



**HAL**  
open science

# Etude du rôle du ligand axial cystéine du site actif de la superoxyde réductase dans la réactivité avec le superoxyde

Emilie Tremey

► **To cite this version:**

Emilie Tremey. Etude du rôle du ligand axial cystéine du site actif de la superoxyde réductase dans la réactivité avec le superoxyde. Biochimie [q-bio.BM]. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2009. Français. NNT: . tel-00462079

**HAL Id: tel-00462079**

**<https://theses.hal.science/tel-00462079>**

Submitted on 8 Mar 2010

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER - GRENOBLE 1  
ECOLE DOCTORALE DE CHIMIE ET SCIENCE DU VIVANT

THESE

*Présentée et soutenue par*

**Emilie TREMEY**

*Pour obtenir le grade de*

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE JOSEPH FOURIER

Discipline : Chimie- Biologie

*Le 03 décembre 2009*

**Etude du rôle du ligand axial cystéine du site  
actif de la superoxyde réductase dans la  
réactivité avec le superoxyde**

---

Composition du jury :

Président du jury : Pr. Franck FIESCHI  
Rapporteurs : Dr. Alain DOLLA  
Dr. François TALFOURNIER  
Examineurs : Dr. Catherine BERTHOMIEU  
Directeur de thèse : Dr Vincent NIVIERE

Laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux  
CEA – Grenoble  
iRTSV/LCBM – CNRS – Université Joseph Fourier



*Cette thèse s'est déroulée au Laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux dirigé par le Professeur Marc Fontecave. Je tiens à le remercier chaleureusement pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et permis de travailler dans d'excellentes conditions.*

*Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance au Docteur Vincent Nivière qui m'a encadré tout au long de cette thèse. Je le remercie pour sa disponibilité, sa patience ainsi que pour toutes les compétences scientifiques qu'il m'a fait partager. J'ai acquis un bon nombre de compétences techniques qui, j'en suis sûre, me seront précieuses.*

*Ce travail a été rendu possible grâce à de nombreuses collaborations. Je remercie le Docteur Geneviève Blondin du CEA de Grenoble pour les études RPE et Izabel Bérard de l'IBS de Grenoble pour les études de spectrométrie de masse. Je remercie également le Docteur Alain Desbois du CEA de Saclay pour les études de Résonance Raman ainsi que le Docteur Catherine Berthomieu du CEA de Cadarache pour les études de FTIR. Enfin je remercie le Docteur Vincent Favaudon de l'institut Curie d'Orsay et le Professeur Chantal Houée-Levin de l'Université d'Orsay pour les études de radiolyse pulsée.*

*Je remercie également le Docteur Alain Dolla, le Professeur Franck Fieschi, le Docteur François Talfournier et le Docteur Catherine Berthomieu pour l'honneur qu'ils m'ont fait d'accepter de juger mon travail de thèse.*

*Je tiens évidemment à remercier tous les membres du laboratoire pour les bons moments passés en leur compagnie :*

*Hamid et Nat pour m'avoir fait découvrir le bon goût de la cuisine marocaine,  
Sandrine et Etienne pour nos discussions scientifiques au détour d'une pailleasse,  
Cathy pour ton aide précieuse sur la compréhension de quelques exercices de chimie que je devais expliquer à mon tour à des étudiants quelques heures plus tard !!  
Fabien pour m'avoir fait découvrir le monde coloré et odorant des levures et surtout le fameux accent tout droit venu des Vosges !!  
Vincent A pour toutes tes connaissances sur tous les sujets dans tous les domaines que l'on a pu aborder lors des discussions au café,  
Caro M pour tes conseils pédagogiques,  
Olivier pour tes conseils pédagogiques aussi et pour avoir accepté d'être mon tuteur de monitorat durant ces 3 années,  
Stéphane M pour avoir pris le temps de m'éclairer sur l'interprétation des résultats de spectro UV-visible et pour ton humour qui n'a pas d'égal avec ton fameux « salut les boudins !! »  
Nico D pour nos discussions sur l'avenir du chercheur,  
Murielle pour avoir pris le temps de m'aider lors de mes répét' de soutenance,  
Simon A pour nous avoir fait découvrir le beau lac d'annecy,  
Silke, Guni et Vinita pour m'avoir permis de perfectionner mon anglais !!  
Elodie pour m'avoir gravé à vie la chanson de Lily Allen dans la tête !!  
Fred pour ta sympathie.  
Et Marie que j'ai eue la chance d'encadrer durant son stage de M1 et qui m'a bien aidé dans la purification de plusieurs protéines.*

*Je n'oublie pas bien sûr les nouveaux au labo avec qui j'ai passé une courte mais sympathique période: Simon D (nouveau venu dans la « team SOR »), Mohamad (nouveau*

venu au pays des levures), Phong (fervent supporter de ST étienne !! ah non du PSG !!) et Vincent F (Grand amateur de thé).

Je tiens à remercier également Stéphane T pour tous les moments, au labo et en dehors, à papoter, et surtout rigoler de tout et de rien. J'espère qu'il y en aura encore plein d'autre avec Sophie et le petit Camille !!

Pascal pour tes blagues et jeux de mots qui sont devenus maintenant légendaire, pour ta bonne humeur et pour ta superbe reprise d'Emilie Jolie !!

Pierre-André et Adeline L pour votre bonne humeur et pour les soirées passées en votre compagnie à rire du début à la fin. On retourne au Palazziiiio quand vous voulez !!

Sigolène, merci pour ces trois années de « Sigolénites » qui m'ont permis de passer de véritables moments de détente et de rire. Surtout ne t'arrêtes pas !!

Et Florence, ma SORette avec qui je formais les SOReuses !! Merci pour toutes les discussions matinales journalières, pour m'avoir aidé dans mes réflexions et aussi pour les soirées de jeux et de détente autour d'un bon repas préparé par tes soins !!

Je n'oublie pas non plus ceux qui ne font plus partie du labo : Caro R (rendez-vous en ville à midi !!), Eric PiLETTE (merci pour ton aide gossip boy !!!), Aziz (comment ?? Joyeux Noël !!), Yohan (alias Dr YO, merci pour le remake d'alerte à Malibu !!) et Pierre (le rugbyman avec la main en l'air !!), merci à tous pour votre sympathie et votre grande disponibilité.

Je remercie également tout les membres du bâtiment K, Sylvia, Delphine, Vincent F, Christelle, Florence M, Peggy ... pour leur accueil et leur sympathie.

Un remerciement tout particulier aux « filles » : Alexia et Carole (mes accolites de créations originales pour tout événement spécial), Maïté (Miss Brives-la-gaillarde), Adeline (ta gentillesse n'a d'égale que ton originalité), Chantal (notre maman de labo à tous). Ces années passées au laboratoire sans vous n'auraient pas été les mêmes. Merci pour votre soutien, votre amitié et pour les petits week-ends Campig-car ou Parisien, pour les mariages (clin d'œil aux maris Alex, Fab et Thomas), et pour toutes les soirées que nous avons passées et que nous passerons encore ensemble.

Une spéciale dédicasse pour Carole qui, il y a 5 ans m'a accueillie comme une simple colloc' de bureau et qui est devenue au fil du temps une véritable amie. Merci pour ton écoute, ton aide et ton soutien !! Mais aussi pour ton énergie, pour m'avoir préparé plein de surprise, et pour toutes nos discussions à refaire le monde !!

Je remercie également Amandine et Nico, Sandrine et Béranger, Audrey, Maryline et Marie-aude pour votre amitié et pour me supporter depuis tout ce temps !!

Pour finir, je tiens à remercier toute ma famille pour avoir toujours cru en moi !!  
Merci aux représentants de la famille d'avoir fait le déplacement de St Etienne et de Morestel pour ma soutenance.

Un grand Merci à mon Frère que j'ai stressé pendant 3 ans !! Merci pour ces années de colloc' dans ce fabuleux appart, pour ton soutien et pour avoir été mon coach sportif lorsque j'en avais besoin ... entre 2 McDO !!

Et enfin Merci à mes parents pour leur soutien inestimable, leur aide et leur écoute durant de nombreuses heures au téléphone !!

# *Sommaire*



---

Sommaire .....	5
Abréviations & Notations .....	11
Introduction .....	15
<b>I. Oxygène, respiration et stress oxydant</b> .....	17
I.1. Production, Propriétés et Cibles des ERO .....	18
I.1.1. Le superoxyde $O_2^{\bullet-}$ .....	18
I.1.2. Le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) .....	21
I.1.3. Le radical hydroxyle ( $HO^{\bullet}$ ) .....	22
I.1.4. L'oxygène singulet ( $^1O_2$ ) .....	23
I.2. Les systèmes de défense .....	25
I.2.1. Systèmes moléculaires non enzymatiques .....	25
I.2.2. Systèmes enzymatiques .....	25
I.2.2.1. Systèmes de défense contre $O_2^{\bullet-}$ .....	25
I.2.2.2. Systèmes de défense contre $H_2O_2$ .....	28
I.2.2.3. Systèmes de défense contre le radical hydroxyle $HO^{\bullet}$ .....	32
I.3. Conséquences du stress oxydant .....	34
I.4. Rôle des ERO dans la signalisation cellulaire .....	35
I.5. Conclusion .....	36
<b>II. La Superoxyde Réductase : SOR</b> .....	37
II.1. Caractéristiques structurales de la SOR .....	37
II.1.1. Classe I .....	39
II.1.2. Classe II .....	41
II.1.3. Classe III .....	42
II.2. Mécanisme réactionnel de la SOR .....	44
II.2.1. Description du mécanisme réactionnel de la SOR .....	44
II.2.2. Nature du premier intermédiaire .....	45
II.2.3. Rôle de la lysine 48 dans la libération d' $H_2O_2$ .....	48
II.2.4. Les complexes mimétiques .....	50
II.2.5. Comparaison de la SOR avec le Cytochrome P450 .....	52
<b>III. Rôle des liaisons hydrogène dans le site actif des protéines Fe-S</b> .....	55

---

<b>IV. Objectif de la thèse : Etude du rôle du ligand axial cystéine dans la réactivité de la SOR avec le superoxyde.....</b>	<b>58</b>
<i>Matériels &amp; Méthodes.....</i>	<i>59</i>
<b>I. Matériels Biologiques.....</b>	<b>61</b>
I.1. Souches bactériennes.....	61
I.2. Vecteur de surexpression .....	61
I.3. Milieu de culture .....	62
<b>II. Méthodes de biologie moléculaire.....</b>	<b>62</b>
II.1. Préparation d'ADN plasmidique.....	62
II.2. Digestion de l'ADN .....	63
II.3. Electrophorèse d'ADN sur gel d'agarose.....	63
II.4. Transformation dans l'ADN d' <i>E. coli</i> .....	63
II.4.1. Préparation des cellules compétentes.....	63
II.4.2. Transformation des cellules compétentes .....	64
II.5. Mutagénèse dirigée par PCR.....	64
<b>III. Culture cellulaire.....</b>	<b>66</b>
III.1. Surexpression des SOR sauvages et mutantes de <i>Desulfoarculus baarsii</i> .....	66
III.2. Complémentation de l'activité SOD .....	67
<b>IV. Méthodes de biochimie.....</b>	<b>67</b>
IV.1. Préparation des extraits solubles .....	67
IV.2. Purification des protéines .....	68
IV.2.1. Ancien protocole de purification.....	68
IV.2.2. Nouveau protocole de purification.....	69
IV.3. Détermination de l'état oligomérique de la protéine.....	70
IV.4. Analyse biochimique.....	71
IV.4.1. Electrophorèse de protéine : SDS-PAGE.....	71
IV.4.2. Dosages .....	73
IV.5. Etudes en fonction du pH .....	74
IV.5.1. Stabilité des SORs en fonction du pH.....	74
IV.5.2. Détermination du pKa des mutants .....	74
IV.6. Titration Redox .....	74
IV.7. Test d'activité.....	75
IV.8. Test turn over NADPH / Hypoxanthine / XO .....	76

---

<b>V. Méthodes spectroscopiques</b> .....	77
V.1. Spectroscopie UV-Visible.....	77
V.2. Spectroscopie Infrarouge à transformée de Fourier (FTIR).....	79
V.3. Spectroscopie de résonance paramagnétique électronique : RPE.....	80
V.4. Spectrométrie de masse .....	81
V.5. Spectroscopie RAMAN de résonance .....	82
 Résultats & Discussions.....	 87
<b>INTRODUCTION</b> .....	89
<b>PARTIE 1 : Caractérisation des SORs mutantes I118A, I118D, I118S et I118V</b> .....	93
I. Obtention des protéines mutantes .....	95
II. Spectrométrie de masse .....	97
III. Spectroscopie UV-visible.....	98
IV. RPE .....	100
V. Stabilité des mutants en fonction du pH et détermination des pKa de la transition alcaline .....	102
V.1. Stabilité en fonction du pH.....	102
V.2. Détermination du pKa de la transition alcaline .....	104
VI. Détermination des potentiels redox des mutants.....	107
VII. Conclusion.....	113
<b>PARTIE 2 : Caractérisation spécifique de la SOR</b> .....	117
I. Résonance Raman : Effets des mutations sur la force de la liaison S-Fe.....	119
II. Spectroscopie IRTF (infrarouge à transformée de Fourier) .....	123
III. Conclusion.....	129
<b>PARTIE 3 : Radiolyse pulsée</b> .....	131
I. Principe de la radiolyse pulsée .....	133
II. Rappel de l'étude du mécanisme réactionnel de la SOR wt .....	134
III. Effet des mutants sur $k_1$ .....	136
III.1. Reconstitution du spectre du $T_1$ .....	138
IV. Effet des mutants sur le $k_2$ .....	139
IV.1. Reconstitution du spectre du $T_2$ .....	142
V. Effet des mutants sur le $k_3$ .....	146
V.1. Spectre du produit final .....	149
VI. Conclusion .....	151

<b>PARTIE 4 : Propriétés des espèces Fe-OOH des mutants I118</b> .....	155
I. Etude par résonance Raman des espèces Fe-OOH.....	157
II. Etudes par spectrométrie de masse des espèces Fe-OOH.....	161
<b>PARTIE 5 : Effet des mutations sur l'activité catalytique de la SOR</b> .....	165
I. Test de cycles catalytiques multiples (multiples turn overs) sur les mutants I118 .....	167
II. Test in vivo : complémentation de l'activité SOD.....	170
 <i>Conclusion Générale</i> .....	 173
 <i>Annexes</i> .....	 179
<b>Annexe 1 : Mathé et al. Article JBC 2007</b> .....	181
 <i>Bibliographie</i> .....	 193

*Abréviations*

*§*

*Notations*



<b>Abs</b>	Absorbance
<b>AcA</b>	Acrylamide Agarose
<b>ADN</b>	Acide Desoxyribo Nucléotide
<b>ARNm</b>	Acide Ribo Nucléotide messenger
<b>ATP</b>	Adenosine tri phosphate
<b>BET</b>	Bromure d'Ethydium
<b>c</b>	Célérité
<b>CAT</b>	Catalase
<b>Cytc</b>	Cytochrome c oxydase
<b>Da</b>	Dalton
<b>DAD</b>	2,3,4,5-tétraméthyl-p-phenylenediamine
<b>DMF</b>	Diméthylformamide
<b>dMPD</b>	N, N-diméthyl-p-phenylenediamine
<b>DMSO</b>	Diméthylsulfoxyde
<b>dNTP</b>	Desoxyribonucléotides
<b>E°</b>	Potentiel redox standard
<b>ENH</b>	Electrode Normale à Hydrogène
<b>ERO</b>	Espèce Réactive de l'Oxygène
<b>ESI</b>	Ionisation par Electrospray
<b>eV</b>	Electronvolt
<b>FA</b>	Acide Formique
<b>FAD</b>	Flavine adénine dinucléotide
<b>Fpr</b>	Flavodoxine Réductase
<b>IRTF</b>	Infra Rouge à Transformée de Fourier
<b>GPx</b>	Glutathion Péroxydase
<b>GSH</b>	Glutathion
<b>Gy</b>	Grey
<b>HPLC</b>	High Pressure Liquid Chromatography
<b>IPTG</b>	Isopropyl $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside
<b>IRP</b>	Iron Responsive Protein
<b>k</b>	Constante de vitesse
<b>LB</b>	Luria Bertani
<b>LMCT</b>	Bande de transfert de charge du Ligand vers le Métal
<b>MALDI</b>	Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation

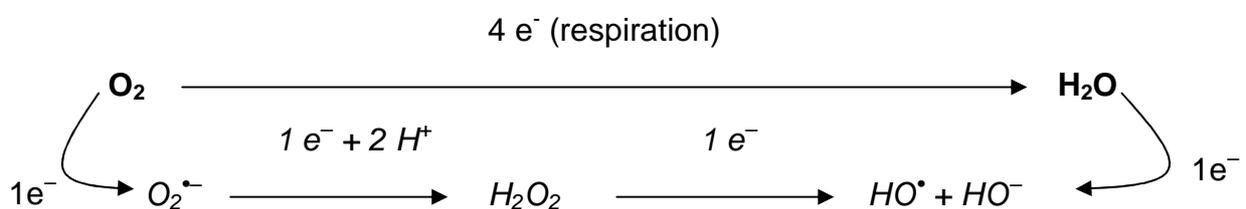
<b>MLCT</b>	Bande de transfert de charge du Métal vers le Ligand
<b>NAD</b>	Nicotidamine Adénine Dinucléotide, forme oxydée
<b>NADH</b>	Nicotidamine Adénine Dinucléotide, forme réduite
<b>NADPH</b>	Nicotidamine Adénine Dinucléotide Phosphate, forme réduite
<b>NOS</b>	NO Synthase
<b>PATS-3</b>	Pyridine-3-carboaldehyde thiosemicarbazone
<b>pBQ</b>	1,4-Benzoquinone
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction (Réaction de Polymérisation en Chaîne)
<b>PES</b>	Phénazine ethosulfate
<b>RMN</b>	Résonance Magnétique Nucléaire
<b>RPE</b>	Résonance Paramagnétique Electronique
<b>rpm</b>	Tours par minute
<b>RR</b>	Résonance Raman
<b>RX</b>	Rayon X
<b>SOD</b>	Superoxyde Dismutase
<b>SOR</b>	Superoxyde Réductase
<b>TFA</b>	Acide trifluoroacétique
<b>TMPD</b>	N,N,N',N''-tétraméthyl-p-phénylènediamine
<b>TOF</b>	Time Of Flight (Temps de vol)
<b>UV</b>	Ultra-Violet
<b>XO</b>	Xanthine Oxydase

# *Introduction*



## I. Oxygène, respiration et stress oxydant

L'oxygène est indispensable à la vie aérobie. Cependant, lorsque la vie est apparue sur terre il y a 3,5 milliards d'années, l'atmosphère ne contenait pas d'oxygène gazeux ( $O_2$ ). C'est grâce à l'activité des organismes photosynthétiques, il y a deux milliards d'années, que l'oxygène a pu s'accumuler dans l'atmosphère. En effet, ces organismes (plantes, algues ou cyanobactéries) utilisent l'énergie lumineuse pour former de l'oxygène à partir de molécules d'eau et de source de carbone inorganique ( $CO_2$ ). Cette accumulation d' $O_2$  dans l'atmosphère est à l'origine de la première crise écologique majeure avec la disparition de 80 % des espèces vivantes. L'oxygène est apparu alors comme une molécule toxique. Cependant, certains organismes ont persisté en développant des mécanismes de consommation d'oxygène à partir des systèmes enzymatiques existant, comme par exemple les NO-réductases qui ont évolué en cytochrome oxydases (*De Vries and Schroder 2002*). Ces nouvelles enzymes se sont avérées être un avantage sélectif de premier ordre. Les organismes les contenant pouvaient non seulement détoxifier l'environnement de l'oxygène mais également utiliser  $O_2$  comme accepteur terminal d'électrons dans des processus de respiration conduisant à la synthèse d'ATP. De plus, le couple  $O_2/H_2O$  ayant un potentiel redox ( $E^\circ = + 1,21 \text{ V/ENH}$ ) beaucoup plus élevé que le potentiel redox des accepteurs terminaux d'électrons retrouvés dans les chaînes de respiration anaérobie ( $E^\circ = + 0,43 \text{ V/ENH}$  pour le nitrate/nitrite ou  $E^\circ = + 0,03 \text{ V/ENH}$  pour le fumarate/succinate), la respiration aérobie est donc plus favorable énergétiquement que la respiration anaérobie (*Prescott et al. 2003*). Malgré ces adaptations métaboliques essentielles, l'oxygène reste toxique pour les organismes aérobies. Il peut subir plusieurs réductions monoélectroniques successives aboutissant à la formation d'espèces partiellement réduites de l'oxygène appelées Espèces Réactives de l'Oxygène (ERO ou ROS pour Reactive Oxygen Species) (Figure 1).



**Figure 1 :** Réductions partielles de l' $O_2$ , conduisant à la formation du radical superoxyde ( $O_2^{\bullet -}$ ), du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), du radical hydroxyle ( $HO^\bullet$ ) et de l'anion hydroxyle ( $HO^-$ ).

Ces ERO sont beaucoup plus toxiques que ne l'est l'oxygène lui-même et sont à l'origine du processus de stress oxydant (*Imlay 2008*). Les ERO peuvent être des espèces

radicalaires, telles que le radical superoxyde  $O_2^{\bullet-}$  ou le radical hydroxyle  $HO^{\bullet}$  ou non radicalaires telles que le peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$ . Chacune de ces espèces possède une réactivité différente (Winterbourn 2008). Le radical superoxyde ( $O_2^{\bullet-}$ ) est le principal précurseur des autres ERO (Imlay 2008). De plus, en réagissant avec le monoxyde d'azote (NO), il forme l'anion peroxynitrique ( $ONOO^-$ ) qui est un puissant agent nitrant et oxydant. En se dismutant, il forme le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) qui, par la réaction de Fenton, est à l'origine de la formation de l'espèce la plus toxique pour la cellule, le radical hydroxyle ( $HO^{\bullet}$ ).  $HO^{\bullet}$  est un agent oxydant très puissant vis-à-vis de toutes les macromolécules présentes dans la cellule. L'oxygène peut également se transformer en oxygène singulet au cours de réactions photochimiques. Il induit des dommages cellulaires similaires à ceux que produit  $HO^{\bullet}$ .

## I.1. Production, Propriétés et Cibles des ERO

Un schéma récapitulatif de la production, de la réactivité et des cibles des ERO dans les cellules eucaryotes et procaryotes est représenté à la fin de cette partie (Figure 4).

### I.1.1. Le superoxyde $O_2^{\bullet-}$

#### Production de $O_2^{\bullet-}$

L'oxygène est utilisé comme accepteur final d'électrons pour la respiration, au niveau de la membrane interne pour les procaryotes et de la mitochondrie pour les eucaryotes (Figure 2).

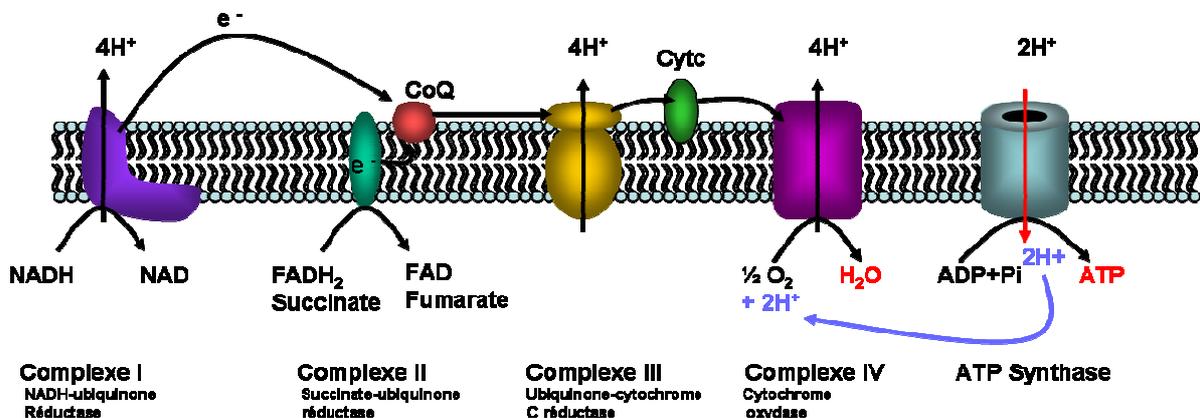


Figure 2 : Chaîne respiratoire mitochondriale.

Dans les deux cas, eucaryote et procaryote, le bilan de la respiration cellulaire correspond à la réduction à quatre électrons de l'oxygène conduisant à la formation d'une molécule d'eau et d'une molécule d'ATP (*Metzler 2001*). Cependant, certaines molécules de dioxygène peuvent être réduites à un seul électron, principalement au niveau de la NADH ubiquinone réductase de la chaîne mitochondriale (complexe I). Ceci aboutit à la formation du radical superoxyde ( $O_2^{\bullet-}$ ) qui, par la suite, peut se dismuter spontanément en peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) et être à l'origine de la formation du radical hydroxyle ( $HO^{\bullet}$ ) (*Imlay 2003; Gutteridge and Halliwell 2000*).

Cette fuite d'électrons correspond à environ 0,2 % du dioxygène utilisé pour la respiration et représente 75 % du  $O_2^{\bullet-}$  produit dans la cellule (*Imlay 2008; Cadenas and Davies 2000*). Ainsi la respiration pour les cellules eucaryotes et procaryotes est la source principale de formation de  $O_2^{\bullet-}$ . Cependant,  $O_2^{\bullet-}$  peut également être produit au niveau cytosolique notamment par la xanthine oxydase et par autooxydation des flavines réductases, des glutathion réductases et de certains xénobiotiques (*Imlay 2008; Massey 2000*). Chez les eucaryotes, la source la plus importante de  $O_2^{\bullet-}$  après la respiration mitochondriale est la NADPH oxydase localisée dans les cellules phagocytaires (*DeCoursey and Ligeti 2005*). Ces cellules constituent un maillon important de l'immunité innée. En effet, la présence de microorganismes pathogènes dans les organismes eucaryotes active la NADPH oxydase dans la membrane du phagosome qui produit alors un flux important de  $O_2^{\bullet-}$ . Celui-ci se dismute pour former  $H_2O_2$  qui, par l'action de la myéloperoxydase produit de l'acide hypochloreux ( $HOCl$ ) responsable de l'élimination des microorganismes pathogènes dans la cellule (*Hampton et al. 1998*). C'est ce que l'on appelle le « burst oxydatif », qui est un processus vital pour la défense des cellules contre les microorganismes pathogènes (*Winterbourn 2008*).

### Réactivité de $O_2^{\bullet-}$

Bien que  $O_2^{\bullet-}$  soit une espèce radicalaire et qu'il soit d'un point de vue thermodynamique à la fois oxydant et réducteur ( $E(O_2^{\bullet-} / H_2O_2) = + 940 \text{ mV/ENH}$  et  $E(O_2 / O_2^{\bullet-}) = - 160 \text{ mV/ENH}$ ), il reste peu réactif vis-à-vis des molécules biologiques et sa diffusion est très limitée (*Sawyer and Valentine 1981*). Une de ses principales caractéristiques est de se dismuter très rapidement pour former  $H_2O_2$  selon l'équation (1).



## $O_2^{\bullet -}$ et les centres Fe-S

Dans les années 90, il a été cependant mis en évidence qu'il existait des cibles spécifiques du  $O_2^{\bullet -}$  dans les cellules, notamment certaines enzymes à centres [Fe-S]. Il a été montré que  $O_2^{\bullet -}$  inactive spécifiquement les deshydratases en oxydant leur centre [Fe-S] (Figure 3) (Imlay 2006; Flint *et al.* 1993). Cela concerne par exemple les aconitases et les dihydroacides deshydratases impliquées dans la biosynthèse des acides aminés branchés (Boehme *et al.* 1976). Cette oxydation entraîne la destruction partielle du centre [Fe-S] et la libération dans la cellule d'atomes de fer sous forme  $Fe^{2+}$  (Figure 3).

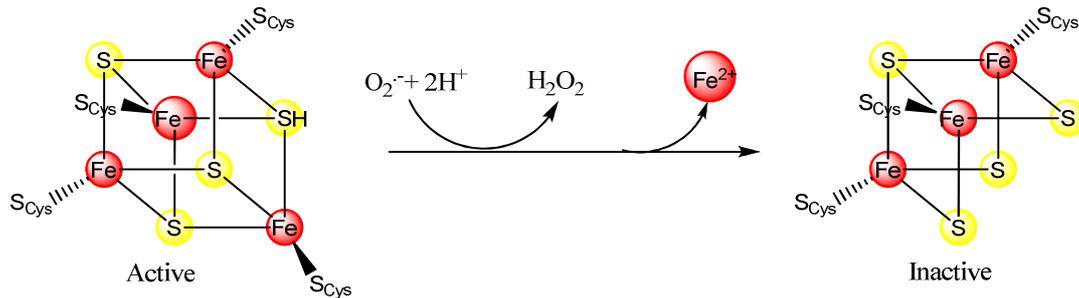


Figure 3 : Oxydation d'un centre [4Fe-4S] de deshydratase par  $O_2^{\bullet -}$ .

Bien que la détérioration du centre [4Fe-4S] entraîne une inactivation de ces enzymes, il a été montré que l'effet toxique de  $O_2^{\bullet -}$  résulte surtout de la libération de fer dans la cellule, sous une forme dite libre. Ces derniers catalysent la réaction de Fenton qui conduit à la formation du radical  $HO^{\bullet}$  très réactif (Imlay 2006 ; Keyer and Imlay 1996). Les deshydratases à centres [Fe-S] sont des enzymes abondantes dans les cellules et leur présence constitue actuellement l'origine majeure de la toxicité de  $O_2^{\bullet -}$  chez les eucaryotes et les procaryotes.

## $O_2^{\bullet -}$ et NO

$O_2^{\bullet -}$  peut également réagir avec le monoxyde d'azote (NO) produit dans les cellules eucaryotes par l'activité des NO synthases (NOS) pour former l'anion peroxy-nitrique ( $ONOO^-$ ). L'anion peroxy-nitrique est un agent oxydant et nitrant très puissant. Il peut réagir avec le dioxyde de carbone pour former du carbonate ( $CO_3^{2-}$ ) et un radical dioxyde nitrique ( $NO_2^{\bullet}$ ) qui oxyde l'ADN et les protéines (Winterbourn 2008).

L'oxydation des protéines par l'anion peroxy-nitrique aboutit à la nitration des résidus aromatiques et soufrés. La nitration des tyrosines peut empêcher la phosphorylation de celles-ci et perturbe certaines voies de transduction du signal (Radi *et al.* 2001). La formation de

ONOO<sup>-</sup> peut avoir pour conséquences des cassures de brin d'ADN par oxydation ou nitration des bases en formant par exemple des 8-oxo ou 8-nitroguanines (*Radi et al. 2001*).

### 1.1.2. Le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

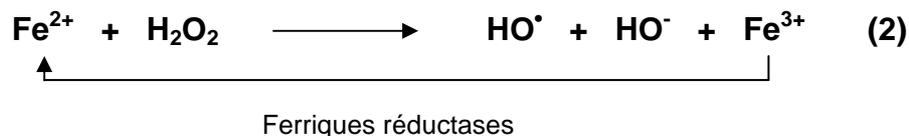
#### Production et réactivité de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est principalement formé par la dismutation de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> (équation 1). Il est aussi produit dans les peroxysomes par des oxydases comme la lactate oxydase ou la glucose oxydase dont l'activité libère de grandes quantités d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (*Imlay 2008*).

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est très oxydant mais reste relativement peu réactif dans la cellule. Il peut traverser librement les membranes biologiques et donc agir assez loin de son lieu de formation (*Imlay 2008*).

#### Toxicité d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

En dehors du fait que H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est un substrat de la myéloperoxydase dans les phagosomes, sa toxicité principale est liée à son implication dans la réaction de Fenton (équation 2). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> peut être réduit par du fer ferreux en HO<sup>•</sup> (*Gutteridge and Halliwell 2000*). Comme cela a été décrit précédemment, ce fer libre peut provenir de la dégradation des centres [Fe-S] des deshydratases par O<sub>2</sub><sup>•-</sup>.



La réaction de Fenton peut être généralement considérée comme catalytique dans la cellule car le fer ferrique Fe<sup>3+</sup> peut être réduit en Fe<sup>2+</sup> grâce à la présence d'enzymes très actives dans la cellule, les ferriques réductases, qui utilisent le NAD(P)H comme donneur d'électrons (*Woodmansee and Imlay 2002*).

### 1.1.3. Le radical hydroxyle (HO<sup>•</sup>)

#### Production de HO<sup>•</sup>

HO<sup>•</sup> est le plus toxique des ERO. Dans la cellule, il se forme uniquement par la réaction de Fenton (équation 2), impliquant principalement le fer ferreux (Fe<sup>2+</sup>) libre mais aussi le cuivre (Cu<sup>+</sup>) disponible dans la cellule (*Gutteridge and Halliwell 2000*).

Notons qu'il est considéré que seules les formes dites libres du fer, par opposition aux formes associées aux métalloprotéines, peuvent catalyser la réaction de Fenton. Bien que la nature exacte de ces formes libres du fer reste encore peu définie, il n'en demeure pas moins qu'elles sont généralement décrites comme les formes du fer les plus dangereuses pour la cellule du fait de leur implication dans la réaction de Fenton (*Pierre and Fontecave 1999*).

#### Réactivité de HO<sup>•</sup>

Le radical HO<sup>•</sup> est extrêmement réactif et a une durée de vie très limitée (inférieure à la microseconde). Il réagit pratiquement au niveau de son lieu de production (*Gutteridge and Halliwell 2000*), selon trois modes d'action (*Winterbourn 2008*):

- en arrachant un électron

- en arrachant un atome d'hydrogène :  $\text{HO}^{\bullet} + \text{RH} \longrightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{R}^{\bullet}$

Dans ce cas une nouvelle espèce radicalaire apparaît et peut être impliquée par exemple dans l'initiation des réactions en chaîne responsables de la peroxydation lipidique.

- en s'additionnant sur les doubles liaisons :  $\text{HO}^{\bullet} + >\text{C}=\text{C}< \longrightarrow >^{\bullet}\text{C}-\text{C}(\text{OH})-$

entraînant par exemple l'hydroxylation de bases puriques et pyrimidiques de l'ADN et de certains acides aminés aromatiques.

#### Cibles de HO<sup>•</sup>

##### ▣ Les protéines

Les principales modifications de HO<sup>•</sup> sur les protéines sont des oxydations d'atomes de carbones. Au niveau de la chaîne principale des acides aminés, ces oxydations conduisent à des fragmentations ou à des pontages covalents interprotéiques. Au niveau des chaînes

latérales, elles entraînent une perte de la fonction catalytique ou structurale de la protéine modifiée (Davies et al. 1987).

### ***▣ Les lipides***

L'oxydation des acides gras membranaires par HO<sup>•</sup>, appelée processus de peroxydation lipidique, est un mécanisme de dégradation en chaîne conduisant à la formation d'hydroperoxyde (ROOH) instable. HO<sup>•</sup> est capable d'arracher un hydrogène sur les alcènes présents sur la chaîne carbonée des lipides. De cette peroxydation lipidique découle une diminution de la fluidité membranaire et donc une altération du fonctionnement des membranes cellulaires, des dépôts de lipides oxydés dans les vaisseaux ou les tissus âgés et de l'apparition de dérivés potentiellement carcinogènes tels que des diènes conjugués, des aldéhydes, ou encore des alcanes (Bruckdorfer 1998).

### ***▣ L'ADN***

Les oxydations de l'ADN par HO<sup>•</sup> se font au niveau des sucres et des bases des nucléotides. Concernant les sucres, l'arrachement d'un hydrogène entraîne une coupure monobrin et la libération de la base correspondante. La structure double brin de l'ADN est alors fortement perturbée. Au niveau des bases, HO<sup>•</sup> peut arracher un atome d'hydrogène ou s'additionner sur les doubles liaisons riches en électrons. Ceci ne crée pas de coupure de brin mais peut fortement perturber les processus de réplication, de transcription et de traduction. Ces événements conduisent à des mutations qui, à terme, peuvent être responsables du vieillissement ou de la mort cellulaire (Henle and Linn 1997; Cadet et al. 1999).

## ***1.1.4. L'oxygène singulet (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>)***

Le dioxygène se caractérise par un état électronique dit triplet (<sup>3</sup>O<sub>2</sub>), avec la présence de deux électrons non appariés ayant le même état de spin. C'est donc un diradical. L'oxygène singulet <sup>1</sup>O<sub>2</sub> correspond au dioxygène dans un état électronique excité où les deux électrons sont appariés (Pryor et al. 2006). <sup>1</sup>O<sub>2</sub> apparaît au cours de réactions photochimiques, soit par l'action de la lumière visible soit par l'action de rayonnements ultraviolets lointains

sur divers pigments biologiques comme les flavines. Ces pigments absorbent des photons, un état excité apparaît alors dans leur structure électronique, puis l'énergie libérée lors du retour à l'état fondamental est transférée à l'oxygène (Pryor *et al.* 2006).  $^1\text{O}_2$  est particulièrement réactif et diffuse très bien à travers les membranes. Il peut accepter un doublet d'électrons pour former des peroxydes. Il a pour cibles biologiques les membranes, l'ADN et les protéines sur lesquelles il induit des dommages similaires à ceux produits par  $\text{HO}^\bullet$  (Pryor *et al.* 2006).

$^1\text{O}_2$  peut également apparaître durant les cycles de peroxydation lipidique. Par exemple, les dommages cellulaires occasionés lors de l'exposition de la peau à la lumière visible, sont en partie dues à la production d' $^1\text{O}_2$  lors de la peroxydation lipidique, amplifiant ainsi les processus d'oxydation (Pryor *et al.* 2006).

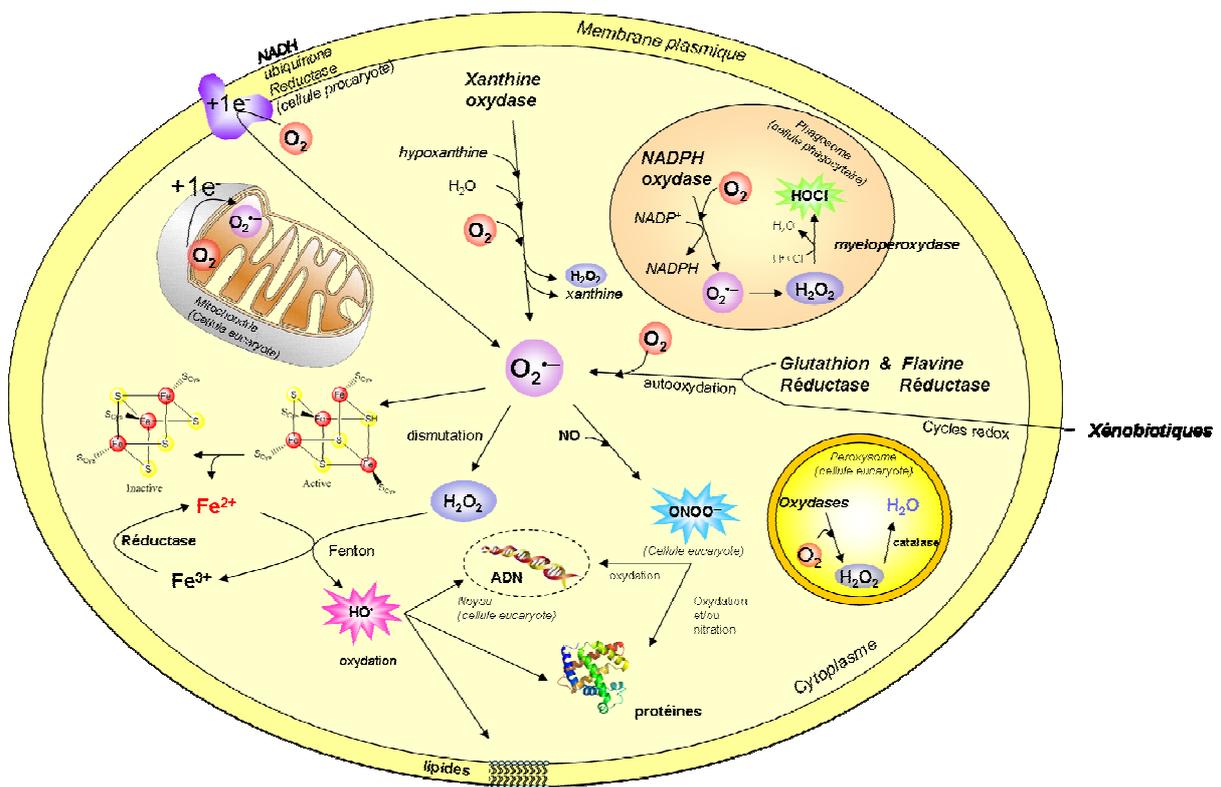


Figure 4 : Production, réactivité et cibles des ERO dans les différents compartiments cellulaires.

## **I.2. Les systèmes de défense**

L'adaptation des cellules à la présence d'oxygène dans l'atmosphère s'est faite par le développement de différents systèmes de détoxification des ERO. Ces systèmes peuvent être soit enzymatiques, soit non enzymatiques fonctionnant ainsi comme des piègeurs stœchiométriques d'ERO.

### **I.2.1. Systèmes moléculaires non enzymatiques**

Chez les mammifères, il existe deux types de molécules antioxydantes dont l'efficacité est directement liée à leurs concentrations dans la cellule ainsi qu'à leurs capacités de régénération (*Winterbourn 2008*) :

**-Les antioxydants d'origines cellulaires** : les thiols, comme par exemple le glutathion, qui réduisent  $H_2O_2$  et  $HO\cdot$ .

**-Les antioxydants d'origines alimentaires** : l'ascorbate (vitamine C) qui réduit  $OH\cdot$ ,  $O_2\cdot^-$  et  $HO_2\cdot$ . Les tocophénols liposolubles, les caroténoïdes et les polyphénols qui réduisent  $OH\cdot$ ,  $RO_2\cdot$  et  $^1O_2$  et inhibent ainsi les réactions en chaîne de la peroxydation lipidique (*Schafer et al. 2002; Pryor et al. 2006*).

Afin de conserver un faible taux global d'ERO dans la cellule, ces molécules doivent être néanmoins assistées par des systèmes de détoxification enzymatiques.

### **I.2.2. Systèmes enzymatiques**

Il existe plusieurs enzymes capables de réduire fortement la concentration de certains ERO dans la cellule. Ces systèmes enzymatiques sont spécifiques pour une espèce donnée. Ils concernent principalement l'élimination du radical superoxyde et des peroxydes.

#### **I.2.2.1. Systèmes de défense contre $O_2\cdot^-$**

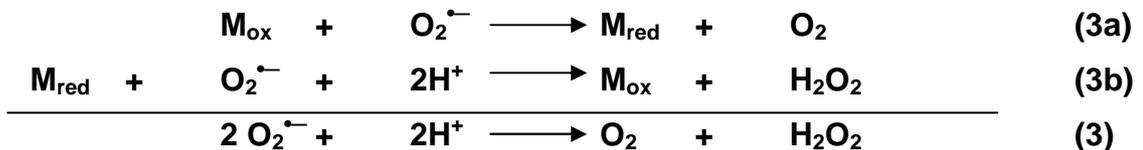
Jusqu'au début des années 2000, le seul système enzymatique connu pour éliminer le superoxyde était la superoxyde dismutase (SOD) (*Fridovich 1986*). Cette enzyme catalyse

très efficacement la réaction de dismutation du superoxyde en  $\text{H}_2\text{O}_2$  et  $\text{O}_2$  avec une constante de vitesse proche de la vitesse de diffusion des molécules en solution (équation 3) (Fridovich 1986). Les SODs sont des métalloprotéines présentes chez tous les organismes aérobies, des bactéries aux organismes supérieurs (Fridovich 1997). Il existe quatre classes de SODs qui diffèrent selon la nature du métal lié au site actif (Afonso et al. 2007) :

- les SODs à fer, présentes uniquement dans les bactéries
- les SODs à manganèse, dans les mitochondries et les bactéries
- les SODs à cuivre/zinc, dans le cytoplasme, les chloroplastes et les peroxysomes des eucaryotes
- les SODs à nickel, uniquement dans les bactéries

Les SODs à fer et manganèse ont une structure similaire mais n'ont pas d'homologie structurale avec les SOD à nickel et à cuivre/zinc, qui sont entre elles également différentes. Dans tous les cas, le métal se trouve à l'intérieur de la protéine et le  $\text{O}_2^{\bullet -}$  parvient au site actif grâce à un canal composé d'acides aminés chargés permettant une attraction électrostatique vers le métal.

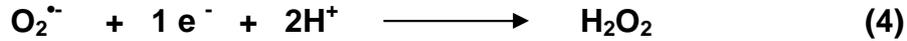
Le mécanisme catalytique des SODs est le même quelque soit la nature du métal. Il se décompose en deux demi-réactions, faisant intervenir  $\text{O}_2^{\bullet -}$  alternativement en tant qu'oxydant (équation 3a) et réducteur (équation 3b) vis-à-vis du métal (M).



La SOD joue un rôle central dans la lutte contre le stress oxydatif (Carlioz and Touati 1986, Imlay 2003). Son absence chez les procaryotes entraîne des défauts de croissance ainsi qu'une augmentation du nombre de mutations spontanées au niveau de l'ADN (Farr et al. 1986). La majeure partie de ces phénotypes résulte de l'inactivation des deshydratases à centre [Fe-S] par le superoxyde (Keyer and Imlay 1996). Les SODs sont donc des enzymes indispensables à la survie des cellules en présence d' $\text{O}_2$  (Carlioz and Touati 1986; Imlay 2003).

Il y a une dizaine d'années, deux équipes ont montré conjointement que certaines bactéries anaérobies et microaérophiles utilisaient un autre système enzymatique permettant l'élimination du superoxyde. Il s'agit de la superoxyde réductase (SOR) (Lombard et al.

2000a; Jenney et al. 1999). La SOR catalyse l'élimination du superoxyde par la réduction monoélectronique de  $O_2^{\cdot-}$  pour produire  $H_2O_2$  sans formation d' $O_2$  moléculaire (équation 4). La description approfondie de cette enzyme est présentée au chapitre II.



### Régulation des systèmes de détoxification de $O_2^{\cdot-}$

La présence d'ERO induit une adaptation métabolique qui implique à la fois des systèmes de détection et de réparation. En ce qui concerne la réponse à l'augmentation de la concentration en  $O_2^{\cdot-}$ , d'une façon générale peu de choses ont été décrites chez les organismes supérieurs. C'est chez la bactérie *Escherichia coli* qu'un système de régulation à un stress  $O_2^{\cdot-}$  a été le plus clairement identifié. Il s'agit du couple de protéines SoxR/SoxS (Figure 5) (Tsaneva and Weiss 1990; Greenberg et al. 1990).

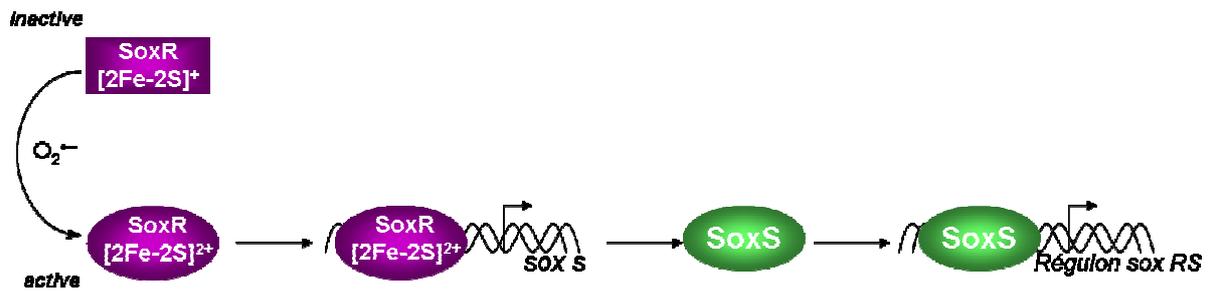


Figure 5 : SoxR/SoxS, mécanisme de la réponse à  $O_2^{\cdot-}$  chez *E. coli*.

Le régulateur transcriptionnel SoxR est une métalloprotéine activée uniquement lorsque son centre  $[2Fe-2S]^+$  est sous sa forme oxydée  $[2Fe-2S]^{2+}$  (Storz and Imlay 1999). Ce régulateur est un senseur redox puisque c'est  $O_2^{\cdot-}$  qui oxyde son centre métallique et active ainsi la transcription du gène codant pour SoxS (Figure 5) (D'Autreaux and Toledano 2007). SoxS induit alors l'expression d'une douzaine de gènes organisés en régulon *soxRS*. Ce régulon inclut le gène *sodA* codant pour la SOD à Mn éliminant le superoxyde, des gènes codant pour des protéines de réparation de l'ADN ainsi que le gène de la protéine Fur qui régule l'incorporation du fer dans la cellule (voir chapitre I.2.2.3) (Storz and Imlay 1999).

### 1.2.2.2. Systèmes de défense contre $H_2O_2$

Les deux principaux types d'enzymes impliqués dans la détoxification de  $H_2O_2$  sont les catalases et les peroxydases (Imlay 2008). Elles prennent ainsi le relais de la superoxyde dismutase qui transforme  $O_2^{\bullet-}$  en  $H_2O_2$  et  $O_2$  (Figure 6).

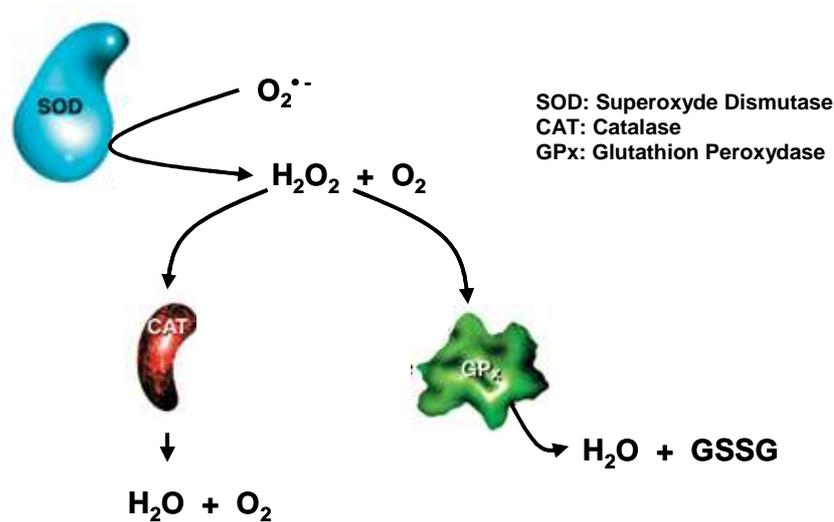


Figure 6 : Systèmes enzymatiques de défense contre  $O_2^{\bullet-}$  et  $H_2O_2$

▣ Les catalases sont des tétramères de 60 à 70 kDa. Chaque sous-unité possède un site actif héminique catalysant la dismutation de  $H_2O_2$  en  $O_2$  et  $H_2O$  (équation 5) (Chelikani et al. 2004).



Chez les eucaryotes, les catalases sont principalement localisées dans les peroxysomes. Chez les procaryotes, elles se situent dans le cytoplasme. Selon la concentration en  $H_2O_2$ , la catalase ne va pas réagir de la même façon (Scandalios 2005) :

- Si la concentration en  $H_2O_2$  est faible (inférieure à  $1 \mu M$ ), elle catalyse une réaction de peroxydation où différents substrats, potentiellement toxiques, peuvent être oxydés.

- Si la concentration en  $H_2O_2$  est élevée, l'enzyme joue alors son rôle de catalase (Scandalios 2005). L'atome de fer du groupement héminique réalise une coupure hétérolytique de la liaison O-O de  $H_2O_2$ , créant ainsi une molécule d'eau et une espèce fer-oxo hautement oxydante. Celle-ci peut ensuite oxyder une autre molécule d' $H_2O_2$  pour former du dioxygène (Figure 7).

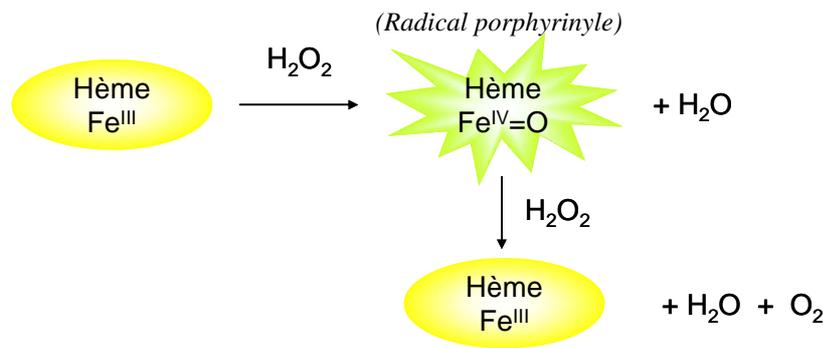
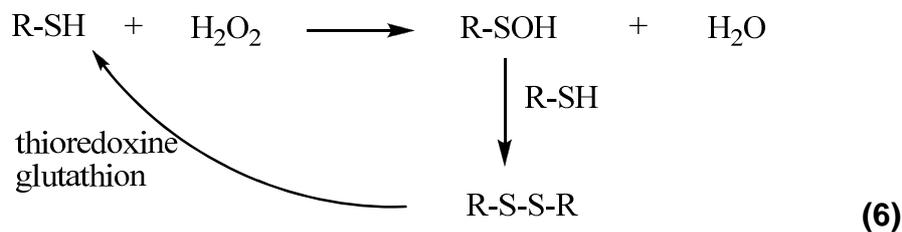


Figure 7 : Mécanisme d'élimination d' $\text{H}_2\text{O}_2$  par la catalase.

▣ **Les peroxydases** sont des petites protéines qui catalysent la réduction à 1 électron des peroxydes ( $\text{R-OOH}$ ) en leur alcool correspondant ( $\text{R-OH}$ ). Elles possèdent en général une cystéine au niveau de leur site actif capable de réaliser une attaque nucléophile sur la fonction peroxydique. Cette réaction conduit à la libération de  $\text{ROH}$  ainsi qu'à la formation transitoire d'un acide sulfénique ( $\text{R-SOH}$ ) (Wood *et al.* 2003). Cet acide sulfénique réagit avec une autre cystéine pour former un pont disulfure (équation 6).



Les peroxydases sont ensuite régénérées par la réduction des ponts disulfure selon deux grandes voies, celle des thiorédoxines et celle du glutathion (Bindoli *et al.* 2008).

Il existe différentes familles de peroxydases :

- les peroxyrédoxines : ces protéines peuvent être homodimériques ou monomériques et conduisent respectivement à la formation d'un pont disulfure intermoléculaire (Wood *et al.* 2002) ou intramoléculaire (Seo *et al.* 2000).
- les glutathion peroxydases : ces sélénoenzymes sont capables de catalyser la réduction des peroxydes. Leur activité catalytique repose sur l'oxydation d'une séléno-cystéine en acide séléinique et à sa réduction par le glutathion (Henle and Linn 1997; Ursini *et al.* 1995).

Enfin, un autre type d'enzyme a été décrit chez certaines bactéries comme capable d'éliminer les peroxydes dans la cellule. Il s'agit de la rubrerythrine qui porte une activité NADPH peroxydase. Son site actif est constitué d'un centre dinucléaire de fer et elle réduit une molécule d' $\text{H}_2\text{O}_2$  en 2 molécules d'eau en présence de NADPH.

### Régulation des systèmes de détoxification des peroxydes

Selon les organismes, il existe différents systèmes de détoxification des peroxydes. Trois exemples parmi les mieux décrits sont présentés dans cette partie : OxyR, PerR et Yap1/Orp1.

#### ▣ Chez la bactérie *E. coli*

Pour cette bactérie, le senseur d' $\text{H}_2\text{O}_2$  est un facteur de transcription appelé OxyR (Zheng *et al.* 1998). Alors que son équivalent pour  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , SoxR, est un système senseur à centre Fe-S, l'activation d'OxyR par  $\text{H}_2\text{O}_2$  est basée sur une chimie d'oxydation de cystéines. Deux cystéines particulières de OxyR, les cystéines 199 et 208, réagissent avec  $\text{H}_2\text{O}_2$  pour former un pont disulfure intramoléculaire. La forme oxydée résultante crée un changement de conformation et permet la fixation d'OxyR sur l'ADN au niveau de la séquence promotrice (Storz *et al.* 1990). OxyR recrute alors l'ARN polymérase pour amorcer la transcription des gènes du régulon OxyR (Figure 8) (Kullik *et al.* 1995). Ce régulon est composé de gènes codant pour l'hydroperoxydase I, pour l'alkyl hydroperoxyde réductase et pour la glutathion réductase qui permettent l'élimination des peroxydes. Il comprend aussi le gène de la protéine Fur qui régule l'incorporation du fer dans la cellule afin de limiter la formation de  $\text{HO}^{\bullet}$ .

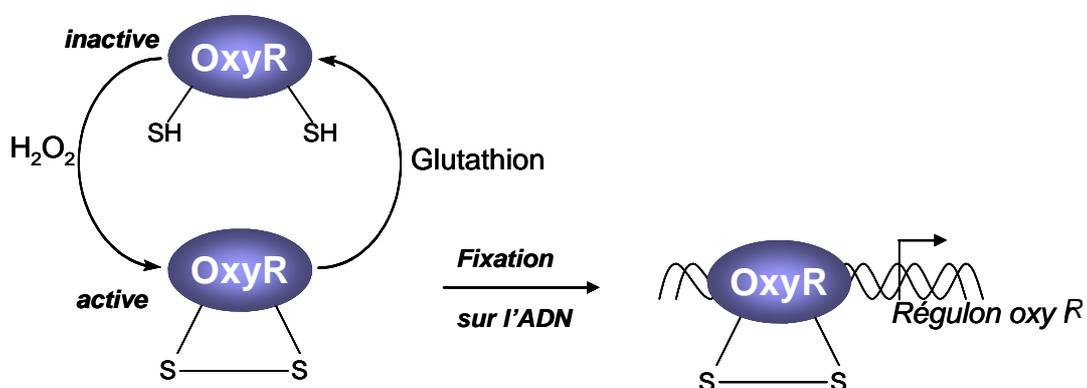


Figure 8 : Fonctionnement du système OxyR en réponse à  $\text{H}_2\text{O}_2$  chez *E. coli*.

