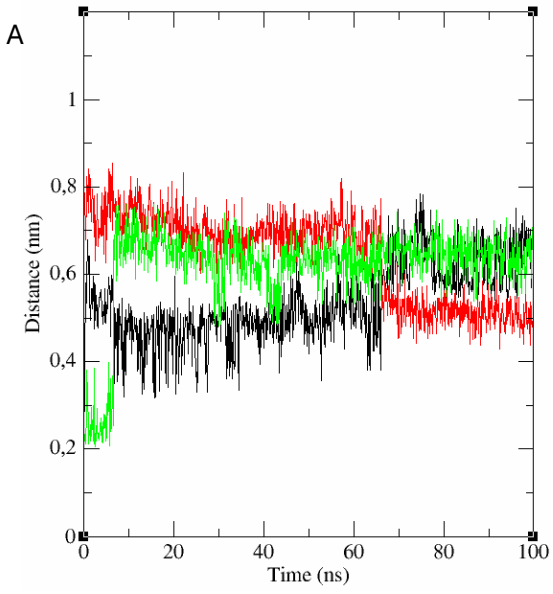


***Figure 65**. Evolution de la distance entre le S inorganique et le solvant dans deux simulations de DM sur le variant Q392H (en noir et en rouge).*

On a vu dans la partie I)2) qu'on pouvait faire l'hypothèse que la position 2 augmente les chances de passage des molécules de substrat jusqu'au site actif comparé au cas où leur passage est soumis aux fluctuations aléatoires des positions 1 et 3. Par ailleurs, la position 2 dans les FDHs est maintenue par l'établissement d'une liaison hydrogène avec un résidu Ser/Thr dans le voisinage de l'His, résidu substitué par une Ala dans les ForC.

Pour voir s'il est possible de stabiliser l'His392 en position 2 dans ForCE1, j'ai réalisé deux nouvelles simulations de 100 ns sur un variant virtuel Q392H-A395S pour reproduire une situation où on peut s'attendre à stabiliser l'His392 en position 2. Dans la première simulation, l'His392 passe en position 3 et bloque l'accès des molécules d'eau au site actif (en vert, Figure 66A). Dans la deuxième, par contre, l'His392 est en liaison hydrogène avec la Ser395 (distance His-O(Ser395) à 3 Å contre environ 5 Å dans la première simulation, tracé noir Figure 66A et C) dès le début de la simulation et le passage A est ouvert (Figure 66B). L'analyse des distances entre le Nδ de l'His392 et l'oxygène de la chaine latérale de la Ser395 ou le S inorganique indique que la position 2 de l'His est stable jusqu'à environ 80 ns (Figure 66C), après quoi, l'His passe en position 3. L'évolution de la distance S_i-solvant montre que les molécules d'eau ont accès au site actif lorsque l'His est en position 2 (la distance vaut environ 2 Å). L'ouverture du passage A est donc plus grande que pour la simulation du mutant A395S, même si cette ouverture n'est pas pérenne (à chaque fois que le passage A se ferme, la distance S_i-solvant augmente). Mais il est difficile de conclure que la simple mutation A395S est responsable de l'ouverture incomplète du passage A.

Cette simulation suggère qu'on puisse reproduire un site actif avec His en position 2 chez ForCE1. Comme pour le mutant A395S, l'objectif de produire un tel variant serait en premier lieu de tester les activités d'oxydation du formiate et surtout de réduction du CO_2, puisque l'accès direct au site actif semble facilité dans une simulations de DM, et de les comparer à celles de l'enzyme native.



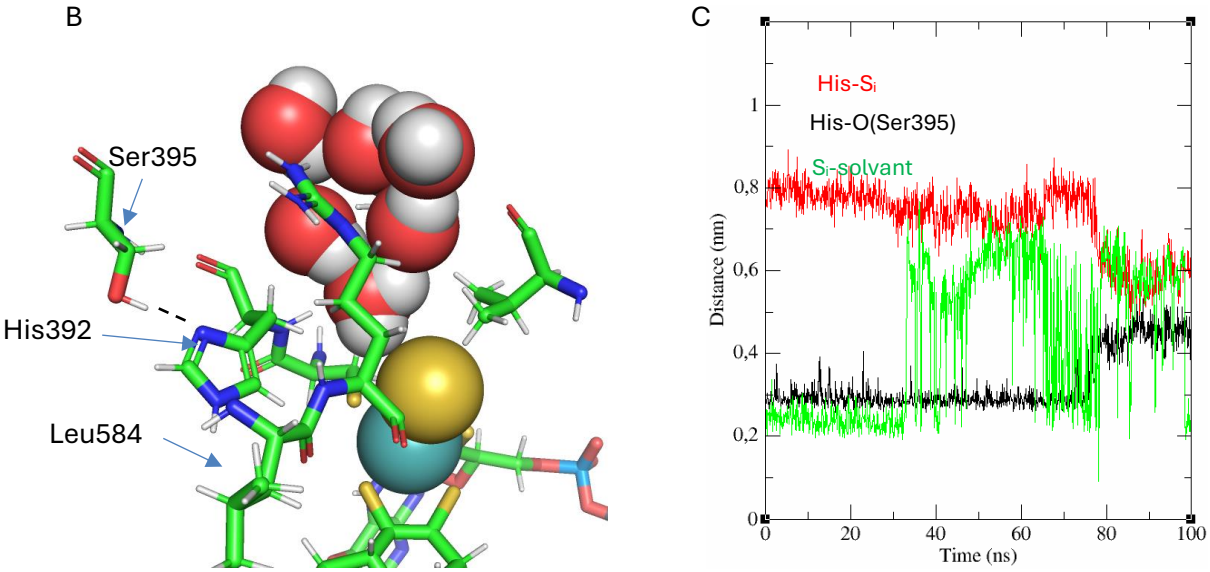


***Figure 66**. DM du variant A395S-Q392H. **A** et **C**. Distance entre le Nδ de l'His392 et le O de la Ser395 (noir), ou le S inorganique (rouge) et entre le S inorganique et le solvant (vert) pour les deux simulations. **B**. Snapshot représentant le l'accès de l'eau dans le mutant A395S-Q392H quand le passage A est ouvert.*

Donc, dans cette partie, on a vu que la substitution de la Gln du site actif par une His entraine une baisse drastique d'activité d'oxydation du formiate, qu'on ne détecte toujours pas d'activité de réduction du CO_2. La caractérisation du mutant par RPE CW indique que l'une des conséquences de la mutation est qu'il n'y a plus d'espèce 2 du Mo(V). Mais on détecte une espèce 3 du Mo(V) et au moins une autre espèce difficile à attribuer. Etant donné les propriétés de relaxations de cette espèce, on peut supposer qu'il s'agisse d'une autre espèce de Mo(V), visible à plus bas potentiel que l'espèce 2.

Le mécanisme d'interaction de ForCE1 avec les quinones

Comme on l'a vu dans l'Introduction, ForCE1 s'insère dans la chaine respiratoire aérobie de *B. subtilis* en couplant l'oxydation du formiate à la réduction de ménaquinones. De manière inhabituelle, la MK7 est co-purifiées avec ForCE1 en proportion stœchiométrique malgré l'étape de lavage pendant la purification. L'augmentation de l'intensité du signal semiquinone après addition de formiate au complexe purifié atteste de l'implication de la MK7 dans le trajet électronique. Les données structurales ont permis de localiser une densité attribuée à la MK7 entre les sous-unités ForC1 et ForE1, une zone qui est donc probablement le site Q. De plus, les caractéristiques structurales du tube formé par les sous-unités ForE, et notamment la présence de lipides à l'extrémité C-terminale, suggèrent fortement que le tube ForE joue un rôle de conduit pour les quinones.

Compte tenu de ces informations, notre modèle de fonctionnement de l'enzyme prévoit que les électrons issus de l'oxydation du formiate sont transférés grâce aux centres FeS jusqu'à la MK7. Ensuite, il y a deux possibilités :

1. La MK7 réduite quitte son site Q, traverse le tube ForE1 et rejoint la membrane. Ce scénario est compatible avec les données de titrages potentiométrique qui indiquent que la MK7 réduite est 80 fois moins affine pour l'enzyme que la MK7 oxydée. La MK7 est dite échangeable.
2. La MK7 réduite reste partiellement associée au site Q et transfère les électrons à une autre MK7 localisée dans le tube qui rejoindra le pool membranaire de MK7.

Donc il y avait deux objectifs : sonder l'environnement nucléaire du site Q de la semiquinone afin de caractériser son mode de fixation et étudier l'échange de quinones entre ForCE1 et la membrane.

Studying molecular interactions between menaquinones and the quinone-reducing formate dehydrogenase ForCE1 from *Bacillus subtilis*

Stéphane Zakarian, [a,b] Alexandre Uzel,[a, #] Guillaume Gerbaud,[a] Fabien Pierrel,[c] Frédéric Biaso,[a] Axel Magalon,[b] Stéphane Grimaldi[a] .

[a] *Aix Marseille Univ, CNRS, BIP, IMM, IM2B, Marseille, France*

[b] *Aix Marseille Univ, CNRS, LCB, IMM, IM2B, Marseille, France*

[c] *Univ Grenoble-Alpes, CNRS, Grenoble INP, TIMC, Grenoble, France.*

[*] Correspondence to: S. Grimaldi (stephane.grimaldi@univ-amu.fr) or A. Magalon (magalon@imm.cnrs.fr)

[#] Present address: *CEA, Laboratoire de Résonance Magnétique, INAC/SCIB, Grenoble, France.*

Abstract

The ForCE1 complex in *Bacillus subtilis* couples formate oxidation with quinone reduction as part of an electron transfer chain. This study provides direct evidence of the exchangeable nature of quinone associated with ForCE1 and characterizes the binding mode of the semiquinone (SQ) intermediate. Biochemical experiments demonstrated that membrane association is essential for ForCE1 to bind exogenous quinones and exchange menaquinone-7 (MK-7) during turnover. EPR spectroscopy combined with ^{15}N isotopic labeling and DFT calculations elucidated the binding mode of the menasemiquinone (MSK) radical to the enzyme. Two nitrogen nuclei involved in hydrogen bonding with the radical were identified and assigned to the backbone nitrogen of Thr100 and the terminal nitrogen of Lys234 based on their nuclear quadrupole interaction parameters. A molecular model of the semiquinone binding mode, consistent with structural and spectroscopic data, was developed. This study provides insights into the mechanism of quinone-based electron transfer in the ForCE1 complex and contributes to our understanding of energy conservation in bacterial oxidoreductases.

Keywords

Bioenergetics • Quinone • HYSCORE • Metalloenzyme • Electron Transfer • Formate dehydrogenase

Highlights

Direct evidence of the exchangeable nature of quinone associated with ForCE1 and characterization of the binding mode of the semiquinone intermediate

1. Introduction

Life relies on harnessing energy from thermodynamic imbalances, which often manifest as redox disequilibria. Oxidative phosphorylation is one of the most universal energy conversion mechanisms. This process relies on oxidoreductases, typically associated with membranes, which couple redox reactions to electron and proton transfer via mobile shuttles, quinones. Electron transfer generates an electrochemical proton gradient across the membrane, which is used by ATP synthase to produce ATP. Phylogenetic studies suggest that quinone-based energy metabolism likely existed in LUCA, accompanied by a wide variety of ancestral redox enzymes. In this context, isoprenoid quinones, whose structures and redox potentials vary considerably, are essential components of bacterial and archaeal membranes.[1,2] Identifying the binding site of these electron shuttles is crucial because their location and properties influence both the redox characteristics of the quinone and the redox enzyme's ability to contribute to the generation of the proton gradient. Recently, our work has revealed a common mode of interaction between multiple oxidoreductases and the membrane quinone pool. [3,4] The atomic structure of the ForCE complex in *Bacillus subtilis* showed that it forms a hetero-octamer consisting of four catalytic formate dehydrogenase subunits arranged around a central tube created by the tetramerization of the partner subunit ForE. This configuration forms a hydrophobic vestibule at the center of the tube, the dimensions of which suggest that quinones may circulate within it. Unexpectedly, quinone co-purifies with the isolated complex in stoichiometric amounts without the aid of detergents. The quinone-binding site is situated at the interface between the oxidoreductase and the tube, in close proximity to the complex's terminal electron relay, a [4Fe-4S] center. In both the X-ray diffraction and cryoEM models, the O4 oxygen atom of menaquinone establishes two hydrogen bonds with the main chain amide and the Oγ1 atom of Thr100. However, differences emerge regarding the nature and number of hydrogen bonds involving the O1 oxygen (Figure 1). In the crystal structure, the O1 oxygen forms two hydrogen bonds with the carboxyl group of Glu237, one with the main chain carbonyl of Leu97, and an additional bond with a nearby water molecule. In contrast, in the cryoEM model, this water molecule is absent, its position being taken by the terminal Nζ of Lys234, which is oriented toward MK-7 and forms a hydrogen bond with its O1 oxygen, similar

to one of the terminal oxygens of Glu237. In a previous study, the redox and electronic properties of the SQ intermediate stabilized within the complex were analyzed by EPR spectroscopy. These experiments led to the conclusion that a neutral MSK (MSKH•) is highly stabilized in the enzyme, while the difference in the midpoint potential of the Q/QH2 couple between the bound and free forms suggests that the oxidized form is bound about 80 times more strongly. This observation aligns with a quinone reduction site that preferentially binds the menaquinone substrate over the menaquinol product.

All these data have led to the development of an energy conservation model associated with the complex's function. In this model, formate oxidation is coupled to the reduction of MK-7, which is located at a distance of roughly 50 Å. Once reduced, MK-7 exchanges with the membrane quinone pool to fuel an electron transfer chain. The aim of this study is to provide direct evidence of the exchangeable nature of the quinone associated with the complex and to describe the binding mode of the semiquinone intermediate generated during the catalytic cycle.

Through the application of biochemical techniques, this study presents direct evidence that the membrane association of ForCE1 is essential for the binding of exogenous quinones and the facilitation of MK-7 exchange during turnover. Furthermore, employing EPR spectroscopy in conjunction with ^{15}N isotopic enrichment and quantum mechanical (DFT/B3LYP) calculations, this study elucidates the MSK binding mode to the enzyme by characterizing and identifying nitrogen nuclei involved in hydrogen bonding with the radical. This work culminates in a molecular model of the MSK binding mode that is consistent with existing structural and spectroscopic data.

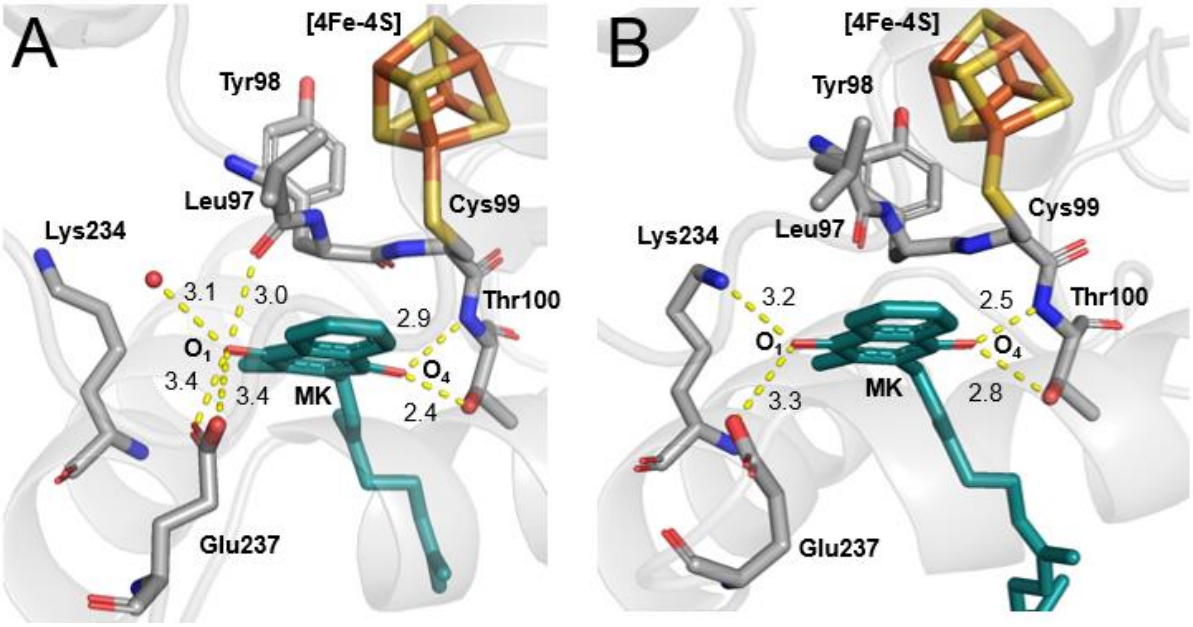


Figure 67. Hydrogen bond network formed by the menaquinone in its binding site as modeled in the crystal structure 8RQZ (A) or cryoEM 8RR0 (B) of *Bs*ForCE1. Residues in ForC (labeled by residue number) forming the site as well as the cubane structure of the histidine-coordinated [4Fe-4S] cluster are shown as ball and stick models in CPK colors. The distances shown are in Å and represent the H-bond length between donor and acceptor atoms. The menaquinone (MK) is colored green.

2. Experimental

2.1. Sample preparation

The *E. coli* MG1655 strain and the *B. subtilis* 168 derivative (*tprC2*, *amyE*::pSHP1-6his*yjgCD, tprC2*, *amyE*::pSHP1-6his*yjgCDΔHMP*) used in this study were routinely grown aerobically in lysogeny broth (LB) medium at 37 °C. For overproduction of the his-tagged ForCE1 complex, *B. subtilis* strain was grown in LB medium supplemented with 2 µM sodium molybdate at 37°C until A_{600} ~ 0.4 when induction is started through the addition of xylose (9g/l) for 4 hours. For overproduction of ^{15}N uniformly labeled his-tagged ForCE1 complex, cells were grown in M9 minimal medium supplemented with trace elements, 60 µM $FeCl_3$, and 46 mM [^{15}N] NH_4Cl. Glucose (0.5%) was used as a carbon source. At A_{600} ~ 0.4, induction is started through the addition of xylose (18 g/l) and the culture is collected upon reaching the stationary phase. Harvested cells were then washed with 20 mM sodium phosphate, pH 7.5, and 50 mM Na_2SO_4 (buffer A) and cells were kept at -80°C until use. Purification was performed essentially as described in [4] except the washing steps which have been reduced in volume. The purified sample in 50 mM Mes, pH 6, 50 mM Na_2SO_4, 5% v/v glycerol and 10 mM potassium nitrate

(buffer D2) were frozen in liquid nitrogen and kept at -70°C until use. Protein concentration was estimated by the method of Lowry *et al*.[5]

2.2. Procedure to probe quinone exchangeability from ForCE1 complex

Inner membrane vesicles from aerobically grown *E. coli* cells were prepared by French press cell lysis and differential centrifugation in 100 mM MOPS buffer at pH 7.5 as described in Magalon *et al.*[6] and stored at -70°C until use. In an anaerobic glove box, the purified enzyme (at a final concentration of 20 μM) is incubated for 30 minutes at room temperature with inner membrane vesicles, either in the presence or absence of 9 mM sodium formate. After incubation, the samples are diluted 5-fold in MOPS buffer and ultracentrifuged at 100,000 rpm for 30 minutes at 4°C. The supernatant is then applied to a Ni-NTA column, and the enzyme is purified following the previously described protocol. The quinone content of the purified protein is then analyzed by HPLC coupled to electrochemical detection (ECD), as described by Arias-Cartin *et al*.[4]

2.2. EPR and HYSCORE spectroscopy

Generation of the MSK was achieved through redox titrations carried out under the same conditions as those used in our previous work.[4] The samples were stabilized at the potential where the amount of MSK stabilized in the quinone reduction site of ForCE1 is maximal, typically -60 mV relative to the SHE, at pH = 6.0.

X-band continuous wave (cw) EPR experiments were performed on a Bruker EleXsys E500 spectrometer equipped with a standard rectangular cavity (ST4102) fitted to an Oxford Instruments liquid helium cryostat (ESR900) and temperature control system. X-band HYSCORE spectra were measured at 50 K using a Bruker EleXsys E580 spectrometer equipped with an ER4118X-MD5 dielectric resonator and an Oxford Instruments'CF 935 cryostat. This two-dimensional four-pulse Electron spin echo envelope modulation (ESEEM) experiment ($\pi/2$-τ-$\pi/2$-t_1-π-t_2-$\pi/2$-τ-echo) was employed with an appropriate 4 step phase-cycling scheme to eliminate unwanted features from the experimental electron spin echo envelopes. The intensity of the echo after the fourth pulse was integrated over 36 ns with varied t_2 and t_1 and constant τ. The length of a $\pi/2$ pulse was 12 ns and of a π pulse 24 or 26 ns, and a shot repetition rate of 1.5 kHz (unless otherwise specified) was used. HYSCORE data were collected in the form of 2D time-domain patterns containing 512 × 512 points with steps of 12 ns. Spectra were recorded at the magnetic field value corresponding to the maximum intensity of the electron spin echo-detected EPR spectrum of the MSK. HYSCORE spectra were processed using Bruker's Xepr software. Relaxation decays were subtracted (fitting by 3rd order

polynomial functions) followed by zero-filling to 2048 points and tapering with a Hamming window, before 2D Fourier transformation which finally gives the spectrum in frequency domain. Processed data were then imported into Matlab (The MathWorks Inc., Natick, MA) for plotting. HYSCORE spectra are normalized to the maximal amplitude. They are shown in absolute value mode and are presented as contour plots (using a cut-off of 0.1) with the skyline projection on the two frequency axes.

2.3. Simulation of ^{14,15}N HYSCORE spectra

A hyperfine coupling between a S = ½ radical (*e.g.*, MSK) and a nucleus with nuclear spin value I consists in general of (i) an isotropic contribution $A_{iso} = 2\mu_0 g_e g_n \beta_e \beta_n \psi(0)^2/3h$ where $\psi(0)^2$ is the electron spin density at the nucleus, g_e and g_n are electron and nuclear *g*-factors, respectively, β_e and β_n are Bohr and nuclear magnetons, respectively, h is Planck's constant, and (ii) the anisotropic contribution described by the dipolar coupling tensor $\hat{T}$. In the point-dipole approximation $\hat{T}$ has axial symmetry with principal values (A_{iso}-T, A_{iso}-T, A_{iso}+2T), with $T = \mu_0 g_e g_n \beta_e \beta_n/4\pi hr^3$ where r is the distance between the nucleus and the electron. The hyperfine couplings of different isotopes of the same element are proportional to a very good approximation to the corresponding g_n values.