### ▣ Chez la bactérie *B. subtilis*

Il existe des systèmes alternatifs à OxyR chez d'autres organismes procaryotes tels que le répresseur PerR. C'est un senseur d' $\text{H}_2\text{O}_2$  présentant des homologues de séquence avec la protéine Fur et qui a été identifié pour la première fois chez *Bacillus subtilis* (Bsat et al. 1998). Il a été retrouvé chez de nombreuses autres bactéries Gram + et Gram – n'ayant pas le système OxyR (Bsat et al. 1996). PerR est une métalloprotéine contenant un atome de zinc ( $\text{Zn}^{2+}$ ) ainsi qu'un atome de fer ( $\text{Fe}^{2+}$ ) ou de manganèse ( $\text{Mn}^{2+}$ ) lié à deux histidines et un aspartate. Le centre catalytique  $\text{Fe}^{2+}$  réagit avec  $\text{H}_2\text{O}_2$  selon une chimie de type Fenton, oxydant une des histidines ligands en 2-oxo-histidine (Latifi et al. 2009). Cela conduit à l'inactivation irréversible du répresseur PerR et à la transcription des gènes codant pour les catalases, peroxydases et enzymes de la biosynthèse des hèmes (Latifi et al. 2009) (Figure 9). C'est un mécanisme très différent de celui d'OxyR ou de SoxRS.

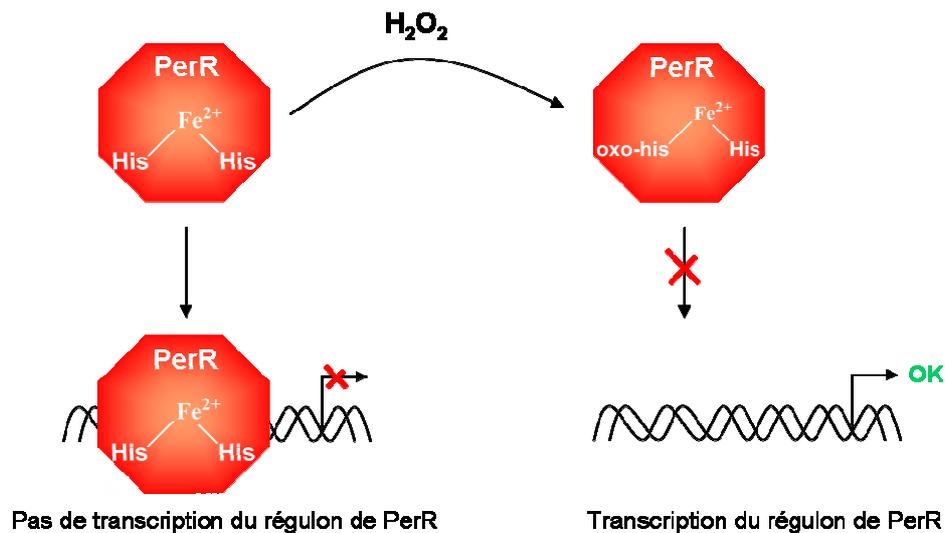


Figure 9 : Mécanisme d'action de PerR en réponse à  $\text{H}_2\text{O}_2$  chez *B. subtilis*.

### ▣ Chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*

Chez la levure, la réponse à  $\text{H}_2\text{O}_2$  se fait grâce à un relais entre deux protéines Yap1 et Orp1 (Moyerowley et al. 1989; Delaunay et al. 2000) (Figure 10). En absence d' $\text{H}_2\text{O}_2$ , Yap1 est continuellement importée dans le noyau par l'importine PSE et exportée dans le cytoplasme par l'exportine Crm1 (Kuge et al. 1997). Le peroxyde d'hydrogène oxyde la

cystéine 36 d'Orp1 en acide sulfénique (Cys<sub>36</sub>-SOH). Cette espèce réagit avec la cystéine 598 de Yap1 pour former un pont disulfure intermoléculaire qui est converti en pont disulfure intramoléculaire entre les cystéines 303 et 598 de Yap1 (Toledano *et al.* 2004). Ce processus conduit à un changement de conformation de Yap1 qui empêche la complexation avec l'exportine Crm1 mais n'empêche pas l'import de Yap1 dans le noyau via Pse (Delaunay *et al.* 2000). La concentration de Yap1 dans le noyau augmente alors et permet l'activation de l'expression des gènes du régulon composé de 70 protéines telles que les SODs et les enzymes de la voie de biosynthèse de la thioredoxine et du glutathion.

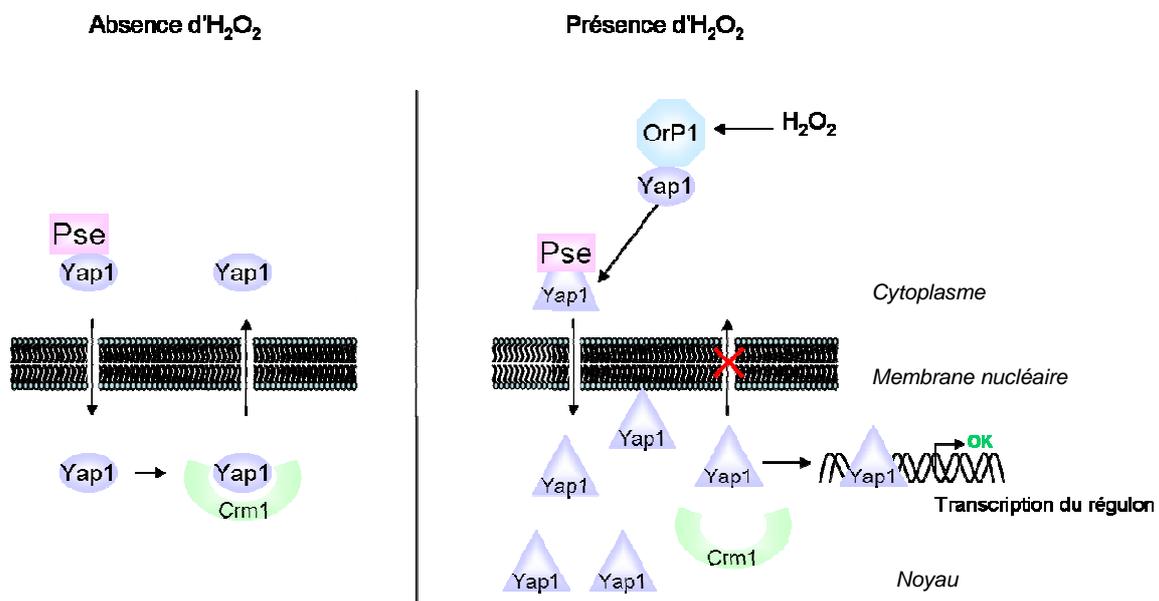


Figure 10 : Mécanisme de Yap1 / Orp1 en réponse à H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> chez *S. cerevisiae*.

### 1.2.2.3. Systèmes de défense contre le radical hydroxyle HO<sup>•</sup>

Il n'existe pas de système enzymatique pouvant éliminer le radical HO<sup>•</sup>. Le principal moyen de protection que la cellule a mis en œuvre est d'éviter au maximum sa formation qui se fait uniquement par la réaction de Fenton. Cela nécessite à la fois de limiter la concentration de fer libre dans la cellule (régulation de l'incorporation du fer, élimination du superoxyde) et d'éliminer le peroxyde d'hydrogène grâce aux catalases et aux peroxydases (Keyer and Imlay 1996).

### Régulation de la production de HO<sup>•</sup>

Deux systèmes de régulation permettant de contrôler finement la quantité de fer incorporée dans la cellule ont été décrits chez les organismes vivants.

Chez les **procaryotes**, la protéine Fur est le régulateur transcriptionnel global de l'homéostasie du fer (Figure 11) (Lee and Helmann 2006). Dans des conditions de croissance normale, les bactéries sécrètent des sidérophores qui vont piéger le fer dans le milieu de culture. Ce fer complexé sous forme ferrique ( $\text{Fe}^{3+}$ ) rentre alors dans la cellule par l'intermédiaire de transporteurs transmembranaires. Après réduction, le fer est libéré puis stocké ou incorporé dans les apoprotéines. En présence d'une grande quantité de fer dans la cellule, Fur est activée par la métallation de deux fer ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ) et inhibe la synthèse des sidérophores et des protéines transmembranaires en se fixant sur les régions promotrices des ADN codant pour ces systèmes (Wandersman and Delepelaire 2004).

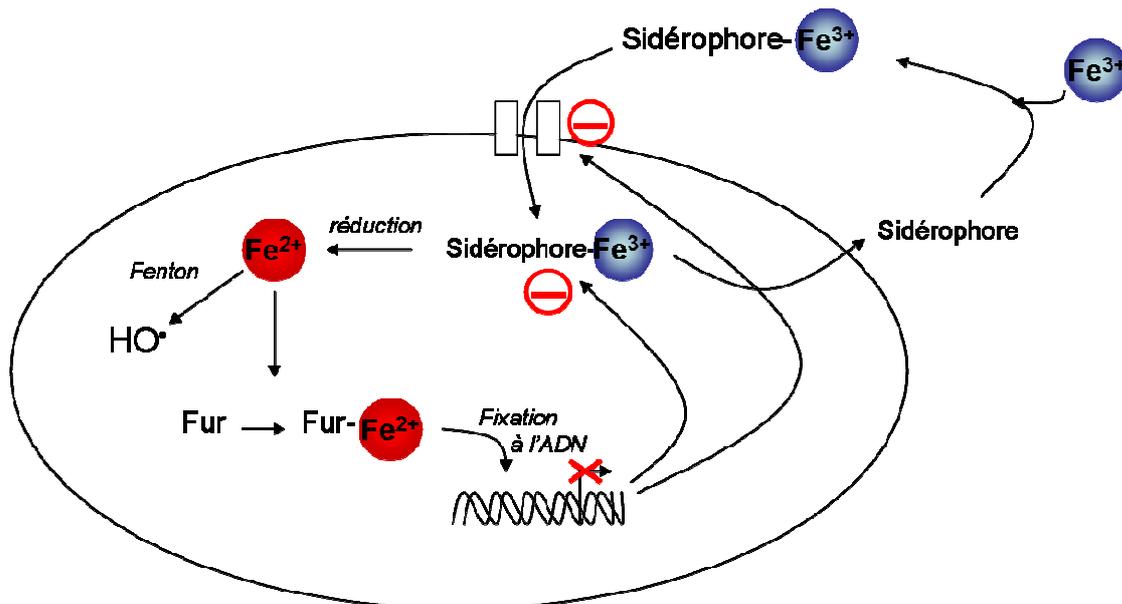


Figure 11 : Système de régulation de l'incorporation du fer dans les cellules procaryotes.

En limitant la concentration des ions  $\text{Fe}^{2+}$  libres, cette régulation diminue ainsi la production de HO<sup>•</sup> par la réaction de Fenton.

Chez les **eucaryotes**, c'est l'aconitase du cytosol qui régule l'incorporation du fer dans la cellule (Figure 12) (Eisenstein and Ross 2002).

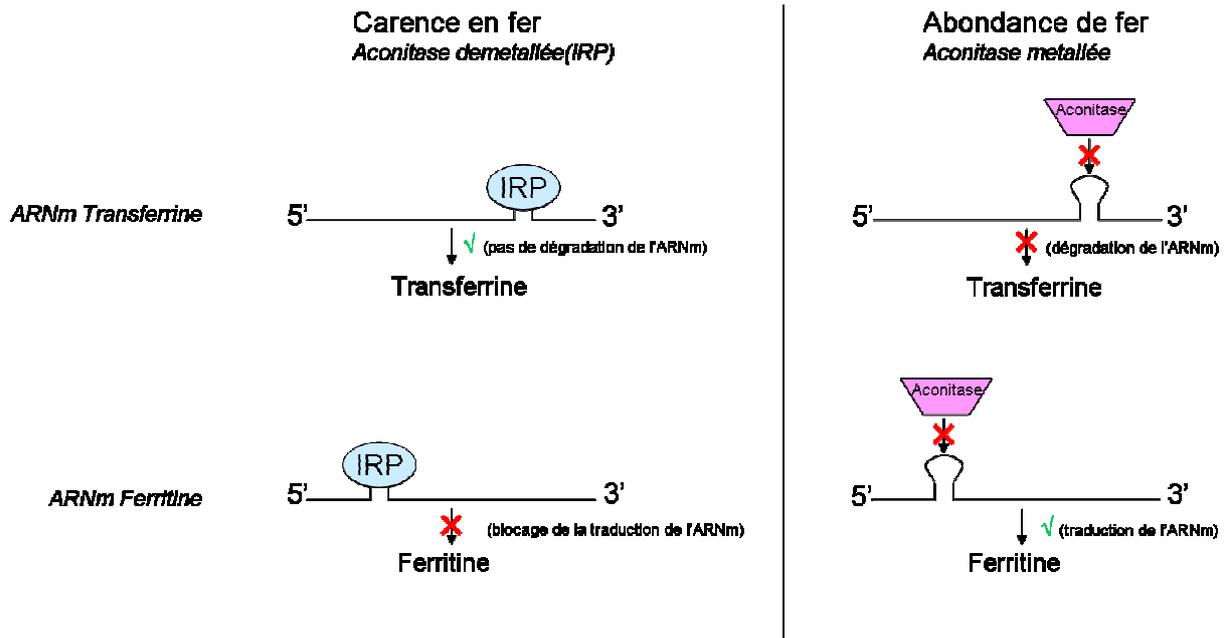


Figure 12 : Système de régulation du fer dans la cellule eucaryote: système IRP/Aconitase

Cette enzyme existe sous deux formes : aconitase et IRP (Iron Responsive Element). Lorsque la cellule est en carence de fer, la forme démétaillée de l'aconitase (IRP) se fixe sur la partie 3' de l'ARNm codant pour la transferrine (protéine de transport du fer dans la cellule) et empêche sa dégradation. Le transport du fer dans la cellule est alors possible. IRP se fixe aussi sur la partie 5' de l'ARNm de la ferritine (protéine de stockage du fer) et bloque sa traduction. Le stockage du fer est alors inhibé. Lorsque le fer est en abondance dans la cellule, c'est la forme aconitase métaillée qui est présente dans la cellule et ne se fixe pas sur l'ARNm. L'ARNm codant pour la transferrine est dégradé alors que la traduction de la ferritine devient possible. Le transport du fer est inhibé et le fer présent dans la cellule est stocké dans la ferritine (*Eisenstein and Ross 2002*).

Ces deux systèmes permettent de réduire au maximum l'apparition de fer libre dans la cellule et ainsi la production de HO<sup>•</sup> engendrée par la réaction de Fenton.

### I.3. Conséquences du stress oxydant

Dans des conditions normales de vie cellulaire, on observe un équilibre entre les processus de production et d'élimination des ERO. Lorsque cette balance est en déséquilibre, les ERO se forment en excès dans la cellule. C'est ce qui caractérise le stress oxydant.

Ces excès d'ERO contribuent au développement de maladies par dérégulation de signaux de transduction et/ou par des dommages oxydatifs sur les macromolécules cellulaires. L'importance du stress oxydant dans de nombreuses pathologies est maintenant largement démontrée (*Salvemini et al. 2002*). Ainsi le stress oxydant est impliqué dans le développement de maladies cardiovasculaires de type artériosclérose (*Calderón et al. 2008*), de maladies rhumatologiques (*Mirshafiey and Mohsenzadegan 2008*), de certains cancers (*Loft and Poulsen 1996; Valko et al. 2006*) ou encore dans l'hépatopathie alcoolique. Dans ce cas, il semblerait que l'éthanol entraînerait au niveau du foie une augmentation du stress oxydant et donc de la concentration des ERO responsables de dommages cellulaires irréversibles (*De Minicis and Brenner 2008*).

Le stress oxydant est aussi impliqué dans certaines maladies neurodégénératives comme les maladie d'Alzheimer (*Zana et al. 2007*) et de Parkinson (*Youdim and Riederer 1997; Zhou et al. 2008*), le syndrome de Down (trisomie 21) (*Martin et al. 1996; Zana et al. 2007*) ou la Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA) provoquée par diverses mutations ponctuelles de la Cu-ZnSOD (*Hayashi 2009*). La maladie de Creutzfeld-Jakob (maladie neurodégénérative non héréditaire) est liée à la chélation du cuivre par le prion qui induirait une perte d'activité des Cu-ZnSODs et des GSH-réductases (*Onodera et al. 2006*).

#### **I.4. Rôle des ERO dans la signalisation cellulaire**

Les ERO n'ont pas uniquement des propriétés toxiques dans la cellule. Il est reconnu aujourd'hui que les ERO, en particulier H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, jouent un rôle essentiel dans l'activation de différents mécanismes cellulaires en modifiant le potentiel redox de la cellule (*Finkel 2000; Scandalios 2005*). O<sub>2</sub><sup>•-</sup> et H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se comportent alors comme de petites molécules de signalisation intracellulaire. De nombreuses interactions protéine-protéine et ADN-protéine sont régulées par l'état redox de leurs cystéines. Ces fonctions thiols peuvent être oxydées par les ERO entraînant ainsi l'activation de facteurs de transcription. C'est le cas par exemple de NF-κB et AP1 qui sont impliqués dans les phénomènes de prolifération cellulaire et de différenciation (*Bolwell and Wojtaszek 1997*).

## **I.5. Conclusion**

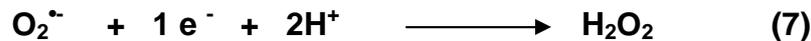
Bien que les ERO soient utilisées de façon positive dans les processus de signalisation cellulaire, elles n'en restent pas moins toxiques. Ainsi, l'une des voies de recherche importante en médecine est l'élimination de ces ERO qui, comme il a été vu précédemment, sont à l'origine de diverses maladies. De nombreuses molécules antioxydantes ont été synthétisées sur la base des systèmes antioxydants naturels et sont utilisées comme compléments alimentaires. Cependant, ces molécules ne présentent pas une efficacité avérée pour traiter des maladies graves telles que la maladie de Parkinson, les cancers ou les maladies cardiovasculaire (*Kang et al. 2009*). Cette inefficacité est principalement due au fait que l'activité de ces molécules n'est pas catalytique, celles-ci doivent donc être administrées en dose importante pouvant générer des effets secondaires (*Bendich and Langseth 1989*). C'est pourquoi la synthèse de molécules antioxydantes catalytiques, prenant pour modèle les enzymes de détoxification d'ERO présentes dans les cellules vivantes, représente un enjeu important dans le traitement des maladies liées au stress oxydant. C'est une des raisons pour laquelle de nombreuses équipes étudient ces enzymes de détoxification des EROs.

## II. La Superoxyde Réductase : SOR

### II.1. Caractéristiques structurales de la SOR

Les cellules vivantes possèdent toutes des systèmes de défense contre  $O_2^{\bullet-}$ . C'est aussi le cas des organismes anaérobies stricts qui peuvent être accidentellement et transitoirement exposés à l'oxygène (*Dolla et al. 2006*). Ces organismes possèdent des SODs ainsi que d'autres systèmes antioxydants.

Il y a quelques années, il a été découvert que certaines bactéries et archéobactéries anaérobies ou microaérophiles n'utilisaient pas la SOD mais un nouveau type de protéine capable d'éliminer le superoxyde (*Pianzola et al. 1996*). Ce nouveau système a été appelé superoxyde réductase (SOR), car elle réduit spécifiquement le  $O_2^{\bullet-}$  en  $H_2O_2$  sans formation d' $O_2$  moléculaire, contrairement à la superoxyde dismutase (équation 7) (*Lombard et al. 2000a; Jenney et al. 1999*).



La délétion du gène de la SOR dans ces bactéries entraîne une très forte sensibilité à l'oxygène (*Fournier et al. 2003*). Ceci démontre l'importance de la SOR pour la survie de ces bactéries anaérobies lors d'expositions transitoires à l'air (*Imlay 2002*).

D'autre part, il a été montré que la SOR a la capacité de remplacer totalement l'activité SOD chez *E. coli* (*Pianzola et al. 1996*). Ceci illustre le fait que la SOR est tout aussi efficace pour la lutte contre le stress oxydant que la SOD (*Emerson et al. 2003c*).

#### ***Le site actif des SORs :***

Il existe trois différentes classes structurales de SOR. Cependant, malgré quelques différences structurales elles ont toutes le même site actif (Figure 13) (*Yeh et al. 2000 ; Adam et al. 2004 ; Coelho et al. 1997 ; Chen et al. 1994; Silva et al. 1999; Zhang et al. 2002; Santos-Silva et al. 2006*).

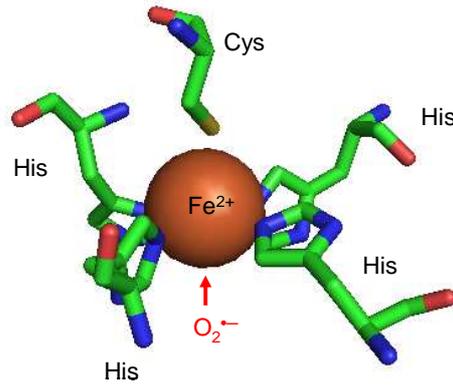
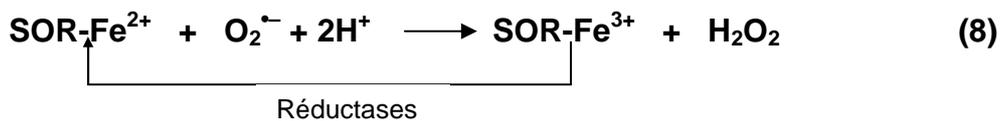


Figure 13 : Site actif de la SOR

Contrairement aux SODs, le site actif des SORs est exposé à la surface. Ce site actif est constitué d'un centre mononucléaire de fer ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ) haut spin, lié à quatre atomes d'azote provenant d'histidines en position équatoriale et à un atome de soufre provenant d'une cystéine en position axiale (Figure 13). La position axiale de cette cystéine est tout à fait atypique. Ce type de structure de site à fer avec une géométrie pyramidale à base carrée n'a jamais été décrit auparavant. Le fer du site actif de la SOR reste à l'état ferreux en présence d' $\text{O}_2$ . La sixième position de coordination du fer ferreux  $\text{Fe}^{2+}$  est libre, ce qui suggère que c'est à cet endroit que vient se fixer le superoxyde pour être réduit en  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Yeh *et al.* 2000) (équation 8).



La réaction est catalytique du fait de la réduction du  $\text{Fe}^{3+}$  en  $\text{Fe}^{2+}$  par des réductases présentes dans la cellule (Emerson *et al.* 2003c). Cette réduction est d'autant plus facile que le site actif est exposé à la surface.

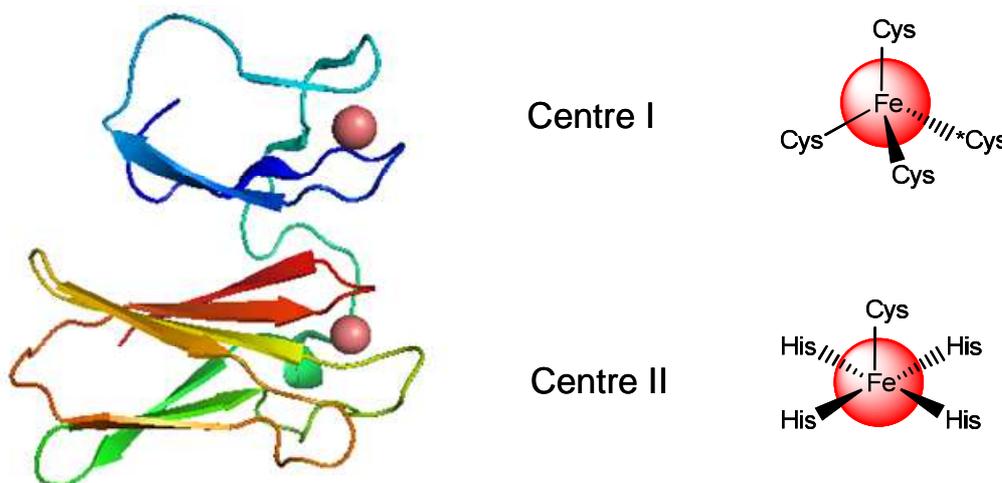
Trois classes structurales de SOR ont été décrites se différenciant principalement par la structure du domaine N-terminal.

### II.1.1. Classe I

Ce sont des métalloprotéines contenant deux centres mononucléaires de fer. On retrouve ces enzymes chez les bactéries sulfato-réductrices telles que *Desulfoarculus baarsii* (Adam et al. 2004; Lombard et al. 2000a), *Desulfovibrio desulfuricans* (Moura et al. 1990; Coelho et al. 1997), *Desulfovibrio vulgaris Hildenborough* (Coulter et al. 2000) ou les archaea telles que *Archaeoglobus fulgidus* et *Methanobacterium thermoautotrophicum* (Chae 2002). Différentes structures de ces SORs ont été résolues et ont montré qu'il s'agit d'enzymes dimériques de 14000 Da par monomère (Adam et al. 2004); (Coelho et al. 1997). Un atome de calcium situé entre les deux monomères semble jouer un rôle dans la dimérisation (Coelho et al. 1997). Chaque monomère est composé d'un domaine C-terminal et un domaine N-terminal. Des études spectroscopiques ont montré la présence de deux centres à Fer à haut spin chacun compris dans un domaine (Figure 14) (Moura et al. 1990) :

- **Le centre I**, situé dans le domaine N-terminal, correspond à un fer chélaté par quatre cystéines et présente une structure analogue à la désulfoferedoxine :  $\text{Fe}(\text{SCys})_4$ . Ce centre ne semble pas être impliqué dans la réactivité avec  $\text{O}_2^{\cdot -}$  car l'absence de ce centre I ne modifie pas la réactivité enzymatique (Emerson et al. 2003b). Certaines suppositions laissent penser que le centre I jouerait un rôle dans le transfert d'électrons vers le site actif de la SOR (Kurtz 2006). Cependant, la distance de 22 Å entre les deux centres laisse supposer qu'un transfert d'électron intraprotéique entre le centre I et le centre II soit peu probable.

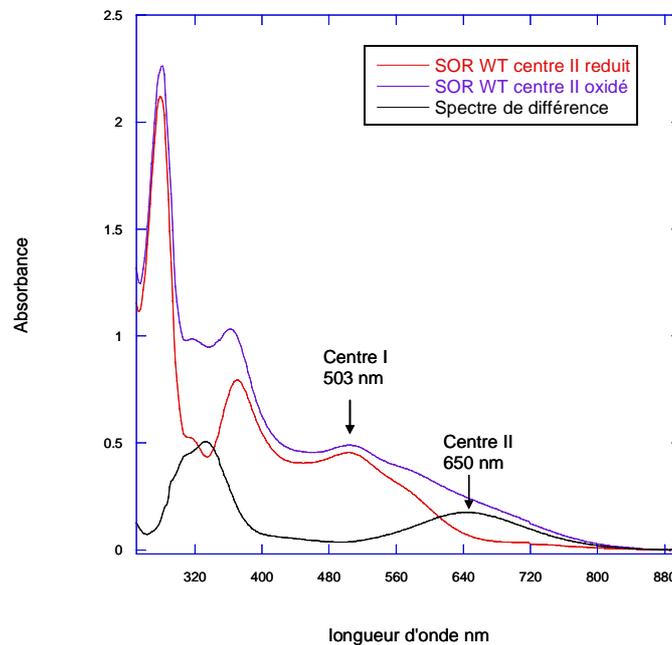
- **Le centre II**, situé dans le domaine C-terminal, constitue le site actif de la SOR.



**Figure 14 :** Structure cristallographique (à gauche) d'un monomère de la SOR de *Desulfoarculus baarsii* (Adam et al. 2004) et coordinations de l'atome de fer (à droite) dans chacun des deux sites.

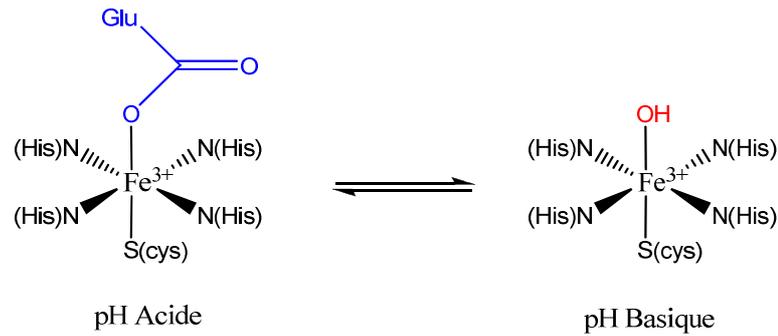
Des études biochimiques ont montré qu'en présence d'O<sub>2</sub> atmosphérique, la superoxyde réductase se présente sous sa forme semi-réduite. Son centre I est sous forme oxydée (bande d'absorption dans l'UV-visible à 503 nm) alors que le centre II est sous sa forme réduite (pas de bande d'absorption dans l'UV-visible). La protéine est de couleur rose (Figure 15-spectre rouge).

Lorsque l'on ajoute un fort oxydant tel que l'iridium IV, la protéine devient totalement oxydée et est alors de couleur grise (Figure 15-spectre bleu). Le spectre de différence entre la forme totalement oxydée et la forme semi-réduite laisse apparaître une bande autour de 650 nm, attribuée à un transfert de charge  $S \rightarrow Fe^{3+}$  du centre II (Figure 15-spectre noir) (Clay *et al.* 2002a).



**Figure 15 :** Spectre UV-visible de la SOR de classe I (*D. baarsii*) sous forme semi-réduite (spectre rouge) et sous sa forme totalement oxydée (spectre bleu). Le spectre de différence (spectre noir) fait apparaître la bande de transfert de charge  $S \rightarrow Fe^{3+}$  attribuée au centre II.

Le maximum d'absorbance de la bande caractéristique du centre II est déplacé en fonction du pH : il passe de 644 nm (pH 5) à 560 nm (pH 10,2). Ceci indique que les espèces à pH basique sont différentes des espèces à pH acide (Figure 16). Des études infra rouges et de diffraction des rayons X ont montré qu'à pH acide, le groupement carboxylate du glutamate 47 était ligand du fer oxydé du site actif. A pH basique, le ligand carboxylate est remplacé par un ligand HO<sup>-</sup> provenant du solvant (Mathé *et al.* 2005). Un pKa apparent est alors observé autour de 9 pour la SOR de *D. baarsii* (Nivière *et al.* 2004).



**Figure 16 :** Equilibre entre la forme  $Fe^{3+}$ -Glu et la forme  $Fe^{3+}$ -OH du site actif de la SOR en fonction du pH.

Cette transition alcaline est retrouvée chez toutes les classes de SOR (*Mathé et al. 2006 ; Huang et al. 2007 ; Rodrigues et al. 2006*).

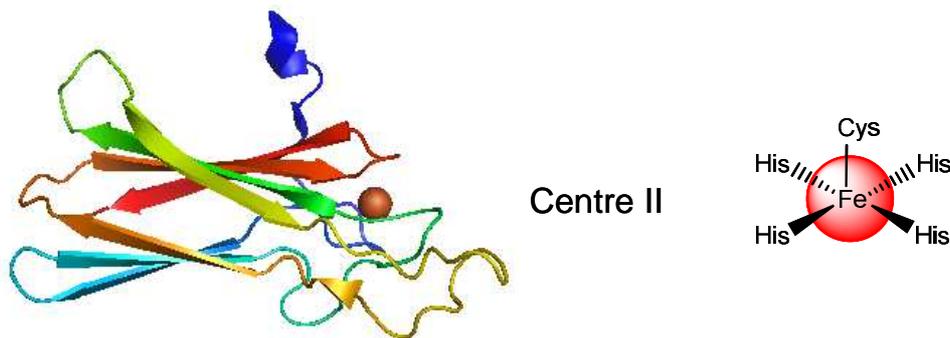
De plus, une étude réalisée sur le mutant E47A (le glutamate 47 est remplacé par une alanine) montre que la transition se fait à des pH beaucoup plus acide pour ce mutant, correspondant à un échange entre une molécule d'eau et un  $HO^-$ . Le glutamate ne rentre pas en compétition et le pKa est déplacé. Le spectre à pH 7,6 montre également une bande de transfert de charge centrée à 580 nm, attribué également à une forme  $Fe^{3+}$ -OH (*Mathé et al. 2005*). Ceci valide le fait que c'est bien l'acide aminé glutamate 47 qui se fixe sur la sixième position de coordination.

Les deux centres à fer haut spin des SOR de classe I ont également été caractérisés par RPE (*Nivière et al. 2004 ; Tavares et al. 1994*). Le spectre RPE de la SOR semi-réduite présente plusieurs valeurs du facteur  $g = 7,7 ; 5,7$  et  $1,8$  qui ont été attribuées au centre I oxydé (*Tavares et al. 1994*). Le spectre RPE de la SOR totalement oxydée fait apparaître un autre signal de symétrie rhombique avec un facteur  $g = 4,3$ , caractéristique d'un système haut spin ( $S = 5/2$ ) avec une géométrie octaédrique ( $FeN_4S$ ), qui a été attribué au centre II (*Nivière et al. 2004*).

### II.1.2. Classe II

Ces enzymes, contrairement à celle de la classe I, ne contiennent qu'un seul domaine structural correspondant au domaine C-terminal des SORs de classe I. Cependant, elles ont la même taille que les SORs de classe I, à savoir 14000 Da. Ceci est dû à la présence de séquences supplémentaires qui forment des boucles sans modifier la structure générale du domaine contenant le site actif. On les retrouve dans des archæa extrémophiles, *Pyrococcus*

*furiosus* (Yeh et al. 2000; Jenney et al. 1999), dans des bactéries sulfato-réductrices, *Desulfovibrio gigas* (Chen et al. 1994; Silva et al. 1999), et dans des bactéries hyperthermophiles, *Thermotoga maritima* (Zhang et al. 2002). Contrairement aux enzymes de la classe I, ce sont des tétramères de couleur bleue qui ne possèdent qu'un seul centre à fer, homologue au centre II des SORs de classe I (Figure 17) (Yeh et al. 2000). Le spectre UV-visible de ces SORs ne présente pas de bande caractéristique lorsqu'elles sont réduites. Lorsqu'elles sont oxydées à pH 7,6, elles présentent la même bande d'absorption vers 650 nm que le centre II des SORs de classe I. Le spectre RPE de ces SORs de classe II montre des valeurs de  $g = 7,3$  et  $5,8$  correspondant à un système haut spin mais également un signal rhombique avec un facteur  $g = 4,3$  identique à celui des SOR de classe I. Le signal complet est globalement plus axial que celui des SORs de classe I (Clay et al. 2003). Cependant, malgré l'absence du domaine N-terminal et des signatures RPE différentes, les enzymes de cette classe présentent le même type de réactivité vis-à-vis du  $O_2^{\bullet -}$  que les enzymes de la classe I (Rodrigues et al. 2007)



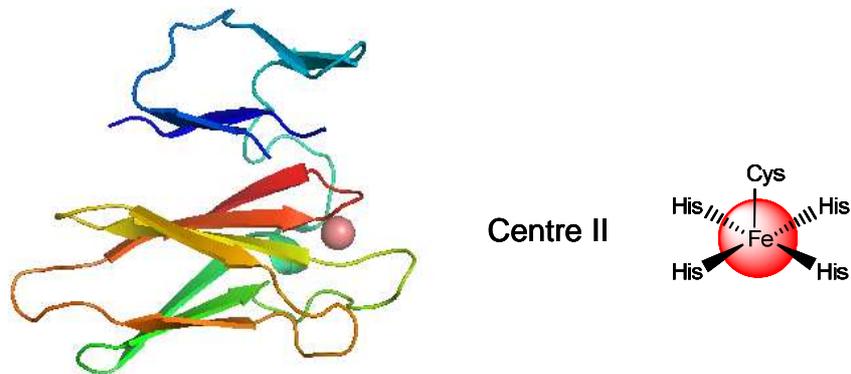
**Figure 17 :** Structure cristallographique d'un monomère de la SOR de *Pyrococcus furiosus* (Yeh et al. 2000).

Notons que certaines souches bactériennes peuvent avoir dans leur génome deux types de SOR. Par exemple *Archaeoglobulus fulgidus* comprend à la fois une SOR de la classe I et une SOR de la classe II (Abreu et al. 2000).

### II.1.3. Classe III

La SOR de classe III a été trouvée dans une bactérie microaérophile pathogène pour l'homme: *Treponema pallidum*, l'agent responsable de la syphilis (Jovanovic et al. 2000, Lombard et al. 2000b, Santos-Silva et al. 2006). Étonnamment, cette souche bactérienne ne contient pas de SOD dans son génome, mais uniquement une SOR, présentant une certaine

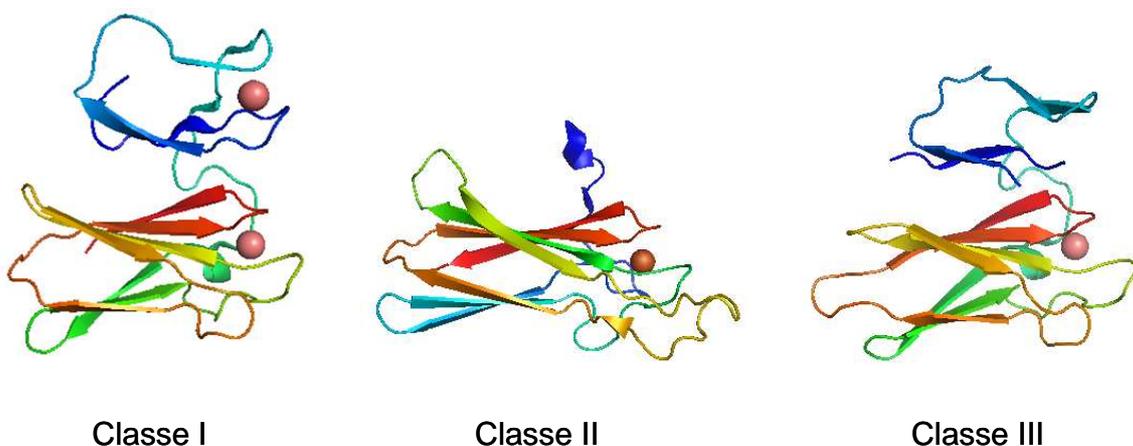
homologie avec les SORs de classe I (Fraser *et al.* 1998). Cependant cette SOR ne contient qu'une seule cystéine au niveau du centre I. La partie N-terminale de l'enzyme ne peut donc pas lier d'atome de fer (Figure 18). La partie C-terminale contient également un centre à fer identique au centre II des SORs de classe I et constitue le site actif de l'enzyme.



**Figure 18 :** Structure cristallographique d'un monomère de la SOR de *Treponema pallidum* (Santos-Silva *et al.* 2006).

Le spectre UV-visible de cette SOR présente une bande caractéristique du centre à fer oxydé à l'iridium. Le maximum d'absorbance est légèrement déplacé vers les plus hautes longueurs d'ondes par rapport aux autres classes de SOR (656 nm pour *T. pallidum* contre 644 nm pour *D. baarsii*). Le spectre RPE de la SOR de *T. pallidum* oxydée à l'iridium est similaire à celui du centre II des SORs de classe I. Ce spectre est de géométrie rhombique avec une valeur de  $g = 4,3$  caractéristique d'un fer à haut spin à symétrie octaédrique.

Ces trois types de SOR ont une réactivité comparable vis-à-vis du superoxyde et ceci malgré leurs différences structurales au niveau du domaine N-terminal (Figure 19).



**Figure 19 :** Comparaison de la structure des trois classes de SORs.

## II.2. Mécanisme réactionnel de la SOR

### II.2.1. Description du mécanisme réactionnel de la SOR

L'étude du mécanisme de la SOR a été principalement réalisée par radiolyse pulsée. Cette technique permet la production rapide et contrôlée de superoxyde ainsi qu'une détection sur des temps très courts de la cinétique d'oxydation du site actif de la SOR par  $O_2^{\bullet -}$ . Une des particularités de ce mécanisme est la formation d'intermédiaires réactionnels de type Fer-peroxyde au cours du cycle catalytique de l'enzyme avec  $O_2^{\bullet -}$  (Figure 20). Actuellement, le schéma réactionnel de la SOR avec le superoxyde peut être décrit de la façon suivante, avec la présence de deux intermédiaires réactionnels (Emerson et al. 2003a; Rodrigues et al. 2006; Rodrigues et al. 2008; Huang et al. 2007; Nivière et al. 2004) :

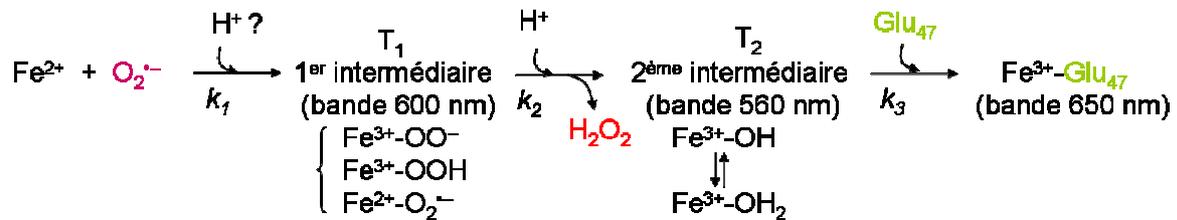


Figure 20 : Mécanisme réactionnel de la SOR.

Le  $\text{Fe}^{2+}$  du site actif de la SOR, contenant une sixième position de coordination libre, réagit spécifiquement avec le superoxyde selon un mécanisme de sphère interne (Lombard et al. 2001; Rodrigues et al. 2007). Cette réaction se fait très rapidement avec une constante de vitesse  $k_1$  de l'ordre de  $1.10^9 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$ , c'est-à-dire proche de la vitesse de diffusion des molécules en solution.

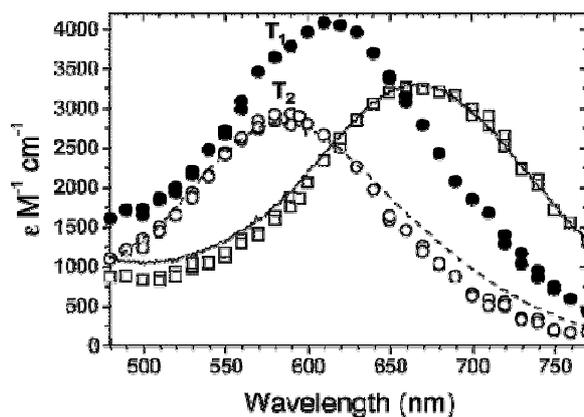
La fixation du superoxyde sur le  $\text{Fe}^{2+}$  du site actif conduit à la formation d'un premier intermédiaire réactionnel ( $\text{T}_1$ ) présentant un spectre d'absorption avec une bande centrée autour de 600 nm (Figure 21). La nature exacte de ce premier intermédiaire n'est pas encore clairement définie mais pourrait correspondre à une espèce fer-peroxo ( $\text{Fe}^{3+}\text{-OO}^-$ ), fer hydroperoxo ( $\text{Fe}^{3+}\text{-OOH}$ ) ou fer-superoxo ( $\text{Fe}^{2+}\text{-O}_2^{\bullet -}$ ), comme nous en discuterons plus loin. La cinétique de formation du premier intermédiaire est indépendante du pH (Lombard et al. 2001; Rodrigues et al. 2007).

Cet intermédiaire se convertit en un second intermédiaire réactionnel ( $\text{T}_2$ ) dont la cinétique de formation dépend du pH (Figure 20). A pH 7,6, la constante de vitesse  $k_2$  de formation du  $\text{T}_2$  est de l'ordre de  $500 \text{ s}^{-1}$  pour la SOR de *D.baarsii* et de  $3000 \text{ s}^{-1}$  pour la SOR

d'*A. fulgidus* (Lombard et al. 2001; Rodrigues et al. 2007; Nivière et al. 2004)). Ce deuxième intermédiaire présente à pH 7,6 un spectre caractéristique, avec une bande centrée à 560 nm (Figure 21) qui a pu être attribué à une espèce  $\text{Fe}^{3+}\text{-OH}$  (Mathé et al. 2005 ; Rodrigues et al. 2006). De plus, il a été montré que ce spectre varie en fonction du pH. Son maximum d'absorbance se déplace de 660 nm à pH acide à 560 nm à pH basique laissant apparaître un pKa de 7 (Rodrigues et al. 2006). Ce pKa reflète un transfert de proton sur la forme  $\text{Fe}^{3+}\text{-OH}$ . L'intermédiaire  $T_2$  correspond donc aux espèces  $\text{Fe}^{3+}\text{-OH}/\text{Fe}^{3+}\text{-OH}_2$  en équilibre acido-basique (Rodrigues et al. 2006).

Enfin, le glutamate en position 47 se coordine sur cette espèce ( $T_2$ ) pour former le produit final  $\text{Fe}^{3+}\text{-Glu}$ , caractérisé par une bande spectrale centrée autour de 650 nm (Figure 21). Ce processus se déroule avec une constante de vitesse  $k_3$  de l'ordre de  $10 \text{ s}^{-1}$  (Rodrigues et al. 2007).

Notons que l'étape de relargage d' $\text{H}_2\text{O}_2$  n'a pas été directement identifiée. Compte tenu de la nature du  $T_2$ , où le peroxyde est absent, le départ d' $\text{H}_2\text{O}_2$  doit se faire entre  $T_1$  et  $T_2$ .



**Figure 21** : Spectres reconstitués des intermédiaires de réaction de la SOR d'*A. fulgidus*.  
Spectre du  $T_1$  (●) ; spectre du  $T_2$  (○) ; spectre du produit final avec le glutamate (□).

### II.2.2. Nature du premier intermédiaire

À la différence du  $T_2$ , où les spectres d'absorbance ont clairement permis de définir sa nature  $\text{Fe}^{3+}\text{-OH} / \text{Fe}^{3+}\text{-OH}_2$ , le spectre du  $T_1$  ne permet pas clairement son identification.

Plusieurs propositions ont été faites sur la nature du premier intermédiaire :

► Il est proposé que le  $T_1$  pourrait être de nature  $\text{Fe}^{3+}\text{-peroxyde}$  ( $\text{Fe}^{3+}\text{-OO}^-$ ) ou  $\text{Fe}^{3+}\text{-hydroperoxyde}$  ( $\text{Fe}^{3+}\text{-OOH}$ ) (Rodrigues et al. 2006; Nivière et al. 2004). Cette hypothèse se

base sur le fait que le superoxyde peut se coordiner au fer sur la sixième position de coordination libre du  $\text{Fe}^{2+}$  et qu'un transfert d'électron du  $\text{Fe}^{2+}$  au superoxyde peut se faire instantanément par un mécanisme de sphère interne. Le fait que le site actif de la SOR puisse accommoder une espèce de type  $\text{Fe}^{3+}$ -peroxyde a été montré par des études de résonance Raman. Ces études n'ont pas pu être réalisées à partir de la réaction de la SOR avec  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , mais à partir d'un mélange de la SOR avec six équivalents d' $\text{H}_2\text{O}_2$ . Dans ces conditions, une espèce  $\text{Fe}^{3+}$ -OOH a pu être piégée et caractérisée par résonance Raman. Deux bandes de vibrations caractéristiques de la liaison Fe-O à  $438\text{ cm}^{-1}$  et de la liaison O-O à  $850\text{ cm}^{-1}$  d'une espèce  $\text{Fe}^{3+}$ -peroxyde ont été mise en évidence (Mathé et al. 2002; Mathé et al. 2005). Ces résultats indiquent qu'une espèce  $\text{Fe}^{3+}$ -peroxyde, protonée ou non, peut se former sur le site actif de la SOR.

Dans la littérature deux propositions sont faites sur l'état de protonation de ce Fe-peroxyde :

- Rodrigues et al. (2006), proposent que ce premier intermédiaire corresponde à un fer-hydroperoxo ( $\text{Fe}^{3+}$ -OOH). Ceci implique qu'une première étape de protonation se fasse en même temps que la fixation de  $\text{O}_2^{\bullet-}$  sur le  $\text{Fe}^{2+}$  du site actif. Bien qu'aucune dépendance au pH de la cinétique de cette réaction n'a été observée (Rodrigues et al. 2006; Nivière et al. 2004), une étude de calcul théorique DFT sur un modèle du site actif de la superoxyde réductase indique qu'en milieu protique, l'espèce  $\text{Fe}^{3+}$ -OO<sup>-</sup> se protone instantanément pour former l'espèce Fe-OOH (Dey et al. 2007). Ces données pourraient rendre compte de la formation d'un premier intermédiaire  $\text{Fe}^{3+}$ -OOH, sans observer de dépendance au pH dans sa cinétique de formation. Dans ce cas l'étape de protonation pourrait ne pas être cinétiquement limitante.

- Nivière et al. (2004), proposent de leur côté que le premier intermédiaire soit une espèce  $\text{Fe}^{3+}$ -OO<sup>-</sup>, correspondant à la seule fixation de  $\text{O}_2^{\bullet-}$  sur le  $\text{Fe}^{2+}$  et à un transfert d'électron du fer vers le  $\text{O}_2^{\bullet-}$ . Cela est en accord avec le fait que la cinétique de formation de cet intermédiaire est indépendante au pH. La conséquence de cette hypothèse est que les deux processus de protonation permettant la formation d' $\text{H}_2\text{O}_2$  doivent se produire au cours des étapes suivantes.

► Une autre hypothèse peut être proposée quant à la nature chimique de ce premier intermédiaire. Récemment, une étude sur l'homoprotocatéchuate dioxygénase a permis de

mettre en évidence la formation d'un intermédiaire réactionnel de type  $\text{Fe}^{2+}$ -superoxo ( $\text{Fe}^{2+}\text{-O}_2^{\bullet-}$ ) au cours de son cycle catalytique. Cette espèce se caractérise par une bande d'absorption centrée à 600 nm (Groce and Lipscomb 2005; Kovaleva and Lipscomb 2007; Kovaleva et al. 2007). Cette bande est similaire à celle observée pour le premier intermédiaire de la SOR. Il est donc possible que pour la SOR, le premier intermédiaire observé soit une espèce de type  $\text{Fe}^{2+}\text{-O}_2^{\bullet-}$ .

Il est important de noter que selon la nature du premier intermédiaire, le nombre d'étapes conduisant à la libération d' $\text{H}_2\text{O}_2$  sera différent (Figure 22).

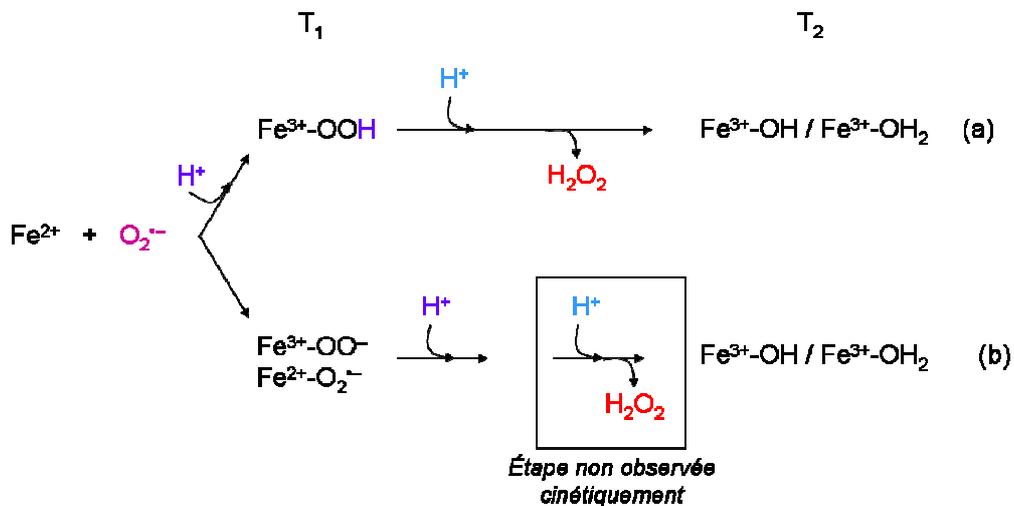


Figure 22 : Différents schémas réactionnels conduisant à la libération d' $\text{H}_2\text{O}_2$ .

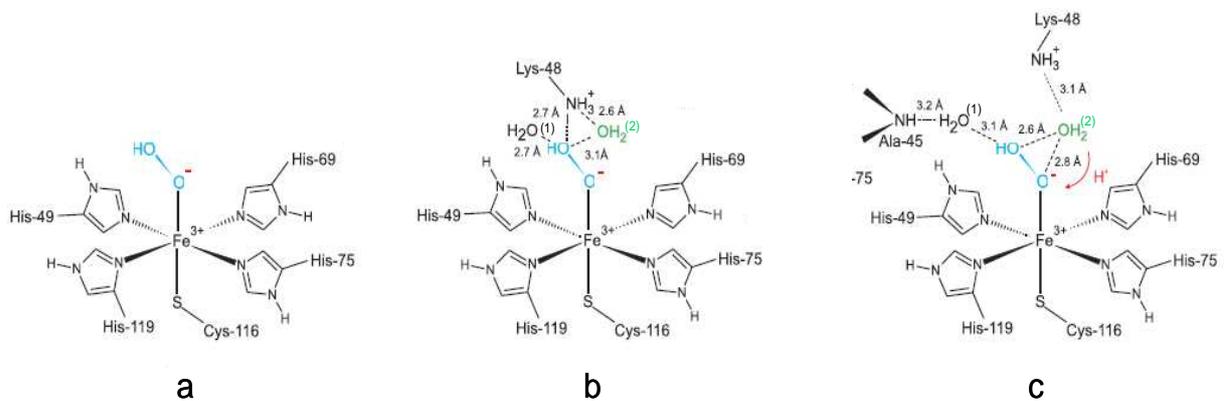
-Si l'on considère que T<sub>1</sub> correspond à une espèce  $\text{Fe}^{3+}\text{-OOH}$ , alors la libération d' $\text{H}_2\text{O}_2$  pourrait se faire immédiatement après une seule étape de protonation de cette espèce  $\text{Fe}^{3+}\text{-OOH}$  (Figure 22-a).

-Si l'on considère que T<sub>1</sub> correspond à une espèce  $\text{Fe}^{3+}\text{-OO}^-$  ou  $\text{Fe}^{2+}\text{-O}_2^{\bullet-}$ , alors la libération d' $\text{H}_2\text{O}_2$  pourrait se faire après deux étapes de protonation (Figure 22-b). Cependant, en radiolyse pulsée il n'a été observé qu'une seule étape de protonation correspondant au passage du T<sub>1</sub> au T<sub>2</sub> (Nivière et al. 2004). Il a été proposé que cette protonation se fasse par un  $\text{H}_3\text{O}^+$  du solvant. Cela est en accord avec le fait que le site actif de la SOR se trouve à la surface de la protéine. Cette protonation doit aboutir à la formation d'une espèce  $\text{Fe}^{3+}$ -hydroperoxo ( $\text{Fe}^{3+}\text{-OOH}$ ), qui n'a pas été observée expérimentalement. Le passage de l'espèce  $\text{Fe}^{3+}\text{-OOH}$  au deuxième intermédiaire  $\text{Fe}^{3+}\text{-OH} / \text{Fe}^{3+}\text{-OH}_2$  nécessite une deuxième étape de protonation afin de libérer  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Cette étape n'a pas été observée cinétiquement. Il est possible qu'elle soit rapide et donc cinétiquement non limitante. L'existence de cette

seconde étape de protonation est fortement suggérée par les données présentées dans le paragraphe suivant.

### II.2.3. Rôle de la lysine 48 dans la libération d' $H_2O_2$

Différentes structures de la SOR ont permis de mettre en évidence la présence d'une lysine en position 48 proche du site actif de la SOR de *D. baarsii* (Adam et al. 2004). Le rôle de cette lysine 48 dans le mécanisme de protonation des espèces Fe-peroxyde a pu être mis en évidence par une étude structurale combinant la spectroscopie Raman et les rayons X (Katona et al. 2007). Ce travail a été réalisé sur un mutant E114A de la SOR de *D. baarsii*, qui permet de stabiliser une espèce  $Fe^{3+}$ -OOH à partir de la réaction avec  $H_2O_2$ . Des cristaux du mutant E114A ont été trempés rapidement dans une solution d' $H_2O_2$  et congelés. Les études de spectroscopie Raman sur ces cristaux ont montré la présence de deux bandes caractéristiques d'une espèce  $Fe^{3+}$ -peroxyde à 567 et 838  $cm^{-1}$ , indiquant la présence de cette espèce piégée dans le cristal de SOR. Ces cristaux ont diffracté à haute résolution. Sur les quatre molécules de SOR présentes par unité asymétrique, trois contiennent une densité électronique à proximité du fer qui a pu être associée à une espèce fer-peroxyde. De façon tout à fait remarquable, différentes conformations dans l'environnement de ce fer-peroxyde ont été observées dans chacune de ces trois structures (Figure 23).



**Figure 23 :** Structure aux rayons X de la superoxyde réductase de *D. baarsii* en présence d' $H_2O_2$  (Katona et al. 2007).

Dans la première structure (Figure 23-a), l'hydroperoxyde sous forme linéaire est coordonné au fer et on n'observe aucune autre interaction sur le peroxyde.

Dans la deuxième structure (Figure 23-b), la boucle contenant la lysine 48 s'est rapprochée du site actif et, par un réseau de liaisons hydrogène impliquant une molécule d'eau, interagit avec l'oxygène distal du peroxyde.

Dans la troisième structure (Figure 23-c), la chaîne latérale de la lysine 48 se déplace en direction du fer et permet le positionnement d'une molécule d'eau qui peut ainsi interagir avec l'oxygène proximal du peroxyde.  $\text{H}_2\text{O}^{(2)}$  est alors dans une position favorable pour donner un proton à l'oxygène proximal permettant la formation et la libération d' $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Cette étude a permis de montrer que la lysine en position 48 pourrait être essentielle dans la réactivité de la SOR notamment en ce qui concerne la formation et la libération d' $\text{H}_2\text{O}_2$ . Elle permet de protoner l'oxygène proximal de l'espèce  $\text{Fe}^{3+}\text{-OOH}$  grâce à son interaction avec une molécule d'eau, permettant ainsi la libération d' $\text{H}_2\text{O}_2$  et la formation du second intermédiaire  $\text{T}_2$ . Cette étape pourrait correspondre à une étape cinétiquement non limitante et donc non observable en radiolyse pulsée.