A ^{14}N nucleus has a quadrupole moment that interacts with the electric field gradient (EFG) at the nucleus. The components of the EFG tensor q_{xx}, q_{yy} and q_{zz} are defined in its principal axis system and are ordered according to $q_{xx} \leq q_{yy} \leq q_{zz}$. This trace-less tensor can then be fully described by only two nuclear quadrupole interaction (NQI) parameters: (i) the ^{14}N nuclear quadrupole coupling constant $\kappa = e^2 q_{zz} Q/4h$, where e is the charge of electron and Q is the nuclear electric quadrupole moment of the ^{14}N nucleus, (ii) the asymmetry parameter $\eta = q_{yy} - q_{xx}/q_{zz}$. κ is a measure of the strength of the interaction between the nuclear quadrupole moment and the EFG at the ^{14}N nucleus site due to the anisotropic charge distribution in the system, whereas η is a measure of the deviation of the charge distribution from axial symmetry. κ and η are very sensitive to atomic and chemical bon arrangements and are excellent probes for the identification of bonding geometry and of the chemical group housing the nucleus. They can, therefore, be used for the identification and characterization of the ^{14}N atom.

Spectral simulations were carried out using the EasySpin package (release 5.2.36) under Matlab (release 2015b) (The MathWorks, Inc, US).[7] Simulations of ^{14,15}N HYSCORE spectra were

carried out assuming axial hfi tensors. The main axes of the g-, hyperfine- and quadrupolar tensors were assumed to be collinear.

2.4. DFT calculations

Constrained geometry optimization calculations were performed in vacuum by DFT with Gaussian16 software[8], with the hybrid functional B3LYP [9–11] and the def2-SVP basis set.[12] The optimized structures served as input files for magnetic property calculations with Orca3.0 software[13] using the B3LYP functional and EPR-II basis [14] and taking into account a D3BJ dispersion correction.[15] The electrostatic effects of the protein environment were taken into account using conductor-like polarizable continuum model (CPCM)[16] with a dielectric constant $\varepsilon = 4.0$.

3. Results and discussion

Membrane interaction facilitates quinone exchange in the ForCE1 complex

To evaluate the exchangeability of MK-7 co-purified with the ForCE1 complex, the latter was incubated with inner membrane vesicles from *E. coli* prior to repurification of the complex and analysis of its quinone content by HPLC-ECD. To maximize the presence of UQ-8 in the vesicles, *E. coli* cultures were conducted under aerobic conditions.[17,18] The experiment was also conducted in the absence or presence of formate, which served as an electron donor to facilitate MK-7 reduction. As demonstrated in Figure 68, in the absence of formate, incubation of ForCE1 with IMVs results in the binding of all three types of *E. coli* quinone in small quantities, in proportions comparable to the quinone composition of the membrane of aerobically grown cells.[18] The total quantity of quinones associated with the complex exceeds the stoichiometric value and likely accounts for the complex's capacity to bind several molecules simultaneously in the tube formed by the ForE tetramer. Conversely, the addition of formate significantly reduces the amount of MK-7 associated with ForCE1 from 1 to 0.25, and to a lesser extent, that of *E. coli* quinones. This observation suggests that turnover of the ForCE1 complex specifically induces MK-7 dissociation.

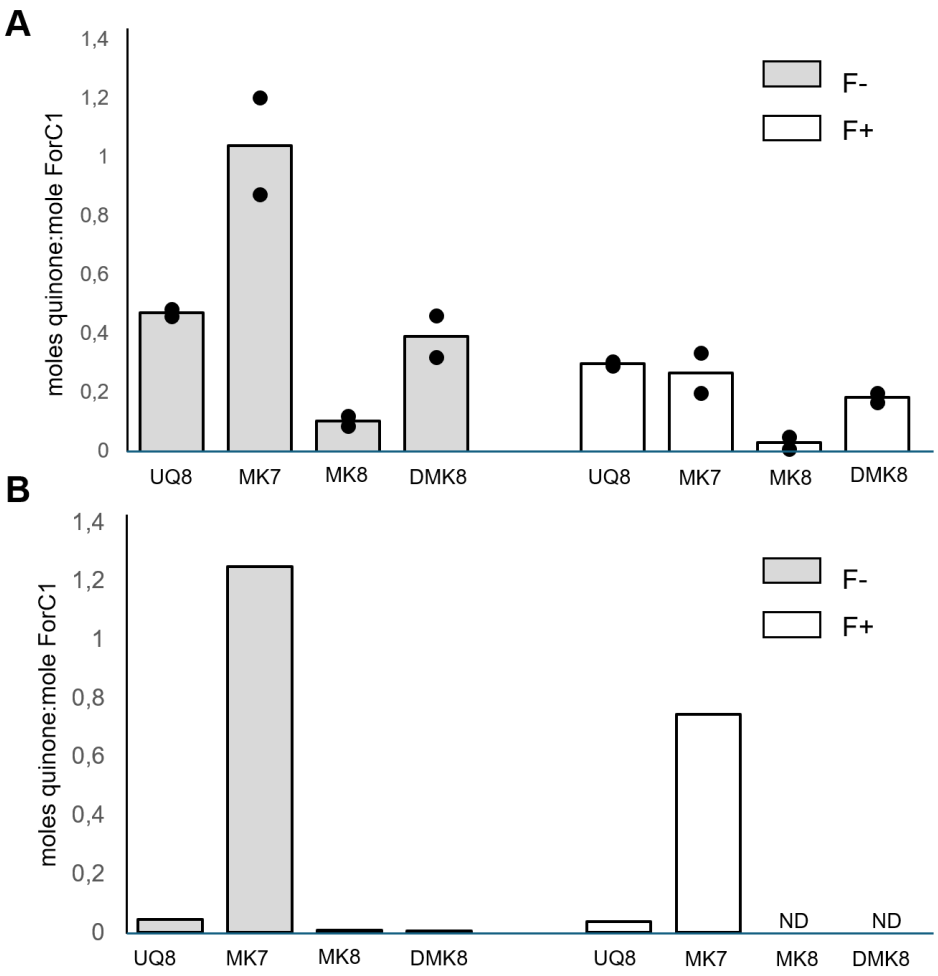


Figure 68. Evaluation of the exchangeability of the quinone associated with the ForCE1 complex with (A) and without (B) the HMP domain. The reported values correspond to the quantification of quinones co-purified with the ForCE1 complex after incubation with *E. coli* membrane vesicles, followed by separation and purification. The presence or absence of formate during incubation is indicated by different colors. Values are expressed as moles of quinone per mole of ForCE1 complex. ND refers to non-detected molecules.

To ascertain whether the capacity for quinone exchange is associated with membrane interaction, an experiment was conducted utilizing a modified version of the ForCE1 complex that lacked the helical membrane plug-in (HMP) domain responsible for membrane binding.[3] In the absence of formate, ForCE1 exclusively contains MK-7. Under turnover conditions, ForCE1 exhibits an almost unaltered quantity of MK-7, suggesting a limited capacity to release the quinone from the complex. Consequently, membrane interaction is essential for the binding of exogenous quinones and the exchange of MK-7 under turnover conditions.

^{14}N HYSCORE spectroscopy of the ForCE1 bound MSK

To identify the binding mode of the stabilized MSK intermediate in ForCE1, a study of the radical using HYSCORE spectroscopy was conducted on a protein sample in which the amount of the radical was maximized through potentiometric titration: at a potential of -50 mV vs ESH, only the radical signal is detected on the EPR spectrum. This isotropic signal is characterized by an average *g*-value g_{av} ~ 2.004 and a peak-to-peak width of 0.88 mT (Figure S1). Time-domain HYSCORE spectra of the radicals were measured at a temperature of 50 K and a magnetic field corresponding to g ~ 2.004 using three different τ values: τ = 136 ns and 204 ns were selected to suppress the modulation at the free ^{1}H Larmor frequency ($\nu_I(^{1}H)$ ~14.7 MHz) from weakly-coupled "matrix" protons whereas τ = 440 ns was chosen to deviate significantly from the former values. Corresponding frequency-domain HYSCORE spectra obtained after two-dimensional Fourier transformation of the experimental data are shown in Figure S2. Intense signals from ^{14}N nuclei (nuclear spin value I = 1, natural abundance ~ 99.63 %) are detected in the low-frequency region [0-6] MHz. Their intensity dominates that of weaker signals detected around $\nu_I(^{1}H)$ from coupled protons (I = ½, natural abundance ~ 99.99 %) in the spectra recorded using τ = 136 ns and 204 ns (Fig. S2). Their high intensity and their occurrence in both the (+,+) and (-,+) quadrants are characteristic of the presence of a ^{14}N hyperfine coupling with predominant isotropic hyperfine coupling constant in an intermediate coupling situation for which the isotropic part of the hyperfine coupling A_{iso} satisfies the relation $A_{iso} \sim 2\nu_I(^{14}N)$ where $\nu_I(^{14}N) \sim 1.1$ MHz (*i.e.,* the so-called cancellation condition).[19] This situation provokes a strong dampening effect on the ^{1}H modulation by the suppression effect.[20] Figure 69 shows the low-frequency part of these spectra restricted to the (+,+) quadrant for the three τ values used.

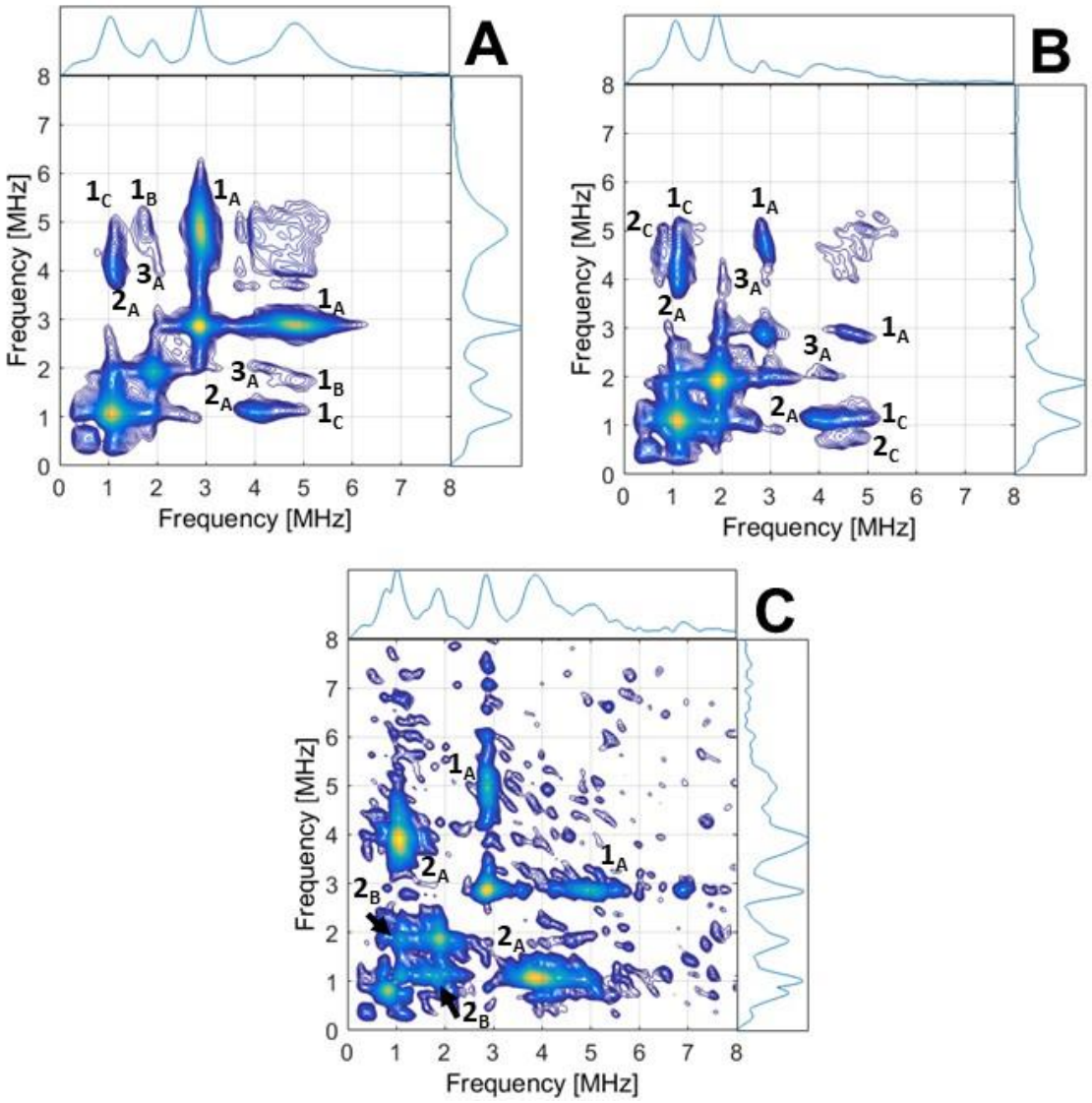


Figure 69. X-band ^{14}N HYSCORE spectra of MSK stabilized by redox potentiometry in *Bs*ForCE1. Spectra were recorded at 50 K using τ = 136 ns (A), τ = 204 ns (B), and τ = 440 ns (C). Other experimental parameters are given in the caption of Figure S1 and in the Experimental section.

The HYSCORE spectrum measured with τ = 136 ns displays three intense diagonal peaks at ~1.1 MHz, 1.9 MHz and 2.9 MHz as well as a pair of high-intensity cross-peaks $\mathbf{1_A}$ correlating nuclear frequencies 2.9 and 4.8 MHz (Figure 69**A**). This characteristic pattern of a ^{14}N nucleus experiencing the cancellation condition implies that the effects of the hyperfine interaction and the nuclear Zeeman interaction cancel each other in one of the electron spin manifolds characterized by $M_S = \pm 1/2$ so that the nuclear frequencies detected in this manifold correspond to the pure nuclear quadrupole frequencies $\nu_0 = \kappa(3+\eta)$, $\nu_- = \kappa(3-\eta)$ and $\nu_+ = \kappa\eta$ and satisfy the relationship $\nu_0 + \nu_- = \nu_+$. $\kappa = e^2q_{zz}Q/4h$ is the quadrupole coupling constant, and η is the

asymmetry parameter of the electric field gradient at the nucleus. This situation is also characterized by the absence of a single-quantum peak in the other electron spin manifold, and by a broadening of the corresponding double-quantum peak, which then exhibits maximum intensity at a frequency approximated by

$$\nu_{dq+} = 2(\nu_{eff+}^2+c)^{0.5} \quad \text{(Eq. 1)}$$

where $\nu_{eff+/-} = \nu_I \pm A/2$ and $c = \kappa^2(3+\eta^2)$.[19] A is the secular part of the associated hyperfine coupling tensor determined mainly by its isotropic part A_{iso} in the case of a weakly anisotropic hyperfine tensor. The interacting nitrogen nucleus, hereafter referred to as N_1, is therefore characterized by $(\nu_0, \nu_-, \nu_+, \nu_{dq+}) = (1.1, 1.9, 2.9, 4.8)$ MHz, and cross-peaks $\mathbf{1_A}$ are consistently assigned to correlations between double-quantum nuclear transition frequencies (ν_+, ν_{dq+}) from the two opposite $M_S = \pm 1/2$ electron spin manifolds. This assignment leads to $(\kappa, \eta)(N_1) =$ (0.78 MHz, 0.66) and $A(N_1) = 1.75$ MHz (Table 1).

An additional pair of high-intensity cross-peaks $\mathbf{2_A}$ correlating frequencies 1.0 MHz and 4.0 MHz is also detected in the HYSCORE spectra shown in Figure 69. It is predominantly seen in the spectrum measured using $\tau = 440$ ns (Figure 69**C**) and assigned to correlation peaks between the double quantum frequencies $\nu_{dq-} = 1.0$ MHz and $\nu_{dq+} = 4.0$ MHz from an additional ^{14}N, (hereafter referred to as N_2) coupled to the MSK radical whose coupling parameters satisfy $\nu_{eff+/-} / \kappa > 1$. Indeed, in this case only a single pair of cross peaks correlating double quantum transitions from the two electron spin manifolds is expected due to a weak orientation dependence of the corresponding transitions.[19] Their maximum intensity is well described by Eq. 1. In contrast, the single quantum transitions usually do not show any resolved peaks because of significant orientation dependence from quadrupole interaction. Application of equation 1 to the observed frequencies gives $A(N_2) = 1.85$ MHz and $c(N_2) = 0.24$ MHz^2. Given that $0 \leq \eta \leq 1$, this leads to $0.25 < \kappa(N_2) < 0.28$ (Table 1).

Further examination of the HYSCORE spectra reveals the presence of lower intensity cross-peaks. These include cross-features $\mathbf{1_B}$ (Figure 3A) and $\mathbf{1_C}$ (Figure 3B) which are tentatively assigned to correlations from N_1 between single quantum transitions within the electron spin manifolds experiencing the cancellation condition and the double quantum transition from the opposite manifold, *i.e.*, (ν_-, ν_{dq+}) and (ν_0, ν_{dq+}). Other weak cross-features $\mathbf{2_B}$, $\mathbf{2_C}$ and $\mathbf{3_A}$ correlating (1.8, 1.1) MHz, (4.2, 0.8) and (4.0, 2.0) MHz, respectively, could arise from N_2 and/or combine frequencies from both N_1 and N_2. The occurrence of the latter combination peaks can be observed when at least two nuclei are coupled to the same electron spin.[21]

	Nitrogen nucleus	HFI (A_{iso}, T) or (A_{iso}, T_i)	NQI ($\|\kappa\|$, η)
Experimental (EPR)	$^{14}N_1$	(1.75, 0.29)	(0.78, 0.66)
	$^{14}N_2$	(1.85, 0.36)	($\in$[0.25-0.28], $\in$ [0,1])
Theoretical (DFT)	Thr100 N_{backb}	(0.97, -0.25, -0.17, 0.42)	(0.89, 0.66)
	Lys234 Nζ	(1.01, -0.14, -0.11, 0.25)	(0.23, 0.87)
	Leu97 N_{backb}	(-0.00, -0.01, -0.02, 0.03)	(1.22, 0.24)
	Tyr98 N_{backb}	(-0.02, -0.03, 0.07, -0.05)	(0.97, 0.49)
	Cys99 N_{backb}	(-0.06, -0.05, 0.20, -0.16)	(1.10, 0.13)

Table 1. Comparison of nitrogen hyperfine and quadrupolar parameters determined from the analysis of ^{14}N HYSCORE experiments of the MSK in *Bs*ForCE1 to those calculated from the DFT model derived from the cryoEM structure of the enzyme. All values are in MHz except for dimension-less η.

^{15}N HYSCORE spectroscopy of the MSK stabilized in uniformly enriched ForCE1.

^{14}N HYSCORE spectra of the MSK radical in *Bs*ForCE1 reveal the presence of at least two nitrogen nuclei specifically coupled to the radical. To facilitate a more detailed analysis of these hyperfine couplings and to better characterize the nitrogen environment of the radical with enhanced spectra resolution, it is essential for employ ^{15}N-labeled proteins. Indeed, the ^{15}N nucleus, which is a spin ½ system, lacks the nuclear quadrupole moment that influences the ^{14}N HYSCORE spectra. Therefore, HYSCORE experiments were performed on the MSK generated in uniformly ^{15}N labeled ForCE1 purified from a *Bacillus subtilis* strain grown in (M9) minimal medium supplemented with $^{15}NH_4Cl$ as the only nitrogen source.

Figure **70**A shows the low-frequency region of a representative ^{15}N HYSCORE spectrum measured with τ = 204 ns at the maximum of the MSK EPR line using a sample redox poised at -45 mV. It displays cross-features **1**, **2** and **3** located in the (+, +) and (-, +) quadrants, with maxima at (2.7, 0.4) MHz (**1**), (0.8, 2.7) MHz (**2**) and (-3.2,0.4) MHz (**3**). The first-order estimates of the hyperfine couplings calculated as the difference between the above-mentioned correlated frequencies are 2.3 and 2.8 MHz for **1** and **3**, respectively (1.6 and 2.0 MHz when scaled to ^{14}N). These values are consistent with the coupling estimated for N_1 and N_2 from ^{14}N HYSCORE spectra. Notably, cross-ridges **3** are parallel to one of the axes, a characteristic

property of ^{15}N nuclei whose hfi parameters verify $|2A_{iso} + T| \sim 4\nu_I(^{15}N)$.[22] In this situation, cross-features having a similar shape are expected to show up in both quadrants or even have comparable intensity. Therefore, it is anticipated that the same nucleus contributes to cross-peaks **1**. Moreover, this situation corresponds to the cancellation condition regime for the corresponding ^{14}N nucleus. Therefore, this nucleus is assigned to N_1.

In contrast to cross-peaks **1** that are approximately centered on the ^{15}N Larmor frequency, *i.e.*, $\nu_I(^{15}N) \sim 1.5$ MHz, cross-peaks **2** are located well above the antidiagonal passing through $\nu_I(^{15}N)$. To the best of our knowledge, such cross-peaks have not been detected in ^{15}N HYSCORE spectra of protein-bound SQ.[23–27] They are tentatively attributed to cross-combination peaks produced when several nuclei are coupled to the same electron spin (see next section). Finally, a diagonal signal **4** is detected on the diagonal at $\nu_I(^{15}N)$, surrounded by weak non-diagonal peaks of low intensity. These signals are ascribed to the contribution of at least one additional weakly-coupled ^{15}N nucleus.

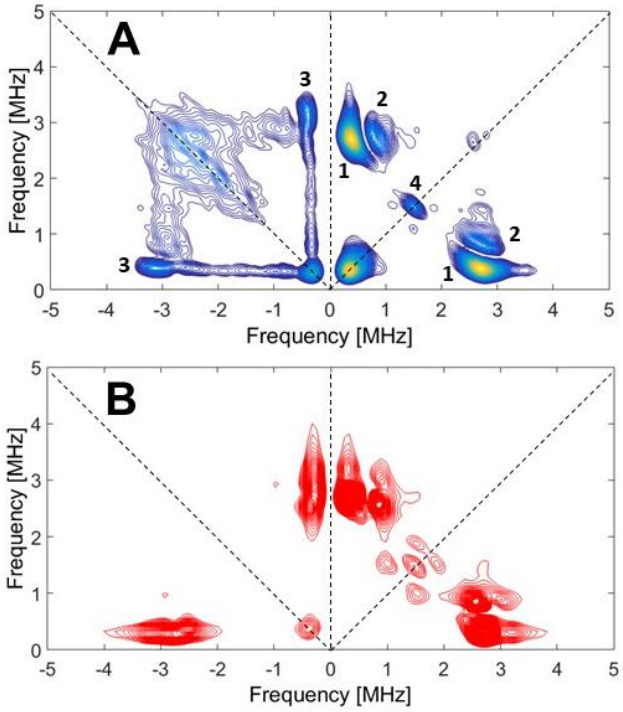


Figure 70. Experimental (A) and simulated (B) ^{15}N HYSCORE spectrum of the MSK in ^{15}N uniformly enriched *Bs*ForCE1 measured using τ = 204 ns. The simulated spectrum was calculated assuming that the S = ½ MSK is magnetically coupled to three ^{15}N nuclei referred to as N_1, N_2 and N_3 with hyperfine parameters as given in the main text. Experimental parameters: magnetic field, 346.7 mT, microwave frequency, 9.727 GHz, acquisition time, 22 hours. Other experimental conditions are given in the Experimental section.

Simulations of $^{14/15}$N HYSCORE spectra.

To support our interpretation of the ^{15}N HYSCORE signals described above, spectral simulations were carried out. They first showed that the elongated profile of cross-peaks **1** cannot be simulated by a single nitrogen coupling, but rather results from the contribution of two nuclei (Figure S3). These nuclei have rather close A_{iso} and T values and thus produce partially overlapping spectral contributions in cross-peaks **1**. Indeed, the position and profile of cross-peaks **1, 2** and **3** are satisfactorily simulated using coupling parameters (A_{iso}, T)($^{15}N_1$) = (2.8, 0.5) MHz and (A_{iso}, T)($^{15}N_2$) = (2.1, 0.4) MHz, respectively (Fig. 4B). This model confirms that $^{15}N_1$ strongly contributes in the two (-, +) and (+, +) quadrants (Fig. S3A) while N_2 contributes mainly to the part of cross-peaks **1** closer to the diagonal in the (+, +) quadrant (Fig. S3B). Furthermore, these simulations unambiguously show that cross-peaks **2** are produced by the situation of multiple coupling of the MSK to both N_1 and N_2 and are not generated in case of single coupling to only one of them (Fig. S3). Finally, peak **4** and the weaker cross-peaks around it are simulated by considering that the radical is coupled to a third weakly-coupled ^{15}N designated as N_C with estimated hyperfine parameters (A_{iso}, T)($^{15}N_C$) = (0.02, 0.25) MHz (Fig. 2B).

Our spectral interpretation was further supported by numerical simulation of ^{14}N HYSCORE spectra. These were carried out by scaling the hyperfine ^{15}N parameters of N_1 and N_2 to those of ^{14}N as starting values, then slightly refining the value A_{iso} (N_2) from 1.5 MHz to 1.8 MHz. A simulation example is shown in Figure 71 superimposed to the experimental spectrum measured with τ = 136 ns. While the quadrupole parameters are well determined for N_1 which experiences the cancellation condition, this is not the case for those of N_2. However, our simulations narrow down the range of possible values to $\eta(N_2) \leq 0.6$. A value η = 0.5 was chosen for the simulation shown in Figure 71, in which the position and relative intensity of cross peaks **2a** are satisfactorily reproduced. Intense cross-peaks $\mathbf{2_B}$ are also present in simulations where only N_2 is present. (Figure S4B). These peaks appear to correlate the ν_{dq+} = 3.9 MHz double quantum transition of this nucleus with the 2.0 MHz frequency, which can then be attributed to a single quantum transition ν_{sq-} of the opposite manifold.

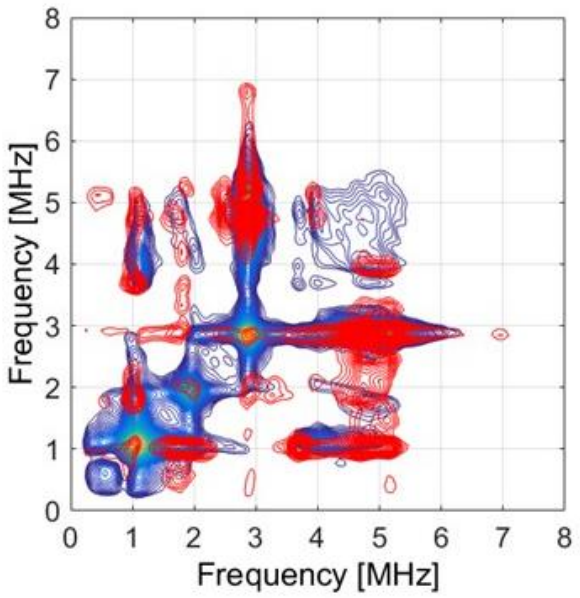


Figure 71. Superposition of the ^{14}N region of the X-band HYSCORE spectrum of MSK in *Bs*ForCE1 with its simulation. The experimental spectrum is reproduced by simulation (red contour) using the following parameters: HFI parameters (A_{iso}, T) = (2.0, 0.29) MHz (N_1) and (1.8, 0.36) MHz (N_2), NQI parameters (κ, η) = (0.78 MHz, 0.66) (N_1) and (0.23 MHz, 0.5) (N_2).

Assignment of the detected nuclei

The relatively large isotropic hyperfine coupling values between the MSK and N_1 and N_2 ($A_{iso}(^{14}N)$ ~ 2.0 and 1.8 MHz, respectively) reflects significant delocalisation of the electron spin of MSK onto the interacting nitrogens. This translates into a small delocalization of spin density in the nitrogen atom 2s orbital indicative of an atomic bridge between the SQ and the two ^{14}N nuclei. The only likely mechanism for such a transfer is via hydrogen bonds between the SQ oxygens and these nitrogens. While N_1 and N_2 have close hyperfine parameters, they are clearly distinguished by their NQI parameters. The latter can be used to provide clues as to the origin of the detected nitrogens by comparison with similar data obtained from reported ESEEM studies of protein-bound SQ. Although experimental data are not available for all possible candidates, the quadrupolar coupling parameters (κ, η) = (0.78 MHz, 0.66) of N_1 place themselves in the diagram of Figure 72 in the region reported for the interaction of SQ with backbone nitrogens, as in the Q_A and Q_B sites of bacterial reaction centers[28–30] and photosystem II[31–33]. Regarding N_2, its κ parameter = (0.25-0.28 MHz) is consistent with the corresponding parameter measured by nuclear quadrupole resonance for Lys Nξ nitrogens *i.e.*, (κ, η) = (0.25 MHz, 0.64)[34]. Thus, the assignment of the nuclei detected by HYSCORE spectroscopy on the basis of their quadrupolar parameters and the corresponding data available in the literature is

highly consistent with the quinone binding mode resolved by cryoEM, which implies the existence of a hydrogen bond between the O1 of MK-7 and the terminal nitrogen of Lys 234, and another one between the MK-7 O4 and the backbone nitrogen of Thr100.

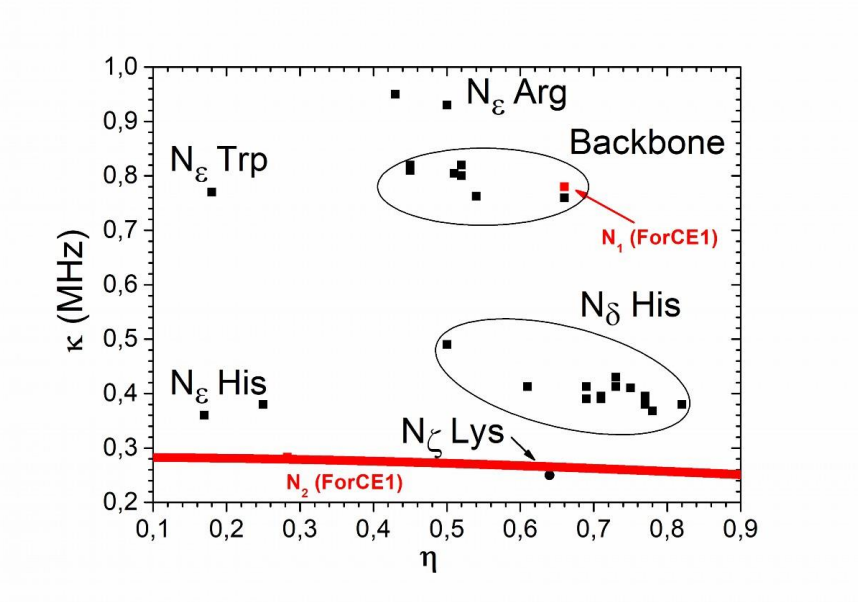


Figure 72. NQI parameters of ^{14}N measured by ESEEM spectroscopy of protein-bound SQ or by nuclear quadrupole resonance (NQR) in amino acids (Lys Nζ[34]). For SQ measurements, the Trp Nε was assigned for interaction at the phylloquinone site A_1 in photosystem 1[35], His Nε at the ubiquinone reduction site Q_i of bacterial *bc*$_1$ complex[36,37], Arg Nε at the ubiquinol oxidation site QH in cytochrome *bo*$_3$[23,27,38,39] or in the H217R variant in the Q_i site of bacterial *bc*$_1$ complex[37], His Nδ and backbone nitrogen at the Q_A and Q_B sites of bacterial reaction centers[28–30] and photosystem 2[31–33], and His Nδ at the quinone reduction site Q_D in bacterial nitrate reductase NarGHI[40–42]. The values of (κ, η) for N_1 are indicated by a red arrow while possible values for N_2 satisfy the relationship $\kappa^2(3+\eta^2) = 0.24$ MHz^2 corresponding to the red curve.

A structure-based DFT model of MSK binding to ForCE1.

To strengthen our assignment in light of the three-dimensional structures of the enzyme, a small molecular model was built based on the cryoEM structure of ForCE1. A neutral MSK (MSKH•) was used to keep consistency with our previous spectroscopic data.[4] The quinone was protonated on the O1 oxygen located on the Lys 234 side, as this side appears to be more accessible to the solvent, with a water molecule resolved there in the crystal structure (Fig. 1A). In addition to Lys234, Glu237 and Thr100, Leu97 was added to the model as its backbone oxygen points toward the quinone and is located at 3 Å from the MK7 O1 oxygen, as well as Cys99 whose backbone nitrogen is at 2.9 Å from the O4 oxygen, and Tyr 98 to constrain Leu97 and Cys99 movements during geometry optimization. To reduce calculation time, Thr100 has

been truncated at the C=O, only the backbone of Tyr98 and Cys99 and the Lys234 sidechain (from its Cβ) have been taken into account. In addition, the quinone side chain has been truncated after one isoprene unit (Figure 73). In a previous work based on DFT calculations, we have shown that three structural parameters have a major influence on the calculated HFI and NQI parameters of a nitrogen hydrogen bonded to a MSK.[42] These include the H-bond length r_{O-H}, the in-plane hydrogen bond angle α and the out-of-plane hydrogen bond angle β (Fig. S5). On the basis of this work, these parameters were slightly modified for N_1 and N_2 with respect to their values in the cryoEM structure prior to geometry optimization. After several tests, a tentative model shown in Figure 73 was obtained using the parameters given in Table S1. It satisfactorily accounts for the experimentally-determined magnetic parameters for N_1 and N_2, as shown in Table 1. The deviation of the in-plane angles α defining the orientation of the radical's hydrogen bonds with the backbone nitrogen of Thr100 or with the Lys234 Nζ is less than 20° for the DFT model compared to the cryoEM model, and the corresponding out-of-plane angles β are essentially unchanged. In addition, the distance between the MK-7 O4 and the Thr100 backbone oxygen increased by 1 Å in the DFT model compared to the cryoEM model which leads to the braking of the associated H-bond. In contrast, those between the MK-7 carbonyl oxygens and the three other H-bonded atoms were shortened by about 0.1 Å (Thr100), 0.6 Å (Lys234) and 0.8 Å (Glu237) for the radical intermediate in the DFT model. This shortening is reminiscent to previous DFT calculations performed on benzoquinone radical anion solvent interactions demonstrating that upon formation of the radical anion, the distance between the quinone carbonyl oxygen and a H-bonded water molecule gets shorter by about 0.25 Å.[43] Notably, the corresponding calculated ^{14}N quadrupolar parameters that have been shown to be strongly affected by r_{O-H} and the α angle are very close to the experimental values for N_1 and N_2, further supporting our assignment (Table 1).[42,44] In particular, the best agreement is found between the experimentally determined parameters (κ, η) of N_1 and those of the Thr100 backbone nitrogen nucleus, with the model's other backbone nitrogens systematically giving values further apart. Eventually, this work indicates that the environment and the geometry of the MK-7 resolved in the cryoEM structure provides a good overall model to describe that of the $MSKH^{\bullet}$.

In the DFT model, the protonation of O_1, in line with our previous work[4], has important consequences for the distribution of spin density within the quinone moiety (Fig. 7A). Indeed, it causes a strong asymmetry leading to a significant decrease in spin density on the quinone O_1 and a concomitant increase in that on the adjacent ring C1, while the opposite situation occurs

on the opposite quinone carbonyl group. Moreover, this strong asymmetry also translates in particular into a shift in spin density on the ring C2 carrying the methyl group (which becomes negative) towards the C3 carrying the isoprene chain. This shift is predicted to directly impact the HFI parameters of the β-protons carried by these two carbons. Further work is needed to specifically characterize these couplings and further test our DFT model, for example using a strategy based on selective ^{2}H labeling of the menaquinone methyl ring substituent.[42]

A strong polarization of charge and spin distribution of the SQ stabilized in the Q_i site of *Rhodobacter spahaeroides* cytochrome bc_1 complex has been discussed to promote transition between the SQ^- and SQH states, thereby securing efficient progress of the catalytic reaction at the Q_i site. [37,45]

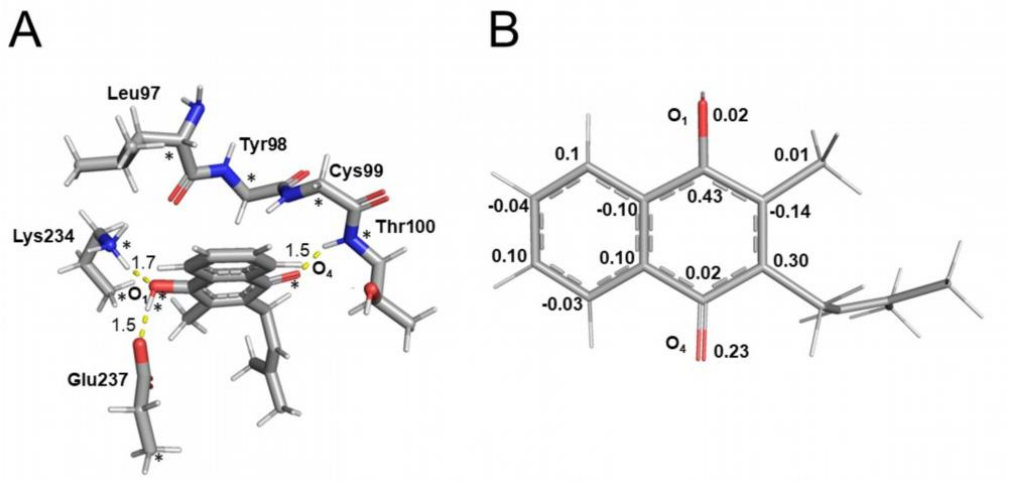


Figure 73. A) DFT model of MSKH• binding to the Q-site of *Bs*ForCE1. In this model, Lys84 is in its protonated form according to the prediction of the Propka 2.0 program (pK_A = 11.3) whereas Glu237 is deprotonated (pK_A = 5.1). Geometry optimization was performed with the constraints imposed on the atoms indicated by asterisks which were frozen to preserve the rigidity of the model. B) Mulliken spin populations of the ring carbon and oxygen atoms in MSKH• in the model shown in A). In A), hydrogen bonds are indicated by yellow dotted lines and their length is given in Å. Distances between the nearest MK-7 oxygen and the H-bonded atoms are 2.6 Å (Lys234 Nζ), 2.5 Å (Glu237 Oε) and 2.4 Å (Thr100 backbone N) whereas that with the Thr100 backbone O is 3.4 Å. The isoprenoid side chain has been truncated after one isoprene unit.

4. Conclusions

In conclusion, this study offers a comprehensive analysis of the binding mode of the semiquinone intermediate and its binding site, which is situated at the interface between the ForC catalytic subunit and the tube formed by the ForE tetramer. Structural data analysis reveals

that two-thirds of the MK7 molecule, *i.e.* approximately twenty angstroms in length, is positioned outside the Q site. This binding site exhibits similarities to that of the Huc complex in the bacterium *Mycolicibacterium smegmatis*.[46] The oxidoreductase, specifically a [Ni-Fe] hydrogenase, is organized around a tube that facilitates interaction with the membrane and connection with the electron transfer chain.[46,47] Again, the quinone binding site is situated at the interface of the oxidoreductase, which is constituted by the HucSL complex and the HucM tube. Notably, in both instances, the quinone binding site is atypically distant from the membrane, ranging between 60 and 90 Å. The proposed mechanism for energy conservation in these systems is analogous, suggesting that the tube facilitates access to the membrane quinone pool, as its internal dimensions and properties are conducive to the movement of these molecules. Consistent with this model, cryo-EM analysis of the ForCE1 complex has identified numerous densities within the tube, most of which are ascribed to lipids or MK-7.[3]

Our findings indicate that membrane association is crucial for the binding of exogenous quinones by the ForCE1 complex and for the exchange of MK-7 during turnover, thereby challenging the current understanding of the quinone turnover mechanism at the Q site. Two potential scenarios are proposed: firstly, the quinone, upon reduction, only partially dissociates from its site, which aligns with the lower affinity observed in potentiometric studies, and facilitates electron exchange with a nearby quinone within the tube, thereby connecting to the membrane quinone pool. Alternatively, in the second scenario, the quinol dissociates from the site, migrates within the tube, and is subsequently replaced by a quinone at the Q site. The co-purification of three types of *E. coli* quinones with ForCE1 suggests that both the complex and the tube can simultaneously bind multiple quinones, with up to eight quinone molecules per hetero-oligomeric complex. Further experimental investigations are necessary to evaluate these scenarios and to enhance the understanding of this novel mode of integrating oxidoreductases into microbial energy metabolism.

Acknowledgements

This work was supported by the Agence Nationale de la Recherche [ANR-22-CE44-0035 & ANR-23-CE44-0012]. We would like to thank the Région Sud - Provence Alpes Côte d'Azur for granting a *Emplois Jeunes Doctorants* scholarship to SZ for the Microbio_CO2 project, the support of the Capenergies competitiveness cluster, and the GERME company. Financial support from INFRANALYTICS (CNRS FR2054) for conducting the research is also gratefully acknowledged. This work was supported by the computing facilities of the *Centre Régional de Compétences en Modélisation Moléculaire de Marseille* (CRCMM).

Author contributions

S. Z.: Enzyme purification and biochemical assays, preparation of EPR samples, EPR spectroscopy, HYSCORE data analysis, DFT calculations, A.U.: HYSCORE data analysis, G.G.: HYSCORE spectroscopy, F.P.: HPLC-ECD-MS analyses, F.B.: Analysis of DFT calculations, A. M. and S.G.: Conceptualization, supervision, formal analysis, funding acquisition, methodology, project administration, writing original draft, review and editing with contributions of all co-authors.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article available.

References

(1) Nowicka, B.; Kruk, J. Occurrence, Biosynthesis and Function of Isoprenoid Quinones. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* **2010**, *1797* (9), 1587–1605. https://doi.org/10.1016/j.bbabio.2010.06.007.

(2) Wilkens, D.; Simon, J. Biosynthesis and Function of Microbial Methylmenaquinones. In *Advances in Microbial Physiology*; Elsevier, 2023; Vol. 83, pp 1–58. https://doi.org/10.1016/bs.ampbs.2023.05.002.

(3) Broc, M.; Cherrier, M. V.; Uzel, A.; Arias-Cartin, R.; Arnoux, P.; Brasseur, G.; Seduk, F.; Guigliarelli, B.; Legrand, P.; Pierrel, F.; Schoehn, G.; Maté, M. J.; Martin, L.; Grimaldi, S.; Nicolet, Y.; Magalon, A.; Walburger, A. A Conserved Scaffold for Quinone Channeling between Membrane and Soluble Oxidoreductases. *Nature Structural and Molecular Biology*. 2025, in press.

(4) Arias-Cartin, 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. *J. Biol. Chem.* **2022**, *298* (2), 101384. https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.101384.

(5) Lowry, O.; Rosebrough, N.; Farr, A.; Randall, R. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* **1951**, *193* (1), 265–275.

(6) Magalon, A.; Rothery, R. A.; Giordano, G.; Blasco, F.; Weiner, J. H. Characterization by Electron Paramagnetic Resonance of the Role of the Escherichia Coli Nitrate Reductase (NarGHI) Iron-Sulfur Clusters in Electron Transfer to Nitrate and Identification of a Semiquinone Radical Intermediate. *J. Bacteriol.* **1997**, *179* (16), 5037–5045. https://doi.org/10.1128/jb.179.16.5037-5045.1997.
(7) Stoll, S.; Schweiger, A. EasySpin, a Comprehensive Software Package for Spectral Simulation and Analysis in EPR. *J. Magn. Reson.* **2006**, *178* (1), 42–55. https://doi.org/10.1016/j.jmr.2005.08.013.
(8) Frisch, M. J. et al. Gaussian 16, Revision C.01, Gaussian, 2016.
(9) Becke, A. Density-Functional Thermochemistry. III. The Role of Exact Exchange. *J. Chem. Phys.* **1993**, *98* (7), 5648–5652. https://doi.org/10.1063/1.464913.
(10) Lee, C.; Yang, W.; Parr, R. Development of the Colle-Salvetti Correlation-Energy Formula into a Functional of the Electron-Density. *Phys. Rev. B* **1988**, *37* (2), 785–789. https://doi.org/10.1103/PhysRevB.37.785.
(11) Becke, A. A New Mixing of Hartree-Fock and Local Density-Functional Theories. *J. Chem. Phys.* **1993**, *98* (2), 1372–1377. https://doi.org/10.1063/1.464304.
(12) Schafer, A.; Horn, H.; Ahlrichs, R. Fully Optimized Contracted Gaussian-Basis Sets for Atoms Li to Kr. *J. Chem. Phys.* **1992**, *97* (4), 2571–2577. https://doi.org/10.1063/1.463096.
(13) Neese, F. The ORCA Program System. *WIREs Comput. Mol. Sci.* **2012**, *2* (1), 73–78. https://doi.org/10.1002/wcms.81.
(14) Barone, V. Structure, Magnetic Properties and Reactivities of Open-Shell Species From Density Functional and Self-Consistent Hybrid Methods. In *Recent Advances in Density Functional Methods*; Recent Advances in Computational Chemistry; WORLD SCIENTIFIC, 1995; Vol. Volume 1, pp 287–334. https://doi.org/10.1142/9789812830586_0008.
(15) Grimme, S.; Ehrlich, S.; Goerigk, L. Effect of the Damping Function in Dispersion Corrected Density Functional Theory. *J. Comput. Chem.* **2011**, *32* (7), 1456–1465. https://doi.org/10.1002/jcc.21759.
(16) Barone, V.; Cossi, M. Quantum Calculation of Molecular Energies and Energy Gradients in Solution by a Conductor Solvent Model. *J. Phys. Chem. A* **1998**, *102* (11), 1995–2001. https://doi.org/10.1021/jp9716997.
(17) Shestopalov, A. I.; Bogachev, A. V.; Murtazina, R. A.; Viryasov, M. B.; Skulachev, V. P. Aeration-Dependent Changes in Composition of the Quinone Pool in Escherichia Coli - Evidence of Post-Transcriptional Regulation of the Quinone Biosynthesis. *FEBS Lett.* **1997**, *404* (2–3), 272–274. https://doi.org/10.1016/S0014-5793(97)00143-9.
(18) Nitzschke, A.; Bettenbrock, K. All Three Quinone Species Play Distinct Roles in Ensuring Optimal Growth under Aerobic and Fermentative Conditions in *E. Coli* K12. *PLoS ONE* **2018**, *13* (4), e0194699. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194699.
(19) Dikanov, S. A. Resolving Protein-Semiquinone Interactions by Two-Dimensional ESEEM Spectroscopy. In *Electron Paramagnetic Resonance*; Gilbert, B. C., Murphy, D. M., Chechik, V., Eds.; The Royal Society of Chemistry, 2012; pp 103–179. https://doi.org/10.1039/9781849734837-00103.
(20) Stoll, S.; Calle, C.; Mitrikas, G.; Schweiger, A. Peak Suppression in ESEEM Spectra of Multinuclear Spin Systems. *J. Magn. Reson.* **2005**, *177* (1), 93–101. https://doi.org/10.1016/j.jmr.2005.07.012.
(21) Schweiger, A.; Jeschke, G. *Principles of Pulse Electron Paramagnetic Resonance*; Oxford university press: New York, 2001.