Aux vues de toutes ces informations, le mécanisme de réaction de la SOR avec le superoxyde suivant peut être proposé (Figure 24) :

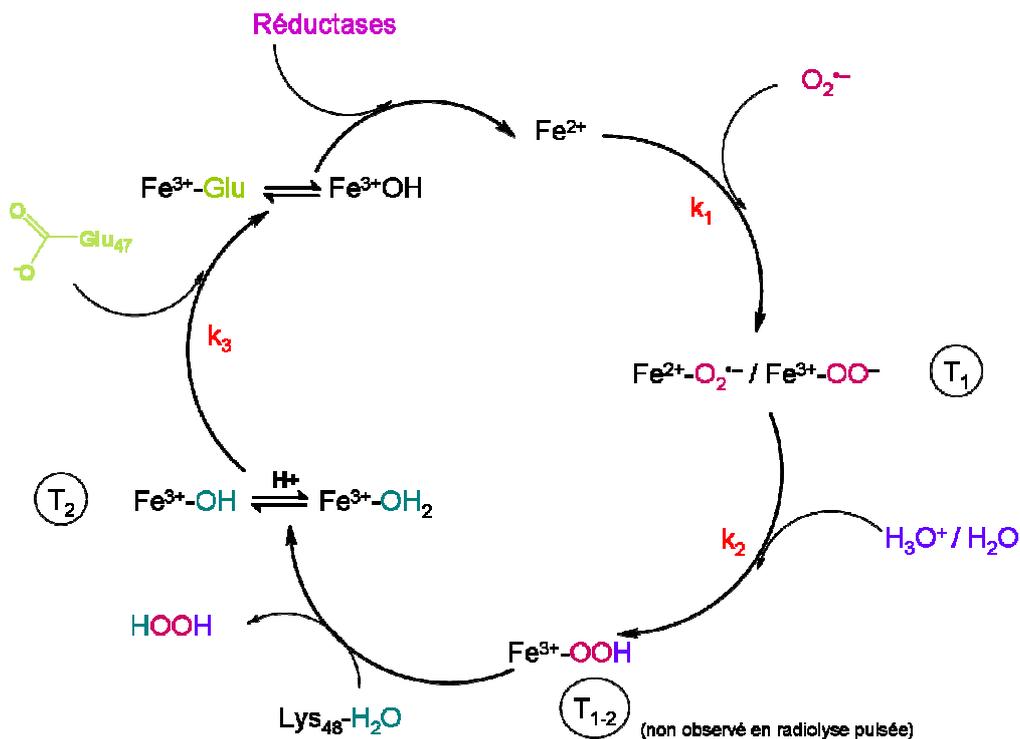


Figure 24 : Cycle catalytique de la superoxyde réductase de *D. baarsii*.

Afin que le cycle catalytique soit complet, des réductases, présentes dans les cellules permettent la réduction du  $\text{Fe}^{3+}$  en  $\text{Fe}^{2+}$  (Emerson et al. 2003c).

## II.2.4. Les complexes mimétiques

En parallèle de ces études sur la SOR, différents groupes ont synthétisé des complexes de fer, mimant le site actif de la SOR avec une coordination de type  $N_4S_1$ . Les études de la réactivité de certains de ces complexes avec le superoxyde ont permis d'apporter des informations sur la formation des intermédiaires fer-peroxyde à partir du superoxyde. Plusieurs complexes ont été réalisés.

► Le premier complexe  $[Fe^{II}-(S^{Me_2}N_4(tren))]^+$  (**A**) mimétique de la SOR contient un fer coordonné par quatre groupements amines reliés entre eux par des ponts carbonés et un groupement thiolate en position cis, et non pas trans comme dans le site actif de la SOR (Figure 25-1) (Shearer *et al.* 2002). Par l'ajout à basse température de  $O_2^{\bullet -}$  et de MeOH au complexe ferrique, une espèce Fe-hydroperoxo a pu être piégée et caractérisée (Figure 25-2).

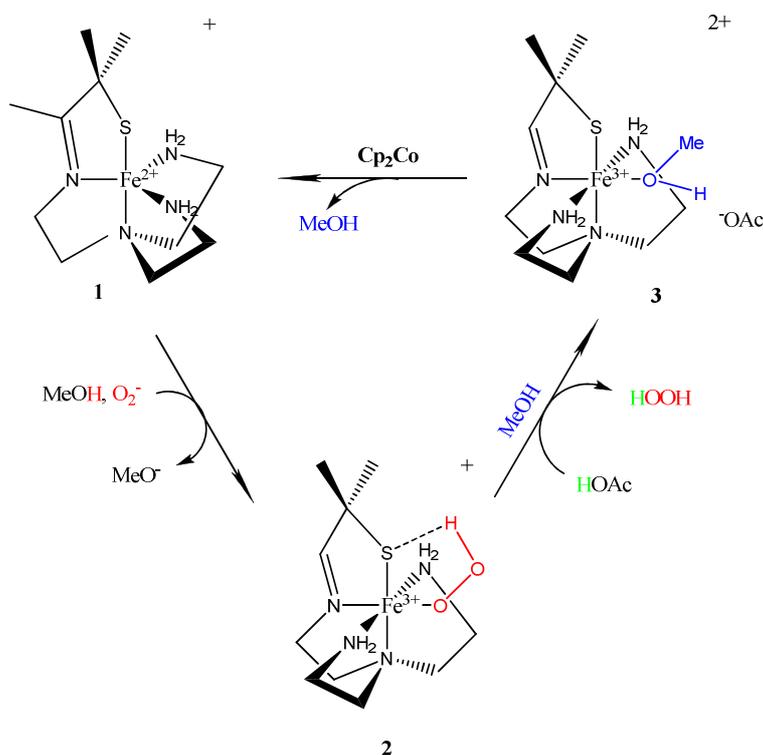


Figure 25 : Réaction du complexe  $[Fe^{II}-(S^{Me_2}N_4(tren))]^+$  (A) avec  $O_2^{\bullet -}$  (Shearer, 2002).

Cette espèce fer-hydroperoxo est bas spin ( $S=1/2$ ), contrairement à l'état haut spin ( $S=5/2$ ) du Fe-OOH observée pour la SOR (Mathé *et al.* 2002).

Shearer et al. (2002) montrent que ce complexe présente le même type de réactivité que la SOR, c'est-à-dire, après la protonation du fer-peroxyde, une rupture de la liaison Fe-O et la libération d' $\text{H}_2\text{O}_2$ .

L'état bas spin du fer-peroxyde de ce complexe est expliqué par le fait qu'une liaison hydrogène se forme entre le soufre de la cystéine en position cis et l'hydrogène du peroxy (Figure 25) (Theisen and Kovacs 2005). En outre, cette liaison hydrogène stabiliserait l'espèce Fe-OOH, déplacerait la densité électronique sur le peroxyde affaiblissant ainsi la liaison Fe-O, et permettrait la libération d' $\text{H}_2\text{O}_2$  par cassure de cette liaison Fe-O.

► Un autre complexe  $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{cyclam-PrS})]^+$  (**B**) de même géométrie que la SOR, comprenant 4 groupements amines en position équatoriale et un groupement thiolate en position axiale, a été synthétisé (Kitagawa et al. 2006). Ce complexe comporte un fer haut spin ( $S=5/2$ ), et un intermédiaire Fe-OOH haut spin a pu être obtenu après réaction avec  $\text{O}_2^{\bullet-}$  à basse température. A partir de cet intermédiaire, l'apport de protons dans la solution entraîne une rupture de la liaison Fe-O et la libération d' $\text{H}_2\text{O}_2$  tel que cela a été observé pour la SOR (Figure 26).

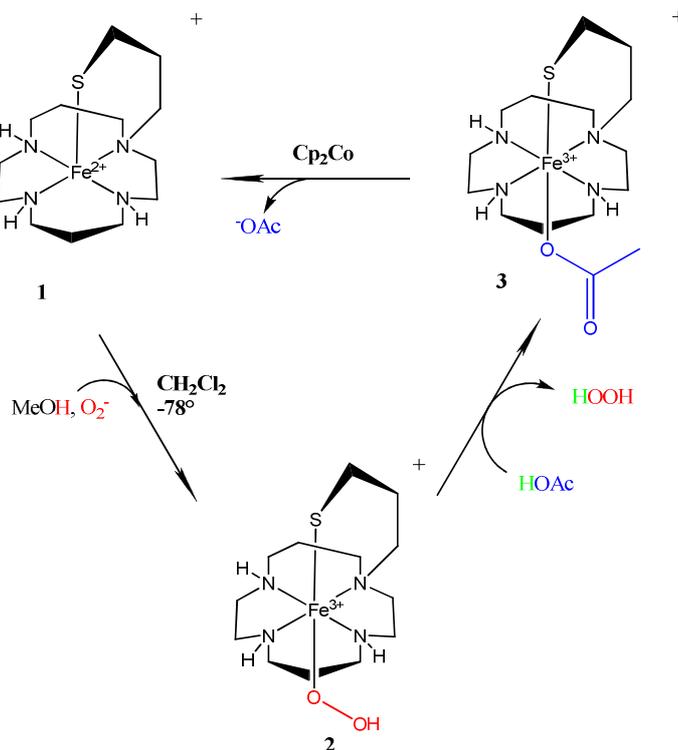


Figure 26 : Réaction du complexe  $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{cyclam-PrS})]^+$  avec  $\text{O}_2^{\bullet-}$  (Kitagawa, 2006).

Malgré les différences structurales de ces deux complexes, la liaison S-Fe en position cis pour le complexe **A** et en position trans pour le complexe **B**, leur réactivité vis-à-vis du

superoxyde est la même. Ils permettent tout les deux la formation d'un intermédiaire fer-hydroperoxyde et la libération d' $\text{H}_2\text{O}_2$  après réaction avec  $\text{O}_2^{\bullet-}$ .

Au vue de ces résultats, on peut donc penser que la position de la cystéine permettant la liaison S-Fe n'est pas vraiment importante dans la réactivité avec le superoxyde. Cependant, certaines informations obtenues lors de ces expériences suggèrent le contraire. La première conséquence importante de ce changement de position est l'état de spin du fer passant de bas spin pour le complexe **A** où le soufre est en position cis à haut spin pour le complexe **B** où le soufre est en position trans. Ensuite, le thiolate en position trans déplace de façon significative le potentiel redox de + 480 mV. Ceci à pour conséquence une meilleure réduction du superoxyde pour le complexe **B** par rapport au complexe **A** où le soufre est en position cis. Enfin, le thiolate en trans déplace considérablement la bande de vibration Raman de la liaison Fe-O vers les basses fréquences par rapport au thiolate en cis et à une valeur très proche de celle obtenue pour la SOR environ  $450 \text{ cm}^{-1}$  (Kitagawa *et al.* 2006). Ceci signifie que la liaison Fe-O est significativement affaiblie lors de l'introduction du ligand thiolate en trans dans la sphère de coordination par rapport au thiolate en cis. Il est donc plus facile de casser cette liaison Fe-O déjà affaiblie et donc de faciliter la libération d' $\text{H}_2\text{O}_2$ .

D'après ces données, il apparaît que la position en trans de la liaison S-Fe est une caractéristique importante pour la formation des intermédiaires peroxo. Elle modifie la force de la liaison Fe-O et influe par conséquent sur la protonation du l'oxygène proximal.

### **II.2.5. Comparaison de la SOR avec le Cytochrome P450**

La présence d'intermédiaires réactionnels de type fer-peroxyde n'est pas une caractéristique propre aux SORs. On les retrouve dans d'autres enzymes, telles que les oxygénases de type cytochrome P450 (Figure 27) (Denisov *et al.* 2005).

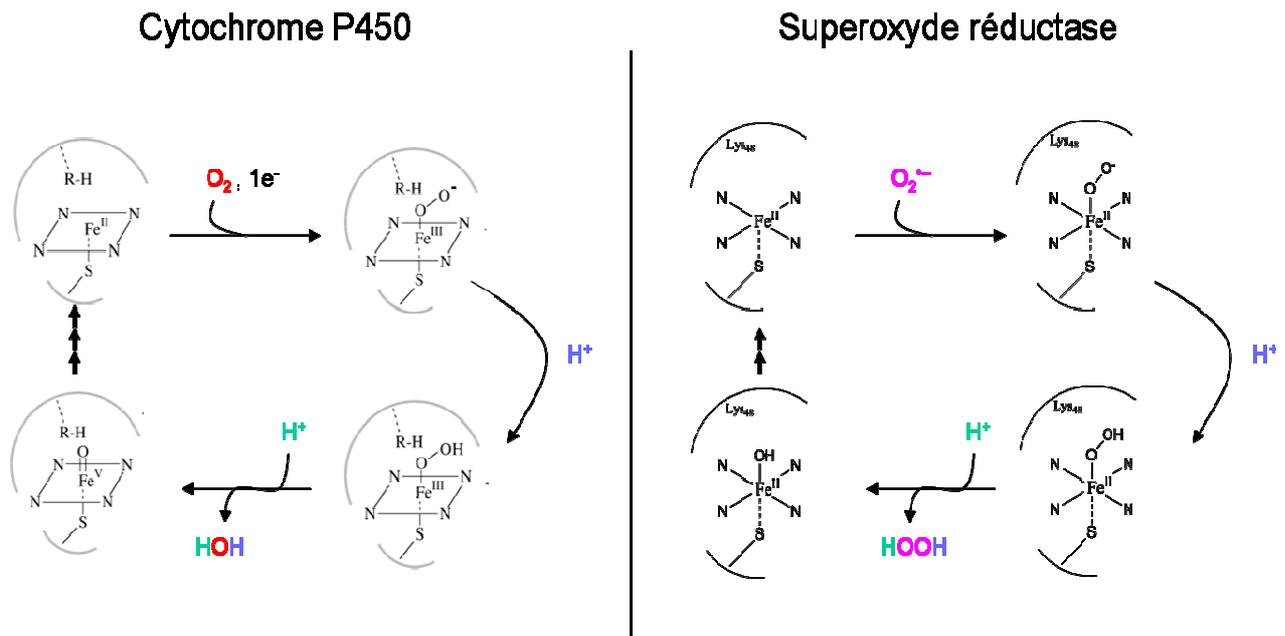


Figure 27 : Comparaison des mécanismes réactionnels de la SOR (à droite) et du cytochrome P450 (à gauche).

La protonation de l'intermédiaire Fe-OOH est une étape cruciale qui différencie la SOR des cytochromes P450 (Cyt P450). Pour le Cyt P450, la protonation se fait sur l'oxygène distal du Fe-OOH, permettant ainsi une coupure homolytique de la liaison O-O du peroxyde et la formation d'une espèce Fe(IV)=O (radical porphyrinyle) capable d'oxyder de nombreux substrats (Meunier *et al.* 2004).

Dans le cas de la SOR, l'oxygène proximal de l'intermédiaire fer-peroxyde est protoné, permettant ainsi la libération du peroxyde d'hydrogène et la formation d'une espèce Fe<sup>3+</sup> (Figure 28).

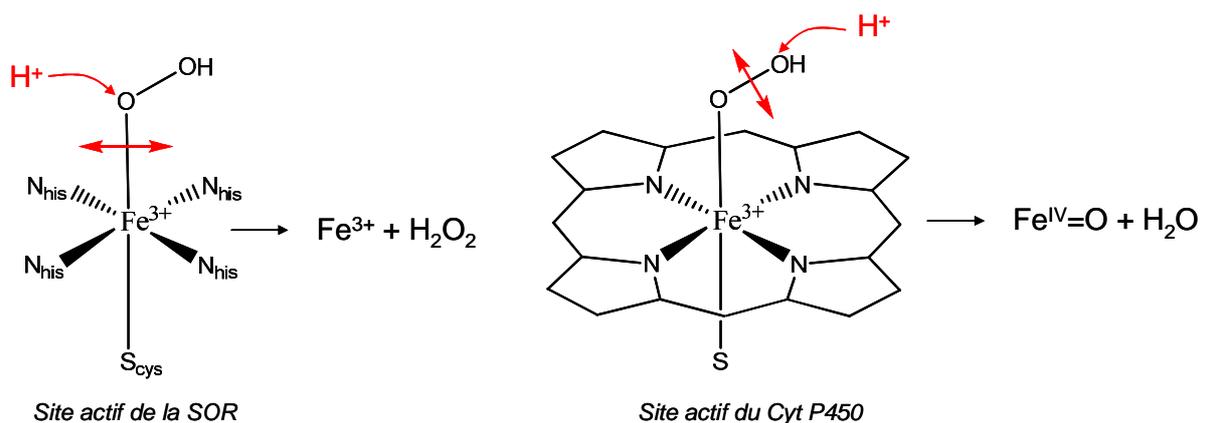


Figure 28 : Comparaison de l'évolution de l'intermédiaire Fe-OOH de la SOR (à gauche) et du Cyt P450 (à droite), et site de coupure de liaison (↔)

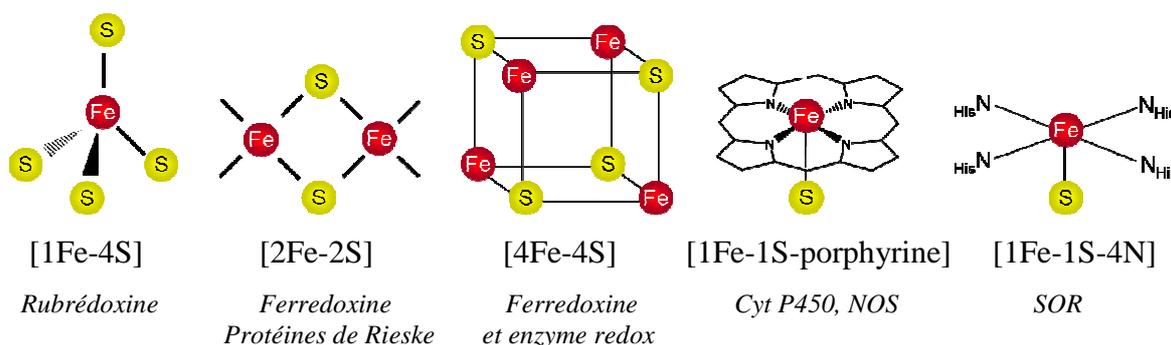
Cette différence de réactivité de l'espèce fer-peroxyde survient alors que les géométries des deux sites actifs présentent certaines similitudes. Le fer du site actif de la SOR est coordonné par quatre azotes des histidines en position équatoriale et un soufre de la cystéine en position axiale. Le site à fer du Cyt P450 est coordonné par quatre azotes d'un cycle porphyrine (quatre sous unités pyroles jointes sur les carbones  $\alpha$  par quatre ponts methine) et un soufre de cystéine en position axiale. Notons que la présence du noyau porphyrine dans la formation de l'espèce fer-oxo ne semble pas être déterminante car des études ont montré que des espèces fer-oxo pouvaient se former dans des complexes de fer non hémique avec une coordination  $N_4S_1$  (Rohde et al. 2003).

La différence de réactivité des espèces Fe-OOH entre la SOR et le Cyt P450 a été associée à la différence d'état de spin du fer. Dans le cytochrome P450 l'espèce Fe-OOH est bas spin. Des études sur des complexes de fer ont montré que l'état bas spin favorise la rupture homolytique de la liaison O-O des fer-peroxyde (Lehnert et al. 2001; Lehnert et al. 2002). En revanche, dans la SOR, l'espèce Fe-OOH est haut spin ( $S=5/2$ ), ce qui favoriserait la protonation de l'oxygène proximal et ainsi la rupture de la liaison Fe-O (Mathé et al. 2002).

### III. Rôle des liaisons hydrogène dans le site actif des protéines Fe-S

La structure cristallographique de la SOR de *D. baarsii* montre la présence de liaisons hydrogène entre le soufre de la cystéine en position axiale et des acides aminés environnants. Ces liaisons hydrogène sont sans doute importantes pour moduler la force de la liaison S-Fe et par conséquent la réactivité de la SOR avec  $O_2^{\cdot-}$ . On note que d'une façon générale, pour toutes les protéines à fer contenant un ou plusieurs ligands soufrés (protéines fer-soufre), on retrouve ce type de liaison hydrogène entre le soufre ligand et les acides aminés environnants. Quelques études ont été réalisées sur différentes protéines à centre [Fe-S] et ont permis de préciser le rôle de ces liaisons hydrogène dans les propriétés de ces centres [Fe-S].

Il existe plusieurs types de centre [Fe-S] : [1Fe-4S], [2Fe-2S], [4Fe-4S], [1Fe-1S-porphyrine] qui se retrouvent dans de nombreuses protéines telles que les rubredoxines, les ferredoxines ou encore les cytochromes P450. Mais, à ce jour, aucune protéine ne contient un centre métallique identique à celui de la SOR [1Fe-1S-4N] (Figure 29):



**Figure 29** : Différents types de centre [Fe-S] présent dans les métalloprotéines.

Sur différentes protéines Fe-S, l'importance des liaisons hydrogène entre le NH de la chaîne principale d'un acide aminé et le soufre ligand du fer a été étudiée par mutagenèse dirigée. Ces mutations ont permis de moduler la force de la liaison hydrogène avec le soufre ligand du fer. L'impact de ces mutations sur la liaison hydrogène, entre les NH de la chaîne principale des acides aminés et le soufre ligand du fer a été étudié par plusieurs techniques dont la RMN, la spectroscopie d'absorption des RX, la spectroscopie Raman et la voltamétrie cyclique.

► Dans le cas de la rubredoxine et des protéines de Rieske, les valines 8 et 44 pour la rubredoxine ainsi que la tyrosine 156 et la serine 154 des protéines Rieske ont été mutées afin de modifier la force de la liaison hydrogène que chaque acide aminé fait respectivement avec un soufre du centre [Fe-S] (Figure 30). Dans les deux cas, ces mutations ont entraîné un renforcement de la liaison hydrogène. Ceci a été observé par RMN pour la rubredoxine et absorption aux RX pour la protéine de Rieske. Dans les deux cas, le potentiel redox du centre [Fe-S] est augmenté (Lin et al. 2005 ; Kolling et al. 2007). Ceci est interprété par le fait que le renforcement d'une liaison hydrogène sur le soufre du site actif rend moins disponible les électrons pour la liaison S-Fe. Le transfert de charge du ligand soufré vers le fer est donc plus faible et la covalence de la liaison S-Fe diminue. Cela stabilise l'état réduit et augmente le potentiel redox du centre [Fe-S].



**Figure 30 :** Liaisons hydrogène (IIII) sur le soufre des sites actifs de la rubredoxine (à gauche) et des protéines de Rieske (à droite)

► Dans le cas de la **ferrédoxine** d'origine bactérienne comportant un centre [4Fe-4S], la mutation de la cystéine 24 faisant une liaison hydrogène avec un soufre du centre [4Fe-4S] en alanine entraîne une augmentation du potentiel redox (Figure 31) (Beck et al. 2001; Dey et al. 2005). Ici l'élimination d'une liaison hydrogène augmente le potentiel redox. Ceci va dans le sens inverse de ce qui a été décrit pour les protéines à centre [2Fe-2S]. Ceci peut être interprété par le fait que lorsque la liaison hydrogène est présente, elle modifie la localisation du centre [4Fe-4S] dans la poche du site actif. L'environnement autour du centre à fer est alors modifié. Le potentiel redox ne correspond pas uniquement à la covalence de la liaison S-Fe mais à un ensemble de paramètres qui le modifient différemment par rapport à ce qui est observé pour les protéines [2Fe-2S]. Dans ce cas, le potentiel redox diminue lorsqu'une liaison hydrogène est ajoutée.

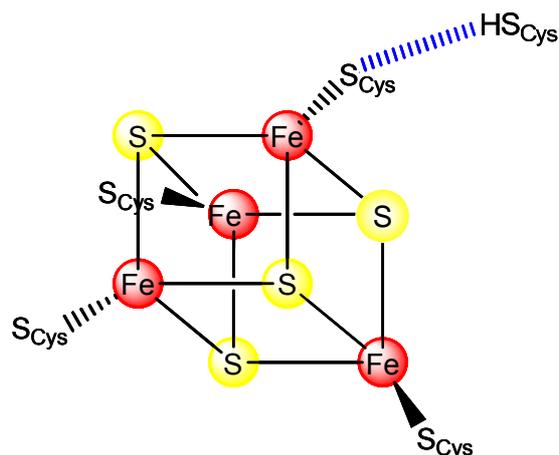


Figure 31 : Liaison hydrogène (1111) sur le soufre du site actif des ferrédoxines.

► Enfin dans le cas des **NO synthases (NOS)** ayant un site actif de type P450, la mutation du tryptophane 409 entraîne la perte de la liaison hydrogène entre l'atome d'azote de sa chaîne latérale et le soufre de la cystéine ligand du fer (Figure 32) (Couture *et al.* 2001). Ici l'impact de la mutation sur la liaison Fe-S a été observé par résonance Raman. Ces études ont montré que la perte de cette liaison hydrogène entraîne un affaiblissement de la liaison Fe-NO, lorsque NO se complexe au fer. Ceci est attribué au fait que l'absence de cette liaison hydrogène entraîne un renforcement de la liaison Fe-S et par conséquent le renforcement de la liaison Fe-NO. Ce résultat est cohérent avec ce qui a été trouvé pour les protéines de Rieske et les rubrédoxines.

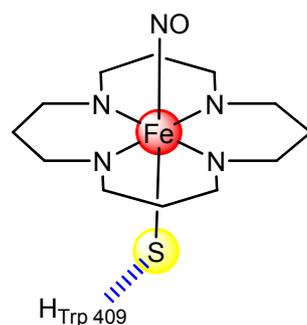


Figure 32 : liaison hydrogène (1111) sur le soufre du site actif des NOS.

En conclusion, ces quatre études révèlent l'importance de l'environnement des sulfures ligands du fer. La présence ou non d'une liaison hydrogène entre la chaîne principale ou latérale d'un acide aminé et le soufre du site actif permet de moduler la force de la liaison S-Fe. Ceci a pour conséquence notamment la modification du potentiel redox des centres [Fe-S] comme cela a été observé pour la rubredoxine, la ferrédoxine ou la protéine de Rieske.

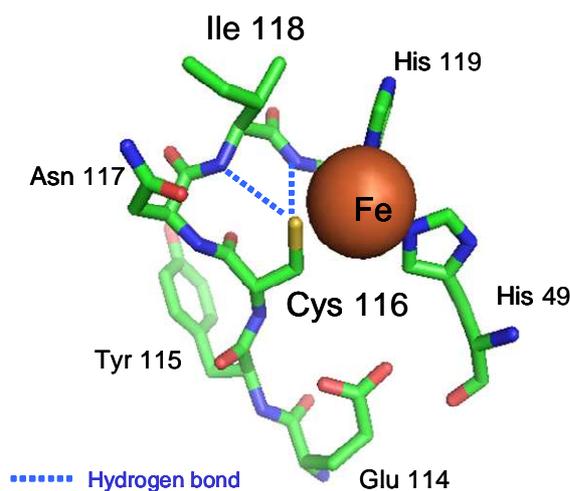
## IV. Objectif de la thèse : Etude du rôle du ligand axial cystéine dans la réactivité de la SOR avec le superoxyde.

Comme nous avons pu le voir précédemment, dans le cas de la SOR la présence d'une cystéine ligand en position axiale ainsi que la présence de liaisons hydrogène dans l'environnement du site actif semblent être des points importants dans la réactivité de l'enzyme.

Les structures aux rayons X de différentes SORs montrent la présence de liaison hydrogène entre le soufre de la cystéine et les NH des chaînes principales de l'isoleucine 118 et de l'histidine 119 (Figure 33).

Ces travaux de thèse ont consisté à modifier l'environnement de cette cystéine et à étudier les effets de ces modifications à différents niveaux: propriétés de coordination S-Fe, effets sur le potentiel redox du site actif, réactivité de l'enzyme avec le superoxyde par cinétique rapide.

Notre approche a été de muter la chaîne latérale de ces résidus de façon à moduler la liaison hydrogène avec le substrat ligand. L'histidine 119 étant ligand du fer, il est difficilement envisageable de muter ce résidu sans risquer de déstructurer complètement le site actif. Nous nous sommes donc intéressés essentiellement à l'isoleucine en position 118 que nous avons muté en alanine, valine, serine et aspartate.



**Figure 33 :** Représentation des liaisons hydrogènes entre le soufre ligand du fer et les NH peptidiques de l'isoleucine 118 et l'histidine 119 au sein du site actif de la SOR de *D. baarsii*.

*Matériels*

*§*

*Méthodes*



## I. Matériels Biologiques

### I.1. Souches bactériennes

#### ***Escherichia coli* BL21**

Cette bactérie a le génotype suivant : F-*ompT hsdS<sub>B</sub>* (*r<sub>B</sub><sup>-</sup>*, *m<sub>B</sub><sup>-</sup>*) *gal dcm*. Ce système est utilisé pour la surproduction de protéines. Expression des gènes d'*E. coli* sous des promoteurs, autre que T7, tel que *lac*, *tac*, *trc* et *trp*.

#### ***Escherichia coli* DH5 $\alpha$**

Cette bactérie a le génotype suivant : F- $\phi$ 80*lacZ* $\Delta$ M15 *recA1 endA1 gyrA95 thi-1, hsdR17* (*rk<sup>-</sup>*, *mk<sup>+</sup>*) *supE44 relA1 deoR*  $\Delta$  (*lacZYA-argF*) U169. Elle est utilisée pour la préparation de plasmides. Elle est déficiente en endonucléases (*endA*), ce qui améliore la qualité des préparations d'ADN. D'autre part, la mutation sur le gène *recA*, la rendant déficiente pour la recombinaison homologue, évite les risques de mutations du plasmide au cours de sa préparation.

#### ***Escherichia coli* QC 2965 / MG1655 *sodA sodB***

Cette bactérie est utilisée pour les tests de complémentation de l'activité SOD par la superoxyde réductase. Elle a pour génotype : F- $\Delta$ (*argF-lac*)U169 *rpsL*  $\Delta$ *sodA3*  $\phi$ (*sodB-kan*)  $\Delta$ 2  $\Delta$ *recA306 srl* ::Tn10 Ces souches sont délétées en SOD à manganèse codée par le gène *sod A* et en SOD à fer codée par le gène *sod B*. Elles ne peuvent donc pas lutter contre le stress superoxyde.

### I.2. Vecteur de surexpression

***pJF119EH*** : Ce vecteur est un dérivé du plasmide pKK223-3. C'est un plasmide à large spectre d'hôte qui possède un site de polyclonage (MCS) entouré, en amont, par un promoteur inductible *ptac* et en aval, par le gène *rrnB* codant pour le gène 5S de *E. coli* suivi

de deux terminateurs forts de transcription T1 et T2. Ce plasmide porte le gène *lac Iq* ce qui permet son utilisation dans des souches ne possédant pas le répresseur du promoteur *lac*.

**▮ *pMJ25*** : Ce vecteur résulte de l'insertion d'une partie de l'opéron *rbo-rub* de *Desulfoarculus baarsii* entre les sites *ecoRI* et *hindIII* du MCS de pJF119EH. La portion d'ADN ainsi insérée contient la totalité du gène *rbo* (381 pb) codant pour la SOR et 103 pb de la partie 5' du gène *rub* codant pour la rubrédoxine. Ce plasmide a été construit par le Dr. Danièle Touati (*Pianzola et al. 1996*).

### I.3. Milieu de culture

**▮ Le milieu LB** (10 g.l<sup>-1</sup> Tryptone, 5 g.l<sup>-1</sup> extrait autolytique de levure, 10 g.l<sup>-1</sup> NaCl, pH 7) est utilisé pour les pré-cultures. Il est également utilisé pour les cultures en milieu solide (milieu LB-Agar).

**▮ Le milieu minimum M9** (6 g.l<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 3 g.l<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,5 g.l<sup>-1</sup> NaCl; 1 g.l<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>Cl; pH 7), supplémenté en sels minéraux (2 mM MgSO<sub>4</sub>; 0,1 mM CaCl<sub>2</sub>; 1 mM Fe(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>), en molécules organiques (0,4 % glucose; 2 mg.l<sup>-1</sup> thiamine; 1 g.l<sup>-1</sup> casaminoacides ou 100 mM de chaque acides aminés selon la culture) et en antibiotiques (ampicilline 100 µg.ml<sup>-1</sup> et chloramphénocol 20 µg.ml<sup>-1</sup>), est utilisé pour la culture des souches transformées par les plasmides de la série pMJ25.

## II. Méthodes de biologie moléculaire

### II.1. Préparation d'ADN plasmidique

Cette étape est réalisée à l'aide du kit QIAprep<sup>®</sup> Miniprep (Qiagen) qui permet d'extraire et de purifier l'ADN plasmidique à partir de 10 ml de culture de cellules DH5α transformées avec le plasmide désiré. Après la collecte des cellules par centrifugation, celles-ci subissent une lyse alcaline, en présence de RNase, ainsi qu'une précipitation de l'ADN génomique par l'acide acétique. L'ADN est alors éliminé par centrifugation et le surnageant déposé sur une colonne comportant une matrice de silice, permettant une adsorption sélective

de l'ADN plasmidique en présence d'une forte concentration en sel. Après un lavage à l'éthanol pour éliminer les sels, l'ARN et les protéines, l'ADN plasmidique est élué avec un tampon de faible force ionique (eau ou tampon: Tris-HCl 10 mM pH 8,5). L'ADN ainsi purifié peut être quantifié par spectrométrie UV-visible à 260 nm. Une absorbance de 1 correspond à une concentration d'ADN de 50 ng.µl<sup>-1</sup>. L'ADN plasmidique purifié est stocké à -20°C.

## **II.2. Digestion de l'ADN**

Pour une digestion totale, 200 à 500 ng d'ADN plasmidique sont digérés avec 1 µl de chaque enzyme de restriction (ici EcoR1 et HindIII) dans le tampon de réaction approprié, dans un volume final de 10 µl. La réaction se fait à 37°C pendant 1 h.

## **II.3. Electrophorèse d'ADN sur gel d'agarose**

L'ADN plasmidique obtenu après l'amplification par PCR est analysé par électrophorèse sur gel d'agarose 1 %. Un volume de tampon de charge (0,25 % de bleu de bromophénol ; 2,25 % de xylène cyanol, 30 % de glycérol) est ajouté à 5 volumes de solution d'ADN. Le mélange est déposé sur gel d'agarose, de même que des marqueurs de taille allant de 250 à 10000 pb (Fermentas). Après migration sous une tension de 135 V dans du tampon TAE (Tris-HCl 20 mM pH 8,3 ; acétate 10 mM ; EDTA 0,5 mM) pendant 20 minutes environ, le gel est plongé dans une solution de bromure d'ethyidium (BET) afin de révéler l'ADN. Le BET s'intercale entre les bases de l'ADN et la fluorescence du complexe formé est révélée sous la lumière UV ( $\lambda = 260$  nm). La comparaison avec les marqueurs de taille permet de déterminer la taille approximative du fragment d'ADN étudié.

## **II.4. Transformation dans l'ADN d'*E. coli***

### **II.4.1. Préparation des cellules compétentes**

Toutes les étapes se déroulent stérilement. 100 ml de LB sontensemencés à 1 % avec une pré-culture de bactéries BL21 ou DH5α réalisée sur la nuit. Les cellules sont alors cultivées à 37°C, sous agitation, jusqu'en phase exponentielle de croissance ( $Abs_{600\text{ nm}} = 0,4$ ).

La croissance est alors arrêtée en laissant reposer les cultures dans la glace pendant 10 minutes. Après une centrifugation de 10 minutes à 5000 rpm, les culots sont repris délicatement dans un tampon Tris-HCl 10 mM pH 8, NaCl 50 mM. Les cellules sont de nouveau centrifugées à froid à la même vitesse, puis resuspendues dans un volume minimum de CaCl<sub>2</sub> 0,1 M et maintenues à 4°C pendant 30 minutes. Le traitement des cellules par les ions divalents Ca<sup>2+</sup> altère les membranes en créant des micro-perforations dans la bicouche lipidique, facilitant la transformation par un ADN exogène. Après une nouvelle centrifugation, les bactéries sont reprises dans 5 ml de CaCl<sub>2</sub> 0,1M, 15% glycérol, puis aliquotées et congelées dans l'azote liquide. Les cellules compétentes sont alors conservées à -80°C.

#### **II.4.2. Transformation des cellules compétentes**

Dans un tube eppendorf stérile, 100 µl de cellules compétentes sont incubés à 4°C avec 100 à 500 ng de vecteur de surexpression pendant 30 minutes. Un choc thermique, réalisé à 42°C pendant 1 minute, permet la transformation des bactéries. Ce traitement accentue la déstabilisation de la bicouche lipidique et stimule la pénétration de l'ADN plasmidique dans les cellules. Celles-ci sont ensuite remises 2 minutes à 4°C, puis reprises dans 300 µl de milieu LB, et laissées 1 heure sous agitation à 37°C. Les cellules transformées sont étalées sur boîtes de Pétri contenant du milieu LB-agar, complémenté avec les antibiotiques appropriés (ampicilline 100 µg.ml<sup>-1</sup>). Les boîtes sont placées une nuit à 37°C. Les colonies formées sont celles contenant le vecteur de surexpression.

### **II.5. Mutagenèse dirigée par PCR**

Les mutants SOR I117A, I117S, I117D, I117V sont obtenus par mutagenèse dirigée grâce au kit QuikChange (Stratagene). Cette méthode nécessite l'utilisation d'un plasmide double brin (ici le plasmide pMJ25) portant le gène d'intérêt (*sor*) ainsi que 2 oligonucléotides synthétiques dont la séquence doit être complémentaire au brin d'ADN à modifier, à l'exception de la mutation désirée (*Ho et al. 1989*). Ces oligonucléotides doivent contenir entre 25 et 45 bases, avec une température de fusion (T<sub>m</sub>) supérieure ou égale à 70°C.

$$T_m = 81,5 + 0,41 (\% \text{ GC}) - 675/N - \% \text{ (non appariement)}$$

Avec N le nombre de bases de la séquence, % GC le pourcentage de bases G et C dans la séquence et % (non appariement) le nombre de bases mutées (valeur nulle en cas de délétion ou d'insertion de base). La séquence choisie doit contenir au moins 40 % de bases GC et se terminer par un C ou un G.

Les séquences des oligonucléotides utilisés sont présentées dans le Tableau 1 :

Nom	Amorces - Séquences	Nbr non appariement	%GC	Tm
pMJ25 <sub>I117A</sub>	5'- gaa tac tgc aac <b>g</b> cc cac ggc cac tgg - 3' 3'- ctt atg acg ttg <b>e</b> gg gtg ccg gtg acc - 5'	2	62,9	74,8°C
pMJ25 <sub>I117S</sub>	5'- gaa tac tgc aac <b>a</b> gc cac ggc cac tgg - 3' 3'- ctt atg acg ttg <b>t</b> cg gtg ccg gtg acc - 5'	1	59	77,07°C
pMJ25 <sub>I117D</sub>	5'- gaa tac tgc aac <b>g</b> ac cac ggc cac tgg - 3' 3'- ctt atg acg ttg <b>c</b> tg gtg ccg gtg acc - 5'	2	59	73,3°C
pMJ25 <sub>I117V</sub>	5'- gaa tac tgc aac <b>g</b> tc cac ggc cac tgg - 3' 3'- ctt atg acg ttg <b>c</b> ag gtg ccg gtg acc - 5'	1	59	77,02°C

**Tableau 1:** Séquence d'amorces utilisées pour la SOR de *D. baarsii*. Les nucléotides modifiés à l'origine des mutations Ile →Ala, Ile →Arg, Ile →Ser et Ile →Val sont indiqués en violet.

Dans un eppendorf stérile on mélange 10 ng de plasmide parental, 125 ng de chacune des amorces, 1µl de mélange de dNTP concentrés à 10 mM, 5µl de tampon de réaction, 1µl de polymérase Pfu Ultra (2,5 U.µl<sup>-1</sup>) et 50 µl q.s.p d'eau stérile.

La mutagénèse s'effectue par un enchaînement de cycles de température réalisés de manière automatique par un thermocycleur. Chaque cycle comporte 3 étapes. Dans un premier temps les 2 brins de l'ADN matrice sont séparés par dénaturation thermique, puis les oligonucléotides s'apparient à leur séquence complémentaire sur l'ADN matrice. Ils servent d'amorces pour l'étape d'élongation, au cours de laquelle la *PfuUltra* polymérase (une ADN polymérase thermorésistante) synthétise l'ADN complémentaire au brin parental. Les conditions de PCR sont présentées dans le Tableau 2 :

Cycles	Température	Temps
1 <sup>er</sup>	95°C	30 s
2 <sup>nd</sup>	95°C	30 s
	55°C	1 min
	68°C	10 min (2 min.kb <sup>-1</sup> )
3 <sup>e</sup>	68°C	10 min

**Tableau 2 :** Conditions de PCR pour une mutagenèse dirigée.

Une fois cet enchaînement de cycles terminé, le produit de la réaction est traité par la *Dpn I*, une endonucléase qui digère spécifiquement l'ADN méthylé et hémiméthylé du plasmide parental. L'ADN muté est finalement introduit dans des cellules compétentes (ici des bactéries DH5 $\alpha$  ou BL21) qui relient les extrémités du plasmide encore libres après la synthèse de l'ADN. Le gène muté a été entièrement séquencé (Genome Express SA) pour chacun des plasmides pMJ25<sub>I117A</sub>, pMJ25<sub>I117S</sub>, pMJ25<sub>I117D</sub> et pMJ25<sub>I117V</sub>, afin de confirmer l'introduction de la mutation désirée.

### III. Culture cellulaire

#### III.1. Surexpression des SOR sauvages et mutantes de *Desulfoarculus baarsii*

Les souches DH5 $\alpha$  ou BL21 transformées par les plasmides pMJ25, pMJ25<sub>I117A</sub>, pMJ25<sub>I117S</sub>, pMJ25<sub>I117D</sub> et pMJ25<sub>I117V</sub> sont étalées sur boîte de Pétri LB contenant l'antibiotique approprié, ici 100  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  d'ampicilline. 100 ml de milieu LB contenant les mêmes antibiotiques sont alorsensemencés à partir d'une colonie et cultivés à 37°C sur la nuit sous agitation à 200 rpm, jusqu'en phase de saturation. Cette pré-culture sert alors à ensemencer à 1 % 10 l de milieu M9 contenant les mêmes antibiotiques et supplémentés en sels minéraux, molécules organiques et en fer sous la forme de FeCl<sub>3</sub> (100  $\mu\text{M}$ ). La surexpression de la SOR est induite par addition d'IPTG (1 mM). Après 16 h de croissance à 37°C, sous agitation 220 rpm, les cellules sont collectées par centrifugation à 4000 rpm pendant 15 min à 4°C, en vue de préparer les extraits cellulaires solubles.

## III.2. Complémentation de l'activité SOD

Les souches QC 2965 transformées par les plasmides pMJ25 (*Pianzzola et al. 1996*), pJF119EH, pML<sub>K48I</sub>, pMJ25<sub>E114A</sub>, pMJ25<sub>I117A</sub>, pMJ25<sub>I117S</sub>, pMJ25<sub>I117D</sub> et pMJ25<sub>I117V</sub> sont étalées sur boîte de Pétri LB contenant les antibiotiques appropriés : 100 µg.ml<sup>-1</sup> d'ampicilline et 20 µg.ml<sup>-1</sup> de chloramphénicol. A partir d'une colonie, 10 ml de milieu LB contenant les mêmes antibiotiques sont ensemencés et cultivés à 37°C sur la nuit à 200 rpm d'agitation jusqu'en phase stationnaire de croissance. Le milieu LB est alors éliminé par 2 centrifugations successives à 5000 rpm pendant 1 min, puis le culot cellulaire est resuspendu dans 2 ml de milieu M9. Ces solutions servent alors à ensemencer à 1 % 200 ml de milieu M9 contenant les mêmes antibiotiques et supplémentés en sels minéraux, molécules organiques, en fer sous la forme FeCl<sub>3</sub> (100 µM), et en acides aminés sauf les acides aminés branchés (valine, leucine, isoleucine). La surexpression de la SOR est induite par addition de différentes concentrations d'IPTG (5 µM, 20 µM, 100 µM, 1 mM ou 2 mM). La croissance est suivie par la mesure de l'absorbance à 600 nm.

## IV. Méthodes de biochimie

### IV.1. Préparation des extraits solubles

Le culot bactérien (DH5α) est repris dans 3 volumes (p/v) de tampon 100 mM Tris-HCl pH 7.6. Par ailleurs, pour le nouveau protocole de purification, le culot bactérien est repris dans du tampon 100 mM Tris-HCl pH 8 (10 ml par litre de culture). La suspension bactérienne est alors soumise aux ultrasons (amplitude 20 % ; 4°C ; 3 fois 5 minutes) afin de lyser les cellules. Les débris cellulaires (membranes externes, vésicules membranaires et cellules non lysées) sont alors séparés des extraits solubles par ultracentrifugation à 45000 rpm à 4°C pendant 1 h30 (Rotor Beckman, TI50).

Afin de précipiter les acides nucléiques, les extraits solubles sont incubés pendant 20 minutes sous agitation à 4°C avec 2 % (p/v) de sulfate de streptomycine (solubilisé dans du tampon Tris-HCl 1 M pH 7,6). Après centrifugation à 10000 rpm à 4°C pendant 15 min, le surnageant est incubé pendant 30 min sous agitation à 4°C avec du sulfate d'ammonium 75 % (p/v), afin de précipiter les protéines. Après centrifugation à 10000 rpm à 4°C pendant 20 min, le culot protéique est congelé dans l'azote liquide et conservé à -80°C en attendant son utilisation. Alternativement, ces étapes de précipitation peuvent être remplacées par une

dialyse afin d'éliminer les sels. Pour cela, les extraits solubles sont déposés dans des boudins de dialyse et déposé dans 3 bains de tampon 10 mM Tris-HCl pH 7,6 de 2 heures chacun. Une fois la dialyse terminée, les extraits solubles sont filtrés grâce à une membrane 0,45  $\mu\text{m}$  dans le but d'éliminer le matériel cellulaire insoluble (débris cellulaires, corps d'inclusion et agrégats). Les extraits sont prêts à être utilisés.

## **IV.2. Purification des protéines**

### ***IV.2.1. Ancien protocole de purification***

Après la préparation des extraits cellulaires solubles, le culot en sulfate d'ammonium est décongelé et remis en suspension délicatement avec un volume de tampon 50 mM Tris-HCl pH 7,6 correspondant à une concentration finale en protéine d'environ 30  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  (la solution trouble devient translucide). Cette solution protéique est ensuite centrifugée à 10000 rpm à 4°C pendant 20 min. La solution est concentrée par ultrafiltration en utilisant une cellule Diaflo équipée d'une membrane YM10 (Amicon) afin d'obtenir 15 ml de solution contenant 700 mg de protéine. Juste avant d'être déposée sur la colonne, la solution protéique est centrifugée 10 min à 4°C à 10000 rpm afin d'éliminer les impuretés non solubles.

### ***▣ Chromatographie par filtration sur gel AcA 54***

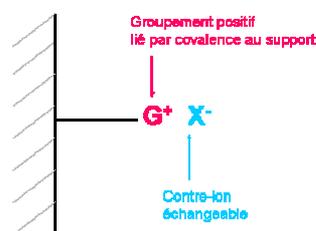
La chromatographie par filtration sur gel permet de séparer la SOR d'un grand nombre de protéines contaminantes de plus haut poids moléculaires.

Le gel AcA 54 (2,6 x 70 cm ; 372 ml ; Ultrogel, IBF) est préalablement équilibré par 1 volume colonne de tampon 10 mM Tris-HCl pH 7,6. Le gel Ultrogel AcA 54 est un polymère d'acrylamide (5 %) et d'agarose (4 %). Il sépare de façon optimale les protéines dont le poids moléculaire est compris entre 5000 et 70000 Daltons. La charge maximale est de 1 g de protéines avec un volume n'excédant pas 15 ml. L'élution est réalisée à un débit de 0,4  $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$  et des fractions de 4 ml sont collectées. Les fractions sont analysées par spectroscopies d'absorption UV-Visible en fonction de leur rapport  $\text{Abs}_{280\text{nm}}/\text{Abs}_{503\text{nm}}$ . La bande à 280 nm est caractéristique des résidus aromatiques et représente la totalité des protéines. La bande à 503 est caractéristique du centre I de la SOR,  $\text{FeS}_4$ , à l'état oxydé, et

donne une information directe sur la quantité de SOR présente dans la solution protéique. Les fractions ayant un rapport  $Abs_{280nm} / Abs_{503nm} < 20$  sont rassemblées.

### **▣ Chromatographie par échange d'anion SOURCE 15 Q**

La chromatographie par échange d'anions permet de séparer les protéines selon leurs charges. Les échangeurs d'ions sont des macromolécules insolubles portant des groupements ionisables qui ont la propriété d'échanger de façon réversible certains de leurs ions au contact d'autres ions provenant d'une solution. Les résines échangeuses d'anion sont chargées positivement (Figure 34) et sont souvent constituées de groupement d'ammonium quaternaire.



*Figure 34: Schéma de fixation de molécules sur une résine échangeuse d'anion.*

Les fractions rassemblées après AcA 54 sont déposées à un débit de  $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$  sur une colonne échangeuse d'anion SOURCE 15Q (Amersham ; diamètre 1,5 cm ; hauteur 5,6 cm ; volume 10 ml), préalablement chargée en sels par 5 volumes colonne de tampon B (10 mM Tris-HCl pH 7,6 ; 0,5 M NaCl) puis équilibré par 5 volumes colonne de tampon A (10 mM Tris-HCl pH 7,6). L'élution des protéines est effectuée par un gradient linéaire de 0 à 150 mM de NaCl en 25 volumes colonne (250 ml) à un débit de  $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ . Les fractions sont analysées par spectroscopie UV-visible de la même façon que décrit précédemment puis rassemblées selon un rapport  $Abs_{280nm} / Abs_{503nm} < 5$ .

## **IV.2.2. Nouveau protocole de purification**

### **▣ Chromatographie par échange d'anion Q sepharose**

La résine Q sepharose (Amersham Bioscience) est moins résolutive que la Source 15Q ce qui convient pour une première étape de purification des extraits solubles.

Les extraits solubles sont déposés à un débit de  $2 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$  sur une colonne échangeuse d'anion Q Sepharose (diamètre 2,6 cm ; hauteur 11 cm ; volume 60 ml), préalablement chargée en sels par 5 volumes colonne de tampon B (10 mM Tris-HCl pH 7,6 ; 0,5 M NaCl) puis équilibrée par 5 volumes colonne de tampon A (10 mM Tris-HCl pH 7,6). L'élution des protéines est effectuée par un gradient linéaire de 0 à 110 mM de NaCl en 11 volumes colonne (660 ml) à un débit de  $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ . Les fractions sont analysées par spectroscopie UV-visible de la même façon que décrit précédemment puis rassemblées selon un rapport  $\text{Abs}_{280\text{nm}} / \text{Abs}_{503\text{nm}} < 10$ .

### **▣ Chromatographie d'exclusion Superdex 75-préparative**

Cette étape de purification consiste à réaliser un tamisage moléculaire. Les différents constituants de l'échantillon sont séparés selon leurs poids moléculaire. Le fractionnement de la Superdex 75 se situe entre  $3 \cdot 10^3 \text{ Da}$  et  $7 \cdot 10^4 \text{ Da}$ . La solution protéique obtenue après purification sur Q Sepharose est chargée sur une colonne Superdex 75 16/60 prep-grade (Amersham-Pharmacia Biotech ; diamètre 1,6 cm ; hauteur 60 cm ; volume 124 ml) équilibrée avec le tampon A (Tris-HCl 10 mM pH 7,6), puis éluee avec ce même tampon à un débit de  $0,6 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ . Des fractions de 2,5 ml sont collectées puis analysées sur gel d'électrophorèse. Les fractions sont analysées par spectroscopie UV-visible de la même façon que décrit précédemment puis rassemblé selon un rapport  $\text{Abs}_{280\text{nm}} / \text{Abs}_{503\text{nm}} < 5$ . Les échantillons sont ensuite aliquotés, congelés dans l'azote liquide et stockés à  $-80^\circ\text{C}$ . Les protéines obtenues sont pures à 95 %.

### **IV.3. Détermination de l'état oligomérique de la protéine**

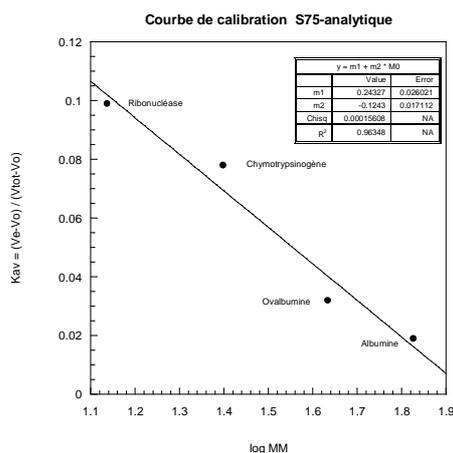
Afin de connaître l'état oligomérique des protéines, un échantillon de protéine obtenu après purification est passé sur une colonne de tamisage moléculaire Superdex-75-analytique. En fonction du volume à laquelle la protéine est éluee, on peut connaître la forme oligomérique de la protéine. La colonne est préalablement calibrée grâce à différentes protéines de taille connue dans la gamme de poids moléculaire recherchée. Le Tableau 3 rassemble les différentes protéines de calibration, le volume d'élution sur Superdex 75 analytique et leurs masses moléculaires.

	Volume d'élution (ml)	Masse moléculaire (kDa)
Bleu Dextran	7,5	-
Albumine	8,5	67
Ovalbumine	9,2	43
Chymotrypsinogène	11,6	25
Ribonucléase	12,7	13.7

**Tableau 3 :** Volume d'élution sur superdex-75-analytique et masse moléculaire des protéines de calibration.

Les protéines sont éluées sur 1 volume colonne (60 ml) avec du tampon Tris-HCl 50 mM, 0,05 M NaCl, à un débit de 0.6 ml.min<sup>-1</sup>.

Les données obtenues servent à construire une courbe de calibration  $K_{av}$  en fonction du log de la masse moléculaire log(MM) (Figure 35) avec :  $K_{av} = (V_e - V_0) / (V_{tot} - V_0)$   
Avec  $K_{av}$  : constante,  $V_e$  : Volume d'élution,  $V_0$  : Volume mort (volume du bleu dextran),  $V_{tot}$  : Volume de la colonne (60 ml).



**Figure 35 :** courbe étalon de calibration de la colonne S-75-analytique.

Le volume d'élution de la protéine d'intérêt est comparé à cette courbe, ce qui permet de déterminer son éventuel état oligomérique.

## IV.4. Analyse biochimique

### IV.4.1. Electrophorèse de protéine : SDS-PAGE

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide, en conditions dénaturantes, permet de séparer les protéines en fonction de leurs poids moléculaires, d'estimer la masse moléculaire

de leurs chaînes polypeptidiques et d'apprécier leurs degrés de pureté. Cette technique est également utilisée avec des cellules entières afin de contrôler la surexpression d'une protéine d'intérêt. Le SDS est un détergent qui se fixe sur les protéines et rompt les interactions protéines-protéines. Chaque molécule de SDS apporte une charge négative lorsqu'elle se lie à la protéine. Ainsi la charge globale est beaucoup plus grande que la charge nette de la protéine. On peut alors considérer que la charge est la même pour toutes les protéines. La mobilité électrophorétique d'un mélange de protéine ne dépend alors que de la masse de chacune puisque leurs charges est uniformément négatives en présence de détergent.

▣ **Préparation des échantillons** : Les échantillons protéiques sont dilués dans 4 volumes de tampon de dénaturation (100 mM Tris-HCl pH 6,8 ; 4% SDS ; 20 % glycérol ; 0,2 % bleu de bromophénol). Afin de compléter la dénaturation, les échantillons sont chauffés à 95°C pendant 5 minutes. En ce qui concerne les cellules, 1 ml de culture est centrifugé à 13000 rpm pendant 5 min, puis le culot bactérien est repris dans 80 µl de tampon de dénaturation et chauffé 15 min à 95°C, puis déposé sur gel.

▣ **Conditions de migration et révélation des protéines** : La composition des gels de polyacrylamide utilisés est indiquée dans le Tableau 4. La migration est effectuée sous une tension de 180 V, à 45 mA et pendant 60 min, dans le tampon de migration 1X (3 g.l<sup>-1</sup> Tris-base ; 14.4 g.l<sup>-1</sup> Glycine ; 1g.l<sup>-1</sup> SDS).

Solutions	Gel de Séparation	Gel de concentration
Acrylamide 30% / Bis-acrylamide 8 % (p/v)	3 ml	0.85 ml
Tris-HCl 1M pH 8,8	1,8 ml	-
Tris-HCl 1M pH 6,8	-	0,78 ml
Glycérol 50 %	1,2 ml	-
H <sub>2</sub> O	-	3,4 ml
SDS 10 %	60 µl	50 µl
TEMED	6 µl	6 µl
APS (100 mg.ml <sup>-1</sup> )	30 µl	25 µl

**Tableau 4** : condition de préparation d'un gel acrylamide 15 %.

Après migration, le gel est coloré pendant 15 min avec une solution de bleu de Coomassie (0,25 % bleu de Coomassie ; 45 % éthanol ; 10 % acide acétique ; 10 % glycérol).

Puis la décoloration est effectuée dans une solution contenant 30 % d'éthanol, 10 % d'acide acétique et 5 % de glycérol. Le poids moléculaire des protéines est évalué grâce à la présence d'un marqueur de poids moléculaires (MBI fermentas) (Tableau 5) contenant :

Protéines	Source	kDa
β galactosidase	<i>E. coli</i>	116
Bovine Serum albumine	Bovine Plasma	66,2
Ovalbumine	Chicken egg white	45
Lactase Deshydrogénase	Porcine muscle	35
Restriction endonucléase Bsp 98 I	<i>E. coli</i>	25
β lactoglobuline	Bovine milk	18,4
Lysozyme	Chicken egg white	14,4

**Tableau 5 :** Poids moléculaire et source des protéines utilisées pour les marqueurs de poids moléculaire.

#### IV.4.2. Dosages

**▣ Dosage des protéines solubles :** Les protéines sont dosées selon le protocole décrit par M. Bradford (*Bradford 1976*). Cette méthode est basée sur l'adsorption du colorant bleu de Coomassie. En milieu acide ce colorant s'adsorbe sur les protéines et cette complexation provoque un transfert de son pic d'adsorption du rouge ( $\lambda_{\max} = 465 \text{ nm}$ ) vers le bleu ( $\lambda_{\max} = 595 \text{ nm}$ ). La Sérum Albumine Bovine est utilisée comme référence pour la réalisation de la gamme étalon. A 5 et 10  $\mu\text{l}$  de solution protéique contenant 0 à 10  $\mu\text{g}$  de protéine, on ajoute 1 ml de solution du réactif de Bradford (Bio-Rad) dilué au 1/5. L'absorbance est alors lue à 595 nm, contre un témoin sans protéine.