(22) Dikanov, S. A.; Taguchi, A. T. Two-Dimensional Pulsed EPR Resolves Hyperfine Coupling Strain in Nitrogen Hydrogen Bond Donors of Semiquinone Intermediates. *J. Phys. Chem. B* **2018**, *122* (20), 5205–5211. https://doi.org/10.1021/acs.jpcb.8b02511.
(23) 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.
(24) Taguchi, A. T.; Wraight, C. A.; Dikanov, S. A. Influence of Polar Mutations on the Electronic and Structural Properties of Q_A⁻ [.] in Bacterial Reaction Centers. *J. Phys. Chem. B* **2022**, *126* (33), 6210–6220. https://doi.org/10.1021/acs.jpcb.2c04371.
(25) Yi, S. M.; Taguchi, A. T.; Samoilova, R. I.; O'Malley, P. J.; Gennis, R. B.; Dikanov, S. A. Plasticity in the High Affinity Menaquinone Binding Site of the Cytochrome Aa(3)-600 Menaquinol Oxidase from Bacillus Subtilis. *Biochemistry* **2015**, *54* (32), 5030–5044. https://doi.org/10.1021/acs.biochem.5b00528.
(26) Taguchi, A. T.; O'Malley, P. J.; Wraight, C. A.; Dikanov, S. A. Nuclear Hyperfine and Quadrupole Tensor Characterization of the Nitrogen Hydrogen Bond Donors to the Semiquinone of the QB Site in Bacterial Reaction Centers: A Combined X- and S-Band ^{14,15}N ESEEM and DFT Study. *J. Phys. Chem. B* **2014**, *118* (6), 1501–1509. https://doi.org/10.1021/jp411023k.
(27) 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-+. https://doi.org/10.1021/ja805906a.
(28) Bosch, M.; Gast, P.; Hoff, A.; Spoyalov, A.; Tsvetkov, Y. The Primary Acceptor Quinone Q(a) in Reaction Centers of Rhodobacter-Sphaeroides R26 Is Hydrogen-Bonded to the N-Delta(1)-H of His M219 - an Electron-Spin Echo Study of Q(a)(-.). *Chem. Phys. Lett.* **1995**, *239* (4–6), 306–312. https://doi.org/10.1016/0009-2614(95)00481-I.
(29) Lendzian, F.; Rautter, J.; Kass, H.; Gardiner, A.; Lubitz, W. ENDOR and Pulsed EPR Studies of Photosynthetic Reaction Centers: Protein-Cofactor Interactions. *BERICHTE BUNSEN-Ges.-Phys. Chem. Chem. Phys.* **1996**, *100* (12), 2036–2040. https://doi.org/10.1002/bbpc.19961001219.
(30) 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 Q(A)(-Center Dot) in Reaction Centers of Rb-Sphaeroides. *Chem. Phys. Lett.* **1996**, *263* (5), 715–720. https://doi.org/10.1016/S0009-2614(96)01255-9.
(31) Deligiannakis, Y.; Hanley, J.; Rutherford, A. W. 1D- and 2D-ESEEM Study of the Semiquinone Radical Q_A⁻ of Photosystem II. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121* (33), 7653–7664. https://doi.org/10.1021/ja984209c.
(32) Astashkin, A.; Kawamori, A.; Kodera, Y.; Kuroiwa, S.; Akabori, K. An Electron-Spin Echo Envelope Modulation Study of the Primary Acceptor Quinone in Zn-Substituted Plant Photosystem-Ii. *J. Chem. Phys.* **1995**, *102* (14), 5583–5588. https://doi.org/10.1063/1.469289.
(33) 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/bi9820331.
(34) Edmonds, D. T.; Speight, P. A. Nitrogen Quadrupole Resonance in Amino Acids. *Phys. Lett. A* **1971**, *34* (6), 325–326. https://doi.org/10.1016/0375-9601(71)90894-2.

(35) Hanley, J.; Deligiannakis, Y.; MacMillan, F.; Bottin, H.; Rutherford, A. W. ESEEM Study of the Phyllosemiquinone Radical A(1)(Center Dot-) in N-14- and N-15-Labeled Photosystem I. *Biochemistry* **1997**, *36* (39), 11543–11549. https://doi.org/10.1021/bi971360a.
(36) Kolling, D. R. J.; Samoilova, R. I.; Holland, J. T.; Berry, E. A.; Dikanov, S. A.; Crofts, A. R. Exploration of Ligands to the Q_i Site Semiquinone in the Bc_1 Complex Using High-Resolution EPR. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278* (41), 39747–39754. https://doi.org/10.1074/jbc.M305913200.
(37) Kuleta, P.; Pietras, R.; Andrys-Olek, J.; Wojcik-Augustyn, A.; Osyczka, A. Probing Molecular Interactions of Semiquinone Radicals at Quinone Reduction Sites of Cytochrome Bc_1 by X-Band HYSCORE EPR Spectroscopy and Quantum Mechanical Calculations. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2023**, *25* (33), 21935–21943. https://doi.org/10.1039/d3cp02433d.
(38) Grimaldi, S.; MacMillan, F.; Ostermann, T.; Ludwig, B.; Michel, H.; Prisner, T. Q_H^{•-} Ubisemiquinone Radical in the Bo_3-Type Ubiquinol Oxidase Studied by Pulsed Electron Paramagnetic Resonance and Hyperfine Sublevel Correlation Spectroscopy. *Biochemistry* **2001**, *40* (4), 1037–1043. https://doi.org/10.1021/bi001641+.
(39) 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^{•-} 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.
(40) Grimaldi, S.; Arias-Cartin, R.; Lanciano, P.; Lyubenova, S.; Endeward, B.; Prisner, T. F.; Magalon, A.; Guigliarelli, B. Direct Evidence for Nitrogen Ligation to the High Stability Semiquinone Intermediate in *Escherichia Coli* Nitrate Reductase A. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285* (1), 179–187. https://doi.org/10.1074/jbc.M109.060251.
(41) 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-+. https://doi.org/10.1021/ja1009234.
(42) Eddine, M. S.; 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 ReductaseA by Selective ²H and ¹⁵N Labeling, HYSCORE Spectroscopy, and DFT Modeling. *CHEMPHYSCHEM* **2017**, *18* (19), 2704–2714. https://doi.org/10.1002/cphc.201700571.
(43) Sinnecker, S.; Reijerse, E.; Neese, F.; Lubitz, W. Hydrogen Bond Geometries from Electron Paramagnetic Resonance and Electron-Nuclear Double Resonance Parameters: Density Functional Study of Quinone Radical Anion-Solvent Interactions. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (10), 3280–3290. https://doi.org/10.1021/ja0392014.
(44) Fritscher, J. Influence of Hydrogen Bond Geometry on Quadrupole Coupling Parameters: A Theoretical Study of Imidazole-Water and Imidazole-Semiquinone Complexes. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2004**, *6* (21), 4950–4956. https://doi.org/10.1039/b408764j.
(45) Pintscher, S.; Wojcik-Augustyn, A.; Sarewicz, M.; Osyczka, A. Charge Polarization Imposed by the Binding Site Facilitates Enzymatic Redox Reactions of Quinone. *Biochim. Biophys. ACTA-Bioenerg.* **2020**, *1861* (8), 148216. https://doi.org/10.1016/j.bbabio.2020.148216.
(46) Grinter, R.; Kropp, A.; Venugopal, H.; Senger, M.; Badley, J.; Cabotaje, P.; Stripp, S. T.; Barlow, C. K.; Belousoff, M.; Cook, G. M.; Vincent, K. A.; Schittenhelm, R. B.;

Khalid, S.; Berggren, G.; Greening, C. Energy Extraction from Air: Structural Basis of Atmospheric Hydrogen Oxidation. Biochemistry October 10, 2022. https://doi.org/10.1101/2022.10.09.511488.
(47) Soom, S.; Moning, S. U.; Cook, G. M.; Lingford, J. P.; Kropp, A.; Tran, S.; Grinter, R.; Greening, C.; Von Ballmoos, C. Hydrogenase-Driven ATP Synthesis from Air. Microbiology March 15, 2025. https://doi.org/10.1101/2025.03.14.643271.

Supplementary Information

Studying molecular interactions between menaquinones and the quinone-reducing formate dehydrogenase ForCE1 from *Bacillus subtilis*

Stéphane Zakarian, [a,b] Alexandre Uzel,[a, #] Guillaume Gerbaud,[a] Fabien Pierrel,[c] Frédéric Biaso,[a] Axel Magalon,[b] Stéphane Grimaldi[a] .

[a] *Aix Marseille Univ, CNRS, BIP, IMM, IM2B, Marseille, France*

[b] *Aix Marseille Univ, CNRS, LCB, IMM, IM2B, Marseille, France*

[c] *Univ Grenoble-Alpes, CNRS, Grenoble INP, TIMC, Grenoble, France.*

[*] Correspondence to: S. Grimaldi (stephane.grimaldi@univ-amu.fr) or A. Magalon (magalon@imm.cnrs.fr)

[#] Present address: *CEA, Laboratoire de Résonance Magnétique, INAC/SCIB, Grenoble, France.*

Table S1. Comparison of relevant geometrical parameters of the DFT model of MSKH$^{\bullet}$ binding to *Bs*ForCE1 after geometry optimization to those inferred from the analysis of the cryoEM structure. The in-plane angle α and the out-of-plane β angles are defined in Figure S5.[42]

Model	H-bond to Lys 234			H-bond to Thr100		
	Distance N(Lys)-O_1(MK) (Å)	In-plane angle α (°)	Out-of-plane angle β (°)	Distance N(Thr)-O_4(MK) (Å)	In-plane angle α (°)	Out-of-plane angle β (°)
CryoEM	3.2	-30	49	2.5	0	26
DFT	2.6	-18	47	2.4	18	24

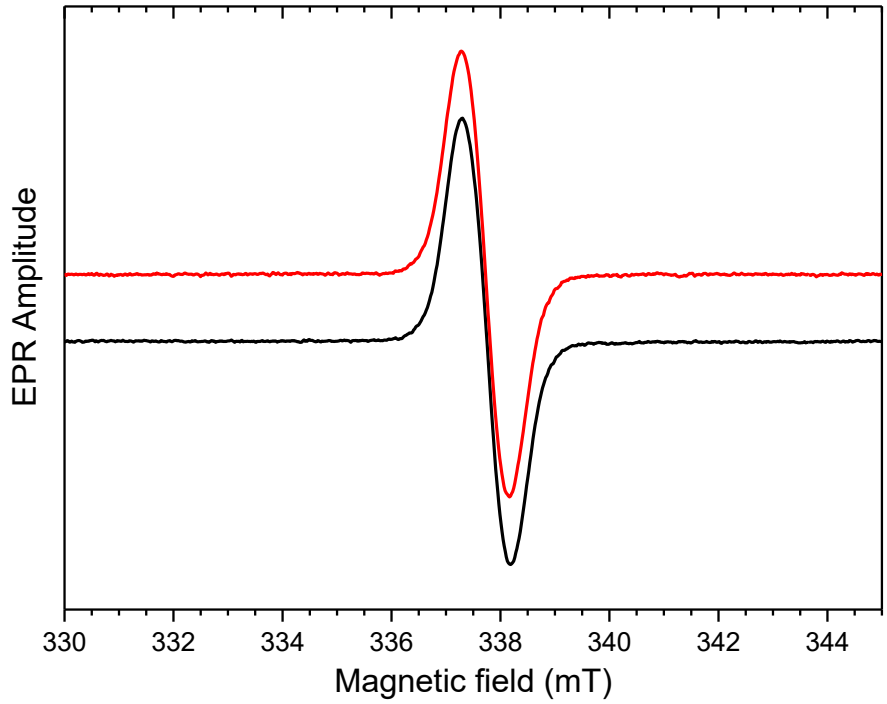


Figure S1. Cw EPR spectrum of the MSK radical in unenriched (top) or uniformly ^{15}N-enriched (bottom) *Bs*ForCE1. Experimental condition: temperature, 60 K, microwave power, 1 mW (non-saturating), modulation amplitude, 0.2 mT (at 100 kHz), microwave frequency, 9.4686 GHz (unenriched ForCE1) or 9.4664 GHz (uniformly ^{15}N-enriched ForCE1). Experimental spectra are normalized to the same maximal amplitude.

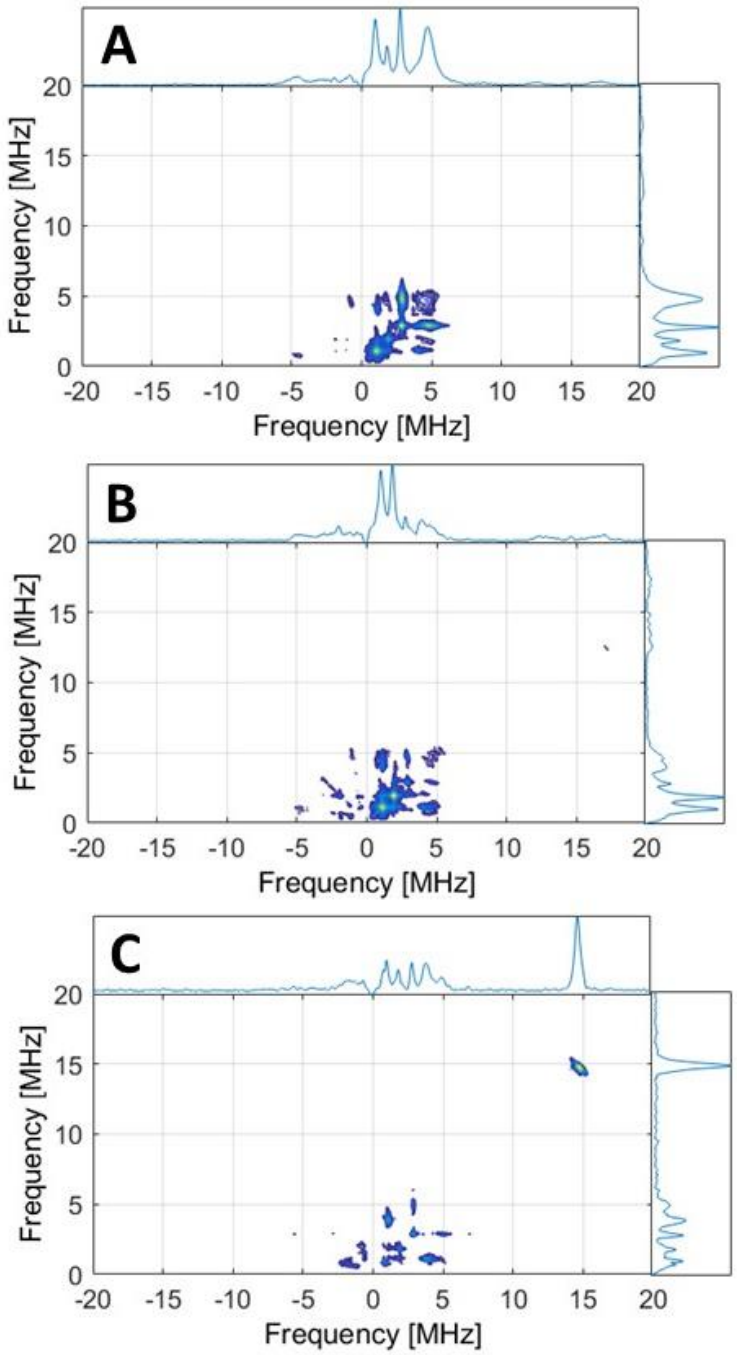


Figure S2. X-band HYSCORE spectra of MSK stabilized by redox potentiometry in *Bs*ForCE1 recorded at 50 K using τ = 136 ns (A), τ = 204 ns (B), and τ = 440 ns (C). No meaningful signals in (-, +) quadrant were present. Experimental parameters, magnetic field and microwave frequency, 346.5 mT and 9.721 GHz (A), 346.4 mT and 9.719 GHz (B), 346.2 mT and 9.712 GHz (C). Acquisition time, 46 hours (A), 71 hours (B), 45 hours (C), shot repetition rate, 2.5

kHz (A) or 1.5 kHz (B, C). Other parameters are given in the Experimental section in the main text.

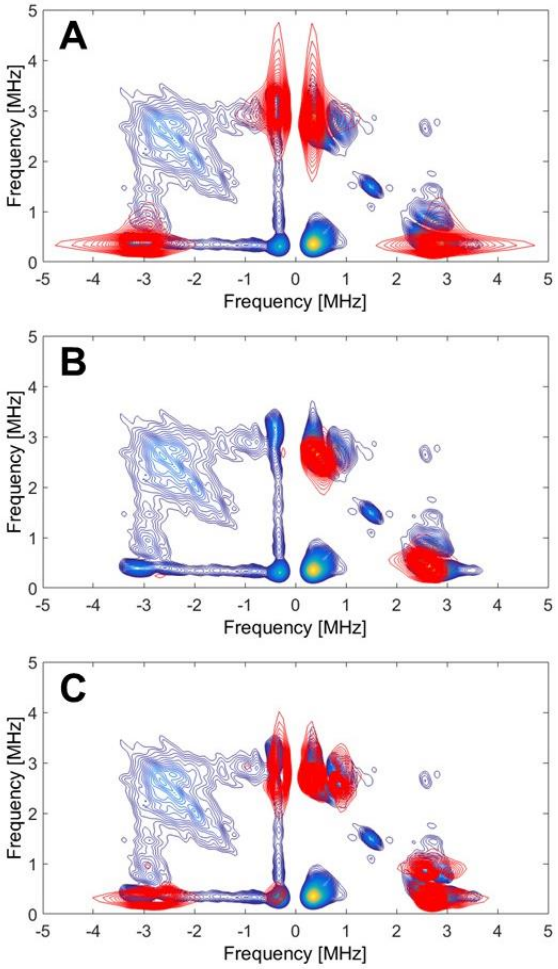


Figure S3. Comparison of the experimental ^{15}N HYSCORE spectrum from Figure 4A with the spectra calculated using a single S = ½ spin system (MSK) coupled to N_1 only (A), N_2 only (B) and N_1 + N_2 (C). HFI parameters are given in the main text.

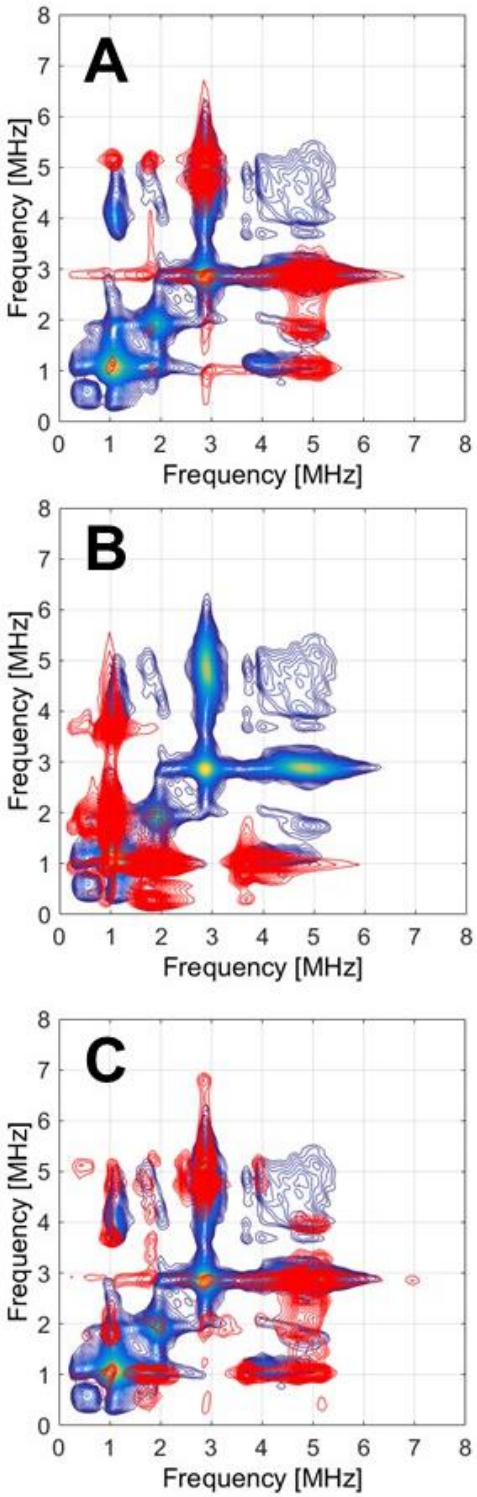


Figure S4. Comparison of the experimental ^{14}N HYSCORE spectrum from Figure 5 with the spectra calculated using a single S = ½ spin system (MSK) coupled to N_1 only (A), N_2 only (B) and N_1 + N_2 (C). HFI and NQI parameters for both nuclei are given in the caption of Figure 5.

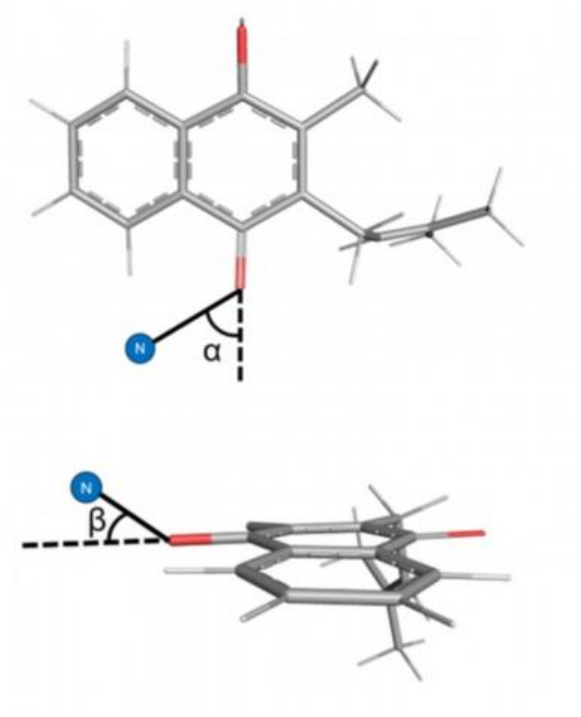


Figure S5. Definition of relevant angles used to characterize hydrogen bonds to the MSK. These are the in-plane hydrogen-bond angle α (top) and the out-of-plane hydrogen bond angle β (bottom).

Discussion

Dans ma thèse, j'ai étudié le mécanisme réactionnel du formiate et du CO_2 dans les FDHs depuis le trajet du substrat jusqu'à la réaction au site actif mais également au niveau du second site actif de l'enzyme en lien avec les quinones.

Les résultats obtenus indiquent que l'accès du formiate et du CO_2 au site actif des formiate déshydrogénases (FDHs) repose sur un tunnel spécifique. L'étude des tunnels sur onze structures de FDHs associée à des simulations de dynamique moléculaire sur ForC1, suggère que ces deux molécules empruntent un même tunnel. Bien que les formylméthanofurane déshydrogénases, possédant deux sites catalytiques, puissent constituer une exception, l'hypothèse d'un tunnel unique et conservé demeure plausible. A l'extrémité de ce tunnel, quatre acides aminés (Ala/Ser, His/Gln, Arg et Val) contrôlent l'ouverture d'un passage donnant accès au site actif à Mo/W. Dans huit des onze structures analysées, cette ouverture paraît suffisante pour permettre le passage du formiate, tandis que dans les trois autres (*D. vulgaris*, *D. gigas* et ForCE1) le passage est trop étroit. Mes analyses révèlent que cette ouverture est corrélée à la position de l'His/Gln : en position 1, le passage est fermé, tandis qu'en position 2, il est ouvert. La stabilisation de la position 2 repose sur le maintien de l'orientation de l'His par des liaisons hydrogène avec une Thr/Ser. Dans les enzymes de type ForC, cette stabilisation semble compromise par la substitution de cette Thr/Ser par un résidu Ala strictement conservé dans ce groupe, ce qui pourrait expliquer l'incapacité de la Gln à adopter et maintenir la position 2. La substitution virtuelle de l'Ala395 en Serine permet la stabilisation de la Gln392 en position 2 au cours d'une simulation de dynamique moléculaire, tout comme la double mutation Q392H, A395S. En revanche, dans l'enzyme native et le mutant simple Q392H, la position 2 ne semble pas stabilisée. Ces résultats mettent en lumière le rôle clé de ces résidus dans le contrôle de l'accès au site actif et ouvrent des perspectives pour mieux comprendre la sélectivité et l'efficacité catalytique des FDHs.

En parallèle, l'analyse par RPE de ForCE1 met en évidence au moins trois espèces de Mo(V). L'espèce 1 est couplée à un proton non échangeable, une situation probablement partagée par l'espèce 2. Des calculs DFT ont permis d'élaborer plusieurs modèles compatibles avec les valeurs de *g* et les couplages hyperfins observés dans ces espèces 1 et 2. Les résultats suggèrent que le proton couplé au Mo(V) est probablement l'un des protons du Cβ de la Cys ligand. Par ailleurs, deux orientations possibles de cette cystéine (positions 1 et 2) expliquent les valeurs de *g* de l'espèce 2. A l'inverse, les valeurs de couplages hyperfins entre du Mo(V) et un proton échangeable dans d'autres FDHs[37,46,47] sont compatibles avec la présence d'un proton lié au soufre inorganique. Des calculs préliminaires, basés sur l'hypothèse d'un transfert d'hydrure, indiquent que la réduction du CO_2 est moins favorable lorsque la cystéine est en position 1. Ces observations mettent en lumière l'impact déterminant de la conformation de la cystéine ligand sur l'activité catalytique des FDHs et ouvrent la voie à une meilleure compréhension de leurs mécanismes réactionnels.

L'analyse du site de liaison de la quinone par spectroscopie HYSCORE révèle une interaction magnétique entre la MK7 et deux noyaux d'azote, attribués respectivement à un azote du squelette peptidique et à un azote de lysine. Cette interaction apparaît médiée par des liaisons hydrogène entre la quinone et les résidus environnants. L'étude structurale, couplée à un

modèle DFT, suggère que ces interactions impliquent la Thr100 et la Lys234, identifiées dans le site Q dans les structures cristallographiques et cryo-EM de ForCE1.

En l'absence de formiate, l'incubation du complexe ForCE1 avec des vésicules de membranes de *E. coli* montre une faible fixation des trois types de quinones d'*E. coli*, dans des proportions comparables à celles observées dans les membranes. La quantité totale de quinones dépasse la stœchiométrie, suggérant que le tétramère ForE peut fixer plusieurs molécules aux structures chimiques variées. En présence de formiate, la quantité de MK-7 associée à ForCE1 diminue fortement, tandis que celles des quinones d'*E. coli* sont peu affectées, indiquant que l'activité catalytique favorise spécifiquement la dissociation de la MK-7. Lorsque l'expérience est répétée avec une version de ForCE1 dépourvue du domaine HMP, seule la MK-7 est détectée en absence de formiate. En conditions de turnover, sa quantité reste stable, indiquant une libération limitée. Ces résultats soulignent le rôle clé de l'interaction membranaire dans l'échange des quinones et la dissociation de la MK-7 sous turnover.

À partir de ces résultats et des progrès réalisés dans la compréhension du système ForCE, plusieurs enseignements peuvent être tirés. Toutefois, ces observations soulèvent également de nombreuses questions, que je vais aborder en suivant le plan du manuscrit de thèse : l'une portant sur le site actif à Mo, l'autre sur le site actif de liaison des quinones.

I) Mécanisme de réaction

a) Le tunnel unique

Comme indiqué dans l'introduction, les FDHs constituent une famille extrêmement diversifiée, dont plusieurs représentants sont probablement apparus dès les premières formes de vie sur Terre pour catalyser la fixation du CO_2[12,157]. Les récentes analyses phylogénétiques ont mis en évidence que les FDHs ont émergé à plusieurs reprises au cours de l'évolution[157] (Daan Speth, communication personnelle). Cependant, seules quelques-unes de ces enzymes ont été caractérisées à ce jour, loin de décrire la diversité existante.

Mes travaux permettent de proposer l'existence d'un tunnel unique et commun à l'ensemble des FDHs. Comme illustré avec plusieurs FDHs et le HDCR, ce tunnel peut permettre le transport du formiate et du CO_2 en accord avec le fonctionnement de ces enzymes. En dépit du faible degré de conservation (Tableau 4), un tunnel est retrouvé au même endroit dans les structures. A titre d'exemple, FdhAB de *D. vulgaris* et la Fwd de *M. wolfei* ne partagent que 11% d'identité de séquence, soulignant la distance évolutive les séparant. L'hypothèse la plus probable est que le tunnel formiate présent chez les formes anciennes d'enzymes a été conservé dans toutes les FDHs au cours de l'évolution. De manière intéressante, ce tunnel est conservé dans la structure du complexe formyltransférase-hydrolase de *Methylorubrum extorquens* (PDB : 6s6y), qui ressemble à celle de la Fwd de *M. wolfei* (PDB : 5t5i), mais qui ne lie pas de cofacteur à Mo/W-*bis*PGD[103]. Dans ce complexe, le formiate produit au site actif à Zn est évacué par ce tunnel qui relie le site actif au solvant.

Il faut souligner que, chez les Fwd/Fmd, le tunnel caractérisé ne débouche pas directement à la surface de la protéine, contrairement aux autres FDHs étudiées. Il constitue plutôt le point de départ d'un tunnel intermoléculaire reliant le site actif à Mo/W-*bis*PGD à un second site actif, où s'effectue la condensation du formiate avec le méthanofurane [19,104]. D'après les travaux de Lemaire et Wagner, la réaction inverse pourrait se produire dans des systèmes voisins impliquant ce même tunnel[104]. Ces études indiquent également que le tunnel CO_2 est

distinct et relie le site actif à Mo/W au solvant. Bien qu'aucune étude n'ait encore exploré l'histoire évolutive des FDHs, il semble que le tunnel CO_2 n'ait pas été retenu comme solution évolutive, contrairement au tunnel formiate. Un point clé à retenir est la faible conservation des acides aminés de ce dernier, rendant impossible l'identification d'un motif caractéristique des FDHs. L'un des critères les plus fiables pour reconnaître une FDH reste la présence d'acides aminés conservés à l'extrémité du tunnel, au niveau du site actif, dont le rôle est discuté dans la section suivante.

b) Le rôle des acides aminés

Peu d'études ont été réalisées pour évaluer le rôle des acides aminés dans la catalyse. Parmi les acides aminés qui ont été testés il y a la Cys ligand, l'Arg conservée et l'His/Gln. Chez *R. capsulatus*, la substitution de la Cys ligand par une Ser abolit l'activité d'oxydation du formiate de l'enzyme[11]. Il n'y a pas d'informations sur la coordination du Mo pour ce mutant ni sur l'impact que cette mutation a sur les acides aminés environnant, mais en tout cas, la présence d'un soufre de Cys au lieu d'un oxygène de Ser semble vitale pour cette FDH. Dans cette même étude [11], la substitution de l'Arg par une Thr entraîne une perte totale de l'activité d'oxydation du formiate de l'enzyme, confirmant ainsi l'importance de ce résidu conservé au site actif. En revanche, sa substitution par une Lys aboutit à un variant toujours actif, bien que le k_M pour le formiate soit 1900 fois plus grand et le k_{cat} 3 fois plus petit par rapport à l'enzyme native[11]. Cette observation pourrait s'expliquer par le fait que la Lys, dont la chaîne latérale est presque aussi longue que celle de l'Arg, possède une charge positive, comme l'Arg, ce qui pourrait partiellement compenser son remplacement. Dans la littérature, l'Arg est supposée stabiliser le substrat au niveau du site actif par des liaisons hydrogène[24], en accord avec les calculs de DFT de [52] et on peut supposer qu'une Lys puisse faire même. On se rappelle aussi, que dans les FDHs non métalliques, une arginine se trouve à proximité de la flavine qui reçoit les électrons du formiate[42,45,158]. Les liaisons électrostatiques peuvent permettre de rendre une barrière de potentiel plus facile à franchir, et dans ce cas, on pourrait comprendre le rôle clé de l'Arg.

Toujours au niveau des liaisons hydrogènes, la DFT dans [41,52] indique que l'His établit une liaison avec le substrat uniquement avec son azote backbone, ce qui pourrait laisser penser que ce résidu a un impact moins important sur la réaction. Néanmoins, dans la FDH de *R. capsulatus*, ce résidu a été substitué par une Met, Arg, Lys et Phe, conduisant dans chaque cas à une baisse importante de l'efficacité catalytique[11]. L'un de ces variants, H387M, est intéressant parce que son k_M formiate est 19 fois plus grand que celui de l'enzyme native, mais son k_{cat} est inchangé, ce qui indique que la mutation réduit l'affinité de l'enzyme pour le formiate (peut-être en limitant son accès). De manière générale, bien qu'il soit difficile d'expliquer précisément l'impact de ces mutations sur la catalyse, il apparaît que ces quatre acides aminés substitués à l'His ne sont pas adaptés à l'enzyme. A ce jour, aucune de ces substitutions n'a d'ailleurs été retrouvée naturellement dans une FDH. Par contre, la substitution de la Gln de ForCE1 par une His rend l'enzyme presque inactive. *A priori*, il ne s'agirait pas ici d'un problème d'accès du substrat, mais plutôt d'un défaut de réactivité. Cela montre que la seule substitution Q392H dans ForCE1 ne suffit pas à convertir cette enzyme en une enzyme de type Fds. En effet, la séparation en branches phylogénétiques distinctes (Figure 23, Introduction) résulte de la substitution simultanée de plusieurs autres résidus.

Donc plusieurs substitutions permettent la distinction des ForC en une sous-famille phylogénétique parmi les FDHs multidomaines. Alors, pour essayer de rendre compte de différences structurales entre ForC et les autres sous-familles, j'ai sélectionné dans la structure

cristallographique de ForCE1 tous les résidus situés dans un rayon de 10 Å autour du Mo et j'ai étudié leur conservation parmi les ForC et parmi les autres FDHs multidomaines.

Parmi les résidus communs à la famille des FDHs multidomaines (conservation supérieure à 90%), on trouve notamment une Cys (à la position 387 dans ForCE1, voir I)1)c)), la Cys/Sec ligand du métal et une Arg (position 389) conservée du tunnel formiate. Les motifs Leu584-Gly586 qui incluent l'Arg585 du site actif et Asn588-Gly592 sont aussi très conservés. L'Arg828 située « sous » le site actif est aussi conservée.

Aussi, j'ai cherché les résidus présents chez les séquences ForC qui ne sont pas retrouvés chez les autres sous-familles. Par cette analyse, j'ai sélectionné cinq acides aminés représentatifs des ForC (Figure 67). On retrouve évidemment la Gln392 du site actif et l'Ala395 dont on a parlé dans la section résultats. De manière intéressante la Thr/Ser396 est substituée par un acide aminé apolaire dans les autres sous-familles, sauf pour un seul représentant qui a une Ser. La Tyr/Phe390 est substituée par une Leu, Val, Ile ou Thr, sauf pour un seul représentant qui a une Phe. L'His587 est substituée par une Gln ou Lys. Il faut noter qu'une His est retrouvée à cette même position dans d'autres FDH que les ForC, par exemple chez la sous-unité FDH de la formylméthanofurane déshydrogénase de *M. wolfei*. Mais attribuer une fonction particulière à ces résidus reste difficile.

Une étude plus large, incluant des groupes de FDHs hors des FDHs multidomaines permettrait d'obtenir plus d'informations sur la conservation ou la spécificité de certains motifs.

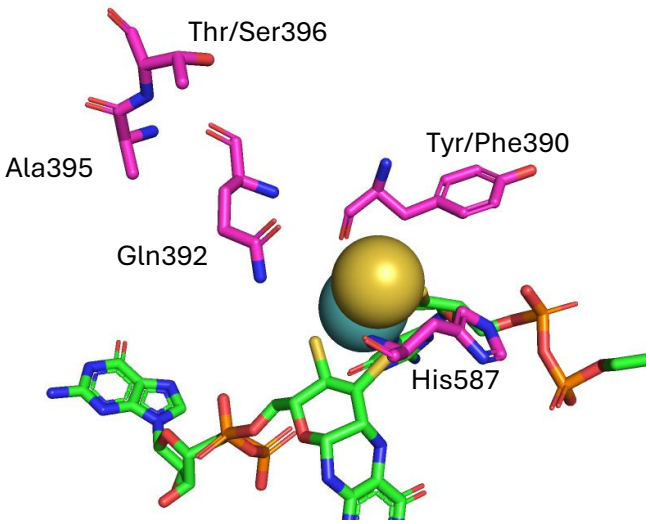


***Figure 74**. Structure de ForCE1 illustrant les acides aminés représentatifs des ForC dans la famille des FDHs multidomaines.*

Nos études indiquent que l'orientation de la chaine latérale du résidu His/Gln du site actif des FDHs contrôle l'accès des molécules au site actif. En particulier, nos résultats indiquent que l'accès au site actif est favorisé quand l'His/Gln est en position 2 et que l'accès est probablement moins efficace si l'His/Gln oscille entre les positions 1 et 3. Ce constat peut être soutenu par les données cinétiques de la FDH de *D. vulgaris* au repos *vs* activée au DTT et *vs* certains de ses variants. En fait, l'enzyme au repos (Sec et His en position 1) possède, en plus d'un k_{cat} formiate 14 fois plus faible, un k_m formiate 150 fois plus grand que l'enzyme

réduite au DTT[159]. La différence en K_m peut suggérer que l'affinité pour le formiate est plus faible et peut traduire un accès plus difficile au site actif. La mutation du résidu M405 par une Ala ou Ser induit l'His en position 2 (passage A ouvert) et laisse la Sec ligand en position 1. Pour ces deux variants, le k_{cat} formiate est de l'ordre de celui de l'enzyme au repos mais le K_m formiate est de l'ordre de celui de l'enzyme activée au DTT[107]. Avec tous ces éléments, on peut supposer que le K_m formiate diminue chez les mutants parce que l'ouverture du passage A par le basculement de l'His en position 2 donne un accès facile et direct du formiate au site actif, en accord avec les calculs de DM sur ForCE1. Les données structurales et les calculs montrent aussi l'importance d'un résidu Ser/Thr qui facilite la stabilisation de l'His/Gln en position 2 par des liaisons hydrogène. La conservation de ce résidu chez les FDHs multidomaines (hors ForC) permet de conforter cette hypothèse. Des tests de cinétique enzymatique sur des variants de ce résidu dans ForC et les autres FDHs, pourrait permettre d'en savoir plus sur son rôle.

c) Transfert d'hydrure ou pas transfert d'hydrure

L'hypothèse du transfert d'hydrure est actuellement la plus acceptée parmi les chercheurs qui travaillent sur les FDHs. Cela dit, il n'existe pas aujourd'hui de preuve de ce mécanisme. D'ailleurs, un des éléments fondateurs de cette hypothèse, qui est la détection par RPE d'un couplage hyperfin fort entre le Mo(V) et un proton échangeable, probablement du sulfhydrile, est compatible avec certains modèles qui proposent la décoordination du ligand protéique[38].

Dans les échantillons de ForCE1, on peut détecter plusieurs espèces de Mo(V), en particulier, les espèces 1 et 2 représentent vraisemblablement des espèces de Mo(V) coordinnées par 6 atomes de soufre, comme attendu pour un site actif de FDH[67]. Il faut aussi garder à l'esprit qu'on ne sait pas encore si les espèces 1 et 2 de Mo(V) de ForCE1 sont catalytiquement actives ou pas. Le fait que des espèces Mo(V) détectées en RPE ne correspondent pas à des formes catalytiquement actives a déjà été mis en évidence chez la nitrate réductase périplasmique[160]. La capture d'intermédiaires catalytiques Mo/W(V) peut être effectuée en congelant rapidement l'échantillon après l'ajout de formiate.

En tout cas, notre étude des espèces 1 et 2 indique que le Mo(V) de ces espèces n'est probablement pas couplé à un proton échangeable. L'espèce 1 est couplée à un proton non échangeable et on peut proposer qu'il s'agisse d'un des protons de la Cys ligand. Ce constat ne favorise aucune hypothèse de mécanisme. En effet, on peut supposer que toutes les FDHs à Mo/W-*bis*PGD fonctionnent fondamentalement de la même façon, et qu'un évènement de protonation/déprotonation du site actif ne se passe pas au même moment selon les FDHs. Par exemple, les auteurs de [51] proposent que la protonation/déprotonation se produise entre les états Mo(IV) et Mo(V) chez ForCE1, ce qui peut être soutenu dans ce travail par un décalage d'environ -60 mV/pH du potentiel de la transition Mo(IV)/Mo(V) de l'espèce 2. En parallèle, l'étude de Meneghello et al.[51] indique que la protonation/déprotonation dans la FDH de *D. vulgaris* peut avoir lieu entre les états W(VI) et W(V).

Mais c'est l'étude de la coordination du site actif en état Mo/W(IV) qui résoudra la question du mécanisme de réaction des FDHs. Dans l'idéal, par exemple, il faudrait obtenir une structure cristallographique d'une FDH avec une molécule de formiate résolue au site actif et confirmer que le site actif est en état Mo/W(IV) par une technique de spectroscopie directement sur les cristaux.

d) Directionnalité

Le fonctionnement des FDHs fait entrevoir la possibilité d'une application biotechnologique ou de dispositifs bio inspirés de capture et de valorisation du CO_2. On note des efforts de recherche qui portent par exemple sur l'élaboration de systèmes synthétiques qui miment le fonctionnement des FDHs[161–163] . La recherche sur les FDHs porte particulièrement dur la compréhension de la réaction « intéressante » catalysée par ces enzymes qui est la réduction du CO_2 en formiate. L'étude des biais catalytiques de la réaction s'insère dans ces efforts de recherche.

Pourquoi certaines enzymes sont monodirectionnelles ? C'est une question difficile, notamment parce que les techniques employées et les conditions de test des activités d'oxydation du formiate et de réduction du CO_2 varient d'un laboratoire à un autre, et que ces activités d'oxydation du formiate et de réduction du CO_2 n'ont été étudiées que pour un nombre relativement restreint d'enzymes. Pour certaines FDHs caractérisées, la réduction du CO_2 n'a pas été testée. Et si elle est testée, on ne dispose pas toujours de la structure de l'enzyme pour essayer de rationaliser la capacité à fonctionner dans les deux sens en terme structural. A ce jour, parmi les FDHs, deux exemples (ForCE1 et la FDH de *D. vulgaris* non réduite au DTT[106]) ont été étudiés, et aucune activité CO_2 réductase n'a été détectée. Malgré le faible nombre d'études de cas, on peut se risquer à proposer une explication.

Parmi les caractéristiques structurales remarquables comparées aux autres structures disponibles, on a vu que dans la FDH de *D. vulgaris* non réduite au DTT, la Sec ligand est en position 1 et l'His est en position 1. On peut faire l'hypothèse que ces résidus ou l'un de ces résidus est responsable de la directionnalité.