**▣ Dosage spectrométrique sur les SOR natives et les mutants de *D.baarsii* :** La protéine purifiée se caractérise par un spectre d'absorption de 250 nm à 900 nm dans du tampon Tris-HCl 10 mM pH 7,6. Ce spectre est celui de la forme semi-réduite de la protéine : le centre I oxydé présente une bande d'absorption à 503 nm. Le centre II est réduit et ne présente pas de bande d'absorption dans le visible (*Moura et al. 1990 ; Lombard et al. 2000a*). L'ajout d'un fort oxydant,  $\text{H}_2\text{O}_2$  ou  $\text{K}_2\text{IrCl}_6$  (iridium IV), le plus utilisé durant cette étude, permet l'oxydation du centre II. Du fait de son instabilité en solution, il est nécessaire d'ajouter 3 équivalents d'iridium par rapport à la protéine pour permettre une oxydation totale de la SOR. Un spectre de différence entre la protéine totalement oxydée et la protéine semi-réduite permet de visualiser le centre II oxydé, qui représente une large bande d'absorbance centrée autour de 650 nm.

Inversement, le site actif de la SOR (centre II) peut être réduit par 1 équivalent d'ascorbate de sodium. Le centre I peut être réduit par le dithionite en anaérobie.

La bande à 503 nm nous permet d'obtenir la concentration en centre I et donc de la SOR présente dans la solution pour la forme semi-réduite ( $\epsilon = 4400 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ).

## IV.5. Etudes en fonction du pH

Une gamme de pH est réalisée grâce à différentes solutions de tampon : tampon acétate pH 5,5 et 5,5, tampon phosphate pH 6,5 ; 7 ; 7,6, tampon Tris-HCl pH 7,6 ; 8,1 ; 8,5 ; 8,8 et tampon glycine-NaOH pH 9,1 ; 9,5 ; 9,8 ; 10,2 ; 10,5.

### IV.5.1. Stabilité des SORs en fonction du pH

La stabilité des protéines est suivie sur 30 min d'incubation dans les solutions de tampon 10 mM à un pH donné. Une caractérisation spectrale est effectuée à différents intervalles de temps  $t$  (0, 1, 5, 10 et 30 min). Les spectres UV-visible des formes semi-réduites et oxydées sont enregistrés et comparés sur la durée.

### IV.5.2. Détermination du pKa des mutants

Lorsque l'on augmente le pH de 5 à 10,5, la bande d'absorption du Centre II est décalé autour de 660 nm (*Nivière et al. 2004*). Cette longueur d'onde est utilisée pour la titration pH, afin de déterminer le pKa associé à l'échange de proton au niveau du site actif de la protéine. Pour cela, 10 mM de tampon sont ajoutés à 50  $\mu\text{M}$  de SOR et l'oxydation du centre II se fait grâce à l'ajout 3 équivalents de  $\text{K}_2\text{IrCl}_6$ . Le spectre UV-Visible est réalisé immédiatement. La courbe de titration ( $\text{Abs}_{660\text{nm}}$  en fonction du pH) est modélisée par l'équation suivante :  $A_{660} = (A_{660} + A_{600} \times 10^{(\text{pH} - \text{pKa})}) / (1 + 10^{(\text{pH} - \text{pKa})})$ . Cette équation correspond à un processus d'échange à un proton.

## IV.6. Titration Redox

Les titrations redox de la SOR sont réalisées à 18°C, en conditions anaérobies, en mesurant le potentiel redox associé à chaque changement d'absorption du centre I (à 503 nm)

et du centre II (à la valeur du  $\lambda$  max de chaque SOR). Les mesures sont réalisées avec un spectrophotomètre à barrette de diode équipé d'une cuve conçue spécialement pour avoir une agitation constante de la solution. Les potentiels redox sont mesurés grâce à une microélectrode Pt-Ag/AgCl/KCl (3M) par rapport à l'électrode de référence à hydrogène. La solution protéique à 50  $\mu$ M de SOR dans 50 mM de tampon Tris-HCl pH 5 ou pH 7,6 est complétée de médiateurs à 2  $\mu$ M chacun : Ferrocène (+ 422 mV), 2,5-diméthyl-p-benzoquinone (+ 180 mV), duroquinone (+ 5 mV), 1,4 benzoquinone (+ 280 mV), N, N'-diméthyl-p-phenylenediamine (DMPD) (+ 371 mV). Les médiateurs servent à balayer l'ensemble de la gamme de potentiel de la protéine. La SOR sous sa forme semi-réduite (centre I oxydé et centre II réduit) est tout d'abord oxydée par étape, par addition de petites quantités de  $K_2IrCl_6$ , puis réduite par étape, par addition de petites quantités de dithionite de sodium. Après chaque addition, la solution protéique est laissée 5 minutes afin d'atteindre l'équilibre thermodynamique. Le potentiel obtenu est alors attribué à une valeur d'absorbance lue sur le spectre qui correspond à l'état d'oxydation de la SOR à ce moment précis. Ces valeurs sont alors reportées sur un spectre représentant la normalisation de la variation d'absorbance (NAV) à 503 nm pour le centre I et à  $\lambda_{max}$  pour le centre II en fonction du potentiel redox corrigé de la valeur de l'électrode de référence + 207 mV. La courbe obtenue est alors modélisée par l'équation obtenue à partir de l'équation de Nernst :

$$NAV = (NAV_{max} - NAV_{min}) / (1 + 10^{((-E-E^{\circ}) * n) / (0.06 * \Delta E)})$$

#### IV.7. Test d'activité

L'oxydation du site actif peut se faire aussi par son substrat naturel : le superoxyde  $O_2^{\bullet -}$ . Le radical superoxyde peut être généré de 3 façons différentes :

**▮ Par une source enzymatique continue telle que le système Hypoxanthine/Xanthine Oxydase :** en présence de xanthine et d'oxygène, la xanthine oxydase forme des radicaux  $O_2^{\bullet -}$  (30 %) et du peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$  (70 %) qui peut être éliminé par l'ajout de catalase (Bray 1961). La vitesse d'oxydation du site actif est alors proportionnelle à la quantité de xanthine oxydase présente dans le milieu réactionnel.

**▮ Par une source chimique ponctuelle :** le superoxyde de potassium  $KO_2$  est soluble et stable dans un mélange DMSO/DMF 2 :1 anhydre en présence d'éther couronne 18-6 (30

mM). La concentration en  $O_2^{\cdot-}$  peut être déterminée par spectrophotométrie UV-visible à 265 nm, avec un coefficient d'extinction molaire  $\epsilon = 2000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  (Valentine and Curtis 1975).

▮ **Par radiolyse de l'eau** : elle permet de générer une quantité définie de radical superoxyde dans un temps très court (Schuler et al. 1980; Favaudon et al. 1990).

▮ **La radiolyse pulsée** est réalisée en collaboration avec le professeur Chantal Houée-Levin et le docteur Vincent Favaudon à l'institut Curie d'Orsay. La durée de vie des radicaux provenant de la radiolyse de l'eau n'excède pas quelques microsecondes. Pour pouvoir identifier ces radicaux en temps réel et déterminer leurs vitesses de réaction avec des composés chimiques, il est nécessaire d'utiliser une technique spécifique : la radiolyse pulsée. L'appareil de radiolyse est composé d'une source de rayonnement ionisant provenant d'un accélérateur linéaire d'électrons, d'un oscilloscope digital afin d'enregistrer les données à différentes longueurs d'ondes, d'un porte échantillon pouvant contenir des cuvettes de 2 cm de trajet optique.

Les radicaux libres sont générés au niveau de la solution aqueuse renfermant la protéine, par l'application d'un pulse d'électrons à haute énergie de 200 ns à 2  $\mu\text{s}$  provenant de l'accélérateur d'électron. Le superoxyde est obtenu pur en solution en moins de 1  $\mu\text{s}$  en présence d'un excès de formiate et d'oxygène. La dose par pulse est ici entre 4,5 et 27 Gy soit une concentration en superoxyde entre 3 à 16,5  $\mu\text{M}$  (rendement radiolytique :  $6,2 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{J}^{-1}$ ).

La solution protéique (100  $\mu\text{M}$ ) saturée en oxygène, dans 2 mM des différents tampons utilisés, de catalase aux pH basiques, et de 10 mM de formiate. La réaction est suivie spectrophotométriquement, entre 450 et 750 nm, à 20°C dans une cuvette de 2 cm de trajet optique spécialement conçue pour ce type d'expérience. Les traces cinétiques sont analysées en utilisant un algorithme Levenberg-Marquardt du logiciel Kaleidagraph®.

#### IV.8. Test turn over NADPH / Hypoxanthine / XO

Il s'agit de déterminer l'activité NADPH: superoxyde réductase de la SOR (Coulter and Kurtz 2001). Pour cela l'oxydation du NADPH est suivie à 340 nm dans une cuvette spectrophotométrique de 1 ml contenant 50 mM de tampon Tris-HCl pH 7,6, 200  $\mu\text{M}$  de NADPH, 500  $\text{U} \cdot \text{ml}^{-1}$  de catalase, 500  $\mu\text{M}$  d'hypoxanthine et 1  $\mu\text{M}$  de flavodoxine réductase

de *E. Coli* (Fpr), à température ambiante. Après 30 s, 1  $\mu\text{M}$  de SOR sauvage ou mutante est ajouté et après 90 s, une quantité de xanthine oxydase (XO) produisant un flux de superoxyde de 22  $\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$  est ajoutée.

L'hypoxanthine et la xanthine oxydase ont pour but de former du superoxyde. Ce dernier est immédiatement utilisé par la SOR afin de produire du peroxyde d'hydrogène qui est immédiatement éliminé par l'action de la catalase. Le site actif de la SOR est alors sous sa forme oxydé ( $\text{Fe}^{3+}$ ). La présence de la FpR ainsi que du NADPH va permettre la réduction du Fer et donc l'activité catalytique de la SOR (Figure 36).

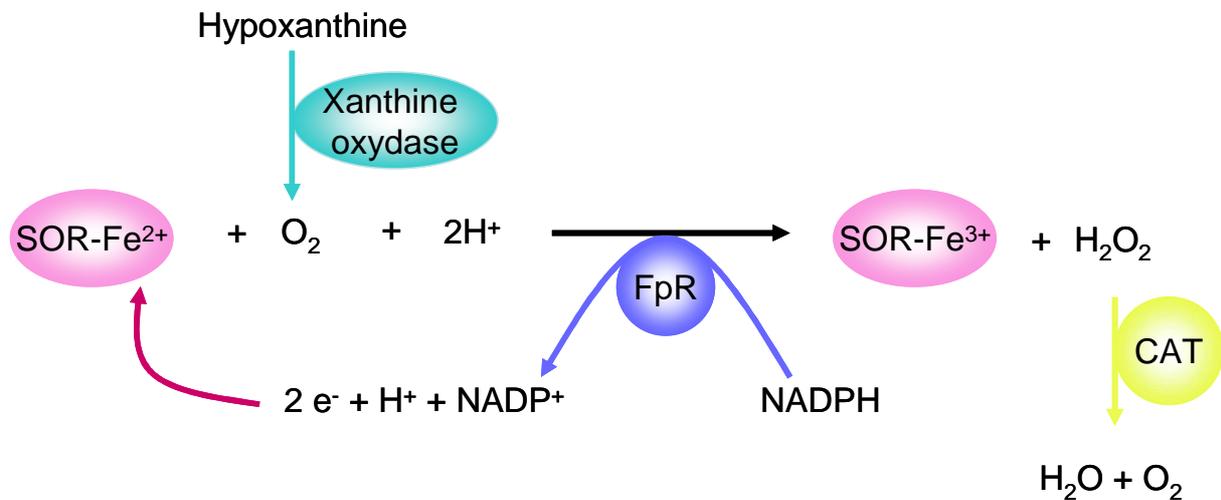


Figure 36 : Mécanisme d'action du test turn over NADPH / Hypoxanthine / Xanthine oxydase

## V. Méthodes spectroscopiques

### V.1. Spectroscopie UV-Visible

Il se peut qu'une substance absorbe de la lumière dans le domaine du proche infra rouge, du visible et de l'ultra-violet, l'énergie absorbée provoque alors des perturbations dans la structure électronique des atomes, ions ou molécules. Un ou plusieurs électrons utilisent cette énergie pour sauter d'un niveau de basse énergie (état électronique fondamental  $s_0$ ) à un niveau de plus haute énergie (état électronique excité  $s^*$ ) (Figure 37).

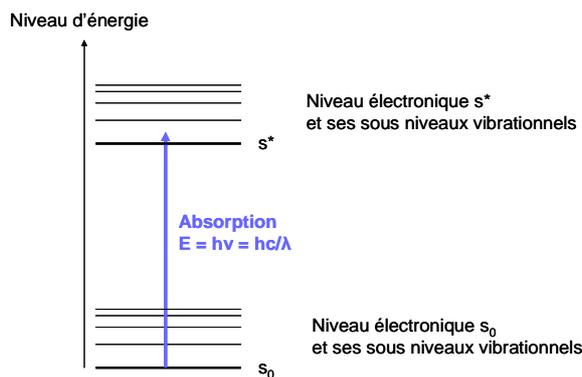


Figure 37 : Phénomène d'absorption des photons

L'énergie d'un photon absorbé lors d'une transition entre deux niveau d'énergie est donnée par la relation  $E = h\nu$  où  $h$  est la constante de Planck et  $\nu$  la fréquence du photon ( $\nu = 1/\lambda$  avec  $\lambda$  correspondant à la longueur d'onde). Les molécules biologiques qui absorbent sont celles qui possèdent des doubles liaisons conjuguées, des noyaux aromatiques (pic d'absorption à 280 nm) et celles qui contiennent un métal de transition.

Pour les complexes de métaux de transitions dans les protéines, il existe plusieurs types de bandes d'absorption :

▣ **Les bandes de transition entre les orbitales** : certaines sont permises  $s \leftrightarrow p$ ,  $p \leftrightarrow d$  et  $d \leftrightarrow f$  ; d'autres sont interdites :  $s \leftrightarrow d$ ,  $p \leftrightarrow f$ ,  $s \leftrightarrow s$ ,  $p \leftrightarrow p$ ,  $d \leftrightarrow d$ . Dans les complexes de métaux de transitions, il est possible d'observer des bandes de transition  $d \leftrightarrow d$  dans le visible. Ces bandes sont, en général, de faible intensité.

▣ **Les bandes de transfert de charge** : ce sont en général des bandes assez intenses. Au cours de l'excitation, l'électron passe d'un atome à un autre provenant de son environnement le plus proche. Dans les complexes avec les métaux de transitions, on peut distinguer surtout deux catégories de transitions de transfert de charge :

▣ **LMCT ou bande de transfert de charge du ligand vers le métal**. Un électron  $\sigma$  ou  $\pi$  du ligand est transféré à une orbital métallique.

▣ **MLCT ou bande de transfert de charge du métal vers le ligand**. Un électron métallique est transféré à une orbitale localisé sur le ligand. Cette transition correspond à l'oxydation du métal et à la réduction du ligand.

Les transferts de charges ligand  $\rightarrow$  métal (LMCT) sont en général plus faciles, donc de plus faibles énergies (hautes  $\lambda$ ), puisque la charge formelle sur l'ion métallique augmente.

Inversement, les transferts de charge métal  $\rightarrow$  ligand (MLCT) sont plus difficiles, donc de plus hautes énergies (faible  $\lambda$ ).

De façon générale, en biologie, la spectroscopie d'absorption UV-visible permet d'identifier et de quantifier un cofacteur protéique.

Dans le cas de la SOR qui comprend une liaison Fe-S, le transfert de charge du soufre vers le fer provoque des absorptions entre 300 et 700 nm. Ces mesures d'absorption varient en fonction du type de liaison fer-soufre et même si ces bandes d'absorption sont relativement large, la position de leur maximum ainsi que la forme générale du spectre fournissent des renseignements sur la nature du centre Fe-S.

Les spectres d'absorption ont été enregistrés dans les cuves en quartz de 1 cm de trajet optique. Les études en aérobiose ont été réalisées avec un spectrophotomètre Cary 1 Bio (Varian), et les spectres en conditions anaérobies ont été enregistrés avec un spectrophotomètre à barrette de diode Uvikon XL (Bio-Tek instruments) relié par des fibres optiques à la cuve placée à l'intérieur de la boîte à gants.

## V.2. Spectroscopie Infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)

La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (ou FTIR : Fourier Transformed InfraRed Spectroscopy) est basée sur l'absorption d'un rayonnement infrarouge par le matériau analysé, ici la solution protéique. Elle permet via la détection des vibrations caractéristiques des liaisons chimiques, d'effectuer l'analyse des fonctions chimiques présentes dans la protéine.

Lorsque l'énergie apportée par le faisceau lumineux (longueur d'onde) est voisine de l'énergie de vibration de la molécule, celle-ci va absorber le rayonnement. Ainsi la diminution de l'intensité réfléchié ou transmise est enregistrée. Le domaine d'énergie de vibration des molécules correspond au domaine infrarouge entre  $4000\text{ cm}^{-1}$  et  $700\text{ cm}^{-1}$  ( $2,5 - 25\text{ }\mu\text{m}$ ). Toutes les vibrations ne donnent pas lieu à une absorption, cela dépend de la géométrie de la molécule.

Les mesures se font grâce à un spectromètre à transformée de Fourier qui envoie sur l'échantillon un rayonnement infrarouge et mesure les longueurs d'onde et les intensités auxquelles la solution protéique absorbe.

Les spectres FTIR sont enregistrés à une résolution de  $4\text{ cm}^{-1}$  avec un spectromètre Bruker 66 SX.

Les expériences sont réalisées en collaboration avec le docteur Catherine Berthomieu au CEA à Cadarache.

### **V.3. Spectroscopie de résonance paramagnétique électronique : RPE**

La spectroscopie RPE permet d'étudier les espèces dites paramagnétiques qui contiennent un ou plusieurs électrons non appariés. L'entité paramagnétique est placée dans un champ magnétique  $H$  variable et reçoit une onde électromagnétique d'énergie  $h\nu$ . Lorsque l'énergie  $h\nu$  de l'onde est égale à l'énergie nécessaire pour permettre la transition entre deux états de spin de l'électron (dont la levée de dégénérescence est permise par le champ magnétique), il se produit le phénomène de résonance paramagnétique électronique. L'énergie de transition est égale à  $g\beta H$ , où  $g$  correspond au facteur de Landé ( $g_e = 2,0023$  pour l'électron libre) et  $\beta$  au magnéton de Bohr. L'électron non apparié dans une orbitale moléculaire possède un facteur  $g$  dont la valeur diffère de celle de  $g_e$  en fonction du centre paramagnétique et de son environnement moléculaire. Le facteur  $g$  est anisotrope, ce qui signifie qu'il est assimilable à une grandeur tensorielle définie par trois composantes  $g_x$ ,  $g_y$  et  $g_z$ . Ces trois composantes correspondent aux points d'inflexion et à l'extremum du spectre d'absorption enregistré au cours du balayage des valeurs du champ magnétique. En fait, le spectre obtenu expérimentalement est la dérivée du signal d'absorption pour laquelle la détermination des valeurs de  $g$  est plus précise.

Appliquée à l'étude des centres à fer des protéines, la RPE nous informe sur le type de centre, sur sa géométrie et sur l'état redox du fer.

#### ***Préparation des échantillons***

Les mesures ont été effectuées sur des échantillons congelés de 200  $\mu\text{L}$  de protéine à une concentration de 100  $\mu\text{M}$ . Les spectres RPE ont été enregistrés grâce à un spectromètre Bruker ESP 300 E équipé d'un cryostat qui permet d'atteindre la température de l'hélium liquide.

Les expériences de RPE sont réalisées en collaboration avec le Dr Geneviève Blondin au CEA à Grenoble.

## V.4. Spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse est une technique de détection extrêmement sensible qui permet de déterminer des structures moléculaires. Elle permet de transformer des molécules dans leur état naturel en ions à l'état gazeux, et d'obtenir leur masse moléculaire  $m$  en analysant leur rapport masse/charge noté  $m/z$ , où  $m$  est la masse du composé et  $z$  sa charge.

Bien qu'il existe plusieurs techniques de spectrométrie de masse, un spectromètre de masse est constitué de cinq parties principales :

- ▣ **Le système d'introduction** qui fait pénétrer l'échantillon dans le spectromètre de masse.
- ▣ **La source d'ions** dans laquelle les molécules sont ionisées après bombardement électronique. Il existe plusieurs méthodes d'ionisation, le choix de celle-ci est directement lié à la nature de l'échantillon et au type d'analyse souhaitée.
- ▣ **L'analyseur** qui réalise le tri des ions fragments en fonction du rapport masse/charge par l'application d'un champ magnétique et/ou électrique.
- ▣ **Un détecteur** qui collecte les ions fragments et amplifie le signal associé aux ions.
- ▣ **Un ensemble informatique de traitement des données** qui permet de transformer les informations reçues par le détecteur en spectre de masse.

Deux types de spectromètre ont été utilisés : le spectromètre ESI-Q-TOF et le spectromètre MALDI-TOF.

Ces deux techniques sont des méthodes d'ionisation douce c'est-à-dire qu'il y a peu de fragmentation des ions moléculaire. Elles sont utilisées pour l'ionisation des molécules de haute masse moléculaire. Elles sont complémentaires. La ionisation MALDI permet d'analyse des échantillons de très faible concentration et à une grande tolérance aux sels et aux tampons mais elle est moins précise que la méthode ESI qui a l'avantage d'utiliser des molécules en solution.

### **Préparation des échantillons**

▣ **Maldi** : l'échantillon protéique est dilué à 10  $\mu\text{M}$  dans du TFA 0,1 %. 1  $\mu\text{l}$  de cette solution est déposé avec 1  $\mu\text{l}$  de matrice acide sinapinique (10  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ; ACN/H<sub>2</sub>O/TFA 50/50/0,1) utilisée pour les protéines.

▣ **ESI-Q-TOF** : *vérification de la masse des mutants* : 5  $\mu\text{l}$  de solution protéique à 1  $\mu\text{M}$  dilué dans 0,2 % de FA (Acide Formique) est injecté dans l'HPLC (micromas CapLC pump, Waters) couplée avec le spectromètre de masse electrospray QTOF.

**Test mutants + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** : à une solution de SOR mutante à 200 µM sont ajoutés 6 équivalents d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Le temps d'incubation est de 3 minutes avant de diluer cette solution au 1/10 avec 0,2 % d'acide formique et d'injecter dans l'HPLC couplée avec le spectromètre de masse electrospray QTOF.

Toutes les expériences de spectrométrie de masse ont été effectuées par Izabel Bérard du laboratoire de Spectrométrie de Masse des Protéines dirigé par Eric Forest (LSMP/IBS/Grenoble).

## V.5. Spectroscopie RAMAN de résonance

Les études de résonance Raman ont été réalisées en collaboration avec le Docteur Alain Desbois du CEA de Saclay.

La spectroscopie Raman est une méthode d'analyse structurale non destructive fondée sur les propriétés vibrationnelles des molécules. Du fait qu'il s'agit d'une technique vibrationnelle, elle permet d'obtenir un degré de résolution élevé pour les informations structurales, notamment des informations sur la nature chimique des ligands du métal, sur leur force de liaison, leurs conformations et/ou leurs configurations ou encore sur les interactions du site actif avec son environnement (liaisons hydrogène etc.)

### **▣ Principe**

Quand la lumière monochromatique, émise par un faisceau laser de fréquence  $\nu_0$ , est propagée à travers un matériel isotrope (gaz, liquide ou solide) que constitue notre échantillon, cette lumière est en partie réfléchiée, absorbée, transmise et enfin une partie généralement faible est diffusée. La diffusion Raman est un processus à très faible rendement par rapport à la diffusion sans changement de longueur d'onde  $\nu_0$ , diffusion Rayleigh ou diffusion élastique. La diffusion Raman ou diffusion inélastique est caractéristique de l'énergie des sous-niveaux vibrationnels de la molécule (*Spiro and Czernuszewicz 1995*).

La spectroscopie Raman de résonance est un cas particulier où la longueur d'onde du faisceau laser correspond à une bande d'absorption UV-Visible, transition électronique permise de la molécule étudiée. Dans ce cas il y a une exaltation de l'effet Raman qui peut aller jusqu'à  $1 \times 10^6$ . Notons que toutes les bandes du spectre Raman ne sont pas exaltées au

même niveau. Les bandes qui présentent le plus fort degré d'exaltation sont celles qui correspondent aux vibrations (dans l'état électronique fondamental) qui miment la distorsion de l'état électronique excité avec lequel on est en résonance. Par exemple, si le spectre Raman de résonance d'un centre Fe-S est excité par un faisceau laser en résonance avec une bande de transfert de charge  $S \rightarrow Fe^{3+}$ , nous attendons une plus forte exaltation des modes de vibration Fe-S, car la transition électronique est dans la direction de S vers le  $Fe^{3+}$ .

Donc lorsque la longueur d'onde d'excitation du faisceau laser coïncide avec la bande d'absorption UV-visible du chromophore d'intérêt (pour nous les sites métallique), l'effet Raman est amplifié, c'est la spectroscopie Raman de résonance. Lorsque la longueur d'onde d'excitation approche seulement la bande d'absorption UV-Visible du chromophore, une faible exaltation en pré-résonance est observée.

De plus, le déplacement de ces bandes Raman nous donne des informations sur la force d'une liaison. En effet le déplacement d'une bande vers les plus hautes fréquences est attribué à un renforcement de la liaison concernée. Et inversement, lorsqu'on observe le déplacement d'une bande vers les plus basses fréquences, ceci est attribué à un affaiblissement de la liaison. Chaque bande correspond à la vibration d'une ou plusieurs liaisons.

### **▣ Les vibrations moléculaires**

Les molécules comportent des modes normaux de vibrations (mouvement vibrationnels simples) dans lesquels tous les atomes ou groupes d'atomes se déplacent simultanément, sans modifier le centre de gravité de l'édifice moléculaire (*Spiro and Czernuszewicz 1995*). Ce sont des mouvements dans le plan. Elles comportent également des modes de vibrations plus complexes qui se situent en dehors du plan de la molécule.

Il existe plusieurs types de vibrations :

**Dans le plan :** on distingue l'élongation ( $\nu$ ) et la déformation angulaire ( $\delta$ ) qui peuvent être soit symétrique ( $\delta_s$  et  $\nu_s$ ), soit antisymétrique ( $\delta_{as}$  et  $\nu_{as}$ ) se traduisant respectivement par des mouvements de cisaillement ou de rotation des trois atomes formant l'angle  $\theta$  (Figure 38).

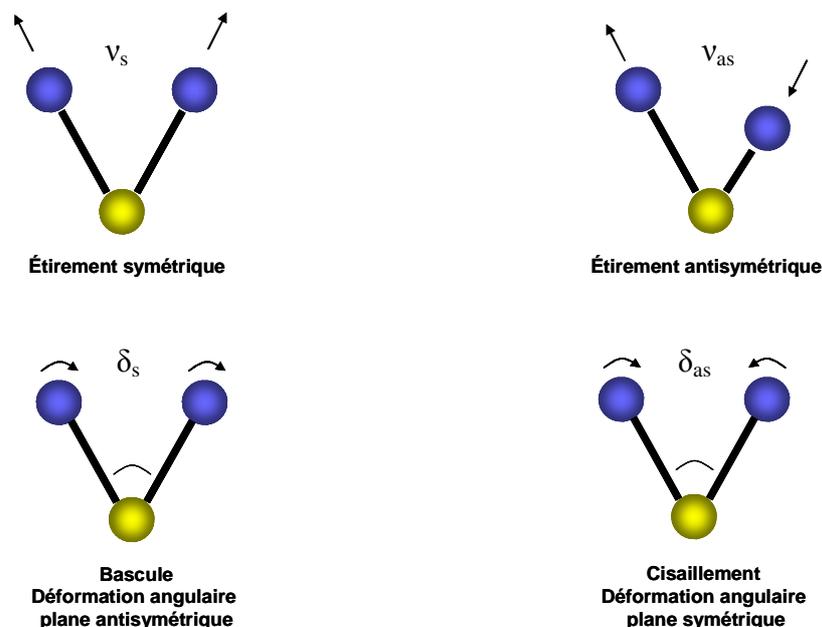


Figure 38 : Vibration moléculaire dans le plan.

**Hors du plan** : ce sont des déformations angulaires hors d'un plan moléculaire pouvant induire un mouvement collectif de la molécule et pouvant être également symétriques ( $\gamma_s$ ) ou antisymétriques ( $\gamma_{as}$ ) qui correspondent à des mouvements de torsion ou de balancement (Figure 39).



Figure 39 : Vibration moléculaire hors du plan.

Les modes de vibrations peuvent se combiner et donner différentes bandes Raman ne correspondant pas à des modes purs. Par exemples dans les cas où il y a des couplages forts, certaines bandes Raman ne sont pas dues à des modes purs mais sont le reflet de combinaisons des modes de déformations et/ou d'élongation.

#### ▣ Apport de cette technique pour notre étude

La spectroscopie Raman de résonance est une technique structurale qui permet l'exploration des sites actifs de métalloprotéines. Particulièrement dans l'étude des protéines

métallo sulfurées dans lesquelles les transitions électroniques (LMCT)  $S \rightarrow Mn^+$  sont exploitées. Le spectre Raman de ces protéines présente des bandes dans la région spectrale entre 300 et 600  $cm^{-1}$  correspondant à la transition électronique du transfert de charge du soufre vers le  $Fe^{3+}$ . Les modes de vibrations S- $Fe^{3+}$  sont prédominant au niveau du spectre RR. Cependant, le couplage de ce transfert de charge avec les vibrations de la chaîne polypeptidique de la cystéine conduit à l'observation d'un grand nombre de raies Raman dans cette portion de spectre. Ainsi plus d'une bande Raman est visible pour un transfert de charge  $S \rightarrow Fe^{3+}$ .

La présence de liaison hydrogène ou des autres ligands peuvent être observés. Les espèces peroxydiques présentent un transfert de charge  $O-O \rightarrow Mn^+$  de plus faible énergie entre 520-750 nm (*Girerd et al. 2000*) et des bandes entre 400 et 900  $cm^{-1}$  sont observées en spectroscopies de résonance Raman (*Lombard et al. 2000a*).

## **▣ Protocole**

L'échantillon protéique sous forme liquide est déposé sur une lamelle de verre de diamètre de 2 cm fixée au porte échantillon. Pour permettre une analyse correcte, la concentration finale utilisée lors des analyses des SOR est au minimum de 2 mM. Les résultats présentés ici sont obtenus en majorité à partir d'échantillon ayant une concentration finale comprise entre 3 et 6 mM et tamponnés à 50 mM (Tris-HCl pH 8,5).

Le porte échantillon est ensuite introduit dans le cryostat (STVP-100 Janis research company) maintenu à 10K par circulation d'hélium liquide et par un contrôleur de température. La géométrie d'excitation est de 135° entre le faisceau et le plan de la lamelle. Ceci afin de minimiser l'entrée de lumière parasite dans le spectromètre Raman due à de la lumière réfléchiée par la lamelle. La lumière diffusée est collectée par une lentille placée devant le spectromètre Raman.

La lumière est émise par un laser dont la longueur d'onde est choisie en fonction du spectre d'absorption UV-visible de l'échantillon. Il correspond à une longueur d'onde monochromatique proche du maximum d'absorption UV-visible du chromophore d'intérêt. Nous avons utilisé un laser Krypton ionisé (Coherent Innova Kr+) qui produit une raie à 647,1 nm utilisé pour l'étude du site actif. La puissance du laser est de 50 mW au niveau de l'échantillon.

Les spectres sont obtenus avec un spectromètre T64000 (Jobin Yvon SPEX). L'utilisation de filtres « holographique Notch Filters » à 647,1 nm permet de rejeter le plus

possible de lumière Rayleigh (incidente). Les fentes sont à 100  $\mu\text{m}$  permettant une résolution spectrale  $\leq 3 \text{ cm}^{-1}$ .

Il est relié à un système informatique permettant le pilotage, l'enregistrement et l'accumulation de données. Le rapport signal/bruit est optimisé par variation du temps et du nombre d'accumulation (ici 6 x 30 secondes). Le calibrage s'effectue par la diffusion Rayleigh (à zéro) et par la bande de glace à  $230 \text{ cm}^{-1}$ .

Les spectres contrôles (solvants, tampon, oxydant) seuls, sont réalisés dans les mêmes conditions, et soustraits à ceux des échantillons nécessaires.

Le traitement des spectres s'effectue par le logiciel GRAMS 32 v 5.2 (Glacatic). Celui-ci permet de corriger d'éventuelles dérives de la ligne de base, de soustraire ou de moyennner des spectres, de supprimer des contributions parasites (rayonnement cosmique etc.). Aucun des spectres présentés durant ce travail n'a été lissé pour en réduire le rapport signal sur bruit.

*RÉSULTATS*  
*§*  
*DISCUSSIONS*



## INTRODUCTION

Le site actif métallique de la SOR est atypique non seulement par sa coordination de type  $[\text{Fe-N}(\text{His})_4\text{-S}(\text{Cys})]$  non hémique mais surtout par la position axiale du ligand cystéine par rapport au plan que forment les quatre histidines avec le fer (Adam *et al.* 2004). La réactivité de la SOR avec le superoxyde a été étudiée par de nombreuses équipes. Au début de ce travail aucune étude n'avait démontré expérimentalement l'influence de la cystéine 116 sur la réduction du superoxyde ce qui a donc constitué l'objectif de cette thèse.

Notre approche a été de modifier par mutagenèse dirigée non pas directement cette cystéine mais son environnement. En effet, sa mutation directe en alanine, déjà réalisée auparavant, avait provoqué une démétallation totale du site actif (Silva *et al.* 2001). Or, pour étudier la réactivité de la SOR vis-à-vis du superoxyde, le site actif doit absolument conserver son fer.

Afin de déterminer quels sont les acides aminés intéressants à muter, la structure aux rayons X de la SOR de *D. baarsii* a été étudiée. Au niveau du site actif, elle montre que le groupement carboxylique de la chaîne latérale du glutamate 114 est en interaction dipolaire avec le soufre de la cystéine 116, ligand du fer. Une étude antérieure réalisée au laboratoire sur un mutant de ce glutamate 114 avait donné des premiers résultats intéressants concernant la fonction de la cystéine sur la réactivité de la SOR avec le superoxyde (Mathé *et al.* 2007). Ces résultats sont présentés en annexe.

D'autre part, la structure montre également la présence de deux liaisons hydrogène entre le soufre de la cystéine 116 et les NH des chaînes principales de l'histidine 119 et de l'isoleucine 118, situées dans l'environnement du site actif (Figure 40) (Adam *et al.* 2004). Ces liaisons hydrogène étant susceptibles de moduler la force de la liaison S-Fe, leurs modifications pourraient aussi donner des informations sur la fonction du ligand cystéine dans la catalyse de l'enzyme.

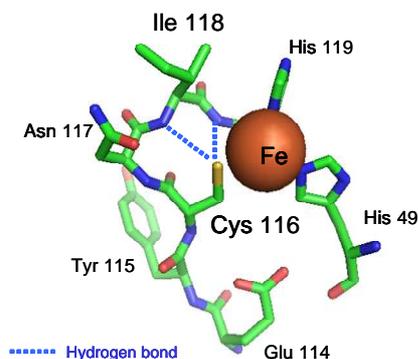
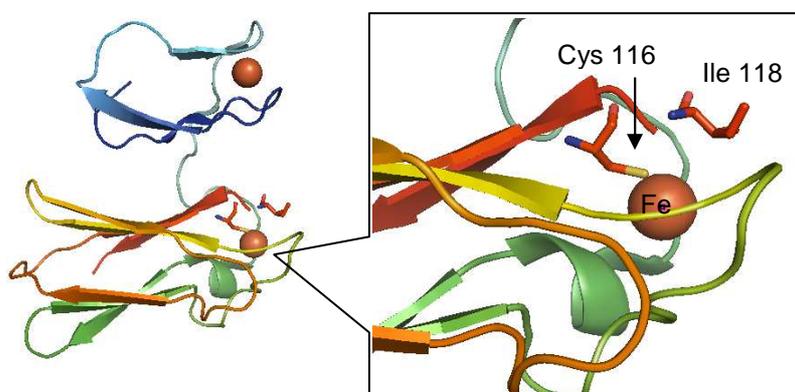


Figure 40 : Structure du site actif de la SOR de *D. baarsii* (Adam *et al.* 2004).

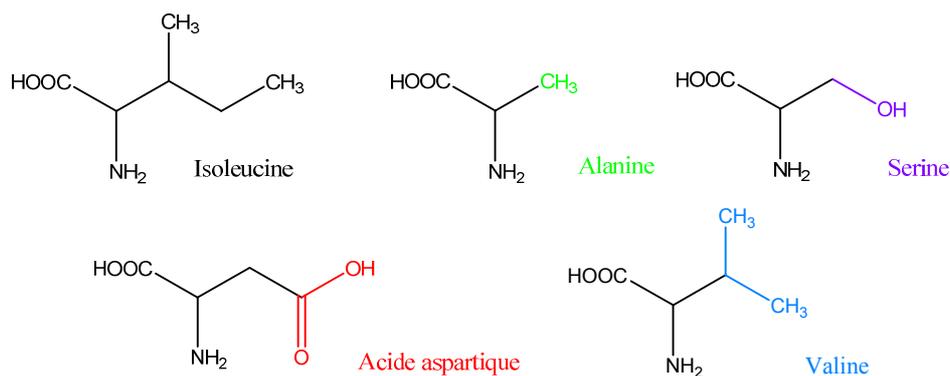
L'histidine 119 étant aussi ligand du fer, sa mutation est susceptible d'entraîner une forte déstabilisation voir même une démétallation du site actif. Un tel phénomène ne permettrait pas d'étudier le rôle de la cystéine.

Le choix s'est alors porté sur l'isoleucine 118. En modifiant la chaîne latérale de l'isoleucine, on peut espérer induire un changement de positionnement de sa chaîne principale, qui pourrait alors affecter la liaison hydrogène entre le NH peptidique et le soufre de la cystéine du site actif. De plus, l'isoleucine 118 se situant à la surface de la protéine, sa mutation ne devrait pas modifier de façon drastique le site actif de la SOR (Figure 41).



**Figure 41** : Localisation de la chaîne latérale de l'isoleucine 118 par rapport au site actif de la SOR de *D. baarsii*.

Quatre acides aminés ont été choisis afin de remplacer l'isoleucine 118. Tout d'abord, l'alanine (A) et la valine (V), présentant une chaîne latérale plus petite composée d'un méthyle pour l'alanine et d'un isopropyle pour la valine. Ces deux mutations permettent d'éliminer partiellement ou complètement l'encombrement stérique dû aux groupements alkyles de la chaîne latérale de l'isoleucine. Ensuite, une mutation en aspartate (D) ajoute une charge négative qui permet la formation éventuelle de liaisons hydrogène supplémentaires avec l'environnement du site actif, tout comme une mutation en sérine (S), par la présence d'un groupement hydroxyle (Figure 42).



**Figure 42 :** Acides aminés choisis pour la mutation de l'isoleucine 118.

Après avoir construit et purifié ces quatre mutants, les études suivantes ont été réalisées :

- ▣ Caractérisation générale des mutants par spectroscopies UV-visible, RPE et spectrométrie de masse.
- ▣ Détermination et comparaison des potentiels redox du fer du site actif, pour chaque mutant.
- ▣ Etudes spectroscopiques plus spécifiques de type résonance Raman et FTIR, afin de déterminer l'impact des mutations sur la structure du site actif.
- ▣ Etudes cinétiques, afin d'analyser l'influence des mutations sur la réactivité de la SOR avec le superoxyde.
- ▣ Etudes de l'effet des mutations sur l'activité de l'enzyme en conditions catalytiques et sur son activité anti-oxydante *in vivo*.



## *PARTIE 1 :*

*Caractérisation des SORS  
mutantes 1118A, 1118D,  
1118S et 1118V*

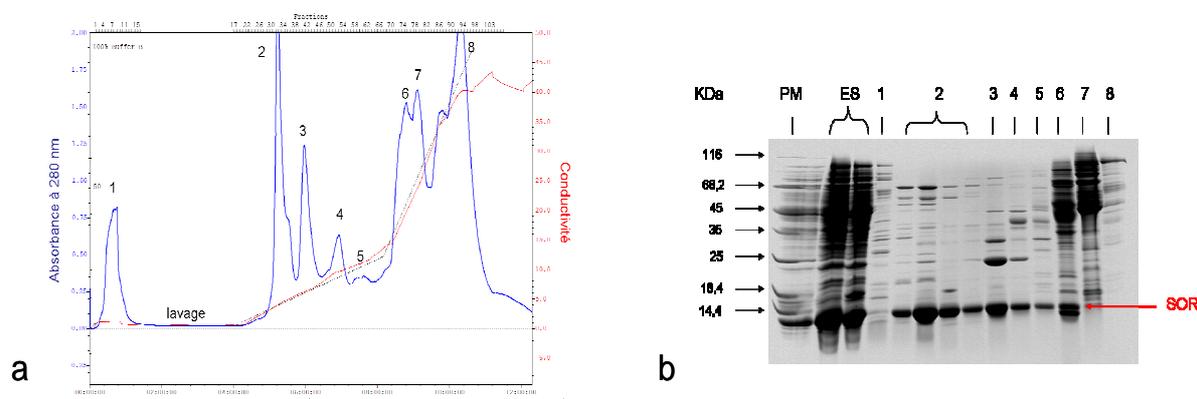


## I. Obtention des protéines mutantes

La mutagenèse dirigée a été réalisée sur le plasmide pMJ25 qui contient le gène de structure de la SOR de *D. baarsii* sous le contrôle du promoteur *ptac*, inductible à l'IPTG (Pianzzola *et al.* 1996). La mutagenèse est effectuée par la technique de PCR afin d'obtenir les plasmides notés pMJ25<sub>I118A</sub>, pMJ25<sub>I118S</sub>, pMJ25<sub>I118D</sub>, pMJ25<sub>I118V</sub> contenant respectivement les gènes codant pour les protéines SOR mutantes I118A, I118S, I118D, I118V. Ces plasmides sont transformés dans la souche de *E. coli* BL21 pour la surproduction des SORs mutés. L'utilisation de cette souche a permis d'augmenter significativement la surexpression de la SOR par rapport à la souche classiquement utilisée DH<sub>5</sub>α (Nivière *et al.* 2004). La surexpression est réalisée dans un milieu minimum M9 complété en source de carbone, acides aminés, vitamines, sels de magnésium, de calcium et de fer.

La SOR était classiquement purifiée par un protocole en deux étapes comprenant une première étape de tamisage moléculaire suivie d'une étape d'échange d'anion (Nivière *et al.* 2004). Pour ce travail, le protocole de purification a été modifié en éliminant les étapes de précipitation lors de la préparation des extraits solubles et en inversant l'ordre des deux étapes de chromatographie. Nous avons réalisé une colonne échangeuse d'anion Q sepharose suivie d'une étape de tamisage moléculaire Superdex 75.

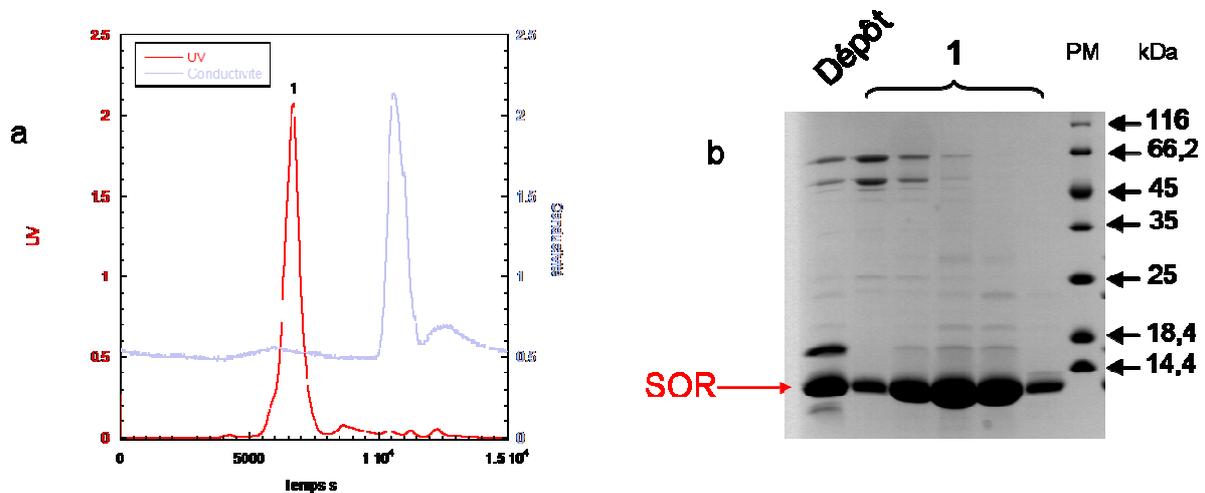
Les extraits solubles obtenus après l'ultracentrifugation sont dialysés puis déposés sur une colonne échangeuse d'anion Q sepharose (Figure 43).



**Figure 43 :** (a) Chromatogramme de l'extrait soluble (SOR sauvage) sur Q sepharose (volume colonne 11 ml). Elution à 1 ml.min<sup>-1</sup> avec un gradient de 0 à 125 mM NaCl pendant 4 heures puis de 125 à 500 mM NaCl pendant 2 heures. En bleu, absorbance à 280 nm, en rouge, conductivité, en noir, pourcentage de tampon B au cours de l'élution. (b) Analyse de l'étape de purification par Q sepharose par SDS page.

La SOR est éluée dans les pics 2, 3, 4 et 5 correspondant à une concentration de NaCl comprise entre 40 et 100 mM. Les spectres UV-visible de ces fractions sont caractéristiques de la présence de la SOR avec une bande d'absorbance à 503 nm. L'analyse par SDS-Page montre que le pic 2 contient une majorité de SOR. Le pic 6 contient lui aussi de la SOR mais en faible quantité et assez contaminée. Les pics 7 et 8 ne contiennent pas de SOR. Les fractions correspondant aux pics 2, 3 et 4 présentant un rapport de pureté  $Abs_{280nm}/Abs_{503nm} < 10$  sont rassemblées.

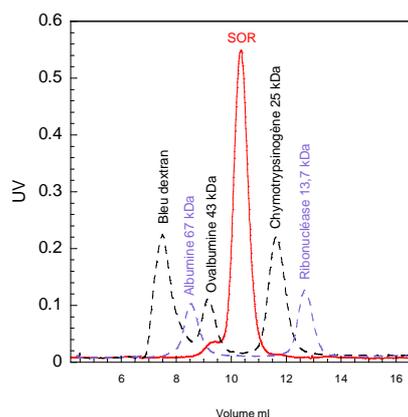
Cette solution est ensuite déposée sur une colonne de tamisage moléculaire Superdex-75 qui sépare de façon optimale les protéines ayant un poids moléculaire entre 3000 et 70000 Da (Figure 44).



**Figure 44 :** (a) Chromatogramme de la sortie de Superdex-75 (volume colonne 120 ml). Elution avec 120 ml de tampon Tris-HCl 10 mM pH 7,6 à 0,6 ml.min<sup>-1</sup>. En rouge, absorbance à 280 nm, en bleu, conductivité. (b) Analyse de cette étape de purification par SDS page.

La SOR est éluée en un pic majoritaire autour de 30000 Da et le gel d'électrophorèse indique que la protéine est pure à environ 95 %. Les fractions présentant un rapport  $Abs_{280nm}/Abs_{503nm} < 5$  sont rassemblées, puis stockées à - 80°C.

L'état oligomérique des SORs mutantes a été vérifié sur une colonne S-75 analytique, calibrée avec des protéines de poids moléculaire connus. Le profil d'éluion est le même pour tous les mutants (Figure 45):



**Figure 45 :** Profil d'élution des SORs mutantes sur colonne S75-analytique (—) et des protéines de calibration (--- et ---). L'élution se fait avec du tampon Tris-HCl 50 mM pH 7,6 + 0,5 mM NaCl à 0,6 ml.min<sup>-1</sup>.

Les protéines SORs mutantes sont éluées sous forme d'un seul pic principal (Figure 45) correspondant à une masse moléculaire de 33 kDa. Les protéines SORs mutantes se trouvent donc toutes sous forme de dimère en solution, comme la SOR sauvage (Lombard et al. 2000a).

## II. Spectrométrie de masse

L'analyse en spectrométrie de masse ESI de la SOR sauvage indique une masse de 14026 Da, correspondant au polypeptide sans la méthionine N-terminale. En effet, *E. coli* possède un système enzymatique excisant le résidu méthionine toujours présent en position N-terminale des protéines exprimées chez les procaryotes.

Le remplacement de l'isoleucine 118 en alanine, valine, serine et aspartate se traduit par une modification de la masse moléculaire (Tableau 6).

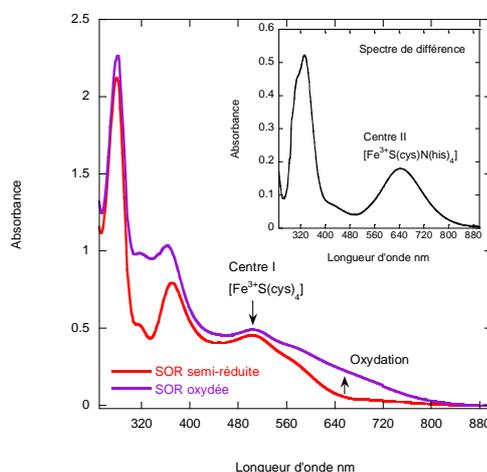
	Masse théorique (Da)	Masse obtenue (Da) (ESI ± 2 Da)
<b>WT</b>	14026	14026
<b>I118A</b>	13984	13983
<b>I118S</b>	13999	13999
<b>I118D</b>	14028	14026
<b>I118V</b>	14012	14011

**Tableau 6 :** Masse moléculaire obtenue en spectrométrie de masse pour les SORs sauvage et mutantes de *D. baarsii*.

L'étude par ESI des mutants purifiés a permis de vérifier que les protéines correspondent bien aux mutations attendues sans la methionine N-terminale. Notons que dans ces conditions d'analyse, les fers de la SOR ne sont pas détectés.

### III.Spectroscopie UV-visible

La SOR de *D. baarsii* est une métalloprotéine contenant deux centres à fer avec des états redox différents en présence d'O<sub>2</sub>. Le spectre d'absorption de la SOR est caractérisé par des bandes de transfert de charge observées dans le visible, correspondant à des transitions électroniques entre les ligands et le fer (Figure 46).



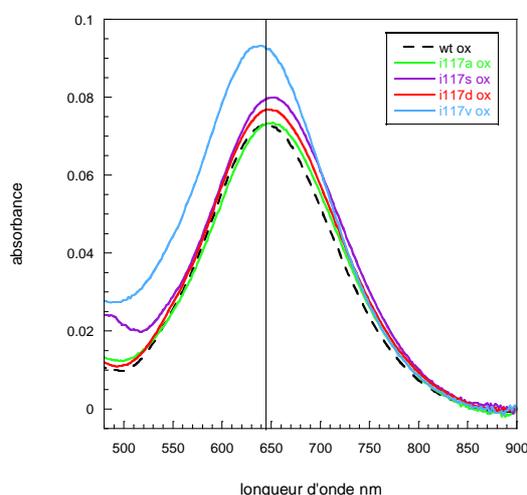
**Figure 46 :** Spectre d'absorption UV-visible de la SOR sauvage de *D.baarsii*, sous forme semi-réduite et totalement oxydée par 3 équivalents de  $K_2IrCl_6$ . La protéine est à 100  $\mu M$  dans du tampon 10 mM Tris-HCl pH 7,6. Figure en médaillon : spectre du site actif obtenu par différence entre le spectre de la forme oxydée ( $K_2IrCl_6$ ) et celui de la forme semi réduite.

La SOR sauvage de *D.baarsii* se trouve sous sa forme semi-réduite [ $Fe^{3+}/Fe^{2+}$ ] après purification. Elle présente une couleur rose due au centre I qui est sous forme oxydé  $Fe^{3+}$ . Le centre II reste à l'état réduit en présence d'O<sub>2</sub> et ne montre pas de bande d'absorption sous cette forme (spectre rouge). Le centre I présente des bandes d'absorption à 370 nm et 503 nm avec un léger épaulement vers 580 nm. Ce spectre est caractéristique d'un centre  $Fe(SCys)_4$  de type rubrédoxine, correspondant à un transfert de charge électronique LMCT [ $SCys_4 \rightarrow Fe^{3+}$ ] (Moura et al. 1990).

Lorsque l'on oxyde la SOR de *D. baarsii* par un fort oxydant,  $K_2IrCl_6$ , ses deux centres se trouvent sous forme oxydée [ $Fe^{3+}/Fe^{3+}$ ]. La SOR est alors de couleur grise (spectre violet).

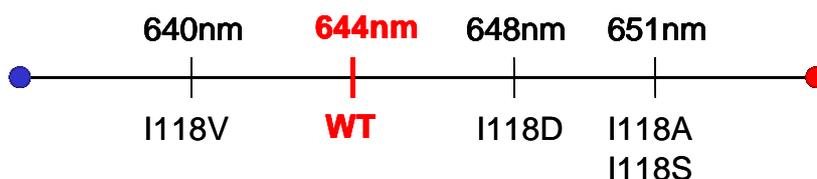
Le spectre de différence entre la forme oxydée [ $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{3+}$ ] et la forme semi-réduite [ $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ ] permet de visualiser le spectre du centre II sous forme ferrique. Il présente deux bandes d'absorption centrées à 330 nm et 644 nm (Figure 46-en médaillon). La bande à 330 nm correspond à un transfert de charge ( $\text{N}(\text{His}) \rightarrow \text{Fe}^{3+}$ ) provenant des histidines en position équatoriale par rapport au fer du site actif. La bande à 644 nm ( $\epsilon = 1900 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  à pH 7,6) correspond à un transfert de charge ( $\text{S}(\text{cys}) \rightarrow \text{Fe}^{3+}$ ) du ligand cystéine (Clay *et al.* 2002a).

Les spectres d'absorption UV-visible des mutants I118 présentent les bandes d'absorption à 370 nm et à 503 nm du centre I, identiques à celles de la SOR sauvage. Le traitement de ces protéines avec un léger excès d'iridium IV permet d'obtenir les spectres des centres II oxydés suivants (Figure 47) :



**Figure 47 :** Spectres visibles du centre II des mutants de l'isoleucine 118 ( $40 \mu\text{M}$ ) obtenus après oxydation totale avec un excès d'iridium (IV), dans du tampon Tris-HCl 10 mM pH 7,6. Ces spectres sont obtenus en soustrayant les spectres des SORs totalement oxydées aux spectres des SORs semi-réduites.

Les bandes d'absorption caractéristiques du site actif pour les 4 mutants sont du même type que celles de la SOR sauvage. Il n'y a donc pas de déstructuration du site actif dans ces quatre protéines mutantes. Cependant, pour chacun des mutants, on observe un déplacement de la longueur d'onde du maximum d'absorption de cette bande de transfert de charge (Figure 48).



**Figure 48 :** Déplacement de la longueur d'onde du maximum d'absorption du site actif des mutants de l'isoleucine 118 par rapport à la SOR sauvage.

Les mutations I118A et I118S déplacent la bande d'absorption de 7 nm vers le rouge, le mutant I118D la déplace de 4 nm vers le rouge et le mutant I118V la déplace de 4 nm vers le bleu, par rapport à la SOR sauvage.

La valeur des coefficients d'extinction molaire au maximum d'absorbance ( $\lambda_{\max}$ ) du centre II des mutants I118A, I118D, I118S et I118V est calculée en prenant comme référence la valeur de l'absorbance à 503 nm ( $\epsilon = 4400 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) et en considérant qu'un monomère de SOR contient 1 fer au centre I et 1 fer au centre II. Les coefficients d'extinction molaire du centre II sont les suivants :  $1900 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  pour le mutant I118A,  $1920 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  pour I118D,  $1925 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  pour I118S et  $2270 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  pour le mutant I118V.

Etant donné que la bande d'absorbance du site actif de la SOR correspond à un transfert de charge soufre-fer, le déplacement de la longueur d'onde des maximums d'absorbance par rapport à la SOR sauvage suggère que les mutations affectent la liaison S-Fe. En effet, la longueur d'onde du maximum de la bande d'absorption ( $\lambda$ ) est directement liée à l'énergie de transition (E) de la liaison S-Fe entre les électrons de la couche p du soufre et les orbitales d du fer par l'équation suivante :  $E = hc / \lambda$  avec  $h =$  constante de Planck et  $c =$  célérité.

Lorsque  $\lambda_{\max}$  est déplacée vers le rouge (I118A, I118S, I118D), l'énergie de transition diminue. Le transfert de charge entre le soufre et le fer pourrait donc être plus favorable. Cela peut être dû au fait que le soufre de ces mutants est plus électrodonneur pour le fer que celui de la SOR sauvage. A l'inverse lorsque  $\lambda_{\max}$  est déplacée vers le bleu (I118V), l'énergie de transition augmente et le transfert de charge du soufre vers le fer pourrait être donc moins favorable. Cela peut indiquer que le soufre du mutant I118V est moins électrodonneur pour le fer que celui de la SOR sauvage.

## IV. RPE

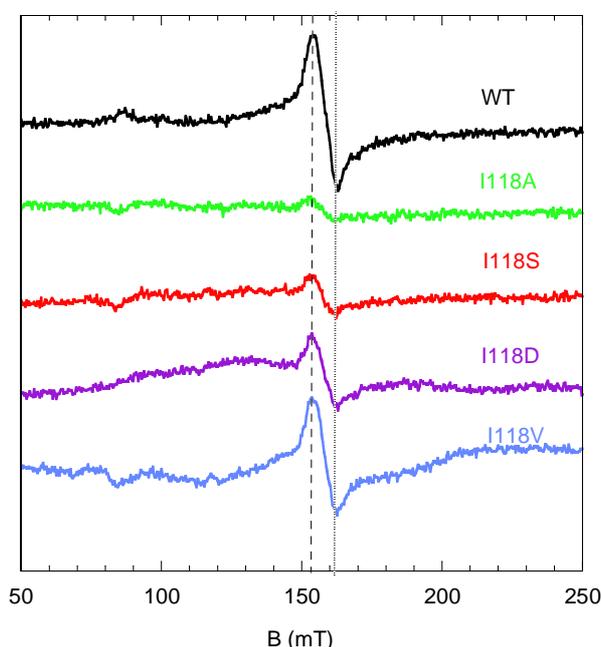
L'étude des spectres RPE permet de définir l'état de spin du fer et certains paramètres de la symétrie du champ des ligands. Si les mutations réalisées sur la SOR entraînent de forts changements dans la géométrie du fer du site actif, leurs spectres RPE pourraient être modifiés.