Si c'est un problème de réactivité, le CO_2 a accès au site actif, mais ne peut pas réagir. En terme énergétique, la barrière de potentiel est trop grande pour que la réaction se produise. L'examen des profils de la surface d'énergie potentielle m'ont permis de proposer que l'orientation de la Cys/Sec ligand en position 1 rend la réduction du CO_2 moins favorable. Il s'agit de la situation rencontrée chez la FDH de *D. vulgaris* non réduite au DTT. Cette hypothèse peut être soutenue par les expériences de cinétique de la FDH de *D. vulgaris* exposées en partie I)b) de cette Discussion, mais en regardant cette fois le k_{cat} CO_2. En effet, quand le résidu M405 est muté par une Ala ou Ser (His en position 2 et Sec en position 1), les variants possèdent une faible activité de réduction du CO_2, environ 10 fois moins importante que celle de l'enzyme réduite au DTT[107].

Chez ForCE1, la Gln392, qui remplace une His dans les autres FDHs, occupe la position 1, tandis que la Cys ligand se trouve en position 2, bien que la résolution locale de la structure de ForCE1 ne permette pas de confirmer l'orientation exacte de la Cys. Il n'est pas à exclure que les ligands protéiques des sites actifs à Mo/W ne se limitent pas uniquement aux positions 1 et 2, et que la Cys ligand de ForCE1 adopte une position différente. Ce résidu pourrait adopter chez ForCE1 une orientation spécifique défavorable à la réaction de réduction du CO_2, renvoyant à l'influence de l'environnement protéique

Le biais catalytique peut dépendre aussi d'autres étapes du cycle catalytique. Notamment, on a vu dans la partie I)b) de la Discussion que l'accès du substrat au site actif est probablement plus difficile quand l'His/Gln est en position 1 et qu'il était possible que cela se traduise par un K_m élevé. De plus, dans le variant M405S de la FDH de *D. vulgaris* (l'His est en position 2 et la Sec en position 1), même si la position 2 de l'His peut permettre un accès plus facile au site actif, le K_m CO_2 du variant reste aussi beaucoup plus grand que celui de l'enzyme native réduite au DTT[107] (plus de 12 mM). Ces deux points permettent de faire l'hypothèse que

l'affinité pour le CO_2 est faible dans le cas de ForCE1 et la FDH de *D. vulgaris* non réduite au DTT, lorsque l'His/Gln est en position 1.

Une autre possibilité est que le biais catalytique soit déterminé par la disposition et les potentiels des centres FeS de la chaine de transfert d'électrons. Cette hypothèse n'est probablement pas applicable au cas de la FDH de *D. vulgaris* étant donné que la coordination des centres FeS et leur géométrie n'apparaissent pas modifiées entre l'enzyme au repos et lorsque le pont disulfure est rompu. Cela dit, c'est une hypothèse qui a été avancée notamment chez les hydrogénases. Par exemple, le changement de ligand du FeS distal dans une hydrogénase à NiFe impacte son activité d'oxydation du dihydrogène[164]. Mais d'autres études basées sur des constructions de variants et chimères ne vont pas toutes dans son sens [165]. En particulier, une étude a visé à construire une enzyme chimère constituée de la sous unité catalytique de Hyd1 (monodirectionnelle) et de la sous unité partenaire (qui contient les centres FeS) de Hyd2 (bidirectionnelle). La chimère est monodirectionnelle, ce qui indique que cette particularité ne s'explique pas par les caractéristiques des relais électroniques dans ce cas d'étude[166].

II) Le cycle des quinones

a) Le site Q

Notre étude par spectroscopie HYSCORE couplée à l'étude par DFT a permis de caractériser le mode de fixation de la MK7 dans le site Q. En fait, cette disposition inédite de site Q éloigné de la membrane, à l'interface entre une sous-unité catalytique et une structure tubulaire partenaire, dont les dimensions sont compatibles avec le transport de quinones, n'est pas un cas isolé. On la retrouve chez Huc, une hydrogénase de *Mycobacterium smegmatis*[167]. La résolution de la structure de cette enzyme par cryo-EM a permis de découvrir la présence de ménaquinones situées, de façon analogue à ForCE1, entre la sous-unité hydrogénase et le tube partenaire[167]. A noter que l'hypothèse de fonctionnement de ce complexe est la même que celle formulée pour ForCE1 dans l'Introduction : la quinone réduite dans le site Q rejoint la membrane en traversant le tube en interaction avec celle-ci tandis qu'une quinone oxydée du pool membranaire vient se fixer dans le site Q vacant. La Figure 68 permet de se rendre compte que les sites de fixation dans ForCE1 et Huc sont différents, donc qu'il n'y a pas de motif de site Q universellement conservé pour les enzymes à tube. Notre étude sur la quinone de ForCE1 a permis de mettre en évidence qu'elle est très probablement en liaison hydrogène avec une Thr et une Lys. Les alignements des séquences d'enzymes de type ForC indiquent que le motif Leu97-Thr100, la Lys234 et Glu 237 sont bien conservés. Dans Huc, il semblerait que des liaisons soient formées avec une Arg et une Tyr.

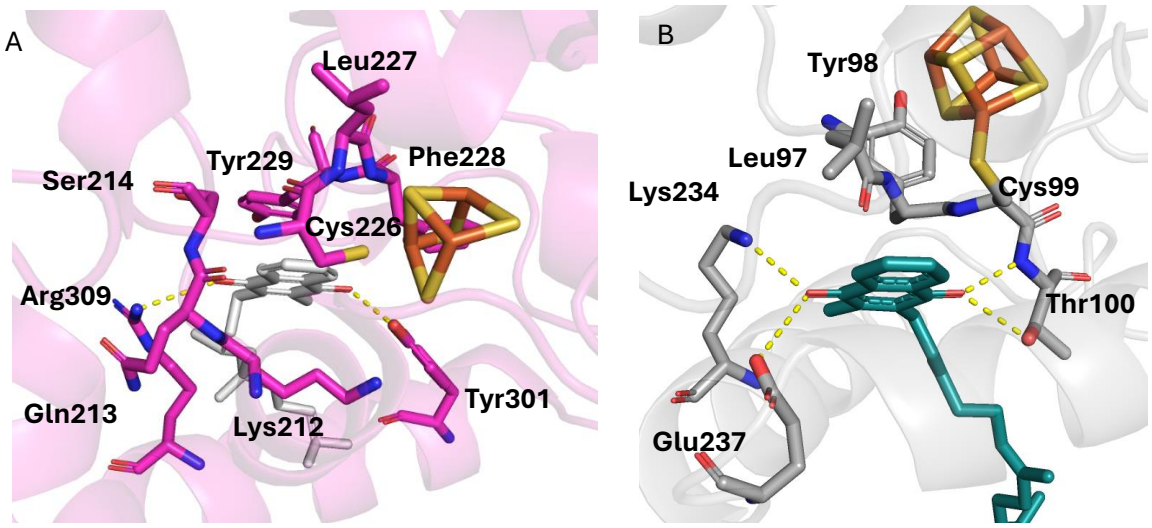


***Figure 75**. Site de fixation des quinones dans Huc (A, PDB : 7utd) et ForCE1 (B, PDB : 8rr0).*

Une étude récente dans l'équipe[65] indique qu'on peut trouver dans d'autres enzymes une organisation similaire de complexes protéiques, où les sous unités catalytiques sont en interaction avec un tube partenaire. Ce serait le cas de certaines NADH:quinone oxydoréductases (NDH-2) ou de sulfure:quinone réductases (SQR). Les modèles alphafold de deux membres de ces familles laissent supposer que le site Q est là aussi à l'interface entre les sous-unités catalytiques et le tube.

Notre étude du mode de fixation de la quinone de ForCE1 s'est focalisée sur la caractérisation des couplages semiquinone-$^{14/15}$N et pourrait être complétée par l'analyse des couplages semiquinone-protons échangeables ou non (Figure 69), ce qui peut permettre de proposer une attribution de ces protons dans la structure.

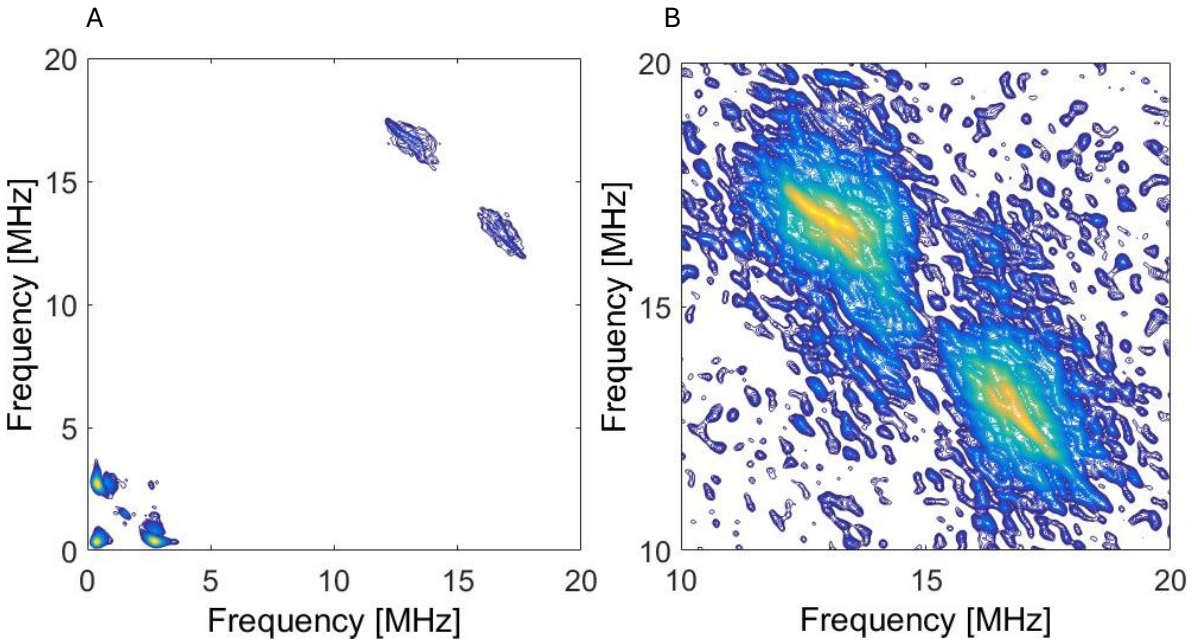


***Figure 76**. Spectre HYSCORE ^{15}N de la semiquinone de ForCE1 enregistré à τ=204 ns. **A**. représentation de la région 0-20 MHz. **B**. Zoom sur la région 10-20 MHz.*

b) Le complexe interagit avec la membrane via le domaine HMP

Des travaux précédents ont montré que ForCE1 participe à la chaine respiratoire de *B. subtilis*[65]. Comme indiqué dans l'introduction, la présence de lipides en contact avec la région C terminale et amphipatique du tube est en accord avec l'hypothèse selon laquelle cette région assure le contact avec la membrane. La délétion de cette région HMP a d'ailleurs permis d'observer que le complexe ne participe plus à la chaine respiratoire.

Dans cette thèse, mes résultats valident l'importance du domaine HMP pour l'interaction avec la membrane et apportent une preuve expérimentale du transfert de quinones de la membrane au complexe en observant que les trois quinones (UQ8, MK8 et DMK8) contenues dans la membrane d'*E. coli* sont retrouvées associées au complexe ForCE après contact et purification. Une situation qui n'est pas retrouvée lorsque le complexe est dépourvu du domaine HMP. Le tube a ainsi la capacité de lier des quinones de structures chimiques différentes comme anticipé par la présence du complexe ForCE dans de nombreux phyla bactériens et archéens disposant de quinones de structures très variables. Là encore, on peut élargir la réflexion à d'autres enzymes. L'analyse de similarité de séquence des protéines qui possèdent un domaine HMP permet de montrer qu'on retrouve des complexes à HMP dans des organismes possédant des ménaquinones, mais aussi des ubiquinones, ou des caldariellaquinone, par exemple, et que les protéines à HMP sont associées exclusivement à des oxydoréductases, en particulier, les FDHs, les NDH-2, les SQR et les hydrogénases[65]. Les modèles alphafold et les structures disponibles suggèrent que les protéines à HMP forment systématiquement un tube auquel vient se connecter le partenaire catalytique[65]. On pourrait alors penser que le tube sert, dans toutes les protéines à HMP, à connecter une oxydoréductase à la membrane en permettant le transport de quinones entre la membrane et les oxydoréductases.

c) La quinone au site Q est-elle échangeable ?

C'est une des questions qu'on s'est posé dans l'Introduction. Dans le cas de Huc, les auteurs font l'hypothèse que la quinone s'échange[167]. Mes résultats montrent que l'addition de formiate facilite l'échange de la MK7 contenue initialement dans le complexe ForCE1 purifié après contact avec les vésicules de membrane d'*E. coli.* Cette observation est en accord avec les données issues de l'examen des propriétés rédox de la MK7 liée au site Q indiquant que la forme réduite est moins affine pour le site Q que la forme oxydée (facteur 80) [64].

En effet, il est alors logique que la MK7 réduite par le formiate quitte plus rapidement son site Q qu'une MK7 oxydée. Cela dit, après 30 minutes d'incubation avec des vésicules, il y a toujours des MK7 co-purifiées avec ForCE1, même dans les échantillons incubés en présence de formiate. C'est quelque chose qui peut paraitre surprenant puisqu'on pourrait s'attendre à ce que 30 minutes d'incubation (même à température ambiante) avec du formiate entraine un nombre de turnover suffisant pour réduire toutes les MK7. Si elles sont échangeables, on pourrait en conséquence s'attendre à ce qu'il n'y ait plus de MK7 après ces 30 minutes. Est-ce parce que la connexion entre ForCE1 et les vésicules de membrane se fait mal ? Ou par l'absence de turnover des quinones elles-mêmes ? L'ajout d'un accepteur final d'électrons pourrait-il changer le comportement ? Ou encore parce que la MK7 est toujours fixée dans son site Q ? Dans ce dernier cas, cela peut indiquer une liaison forte de la quinone au site Q. La détermination de l'énergie de liaison entre la MK7 réduite et la protéine pourrait donner des éléments de réponse.

On pourrait faire l'hypothèse que les MK7 réduites par les électrons du formiate sont remplacées par des quinones des vésicules (majoritairement des UQ8). On pourrait tester cette hypothèse en suivant la même stratégie qu'on a utilisé dans ce travail : isoler la signature RPE des UQ8 semi réduites (puisque leur potentiel moyen est différent de celui des ménaquinones), et étudier leur environnement immédiat par HYSCORE pour étudier leur mode de fixation, si une espèce ubisemiquinone peut être stabilisée.

Pour terminer ce manuscrit en quelques mots, les travaux réalisés durant ma thèse contribuent à mieux comprendre d'une part le mécanisme réactionnel des FDHs et d'autre part le cycle des quinones dans les enzymes à tubes.

Références.

(1) Ellis, P. J.; Conrads, T.; Hille, R.; Kuhn, P. Crystal Structure of the 100 kDa Arsenite Oxidase from Alcaligenes Faecalis in Two Crystal Forms at 1.64 Å and 2.03 Å. *Structure* **2001**, *9* (2), 125–132. https://doi.org/10.1016/S0969-2126(01)00566-4.

(2) Magalon, A.; Ceccaldi, P.; Schoepp-Cothenet, B. CHAPTER 5. The Prokaryotic Mo/W-bisPGD Enzymes Family. In *Metallobiology*; Hille, R., Schulzke, C., Kirk, M. L., Eds.; Royal Society of Chemistry: Cambridge, 2016; pp 143–191. https://doi.org/10.1039/9781782623915-00143.

(3) Le, C. (Chip); Bae, M.; Kiamehr, S.; Balskus, E. P. Emerging Chemical Diversity and Potential Applications of Enzymes in the DMSO Reductase Superfamily. *Annu. Rev. Biochem.* **2022**, *91* (1), 475–504. https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-032620-110804.

(4) Maini Rekdal, V.; Nol Bernadino, P.; Luescher, M. U.; Kiamehr, S.; Le, C.; Bisanz, J. E.; Turnbaugh, P. J.; Bess, E. N.; Balskus, E. P. A Widely Distributed Metalloenzyme Class Enables Gut Microbial Metabolism of Host- and Diet-Derived Catechols. *eLife* **2020**, *9*, e50845. https://doi.org/10.7554/eLife.50845.

(5) 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.; Romão, M. J. Periplasmic Nitrate Reductase Revisited: A Sulfur Atom Completes the Sixth Coordination of the Catalytic Molybdenum. *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.* **2008**, *13* (5), 737–753. https://doi.org/10.1007/s00775-008-0359-6.

(6) Bertero, M. G.; Rothery, R. A.; Palak, M.; Hou, C.; Lim, D.; Blasco, F.; Weiner, J. H.; Strynadka, N. C. J. Insights into the Respiratory Electron Transfer Pathway from the Structure of Nitrate Reductase A. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2003**, *10* (9), 681–687. https://doi.org/10.1038/nsb969.

(7) Kloer, D. P.; Hagel, C.; Heider, J.; Schulz, G. E. Crystal Structure of Ethylbenzene Dehydrogenase from Aromatoleum Aromaticum. *Structure* **2006**, *14* (9), 1377–1388. https://doi.org/10.1016/j.str.2006.07.001.

(8) Mintmier, B.; McGarry, J. M.; Bain, D. J.; Basu, P. Kinetic Consequences of the Endogenous Ligand to Molybdenum in the DMSO Reductase Family: A Case Study with Periplasmic Nitrate Reductase. *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.* **2021**, *26* (1), 13–28. https://doi.org/10.1007/s00775-020-01833-9.

(9) Wu, S.-Y.; Rothery, R. A.; Weiner, J. H. Pyranopterin Coordination Controls Molybdenum Electrochemistry in Escherichia Coli Nitrate Reductase. *J. Biol. Chem.* **2015**, *290* (41), 25164–25173. https://doi.org/10.1074/jbc.M115.665422.

(10) Rothery, R. A.; Stein, B.; Solomonson, M.; Kirk, M. L.; Weiner, J. H. Pyranopterin Conformation Defines the Function of Molybdenum and Tungsten Enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2012**, *109* (37), 14773–14778. https://doi.org/10.1073/pnas.1200671109.

(11) 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.

(12) Schoepp-Cothenet, B.; Van Lis, R.; Philippot, P.; Magalon, A.; Russell, M. J.; Nitschke, W. The Ineluctable Requirement for the Trans-Iron Elements Molybdenum and/or Tungsten in the Origin of Life. *Sci. Rep.* **2012**, *2* (1), 263. https://doi.org/10.1038/srep00263.

(13) Niks, D.; Hille, R. Molybdenum- and Tungsten-containing Formate Dehydrogenases and Formylmethanofuran Dehydrogenases: Structure, Mechanism, and Cofactor Insertion. *Protein Sci.* **2019**, *28* (1), 111–122. https://doi.org/10.1002/pro.3498.

(14) Richardson, D.; Sawers, G. PMF through the Redox Loop. *Sci. Am. Assoc. Adv. Sci.* **2002**, *295* (5561), 1842–1843. https://doi.org/10.1126/science.1070366.

(15) 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.

(16) Da Silva, S. M.; Pacheco, I.; Pereira, I. A. C. Electron Transfer between Periplasmic Formate Dehydrogenase and Cytochromes c in Desulfovibrio Desulfuricans ATCC 27774. *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.* **2012**, *17* (5), 831–838. https://doi.org/10.1007/s00775-012-0900-5.

(17) Sawers, G. The Hydrogenases and Formate Dehydrogenases ofEscherichia Coli. *Antonie Van Leeuwenhoek* **1994**, *66* (1–3), 57–88. https://doi.org/10.1007/BF00871633.

(18) Hartmann, T.; Leimkühler, S. The Oxygen-tolerant and NAD^+-dependent Formate Dehydrogenase from *Rhodobacter Capsulatus* Is Able to Catalyze the Reduction of CO_2 to Formate. *FEBS J.* **2013**, *280* (23), 6083–6096. https://doi.org/10.1111/febs.12528.

(19) Wagner, T.; Ermler, U.; Shima, S. The Methanogenic CO_2 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.

(20) Dietrich, H. M.; Righetto, R. D.; Kumar, A.; Wietrzynski, W.; Trischler, R.; Schuller, S. K.; Wagner, J.; Schwarz, F. M.; Engel, B. D.; Müller, V.; Schuller, J. M. Membrane-Anchored HDCR Nanowires Drive Hydrogen-Powered CO2 Fixation. *Nature* **2022**, *607* (7920), 823–830. https://doi.org/10.1038/s41586-022-04971-z.

(21) Roger, M.; Brown, F.; Gabrielli, W.; Sargent, F. Efficient Hydrogen-Dependent Carbon Dioxide Reduction by Escherichia Coli. *Curr. Biol.* **2018**, *28* (1), 140-145.e2. https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.11.050.

(22) Thomé, R.; Gust, A.; Toci, R.; Mendel, R.; Bittner, F.; Magalon, A.; Walburger, A. A Sulfurtransferase Is Essential for Activity of Formate Dehydrogenases in Escherichia Coli. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287* (7), 4671–4678. https://doi.org/10.1074/jbc.M111.327122.

(23) Bierbaumer, S.; Nattermann, M.; Schulz, L.; Zschoche, R.; Erb, T. J.; Winkler, C. K.; Tinzl, M.; Glueck, S. M. Enzymatic Conversion of CO_2: From Natural to Artificial Utilization. *Chem. Rev.* **2023**, *123* (9), 5702–5754. https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.2c00581.

(24) 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.

(25) Oliveira, A. R.; Mota, C.; Mourato, C.; Domingos, R. M.; Santos, M. F. A.; Guigliarelli, B.; Santos-Silva, T.; Romão, M. J.; Pereira, I. A. C. Towards the Mechanistic Understanding of Enzymatic CO2 Reduction.

(26) Bouvier, J. W.; Emms, D. M.; Kelly, S. Rubisco Is Evolving for Improved Catalytic Efficiency and CO_2 Assimilation in Plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2024**, *121* (11), e2321050121. https://doi.org/10.1073/pnas.2321050121.

(27) Boyington, J. C.; Gladyshev, V. N.; Khangulov, S. V.; Stadtman, T. C.; Sun, P. D. Crystal Structure of Formate Dehydrogenase H: Catalysis Involving Mo, Molybdopterin, Selenocysteine, and an Fe_4S_4 Cluster. *Science* **1997**, *275* (5304), 1305–1308. https://doi.org/10.1126/science.275.5304.1305.

(28) 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. *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.* **2006**, *11* (7), 849–854. https://doi.org/10.1007/s00775-006-0129-2.

(29) Vilela-Alves, G.; Manuel, R. R.; Oliveira, A. R.; Pereira, I. C.; Romão, M. J.; Mota, C. Tracking W-Formate Dehydrogenase Structural Changes During Catalysis and Enzyme Reoxidation. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *24* (1), 476. https://doi.org/10.3390/ijms24010476.