Pour la SOR semi-réduite, seul le centre I ( $\text{Fe}^{3+}$ ) paramagnétique est observé. Le centre II réduit est diamagnétique et ne donne pas de signal RPE (*Lombard et al. 2000 a*). Il

est donc nécessaire d'oxyder la SOR avec de l'iridium IV pour pouvoir observer par RPE le fer du centre II.

Les spectres RPE ont été obtenus pour les formes semi-réduites et totalement oxydées par l'iridium IV (Figure 49). La contribution du signal haut spin du centre I n'est pas modifiée par les mutations (données non montrées).

Les spectres de la figure suivante (Figure 49) correspondent aux spectres de différence entre la SOR totalement oxydée et la SOR semi-réduite afin d'éliminer la contribution du centre I et de visualiser uniquement le spectre du centre II.



**Figure 49 :** Spectres RPE du centre II oxydé des mutants I118A, I118D, I118S et I118V, en comparaison avec celui de la SOR sauvage de *D. baarsii*. Les protéines (100  $\mu$ M dans 10 mM Tris-HCl pH 7,6) sont oxydées avec 3 équivalents de  $K_2IrCl_6$ . Les spectres sont corrigés de la contribution du centre I. Conditions expérimentales : fréquence : 9,447 GHz, puissance : 1,26 mW, modulation amplitude : 10000G à 100000 kHz, température : 10-13 K.

Pour la SOR sauvage de *D. baarsii*, le signal est de type isotrope, centré à une valeur de  $g = 4,3$  et caractéristique d'un  $Fe^{3+}$  haut spin dans un champ de ligand rhombique (Lombard et al. 2000 a).

Les spectres des mutants I118A, I118D, I118S et I118V présentent également un signal rhombique avec une valeur de  $g = 4,3$ . Les sites actifs des mutants I118 contiennent donc tous un fer haut spin ( $S=5/2$ ), avec une symétrie très faible.

Les mutations réalisées sur l'isoleucine 118 ne modifient donc pas de façon notable la géométrie du site à fer. Cependant, on peut noter que l'intensité des signaux RPE est

différente selon la mutation observée. Les mutants I118A, I118S et I118D présentent un signal à  $g = 4,3$  faible alors que le mutant I118V présente une intensité similaire à celle de la SOR sauvage. Cette différence d'intensité est difficile à interpréter car plusieurs facteurs peuvent rentrer en compte. Des facteurs expérimentaux tels que la différence de diamètre entre les différents tubes RPE utilisés ainsi que la différence de température lors de l'enregistrement (la température est inversement proportionnelle à l'intensité du spectre) peuvent conduire à des différences dans l'intensité du signal. Cependant, ces différences sont généralement assez faibles. Des facteurs propres à l'état redox de la protéine et plus particulièrement au niveau de la concentration du fer oxydé du site actif peuvent faire varier l'intensité du spectre. Cependant, comme cela a été vérifié par spectroscopie UV-visible, la concentration en centre II oxydé, déterminée après l'enregistrement des spectres RPE, est identique pour tous les mutants et correspond bien à la concentration initiale avant la congélation.

Une différence dans les propriétés de relaxation des électrons d'un état excité à un état fondamental entre les mutants et la SOR sauvage pourrait être à l'origine de ces différences d'intensité. Une étude en température sur ces mutants pourrait permettre de vérifier si l'on a ou non saturation du signal RPE dans les conditions de la Figure 49.

En conclusion, la spectroscopie RPE indique que tous les fers des sites actifs des mutants sont haut spin et que la géométrie autour de ces fers est du même type que pour la SOR sauvage.

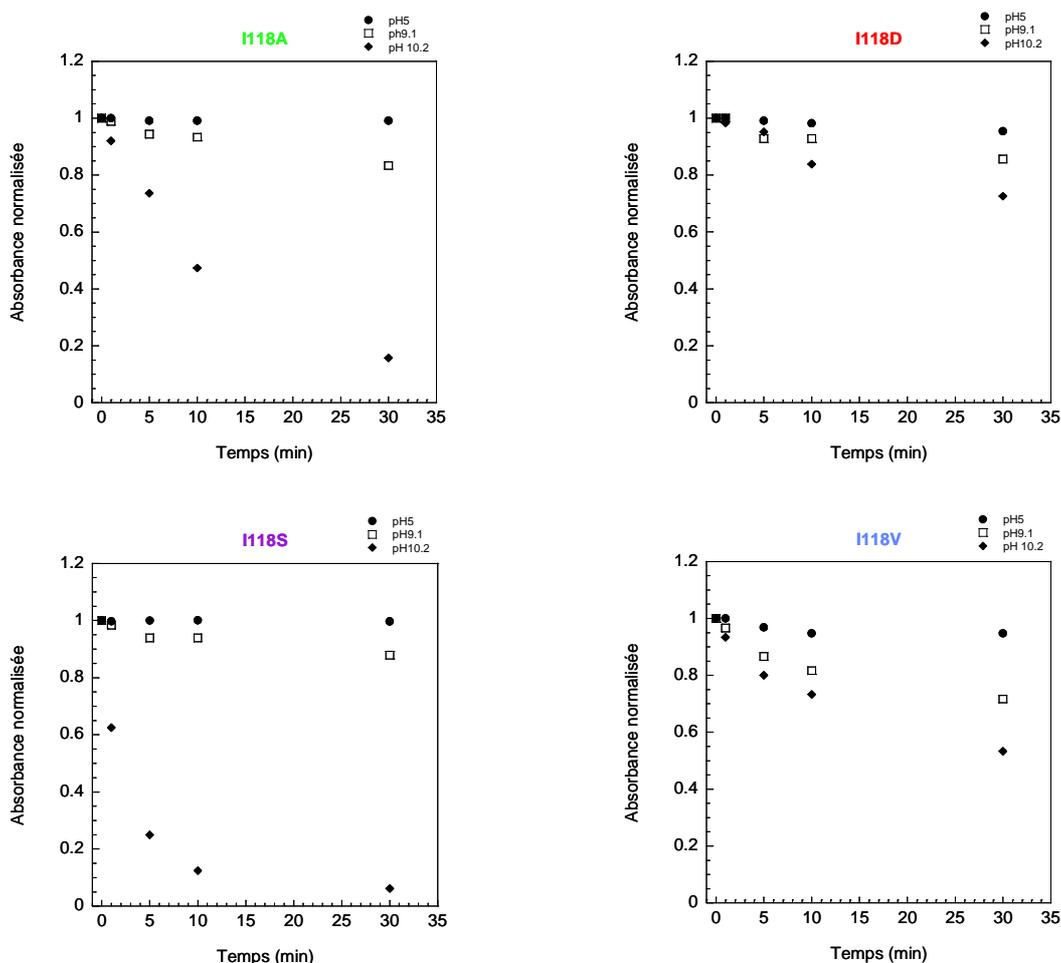
## **V. Stabilité des mutants en fonction du pH et détermination des pKa de la transition alcaline**

### **V.1. Stabilité en fonction du pH**

La stabilité des mutants a été étudiée à différents pH. Ces études ont été réalisées sur les SORs semi-réduites afin de vérifier la stabilité du centre I et sur les SORs totalement oxydées afin de vérifier la stabilité du centre II. Pour cela, l'évolution des spectres UV-visibles des SORs sauvage et mutantes incubées à différents pH de 5 à 10,2, a été suivie pendant 30 minutes.

Les spectres de la forme semi-réduite des SORs sauvage et mutantes I118A, I118D, I118S et I118V, sont tous superposables pour tous les pH et n'évoluent pas pendant 30 minutes. Les mutations n'ont donc pas d'effet sur la stabilité du centre I de pH 5 à pH 9,1 (données non montrées).

La stabilité de la bande d'absorption du centre II a été observée à pH 5, 9,1 et 10,2 (Figure 50) :



**Figure 50** : Stabilité du site actif des différents mutants au pH pendant 30 minutes. Les SORs (50  $\mu$ M) sont placées dans le tampon correspondant au pH souhaité et immédiatement oxydées à l'iridium. La variation d'absorption maximale du centre II de chaque mutant est suivie sur 30 minutes, à 651 nm pour les mutants I118A et I118S, 648 nm pour le mutant I118D et 640 nm pour le mutant I118V. La valeur de 1 représente 100 % d'oxydation du centre II au temps zéro de l'incubation.

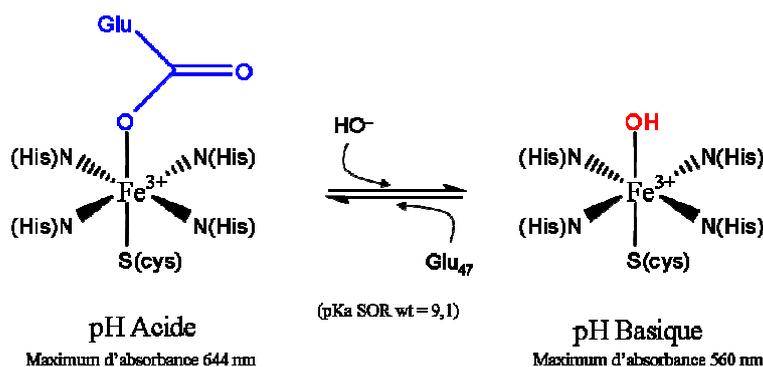
A pH 5, l'état d'oxydation du centre II est stable pendant au moins 30 minutes pour tous les mutants. A pH 9,1, on observe une légère diminution de la bande d'absorption du centre II (moins de 10 % au bout de 30 minutes) pour les mutants I118A, I118D et I118S. A ce pH, le centre II des mutants commence à devenir instable. Au-delà de pH 9,1 et dès la première minute d'incubation, les spectres montrent une diminution de la bande caractéristique du centre II ainsi qu'une diminution de la bande à 503 nm caractéristique du

centre I à pH basique pour tous les mutants. Les cinétiques sont variables d'un mutant à l'autre et au bout de 30 minutes, on observe 30 % de diminution pour I118D, 50 % pour I118V, 90 % pour I118A et 98 % pour I118S. Cette diminution d'absorbance peut indiquer deux événements : soit le centre II est réduit, soit il est dégradé. L'ajout d'iridium à la fin de la cinétique ne modifie pas l'allure des spectres, ce qui indique que les diminutions de bandes d'absorbance des centres II des mutants sont bien dues à une dégradation.

Les SOR mutantes I118 sont donc stables entre pH 5 et pH 9,1 pendant au moins 30 minutes. Au delà de pH 9,1, les mutants deviennent très instables. Ainsi lors des études à pH basiques, il sera important de limiter au maximum les temps d'incubation afin d'éviter de dénaturer fortement les protéines.

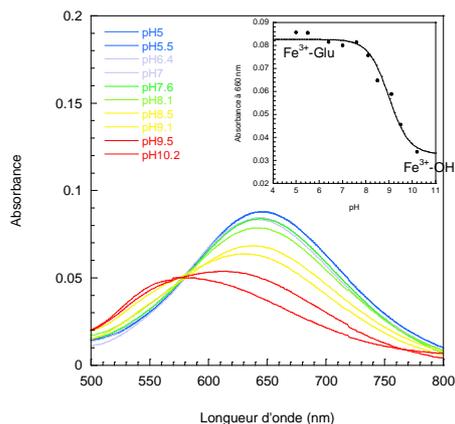
## V.2. Détermination du pKa de la transition alcaline

Comme cela a été présenté dans l'introduction, le maximum de la bande UV-visible caractéristique du site actif de la SOR est déplacé en fonction du pH. Ce déplacement correspond au remplacement du ligand carboxylate du glutamate 47 sur le centre II par un ligand hydroxyle  $\text{HO}^-$  provenant du solvant. Ce processus, appelé transition alcaline, peut être décrit par un pKa apparent avec une valeur de 9,1 pour la SOR sauvage (Figure 51) (Nivière *et al.* 2004 ; Mathé *et al.* 2005).



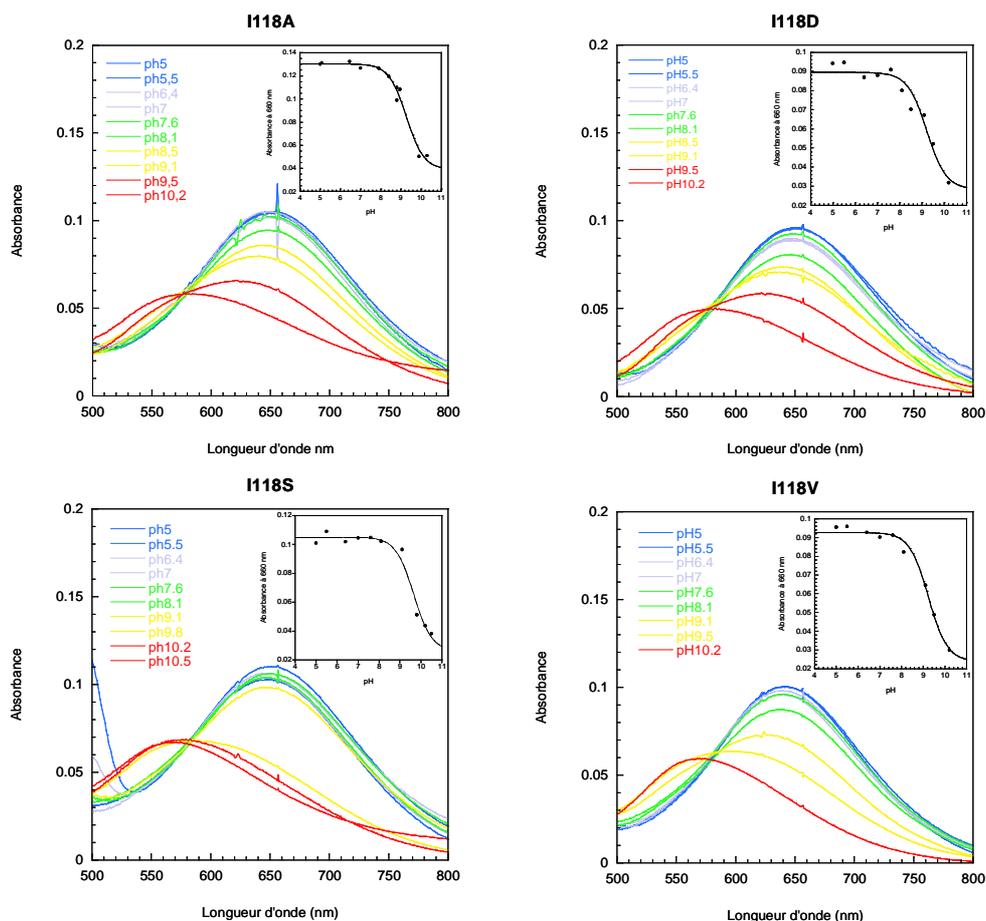
**Figure 51 :** Transition alcaline correspondant au remplacement du ligand carboxylate du glutamate 47 par un ligand  $\text{HO}^-$  sur la SOR sauvage de *D. baarsii*.

Afin d'étudier l'effet des mutations sur la transition alcaline, dans les mêmes conditions, nous avons dans un premier temps reproduit l'expérience sur la SOR sauvage (Figure 52) :



**Figure 52 :** Spectres du site actif de la SOR sauvage à différents pHs entre pH 5 et 10,2. La SOR ( $20 \mu\text{M}$ ) dans différents tampons est oxydée avec un léger excès de  $\text{K}_2\text{IrCl}_6$  et un spectre est immédiatement enregistré. Les spectres sont corrigés de la contribution du centre I. Figure en médaillon : absorbance à 660 nm en fonction du pH. La courbe de titration est modélisée par l'équation  $A_{660} = (A_{660\text{max}} + A_{660\text{min}} \times 10^{p\text{H} - p\text{K}_a}) / (1 + 10^{p\text{H} - p\text{K}_a})$ , faisant apparaître un  $p\text{K}_a = 9,0 \pm 0,1$ .

La valeur du  $p\text{K}_a$  apparent obtenu pour la SOR sauvage dans nos conditions est de  $9,0 \pm 0,1$  (Figure 52). Les mêmes expériences ont été réalisées sur les SORs I118A, I118D, I118S et I118V (Figure 53).



**Figure 53 :** Spectres du site actif des mutants SOR I118 à différent pH entre pH 5 et 10,2. Les SORs ( $20 \mu\text{M}$ ) dans différents tampons sont oxydés avec un léger excès de  $\text{K}_2\text{IrCl}_6$  et les spectres sont immédiatement enregistrés. Les spectres sont corrigés de la contribution du centre I. Figure en médaillon : Absorbance à 660 nm en fonction du pH. Les courbes de titration sont modélisées par l'équation  $A_{660} = (A_{660\text{max}} + A_{660\text{min}} \times 10^{p\text{H} - p\text{K}_a}) / (1 + 10^{p\text{H} - p\text{K}_a})$  faisant apparaître des valeurs de  $p\text{K}_a = 9,3 \pm 0,1$  pour I118A,  $9,2 \pm 0,2$  pour I118D,  $9,6 \pm 0,1$  pour I118S et  $9,1 \pm 0,1$  pour I118V.

A pH acide (pH 5,0), la bande caractéristique du centre II est centrée à 651 nm pour les mutants I118A et I118S, à 648 nm pour le mutant I118D et à 640 nm pour le mutant I118V. A pH basique (10,2), cette bande diminue en intensité et le maximum d'absorbance se déplace à 580 nm pour les mutants I118A et I118D et 560 nm pour les mutants I118S et I118V (déplacement de 71 nm pour I118A, 91 nm pour I118S, 68 nm pour I118D et 80 nm pour I118V nm).

Notons que le maximum d'absorption de la forme  $Fe^{3+}\text{-OH}$  est difficile à atteindre étant donné que les spectres au-delà de pH 10,2 n'ont pas pu être réalisés en raison de l'instabilité des protéines à pH basique. Ainsi, pour la plupart des mutants, à pH 10,2, la titration acide base n'est pas complètement terminée (Figure 53).

L'absorbance à 660 nm pour chaque spectre est reportée en fonction du pH. Cette valeur d'absorbance à 660 nm est choisie car elle représente la longueur d'onde où l'on observe un maximum de changement d'absorbance entre les pH acides et les pH basiques.

La variation en fonction du pH est modélisée par une sigmoïde décrivant un simple processus de protonation  $A_{660} = (A_{660\text{max}} + A_{660\text{min}} \times 10^{(\text{pH}-\text{pKa})}) / (1+10^{(\text{pH}-\text{pKa})})$  (Figure 53-en médaillon).

Les valeurs de pKa pour la transition alcaline de chaque mutant sont les suivantes (Tableau 7) :

	pKa
Wt	9,0 ± 0,1
I118A	9,3 ± 0,1
I118D	9,2 ± 0,1
I118S	9,6 ± 0,1
I118V	9,2 ± 0,1

**Tableau 7 :** Valeurs des pKa apparent obtenus lors de la transition alcaline pour les différents mutants de l'isoleucine.

Ces résultats montrent que les mutants I118V et I118D ne modifient pas significativement le pKa de la transition alcaline. La différence de 0,2 unité pH correspond aux incertitudes des expériences. Le mutant I118A déplace très légèrement de 0,1 unité pH le pKa apparent vers les pH plus basique. Le mutant I118S déplace de 0,6 unité pH le pKa vers les pH plus basique.

Ces valeurs restent proches de celles du pKa obtenues pour la SOR sauvage, ce qui conforte l'idée que les mutations réalisées ne modifient pas de façon drastique l'environnement du site actif. Cependant, pour le mutant I118A et plus particulièrement pour le mutant I118S, les déplacements de pKa vers les pH plus basiques sont significatifs et indiquent que ces mutations favorisent, à ces pH, la fixation sur la sixième position de coordination du fer le ligand carboxylate du glutamate 47 par rapport au ligand hydroxyde. Ces données suggèrent que pour ces mutants I118A et I118S, la densité électronique autour du fer est plus importante que pour la SOR sauvage. Le fer serait moins électroattracteur et donc moins propice à la coordination du groupement HO<sup>-</sup>.

## VI. Détermination des potentiels redox des mutants

Les potentiels redox des deux centres à fer de la SOR de *D. baarsii*, (couples redox monoélectroniques Fe<sup>2+</sup>/Fe<sup>3+</sup>), peuvent être déterminés par rapport à l'électrode standard à hydrogène (NHE, E°=207 mV). Comme nous l'avons vu dans le chapitre Introduction, des modifications de l'environnement autour du site actif peuvent modifier le potentiel redox du couple Fe<sup>2+</sup>/Fe<sup>3+</sup>.

La titration redox des centres I et II sur les SORs sauvage et mutantes a été réalisée par spectroscopie UV-Visible. La titration potentiométrique est réalisée en anaérobiose en boîte à gants, à pH 7,6, en utilisant l'iridium (K<sub>2</sub>IrCl<sub>6</sub>) comme oxydant et le dithionite (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>) comme réducteur. Pour chaque protéine, deux titrations sont réalisées. Une titration par oxydation à partir de la forme semi-réduite de la SOR [Fe<sup>2+</sup>/Fe<sup>3+</sup>] et une titration par réduction à partir de la SOR totalement oxydée [Fe<sup>3+</sup>/Fe<sup>3+</sup>]. Ceci permet de vérifier la réversibilité du système. Les titrations sont réalisées en présence d'une électrode Pt/Ag/AgCl, à 15°C, en présence de 2 μM des médiateurs redox suivants : ferrocène (+ 422 mV/NHE), N, N'-diméthyl-p-phenylenediamine (DMPD) (+ 371 mV/NHE), 1,4 benzoquinone (+ 280 mV/NHE), 2,5-diméthyl-p-benzoquinone (+ 180 mV/NHE), duroquinone (+ 5 mV/NHE). Ces médiateurs permettent d'accélérer les échanges électrochimiques entre l'électrode et les centres à fer de la SOR. Ils sont choisis de façon à couvrir la gamme de potentiel redox des centres de la SOR ainsi que pour leur non contribution spectrale dans la zone où l'on suit les oxydation et réductions des centres de la SOR. Après chaque ajout d'oxydant ou de réducteur à la solution de SOR, un délai de 5 à 10 minutes sous agitation est observé avant de lire la

valeur du potentiel de la solution. Ce délai permet l'établissement d'un équilibre redox entre les centres de la protéine et l'électrode. A l'issue de la première titration redox par oxydation avec l'iridium, une seconde titration par réduction dans la même cuve est réalisée par ajout successif de dithionite.

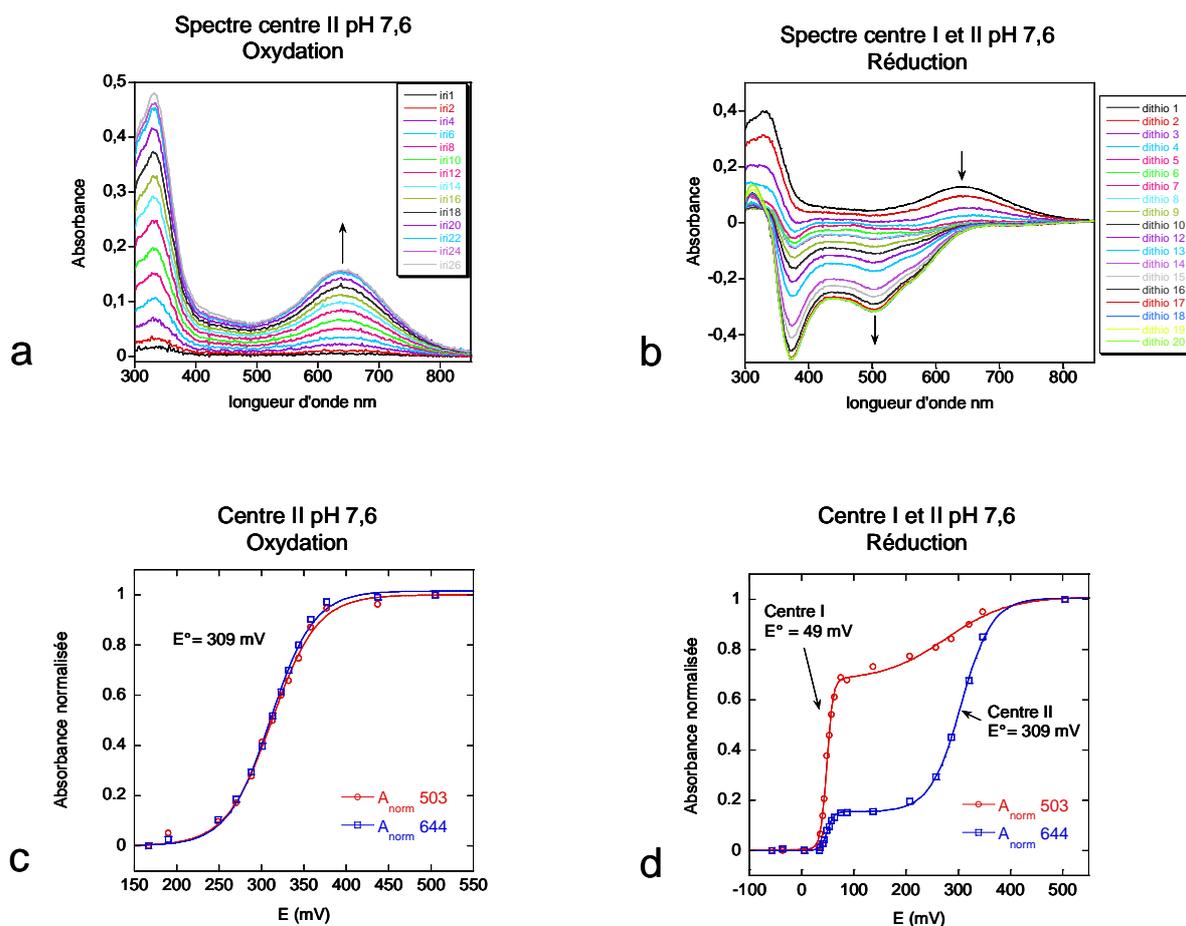
Les titrations sont suivies à deux longueurs d'onde. A 503 nm, l'absorbance correspond majoritairement à la contribution du centre I ( $\epsilon = 4400 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ ) et mineurairement à la contribution du centre II ( $\epsilon = 100 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ ). Entre 640 nm et 651 nm selon le mutant, l'absorbance correspond essentiellement à la contribution du centre II (le centre I ne contribue pratiquement pas à ces longueurs d'onde).

Les données sont modélisées par une équation de Nernst pour la titration par oxydation (oxydation du centre II) et par la somme de deux équations de Nernst pour la titration par réduction (oxydation des centres I et II) (processus monoélectronique dans tous les cas) :

$$A = (A_{\text{max1}} - A_{\text{min1}}) / (1 + 10^{-(E_x^\circ - E_1^\circ) / 0,06 \times a}) + (A_{\text{max2}} - A_{\text{min2}}) / (1 + 10^{-(E_x^\circ - E_2^\circ) / 0,06 \times b})$$

avec A : absorbance normalisée,  $A_{\text{max}}$  : l'absorbance maximale,  $A_{\text{min}}$  : l'absorbance minimale,  $E_x^\circ$  : potentiel redox lu en abscisse,  $E_1^\circ$  : potentiel de demi-réduction du premier phénomène,  $E_2^\circ$  : potentiel de demi-réduction du deuxième phénomène, a et b : amplitudes de chaque phénomène.

Les données de titrations redox obtenus pour la SOR sauvage sont représentées dans la Figure 54 :



**Figure 54 :** Titration redox des centres I et II de la SOR sauvage de *D. baarsii* à pH 7,6 en anaérobiose. (a) Spectres d'oxydation du centre II. (b) Spectres de réduction de la SOR totalement oxydée. (c) Oxydation du centre II suivit à 503 nm et 644 nm, (d) Réduction des centres I et II suivit à 503 et 644 nm. La solution de SOR à 50  $\mu\text{M}$  dans 3 ml de tampon 50 mM Tris-HCl pH 7,6 et 2  $\mu\text{M}$  de chaque médiateur est placée sous agitation. L'oxydation se fait par ajout successif de  $\text{K}_2\text{IrCl}_6$  et la réduction par ajout successif de dithionite. Le potentiel ainsi que l'absorbance de la solution sont mesurés 5 à 10 minutes après chaque ajout. Les valeurs d'absorbance sont normalisées selon l'équation :  $A_{\text{norm}} = (A_x - A_{\text{min}}) / (A_{\text{max}} - A_{\text{min}})$ .

Les spectres représentés dans la Figure 54-a correspondent à l'oxydation du centre II de la SOR sauvage. Ce sont des spectres de différence obtenus en soustrayant le spectre de la SOR totalement oxydée par le spectre de la SOR semi-réduite, faisant ainsi apparaître la bande d'absorbance du centre II. Les spectres représentés dans la Figure 54-b correspondent à la réduction des deux centres à fer de la SOR. Ce sont également des spectres de différence obtenus à partir de la soustraction des spectres obtenus pour chaque ajout de dithionite avec le spectre semi-réduit de la SOR. Ainsi la réduction du centre II se fait en premier suivie de la réduction du centre I.

Pour la SOR sauvage à pH 7,6, le système est réversible. Les valeurs obtenues lors de l'oxydation et de la réduction sont identiques. Le potentiel redox du centre I est déterminé à + 49 mV / NHE et celui du centre II à + 309 mV. Notons que ces valeurs sont plus basses de 50

mV par rapport à celles qui avaient été décrites dans la littérature pour la même SOR (centre II à + 350 mV et centre I à + 100 mV) (Nivière et al. 2004). Ces valeurs sont aussi différentes de celle rapportées pour une autre SOR de classe I, la SOR de *D. desulfuricans*, où le centre II avait été donné à + 240 mV et le centre I à + 4 mV (Tavares et al. 1994). Cependant, la différence entre le potentiel du centre II et le potentiel du centre I dans ces trois études est relativement proche, 260 mV pour la SOR sauvage de *D. baarsii* étudiée ici, 250 mV pour la SOR sauvage de *D. baarsii* étudiée en 2004 (Nivière et al. 2004) et 236 mV pour la SOR de *D. desulfuricans* (Tavares et al. 1994).

Ces disparités dans les valeurs des potentiels redox mesurées par différents groupes laissent penser qu'il est difficile de comparer directement les valeurs absolues des potentiels redox d'une étude à l'autre. Bien qu'il soit difficile de donner une explication claire sur ces différences, on peut penser notamment que la calibration de l'électrode de mesure peut varier d'une étude à l'autre. En effet, en vérifiant le potentiel de l'électrode utilisée pour notre étude à partir d'une solution calibrée de ferrocyanure / ferricyanure ( $E^\circ = + 360 \text{ mV} / \text{NHE}$ ), le potentiel mesuré présente une variation de 60 mV par rapport au potentiel théorique calculé par l'équation de Nernst d'après les concentrations en ferricyanure et ferrocyanure en solution. Il est possible que les électrodes utilisées dans les autres études sur la SOR présentent elles aussi des différences par rapport aux valeurs attendues sur une solution de référence. Ce type d'information n'est en général pas décrit dans les parties expérimentales.

Par contre, le fait que les différences de potentiel entre les centres I et II soient très similaires d'une étude à l'autre conforte l'idée que les comparaisons des valeurs relatives des mesures du potentiel redox faites au cours d'une même étude sont tout à fait valides et significatives.

Les expériences de titration redox à pH 7,6 pour les mutants I118A, I118D, I118R et I118V sont réalisées dans les mêmes conditions que pour la SOR sauvage. Les potentiels redox obtenus pour les centres I et le centre II de chaque SOR mutantes sont représentés dans la Figure 55 :

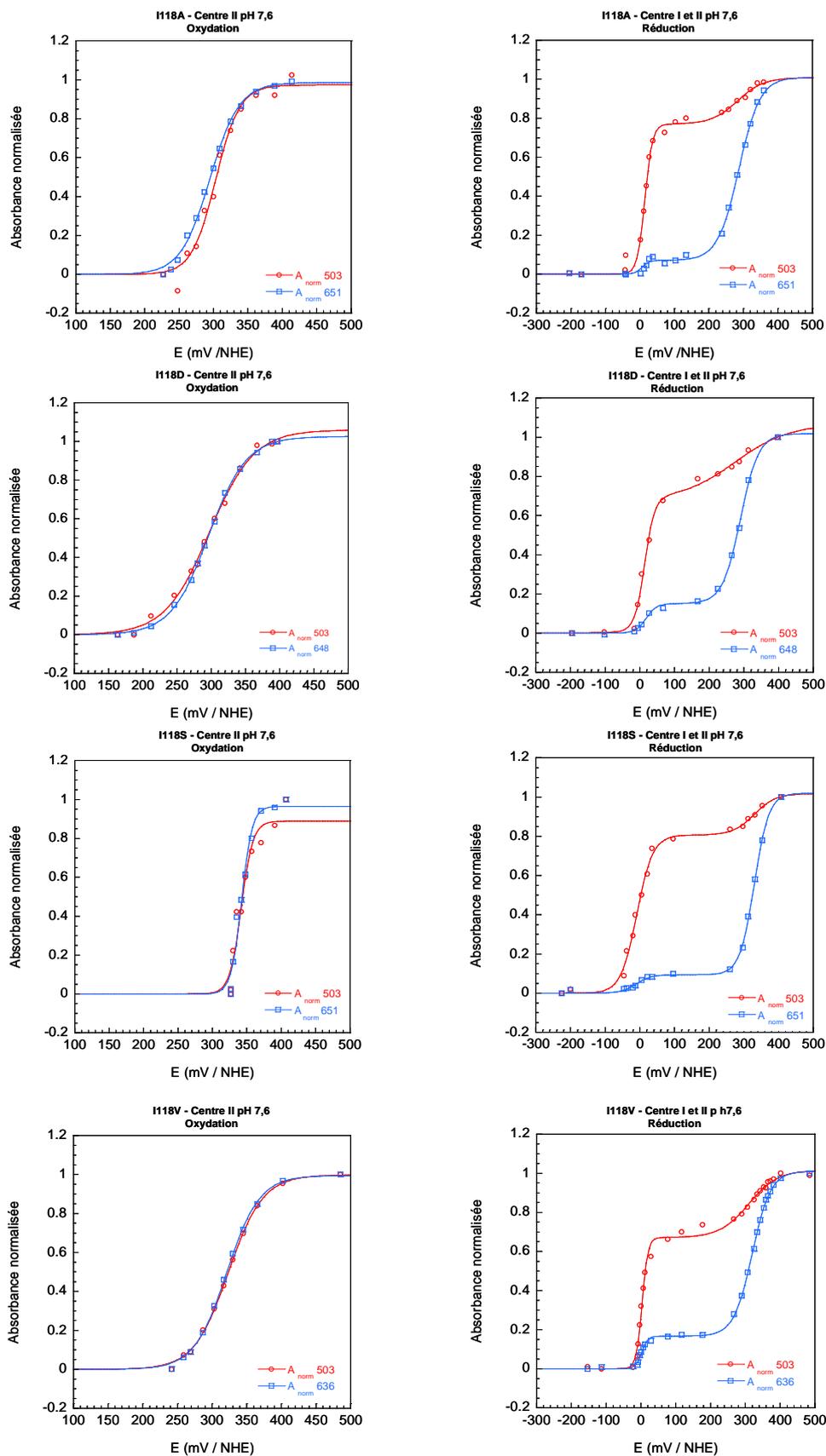


Figure 55 : Titration redox des centres I et des centres II des SORs mutantes I118A, I118D, I118S et I118V à pH 7,6. Conditions expérimentales identiques à celles décrites pour la figure 55.

Pour chaque mutant, les titrations sont réversibles en oxydation et en réduction avec des valeurs identiques de potentiels redox. Les valeurs trouvées sont les suivantes (Tableau 8):

	<b>Centre I E°(mV / NHE)</b>	<b>Centre II E°(mV / NHE)</b>
<b>Sauvage</b>	+ 49 ± 1	+ 309 ± 2
<b>I118A</b>	+ 15 ± 2	+ 292 ± 6
<b>I118D</b>	+ 16 ± 5	+ 295 ± 2
<b>I118S</b>	- 10 ± 7	+ 337 ± 8
<b>I118V</b>	+ 3 ± 1	+ 319 ± 4

*Tableau 8 : Valeurs des potentiels redox des centres I et II des SORs sauvage et mutantes à pH 7,6 déterminées d'après les figures 55 et 56.*

Les valeurs du potentiel redox du centre I obtenues à pH 7,6 pour les mutants de l'isoleucine sont plus faibles que celles de la SOR sauvage. On observe une diminution de - 34 mV pour les mutants I118A et I118D, de - 46 mV pour le mutant I118V et de - 59 mV pour le mutant I118S à pH 7,6 par rapport à la valeur obtenue pour le centre I de la SOR sauvage. Cet effet des mutations de l'isoleucine 118 sur le centre I est inattendu. En effet, bien que la chaîne latérale de l'isoleucine 118 se situe à l'extérieur du site actif et pointe en direction du centre I, elle reste tout de même assez éloignée de ce centre, à 17-18 Å de distance. Le potentiel redox du centre I ne devrait donc pas être modifié par ces mutations. Actuellement, il est difficile d'expliquer l'effet des mutations I118 sur le potentiel redox du centre I.

Les valeurs des potentiels redox du centre II pour les mutants I118A, I118D, I118S et I118V, sont significativement différentes de celles de la SOR sauvage. Ainsi les mutants I118A et I118D présentent un potentiel redox du centre II plus bas respectivement de -17 et - 14 mV / NHE par rapport à celui de la SOR sauvage. Le site actif de ces deux mutans est donc plus facilement oxydable que le site actif de la SOR sauvage. Inversement, le potentiel redox du centre II des mutants I118S et I118V est plus haut respectivement de + 28 et +10 mV / NHE par rapport à celui de la SOR sauvage. Leurs sites actifs sont donc plus difficilement oxydables par rapport à la SOR sauvage.

Ces effets des mutations sur les potentiels redox sont discutés dans le paragraphe ci-dessous, en lien avec les autres résultats précédemment décrits.

## VII. Conclusion

Les valeurs de potentiel redox, des pKa de la transition alcaline et des maximums de la bande UV-visible du site actif de la SOR sont résumés dans le tableau suivant pour tous les mutants I118 (Tableau 9):

	$\lambda_{\max}$	pKa Transition alcaline	Potentiel redox Centre II
<b>SOR sauvage</b>	<b>644 nm</b>	<b>9,0 ± 0,1</b>	<b>309 ± 2</b>
<b>I118A</b>	651 nm	9,3 ± 0,1	292 ± 6
<b>I118S</b>	651 nm	9,6 ± 0,1	337 ± 8
<b>I118D</b>	648 nm	9,2 ± 0,1	295 ± 2
<b>I118V</b>	640 nm	9,2 ± 0,2	319 ± 4

**Tableau 9 :** Récapitulatif des données caractéristiques du site actif des SORs sauvages et mutantes obtenues en spectroscopie UV-visible ( $\lambda_{\max}$  : longueur d'onde du maximum d'absorbance de la bande du centre II), par le pKa de la transition alcaline et par titrations redox.

A priori, chacune de ces expériences est susceptible de donner des informations sur les propriétés du fer au sein du site actif.

Le  $\lambda_{\max}$  est susceptible de donner des informations sur la densité électronique autour de la liaison S-Fe. En effet, la longueur d'onde du maximum de la bande d'absorption ( $\lambda$ ) est directement liée à l'énergie de transition (E) de la liaison S-Fe entre les électrons de la couche p du soufre et les orbitales d du fer par l'équation suivante :  $E = hc / \lambda$ . Lorsque  $\lambda_{\max}$  est déplacée vers le rouge (I118A, I118S, I118D) l'énergie de transition diminue et le transfert de charge entre le soufre et le fer pourrait donc être plus favorable. A l'inverse lorsque  $\lambda_{\max}$  est déplacée vers le bleu (I118V), l'énergie de transition augmente et le transfert de charge du soufre vers le fer pourrait être donc moins favorable.

Le pKa de la transition alcaline, est aussi susceptible de donner des informations sur la densité électronique autour du Fe. L'augmentation du pKa vers les pH plus basiques suggère que l'espèce  $\text{Fe}^{3+}\text{-OH}$  est moins stable que l'espèce  $\text{Fe}^{3+}\text{-Glu}$  et donc que le fer est plus enrichie en électron. En effet, un carboxylate est un ligand moins électrodonneur que l'hydroxyde.

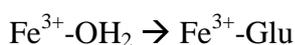
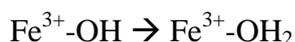
La détermination du potentiel redox donne une information sur la capacité du fer à accepter ou donner des électrons. Ainsi lorsque le potentiel redox augmente, le fer est plus difficilement oxydable. A l'inverse lorsque le potentiel redox diminue, le fer est donc plus facilement oxydable.

Pour le mutant I118A, toutes ces données semblent converger vers une même interprétation. Le déplacement du  $\lambda_{\max}$  vers le rouge, l'augmentation du pKa vers les pH plus basique et la diminution du potentiel redox, indiqueraient que le fer du site actif de ce mutant est enrichi en électron et donc plus facilement oxydable.

Cependant, pour les trois autres mutants et surtout pour le mutant I118S, ces données ne vont pas dans le même sens. En effet, pour les mutants I118D et I118V, les valeurs de  $\lambda_{\max}$  et de potentiels redox tendraient à dire que le fer du I118D est plus enrichi en électrons et donc plus facilement oxydable alors que le fer du mutant I118V, moins enrichi en électrons serait plus difficilement oxydable. Cependant, les valeurs de pKa sont identiques à celles de la SOR sauvage. De même pour le mutant I117S où les valeurs de  $\lambda_{\max}$  et de pKa tendraient à dire que le fer est enrichi en électron alors que la valeur du potentiel redox indiquerait que le fer est plus difficilement oxydable.

Il est possible que les interprétations présentées plus haut sur les effets sur le pKa de la transition alcaline et le potentiel redox du centre II ne représentent qu'un des aspects de la réalité physico-chimique de ces données. Les potentiels redox peuvent dépendre de la densité électronique directement localisée sur le fer, comme cela a été proposé précédemment, mais aussi de l'environnement électrostatique autour du fer. Certaines mutations de l'isoleucine 118 pourraient conduire à des modifications conformationnelles locales qui pourraient perturber cet environnement électrostatique, dans un sens différent de l'effet qu'elles peuvent avoir sur la liaison S-Fe par exemple.

D'autre part, la transition alcaline  $\text{Fe}^{3+}\text{-OH} / \text{Fe}^{3+}\text{-Glu}$  ne reflète sans doute pas un simple équilibre acido-basique. Elle pourrait décrire un processus plus complexe correspondant à la fois à une protonation du ligand HO<sup>-</sup> et à l'échange du ligand aqua par le carboxylate du glutamate :



Le pKa de ce processus n'étant qu'un pKa apparent, reflétant la résultante de ces deux réactions.

Ainsi à partir des résultats précédents, s'il semble assez clair que les mutations de l'isoleucine ont un effet sur les propriétés physico-chimiques du fer du site actif de la SOR, il est plus difficile de décrire qualitativement l'origine de ces effets.

Il est donc nécessaire de faire d'autres expériences plus spécifiques pour pouvoir comprendre plus précisément l'impact des mutations sur le centre à fer.

Il existe une technique de spectroscopie particulièrement bien adaptée pour mesurer l'impact de mutation sur la force de la liaison S-Fe. Il s'agit de la spectroscopie vibrationnelle de résonance Raman qui à déjà été utilisée pour étudier le site actif de la SOR (*Mathé et al. 2002 ; Clay et al. 2002 b*). Une autre technique vibrationnelle intéressante est la spectroscopie Infra Rouge à Transformée de Fourier (FTIR), qui dans le cas de la SOR à permis d'observer certaines modifications structurales dans l'environnement du site actif, liées à la mutation de certains acides aminées (*Berthomieu et al. 2002*). Dans le chapitre suivant, nous présenterons les études de résonances Raman et de FTIR sur ces mutants de l'isoleucine 118.



*PARTIE 2 :*

*Caractérisation spécifique de  
La SOR*



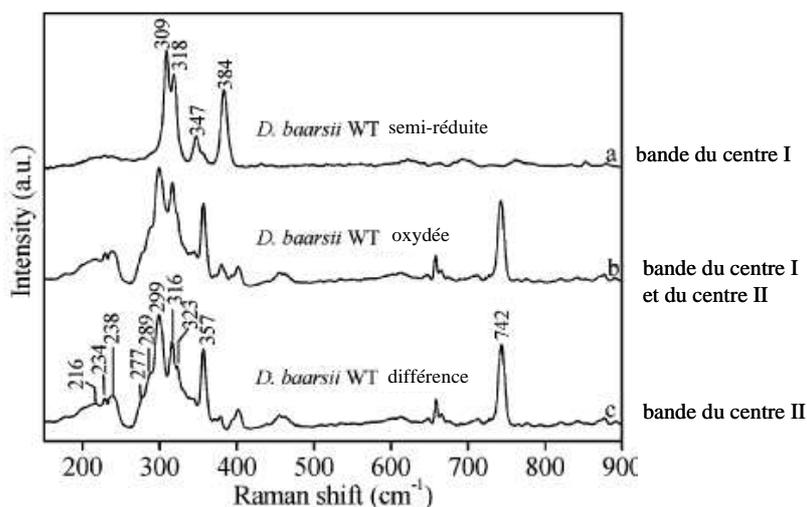
## I. Résonance Raman : Effets des mutations sur la force de la liaison S-Fe

Une liaison chimique se caractérise par la distance de liaison entre les deux atomes qui la compose. Pour avoir une indication sur cette distance de liaison, la première technique à laquelle on fait référence est la diffraction aux rayons X. La structure aux RX de la SOR de *D. baarsii* a été résolue avec un protocole de cristallisation bien maîtrisé (Adam et al. 2004). Cependant, cette technique n'est pas utilisable pour étudier l'effet très fin des mutations que l'on attend sur la liaison S-Fe. En effet, les modifications de distance S-Fe attendues peuvent être de l'ordre du dixième d'Angström, ce qui n'est, en général, pas observable par les techniques de diffraction aux rayons X (Petsko et al. 2008). Il existe une autre technique capable de détecter ces faibles modifications de distance, qui est la spectroscopie de résonance Raman (RR). En effet, les fréquences de vibration des liaisons chimiques que l'on mesure par résonance Raman sont très sensibles aux variations de force de ces liaisons. Cela peut donner des indications sur les modifications de distance que l'on peut avoir sur une liaison chimique particulière.

Nous avons donc comparé par RR, les vibrations caractéristiques de la liaison S-Fe des mutants à celles de la SOR sauvage. Un déplacement de ces bandes vers les plus hautes fréquences peut être attribué à un renforcement de la liaison S-Fe, alors qu'un déplacement de ces bandes vers les plus basses fréquences peut être attribué à un affaiblissement de cette liaison (Mathé et al. 2006).

Les spectres RR de la SOR sauvage et des mutants sous formes semi-réduites ou totalement oxydées en présence d'iridium sont réalisés à 12 K, en utilisant un laser krypton émettant à 647,1 nm. Cette longueur d'onde correspond à la large bande d'absorption du site actif oxydé de la SOR dont le maximum est centré vers 644 nm. Ce laser permet d'exalter spécifiquement toutes les vibrations associées à ce chromophore, c'est-à-dire à l'ensemble des liaisons associé au centre métallique de la SOR. Notons que le centre I dont le maximum d'absorption est à 503 nm peut être excité par pré-résonance avec ce laser à 647 nm. Ainsi, le spectre Raman de la SOR semi-réduite présente uniquement les bandes de vibrations associées au centre I qui sont exaltées par pré-résonance. Les bandes du centre I [FeS<sub>4</sub>] dues aux modes d'élongation  $\nu(\text{Fe-S})$  sont retrouvées à 309, 347, 384 cm<sup>-1</sup>, ainsi que celle due au mode de déformation angulaire  $\delta(\text{S-C-C})$  de la cystéine à 318 cm<sup>-1</sup> (Figure 56) (Mathé et al. 2006; Clay et al. 2002 b).

Lors de l'oxydation du site actif de la SOR par  $K_2IrCl_6$ , de nouvelles bandes sont observables au niveau du spectre Raman dues à l'exaltation du site actif  $[FeN_4S_1]$  (Figure 56). Il est possible alors de soustraire les contributions du centre I à ce spectre, ce qui permet de visualiser uniquement les bandes de vibrations spécifiques du site actif de la SOR (Mathé et al. 2006) (Figure 56).



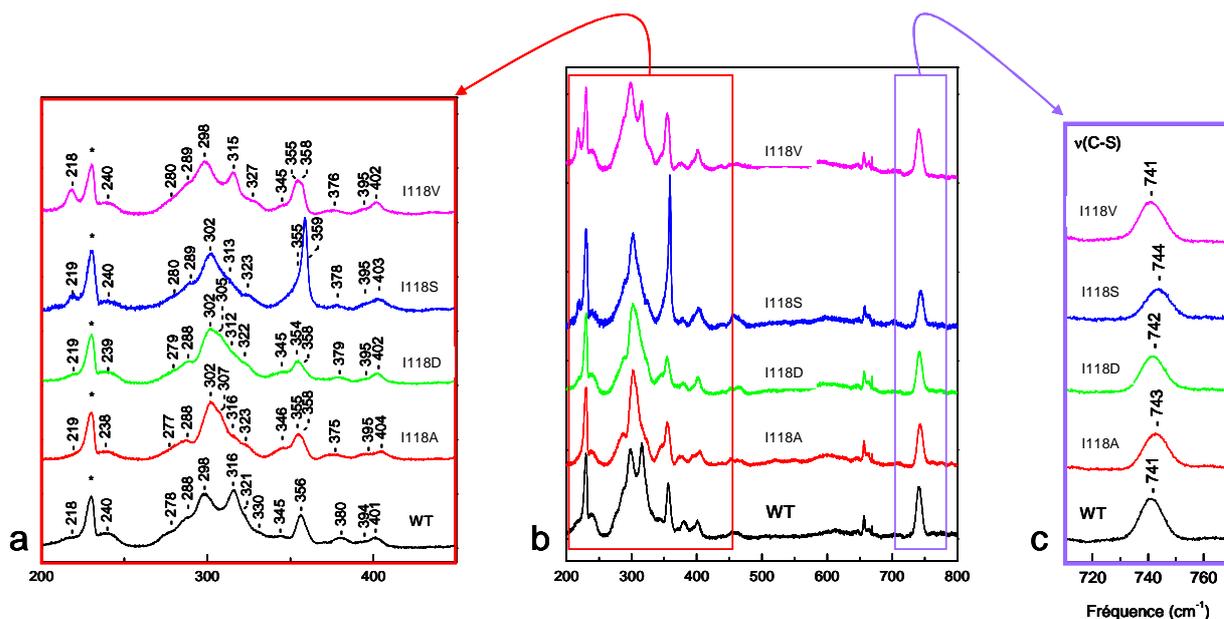
**Figure 56 :** Spectre Raman de résonance de la SOR sauvage de *D. baarsii* sous les formes, (a) semi-réduite  $[Fe^{3+}/Fe^{2+}]$ , (b) oxydée  $[Fe^{3+}/Fe^{3+}]$  par 3 équivalents de  $K_2IrCl_6$ , (c) Spectre Raman du site actif  $Fe^{3+}$  obtenu par la différence entre les spectres des formes oxydée et semi-réduite. La protéine est à 3 mM dans du tampon 100 mM Tris-HCl pH 7,6. Le spectre de différence est calculé de manière à faire disparaître la bande à  $384\text{ cm}^{-1}$ , spécifique du centre I. (Figure issue de (Mathé et al. 2006).

L'attribution des différentes fréquences du spectre du site actif de la SOR de *D. baarsii* (Mathé et al. 2006) a été faite par comparaison avec celles réalisées sur les SORs de *D. vulgaris* Hidenborough et *P. furiosus*, à partir d'expériences de simple, double et triple marquages isotopiques par  $^{15}N$ ,  $^{34}S$ , et  $^{54}Fe$  (Clay et al. 2002b) ; Clay et al. 2003).

Les bandes à  $297/315/321\text{ cm}^{-1}$  ont été attribuées à des modes d'étirement ( $\nu$ ) et de déformation angulaire ( $\delta$ ) de la liaison S-Fe. La bande à  $741\text{ cm}^{-1}$  a été attribuée à un mode d'étirement de la liaison S-C $_{\beta}$  de la cystéine 116.

Les bandes à  $218/240/288$  ont été attribuées à un mode d'étirement de la liaison Fe-N(His) correspondant à la coordination des 4 histidines au fer.

Les spectres de RR obtenus pour les mutants I118A, I118D, I118S et I118V sont représentés dans la figure suivante (Figure 57):



**Figure 57 :** Spectres de résonance Raman du site actif  $\text{Fe}^{3+}$  des mutants SORs de *D. baarsii* I118A, I118D, I118S et I118V, obtenus par la différence entre les spectres oxydés par trois équivalent de  $\text{K}_2\text{IrCl}_6$  et semi-réduits. (b) Spectres entre 200 et 800  $\text{cm}^{-1}$ , (a) Zoom sur la zone entre 200 et 450  $\text{cm}^{-1}$ , (c) Zoom sur la zone entre 710 et 770  $\text{cm}^{-1}$ . Les protéines sont à 5 mM dans du tampon 100 mM Tris-HCl pH 7,6. Les spectres sont obtenus par excitation laser à 647,1 nm, à une température de 12 K. Le volume des échantillons est de 2  $\mu\text{L}$ . L'accumulation est faite sur 6 x 30 s et la résolution spectrale est inférieure à 2  $\text{cm}^{-1}$ .

Les mutations sur l'I118 ne perturbent pas les fréquences associées au centre I (données non montrées). Cependant, les mutations de l'isoleucine perturbent significativement les modes de vibration du site actif associés au ligand cystéine et à la liaison S-Fe, en comparaison avec la SOR sauvage (Tableau 10).

Sauvage	Fréquences de RR en $\text{cm}^{-1}$				Attribution
	I118V	I118S	I118D	I118A	
218	218	219	219	219	$\nu(\text{FeN}(\text{His}))$
230*	230*	230*	230*	230*	glace
240	240	240	239	238	$\nu(\text{FeN}(\text{His}))$
288	289	289	288	288	$\nu(\text{FeN}(\text{His}))$
298	298	302	302	302	$\nu(\text{FeS}) + \delta(\text{SC}_\beta\text{C}_\alpha)$
315	316	317	316	315	$\nu(\text{FeS}) + \delta(\text{SC}_\beta\text{C}_\alpha)$
321	/	323	322	323	$\nu(\text{FeS}) + \delta(\text{SC}_\beta\text{C}_\alpha)$
356	354	358	358	357	$\delta(\text{SC}_\beta\text{C}_\alpha\text{N})$
741	741	744	742	743	$\nu(\text{CS})$

**Tableau 10 :** Fréquences de RR associées au site actif de la SOR sauvage de *D. baarsii* ainsi que des mutants de l'isoleucine 118 après oxydation à l'Ir (VI).

Le groupe des bandes à 297/315/321  $\text{cm}^{-1}$  pour la SOR sauvage est significativement déplacé pour les mutants I118A, I118S et I118D. Il reste identique à la SOR sauvage pour le mutant I118V.

Pour les 3 mutants I118A, I118D et I118S, les bandes à 297 et 315  $\text{cm}^{-1}$  semblent avoir fusionné. En effet, la bande à 297  $\text{cm}^{-1}$  semble être déplacée vers les plus hautes fréquences (301 à 302  $\text{cm}^{-1}$ ) alors que la bande à 315  $\text{cm}^{-1}$  semble être déplacée vers les plus basses fréquences. Ce groupe de bandes a été attribué à un étirement de la liaison S-Fe mais également à une distorsion de la liaison S-C $_{\beta}$ C $_{\alpha}$  de la cystéine. Étant donné que la bande à 297  $\text{cm}^{-1}$  est la plus intense, il est probable qu'elle corresponde à un mode d'étirement de la liaison S-Fe (Mathé *et al.* 2007). Elle est donc la plus informative quand aux effets des mutations sur la liaison S-Fe. Ainsi les spectres de RR indiquent que les mutations I118A, I118D et I118S entraînent un renforcement de la liaison S-Fe $^{3+}$ .

La bande de vibration à 741  $\text{cm}^{-1}$  correspondant au mode d'étirement de la liaison C-S du ligand cystéine pour la SOR sauvage est déplacé vers les plus hautes fréquences pour les mutants I118A, I118S et I118D et n'est pas modifié dans le mutant I118V (Tableau 10). Ces valeurs indiquent que les mutations I118A, I118S et I118D renforcent la liaison C-S de la cystéine.

La bande à 356  $\text{cm}^{-1}$  pour la SOR sauvage a été attribuée à une liaison S-C $_{\beta}$ C $_{\alpha}$ N de la cystéine, c'est-à-dire un mode de déformation contenant un caractère CN. Dans le cas des mutants I118S et I118D (358  $\text{cm}^{-1}$ ) et un peu moins pour le mutant I118A (357  $\text{cm}^{-1}$ ), cette bande est déplacée vers les plus hautes fréquences. Inversement pour le mutant I118V, cette bande est déplacée vers les plus basses fréquences (354  $\text{cm}^{-1}$ ). Ceci indique que les mutations ont entraîné une modification de la liaison S-C $_{\beta}$ C $_{\alpha}$ N et en particulier du caractère CN de la liaison peptidique. En ce qui concerne les bandes vibrationnelles caractéristiques des liaisons Fe-N(His) observées entre 218 et 288  $\text{cm}^{-1}$ , il n'y a aucune modification quelque soit les mutants. Les liaisons Fe-N(His) ne semblent donc pas être affectées par ces mutations.

Toutes ces observations indiquent que la mutation de l'isoleucine 118 en valine ne modifie pas significativement le site actif de la SOR par rapport à la SOR sauvage. Par contre, les mutations de l'isoleucine en alanine, sérine et aspartate modifient significativement la structure du site actif avec pour conséquence un renforcement de la liaison S-Fe et de la liaison C-S. Ces résultats vont dans le même sens que ce qui a été proposé précédemment par la spectroscopie UV-visible, où les mutations I118A, I118D et I118S induiraient une augmentation de la densité électronique autour de la liaison S-Fe.

Ainsi, il est probable que ce renforcement de la liaison S-Fe induit par les mutations de l'isoleucine puisse être dû à un affaiblissement de la liaison hydrogène entre le NH de la chaîne principale de l'isoleucine 118 et le soufre de la cystéine 116 par les mutations I118A, I118S et I118D. Cela pourrait engendrer une modification de la répartition des électrons à la fois sur la liaison S-Fe, mais aussi sur la liaison C-S, avec un renforcement de ces deux liaisons, en accord avec ce qui a été observé par RR. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons étudié par Infra Rouge l'effet des mutations sur l'environnement du site actif de la SOR.