(30) Li, H.-K.; Temple, C.; Rajagopalan, K. V.; Schindelin, H. The 1.3 Å Crystal Structure of *Rhodobacter Sphaeroides* Dimethyl Sulfoxide Reductase Reveals Two Distinct Molybdenum Coordination Environments. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122* (32), 7673–7680. https://doi.org/10.1021/ja000643e.

(31) 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.

(32) Duffus, B. R.; Schrapers, P.; Schuth, N.; Mebs, S.; Dau, H.; Leimkühler, S.; Haumann, M. Anion Binding and Oxidative Modification at the Molybdenum Cofactor of Formate Dehydrogenase from *Rhodobacter Capsulatus* Studied by X-Ray Absorption Spectroscopy. *Inorg. Chem.* **2020**, *59* (1), 214–225. https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.9b01613.

(33) Laun, K.; Duffus, B. R.; Wahlefeld, S.; Katz, S.; Belger, D.; Hildebrandt, P.; Mroginski, M. A.; Leimkühler, S.; Zebger, I. Infrared Spectroscopy Elucidates the Inhibitor Binding Sites in a Metal-Dependent Formate Dehydrogenase. *Chem. – Eur. J.* **2022**, *28* (54), e202201091. https://doi.org/10.1002/chem.202201091.

(34) George, G. N.; Colangelo, C. M.; Dong, J.; Scott, R. A.; Khangulov, S. V.; Gladyshev, V. N.; Stadtman, T. C. X-Ray Absorption Spectroscopy of the Molybdenum Site of *Escherichia Coli* Formate Dehydrogenase. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120* (6), 1267–1273. https://doi.org/10.1021/ja973004l.

(35) Axley, M. J.; Böck, A.; Stadtman, T. C. Catalytic Properties of an Escherichia Coli Formate Dehydrogenase Mutant in Which Sulfur Replaces Selenium. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1991**, *88* (19), 8450–8454. https://doi.org/10.1073/pnas.88.19.8450.

(36) Kumar, H.; Khosraneh, M.; Bandaru, S. S. M.; Schulzke, C.; Leimkühler, S. The Mechanism of Metal-Containing Formate Dehydrogenases Revisited: The Formation of Bicarbonate as Product Intermediate Provides Evidence for an Oxygen Atom Transfer Mechanism. *Molecules* **2023**, *28* (4), 1537. https://doi.org/10.3390/molecules28041537.

(37) 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.

(38) Kumar, H.; Khosraneh, M.; Bandaru, S. S. M.; Schulzke, C.; Leimkühler, S. The Mechanism of Metal-Containing Formate Dehydrogenases Revisited: The Formation of Bicarbonate as Product Intermediate Provides Evidence for an Oxygen Atom Transfer Mechanism. *Molecules* **2023**, *28* (4), 1537. https://doi.org/10.3390/molecules28041537.

(39) Mota, C. S.; Rivas, M. G.; Brondino, C. D.; Moura, I.; Moura, J. J. G.; González, P. J.; Cerqueira, N. M. F. S. A. The Mechanism of Formate Oxidation by Metal-Dependent Formate Dehydrogenases. *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.* **2011**, *16* (8), 1255–1268. https://doi.org/10.1007/s00775-011-0813-8.

(40) Tiberti, M.; Papaleo, E.; Russo, N.; De Gioia, L.; Zampella, G. Evidence for the Formation of a Mo–H Intermediate in the Catalytic Cycle of Formate Dehydrogenase. *Inorg. Chem.* **2012**, *51* (15), 8331–8339. https://doi.org/10.1021/ic300863d.

(41) Dong, G.; Ryde, U. Reaction Mechanism of Formate Dehydrogenase Studied by Computational Methods. *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.* **2018**, *23* (8), 1243–1254. https://doi.org/10.1007/s00775-018-1608-y.

(42) Schirwitz, K.; Schmidt, A.; Lamzin, V. S. High-resolution Structures of Formate Dehydrogenase from *Candida Boidinii*. *Protein Sci.* **2007**, *16* (6), 1146–1156. https://doi.org/10.1110/ps.062741707.

(43) Guo, Q.; Gakhar, L.; Wickersham, K.; Francis, K.; Vardi-Kilshtain, A.; Major, D. T.; Cheatum, C. M.; Kohen, A. Structural and Kinetic Studies of Formate Dehydrogenase from *Candida Boidinii*. *Biochemistry* **2016**, *55* (19), 2760–2771. https://doi.org/10.1021/acs.biochem.6b00181.

(44) Hille, R.; Hall, J.; Basu, P. The Mononuclear Molybdenum Enzymes. *Chem. Rev.* **2014**, *114* (7), 3963–4038. https://doi.org/10.1021/cr400443z.

(45) *Enzymes for Solving Humankind's Problems: Natural and Artificial Systems in Health, Agriculture, Environment and Energy*; Moura, J. J. G., Moura, I., Maia, L. B., Eds.; Springer International Publishing: Cham, 2021. https://doi.org/10.1007/978-3-030-58315-6.

(46) 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.

(47) Rivas, M. G.; González, P. J.; Brondino, C. D.; Moura, J. J. G.; Moura, I. EPR Characterization of the Molybdenum(V) Forms of Formate Dehydrogenase from Desulfovibrio Desulfuricans ATCC 27774 upon Formate Reduction. *J. Inorg. Biochem.* **2007**, *101* (11–12), 1617–1622. https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2007.04.011.

(48) Wilson, G. L.; Greenwood, R. J.; Pilbrow, J. R.; Spence, J. T.; Wedd, A. G. Molybdenum(V) Sites in Xanthine Oxidase and Relevant Analog Complexes: Comparison of Molybdenum-95 and Sulfur-33 Hyperfine Coupling. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113* (18), 6803–6812. https://doi.org/10.1021/ja00018a014.

(49) Gadsby, P. M. A.; Greenwood, C.; Coddington, A.; Thomson, A. J.; Godfrey, C. Purification and Properties of Formate Dehydrogenase from *Pseudomonas Aeruginosa* . Electron-Paramagnetic-Resonance Studies on the Molybdenum Centre. *Biochem. J.* **1987**, *243* (1), 235–239. https://doi.org/10.1042/bj2430235.

(50) Oliveira, A. R.; Mota, C.; Klymanska, K.; Biaso, F.; Romão, M. J.; Guigliarelli, B.; Pereira, I. C. Spectroscopic and Structural Characterization of Reduced *Desulfovibrio Vulgaris* Hildenborough W-FdhAB Reveals Stable Metal Coordination during Catalysis. *ACS Chem. Biol.* **2022**, *17* (7), 1901–1909. https://doi.org/10.1021/acschembio.2c00336.

(51) Meneghello, M.; Uzel, A.; Broc, M.; Manuel, R. R.; Magalon, A.; Léger, C.; Pereira, I. A. C.; Walburger, A.; Fourmond, V. Electrochemical Kinetics Support a Second Coordination Sphere Mechanism in Metal-Based Formate Dehydrogenase. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2023**, *62* (6), e202212224. https://doi.org/10.1002/anie.202212224.

(52) Siegbahn, P. E. M. Energetics for CO_2 Reduction by Molybdenum-Containing Formate Dehydrogenase. *J. Phys. Chem. B* **2022**, *126* (8), 1728–1733. https://doi.org/10.1021/acs.jpcb.2c00151.

(53) Fourmond, V.; Plumeré, N.; Léger, C. Reversible Catalysis. *Nat. Rev. Chem.* **2021**, *5* (5), 348–360. https://doi.org/10.1038/s41570-021-00268-3.

(54) Li, F.; Scheller, S.; Lienemann, M. Comparative Analysis of CO2 Reduction by Soluble Escherichia Coli Formate Dehydrogenase H and Its Selenocysteine-to-Cysteine Substitution Variant. *J. CO2 Util.* **2023**, *77*, 102608. https://doi.org/10.1016/j.jcou.2023.102608.

(55) Sahin, S.; Lemaire, O. N.; Belhamri, M.; Kurth, J. M.; Welte, C. U.; Wagner, T.; Milton, R. D. Bioelectrocatalytic CO_2 Reduction by Mo-Dependent Formylmethanofuran Dehydrogenase. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2023**, *62* (45), e202311981. https://doi.org/10.1002/anie.202311981.

(56) Al-Attar, S.; Rendon, J.; Sidore, M.; Duneau, J.-P.; Seduk, F.; Biaso, F.; Grimaldi, S.; Guigliarelli, B.; Magalon, A. Gating of Substrate Access and Long-Range Proton Transfer in *Escherichia Coli* Nitrate Reductase A: The Essential Role of a Remote Glutamate Residue. *ACS Catal.* **2021**, *11* (23), 14303–14318. https://doi.org/10.1021/acscatal.1c03988.

(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) Hakopian, S.; Niks, D.; Hille, R. The Air-Inactivation of Formate Dehydrogenase FdsDABG from Cupriavidus Necator. *J. Inorg. Biochem.* **2022**, *231*, 111788. https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2022.111788.

(59) Vilela-Alves, G.; Manuel, R. R.; Viegas, A.; Carpentier, P.; Biaso, F.; Guigliarelli, B.; Pereira, I. A. C.; Romão, M. J. Substrate-Dependent Oxidative Inactivation of a W-Dependent Formate Dehydrogenase Involving Selenocysteine Displacement.

(60) Axley, M. J.; Grahame, D. A.; Stadtman, T. C. Escherichia Coli Formate-Hydrogen Lyase. Purification and Properties of the Selenium-Dependent Formate Dehydrogenase Component. *J. Biol. Chem.* **1990**, *265* (30), 18213–18218. https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)44740-5.

(61) Enoch, H. G.; Lester, R. L. The Purification and Properties of Formate Dehydrogenase and Nitrate Reductase from Escherichia Coli. *J. Biol. Chem.* **1975**, *250* (17), 6693–6705. https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)40989-7.

(62) Graham, J. E.; Niks, D.; Zane, G. M.; Gui, Q.; Hom, K.; Hille, R.; Raman, C. S. 1 How a Formate Dehydrogenase Responds to Oxygen: 2 Unexpected O2 Insensitivity of an Enzyme Harboring 3 Tungstopterin, Selenocysteine, and [4Fe-4S] Clusters.

(63) Oliveira, A. R.; Mota, C.; Vilela-Alves, G.; Manuel, R. R.; Pedrosa, N.; Fourmond, V.; Klymanska, K.; Léger, C.; Guigliarelli, B.; Romão, M. J.; Cardoso Pereira, I. A. An Allosteric Redox Switch Involved in Oxygen Protection in a CO2 Reductase. *Nat. Chem. Biol.* **2024**, *20* (1), 111–119. https://doi.org/10.1038/s41589-023-01484-2.

(64) 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. *J. Biol. Chem.* **2022**, *298* (2), 101384. https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.101384.

(65) Broc M. et Al.

(66) Duffus, B. R.; Gauglitz, M.; Teutloff, C.; Leimkühler, S. Redox Potentials Elucidate the Electron Transfer Pathway of NAD+-Dependent Formate Dehydrogenases. *J. Inorg. Biochem.* **2024**, *253*, 112487. https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2024.112487.

(67) Uzel, A.; Grimaldi, S.; Iranzo, O.; Faller, P.; Blondin, G.; Walburger, A.; Nivière, V.; Aix-Marseille Université; Ecole Doctorale Sciences Chimiques; Bioénergétique et Ingénierie des

Protéines. Caractérisation fonctionnelle des formiate-déshydrogénases de Bacillus subtilis par spectroscopie RPE, 2022. https://univ-amu.summon.serialssolutions.com/2.0.0/link/0/eLvHCXMwdV3JbsIwEB2xSK3US3eoWuQfCAo2JM6RptBwqLpx4BY5iV2ihgTFTaVe-j98Bz9WO4QWVeI80mjmWZ7FngWA4K5p_LMJfWbikNlRIJxen1PLNllkU2IGkY1NQXXf8KuHPc96nuFRDbbbrv6eMIo0_jTYouiK_DdtfM_mrEwtjU25ZdWzliiFNts0esoum4TUoYn1GK0GNO-H7vRRWV8WcKkiXs1VMd3xKONjOLrb-Qk_gZrIT-HQ3a5fO4O5W05SXq_yquAGiSwtmxB0YQpHEZdIB5wKWm5E65Wcf0V59rZepcovSUVGtyyMk6SQSBbBR5zEEi1ZjsrWSj3CMlvGHL08jc6hMx5NXc-oxPQrOPxKL3wBjTRLeQsQ7Q2CkChwndDpEyocPAhJwB1GLWoLi7ahpVX2VVCpZPCx8tzDyexBT39pw-Ue_ld7KdfQFOp28Bs42B5MpwK3A_XvyfQHBgKd3w.

(68) Grimaldi, S.; Biaso, F.; Burlat, B.; Guigliarelli, B. CHAPTER 3. Electron Paramagnetic Resonance Studies of Molybdenum Enzymes. In *Metallobiology*; Hille, R., Schulzke, C., Kirk, M. L., Eds.; Royal Society of Chemistry: Cambridge, 2016; pp 68–120. https://doi.org/10.1039/9781782628842-00068.

(69) 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.

(70) Seif Eddine, M.; Guigliarelli, B.; Grimaldi, S.; Fagès, F.; Gambarelli, S.; Duboc, C.; Choua, S.; Magalon, A.; Bioénergétique et Ingénierie des Protéines (BIP) (Marseille); Aix-Marseille Université; Ecole Doctorale Sciences Chimiques. Etude des interactions des quinones avec le complexe respiratoire nitrate réductase par spectroscopie RPE à haute résolution. https://go.exlibris.link/5q5BzvjB.

(71) 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.* **2019**, *116* (39), 19458–19463. https://doi.org/10.1073/pnas.1910675116.

(72) Franza, T.; Gaudu, P. Quinones: More than Electron Shuttles. *Res. Microbiol.* **2022**, *173* (6–7), 103953. https://doi.org/10.1016/j.resmic.2022.103953.

(73) Kao, W.-C.; Hunte, C. Quinone Binding Sites of Cyt *Bc* Complexes Analysed by X-Ray Crystallography and Cryogenic Electron Microscopy. *Biochem. Soc. Trans.* **2022**, *50* (2), 877–893. https://doi.org/10.1042/BST20190963.

(74) Ness, J.; Naurin, S.; Effinger, K.; Stadnytskyi, V.; Ibrahim, I. M.; Puthiyaveetil, S.; Cramer, W. A. Structure-based Control of the Rate Limitation of Photosynthetic Electron Transport. *FEBS Lett.* **2019**, *593* (16), 2103–2111. https://doi.org/10.1002/1873-3468.13484.

(75) Kuleta, P.; Pietras, R.; Andrys-Olek, J.; Wójcik-Augustyn, A.; Osyczka, A. Probing Molecular Interactions of Semiquinone Radicals at Quinone Reduction Sites of Cytochrome Bc_1 by X-Band HYSCORE EPR Spectroscopy and Quantum Mechanical Calculations. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2023**, *25* (33), 21935–21943. https://doi.org/10.1039/D3CP02433D.

(76) 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.

(77) Grimaldi, S.; Arias-Cartin, R.; Lyubenova, S.; Lanciano, P.; Ceccaldi, P.; Endeward, B.; Prisner, T.; Magalon, A.; Guigliarelli, B. EPR-HYSCORE Study of Quinone Binding in Respiratory Nitrate Reductase: Molecular Basis for the Adaptation to Anaerobiosis–Aerobiosis Transition. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* **2010**, *1797*, 114. https://doi.org/10.1016/j.bbabio.2010.04.342.

(78) Horsefield, R.; Yankovskaya, V.; Sexton, G.; Whittingham, W.; Shiomi, K.; Ōmura, S.; Byrne, B.; Cecchini, G.; Iwata, S. Structural and Computational Analysis of the Quinone-Binding Site of Complex II (Succinate-Ubiquinone Oxidoreductase). *J. Biol. Chem.* **2006**, *281* (11), 7309–7316. https://doi.org/10.1074/jbc.M508173200.

(79) Stoll, S.; Schweiger, A. EasySpin, a Comprehensive Software Package for Spectral Simulation and Analysis in EPR. *J. Magn. Reson.* **2006**, *178* (1), 42–55. https://doi.org/10.1016/j.jmr.2005.08.013.

(80) Hahn, E. L. Spin Echoes. *Phys. Rev.* **1950**, *80* (4), 580–594. https://doi.org/10.1103/PhysRev.80.580.

(81) Höfer, P.; Grupp, A.; Nebenführ, H.; Mehring, M. Hyperfine Sublevel Correlation (Hyscore) Spectroscopy: A 2D ESR Investigation of the Squaric Acid Radical. *Chem. Phys. Lett.* **1986**, *132* (3), 279–282. https://doi.org/10.1016/0009-2614(86)80124-5.

(82) Stoll, S.; Britt, R. D. General and Efficient Simulation of Pulse EPR Spectra. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2009**, *11* (31), 6614. https://doi.org/10.1039/b907277b.

(83) Chovancova, E.; Pavelka, A.; Benes, P.; Strnad, O.; Brezovsky, J.; Kozlikova, B.; Gora, A.; Sustr, V.; Klvana, M.; Medek, P.; Biedermannova, L.; Sochor, J.; Damborsky, J. CAVER 3.0: A Tool for the Analysis of Transport Pathways in Dynamic Protein Structures. *PLoS Comput. Biol.* **2012**, *8* (10), e1002708. https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002708.

(84) Jurcik, A.; Bednar, D.; Byska, J.; Marques, S. M.; Furmanova, K.; Daniel, L.; Kokkonen, P.; Brezovsky, J.; Strnad, O.; Stourac, J.; Pavelka, A.; Manak, M.; Damborsky, J.; Kozlikova, B. CAVER Analyst 2.0: Analysis and Visualization of Channels and Tunnels in Protein Structures and Molecular Dynamics Trajectories. *Bioinformatics* **2018**, *34* (20), 3586–3588. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty386.

(85) Darden, T.; York, D.; Pedersen, L. Particle Mesh Ewald: An $N \cdot \log(N)$ Method for Ewald Sums in Large Systems. *J. Chem. Phys.* **1993**, *98* (12), 10089–10092. https://doi.org/10.1063/1.464397.

(86) Carvalho, A. T. P.; Swart, M. Electronic Structure Investigation and Parametrization of Biologically Relevant Iron–Sulfur Clusters. *J. Chem. Inf. Model.* **2014**, *54* (2), 613–620. https://doi.org/10.1021/ci400718m.

(87) Ferreira, P.; Cerqueira, N. M. F. S. A.; Brás, N. F.; Fernandes, P. A.; Ramos, M. J. Parametrization of Molybdenum Cofactors for the AMBER Force Field. *J. Chem. Theory Comput.* **2018**, *14* (5), 2538–2548. https://doi.org/10.1021/acs.jctc.8b00137.

(88) Rugor, A.; Wójcik-Augustyn, A.; Niedzialkowska, E.; Mordalski, S.; Staroń, J.; Bojarski, A.; Szaleniec, M. Reaction Mechanism of Sterol Hydroxylation by Steroid C25 Dehydrogenase – Homology Model, Reactivity and Isoenzymatic Diversity. *J. Inorg. Biochem.* **2017**, *173*, 28–43. https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2017.04.027.

(89) Rappe, A. K.; Casewit, C. J.; Colwell, K. S.; Goddard, W. A.; Skiff, W. M. UFF, a Full Periodic Table Force Field for Molecular Mechanics and Molecular Dynamics Simulations. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114* (25), 10024–10035. https://doi.org/10.1021/ja00051a040.

(90) Wang, J.; Wang, W.; Kollman, P. A.; Case, D. A. Automatic Atom Type and Bond Type Perception in Molecular Mechanical Calculations. *J. Mol. Graph. Model.* **2006**, *25* (2), 247–260. https://doi.org/10.1016/j.jmgm.2005.12.005.

(91) Hohenberg, P.; Kohn, W. Inhomogeneous Electron Gas. *Phys. Rev.* **1964**, *136* (3B), B864–B871. https://doi.org/10.1103/PhysRev.136.B864.

(92) Kohn, W.; Sham, L. J. Self-Consistent Equations Including Exchange and Correlation Effects. *Phys. Rev.* **1965**, *140* (4A), A1133–A1138. https://doi.org/10.1103/PhysRev.140.A1133.

(93) Becke, A. D. Density-Functional Thermochemistry. III. The Role of Exact Exchange. *J. Chem. Phys.* **1993**, *98* (7), 5648–5652. https://doi.org/10.1063/1.464913.

(94) Lee, C.; Yang, W.; Parr, R. G. Development of the Colle-Salvetti Correlation-Energy Formula into a Functional of the Electron Density. *Phys. Rev. B* **1988**, *37* (2), 785–789. https://doi.org/10.1103/PhysRevB.37.785.

(95) Vosko, S. H.; Wilk, L.; Nusair, M. Accurate Spin-Dependent Electron Liquid Correlation Energies for Local Spin Density Calculations: A Critical Analysis. *Can. J. Phys.* **1980**, *58* (8), 1200–1211. https://doi.org/10.1139/p80-159.

(96) Schäfer, A.; Huber, C.; Ahlrichs, R. Fully Optimized Contracted Gaussian Basis Sets of Triple Zeta Valence Quality for Atoms Li to Kr. *J. Chem. Phys.* **1994**, *100* (8), 5829–5835. https://doi.org/10.1063/1.467146.

(97) Schäfer, A.; Horn, H.; Ahlrichs, R. Fully Optimized Contracted Gaussian Basis Sets for Atoms Li to Kr. *J. Chem. Phys.* **1992**, *97* (4), 2571–2577. https://doi.org/10.1063/1.463096.

(98) Barone, V. Structure, Magnetic Properties and Reactivities of Open-Shell Species From Density Functional and Self-Consistent Hybrid Methods. In *Recent Advances in Computational Chemistry*; WORLD SCIENTIFIC, 1995; Vol. 1, pp 287–334. https://doi.org/10.1142/9789812830586_0008.

(99) Van Lenthe, E.; Snijders, J. G.; Baerends, E. J. The Zero-Order Regular Approximation for Relativistic Effects: The Effect of Spin–Orbit Coupling in Closed Shell Molecules. *J. Chem. Phys.* **1996**, *105* (15), 6505–6516. https://doi.org/10.1063/1.472460.

(100) Neese, F. The ORCA Program System. *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Mol. Sci.* **2012**, *2* (1), 73–78. https://doi.org/10.1002/wcms.81.

(101) Barone, V.; Cossi, M. Quantum Calculation of Molecular Energies and Energy Gradients in Solution by a Conductor Solvent Model. *J. Phys. Chem. A* **1998**, *102* (11), 1995–2001. https://doi.org/10.1021/jp9716997.