## II. Spectroscopie IRTF (infrarouge à transformée de Fourier)

Les spectres IR de la SOR, lorsqu'ils résultent d'une différence entre l'état réduit et oxydé du site à fer, permettent de mettre en évidence certains changements structuraux accompagnant les changements de l'état redox du fer (*Berthomieu et al. 2002*). Les vibrations associées aux groupements peptidiques, qui sont perturbées par l'oxydation ou la réduction du métal, peuvent être identifiées (*Mantele 1993*). La fréquence et l'intensité des modes IR des liaisons chimiques sont sensibles aux interactions électrostatiques ainsi qu'aux liaisons hydrogène qu'elles peuvent établir avec leur environnement. Des informations sur les interactions entre acides aminés et le site actif de la SOR peuvent être alors obtenues (*Berthomieu et al. 2002*).

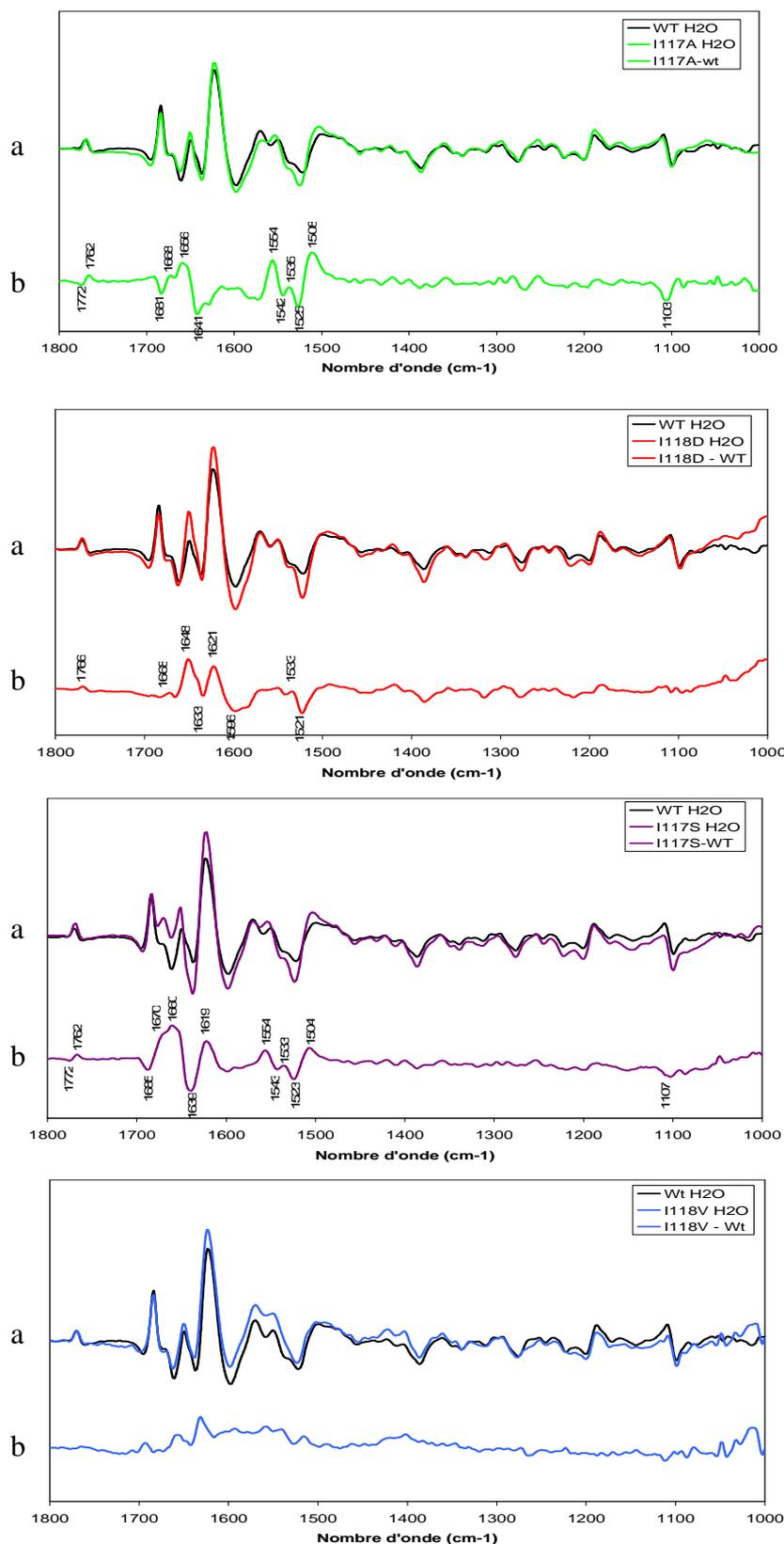
Les mesures des spectres IR sont réalisées sur les formes oxydées et réduites de la SOR au sein d'une même cellule électrochimique. Cette cellule de très faible trajet optique ( $\approx 10 \mu\text{m}$ ) est constituée de fenêtres en fluorure de calcium et d'une grille d'or de  $4 \mu\text{m}$  d'épaisseur qui fait office d'électrode de travail. Cette électrode est couverte de pyridine-3-carboxaldéhyde thiosemicarbazone (PATS-3) qui se lie à la surface de l'or de façon irréversible par son atome de soufre et interagit avec les protéines en solution par l'intermédiaire de ses groupements pyridine et amine. L'électrode de référence est un système Ag/AgCl/KCl (3 M) ( $E = + 208 \text{ mV/NHE}$ ). Les expériences sont réalisées à  $4^\circ\text{C}$  ( $6^\circ\text{C}$  pour les expériences en présence de  $\text{D}_2\text{O}$ ) en présence des médiateurs électrochimiques suivants à une concentration finale de  $40 \mu\text{M}$ : ferrocène ( $E = + 422 \text{ mV}$ ), dMPD ( $E = + 371 \text{ mV}$ ), pBQ ( $E =$

+ 280 mV), TMPD (E = +260 mV), DAD, (E = +230 mV), PES (E = + 55 mV) et duroquinone (DQ, E = + 5 mV). La présence de ces médiateurs électrochimiques accélère le transfert d'électron entre la surface de l'électrode et les centres redox de la protéine. La concentration en protéine est de l'ordre du millimolaire. Le tampon et les médiateurs redox ne contribuent pas aux spectres IR. Les potentiels redox appliqués sur la cellule par un potentiostat sont compris entre + 200 et + 500 mV. Cela permet d'induire sélectivement l'oxydation et la réduction du centre II de la SOR. Les spectres de différence entre la forme oxydée et la forme réduite sont enregistrés entre 1000 et 1800  $\text{cm}^{-1}$  (avec une résolution de 4  $\text{cm}^{-1}$ ). Ces spectres de différence permettent donc d'observer uniquement les différences de vibration associées aux liaisons affectées par le changement de l'état redox du fer. Ainsi, si la mutation entraîne une modification dans l'environnement du fer, elle pourrait être observée par FTIR. Il est également possible de faire des spectres de différence entre les données obtenues sur la SOR sauvage et sur les mutants. Ces spectres permettent alors d'observer directement les modifications induites par les mutations par rapport à la SOR sauvage.

Les spectres IR de différence associés au centre II montrent des signaux sur toute la gamme spectrale entre 1800 et 1000  $\text{cm}^{-1}$ . Cette gamme de fréquence correspond à des vibrations de groupements peptidiques qui prédominent dans la région 1700-1600  $\text{cm}^{-1}$ , ainsi qu'à des vibrations de groupement de chaînes latérales de certains acides aminés (*Berthomieu et al. 2002*).

Les perturbations de la chaîne latérale de l'isoleucine peuvent être en théorie observées par FTIR. Cependant pour les mutants I118A et I118V, les contributions des groupements  $\text{CH}_2\text{-CH}_3$  des chaînes latérales ne sont pas très fortes. Pour le mutant I118S, si la chaîne latérale de la sérine est perturbée par le changement d'état d'oxydoréduction du fer, on s'attend à observer une vibration de C-OH supplémentaire vers 1200-1100  $\text{cm}^{-1}$ , sensible au changement  $\text{H}_2\text{O/D}_2\text{O}$ , avec un déplacement vers 1000  $\text{cm}^{-1}$ . Enfin pour le mutant D, on s'attend à voir apparaître une bande intense au dessus de 1700  $\text{cm}^{-1}$  si sa chaîne latérale est protonée (acide carboxylique) ou à 1650-1640  $\text{cm}^{-1}$  si elle est déprotonée (carboxylate).

Les spectres obtenus pour la SOR sauvage et les quatre mutants sont représentés ci-dessous (Figure 58):



**Figure 58 :** Spectres FTIR des SORs sauvage et mutantes sur l'isoleucine 118. (a) Spectres de différence SOR réduite moins SOR oxydée. (b) Spectres de différence entre les spectres de différence SOR réduite moins SOR oxydée des mutants et de la SOR wt. Ces spectres permettent de visualiser les modifications liées aux mutations. Des potentiels entre 300 et 600 mV (versus NHE) sont appliqués à l'électrode de travail pour obtenir les états oxydés et réduits. Les spectres consistent en une moyenne de spectres enregistrés sur 30 cycles électrochimiques, 300 scans par cycles, avec une résolution spectrale de  $4 \text{ cm}^{-1}$ .

La comparaison des spectres réduit-moins-oxydé enregistrés sur la SOR sauvage et sur les mutants I118A et I118V ne montre aucune contribution visible des groupements alkyls des chaînes latérales. Pour le mutant I118S, des bandes à 1200-1100  $\text{cm}^{-1}$  sont visibles mais ne sont pas différentes de celles observées pour la SOR sauvage. Enfin, pour le mutant I118D, il n'y a pas de différence significative du spectre entre 1580 et 1560  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$ ) ni au dessus de 1700  $\text{cm}^{-1}$ , qui pourraient être attribuées au groupement carboxylate de l'aspartate. Ces données indiquent que les chaînes latérales des mutants sur la position 118 ne contribuent pas au spectre IR. De plus, il n'y a pas de modifications globales des spectres FTIR des mutants par rapport à la SOR sauvage, ce qui démontre que les mutations ne perturbent pas de façon importante la structure du site actif de la SOR.

Pour les mutants I118A et I118S, on observe une modification du spectre entre 1690 et 1620  $\text{cm}^{-1}$ , correspondant aux bandes de vibrations d'élongation des carbonyles peptidiques (bande Amide I) (Berthomieu *et al.* 2002) : 1685-81, 1660-56/1641-40  $\text{cm}^{-1}$ . Lors d'une modification de la bande du C=O peptidique, on peut s'attendre à avoir aussi une modification des bandes de vibrations des liaisons CN-NH peptidiques (bande Amide II) (Berthomieu *et al.* 2002). C'est en effet ce que l'on observe sur les bandes à 1554, 1543, 1535-3, 1525-3 et 1504-8  $\text{cm}^{-1}$  pour les mutants I118A et I118S.

Ces résultats indiquent que les mutants I118A et I118S modifient de façon identique une ou plusieurs liaisons peptidiques qui se trouvent dans l'environnement immédiat du site actif. Ces spectres de différence font également apparaître des bandes à 1772/1762  $\text{cm}^{-1}$  qui traduisent un effet très fin sur l'environnement de la chaîne latérale du Glu 113, ainsi qu'une bande négative à 1103-1107  $\text{cm}^{-1}$ , qui a été attribuée aux chaînes latérales des ligands histidine.

Pour le mutant I118D, une partie seulement des bandes amide I (1668, 1648, 1621  $\text{cm}^{-1}$ ) et amide II (1533, 1521  $\text{cm}^{-1}$ ) décrites précédemment est observée dans le spectre de différence « mutant – moins – sauvage » (Figure 58-b). La mutation I118D génère donc une modification partielle de l'environnement du site actif d'une façon similaire à celle des mutants I118A et I118S.

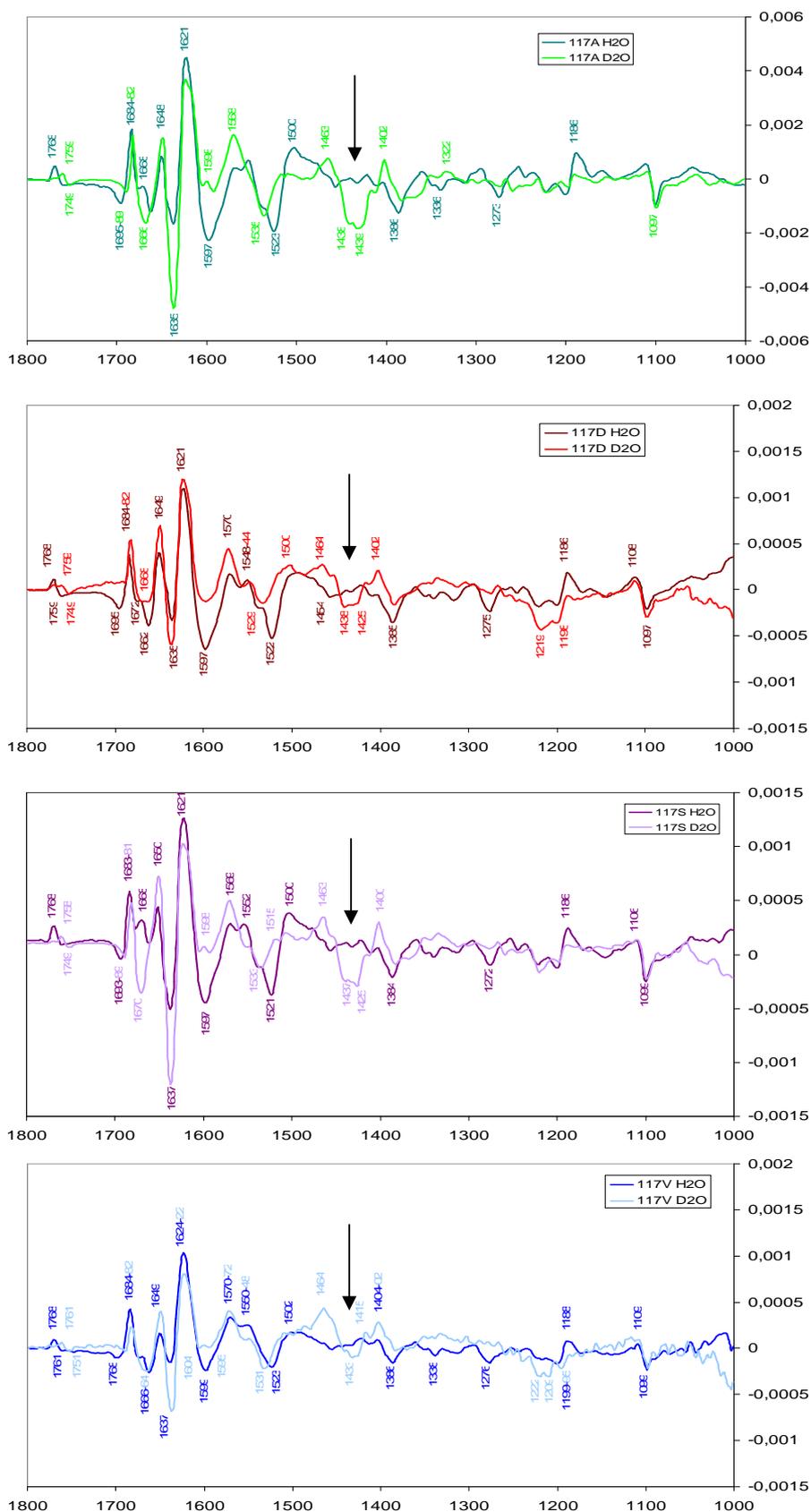
Une interprétation possible des spectres de différence est que la bande située à 1660  $\text{cm}^{-1}$  pour la SOR sauvage est déplacée à  $\approx 1640 \text{ cm}^{-1}$  dans les mutants I118A et I118S. Ce

déplacement peut être attribué à une modification d'une liaison hydrogène avec un C=O ou CN-NH peptidique (*Berthomieu et al. 2002*). Cette bande est de nouveau un peu moins intense pour le mutant I118D ( $1650\text{ cm}^{-1}$ ).

Afin de préciser si le motif caractéristique observé dans la zone amide II pour les mutants I118A et I118S correspond soit à une perturbation de vibrations CN-NH peptidique, soit à une perturbation de vibrations de groupements carbonyles, des expériences d'échange  $\text{H}_2\text{O} / \text{D}_2\text{O}$  ont été réalisées.

L'échange  $\text{H}_2\text{O} / \text{D}_2\text{O}$  permet de remplacer les atomes d'hydrogène échangeables par un deutérium. Au niveau de la liaison peptidique, seul l'hydrogène présent sur la liaison CN-NH peut s'échanger avec  $\text{D}_2\text{O}$ . Cet échange H/D entraîne un déplacement des fréquences de vibration de presque  $100\text{ cm}^{-1}$ , caractéristique des groupes amide II. En revanche, aucun effet n'est attendu pour les modes de vibration des groupements carboxylates. Ainsi, l'étude des spectres en  $\text{D}_2\text{O}$  pourra permettre de préciser si les modifications observées au niveau de la chaîne polypeptidique concernent le groupement CN-NH.

Nous avons donc réalisé des spectres IR en présence de  $\text{D}_2\text{O}$  pour tous les mutants de l'isoleucine 118. Les spectres présentés sont des spectres de différence entre les formes réduites moins les formes oxydées, soit dans  $\text{H}_2\text{O}$ , soit dans  $\text{D}_2\text{O}$  (Figure 59) :



**Figure 59 :** Spectre FTIR de différence réduite moins oxydée des SOR sauvage et mutantes dans D<sub>2</sub>O ou H<sub>2</sub>O. Des potentiels entre 300 et 600 mV (versus NHE) sont appliqués sur l'électrode de travail pour obtenir les états oxydés et réduits. Les spectres consistent en une moyenne de spectres enregistrés sur 30 cycles électrochimiques, 300 scans par cycles, avec 4 cm<sup>-1</sup> de résolution.

Pour les mutants I118A, I118S et I118D, on voit apparaître un large signal à  $\approx 1463/1435/1400 \text{ cm}^{-1}$  en présence de  $\text{D}_2\text{O}$ , correspondant au déplacement des bandes à  $\approx 1562/1525/1504 \text{ cm}^{-1}$  observées en  $\text{H}_2\text{O}$ . Ce déplacement peut être attribué à un(des) proton(s) échangeable(s) au niveau d' au moins un NH peptidique sensible à l'état redox du fer de la SOR (Berthomieu *et al.* 2002). Ce signal est plus intense pour les mutants I118A, I118S et I118D que pour la SOR sauvage (Berthomieu *et al.* 2002) ou le mutant I118V (Figure 59). Ceci indique que pour les mutants I118A, I118S et I118D, les modifications observées sur les spectres de différences entre les mutants et la SOR sauvage en présence d' $\text{H}_2\text{O}$  (Figure 58) correspondent au CN-NH d'une liaison peptidique.

Ces données montrent que les mutations I118A, I118D et I118V perturbent les propriétés d'une ou plusieurs liaisons peptidiques proches du fer du site actif. Ces perturbations peuvent correspondre à une variation de force d'une liaison hydrogène impliquant un groupement peptidique CN-NH

### III. Conclusion

Les résultats obtenus par résonance Raman et FTIR indiquent que les mutations n'ont pas engendré une forte perturbation dans la géométrie du site actif. La combinaison des études FTIR en présence de  $\text{H}_2\text{O}$  et  $\text{D}_2\text{O}$  suggèrent que les mutations de l'isoleucine I118A, I118D et I118S affectent une liaison hydrogène impliquant un NH d'une liaison peptidique.

Les expériences Raman montrent que les mutants I118A, I118S et I118D renforcent la liaison S-Fe. Ces mutations ont donc entraîné une augmentation de la charge électronique autour de la liaison S-Fe. Ceci pourrait être dû à une perte de liaison hydrogène entre le NH de la chaîne principale de l'isoleucine 118 et le soufre de la cystéine ligand du fer.

Cette perte de liaison aurait donc pour conséquence directe le renforcement de la liaison S-Fe.



*PARTIE 3 :*

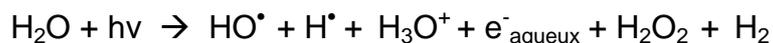
*Radiolyse pulsée*



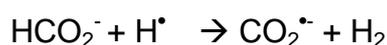
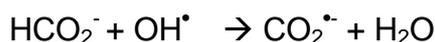
L'étude du mécanisme réactionnel de la SOR se fait principalement par la technique de radiolyse pulsée qui permet de générer très spécifiquement et rapidement des quantités déterminées de superoxyde et de suivre sur des temps très courts la réaction avec la SOR. C'est par cette méthode que l'impact des mutations de l'isoleucine 118 sur la réactivité avec le superoxyde a été étudié.

## I. Principe de la radiolyse pulsée

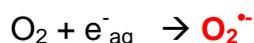
La radiolyse pulsée permet d'étudier les mécanismes de nombreuses réactions radicalaires en milieux aqueux. Cette technique se base sur le principe de la radiolyse de l'eau (*Baldacchino et al. 2001*). Lorsque l'on soumet une solution aqueuse à l'action d'un rayonnement ionisant (par exemple des électrons de très hautes énergies, de 2.5 à 10 MeV ou des rayons gamma), l'eau subit un processus de radiolyse. Le bombardement de la solution aqueuse par les électrons provoque un effet Compton : l'énergie des électrons accélérés est absorbée par les molécules d'H<sub>2</sub>O et conduit à la formation des espèces suivantes :



Ainsi, 10 ns après l'interaction du rayonnement ionisant avec l'eau, la radiolyse de H<sub>2</sub>O conduit à une solution homogène d'espèces radicalaires : H<sup>•</sup>, HO<sup>•</sup>, e<sup>-</sup><sub>aqueux</sub> et moléculaires : H<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, H<sub>3</sub>O<sup>+</sup>. Les quantités formées de chaque espèce sont connues et s'expriment par les rendements de formation, appelés également rendements radiolytiques G, exprimés en moles par unité d'énergie absorbée dans la matière (Joule ou eV) : G (HO<sup>•</sup>) = 2.8 10<sup>-7</sup> mol.J<sup>-1</sup>, G (e<sup>-</sup><sub>aqueux</sub>) = 2.7 10<sup>-7</sup> mol.J<sup>-1</sup>, G (H<sup>•</sup>) = 0.6 10<sup>-7</sup> mol.J<sup>-1</sup>, G (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) = 0.7 10<sup>-7</sup> mol.J<sup>-1</sup>, G (H<sub>2</sub>) = 0.4 10<sup>-7</sup> mol.J<sup>-1</sup> (*Lemaignan 2004*). Les radicaux ainsi formés peuvent réagir très rapidement avec un capteur de radicaux choisi pour former spécifiquement le superoxyde. Dans le cas de notre étude, nous avons choisi le formiate (*Lombard et al. 2000a*). Les radicaux HO<sup>•</sup> et H<sup>•</sup> qui sont des oxydants puissants conduisent, en présence de formiate, à la formation d'une forme radicalaire CO<sub>2</sub><sup>•-</sup> relativement stable :



CO<sub>2</sub><sup>•-</sup> en présence d'oxygène va conduire essentiellement à la formation de superoxyde :



Du point de vue pratique, une brève impulsion d'électron (quelques nanosecondes) fournie par un accélérateur d'électrons, produit une concentration de radicaux superoxyde déterminée, proportionnelle à la durée d'impulsion et pouvant aller jusqu'à 20  $\mu\text{M}$  de superoxyde. L'échantillon est saturé en  $\text{O}_2$  (1 mM) et contient 10 mM de formiate. L' $\text{O}_2$  et le formiate sont en excès par rapport à la protéine (100  $\mu\text{M}$ ) et au tampon (2 mM). Ceci permet que la recombinaison des radicaux primaires formés lors du processus de radiolyse se fasse uniquement sur le formiate et l' $\text{O}_2$ , sans réagir avec la protéine et le tampon. La réaction entre la SOR et  $\text{O}_2^{\bullet-}$  peut alors avoir lieu dans la cuve de radiolyse. A l'aide d'un montage de spectrophotométrie UV-visible couplé à l'impulsion d'électrons, on peut suivre l'évolution de l'absorbance de la solution qui a réagi avec  $\text{O}_2^{\bullet-}$  en fonction du temps. Ceci se fait à différentes longueurs d'ondes dans le domaine de l'UV-visible et sur des temps allant de quelques dizaines de microsecondes à la centaine de secondes après l'impulsion.

Deux lampes différentes sont utilisées pour suivre la variation d'absorbance à une longueur d'onde donnée. La lampe Xenon, avec un spectre d'émission très large entre 200 et 800 nm, est très puissante mais assez peu stable dans le temps. Elle est surtout utilisée pour suivre des cinétiques très courtes, inférieures à 10-50 ms. La lampe Tungstène, moins puissante, avec un spectre d'émission moins large de 350 à 700 nm, est néanmoins plus stable dans le temps. Elle est utilisée pour des cinétiques sur des temps plus long, jusqu'à plusieurs centaines de secondes.

Pour l'étude de la réaction de la SOR avec  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , on se place dans des conditions d'excès de SOR par rapport au superoxyde généré. Cela permet d'être dans des conditions de pseudo premier ordre et de faciliter l'analyse des cinétiques. Notons que ces conditions permettent d'observer un seul cycle catalytique et permettent de voir la formation et la disparition des intermédiaires réactionnels. A partir des cinétiques obtenues à chaque longueur d'onde entre 500 et 700 nm (Figure 61), les constantes de vitesses ainsi que des spectres caractéristiques des espèces intermédiaires de la réaction peuvent être déterminés.

## **II. Rappel de l'étude du mécanisme réactionnel de la SOR wt**

Le mécanisme de la SOR sauvage de *D. baarsii* a été revisité récemment au laboratoire (Bonnot et al. 2009). Il est apparu que lors des études précédentes de radiolyse pulsée (Lombard et al. 2001; Nivière et al. 2004; Mathé et al. 2007), l'utilisation de la lampe

Xénon induisait un processus photochimique au cours de la réaction de la SOR avec  $O_2^{\bullet-}$ . Ce processus photochimique se traduit par l'apparition de bandes d'absorbance qui ne sont pas directement liées à la réaction de la SOR avec  $O_2^{\bullet-}$  et perturbent les interprétations des données cinétiques au-delà de 5 à 10 ms après la réaction de la SOR avec  $O_2^{\bullet-}$ . La fin du cycle catalytique n'est alors pas observée. En présence d'un filtre coupant en dessous de 345 nm entre la lampe et l'échantillon, ce processus photochimique ne se produit plus. Les cinétiques de la SOR avec  $O_2^{\bullet-}$  ont du être alors réinterprétées et l'ensemble du cycle catalytique a pu être observé (Bonnot *et al.* 2009). Comme il a été décrit dans la partie introduction, le schéma réactionnel de la SOR avec  $O_2^{\bullet-}$  est à présent le suivant (Figure 60):

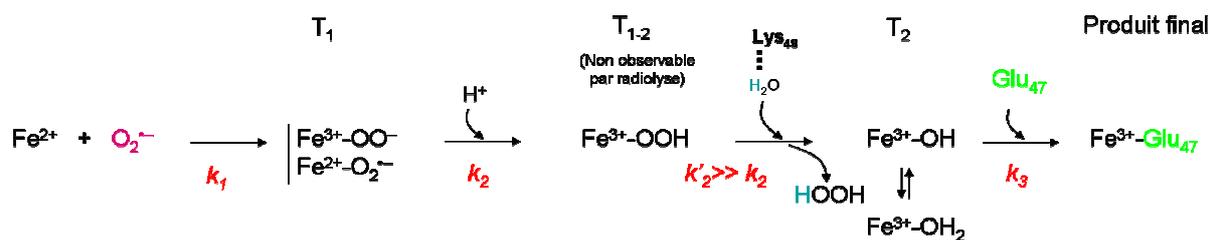


Figure 60 : Nouvelle proposition du schéma réactionnel de la SOR de *D. baarsii* (Bonnot *et al.* 2009).

Ce mécanisme comprend trois étapes :

- La fixation du superoxyde sur le fer du site actif de la SOR pour former un premier intermédiaire ( $T_1$ ).
- Deux processus de protonation successifs conduisant à la libération d' $H_2O_2$  et à la formation du second intermédiaire ( $T_2$ ).
- La fixation du glutamate 47 sur la sixième position de coordination du fer.

Ces trois étapes ont été proposées à partir des analyses cinétiques des expériences de radiolyse pulsée et des effets du pH sur le  $k_1$  et le  $k_2$ . Notons que la seconde étape de protonation ( $k_2'$ ) n'est pas observable par radiolyse car elle n'est pas cinétiquement limitante. Elle a été proposée comme étant plus rapide que la première étape de protonation décrite par  $k_2$ . Enfin la troisième cinétique, décrite par  $k_3$ , se fait sur des temps un peu plus long (10 à 100 ms). Ces trois cinétiques ne peuvent généralement pas être observées sur une seule expérience, mais nécessitent de reproduire les cinétiques sur des échelles de temps différent. Sur des échelles de temps courts (0-300  $\mu$ s), le  $k_1$  est mesuré et sur des temps plus long (1 ms-100 ms), les  $k_2$  et  $k_3$  peuvent être analysés.

L'objectif de cette étude de radiolyse pulsée sur les mutants de l'isoleucine 118 est de déterminer les modifications que ces mutations entraînent pour la réactivité de la SOR avec le superoxyde.

### III. Effet des mutants sur $k_1$

L'étape décrite pour le  $k_1$  correspond à une réaction du second ordre entre  $O_2^{\bullet-}$  et le fer ferreux du centre II. Cette étape conduit à la formation d'un intermédiaire  $T_1$  proposé comme étant une espèce  $Fe^{3+}$ -peroxo ou une espèce  $Fe^{2+}$ -superoxo (Figure 60).

L'équation de vitesse s'écrit de la façon suivante :

$$v = k_1 [SOR] [O_2^{\bullet-}]$$

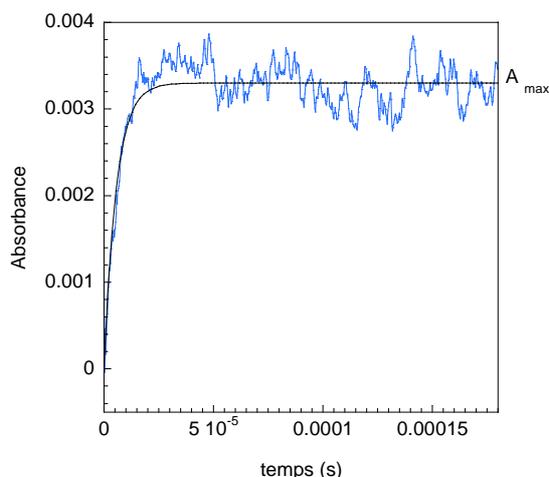
L'étude est réalisée dans des conditions de pseudo-premier ordre, c'est-à-dire en excès de SOR par rapport à  $O_2^{\bullet-}$ . Ainsi l'équation de vitesse se simplifie et peut s'écrire:

$$v = k_1' [O_2^{\bullet-}] = -d [O_2^{\bullet-}] / dt$$

avec  $k_1'$  la constante de vitesse du pseudo premier ordre que l'on peut déterminer après modélisation des cinétiques par un processus exponentiel. La constante  $k_1$  du second ordre peut être obtenue en étudiant la dépendance de  $k_1'$  en fonction de la concentration en SOR :

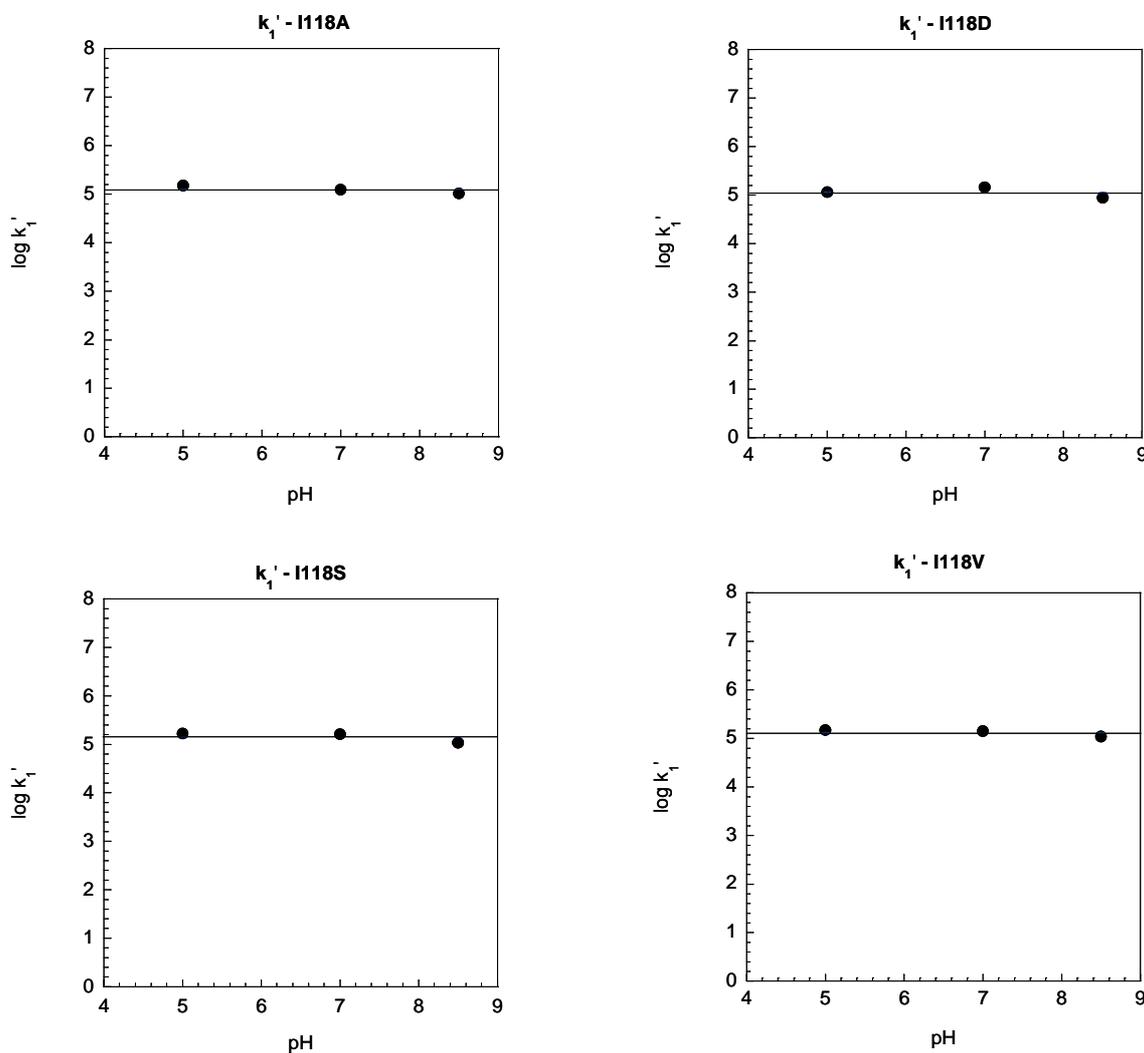
$$k_1' = k_1 [SOR].$$

Les constantes de vitesse  $k_1$  pour les mutants I118A, I118D, I118S et I118V sont déterminées à partir des cinétiques obtenues à 600 nm, sur un temps de réaction de 200  $\mu s$  avec une impulsion de 0,2  $\mu s$  générant une concentration de  $O_2^{\bullet-}$  de 3  $\mu M$ . Pour chaque mutant, les cinétiques sont réalisées à pH 5, 7 et 8,5 (Figure 61).



**Figure 61** : Cinétique suivie à 600 nm (en bleu) de la réaction de la SOR I118V avec  $O_2^{\bullet-}$ . La solution de SOR I118V à 100  $\mu M$  dans 2 mM Tris-HCl pH 5 et 10 mM de formiate est saturé avec 100 % d' $O_2$ , puis placé dans une cuve spectrophotométrique de 2 cm de trajet optique Lampe Xenon avec un filtre à 425 nm. L'échantillon est irradié par une impulsion de 0,2  $\mu s$  générant 3  $\mu M$  d' $O_2^{\bullet-}$ . (en noir) Modélisation de la cinétique par un processus exponentiel ( $A_{max} \times e^{(-k_1 t)}$ ) +  $m_3$ ,  $A$ =absorbance maximum,  $k_1$ =constante de vitesse et  $t$ = temps de la cinétique.

Les résultats sont représentés en log de  $k_1'$  en fonction du pH afin de vérifier si un processus de protonation peut être associé à cette étape (Figure 62).



**Figure 62 :** Dépendance au pH des constantes de vitesse  $k_1'$  pour les mutants I118A, I118D, I118S et I118V, déterminées par radiolyse pulsée, dans les mêmes conditions décrite pour la figure 62.

Pour les mutants I118A, I118D, I118S et I118V, les constantes de vitesses du pseudo premier ordre  $k_1'$  sont toutes identiques quelque soit le pH, avec une valeur de  $10^5 \text{ s}^{-1}$  correspondant à une constante de vitesse du second ordre de  $10^9 \text{ s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$ . Ces valeurs sont identiques à celles obtenues pour la SOR sauvage.

Les mutants I118A, I118D, I118S et I118V ne modifient donc pas la cinétique de fixation du superoxyde sur le fer du site actif de la SOR. Cette étape reste pH-indépendante, et tout comme la SOR sauvage, ne fait pas intervenir de processus de protonation cinétiquement limitant.

### III.1. Reconstitution du spectre du $T_1$

Le spectre du premier intermédiaire  $T_1$  peut être reconstruit à partir des cinétiques enregistrées à différentes longueurs d'onde, effectuées tous les 10 nm entre 500 et 700 nm. A chaque longueur d'onde, la valeur d'absorbance  $A_{\max}$  est lue à la fin de la cinétique, 200  $\mu$ s après la réaction de la SOR avec  $O_2^{\bullet-}$  et correspond à un point du spectre du  $T_1$ .

Les spectres des  $T_1$  à pH 7,6 pour chaque mutant en comparaison avec celui de la SOR sauvage sont représentés ci-dessous (Figure 63) :

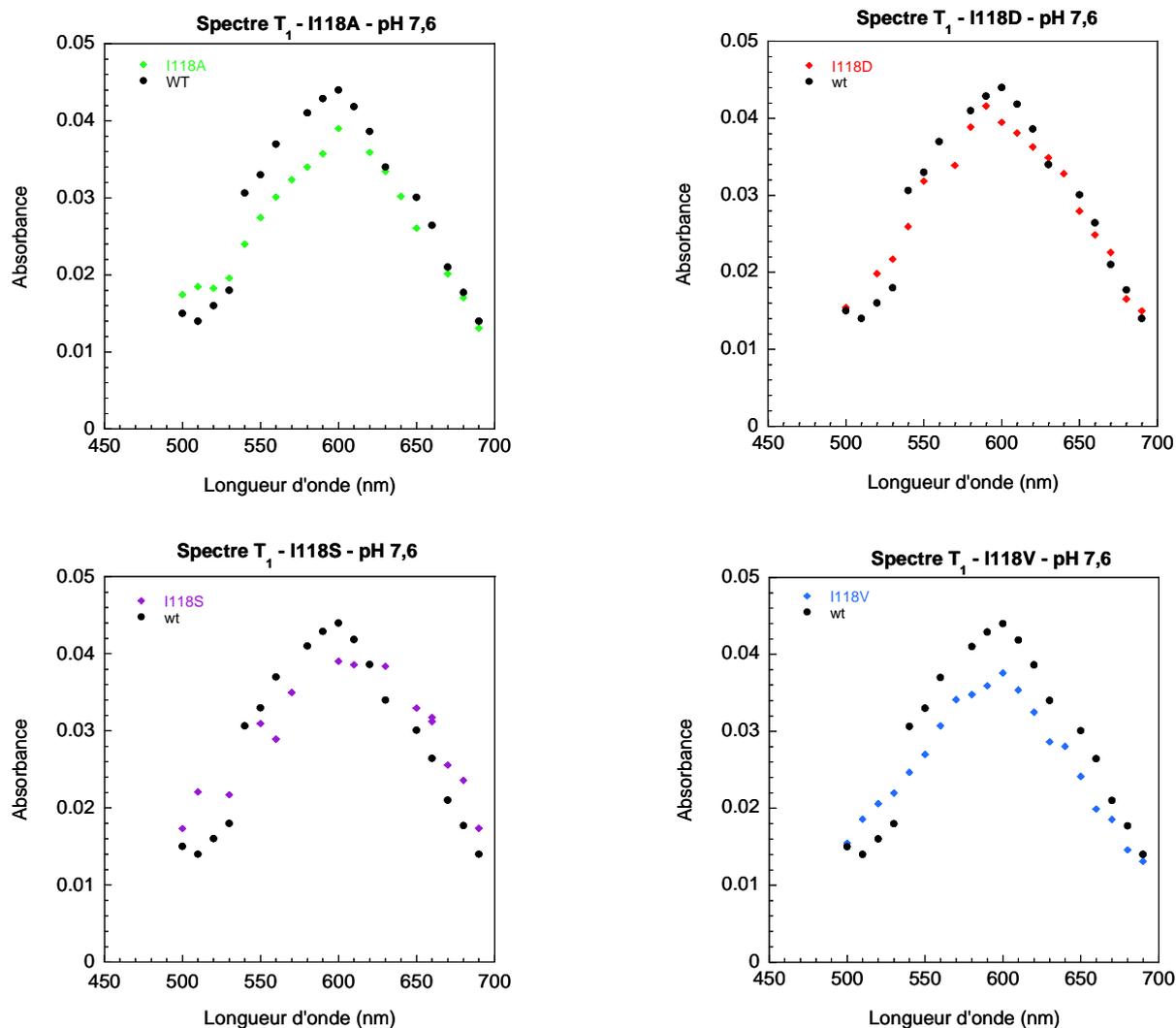


Figure 63 : Spectres du  $T_1$  pour les mutants I118A, I118D, I118S et I118V.

Pour les mutants I118A, I118S, I118D et I118V, les spectres du  $T_1$  présentent tous une bande caractéristique centrée autour de 600 nm. Ces spectres sont superposables à celui du  $T_1$  de la SOR sauvage.

## Conclusion :

Cette première étape du mécanisme réactionnel n'est pas modifiée par les mutations de l'isoleucine 118. Elle correspond toujours pour ces mutants à la fixation du superoxyde sur le fer ferreux et se fait très rapidement avec une constante de vitesse de l'ordre de  $1.10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ . Cette première étape est indépendante du pH et donc ne correspond pas à une étape de protonation cinétiquement limitante. Le spectre de l'intermédiaire  $T_1$  résultant de cette fixation, présente une large bande d'absorption avec un maximum d'absorbance centré à 600 nm. Elle a été proposée comme pouvant correspondre à une espèce de type  $\text{Fe}^{3+}\text{-OO}^-$  ou  $\text{Fe}^{2+}\text{-O}_2^{\cdot-}$ .

## IV. Effet des mutants sur le $k_2$

Cette deuxième étape correspond à un processus de protonation du  $T_1$  ( $k_2$ ), pour former un intermédiaire de type fer-hydroperoxyde  $\text{Fe-OOH}$ . Cette étape est suivie par un second processus de protonation permettant la formation d' $\text{H}_2\text{O}_2$ . Cependant, ce second processus de protonation n'est pas observable cinétiquement et pourrait correspondre à une étape cinétiquement non limitante ( $k_2' \gg k_2$ ). Il a été proposé, d'après les structures aux RX des intermédiaires de type fer-peroxyde de la SOR de *D.baarsii*, que cette seconde étape de protonation corresponde à la protonation de l'espèce  $\text{Fe}^{3+}\text{-OOH}$  par une molécule d'eau en interaction avec la lysine 48 (Katona et al. 2007). Ceci permet ainsi la libération d' $\text{H}_2\text{O}_2$  et la formation du deuxième intermédiaire  $T_2$  observé en cinétique rapide. Il correspond à une espèce  $\text{Fe}^{3+}\text{-OH}$  en équilibre acido basique avec l'espèce  $\text{Fe}^{3+}\text{-OH}_2$  (Figure 64) (Bonnot et al. 2009 ; Rodrigues et al. 2006)

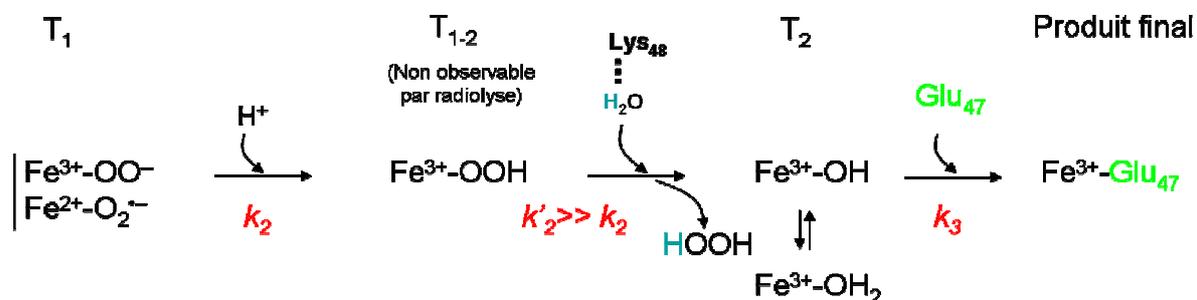
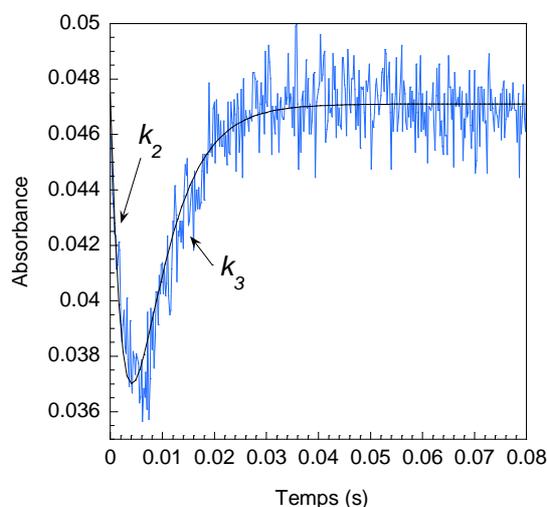


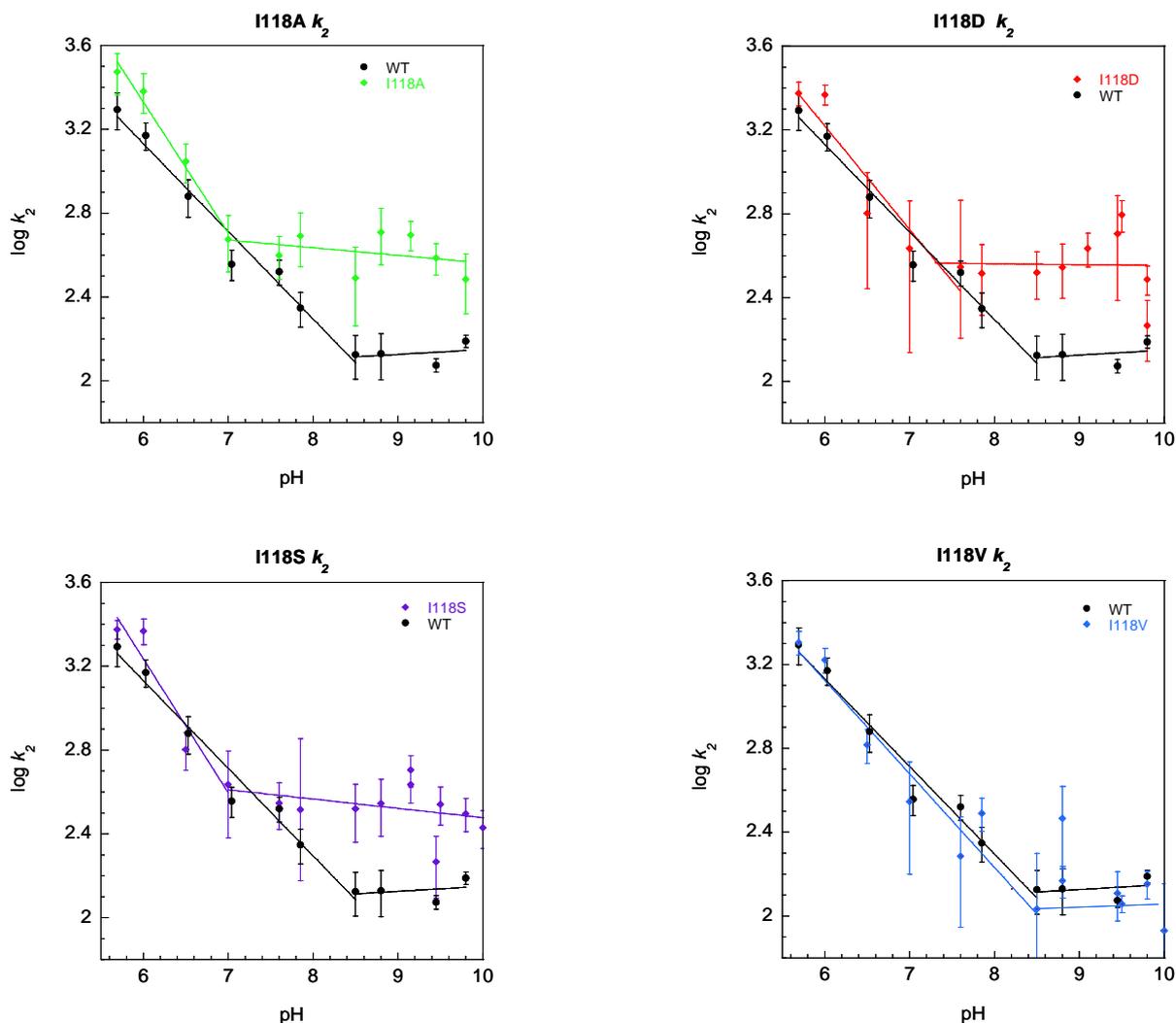
Figure 64 : Schéma de la deuxième étape du mécanisme réactionnel de la SOR de *D. baarsii* : libération d' $\text{H}_2\text{O}_2$ .

D'un point de vue cinétique, pour la SOR sauvage, le T<sub>2</sub> évolue très vite vers la formation de l'espèce finale Fe-Glu, correspondant au remplacement du ligand HO<sup>-</sup> du T<sub>2</sub> par le Glu 47. Cette étape est décrite par la constante de vitesse  $k_3$ . Ainsi la valeur du  $k_2$  et du  $k_3$  sont généralement assez proches et les analyses cinétiques pour déterminer ces valeurs de  $k_2$  et  $k_3$  doivent se faire par modélisation d'une même trace cinétique par deux processus exponentiels:  $m_1 + (A_2 \times e^{(k_3 t)}) - (A_1 \times e^{(-k_2 t)})$  avec  $m_1$  = Absorbance finale,  $A_2$  = amplitude du deuxième phénomène,  $A_1$  = amplitude du premier phénomène,  $k_3$  et  $k_2$  : constantes de vitesse et  $t$  : le temps de la cinétique. Ceci est illustré dans la figure ci-dessous (Figure 65).



**Figure 65 :** (En bleu) Cinétique à 655 nm de la réaction de la SOR I118D avec O<sub>2</sub><sup>•-</sup>. La SOR I118D à 100 μM dans du tampon 2 mM Tris-HCl pH 9,5 et 10 mM formiate est saturée avec 100 % d'O<sub>2</sub>. L'échantillon est irradié par une impulsion de 0,6 μs générant 9 μM de O<sub>2</sub><sup>•-</sup>. Lampe Tungstène avec un filtre à 425 nm. (En noir) Modélisation de la cinétique par un double processus exponentiel:  $m_1 + (A_2 \times e^{(k_3 t)}) - (A_1 \times e^{(-k_2 t)})$ .

Les résultats de la dépendance du  $k_2$  en fonction du pH pour les SORs mutantes sont représentés en comparaison avec ceux obtenus pour la SOR sauvage (Figure 66). Notons que les résultats obtenus pour les  $k_2$  des mutants I118 présentent des incertitudes assez fortes dans certains cas. Ceci est principalement dû au fait que les cinétiques décrites pour le  $k_2$  et le  $k_3$  sont très proches et difficiles à analyser avec précision. Il est donc nécessaire de reproduire plusieurs fois les mêmes cinétiques pour diminuer au maximum ces incertitudes.



**Figure 66 :** Dépendance au pH de la constante de vitesse  $k_2$  des mutants I118A, I118D, I118S et I118V. La réaction se fait entre les SORs à 100  $\mu\text{M}$  dans du tampon 2 mM, 10 mM formiate, saturée à 100 % d' $\text{O}_2$  avec  $\text{O}_2^{\cdot -}$  à 6  $\mu\text{M}$ , générés par radiolyse pulsée. Utilisation de la lampe Tungstène avec un filtre à 425 nm.

L'étude du  $k_2$  en fonction du pH pour la SOR sauvage a montré la présence de deux phénomènes distincts avec une cassure de pente à pH 8,5 (Figure 66-courbe noire). Entre pH 5 et pH 8,5, le  $k_2$  diminue de façon linéaire en fonction du pH et cela a été attribué à la protonation du  $\text{T}_1$  par  $\text{H}_3\text{O}^+$  du solvant. La pente de 0,43 au lieu du 1 théorique pour ce type de processus laisse penser que la protonation est légèrement contrainte par l'environnement du site actif.

Entre pH 8,5 et 10,2, le  $k_2$  est indépendant du pH avec une valeur de l'ordre de  $10^2 \text{ s}^{-1}$ . Il a été proposé que cette étape corresponde toujours à un processus de protonation, mais soit par l'intermédiaire d'une molécule d' $\text{H}_2\text{O}$ , soit par un ou plusieurs acides aminés proche du site actif qui seraient protonés dans cette gamme de pH. En effet, dans cette gamme de pH, le

spectre du  $T_2$  est le même qu'à pH acide, suggérant qu'on a un même processus à pH acide et basique.

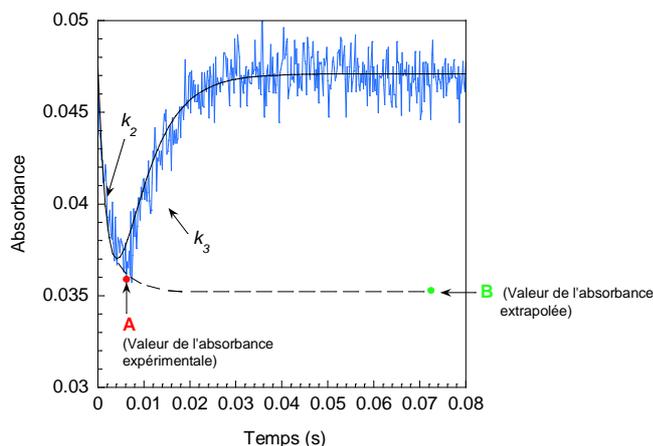
Pour le mutant I118V, la constante de vitesse  $k_2$  déterminée à tous les pH est identique à celles obtenues pour la SOR sauvage. La cassure de pente se situe à pH 8,5 et les deux courbes en dessous et au dessus de pH 8,5 sont superposables (Figure 66). Le mutant I118V ne modifie donc pas la cinétique de la première étape de protonation du  $T_1$ .

Pour les mutants I118A, I118S et I118D, on observe toujours une dépendance linéaire du  $k_2$  à pH acide et une indépendance au pH à pH basique (Figure 66). Cependant, pour ces trois mutants, la cassure de pente entre les deux phénomènes est déplacée vers des pH plus acides, pH 7 au lieu de 8,5 pour la SOR sauvage. Entre pH 5 et pH 7, les constantes de vitesses sont identiques à celles de la SOR sauvage et diminuent linéairement de la même façon lorsque le pH augmente. Ceci correspond bien à une protonation du  $T_1$  par  $H_3O^+$  provenant du solvant. Au delà de pH 7, la constante de vitesse  $k_2$  devient indépendante au pH mais les constantes de vitesse sont 3 fois plus élevées que pour la SOR sauvage. La réaction de protonation par une molécule d'eau est donc plus rapide pour les mutants I118A, I118D et I118S et se fait à un pH plus acide que sur la SOR sauvage. Ceci suggère que pour ces mutants, l'intermédiaire  $T_1$  est plus facilement protonable par une molécule d'eau. Cet intermédiaire semble présenter un pKa plus basique que celui de la SOR sauvage.

#### IV.1. Reconstitution du spectre du $T_2$

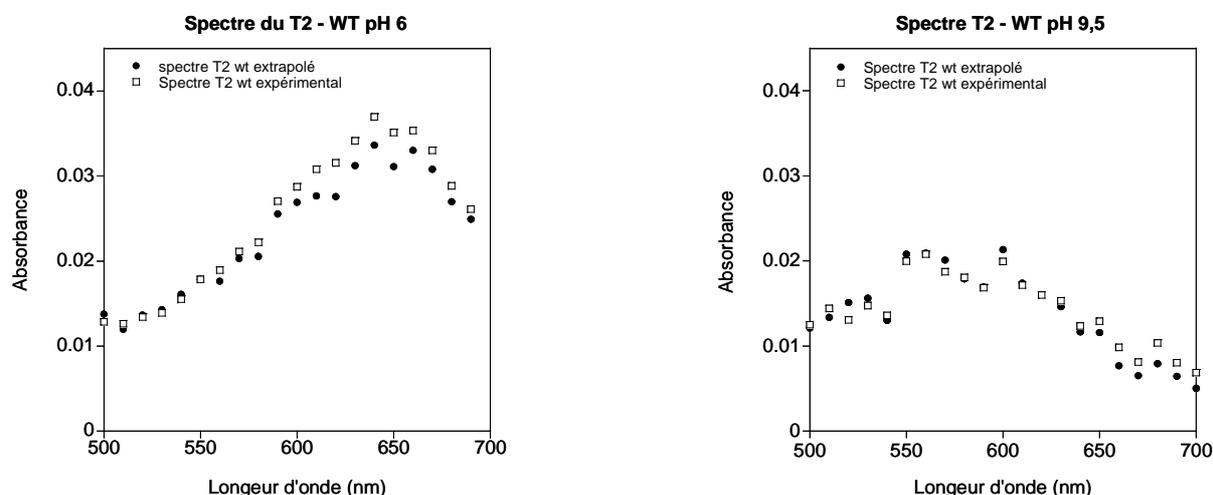
Etant donné que les cinétiques du  $k_2$  et du  $k_3$  sont très proches et que le second intermédiaire n'a pas le temps de s'accumuler avant de donner le produit final, il peut être difficile de reconstituer les spectres du  $T_2$ . Deux méthodes sont donc utilisées pour reconstituer ce spectre :

- la méthode expérimentale, où, à chaque longueur d'onde, la valeur de l'absorbance est lue au point le plus bas de la cinétique (A) correspondant au temps  $t = 5 \mu s$  après le début de la réaction.
- la méthode par extrapolation, où la valeur d'absorbance à chaque longueur d'onde est obtenue à partir d'une extrapolation de la modélisation de la cinétique  $k_2$ , comme cela est représenté par le point (B) dans la Figure 67.