(102) Jormakka, M.; Törnroth, S.; Byrne, B.; Iwata, S. 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.

(103) Hemmann, J. L.; Wagner, T.; Shima, S.; Vorholt, J. A. Methylofuran Is a Prosthetic Group of the Formyltransferase/Hydrolase Complex and Shuttles One-Carbon Units between Two Active Sites. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2019**, *116* (51), 25583–25590. https://doi.org/10.1073/pnas.1911595116.

(104) Lemaire, O. N.; Wegener, G.; Wagner, T. Ethane-Oxidising Archaea Couple CO2 Generation to F420 Reduction. *Nat. Commun.* **2024**, *15* (1), 9065. https://doi.org/10.1038/s41467-024-53338-7.

(105) Vilela-Alves, G.; Manuel, R. R.; Oliveira, A. R.; Pereira, I. C.; Romão, M. J.; Mota, C. Tracking W-Formate Dehydrogenase Structural Changes During Catalysis and Enzyme Reoxidation. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *24* (1), 476. https://doi.org/10.3390/ijms24010476.

(106) Da Silva, S. M.; Pimentel, C.; Valente, F. M. A.; Rodrigues-Pousada, C.; Pereira, I. A. C. Tungsten and Molybdenum Regulation of Formate Dehydrogenase Expression in Desulfovibrio Vulgaris Hildenborough. *J. Bacteriol.* **2011**, *193* (12), 2909–2916. https://doi.org/10.1128/JB.00042-11.

(107) Vilela-Alves, G.; Rebelo Manuel, R.; Pedrosa, N.; Cardoso Pereira, I. A.; Romão, M. J.; Mota, C. Structural and Biochemical Characterization of the M405S Variant of *Desulfovibrio Vulgaris* Formate Dehydrogenase. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Commun.* **2024**, *80* (5), 98–106. https://doi.org/10.1107/S2053230X24003911.

(108) Barber, M. J.; May, H. D.; Ferry, J. G. Inactivation of Formate Dehydrogenase from Methanobacterium Formicicum by Cyanide. *Biochemistry* **1986**, *25* (25), 8150–8155. https://doi.org/10.1021/bi00373a004.

(109) González, P. J.; Rivas, M. G.; Brondino, C. D.; Bursakov, S. A.; Moura, I.; Moura, J. J. G. EPR and Redox Properties of Periplasmic Nitrate Reductase from Desulfovibrio Desulfuricans ATCC 27774. *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.* **2006**, *11* (5), 609–616. https://doi.org/10.1007/s00775-006-0110-0.

(110) Nowicka, B.; Kruk, J. Occurrence, Biosynthesis and Function of Isoprenoid Quinones. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* **2010**, *1797* (9), 1587–1605. https://doi.org/10.1016/j.bbabio.2010.06.007.

(111) Wilkens, D.; Simon, J. Biosynthesis and Function of Microbial Methylmenaquinones. In *Advances in Microbial Physiology*; Elsevier, 2023; Vol. 83, pp 1–58. https://doi.org/10.1016/bs.ampbs.2023.05.002.

(112) Broc, M.; Cherrier, M. V.; Uzel, A.; Arias-Cartin, R.; Arnoux, P.; Brasseur, G.; Seduk, F.; Guigliarelli, B.; Legrand, P.; Pierrel, F.; Schoehn, G.; Maté, M. J.; Martin, L.; Grimaldi, S.; Nicolet, Y.; Magalon, A.; Walburger, A. A Conserved Scaffold for Quinone Channeling between Membrane and Soluble Oxidoreductases. *Nature Structural and Molecular Biology*. 2025, p in press.

(113) Arias-Cartin, 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. *J. Biol. Chem.* **2022**, *298* (2), 101384. https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.101384.

(114) Lowry, O.; Rosebrough, N.; Farr, A.; Randall, R. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* **1951**, *193* (1), 265–275.

(115) Magalon, A.; Rothery, R. A.; Giordano, G.; Blasco, F.; Weiner, J. H. Characterization by Electron Paramagnetic Resonance of the Role of the Escherichia Coli Nitrate Reductase (NarGHI) Iron-Sulfur Clusters in Electron Transfer to Nitrate and Identification of a Semiquinone Radical Intermediate. *J. Bacteriol.* **1997**, *179* (16), 5037–5045. https://doi.org/10.1128/jb.179.16.5037-5045.1997.

(116) Stoll, S.; Schweiger, A. EasySpin, a Comprehensive Software Package for Spectral Simulation and Analysis in EPR. *J. Magn. Reson.* **2006**, *178* (1), 42–55. https://doi.org/10.1016/j.jmr.2005.08.013.

(117) Frisch, M. J. et al. Gaussian 16, Revision C.01, Gaussian, 2016.

(118) Becke, A. Density-Functional Thermochemistry. III. The Role of Exact Exchange. *J. Chem. Phys.* **1993**, *98* (7), 5648–5652. https://doi.org/10.1063/1.464913.

(119) Lee, C.; Yang, W.; Parr, R. Development of the Colle-Salvetti Correlation-Energy Formula into a Functional of the Electron-Density. *Phys. Rev. B* **1988**, *37* (2), 785–789. https://doi.org/10.1103/PhysRevB.37.785.

(120) Becke, A. A New Mixing of Hartree-Fock and Local Density-Functional Theories. *J. Chem. Phys.* **1993**, *98* (2), 1372–1377. https://doi.org/10.1063/1.464304.

(121) Schafer, A.; Horn, H.; Ahlrichs, R. Fully Optimized Contracted Gaussian-Basis Sets for Atoms Li to Kr. *J. Chem. Phys.* **1992**, *97* (4), 2571–2577. https://doi.org/10.1063/1.463096.

(122) Neese, F. The ORCA Program System. *WIREs Comput. Mol. Sci.* **2012**, *2* (1), 73–78. https://doi.org/10.1002/wcms.81.

(123) Barone, V. Structure, Magnetic Properties and Reactivities of Open-Shell Species From Density Functional and Self-Consistent Hybrid Methods. In *Recent Advances in Density Functional Methods*; Recent Advances in Computational Chemistry; WORLD SCIENTIFIC, 1995; Vol. Volume 1, pp 287–334. https://doi.org/10.1142/9789812830586_0008.

(124) Grimme, S.; Ehrlich, S.; Goerigk, L. Effect of the Damping Function in Dispersion Corrected Density Functional Theory. *J. Comput. Chem.* **2011**, *32* (7), 1456–1465. https://doi.org/10.1002/jcc.21759.

(125) Barone, V.; Cossi, M. Quantum Calculation of Molecular Energies and Energy Gradients in Solution by a Conductor Solvent Model. *J. Phys. Chem. A* **1998**, *102* (11), 1995–2001. https://doi.org/10.1021/jp9716997.

(126) Shestopalov, A. I.; Bogachev, A. V.; Murtazina, R. A.; Viryasov, M. B.; Skulachev, V. P. Aeration-Dependent Changes in Composition of the Quinone Pool in Escherichia Coli - Evidence of Post-Transcriptional Regulation of the Quinone Biosynthesis. *FEBS Lett.* **1997**, *404* (2–3), 272–274. https://doi.org/10.1016/S0014-5793(97)00143-9.

(127) Nitzschke, A.; Bettenbrock, K. All Three Quinone Species Play Distinct Roles in Ensuring Optimal Growth under Aerobic and Fermentative Conditions in *E. Coli* K12. *PLoS ONE* **2018**, *13* (4), e0194699. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194699.

(128) Dikanov, S. A. Resolving Protein-Semiquinone Interactions by Two-Dimensional ESEEM Spectroscopy. In *Electron Paramagnetic Resonance*; Gilbert, B. C., Murphy, D. M., Chechik, V., Eds.; The Royal Society of Chemistry, 2012; pp 103–179. https://doi.org/10.1039/9781849734837-00103.

(129) Stoll, S.; Calle, C.; Mitrikas, G.; Schweiger, A. Peak Suppression in ESEEM Spectra of Multinuclear Spin Systems. *J. Magn. Reson.* **2005**, *177* (1), 93–101. https://doi.org/10.1016/j.jmr.2005.07.012.

(130) Schweiger, A.; Jeschke, G. *Principles of Pulse Electron Paramagnetic Resonance*; Oxford university press: New York, 2001.

(131) Dikanov, S. A.; Taguchi, A. T. Two-Dimensional Pulsed EPR Resolves Hyperfine Coupling Strain in Nitrogen Hydrogen Bond Donors of Semiquinone Intermediates. *J. Phys. Chem. B* **2018**, *122* (20), 5205–5211. https://doi.org/10.1021/acs.jpcb.8b02511.

(132) 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.

(133) Taguchi, A. T.; Wraight, C. A.; Dikanov, S. A. Influence of Polar Mutations on the Electronic and Structural Properties of Q_A⁻ [.] in Bacterial Reaction Centers. *J. Phys. Chem. B* **2022**, *126* (33), 6210–6220. https://doi.org/10.1021/acs.jpcb.2c04371.

(134) Yi, S. M.; Taguchi, A. T.; Samoilova, R. I.; O'Malley, P. J.; Gennis, R. B.; Dikanov, S. A. Plasticity in the High Affinity Menaquinone Binding Site of the Cytochrome Aa(3)-600 Menaquinol Oxidase from Bacillus Subtilis. *Biochemistry* **2015**, *54* (32), 5030–5044. https://doi.org/10.1021/acs.biochem.5b00528.

(135) Taguchi, A. T.; O'Malley, P. J.; Wraight, C. A.; Dikanov, S. A. Nuclear Hyperfine and Quadrupole Tensor Characterization of the Nitrogen Hydrogen Bond Donors to the Semiquinone of the QB Site in Bacterial Reaction Centers: A Combined X- and S-Band ^{14,15}N ESEEM and DFT Study. *J. Phys. Chem. B* **2014**, *118* (6), 1501–1509. https://doi.org/10.1021/jp411023k.

(136) 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-+. https://doi.org/10.1021/ja805906a.

(137) Bosch, M.; Gast, P.; Hoff, A.; Spoyalov, A.; Tsvetkov, Y. The Primary Acceptor Quinone Q(a) in Reaction Centers of Rhodobacter-Sphaeroides R26 Is Hydrogen-Bonded to the N-Delta(1)-H of His M219 - an Electron-Spin Echo Study of Q(a)(-.). *Chem. Phys. Lett.* **1995**, *239* (4–6), 306–312. https://doi.org/10.1016/0009-2614(95)00481-I.

(138) Lendzian, F.; Rautter, J.; Kass, H.; Gardiner, A.; Lubitz, W. ENDOR and Pulsed EPR Studies of Photosynthetic Reaction Centers: Protein-Cofactor Interactions. *BERICHTE BUNSEN-Ges.-Phys. Chem. Chem. Phys.* **1996**, *100* (12), 2036–2040. https://doi.org/10.1002/bbpc.19961001219.

(139) 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 Q(A)(-Center Dot) in Reaction Centers of Rb-Sphaeroides. *Chem. Phys. Lett.* **1996**, *263* (5), 715–720. https://doi.org/10.1016/S0009-2614(96)01255-9.

(140) Deligiannakis, Y.; Hanley, J.; Rutherford, A. W. 1D- and 2D-ESEEM Study of the Semiquinone Radical Q_A⁻ of Photosystem II. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121* (33), 7653–7664. https://doi.org/10.1021/ja984209c.

(141) Astashkin, A.; Kawamori, A.; Kodera, Y.; Kuroiwa, S.; Akabori, K. An Electron-Spin Echo Envelope Modulation Study of the Primary Acceptor Quinone in Zn-Substituted Plant Photosystem-Ii. *J. Chem. Phys.* **1995**, *102* (14), 5583–5588. https://doi.org/10.1063/1.469289.

(142) 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.

(143) Edmonds, D. T.; Speight, P. A. Nitrogen Quadrupole Resonance in Amino Acids. *Phys. Lett. A* **1971**, *34* (6), 325–326. https://doi.org/10.1016/0375-9601(71)90894-2.

(144) Hanley, J.; Deligiannakis, Y.; MacMillan, F.; Bottin, H.; Rutherford, A. W. ESEEM Study of the Phyllosemiquinone Radical A(1)(Center Dot-) in N-14- and N-15-Labeled Photosystem I. *Biochemistry* **1997**, *36* (39), 11543–11549. https://doi.org/10.1021/bi971360a.

(145) Kolling, D. R. J.; Samoilova, R. I.; Holland, J. T.; Berry, E. A.; Dikanov, S. A.; Crofts, A. R. Exploration of Ligands to the Q_i Site Semiquinone in the Bc_1 Complex Using High-Resolution EPR. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278* (41), 39747–39754. https://doi.org/10.1074/jbc.M305913200.

(146) Kuleta, P.; Pietras, R.; Andrys-Olek, J.; Wojcik-Augustyn, A.; Osyczka, A. Probing Molecular Interactions of Semiquinone Radicals at Quinone Reduction Sites of Cytochrome Bc_1 by X-Band HYSCORE EPR Spectroscopy and Quantum Mechanical Calculations. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2023**, *25* (33), 21935–21943. https://doi.org/10.1039/d3cp02433d.

(147) Grimaldi, S.; MacMillan, F.; Ostermann, T.; Ludwig, B.; Michel, H.; Prisner, T. Q_H^{•-} Ubisemiquinone Radical in the Bo_3-Type Ubiquinol Oxidase Studied by Pulsed Electron Paramagnetic Resonance and Hyperfine Sublevel Correlation Spectroscopy. *Biochemistry* **2001**, *40* (4), 1037–1043. https://doi.org/10.1021/bi001641+.

(148) 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^{•-} 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.

(149) Grimaldi, S.; Arias-Cartin, R.; Lanciano, P.; Lyubenova, S.; Endeward, B.; Prisner, T. F.; Magalon, A.; Guigliarelli, B. Direct Evidence for Nitrogen Ligation to the High Stability

Semiquinone Intermediate in *Escherichia Coli* Nitrate Reductase A. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285* (1), 179–187. https://doi.org/10.1074/jbc.M109.060251.

(150) 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-+. https://doi.org/10.1021/ja1009234.

(151) Eddine, M. S.; 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 ReductaseA by Selective ²H and ¹⁵N Labeling, HYSCORE Spectroscopy, and DFT Modeling. *CHEMPHYSCHEM* **2017**, *18* (19), 2704–2714. https://doi.org/10.1002/cphc.201700571.

(152) Sinnecker, S.; Reijerse, E.; Neese, F.; Lubitz, W. Hydrogen Bond Geometries from Electron Paramagnetic Resonance and Electron-Nuclear Double Resonance Parameters: Density Functional Study of Quinone Radical Anion-Solvent Interactions. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (10), 3280–3290. https://doi.org/10.1021/ja0392014.

(153) Fritscher, J. Influence of Hydrogen Bond Geometry on Quadrupole Coupling Parameters: A Theoretical Study of Imidazole-Water and Imidazole-Semiquinone Complexes. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2004**, *6* (21), 4950–4956. https://doi.org/10.1039/b408764j.

(154) Pintscher, S.; Wojcik-Augustyn, A.; Sarewicz, M.; Osyczka, A. Charge Polarization Imposed by the Binding Site Facilitates Enzymatic Redox Reactions of Quinone. *Biochim. Biophys. ACTA-Bioenerg.* **2020**, *1861* (8), 148216. https://doi.org/10.1016/j.bbabio.2020.148216.

(155) Grinter, R.; Kropp, A.; Venugopal, H.; Senger, M.; Badley, J.; Cabotaje, P.; Stripp, S. T.; Barlow, C. K.; Belousoff, M.; Cook, G. M.; Vincent, K. A.; Schittenhelm, R. B.; Khalid, S.; Berggren, G.; Greening, C. Energy Extraction from Air: Structural Basis of Atmospheric Hydrogen Oxidation. Biochemistry October 10, 2022. https://doi.org/10.1101/2022.10.09.511488.

(156) Soom, S.; Moning, S. U.; Cook, G. M.; Lingford, J. P.; Kropp, A.; Tran, S.; Grinter, R.; Greening, C.; Von Ballmoos, C. Hydrogenase-Driven ATP Synthesis from Air. Microbiology March 15, 2025. https://doi.org/10.1101/2025.03.14.643271.

(157) Wells, M.; Kim, M.; Akob, D. M.; Basu, P.; Stolz, J. F. Impact of the Dimethyl Sulfoxide Reductase Superfamily on the Evolution of Biogeochemical Cycles. *Microbiol. Spectr.* **2023**, *11* (2), e04145-22. https://doi.org/10.1128/spectrum.04145-22.

(158) Popov, V. O.; Lamzin, V. S. NAD+-Dependent Formate Dehydrogenase. *Biochem. J.* **1994**, *301* (3), 625–643. https://doi.org/10.1042/bj3010625.

(159) Oliveira, A. R.; Mota, C.; Vilela-Alves, G.; Manuel, R. R.; Pedrosa, N.; Fourmond, V.; Klymanska, K.; Léger, C.; Guigliarelli, B.; Romão, M. J.; Cardoso Pereira, I. A. An Allosteric Redox Switch Involved in Oxygen Protection in a CO2 Reductase. *Nat. Chem. Biol.* **2024**, *20* (1), 111–119. https://doi.org/10.1038/s41589-023-01484-2.

(160) Fourmond, V.; Burlat, B.; Dementin, S.; Arnoux, P.; Sabaty, M.; Boiry, S.; Guigliarelli, B.; Bertrand, P.; Pignol, D.; Léger, C. Major Mo(V) EPR Signature of *Rhodobacter Sphaeroides* Periplasmic Nitrate Reductase Arising from a Dead-End Species That Activates upon Reduction.

Relation to Other Molybdoenzymes from the DMSO Reductase Family. *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112* (48), 15478–15486. https://doi.org/10.1021/jp807092y.

(161) Lodh, J.; Roy, S. Bio-Inspired CO2 Reduction Reaction Catalysis Using Soft-Oxometalates. *J. Inorg. Biochem.* **2022**, *234*, 111903. https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2022.111903.

(162) Shiekh, B. A.; Kaur, D.; Kumar, S. Bio-Mimetic Self-Assembled Computationally Designed Catalysts of Mo and W for Hydrogenation of CO_2 /Dehydrogenation of HCOOH Inspired by the Active Site of Formate Dehydrogenase. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2019**, *21* (38), 21370–21380. https://doi.org/10.1039/C9CP03406D.

(163) Fogeron, T.; Li, Y.; Fontecave, M. Formate Dehydrogenase Mimics as Catalysts for Carbon Dioxide Reduction. *Molecules* **2022**, *27* (18), 5989. https://doi.org/10.3390/molecules27185989.

(164) Dementin, S.; Belle, V.; Bertrand, P.; Guigliarelli, B.; Adryanczyk-Perrier, G.; De Lacey, A. L.; Fernandez, V. M.; Rousset, M.; Léger, C. Changing the Ligation of the Distal [4Fe4S] Cluster in NiFe Hydrogenase Impairs Inter- and Intramolecular Electron Transfers. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128* (15), 5209–5218. https://doi.org/10.1021/ja060233b.

(165) Fasano, A.; Fourmond, V.; Léger, C. Outer-Sphere Effects on the O_2 Sensitivity, Catalytic Bias and Catalytic Reversibility of Hydrogenases. *Chem. Sci.* **2024**, *15* (15), 5418–5433. https://doi.org/10.1039/D4SC00691G.

(166) Fasano, A.; Guendon, C.; Jacq-Bailly, A.; Kpebe, A.; Wozniak, J.; Baffert, C.; Barrio, M. D.; Fourmond, V.; Brugna, M.; Léger, C. A Chimeric NiFe Hydrogenase Heterodimer to Assess the Role of the Electron Transfer Chain in Tuning the Enzyme's Catalytic Bias and Oxygen Tolerance. *J. Am. Chem. Soc.* **2023**, *145* (36), 20021–20030. https://doi.org/10.1021/jacs.3c06895.

(167) Grinter, R.; Kropp, A.; Venugopal, H.; Senger, M.; Badley, J.; Cabotaje, P. R.; Jia, R.; Duan, Z.; Huang, P.; Stripp, S. T.; Barlow, C. K.; Belousoff, M.; Shafaat, H. S.; Cook, G. M.; Schittenhelm, R. B.; Vincent, K. A.; Khalid, S.; Berggren, G.; Greening, C. Structural Basis for Bacterial Energy Extraction from Atmospheric Hydrogen. *Nature* **2023**, *615* (7952), 541–547. https://doi.org/10.1038/s41586-023-05781-7.

Annexe

Annexe 1. Composition des milieux de culture de *Bacillus subtilis et des tampons utilisés*

Milieu LB pH 7.3 :

- Tryptone 10g/L
- Extrait de levure 5g/L
- NaCl 5g/L

Milieu CE :

- Glucose 0.5%
- $MgSO_4$ 0.5 mM
- $MnSO_4$ 10 µM
- tryptophane 0.1 mM
- glutamate de potassium 40 mM
- ferric ammonium citrate 85 µM
- Na_2MoO_4-$2H_2O$ 3 µM
- CE salt
    - K_2HPO_4 70 mM
    - KH_2PO_4 30 mM
    - $(NH_4)_2SO_4$ 25mM

Milieu M9 :

- Glucose 0.5%
- $CaCl_2$ 0.1 mM
- $MgSO_4$ 1.25 mM
- Tryptophane 0.1 mM
- $FeCl_3$ 0.06 mM
- Eléments traces
    - $MnCl_2$-$4H_2O$ 5 mM
    - $ZnCl_2$ 12 mM
    - $CuCl_2$-$2H_2O$ 2.5 mM
    - Na_2MoO_4 2.5 mM
- M9 salt pH 7
    - Na_2HPO_4-$2H_2O$ 60 mM
    - KH_2PO_4 25 mM
    - NH_4Cl 46 mM
    - NaCl 10 mM

Tampon A pH 7.5 pour laver les cellules et purifier l'enzyme :

- Na_2SO_4 50 mM
- NaH_2PO_4 3 mM
- Na_2HPO_4 17 mM

Tampon B pH 7.5 pour purifier l'enzyme :

- Na_2SO_4 50 mM
- NaH_2PO_4 3 mM
- Na_2HPO_4 17 mM
- Imidazole 500 mM

Tampon D2 pH 6 pour stocker l'enzyme :

- MES 50 mM
- Na_2SO_4 50 mM
- Glycérol 5% volume
- KNO_3 10 mM

Solution A Lowry :

- Na_2CO_3 anhydre 190 mM
- NaOH 100 mM

Solution B Lowry :

- $CuSO_4$ 30 mM
- Tartrate de sodium et de potassium 35 mM