**Figure 67 :** Détermination de l'absorbance du T2 à 655 nm (En bleu) Cinétique à 655 nm de la réaction de la SOR I118D avec  $O_2^{\bullet-}$ . La SOR I118D à 100  $\mu M$  dans du tampon 2 mM Tris-HCl pH 9,5 et 10 mM formiate est saturée avec 100 % d' $O_2$ . L'échantillon est irradié par une impulsion de 0,6  $\mu s$  générant 9  $\mu M$  de  $O_2^{\bullet-}$ . Lampe Tungsten avec un filtre à 425 nm. (En noir) Modélisation de la cinétique par un double processus exponentiel:  $m_1 + (A_2 \times e^{(k_3 t)}) - (A_1 \times e^{(-k_2 t)})$  avec  $m_1$  = Absorbance finale,  $A_2$  = amplitude du deuxième phénomène,  $A_1$  = amplitude du premier phénomène,  $k_3$  et  $k_2$  : les constantes de vitesse et  $t$  : le temps de la cinétique (En pointillés) Extrapolation de la modélisation de la cinétique du  $k_2$  à un temps infini. La valeur de l'absorbance de T2 à 655 nm est égale à  $m_1 - A_2$ .

Les deux méthodes ont été réalisées pour la reconstitution des spectres du T<sub>2</sub> de la SOR sauvage et des quatre mutants à pH 6 et à pH 9,5 (Figure 68).



**Figure 68 :** Spectres du T<sub>2</sub> à pH 6 et pH 9,5 de la SOR wt de *D. baarsii*, reconstitué par la méthode expérimentale (□) et par la méthode d'extrapolation (●) (Bonnot thèse 2009).

Pour la SOR sauvage, les spectres expérimentaux et extrapolés à pH 6 et pH 9,5 du second intermédiaire T<sub>2</sub> sont identiques. A pH acide, le spectre est caractéristique d'une espèce  $Fe^{3+}-OH_2$  avec son maximum à 644 nm. A pH basique, le spectre est caractéristique de l'espèce  $Fe^{3+}-OH$ , avec la bande à 560 nm. Ces deux espèces  $Fe^{3+}-OH_2$  et  $Fe^{3+}-OH$  sont en

équilibre acido-basique avec une valeur de pKa entre 6 et 7 (Bonnot et al. 2009 ; Rodrigues et al. 2006).

Les spectres extrapolés et expérimentaux des intermédiaires T<sub>2</sub> des mutants I118A, I118D, I118S et I118V à pH 6 et pH 9,5 sont également superposables. Pour la représentation des résultats, seuls les spectres expérimentaux sont montrés (Figure 69).

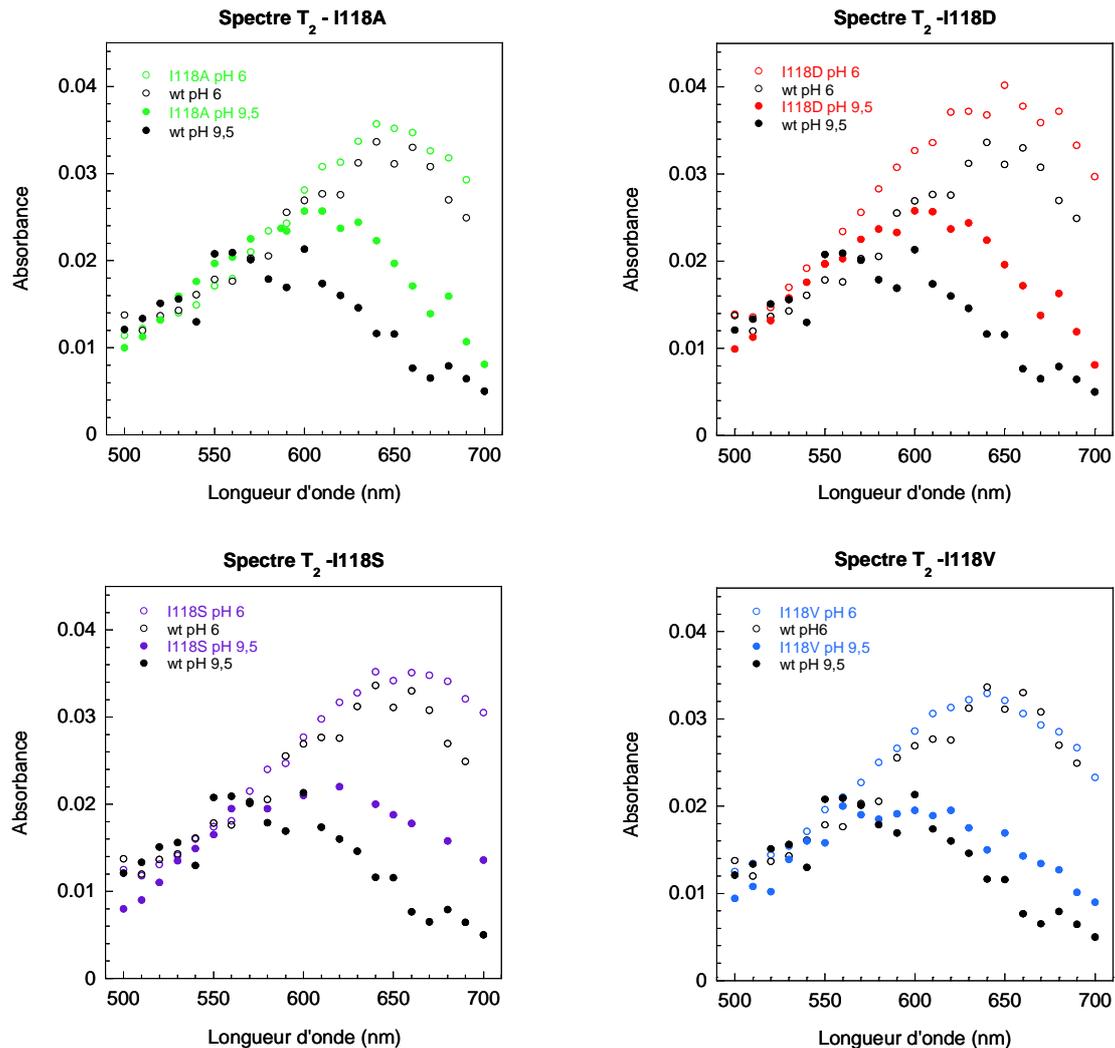


Figure 69 : Spectre du T<sub>2</sub> pour les mutants I118A, I118D, I118S et I118V à pH 6 et pH 9,5.

Pour le mutant I118V, les spectres du T<sub>2</sub> à pH 6 et 9,5 sont superposables à ceux de la SOR sauvage. Le spectre à pH 6 montre une bande d'absorption centrée vers 650 nm, correspondant à l'espèce Fe<sup>3+</sup>-OH<sub>2</sub>. A pH 9,5, la bande se déplace à 560 nm, correspondant à une espèce Fe<sup>3+</sup>-OH. L'intermédiaire T<sub>2</sub> du mutant I118V est donc le même que celui de la SOR sauvage.

Pour les mutants I118A, I118D et I118S, à pH 6, les spectres sont également superposables à ceux obtenus pour la SOR sauvage et correspondent à l'espèce  $\text{Fe}^{3+}\text{-OH}_2$ .

Cependant à pH 9,5, les spectres sont différents par rapport à la SOR sauvage. La bande d'absorption du  $T_2$  est moins déplacée vers les plus faibles longueurs d'onde que pour la SOR sauvage et se situe autour de 600 nm pour les mutants I118A, I118D et I118S.

L'espèce  $T_2$  formée à pH 9,5 pour les mutants I118A, I118D et I118S n'est donc pas tout à fait identique à celle formée pour la SOR sauvage et le mutant I118V au même pH. Son maximum d'absorption est intermédiaire entre la forme  $\text{Fe}^{3+}\text{-OH}$  et la forme  $\text{Fe}^{3+}\text{-OH}_2$ . Ces données suggèrent que le pKa du  $T_2$  pour ces mutants a été fortement augmenté par rapport au  $T_2$  de la SOR sauvage.

### Conclusions :

Le passage du  $T_1$  au  $T_2$  n'est pas modifié par la mutation I118V. En effet, les constantes de vitesse  $k_2$  sont identiques à celles obtenues pour la SOR sauvage quelque soit le pH. Ceci indique qu'une molécule d' $\text{H}_3\text{O}^+$  protone le  $T_1$  entre pH 5 et pH 8,5 et qu'une molécule d'eau ou un acide aminé dans l'environnement du site actif prend le relais au-delà de pH 8,5. De plus, les spectres du  $T_2$  sont les mêmes que ce soit à pH acide ou à pH basique, ce qui indique que l'espèce  $T_2$  formée dans le mutant I118V correspond bien aux mêmes formes  $\text{Fe}^{3+}\text{-OH}_2$  à pH acide et  $\text{Fe}^{3+}\text{-OH}$  à pH basique que pour la SOR sauvage.

Les mutants I118A, I118D et I118S induisent des modifications par rapport à la SOR sauvage. La constante  $k_2$  devient pH indépendante au-delà de pH 7 au lieu de pH 8,5 pour la SOR sauvage. D'autre part cette valeur de  $k_2$  pH indépendante est augmentée d'un facteur 3 par rapport à la SOR sauvage. Donc pour ces trois mutants, la protonation du  $T_1$  par une molécule d'eau est facilitée par rapport à la SOR sauvage.

Il faut noter que cet effet ne peut pas être dû directement à la mutation de l'isoleucine 118 d'un point de vue structural car elle ne peut pas être en contact direct avec le  $T_1$ . En effet, la position 118 se trouve du côté du ligand cystéine, de l'autre côté du site de fixation du  $\text{O}_2^{\cdot-}$  par rapport au fer. Cependant, ces mutants peuvent avoir des effets électroniques indirects sur le  $T_1$  par l'intermédiaire du fer. Comme cela a été supposé précédemment, ces mutations peuvent être à l'origine d'une augmentation de charge électronique autour de la liaison S-Fe. Cela pourrait conduire à un effet électrodonneur du peroxyde au fer plus faible et à une augmentation du pKa de cet intermédiaire. Ainsi, l'espèce  $T_1$  des mutants I118A, I118S et

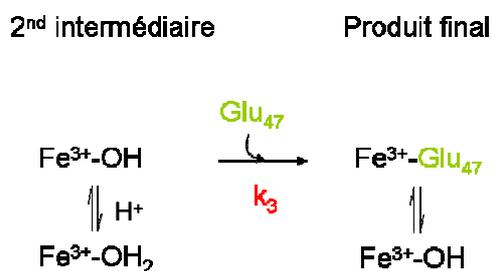
I118D pourrait être plus basique et donc plus facilement protonable par un acide faible tel que H<sub>2</sub>O.

De plus, alors que le spectre du T<sub>2</sub> des mutants I118A, I118D et I118S à pH acide (pH 6,0) est identique à celui de la SOR sauvage, à pH basique (pH 9,5) il présente un maximum à 600 nm, au lieu de 560 nm pour la SOR sauvage. Cette bande d'absorbance à 600 nm semble indiquer un spectre intermédiaire dans l'équilibre acido-basique de l'espèce Fe<sup>3+</sup>-OH<sub>2</sub> à 650 nm et l'espèce Fe<sup>3+</sup>-OH à 560 nm. Notons qu'il est difficile pour ces mutants d'effectuer des études au-delà de pH 9,5 du fait de l'instabilité des protéines à pH très basiques. Pour la SOR sauvage, le pKa de cet équilibre pour le T<sub>2</sub> se trouve entre 6 et 7. (Bonnot *et al.* 2009 ; Rodriguez *et al.* 2006). Le fait que pour les mutants à pH 9,5, le spectre du T<sub>2</sub> soit intermédiaire entre les deux formes Fe<sup>3+</sup>-OH et Fe<sup>3+</sup>-OH<sub>2</sub>, suggère que le pKa de cet équilibre a été déplacé vers des valeurs beaucoup plus basiques que la SOR sauvage.

Donc, les mutations de l'isoleucine en alanine, serine ou aspartate semblent augmenter à la fois la basicité de l'intermédiaire T<sub>1</sub> (Fe<sup>3+</sup>-OO<sup>-</sup> / Fe<sup>2+</sup>-O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) ainsi que celle de l'intermédiaire T<sub>2</sub> (Fe<sup>3+</sup>-OH<sub>2</sub> / Fe<sup>3+</sup>-OH). Ces deux effets peuvent être expliqués par une augmentation de la densité électronique sur le Fe<sup>3+</sup> dans ces trois mutants.

## V. Effet des mutants sur le k<sub>3</sub>

La dernière étape du mécanisme réactionnel correspond à la fixation du glutamate 47 sur le T<sub>2</sub>, avec un déplacement du ligand H<sub>2</sub>O / HO<sup>-</sup> par le groupement carboxylate du glutamate 47 (Figure 70).



**Figure 70** : Schéma de la dernière étape du mécanisme réactionnel de la SOR de *D. baarsii* : fixation du glutamate 47 sur le fer du site actif.

Cette étape a été clairement identifiée grâce au mutant E47A où le remplacement du carboxylate du glutamate 47 entraîne la disparition de cette étape décrite par  $k_3$  (Nivière *et al.* 2004).

Comme cela a été décrit précédemment pour la SOR sauvage et les mutants, l'espèce  $\text{Fe}^{3+}\text{-Glu}$  est en équilibre avec la forme  $\text{Fe}^{3+}\text{-OH}$  selon le pH, correspondant à la transition alcaline et dont les pKa apparents ont été déterminés précédemment (Partie I-chapitre V-2).

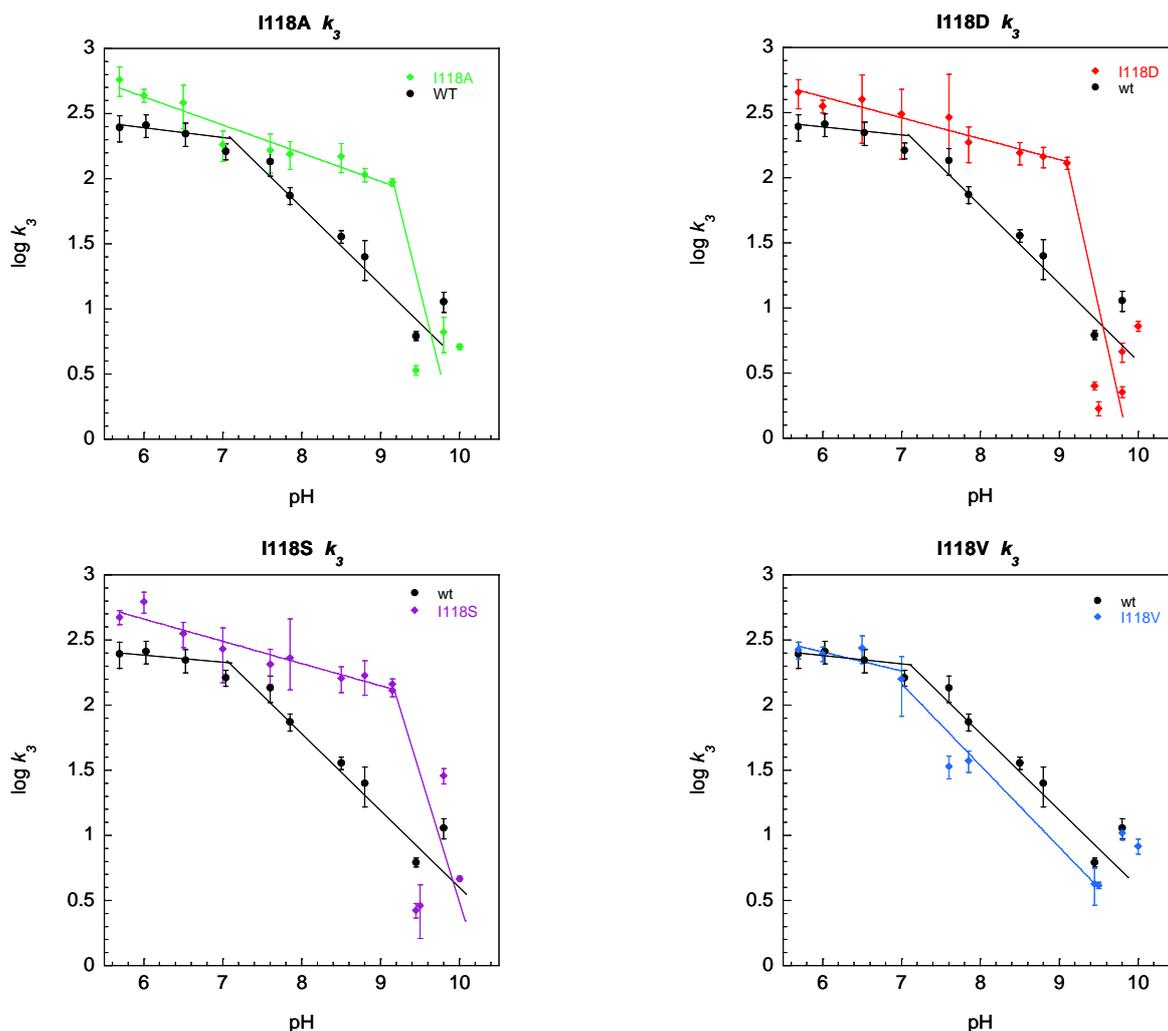
La constante  $k_3$  pour les mutants I118 a été déterminée à partir des mêmes cinétiques que celles utilisées pour déterminer le  $k_2$ .

Les cinétiques sont modélisées par la somme de deux exponentielles correspondant aux étapes décrites par le  $k_2$  et le  $k_3$ , comme cela a été décrit précédemment. Les constantes  $k_3$  ont été déterminées à différents pH. Les résultats sont exprimés en  $\log k_3$  en fonction du pH (Figure 71).

Pour la SOR sauvage, la constante de vitesse  $k_3$  est indépendante au pH entre pH 5 et pH 7. Au-delà de pH 7 une rupture de pente est visible et  $k_3$  devient dépendant au pH et diminue avec le pH. Ces données sont caractéristiques d'une catalyse acide générale (Piszkiwics 1977). La cassure de la pente correspond au pKa de cette réaction, avec une valeur de 7 pour la SOR sauvage (Figure 71). Cette catalyse acide générale correspond au fait qu'au niveau du  $\text{T}_2$ , il est plus facile et donc plus rapide pour un carboxylate de s'échanger avec un ligand  $\text{H}_2\text{O}$  (issue de la protonation de  $\text{HO}^-$ ), plutôt qu'avec un ligand hydroxo ( $\text{HO}^-$ ).

Notons que le pKa associé à cette catalyse acide générale est différent du pKa observé pour la transition alcaline, correspondant à l'équilibre des espèces  $\text{Fe}^{3+}\text{-OH} - \text{Fe}^{3+}\text{-Glu}$ , avec une valeur de 9 alors que le pKa observé sur le  $k_3$  correspond à l'équilibre acido-basique du second intermédiaire  $\text{T}_2 \text{Fe}^{3+}\text{-OH}_2 / \text{Fe}^{3+}\text{-OH}$ .

Les constantes de vitesses  $k_3$  obtenues à différent pH pour les mutants I118A, I118D, I118S et I118V sont représentées ci-dessous (Figure 71):



**Figure 71 :** Dépendance au pH de la constante de vitesse  $k_3$  des mutants I118A, I118D, I118S et I118V. La réaction se fait entre les SORs à 100  $\mu\text{M}$  dans du tampon 2 mM et 10 mM formiate, saturée avec 100 % d' $\text{O}_2$  et  $\text{O}_2^-$  à 6  $\mu\text{M}$ , généré par radiolyse pulsée. Utilisation de la lampe Tungstène avec un filtre à 425 nm.

Le mutant I118V réagit de la même manière que la SOR sauvage. La cassure de pente se fait à pH 7. Au-delà de pH 7, la constante de vitesse  $k_3$  apparaît légèrement plus faible que celle observée pour la SOR sauvage. Cependant, ce mutant I118V ne modifie pas de façon importante cette étape de fixation du glutamate 47 sur l'intermédiaire  $\text{T}_2$ .

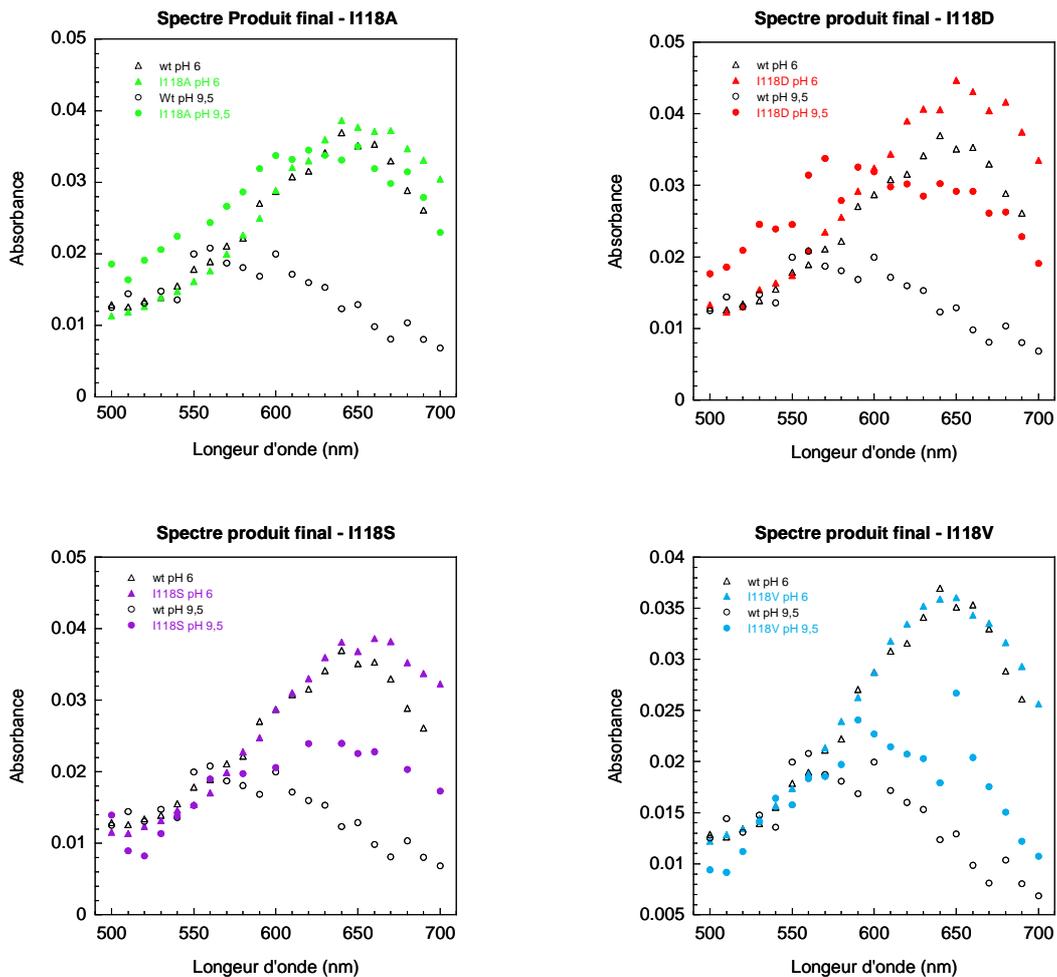
Pour les mutants I118A, I118D et I118S, on observe un net déplacement du pKa de la catalyse acide vers des pH plus basiques. La cassure de pente se situe vers pH 9,0 pour les 3 mutants. Les constantes de vitesse  $k_3$  sont relativement stables jusqu'à pH 9,1 puis diminuent rapidement au delà de cette valeur. Cela indique que pour ces mutants, le passage du  $\text{T}_2$  au produit final est facilité. Cela va dans le sens de ce qui a été proposé précédemment. A savoir que pour le  $\text{T}_2$  des mutants, l'espèce  $\text{Fe}^{3+}\text{-OH}_2$  est plus stable à pH basique. Il est donc plus

facile pour le carboxylate du glutamate de s'échanger avec le ligand  $\text{H}_2\text{O}$  qu'avec le ligand  $\text{HO}^-$ . Cela est traduit par un  $k_3$  plus élevé jusqu'à pH 9,0. Le pKa de cette catalyse acide reflète donc le pKa associé au  $\text{T}_2$ . Cette valeur de 9 déterminée ici par le  $k_3$  est en accord avec l'estimation du pKa du  $\text{T}_2$  pour les mutants I118A, I118D et I118S.

## V.1. Spectre du produit final

Pour la SOR sauvage, le spectre du produit final est différent selon le pH correspondant à la transition alcaline  $\text{Fe}^{3+}\text{-OH} / \text{Fe}^{3+}\text{-Glu}$  (Rodrigues *et al.* 2006). Les spectres finaux sont obtenus en prenant la valeur de l'absorbance à la fin des cinétiques entre 100  $\mu\text{s}$  et 2 ms après le début de la réaction avec  $\text{O}_2^{\bullet-}$ . Les cinétiques sont réalisées tous les 10 nm entre 500 et 700 nm.

Les résultats pour les mutants de l'isoleucine sont les suivants (Figure 72):



**Figure 72 :** Spectres reconstitués de la SOR en fin de réaction avec le superoxyde pour les mutants I118A, I118D, I118S et I118V à pH 6 et pH 9,5. Même conditions expérimentales que la figure 72.

Pour le mutant I118V, les spectres à pH 6 et pH 9,5 se superposent à ceux de la SOR sauvage. Le produit final de ce mutant est donc le même que celui de la SOR sauvage aux deux pH (Figure 72).

Pour les mutants I118A, I118S et I118D, les spectres à pH acide sont identiques à celui de la SOR. L'espèce  $\text{Fe}^{3+}\text{-Glu}$  est donc bien formée.

A pH basique, les spectres de ces trois mutants sont différents du sauvage. Le spectre à pH 9,5 du mutant I118A présente une bande centrée à 625 nm. Celui du mutant I118D présente une large bande centrée autour de 600 nm. Et finalement, celui du mutant I118S présente une bande centrée à 625 nm, mais avec une absorbance plus faible que celle obtenue pour le mutant I118A (Figure 72).

Ces résultats indiquent que pour ces mutants les espèces finales à pH 9,5 ne correspondent pas tout à fait à la forme  $\text{Fe}^{3+}\text{-OH}$  observée pour la SOR sauvage et le mutant I118V.

Notons que les valeurs des pKa de la transition alcaline de ces mutants sont déplacées vers les pH plus basique, en particulier pour le mutant I118S. Les spectres de la Figure 72 ayant été réalisés à pH 9,5, c'est-à-dire très proche des pKa de la transition alcaline, cela suggère fortement que pour ces mutants, les produits finaux observés ne correspondent pas à l'espèce  $\text{Fe}^{3+}\text{-OH}$  mais à un mélange des espèces  $\text{Fe}^{3+}\text{-Glu}$  et le  $\text{Fe}^{3+}\text{-OH}$ . Il faudrait donc déterminer le spectre des produits peroxyde à pH beaucoup plus basique, par exemple pH 10,5. Cependant ceci n'est pas possible à cause de l'instabilité de ces mutants à pH très basique.

Néanmoins, ces résultats indiquent que l'espèce  $\text{Fe}^{3+}\text{-Glu}$  est stabilisée dans les SORS mutantes I118A, I118D et I118S par rapport à la SOR sauvage et donc que le pKa de la transition alcaline est légèrement plus basique que pour la SOR sauvage, comme le montrait les expériences de la Figure 53.

En conclusion, en comparaison avec la SOR sauvage, les mutants I118A, I118D et I118S semblent favoriser la formation de l'espèce  $\text{Fe}^{3+}\text{-Glu}$ . Bien que pour la transition alcaline, le phénomène soit peu marqué, cela va dans le même sens que l'effet des mutations sur les intermédiaires réactionnels  $T_1$  et  $T_2$ .

## VI. Conclusion

Ces expériences de radiolyse pulsée ont permis d'étudier l'impact des mutations de l'isoleucine 118 sur la réactivité avec le superoxyde et de regarder leurs effets sur chaque étape du mécanisme catalytique de la SOR.

La première étape, correspondant à la fixation du superoxyde sur le  $\text{Fe}^{2+}$  et à la formation du premier intermédiaire  $T_1$ , n'est pas modifiée par les différentes mutations sur l'isoleucine 118.

Pour les étapes suivantes, le mutant I118V présente les mêmes cinétiques de  $k_2$  et de  $k_3$  ainsi que les mêmes spectres des intermédiaires que la SOR sauvage. La mutation de l'isoleucine en valine ne modifie donc pas la réactivité de la SOR avec le superoxyde.

Les mutants I118A, I118D et I118S modifient les cinétiques décrites par  $k_2$  et  $k_3$  ainsi que les spectres des intermédiaires. L'analyse de ces résultats indique que ces mutants induisent une augmentation de la basicité du  $T_1$  ( $\text{Fe}^{3+}\text{-OO}^- / \text{Fe}^{2+}\text{-O}_2^{\bullet-}$ ) ainsi que du  $T_2$  ( $\text{Fe}^{3+}\text{-OH}_2 / \text{Fe}^{3+}\text{-OH}$ ). Ceci a pour conséquence une augmentation de la vitesse de protonation du  $T_1$  et du  $T_2$  ainsi qu'une certaine stabilisation de la forme  $\text{Fe}^{3+}\text{-Glu}$  du produit final à pH basique.

Les résultats précédents ont fortement suggéré que les mutations de l'isoleucine en position 118 entraînent un affaiblissement de la liaison hydrogène entre le NH de la chaîne principale et le soufre ligand du fer. Cela induit un déplacement de la densité électronique du soufre vers le fer du site actif de la SOR. La liaison S-Fe est donc renforcée. Cette augmentation de densité électronique autour du fer est en accord avec une augmentation de la basicité des intermédiaires réactionnels  $\text{Fe}^{3+}\text{-OO}^-$  et  $\text{Fe}^{3+}\text{-OH}$  qui se forment au cours de la réaction avec le superoxyde.

Ces résultats peuvent être comparés à ceux obtenus pour le mutant E114A (Annexe 1). Le glutamate E114 établit une interaction de type dipolaire avec le soufre ligand du fer. Les études sur le mutant E114A montrent que la mutation affaiblit la force de la liaison S-Fe, ce qui diminue à la fois la force de la liaison Fe-O et le pKa de l'intermédiaire Fe-peroxyde formé au cours de la réaction enzymatique. Les cinétiques de formation du second intermédiaire sont plus lentes que celle observée pour la SOR sauvage. Cela est donc à l'opposé de ce qui se passe pour les mutants I118A, I118D et I118S. La SOR contient donc un réseau d'interaction dans son site actif capable de réguler finement sa réactivité avec le superoxyde.

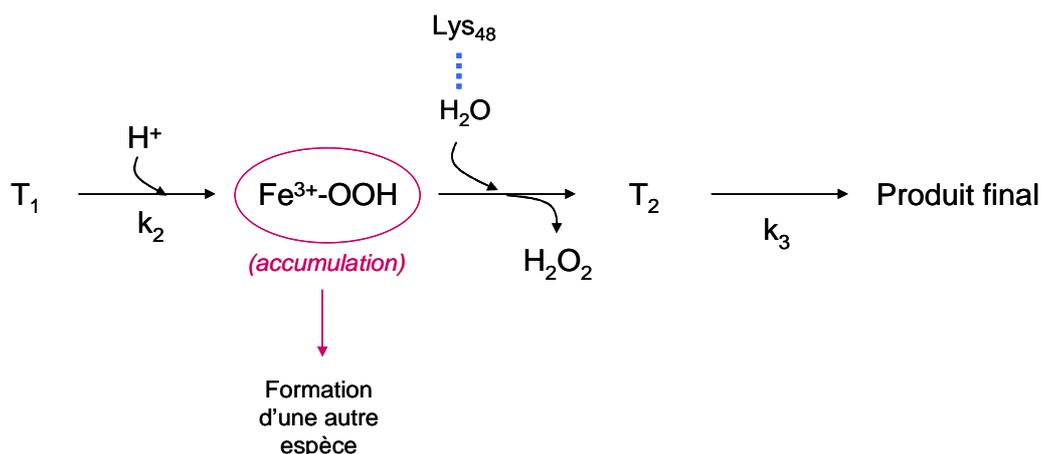
L'ensemble de ces données supporte le fait que la modulation de la liaison S-Fe a un impact direct sur la réactivité avec le superoxyde. Si la liaison est affaiblie comme dans le mutant E114A, alors la réactivité avec le superoxyde est plus lente. A l'inverse, si la liaison S-Fe est renforcée comme pour les mutants I118A, I118D et I118S, alors la réactivité avec le superoxyde est accélérée.

Il est étonnant de voir que pour un processus visant à éliminer une molécule toxique pour la cellule, la SOR sauvage présente une vitesse de réaction plus faible que celle des mutants de l'isoleucine étudiés ici.

On est tenté d'imaginer que ce phénomène ne se fait pas par hasard et pourrait être lié à un mécanisme de régulation des espèces toxiques libres dans la cellule.

Ainsi, d'un point de vue cellulaire, il peut être avantageux que la SOR sauvage piège un certain temps le superoxyde et la molécule d' $H_2O_2$  au sein de son site actif, ce qui limiterait les dommages cellulaires causés par ces espèces.

Si on se place au niveau du cycle catalytique de la SOR, une cinétique de formation plus lente de l'intermédiaire réactionnel,  $Fe^{3+}$ -OOH (non visible en radiolyse), limiterait son accumulation au sein du site actif. Une telle accumulation pourrait conduire à l'évolution du fer-peroxyde vers d'autres espèces que  $H_2O_2$  et  $Fe^{3+}$ . Il pourrait évoluer notamment vers des entités plus oxydables, telle que des fer-oxo, comme cela se passe pour d'autres systèmes enzymatique comme le Cyt P450 par exemple.



Cependant, sur les mutants I118A, I118S et I118D qui accélèrent la formation de l'espèce  $Fe^{3+}$ -OOH, on ne voit pas d'accumulation de cette espèce. Ceci est probablement dû au fait que ces mutations n'affectent qu'une seule liaison hydrogène vis-à-vis du ligand soufré. Or, dans la structure aux RX de la SOR il y a une autre liaison hydrogène entre le soufre et

l'histidine 119 susceptible de moduler également la liaison S-Fe. S'il était possible d'éliminer cette liaison hydrogène en même temps que celle de l'isoleucine 118, peut être verrions-nous une accumulation. Nos verrons au chapitre suivant que les espèces  $\text{Fe}^{3+}$ -OOH formées au sein du site actif de ces mutants ont une réactivité particulière.



## *PARTIE 4 :*

*Propriétés des espèces Fe-OOH  
des mutants 1118.*



## I. Etude par résonance Raman des espèces Fe-OOH

Afin d'étudier les effets des mutations de l'isoleucine 118 sur les propriétés des espèces intermédiaires fer-(hydro)peroxyde qui se forment lors des réactions avec  $O_2^{\bullet -}$ , il est essentiel de pouvoir les piéger (équation 1). Cependant, la réaction de la SOR avec le superoxyde est très rapide et le piégeage des intermédiaires fer-(hydro)peroxyde, qui disparaissent en seulement quelques millisecondes, n'est pas possible actuellement. Une alternative à cela a été de former ces intermédiaires en faisant réagir la SOR avec un léger excès d' $H_2O_2$ , reproduisant d'une certaine façon la réaction inverse de celle avec  $O_2^{\bullet -}$  (équation 2). Dans ces conditions, des espèces fer-(hydro)peroxyde ont pu être piégées au site actif de la SOR et étudiées par RR (Mathé et al. 2006).



*Intermédiaire  
réactionnel*

Notons que ce type de réaction avec  $H_2O_2$  (équation 2) a été décrit depuis longtemps dans le cas des complexes synthétiques de fer pour former et piéger des espèces fer-(hydro)peroxyde (Girerd et al. 2000). Les fer-(hydro)peroxyde peuvent être formés à partir de la réaction de complexe de fer ferreux ou de fer ferrique avec un léger excès de  $H_2O_2$ , comme cela a aussi été décrit dans le cas de la SOR (Mathé et al. 2002, Mathé et al. 2006). La SOR est mélangée à 4°C avec 6 équivalents d' $H_2O_2$  et congelée rapidement dans l'azote liquide, dans les 5 à 10 secondes suivant le mélange. Une espèce fer-(hydro)peroxyde a pu être ainsi observée par RR, en particulier sur les mutants E47A et E114A qui induisent une certaine stabilisation du fer-(hydro)peroxyde, facilitant ainsi son piégeage (Mathé et al. 2007, Mathé thèse 2005).

Notons que la réaction de la SOR sauvage avec  $H_2O_2$  permet aussi de piéger une espèce fer-(hydro)peroxyde, mais dans des proportions beaucoup plus faibles par rapport à ce qui a été déterminé avec le mutant E47A. Cependant, dans les deux cas, il a été montré que les spectres de résonance Raman présentent deux nouvelles bandes à  $849\text{ cm}^{-1}$  et  $437\text{ cm}^{-1}$  que l'on n'observe pas pour les protéines oxydées par  $K_2IrCl_6$ . Ces deux bandes ont été attribuées à des modes de vibrations  $\nu(O-O)$  pour la bande à  $849\text{ cm}^{-1}$  et  $\nu(Fe-O)$  pour la bande à  $437\text{ cm}^{-1}$  de l'espèce fer-(hydro)peroxyde. Ces valeurs sont comparables à celles qui ont été déterminées pour des  $Fe^{3+}$ -(hydro)peroxyde formés dans certains complexes de fer (Girerd et



SOR	Fréquences de l'espèce fer-(hydro)peroxyde (cm <sup>-1</sup> )	
	v(Fe-O)	v(O-O)
WT	435	850
I118A	436	852
I118D	438	851
I118S	436	851
I118V	436	850

**Tableau 11** : Fréquences de RR associées à l'espèce fer-(hydro)peroxyde formée après le mélange rapide de la SOR sauvage et des mutants I118 avec H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (conditions identiques à celles de la figure 74).

Lorsque les mutants sont traités avec 6 équivalents d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à pH 8,5 et congelés rapidement, les spectres RR montrent de nouvelles bandes vers 436, 825 et 850 cm<sup>-1</sup> qui ne sont pas présentes dans les spectres RR des protéines oxydées à l'iridium (Figure 73). Notons que les bandes vers 436 et 850 cm<sup>-1</sup> sont très faibles, d'une intensité comparable à celles observée pour la SOR sauvage. Ces fréquences correspondent à des modes d'étirement v(Fe-O) et v(O-O) d'une espèce Fe<sup>3+</sup>-(hydro)peroxyde, comme cela a été vérifié pour la SOR sauvage et pour le mutant E47A de la SOR de *D. baarsii* en utilisant un marquage isotopique <sup>18</sup>O (Mathé et al. 2002 ; Mathé et al. 2006).

La faible intensité de ces bandes à 436 et 850 cm<sup>-1</sup> suggère que l'espèce Fe<sup>3+</sup>-(hydro)peroxyde n'est pas fortement stabilisée au site actif des mutants de l'isoleucine 118, après 10 secondes d'incubation avec H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Les fréquences des bandes correspondant aux liaisons Fe-O et O-O ne semblent pas fortement perturbées par les mutations. L'intensité de ces bandes étant faible, les légères différences notées sur les spectres des mutants de la Figure 73 par rapport à la SOR sauvage ne sont sans doute pas significatives.

Cependant, dans le cas des mutants I118A, I118D et I118S, on voit apparaître une bande relativement intense à 825 cm<sup>-1</sup> qui ne se retrouve ni pour la SOR sauvage ni pour le mutant I118V. Cette bande a déjà été observée dans le cas du mutant E47A pour des incubations en présence d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> supérieure à la minute (Mathé thèse 2005). Pour le mutant E47A, l'apparition de cette bande à 825 cm<sup>-1</sup> se fait parallèlement à la disparition des bandes à 436 et 850 cm<sup>-1</sup> et semble donc résulter d'une évolution de l'espèce fer-peroxyde. En présence d'H<sub>2</sub><sup>18</sup>O<sub>2</sub>, cette bande est déplacée de - 34 cm<sup>-1</sup> vers les basses fréquences (Mathé thèse 2005). On note que les espèces fer-oxo (Fe=O) à haut degré d'oxydation présentent le même type de caractéristique en RR. On peut donc se poser la question si l'espèce fer-(hydro)peroxyde de la SOR n'évoluerait pas vers la formation de fer-oxo par rupture de la liaison O-O du peroxyde.

Alternativement, cette bande à  $825\text{ cm}^{-1}$  pourrait correspondre à une nouvelle espèce peroxydique au site actif de la SOR.

En effet, une étude par spectrométrie de masse sur les mutant E47A a montré qu'une incubation avec  $\text{H}_2\text{O}_2$  supérieure à une minute conduit spécifiquement à l'apparition de nouveaux pics de masse, dont un présent en quantité presque équivalente à celui de l'apoprotéine, et correspondant à l'addition d'un atome d'oxygène sur la chaîne polypeptidique de la SOR. L'origine de cet oxygène pourrait correspondre à un adduit alkyl-peroxyde ( $\text{Fe}^{3+}\text{-O-O-R}$ ) dont la liaison O-O serait rompue durant l'analyse par spectrométrie de masse (*Mathé thèse 2005*). Ainsi pour le mutant E47A, il a été proposé que l'espèce (fer-peroxyde) formée à partir du mélange avec  $\text{H}_2\text{O}_2$  évoluerait en formant un alkyl peroxyde sur la chaîne polypeptidique de la SOR, reflétant ainsi une certaine réactivité de l'espèce fer-peroxyde.

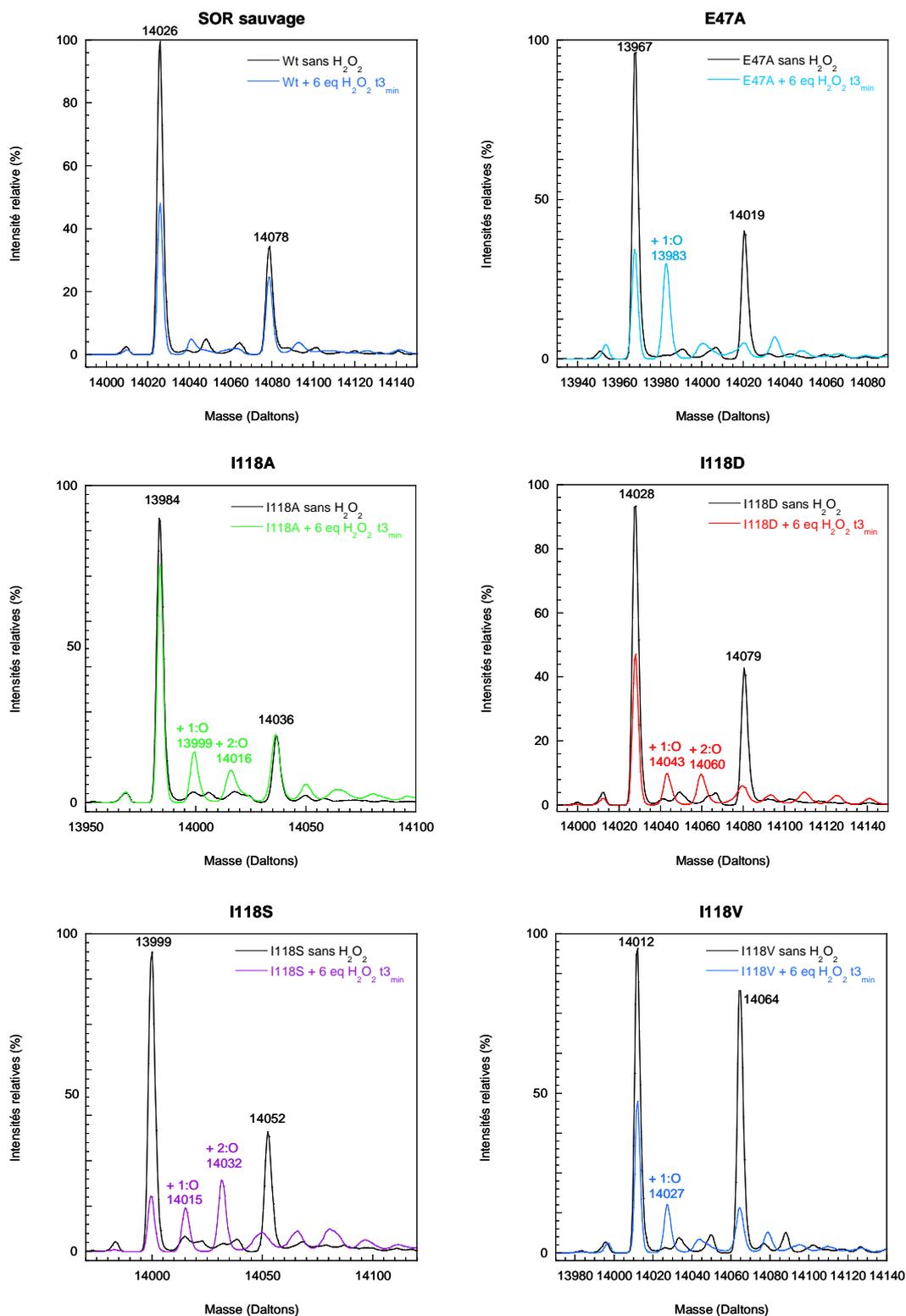
Il faut noter que dans le cas du E47A, cette bande à  $825\text{ cm}^{-1}$  apparaît après plusieurs dizaine de seconde d'incubation avec  $\text{H}_2\text{O}_2$  (*Mathé thèse 2005*). Dans le cas des mutants I118A, I118D et I118S, cette bande apparaît en moins de 10 secondes. Ceci suggère que l'espèce formée lors du mélange avec  $\text{H}_2\text{O}_2$  et donnant une bande à  $825\text{ cm}^{-1}$  apparaît beaucoup plus rapidement pour les mutants I118A, I118S et I118D que pour le mutant E47A. Cette espèce pourrait également former des adduits d'oxygène sur la chaîne polypeptidique. Des études de spectroscopie de masse ont été réalisées sur les mutants I118 (voir Annexe 1) et montrent également la présence d'adduit d'un et deux oxygènes sur la chaîne polypeptidique de la protéine, dans les conditions équivalentes à celle des études RR.

En conclusion, les mutants I118A, I118D et I118S, après un mélange rapide avec  $\text{H}_2\text{O}_2$ , stabilisent une espèce de type  $\text{Fe}^{3+}\text{-O-O-(H)}$  au sein du site actif. Cette espèce évoluerait très rapidement vers la formation d'une autre espèce oxydante (par exemple un fer-oxo) qui conduirait à la formation d'un alkyl-peroxyde sur la chaîne polypeptidique de la SOR de type  $\text{Fe}^{3+}\text{-O-O-R}$ , R étant un acide aminé du site actif. Ce type d'évolution de l'espèce  $\text{Fe}^{3+}\text{-O-O-(H)}$  a déjà été observé pour le mutant E47A, mais avec une cinétique beaucoup plus lente. Il semblerait que les mutants I118A, I118D et I118S augmentent la réactivité du fer-peroxyde et en particulier son pouvoir nucléophile vis-à-vis de la chaîne latérale de résidus proche du site actif. Ces données vont de nouveau dans le sens d'une augmentation du pouvoir électrodonneur du soufre vers le fer pour ces mutants.

## II. Etudes par spectrométrie de masse des espèces Fe-OOH

Les spectres obtenus en résonance Raman laissent apparaître une bande à  $825\text{ cm}^{-1}$  pour les mutants I118A, I118S et I118D au bout de quelques secondes d'incubation des SOR avec  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Cette bande n'est pas visible dans le cas de la SOR sauvage et du mutant I118V, dans les mêmes conditions expérimentales. Cette bande à  $825\text{ cm}^{-1}$  avait déjà été retrouvée pour le mutant E47A, cependant pour des temps d'incubation avec  $\text{H}_2\text{O}_2$  beaucoup plus longs (au-delà d'une minute). Une analyse par spectrométrie de masse sur ce mutant a montré la présence d'adduit d'atome d'oxygène sur la chaîne peptidique du mutant, interprété ainsi comme une évolution de l'intermédiaire fer-(hydro)peroxo conduisant à la formation d'un  $\text{Fe}^{3+}$ -alkyl peroxyde sur un acide aminé proche du site actif (*Mathé thèse 2005*).

Pour les mutants I118A, I118D et I118S, il est important de noter que cette bande à  $825\text{ cm}^{-1}$  apparaît immédiatement (quelques secondes) après l'ajout de 6 équivalents d' $\text{H}_2\text{O}_2$ . Une étude de spectroscopie de masse a été réalisée sur ces mutants. Les analyses de spectrométrie de masse ont été réalisées dans des conditions équivalentes à celles utilisées pour la résonance Raman. Les échantillons analysés par spectrométrie de masse sont issus d'un mélange de SOR sous forme semi-réduite [ $\text{Fe}^{2+} / \text{Fe}^{3+}$ ] ou oxydée [ $\text{Fe}^{3+} / \text{Fe}^{3+}$ ] avec 6 équivalents d' $\text{H}_2\text{O}_2$  et incubés pendant 3 minutes. D'un point de vue de la progression de la réaction, ce temps d'incubation correspond environ au temps d'incubation de 5 à 10 secondes lors des expériences de résonance Raman avec une concentration de SOR 20 fois plus forte. Les spectres obtenus pour les mutants I118A, I118D, I118S, I118V, E47A et la SOR sauvage sont représentés dans la figure suivante (Figure 74) :



**Figure 74 :** Spectres de masse en électrospray des mutants I118A, I118D, I118S, I118V, E47A et de la SOR sauvage de *D. baarsii*. Les protéines analysées sont à 200  $\mu$ M dans l'eau faiblement tamponnée 10 mM Tris-HCl pH 8,5, plus une solution d'acide formique.

En absence de traitement avec H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, toutes les SORs étudiées, sauvage et mutantes présentent deux pics de masse. Un premier pic, généralement plus intense qui correspond

exactement à la masse attendue pour chaque polypeptide. Un second pic, généralement moins intense, qui correspond à un ajout de + 52 Da pour toutes les SORs. Ce pic semble correspondre à la présence d'un atome de fer, du centre I ou II qui reste lié au polypeptide dans ces conditions expérimentales.

Au bout de 3 minutes d'incubation avec H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, le spectre de masse de la SOR sauvage montre une légère dégradation de la protéine comme en témoigne la diminution du pic principal correspondant à la forme apo de la protéine. Le mutant E47A semble être plus sensible à H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que la SOR sauvage. Le spectre de masse de ce mutant montre un pic en quantité relativement importante, presque équivalent à celui de l'apoprotéine, avec une masse de 13983 Da correspondant à l'ajout d'un atome d'oxygène. Le mutant I118V présente lui aussi ce pic mais avec une intensité beaucoup plus faible. Les spectres des mutants I118A, I118S et I118D présentent, quand à eux, à la fois un pic avec une masse correspondant à l'ajout d'un oxygène mais aussi un deuxième pic, de la même intensité que le premier, correspondant à une masse de + 32 Da correspondant à l'ajout d'un deuxième atome d'oxygène. Ce deuxième pic n'est pas retrouvé dans la SOR sauvage ni dans les mutants I118V et E47A. Notons que dans ces temps d'incubation de la SOR E47A, sauvage et I118V avec H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, la bande à 825 cm<sup>-1</sup> n'apparaît pas en Raman alors que pour les mutants I118A, I118S et I118D elle apparaît.

De plus la proportion des SORs ayant deux oxygènes paraît être proportionnelle à la quantité de l'espèce peroxydique à 825 cm<sup>-1</sup>, visualisées au niveau de l'intensité de cette bande sur les spectres Raman (figure 61). La SOR I118S présente un pic à + 32 Da plus important, relativement au pic de l'apoprotéine, que les deux autres mutants I118A et I118D et la bande RR à 825 cm<sup>-1</sup> de ce mutant est aussi plus prononcée. On peut donc penser que le mutant I118S favorise d'avantage la formation de cette nouvelle espèce peroxydique.

Etant donnée que la bande à 825 cm<sup>-1</sup> n'est observée en RR que pour les mutants I118A, I118S et I118D et que les spectres de masse des autres mutants I118V, E47A et de la SOR sauvage ne présentent pas de pic à + 32, il peut être proposé que cette bande à 825 cm<sup>-1</sup> pourrait être le reflet de façon indirecte de la présence d'un alkyl peroxyde Fe<sup>3+</sup>-O-O-a.a-SOR sur la chaîne polypeptidique de la SOR. En effet, cet adduit d'alkyl peroxyde pourrait être formé par une nouvelle espèce peroxydique ou un fer-oxo produit lors du mélange SOR + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et dont la bande à 825 cm<sup>-1</sup> observée en RR serait la signature.



## *PARTIE 5:*

*Effet des mutations sur  
l'activité catalytique de la  
SOR*



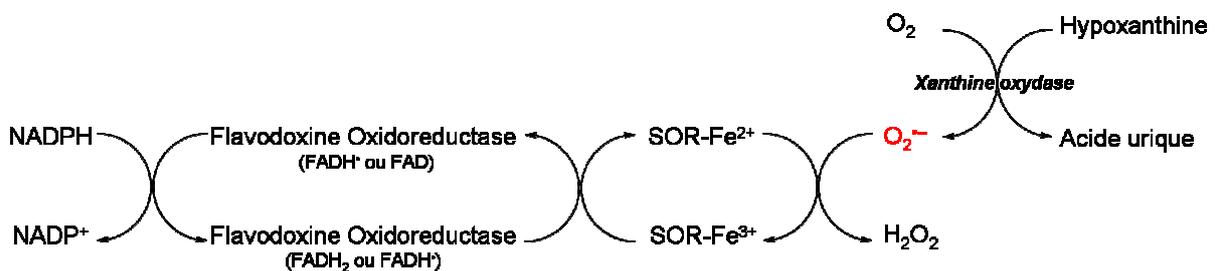
## I. Test de cycles catalytiques multiples (multiples turn overs) sur les mutants I118

Nous avons étudié l'effet des mutations de l'isoleucine 118 sur la catalyse complète d'élimination de  $O_2^{\bullet-}$  par la SOR. Cette catalyse est possible grâce à la présence de réductases dans la cellule qui régénèrent le  $Fe^{3+}$  en  $Fe^{2+}$  et permettent ainsi un nouveau cycle de réaction avec  $O_2^{\bullet-}$ . L'étude du cycle catalytique de la SOR *in vitro* est possible en utilisant la NADPH-flavodoxine-oxydoréductase (Fpr) de *E. coli*, capable de réduire efficacement le fer du site actif de la SOR (Lombard thèse 2001).

La Fpr est une flavoprotéine de 27620 Da, qui contient 1 cofacteur FAD. Le NADPH réduit le FAD qui est donc capable de réduire différents accepteurs d'électrons artificiels, tels que le ferricyanure, le cytochrome c, la ferrédoxine et la flavodoxine (McIver *et al.* 1998).

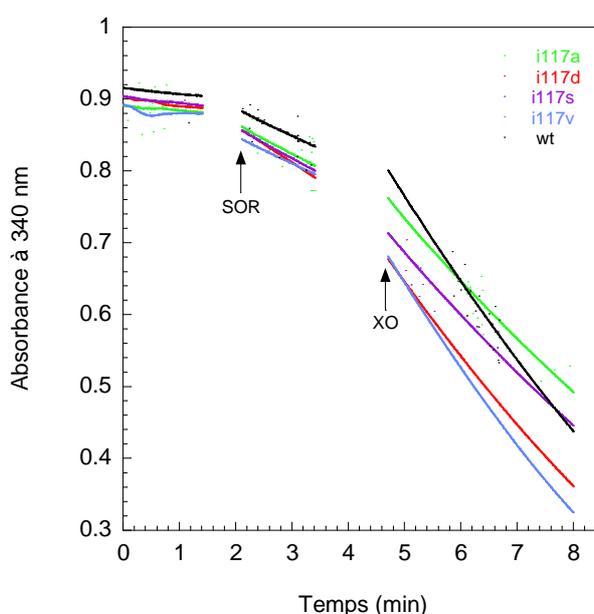
Le test catalytique de la SOR utilise donc cette Fpr comme donneur d'électron pour réduire le  $Fe^{3+}$  en  $Fe^{2+}$  à partir du NADPH et le système xanthine / xanthine oxydase pour former du superoxyde en continu. La xanthine oxydase en présence d' $O_2$  oxyde l'hypoxanthine en xanthine puis en acide urique et produit au cours de cette réaction 70 % d' $H_2O_2$  et 30 % d' $O_2^{\bullet-}$ . Lors du test enzymatique, afin de n'avoir que du superoxyde produit en solution, de la catalase est ajoutée en quantité catalytique pour éliminer l' $H_2O_2$  produit par la xanthine oxydase.

Le test de l'activité de la SOR se présente ainsi :



Dans ces conditions, en mesurant l'oxydation de NADPH à 340 nm ( $\epsilon = 6220 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ), on peut déterminer une activité SOR. L'oxydation du NADPH produisant deux électrons, 2 SORs sont réduites par NADPH oxydé.

Afin de pouvoir déterminer la part d'oxydation du NADPH qui n'est pas liée à l'activité SOR proprement dite, on place dans un premier temps dans une cuve spectroscopique l'ensemble des réactifs chimiques (hypoxanthine, NADPH, tampon) et la Fpr. Dans un deuxième temps, on rajoute la SOR. Enfin, dans un troisième temps, on rajoute la xanthine oxydase (Figure 75).



**Figure 75 :** Activité NADPH : superoxyde oxydoréductase de la SOR wt et des mutants I117A, I117D, I117S et I117V de *D. baarsii*. L'oxydation de NADPH est suivie à 340 nm dans une cuve spectrophotométrique de 1 ml contenant 50 mM de Tris-HCl pH 7,6, 200  $\mu\text{M}$  de NADPH, 500 unité. $\text{ml}^{-1}$  de catalase, 500  $\mu\text{M}$  d'hypoxanthine et 1  $\mu\text{M}$  de flavodoxine réductase de *E. coli* (Fpr) à température ambiante. Les flèches indiquent l'ajout de 1  $\mu\text{M}$  de SOR (wt et mutants I118) et de xanthine oxydase (XO), produisant un flux de superoxyde de 22  $\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$ .

En absence de superoxyde, c'est-à-dire avant l'ajout de la xanthine oxydase, le système SOR-Fpr-NADPH présente une légère réaction d'autooxydation, reflétant probablement l'oxydation du cofacteur FAD de la Fpr (FAD) et du centre I de la SOR par  $\text{O}_2$ . La pente observée dans ces conditions correspond à une oxydation de 7,3 à 10,2  $\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$  de NADPH par mutant selon la quantité de SOR considérée.

Lorsque la xanthine oxydase est ajoutée, l'oxydation du NADPH est fortement augmentée, résultant de l'activité de la SOR avec  $\text{O}_2^{\bullet-}$ .

La différence entre les pentes d'oxydation du NADPH en présence et en absence de xanthine oxydase permet de déterminer l'activité NADPH superoxyde oxydoréductase.

Pour la SOR sauvage et le mutant I118V, des activités très proches de 10,9 et 10,6  $\mu\text{M}$  NADPH oxydés par minute ont été déterminées respectivement. Pour les mutants I118A,

I118D et I118S, les activités correspondent à la moitié de celle déterminée pour la SOR sauvage et le mutant I118V. Elles sont de  $5,2 \mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$  pour le mutant I118A,  $5,8 \mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$  pour le mutant I118D et  $4,9 \mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$  pour le mutant I118S.

Etant donné que pour une mole de NADPH oxydée, 2 moles de SOR sont réduites, dans ces conditions expérimentales la SOR sauvage et le mutant I118V réalisent environ 20 cycles catalytiques par minute alors que les mutants I118A, I118D et I118S n'en font que 10 par minute. De plus, lorsque l'on augmente la quantité de superoxyde en augmentant par dix la concentration de xanthine oxydase, le nombre de cycles catalytiques ne change pas (Tableau 12).

	<b>Wt</b>	<b>I118A</b>	<b>I118D</b>	<b>I118S</b>	<b>I118V</b>
<b>Activité SOR NADPH<sub>ox</sub>/min</b>	10,9	5,2	5,7	4,8	10,6
<b>Nb de cycles catalytique / min</b>	21,9	10,4	11,5	9,8	21,4
<b>k cat (s<sup>-1</sup>)</b>	0.365	0.173	0.191	0.163	0.356

**Tableau 12** : Activité NADPH superoxyde oxydo-éductase et nombre de cycles catalytiques par minutes pour les SOR wt et mutants de l'isoleucine 118. (Même conditions expérimentales que la figure 75)

Ces résultats indiquent que tous les mutants sont capables de réaliser une catalyse de réduction de  $\text{O}_2^{\bullet-}$ . L'activité catalytique du mutant I118V est la même que celle de la SOR sauvage. Pour les autres mutants, cette activité est deux fois plus faible. Ces différences observées peuvent correspondre à plusieurs facteurs limitant, étant donné le nombre de processus nécessaires à l'établissement d'un cycle catalytique.

Les résultats obtenus en radiolyse montrent que sur le demi-cycle catalytique avec  $\text{O}_2^{\bullet-}$  ( $\text{O}_2^{\bullet-} + \text{SOR-Fe}^{2+} \rightarrow \text{SOR-Fe}^{3+} + \text{H}_2\text{O}_2$ ), ces trois mutants accélèrent la réaction avec le superoxyde. Ce demi-cycle catalytique n'est donc pas l'étape limitante dans ces tests d'activité.

On peut penser que les mutations affectent le processus de transfert d'électron de la réductase vers la SOR. Ceci peut être vérifié en déterminant les paramètres cinétiques de réduction des SOR par la réductase.

## II. Test in vivo : complémentation de l'activité SOD

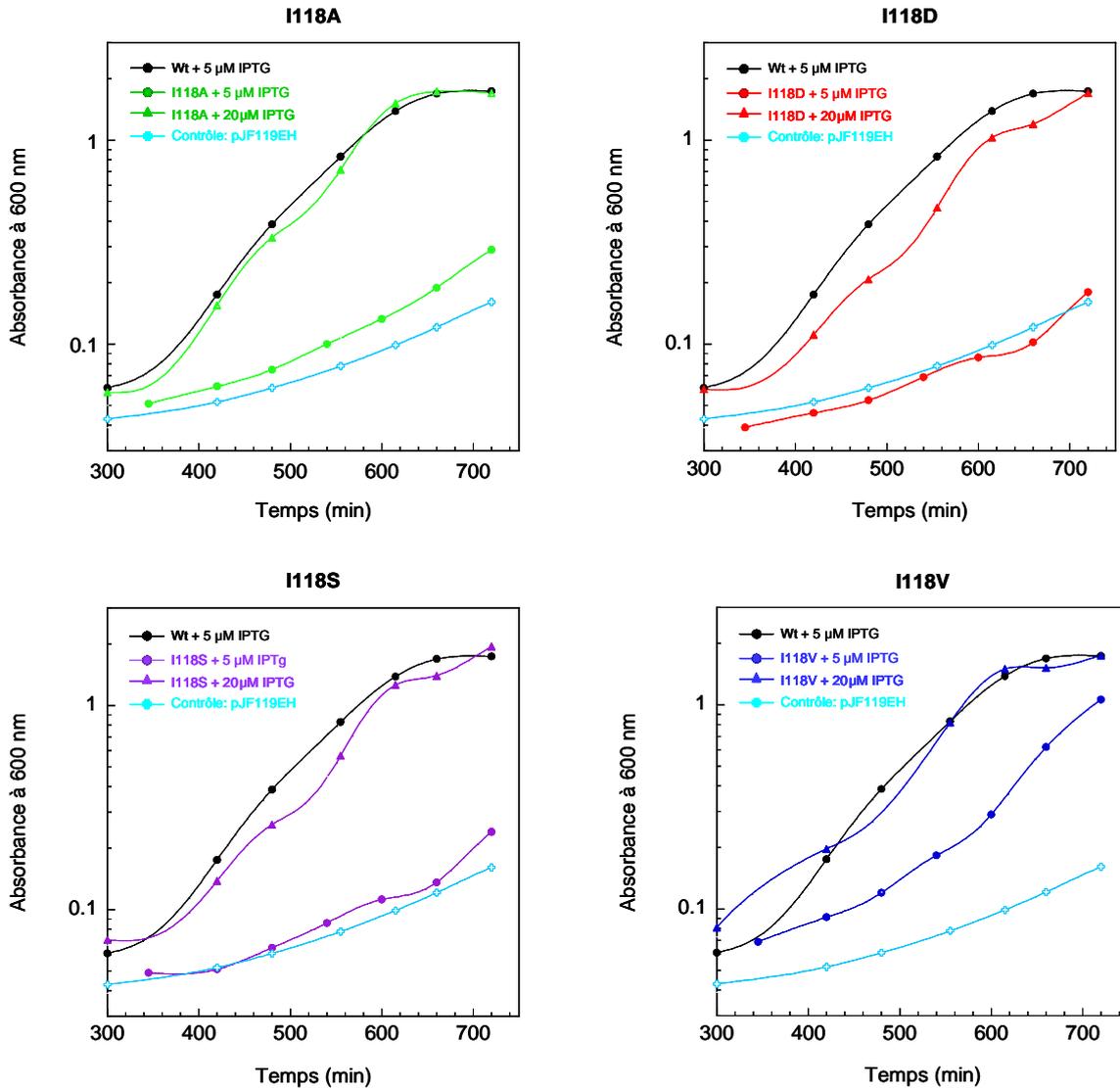
Il a été montré que la SOR de *D. baarsii* pouvait compléter une souche bactérienne de *E. coli* déficiente en activité SOD (Pianzzola et al. 1996).

La souche de *E. coli* délétée pour les gènes *sodA sodB* ne peut pas pousser dans des conditions aérobies à cause de son incapacité à éliminer  $O_2^{\bullet-}$ . L'absence de ces deux activités est bactériostatique pour la cellule lorsqu'elle pousse sur milieu minimum en présence d' $O_2$ . Les principales cibles du superoxyde *in vivo* sont les clusters [4Fe-4S] des déshydratases, telles que les dihydroxyacide déshydratases impliquées dans la voie de biosynthèse des acides aminés branchés. L'inactivation de ces enzymes par le superoxyde induit une incapacité des mutants *sodA sodB* à pousser sur un milieu minimum dépourvu d'acides aminés branchés. L'incorporation du gène de la SOR de *D. baarsii* dans ces souches rétabli leur croissance sur milieu minimum en absence d'acides aminés branchés (Pianzzola et al. 1996).

Nous avons testé l'effet des mutants de l'isoleucine I18 sur la capacité de la SOR à compléter la souche mutante *E. coli sodA sodB* pour sa croissance sur milieu minimum en absence d'acides aminés branchés.

La souche *sodA sodB* est transformée avec les plasmides contenant les gènes des SORs sauvage et mutantes I18 sous contrôle du promoteur *ptac* inductible à l'IPTG. Les tests ont été réalisés avec la SOR sauvage et les SORs mutantes I18 à différentes concentrations d'IPTG, 5  $\mu$ M et 20  $\mu$ M afin de voir si la complémentation peut être liée à une augmentation de l'expression de la SOR dans la cellule. La croissance des bactéries est suivie par la mesure de l'absorbance à 600 nm

Les résultats obtenus pour les mutants I18A, I18D, I18S et I18V sont représentés avec ceux obtenus pour la SOR sauvage afin de mieux voir les éventuelles différences dans la croissance bactérienne (Figure 76). Une souche contrôle, c'est-à-dire avec un plasmide parental ne contenant pas la SOR (pJF119EH), a également été testée.



**Figure 76 :** Croissance aérobie de la souche *E. coli sodA sodB pMJ25<sub>I118A</sub>*, *pMJ25<sub>I118D</sub>*, *pMJ25<sub>I118S</sub>*, *pMJ25<sub>I118V</sub>* ou *pJF119EH* en présence de 20  $\mu\text{M}$  d'IPTG. Les cultures sont réalisées en milieu M9 sans acide aminé branché à 37°C.

La souche contrôle contenant le plasmide pJF119EH ne pousse pas en absence d'acides aminés branchés. En absence d'IPTG, les courbes de croissance des mutants I118 et de la SOR sauvage sont identiques à celle de la souche contrôle. Les SORs ne sont pas surexprimées et ne permettent donc pas de compléter l'activité SOD dans la cellule.

La croissance bactérienne est rétablie complètement pour la SOR sauvage en présence de 5  $\mu\text{M}$  d'IPTG (courbe ●).

En présence de 20  $\mu\text{M}$  d'IPTG (courbes ▲, △, ▴, ▾), les courbes de croissance des quatre mutants sont superposables à celle obtenu pour la SOR sauvage à 5  $\mu\text{M}$ . Etant donné que la SOR sauvage de *D. baarsii* est capable dans ces conditions de compléter à 100 %

l'activité SOD dans une cellule, on peut donc en conclure que, les mutants I118 sont également capables de rétablir à 100 % l'activité SOD dans une souche délétée en SOD.

Cependant, en présence de 5  $\mu$ M d'IPTG (courbe ●,●,●,●), on constate que pour le mutant I118V la croissance bactérienne ne se fait pas de façon optimale. Ce mutant est capable dans ces conditions de rétablir l'activité SOD mais pas aussi bien que la SOR sauvage. Pour les mutants I118A, I118D et I118S, les courbes de croissance sont identiques à celle du contrôle, ce qui indique que dans ces conditions ces mutants ne sont pas capables de rétablir l'activité d'élimination du superoxyde. Etant donné que pour les purifications, nous n'avons pas vu de différence dans la surexpression de ces quatre mutants avec celle de la SOR sauvage, on peut penser que le taux de surexpression de ces protéines est le même quelque soit la concentration en IPTG ajouté.

D'après ces résultats, on peut dire qu'afin de rétablir l'activité SOD dans la cellule, il est donc nécessaire d'avoir une quantité de SOR mutante I118A, I118S et I118D plus importante que de SOR sauvage.

Il semble que l'activité *in vivo* des mutants I118A, I118S et I118D est plus faible que celle de la SOR sauvage, et nécessite une surexpression plus importante pour avoir la même efficacité de détoxification.

Ces données semblent aller dans le même sens que celles mises en évidence par la mesure de l'activité *in vitro* sur plusieurs cycles catalytique. Il semble donc que l'activité de ces mutants soit limitée par la vitesse de transfert d'électrons des réductases cellulaire vers le site actif oxydé de la SOR. Nous n'avons pas pu au cours de ce travail étudier l'effet des mutations sur ce transfert d'électrons. Il semble que cela soit un autre aspect intéressant à étudier sur ces mutants.

*CONCLUSIÓN  
GÉNÉRALE*



Au cours du processus de respiration, l'utilisation de l'oxygène par les organismes vivants s'accompagne irrémédiablement de la formation de dérivés toxiques de l'oxygène (ERO), constituant une situation de stress oxydant permanente à l'intérieur des cellules. Heureusement, les organismes aérobies contiennent des enzymes éliminant ces ERO, telles les SODs, les catalases et les peroxydases, essentielles à leurs survies. Certains microorganismes contiennent, en plus, d'autres enzymes de détoxification, telle que la superoxyde réductase (SOR), qui permet l'élimination du superoxyde par réduction.

La SOR possède au niveau de son site actif un centre mononucléaire à fer, essentiel pour sa réactivité avec le superoxyde. Un des ligands de ce fer est un soufre de cystéine en position axiale, qui établit également une liaison hydrogène avec le NH de la chaîne principale de l'isoleucine 118. La présence de cette cystéine est tout à fait atypique pour un centre à fer et son rôle dans la catalyse n'avait pas encore été étudié au début de cette thèse.

Afin de mieux comprendre la fonction de ce ligand cystéine dans la réactivité de la SOR avec le superoxyde, quatre mutations de la protéine au niveau de l'isoleucine 118 ont été réalisées. Ces mutations ont été choisies afin d'induire une modulation la liaison hydrogène entre le NH de cette isoleucine 118 et la cystéine du site actif. En perturbant cette liaison hydrogène, on attend une modification de la force de la liaison S-Fe, dont les effets pourront être étudiés sur la catalyse. Les mutants I118A, I118D, I118S et I118V ont été construits, purifiés et caractérisés par différentes techniques de spectroscopie. Par la suite, une étude cinétique rapide a permis d'analyser l'effet de chaque mutation sur la réactivité de la protéine avec le superoxyde.

Les études UV-Visible, de résonance Raman, de mesure des pKa et potentiel redox du site à fer nous ont ainsi permis de montrer que les mutations I118A, I118S, I118D conduisent à une augmentation de la force de la liaison S-Fe avec une augmentation de densité électronique autour du fer. Les études FTIR ont mis en évidence que cette augmentation de la force de la liaison S-Fe se fait parallèlement à un affaiblissement d'une liaison hydrogène sur un NH peptidique proche du site actif. Ainsi, l'ensemble de ces données nous a permis de proposer que les mutations de la chaîne latérale de l'isoleucine entraînent un affaiblissement de la liaison hydrogène entre le NH de la liaison peptidique de l'isoleucine et le soufre de la cystéine ligand du fer. Ceci a pour conséquence d'augmenter la densité électronique sur le soufre, induisant une augmentation directe de la force de la liaison S-Fe.

On peut donc penser que la présence de cette liaison hydrogène au sein du site actif de la SOR permet une modulation fine de la force de la liaison S-Fe.

Nous avons alors étudié par radiolyse pulsée l'effet du renforcement de cette liaison S-Fe sur la réactivité de la SOR avec le superoxyde. La radiolyse pulsée est une technique très intéressante pour cela car elle permet de visualiser sur un cycle catalytique les cinétiques de formation et de disparition des intermédiaires réactionnels de type  $\text{Fe}^{3+}$ -(hydro)peroxo et  $\text{Fe}^{3+}$ -hydroxo qui se forment au site actif de la SOR. Ainsi, nous avons pu étudier l'effet des mutations de l'I118 sur les cinétiques de fixation du superoxyde, de formation des deux intermédiaires réactionnels et enfin de l'apparition du produit final. La première étape de fixation du superoxyde n'est modifiée par aucun des mutants étudiés. Par contre, la formation des intermédiaires réactionnels et du produit final est sensiblement accélérée pour les mutants I118A, I118S et I118D par rapport à la protéine sauvage. Ces étapes correspondent à des processus de protonation et il apparaît donc que la protonation des intermédiaires réactionnels est facilitée chez ces mutants. Cela indique notamment que le pKa de l'intermédiaire de type  $\text{Fe}^{3+}$ -peroxo est devenu plus basique dans ces mutants. On peut alors proposer que l'augmentation de la basicité de cet intermédiaire soit directement liée à l'augmentation de la densité électronique autour du fer, comme cela a été observé par spectroscopie. Les mutations de l'isoleucine en alanine, sérine et aspartate permettent donc de faciliter la protonation des espèces intermédiaires de la réaction de la SOR avec le superoxyde.

Ces résultats peuvent être comparés à ceux obtenus pour le mutant E114A (voir Annexe 1). La chaîne latérale du E114 est située à 4-5 Å du soufre de la cystéine ligand et établie une interaction de type dipolaire avec la liaison S-Fe. La mutation E114A annule cette interaction et provoque un affaiblissement de la liaison S-Fe. D'un point de vue cinétique, cette mutation E114A induit un ralentissement des cinétiques de protonation des intermédiaires réactionnels. Ainsi les effets des mutants I118 et E114 sont opposés, à la fois sur la force de la liaison S-Fe et sur les cinétiques de protonation des intermédiaires réactionnels. On peut donc dire que lorsque la liaison S-Fe est renforcée, le pKa des intermédiaires réactionnels devient plus basique, accélérant la cinétique de formation du produit de la réaction  $\text{H}_2\text{O}_2$ . On observe l'effet inverse lorsque la liaison S-Fe est affaiblie, avec le pKa des intermédiaires réactionnels plus acide, induisant un ralentissement de la réaction.

Ces résultats montrent que la présence de cette cystéine, par les interactions qu'elle établie avec les résidus de la seconde sphère de coordination du fer, permet un contrôle de la densité électronique autour du fer qui influence directement la cinétique des processus de protonation des intermédiaires réactionnels. De façon surprenante, il semble que ce contrôle se fasse dans les deux sens pour que la réaction se fasse suffisamment vite mais sans être trop accélérée. Il semble donc que pour la SOR sauvage, il existe un intérêt à ce que l'ensemble de la réaction ne soit pas trop rapide. Il est en effet possible que l'accélération de la protonation de l'intermédiaire  $\text{Fe}^{3+}$ -peroxo conduise à une certaine accumulation de l'espèce  $\text{Fe}^{3+}$ -hydroperoxo au niveau du cycle catalytique de la SOR. Certains de nos résultats préliminaires à ce sujet suggèrent que cette accumulation pourrait favoriser une réactivité propre de l'intermédiaire  $\text{Fe}^{3+}$ -(hydro)peroxo, néfaste pour la SOR, comme par exemple la formation d'adduits alkyl peroxyde sur certaines chaînes latérales de résidus du site actif.

Finalement, il semblerait que les propriétés catalytiques du site actif de la SOR résultent d'effets antagonistes de résidus de la seconde sphère de coordination du fer. Ces effets antagonistes permettraient au site actif de la SOR d'accueillir des intermédiaires potentiellement très réactifs, tels que des espèces fer-peroxyde, pour évoluer vers la formation de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , sans qu'elles manifestent une réactivité propre comme chez les oxygénases de type cytochrome P450 par exemple.

Notre étude a donc permis de mieux comprendre les caractéristiques du site actif de la SOR nécessaires à son activité. Ces données pourront être utilisées pour l'élaboration de complexes mimétiques fonctionnels. En effet, le développement de molécules SOR biomimétiques actives peut présenter un grand intérêt en médecine, notamment dans le cadre de thérapies antioxydantes.



# *ANNEXES*



ANNEXE 1 :

Mathé et al.

Article JBC 2007



# Assessing the Role of the Active-site Cysteine Ligand in the Superoxide Reductase from *Desulfoarculus baarsii*\*<sup>§</sup>

Received for publication, January 10, 2007, and in revised form, April 18, 2007 Published, JBC Papers in Press, June 1, 2007, DOI 10.1074/jbc.M700279200

Christelle Mathé<sup>‡§1</sup>, Claire O. Weill<sup>‡1,2</sup>, Tony A. Mattioli<sup>§</sup>, Catherine Berthomieu<sup>¶</sup>, Chantal Houée-Levin<sup>||</sup>, Emilie Tremey<sup>‡</sup>, and Vincent Nivière<sup>‡3</sup>

From the <sup>‡</sup>Laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux, iRTSV-CEA Grenoble/CNRS/Université Joseph Fourier, 17 Avenue des Martyrs, 38054 Grenoble Cedex 9, the <sup>§</sup>Laboratoire du Stress Oxydant et Détoxication, SB<sup>2</sup>SM, iBiTec-S, CEA Saclay/CNRS, 91191 Gif-sur-Yvette Cedex, the <sup>¶</sup>Laboratoire des Interactions Protéine Métal, SBVME-CEA Cadarache/CNRS/Université Aix-Marseille II, 13108 Saint-Paul-lez-Durance Cedex, and the <sup>||</sup>Laboratoire de Chimie Physique, CNRS/Université Paris-Sud, Bâtiment 350, Centre Universitaire, 91405 Orsay Cedex, France

Superoxide reductase is a novel class of non-heme iron proteins that catalyzes the one-electron reduction of O<sub>2</sub><sup>-</sup> to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, providing an antioxidant defense in some bacteria. Its active site consists of an unusual non-heme Fe<sup>2+</sup> center in a [His<sub>4</sub> Cys<sub>1</sub>] square pyramidal pentacoordination. In this class of enzyme, the cysteine axial ligand has been hypothesized to be an essential feature in the reactivity of the enzyme. Previous Fourier transform infrared spectroscopy studies on the enzyme from *Desulfoarculus baarsii* revealed that a protonated carboxylate group, proposed to be the side chain of Glu<sup>114</sup>, is in interaction with the cysteine ligand. In this work, using pulse radiolysis, Fourier transform infrared, and resonance Raman spectroscopies, we have investigated to what extent the presence of this Glu<sup>114</sup> carboxylic lateral chain affects the strength of the S–Fe bond and the reaction of the iron active site with superoxide. The E114A mutant shows significantly modified pulse radiolysis kinetics for the protonation process of the first reaction intermediate. Resonance Raman spectroscopy demonstrates that the E114A mutation results in both a strengthening of the S–Fe bond and an increase in the extent of freeze-trapping of a Fe-peroxo species after treatment with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> by a specific strengthening of the Fe–O bond. A fine tuning of the strength of the S–Fe bond by the presence of Glu<sup>114</sup> appears to be an essential factor for both the strength of the Fe–O bond and the pK<sub>a</sub> value of the Fe<sup>3+</sup>-peroxo intermediate species to form the reaction product H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Superoxide reductase (SOR)<sup>4</sup> catalyzes the one-electron reduction of O<sub>2</sub><sup>-</sup> to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, providing an antioxidant defense in

some anaerobic or microaerophilic bacteria (1–5): O<sub>2</sub><sup>-</sup> + 1e<sup>-</sup> + 2H<sup>+</sup> → H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Historically, the only enzymes known to eliminate superoxide were superoxide dismutases, which catalyze the disproportionation of superoxide (6). The recently discovered SOR activity involving the reduction of superoxide has changed our view of how toxic superoxide is eliminated in cells and how this activity protects the cell against oxidative stress and lethal levels of superoxide.

SORs are a novel class of non-heme iron proteins that can be classified into one-iron proteins, which possess only the active-site iron center (called Center II) (7–12), and two-iron proteins (2, 13, 14), which possess an additional rubredoxin-like Fe<sup>3+</sup>- (SCys)<sub>4</sub> center (called Center I) for which the function and role are not known (9, 15). In the reduced state, the SOR active site consists of a non-heme Fe<sup>2+</sup> center in an unusual [His<sub>4</sub> Cys<sub>1</sub>] square pyramidal pentacoordination (7, 13, 14). The sixth coordination site of the Fe<sup>2+</sup> center is vacant and suggests the most obvious site for O<sub>2</sub><sup>-</sup> binding. The SOR active site Fe<sup>2+</sup> center reacts specifically at nearly diffusion-controlled rates with O<sub>2</sub><sup>-</sup> according to an inner sphere mechanism (16–21). Although one or two reaction intermediates have been proposed depending on the enzyme studied, it is now generally accepted that these intermediate species are Fe<sup>3+</sup>-peroxide species (16–24). For the *Desulfoarculus baarsii* enzyme, the reaction mechanism was proposed to involve formation of two intermediates (Scheme 1) (16, 19). The first one, a proposed Fe<sup>3+</sup>-peroxo species, results from the bimolecular reaction of O<sub>2</sub><sup>-</sup> with Fe<sup>2+</sup>. It then undergoes a diffusion limited protonation process to form a second reaction intermediate, a Fe<sup>3+</sup>-hydroperoxo species (19). A second protonation process at the level of the Fe<sup>3+</sup>-hydroperoxo species would allow the release of the reaction product H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Although the donor of this second protonation event is not yet known, it was proposed to be associated with the presence of a water molecule at the SOR active site (25). Finally, the resulting Fe<sup>3+</sup> atom of the active site becomes hexacoordinated with a conserved glutamate residue, Glu<sup>47</sup> in *D. baarsii* (Scheme 1) (7, 26).

The strictly conserved cysteine axial ligand in the SOR active site has been hypothesized for long to be an essential feature in the reactivity of the enzyme with superoxide (5, 8). It was also proposed that, similarly to that reported for cytochrome P450 enzymes, rubredoxins, or ferredoxins (27–29), H-bonds on the cysteine ligand could finely tune the strength of the Fe–S bond

\* This work was supported in part by grants from the Commissariat à l'Energie Atomique (CEA, France), programme "Toxicologie Nucléaire" (to V. N. and C. B.). The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

§ The on-line version of this article (available at <http://www.jbc.org>) contains supplemental Fig. S1.

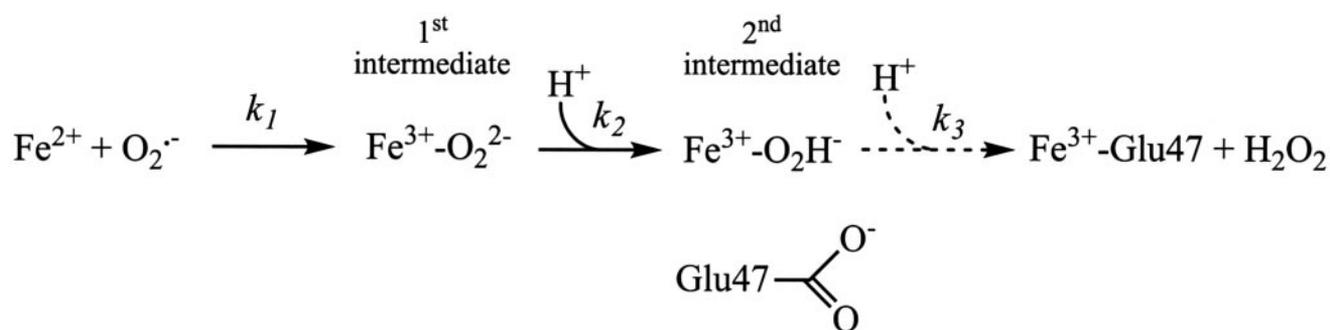
<sup>1</sup> Both authors contributed equally to this work.

<sup>2</sup> Supported by a post-doctoral fellowship from the CEA program "Toxicologie Nucléaire." Present address: Polyplus-Transfection, Bioparc BP 90018, Boulevard Sébastien Brandt, 67401 Illkirch Cedex, France.

<sup>3</sup> To whom correspondence should be addressed. Tel.: 33-4-38-78-91-09; Fax: 33-4-38-78-91-24; E-mail: [vniviere@cea.fr](mailto:vniviere@cea.fr).

<sup>4</sup> The abbreviations used are: SOR, superoxide reductase; FTIR, Fourier transform infrared; RR, resonance Raman; IPTG, isopropyl 1-thio-β-D-galactopyranoside; EPR, electron paramagnetic resonance; Fpr, flavodoxin reductase from *E. coli*.

## Function of the Cysteine Axial Ligand in SOR Activity



SCHEME 1. Reaction mechanism of the SOR from *D. baarsii* with  $\text{O}_2^{\cdot-}$  (from Ref. 19).

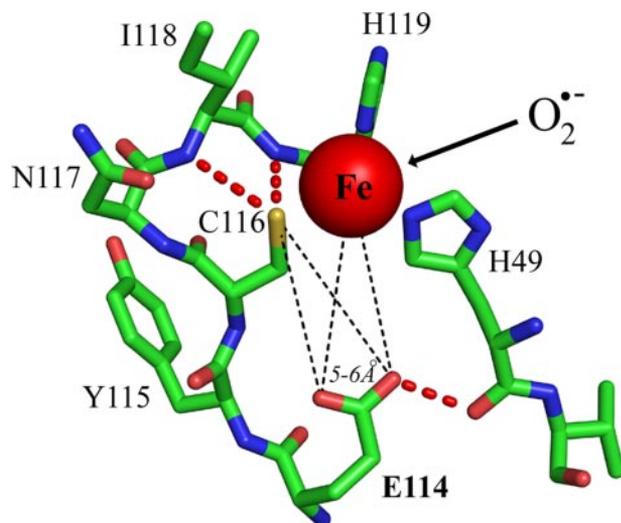


FIGURE 1. Active site of the SOR from *D. baarsii* from its crystal structure at 1.15-Å resolution (14). Hydrogen bonds are shown in red: (i) between the NH main chains of Ile<sup>118</sup> (3.41 Å), His<sup>119</sup> (3.26 Å), and the sulfur atom of the Cys<sup>116</sup>; (ii) one oxygen atom of the Glu<sup>114</sup> side chain is located at 2.63 Å from the backbone C=O of His<sup>49</sup>. This is consistent with a protonated Glu<sup>114</sup> carboxylate side chain forming a H-bond with the backbone CO of His<sup>49</sup>. In black are shown the distances between the two oxygen atoms of the carboxylic side chain of Glu<sup>114</sup> and the sulfur and iron atoms (5.6–6.5 Å).

and then, in the case of SOR, might play an important role in the reactivity of SOR with superoxide (30). Two peptide NH groups from the Leu/Ile and His of the well conserved tetrapeptide Cys<sup>116</sup>-Asn<sup>117</sup>-Leu/Ile<sup>118</sup>-His<sup>119</sup> (numbered according to the *D. baarsii* SOR sequence) are within H-bonding distance of the cysteine ligand sulfur. In the case of the SOR from *D. baarsii*, for which a crystal structure was determined at 1.15-Å resolution (14), the Ile<sup>118</sup> and His<sup>119</sup> peptide N atoms are at 3.41 and 3.26 Å, respectively, from the cysteine sulfur ligand, suggesting relatively weak H-bonds from these two potential donors (Fig. 1). However, up to now, no experimental data have been reported to investigate the functional role of this cysteine residue. Site-directed mutagenesis at this position (Cys → Ala) in the case of *Archaeoglobus fulgidus* SOR enzyme was reported (11) to result in an apoprotein, and thus not suitable for any study of the reaction with superoxide.

In the case of the *D. baarsii* enzyme, redox-induced FTIR difference spectra (exploiting the  $\text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{3+}$  redox change at the SOR active site) revealed that a protonated carboxylate group, proposed to be the side chain of Glu<sup>114</sup>, undergoes conformational modifications upon oxidation of the active-site iron (26). This highlights some marked interaction between this

carboxylic group and the iron active site. Glu<sup>114</sup> is located near the Cys<sup>116</sup> side chain, buried inside the protein in a non-polar environment, compatible with a protonated carboxylate side chain. Its two carboxylic oxygens face directly the sulfur and iron atoms, with distances of about 5.6–6.5 Å (Fig. 1). Such an orientation suggests some dipolar interactions, which could explain the FTIR difference signals. These interactions could also contribute to the modulation of the strength of the S–Fe bond. Glu<sup>114</sup> is conserved among the two-iron type of SORs, as well as the one-iron SOR of *Treponema pallidum*. For the *T. pallidum* enzyme, a similar interaction with the iron active site and the lateral chain of a protonated carboxylate was also observed by FTIR spectroscopy (26). On the other hand, most of the one-iron SORs such as the neelaredoxins and as represented by, for example, *Pyrococcus furiosus*, do not have this glutamate residue, where instead a serine residue is found (7). The side chain of this serine residue shows no probable H-bonds donated by the OH group, according to the crystal structure of the *P. furiosus* enzyme (7).

In this work, using pulse radiolysis, FTIR, and resonance Raman spectroscopies, we have investigated to what extent the presence of the Glu<sup>114</sup> carboxylic lateral chain could affect the strength of the S–Fe bond and the reaction of the iron active site with superoxide. We report a characterization of the E114A mutant in *D. baarsii* showing significantly modified pulse radiolysis kinetics for the protonation process of the first reaction intermediate. RR spectroscopy shows very local changes at the level of the  $\text{Fe}^{3+}$ -S(Cys) bond, and demonstrates that the mutant strongly stabilized an iron peroxo species in its active site. This highlights the function of this carboxylic group on the fine tuning of the S–Fe strength and in the role of the cysteine ligand in the reactivity of the enzyme with superoxide.

### EXPERIMENTAL PROCEDURES

**Materials**—For pulse radiolysis experiments, sodium formate and buffers were of the highest quality available (Prolabo Normatom or Merck Suprapure). Oxygen was from ALPHA GAZ. Its purity is higher than 99.99%. Water was purified using an Elga Maxima system (resistivity 18.2 megaohm).  $\text{K}_2\text{IrCl}_6$  was from Strem Chemical Inc.

**Bacterial Strain and Plasmids**—The complementation tests of the *Escherichia coli* QC2375 mutant strain were carried out as previously described (16). Plasmid pMJ25 is a pJF119EH derivative, in which the *sor* gene from *D. baarsii* is under the control of a *tac* isopropyl 1-thio- $\beta$ -D-galactopyranoside (IPTG)-inducible promoter (2).

**Site-directed Mutagenesis and Protein Purification**—Two primers were designed for PCR-based site-directed mutagenesis to create the *D. baarsii* SOR mutant E114A. Primer 1 (5'-CAAGGTCGTGGCCCGCGCATACTGCAACATCCACG-3') and primer 2 (5'-CGTGGATGTTGCAGTATCGCGGGCCACGACCTTG-3') contained the mutation of interest (underlined). Mutagenesis was carried out on plasmid pMJ25 with the QuikChange® site-directed mutagenesis kit from Stratagene. The mutation was verified by DNA sequencing. The resulting plasmid, pCWE114A, was transformed in *E. coli* DH5 $\alpha$ . Overexpression and purification of the E114A mutant protein was carried out as reported for the wild-type protein (2). The purified mutant protein was found to be as stable as the wild-type protein. The UV-visible absorption spectrum of the purified protein exhibited an  $A_{280\text{ nm}}/A_{503\text{ nm}}$  ratio of 4.8–4.9 and appeared to be homogeneous, as seen by SDS-PAGE analysis (data not shown). Protein concentration was determined using the Bio-Rad protein assay reagent. Full metallation of the two mononuclear iron sites was verified by atomic absorption spectroscopy, with a value of 2.0 iron atoms per polypeptide chain (data not shown). The protein was isolated with an oxidized Center I ( $\epsilon_{503\text{ nm}} = 4,400\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ ) and a fully reduced Center II.

**pH Studies**—The following different buffers, at 50 mM, were used to cover the pH range 5.0 to 10.2: pH 5.0 and 5.5, acetate buffer; pH 6.5, 7.0, and 7.5, phosphate buffer; pH 7.6, 8.1 and 8.5, Tris-HCl buffer; pH 9.1, 9.5, and 10.2, glycine-NaOH buffer.

**Pulse Radiolysis**—Pulse radiolysis measurements were performed as described elsewhere (16, 19). Briefly, free radicals were generated by irradiation of O<sub>2</sub>-saturated aqueous protein solutions (100  $\mu\text{M}$ ), in 10 mM of the different buffers used, 0.1 M sodium formate with 200-ns pulses of 4 MeV electrons at the linear accelerator at the Curie Institute, Orsay, France. Superoxide anion, O<sub>2</sub><sup>-</sup>, was generated during the scavenging by formate of the radiolytically produced hydroxyl radical, HO<sup>•</sup>, as previously described (16). Doses of about 5 gray per pulse resulted in about 3  $\mu\text{M}$  O<sub>2</sub><sup>-</sup>. Reactions were followed spectrophotometrically, between 450 and 750 nm, at 20 °C in a 2-cm path length cuvette. Kinetic traces were analyzed using a Levenberg-Marquardt algorithm from the Kaleidagraph® software package (Synergy Software).

**$\gamma$ -Ray Irradiations**— $\gamma$ -Ray irradiations were carried out at 20 °C using a cobalt-60 source, at a dose rate of 5.9 gray min<sup>-1</sup>. The SOR protein to be irradiated, 22  $\mu\text{M}$ , was in 10 mM Tris-HCl buffer, pH 7.6, 100 mM sodium formate, 500 units/ml of catalase from *Aspergillus niger* and saturated with pure O<sub>2</sub>. The duration of irradiation was 6 min (35 gray) to obtain a stoichiometric amount of O<sub>2</sub><sup>-</sup> (radiolytic yield 0.62  $\mu\text{mol J}^{-1}$ ) relative to SOR.

**Resonance Raman**—Resonance Raman spectra were recorded using a modified single-stage spectrometer (Jobin-Yvon) equipped with a liquid nitrogen cooled back-thinned CCD detector as described elsewhere (22, 23). Briefly, excitation at 647.1 nm (30 milliwatts) was provided by a Spectra Physics Series 2000 Kr<sup>+</sup> laser. Protein samples were 3–5 mM and in 100–200 mM buffer. A holographic notch filter (Kaiser Optical) was used to reject stray light. Spectra were calibrated using the

exciting laser line, along with the SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> (983 cm<sup>-1</sup>) and ice (230 cm<sup>-1</sup>) Raman bands from a frozen aqueous sodium sulfate solution. Spectral resolution was <3 cm<sup>-1</sup> with entrance slits at 100  $\mu\text{m}$  and frequency accuracy was  $\pm 1\text{ cm}^{-1}$ . Reported spectra were the result of the averaging of 40 single spectra recorded with 30 s of accumulation time. Baseline corrections were performed using GRAMS 32 (Galactic Industries). In all reported spectra, the contributions from ice have been subtracted using the GRAMS 32 software by cancellation of the 230 cm<sup>-1</sup> band. In general for the resonance Raman samples, 1  $\mu\text{l}$  of concentrated protein (1–5 mM) was deposited on a glass slide sample holder and then transferred into a cold helium gas circulating optical cryostat (STVP-100, Janis Research) held at 15 K. For the rapidly frozen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated Raman samples, 5  $\mu\text{l}$  of concentrated SOR protein (3–6 mM) on ice was manually mixed rapidly with an equal volume of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solution whose concentration was adjusted to obtain a final SOR protein: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ratio of about 1:6 eq. 3–5  $\mu\text{l}$  of the resulting mixture were promptly transferred to the glass slide sample holder and immediately immersed in liquid nitrogen before transferring to the optical cryostat for Raman measurement. The entire mixing/freezing operation took no more than about 5 s.

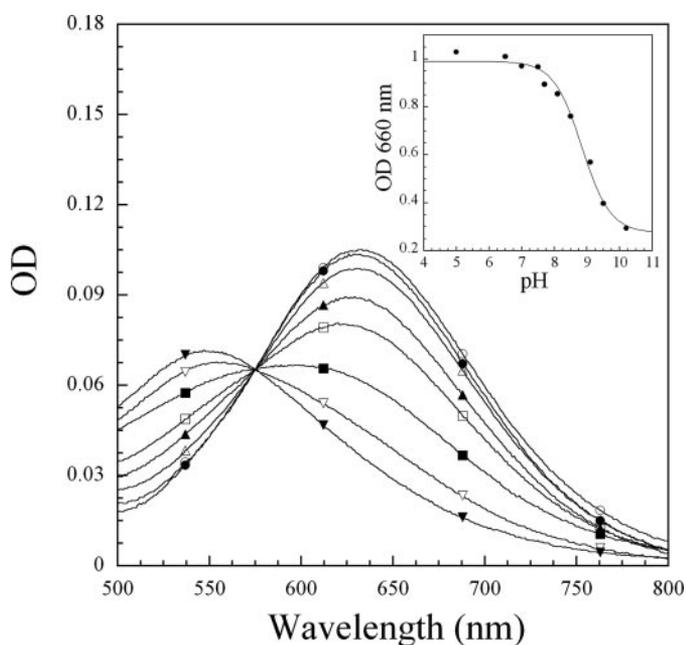
**FTIR**—Electrochemically induced FTIR difference spectra were recorded, using a thin path length electrochemical cell and a Bruker 66 SX spectrometer equipped with a KBr beam splitter and a nitrogen-cooled MCT-A detector, as described in Ref. 26. 10  $\mu\text{l}$  of a 1 mM solution of SOR in 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, and 100 mM KCl were used for one sample. Ferrocene, *N,N*-dimethyl-*p*-phenylenediamine, 1,4-benzoquinone, *N,N,N',N'*-tetramethyl-*p*-phenylenediamine, 2,3,4,5-tetramethyl-*p*-phenylenediamine, phenazine ethosulfate, and duroquinone were used as electrochemical mediators, at concentrations of 40  $\mu\text{M}$ .

Optical absorbance measurements were made using a Varian Cary spectrophotometer, in 1-cm path length cuvettes. Low temperature (4.2 K) X-band EPR spectra were recorded on a Bruker EMX 081 spectrometer equipped with an Oxford Instrument continuous flow cold helium gas cryostat.

## RESULTS

**Spectroscopic Characterization of the SOR E114A Mutant**—The UV-visible absorption spectrum of the as isolated E114A mutant exhibited the characteristic absorption bands at 370 and 503 nm, arising from the ferric iron of Center I (2); these values are similar to those observed for the wild-type protein (2). When treated with a slight excess of K<sub>2</sub>IrCl<sub>6</sub>, the spectrum of the mutant exhibited an increase in absorbance in the 500–700 nm range, reflecting oxidation of the Center II iron atom (19). The well defined absorption band corresponding to the oxidized Center II band can be more easily seen when the intense contributions of Center I are subtracted (Fig. 2). The maximum of this absorption band strongly depends on the pH, as was determined for the wild-type SOR protein (19). At pH 7.6, in the E114A mutant protein, the band corresponding to the oxidized Center II is centered at 630 nm, with a molar extinction coefficient value of 1,660 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>. Upon increasing the pH from 5 to 10.2, the Center II absorption band shifts from 632 to 547 nm (Fig. 2), with an apparent pK<sub>a</sub>

## Function of the Cysteine Axial Ligand in SOR Activity

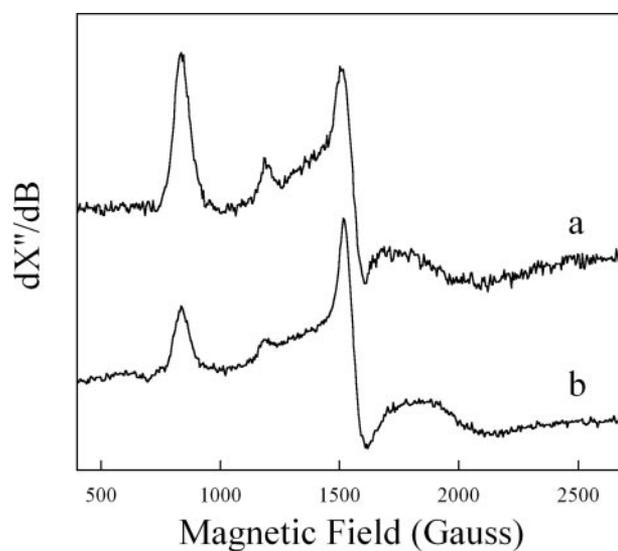


**FIGURE 2. pH dependence of the light absorption spectra of the oxidized SOR from *D. baarsii* E114A mutant active site.** The as isolated enzyme (61.3  $\mu\text{M}$  in 10 mM of the different buffers) was oxidized with a slight excess of  $\text{K}_2\text{IrCl}_6$  and the spectra were recorded immediately. The spectra were corrected from the absorbance of Center I. The values and symbols are: pH 5.0 ( $\circ$ ), pH 6.5 ( $\bullet$ ), pH 7.5 ( $\Delta$ ), pH 8.1 ( $\blacktriangle$ ), pH 8.5 ( $\square$ ), pH 9.1 ( $\blacksquare$ ), pH 9.5 ( $\nabla$ ), and pH 10.2 ( $\blacktriangledown$ ). The inset shows the pH dependence of the absorbance at 660 nm. The titration curve fitted the equation expected from a single protonation process,  $A_{660} = (A_{660\text{max}} + A_{660\text{min}} \times 10^{(\text{pH}-\text{pK}_a)}) / (1 + 10^{(\text{pH}-\text{pK}_a)})$ . A  $\text{pK}_a$  value of  $8.8 \pm 0.1$  was determined.

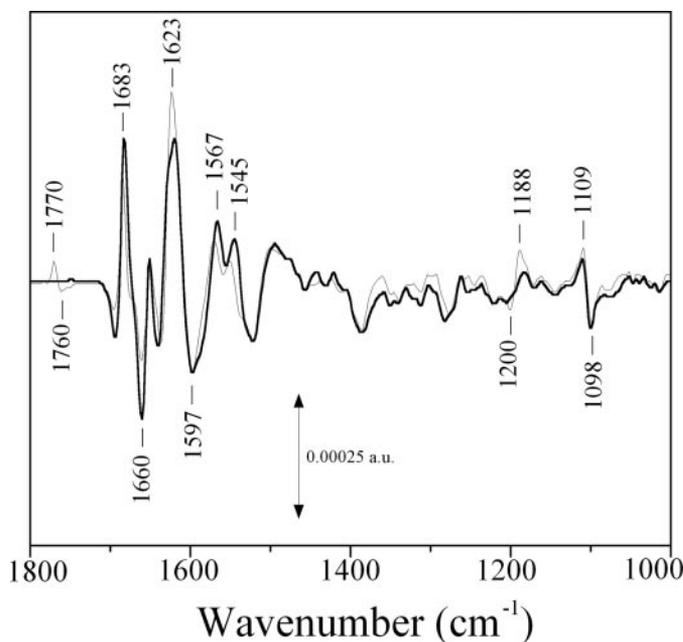
value of  $8.8 \pm 0.1$  (Fig. 2, inset). This  $\text{pK}_a$  value of the so-called "alkaline transition" is similar to that found for the wild-type ( $\text{pK}_a = 9.0 \pm 0.1$ ) (19) and corresponds to the displacement of the glutamate 47 ligand by a hydroxide ion at basic pH values on the sixth coordination position of the active-site ferric iron (25). However, in the case of the E114A mutant, the absorption maxima of the  $\text{Fe}^{3+}$ -Glu (632 nm) and the  $\text{Fe}^{3+}$ -OH (547 nm) forms are blue shifted from 12 to 13 nm compared with that reported for the wild-type protein (644 and 560 nm, respectively) (19). This might reflect some electrostatic changes at or near Center II in the mutant protein.

The 4 K EPR spectra of as isolated E114A mutant displayed resonances at  $g = 7.7, 5.7, 4.1$ , and  $1.8$ , similar to those obtained for the wild-type SOR (2) (data not shown). These resonances are typical of those of a  $\text{Fe}^{3+}$  ion in a distorted tetrahedral  $\text{FeS}_4$  center and originated from Center I (2). The 4 K EPR spectrum of the E114A mutant oxidized with a slight excess of  $\text{K}_2\text{IrCl}_6$  exhibited an additional signal at  $g = 4.3$  (Fig. 3), identical to that observed for wild-type SOR (2). This  $g = 4.3$  signal was attributed to the oxidized Center II, with a rhombic ( $E/D = 0.33$ ) high-spin ( $S = 5/2$ ) ferric ion (2, 30).

For the wild-type protein, FTIR difference spectra for reduced and oxidized iron Center II showed bands at  $1770$  and  $1760\text{ cm}^{-1}$ , respectively (Fig. 4, thin line, and Ref. 26), assigned to the carbonyl stretching mode,  $\nu(\text{C}=\text{O})$ , of a protonated carboxylate group of an Asp or Glu side chain located in a nonpolar environment (26). The comparison of reduced *minus* oxidized FTIR difference spectra of the wild-type SOR (Fig. 4, thin line) with that of the E114A mutant (thick line) clearly indicates that



**FIGURE 3. EPR spectra of the SOR from *D. baarsii* E114A mutant.** The mutant protein ( $200\ \mu\text{M}$  in 10 mM Tris-HCl buffer, pH 8.5) was oxidized with (a) 3 eq of  $\text{K}_2\text{IrCl}_6$  and (b) 6 eq of  $\text{H}_2\text{O}_2$  (incubation time 15 s and freezing). EPR conditions: temperature, 4.2 K; microwave power, 25 milliwatts at 9.447 GHz; modulation amplitude, 20 gauss at 100 kHz.



**FIGURE 4. Reduced *minus* oxidized FTIR difference spectra of the SOR active site wild-type (thin line) and E114A mutant (thick line) from *D. baarsii*.** Potentials of 650 and 250 mV (*versus* NHE) were applied at the working electrode to obtain the oxidized and reduced states, respectively. The spectra consist of an average of data recorded on 30 electrochemical cycles, 300 scans per cycle,  $4\text{ cm}^{-1}$  resolution.

the  $1770/1760\text{ cm}^{-1}$  differential signal is not observed when Glu<sup>114</sup> is replaced with alanine, a residue that does not possess a carboxylic group. Thus, Glu<sup>114</sup>, located in a hydrophobic protein environment at  $\approx 6\ \text{\AA}$  of the iron Center II accounts for the  $1770/1760\text{ cm}^{-1}$  differential signal (26). Bands at  $1200$  (oxidized) and  $1188$  (reduced)  $\text{cm}^{-1}$  (Fig. 4, thin line) can be also assigned to the Glu<sup>114</sup> side chain  $\nu(\text{C}-\text{O})$  stretching mode.

In addition, Fig. 4 further shows that only modest global protein structural changes are induced by the E114A mutation. Slight spectral changes are observed in the region where pep-

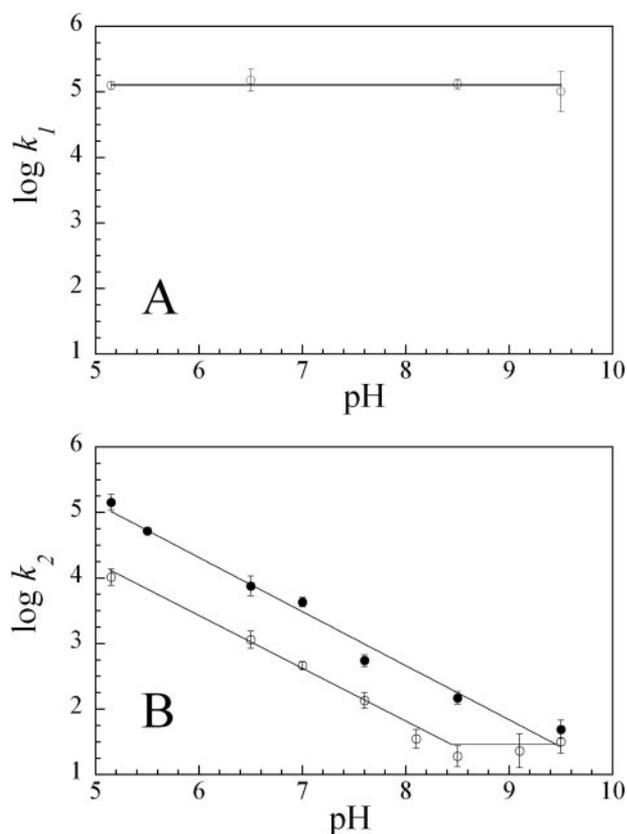


FIGURE 5. pH dependence of rate constants  $k_1$  and  $k_2$  for the reaction of SORs from *D. baarsii* (100  $\mu\text{M}$ ) with  $\text{O}_2^-$  (3  $\mu\text{M}$ ), generated by pulse radiolysis. A, SOR E114A mutant.  $k_1$  did not vary significantly with pH. B,  $\circ$ , SOR E114A mutant. Between pH 5.2 and 8.5,  $k_2$  values were fitted to a linear equation,  $\log k_2 = \log k_0 - \alpha\text{pH}$ , with  $\alpha = 0.8 \pm 0.1$  and  $k_0 = 1.7 \pm 0.6 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ .  $\bullet$ , SOR wild-type protein, shown for comparison.  $k_2$  values were fitted to a linear equation,  $\log k_2 = \log k_0 - \alpha\text{pH}$ , with  $\alpha = 0.80 \pm 0.05$  and  $k_0 = 1.4 \pm 0.7 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ .

tide  $\nu(\text{C}=\text{O})$  and  $\nu(\text{CN}) + (\text{NH})$  modes contribute, at 1700–1610 and 1580–1520  $\text{cm}^{-1}$ , respectively. The infrared bands at 1109 (reduced) and 1098 (oxidized)  $\text{cm}^{-1}$ , assigned to the ring mode of histidine ligands of the iron, remain unchanged for the mutant.

**Reaction of E114A SOR with  $\text{O}_2^-$  Formation of Reaction Intermediates**—The reaction of the SOR E114A mutant protein with  $\text{O}_2^-$  was studied by pulse radiolysis. The kinetics of the reaction were followed spectrophotometrically between 450 and 700 nm. The protein was present in large excess with regard to superoxide ( $[\text{protein}] = 20\text{--}100 \mu\text{M}$ ,  $[\text{O}_2^-] = 3 \mu\text{M}$ ), and therefore pseudo first-order conditions could be assumed. Kinetics were always analyzed at different wavelengths, which gave qualitatively identical results. As described for the wild-type protein, at pH 7.6 (Refs. 16 and 19 and Scheme 1), a first reaction intermediate species was formed very rapidly, about 50  $\mu\text{s}$  after the pulse, with a first-order rate constant ( $k_1$ ) directly proportional to the protein concentration (data not shown). A second-order rate constant for the reaction of the mutant protein with  $\text{O}_2^-$  was determined to be  $(1.2 \pm 0.2) \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . This value is almost identical to that reported for the wild-type protein (20). Furthermore,  $k_1$  was found to be pH independent between 5 and 9.5 (Fig. 5A), as it was reported for the wild-type protein (19).

This first intermediate decayed monoexponentially on the millisecond time scale (0.4–10 ms) with a  $k_2$  value independent of the protein concentration (data not shown). As reported for the wild-type protein, in the E114A mutant  $k_2$  is directly proportional to  $\text{H}^+$  concentration between pH 5 and 8 (Fig. 5B), with  $\log k_2 = \log k_0 - (0.80 \pm 0.1) \times \text{pH}$ . A slope close to unity (*i.e.*  $0.8 \pm 0.1$ ) indicates that, like the wild-type protein (19), the decay of the first intermediate involves a single protonation process as the rate-limiting step, the proton being directly provided by the bulk aqueous solvent. However, between pH 5 and 8,  $k_2$  values determined for the E114A mutant are 10 times smaller than that of the wild-type protein (Fig. 5B). This is reflected by the  $k_0$  value, the limit of the protonation rate constant when pH values approach 0, calculated to be  $(1.7 \pm 0.6) \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  for the E114A mutant and  $(1.4 \pm 0.7) \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  for the wild-type protein (Fig. 5B and Ref. 19). These data show that the E114A mutation results in a decrease of the rate of protonation of the first reaction intermediate.

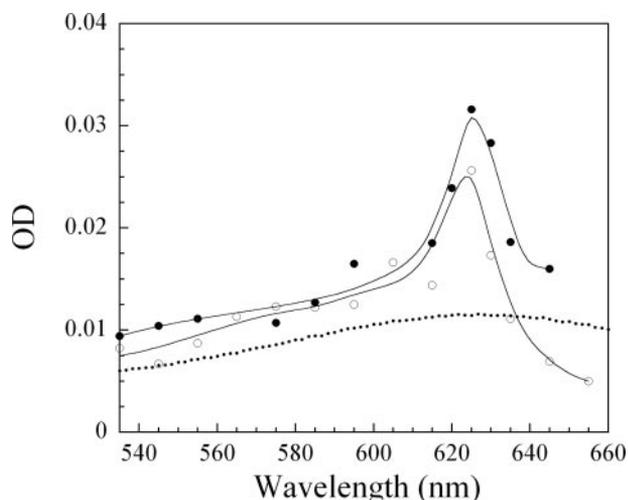
Above pH 8.4 and up to pH 9.5, in contrast with the wild-type protein,  $k_2$  values for the E114A mutant became pH independent (Fig. 5B). Similar behavior at basic pH values was also described for the wild-type SORs from *Desulfovibrio vulgaris* (18) and *Archaeoglobus fulgidus* (20, 21) and was proposed to be associated with a protonation event arising from a water molecule instead of  $\text{H}_3\text{O}^+$  at more acidic pH values (20, 21). This behavior could be also associated with the presence of a protonated base close to the active site. In the wild-type SOR from *D. baarsii*, where such a pH-dependent process was observed up to pH 10, this protonated base might be not be effective enough to out-compete the protonation process from the bulk solvent. For the E114A mutant, at basic pH values, the situation could be the opposite, due to the slower protonation process arising from the bulk.

The UV-visible absorption spectrum of the first reaction intermediate for the E114A mutant was reconstructed from the absorbance at different wavelengths obtained after 50  $\mu\text{s}$  of the reaction at pH 7.6 (data not shown). This spectrum exhibits a maximum at 610 nm and is identical to the spectrum of the first reaction intermediate reported for the wild-type protein, which was associated with a  $\text{Fe}^{3+}$ -peroxo species (19). Such a species results from the fast binding, at the sixth coordination position, of the superoxide anion and its subsequent reduction by the ferrous iron.

The spectrum of the second intermediate of the E114A mutant was reconstructed at pH 7.6, where  $k_2$  exhibits a direct dependence with  $\text{H}^+$  concentration and at pH 9.1, where  $k_2$  was found to be pH independent (Fig. 6). Both reconstructed spectra are similar and comparable with that determined for the second reaction intermediate in the wild-type protein (19), with a relatively narrow absorption band centered at 625 nm. This second intermediate, resulting from the protonation of the  $\text{Fe}^{3+}$ -peroxo species was proposed to be a  $\text{Fe}^{3+}$ -hydroperoxo species (19).

As previously described (19), with our instrumental device, we are not able to follow the reaction kinetics above 30 ms, a time range in which the last step of the reaction is expected to occur (Scheme 1). This last step would correspond to the dissociation of the second reaction intermediate, the release of

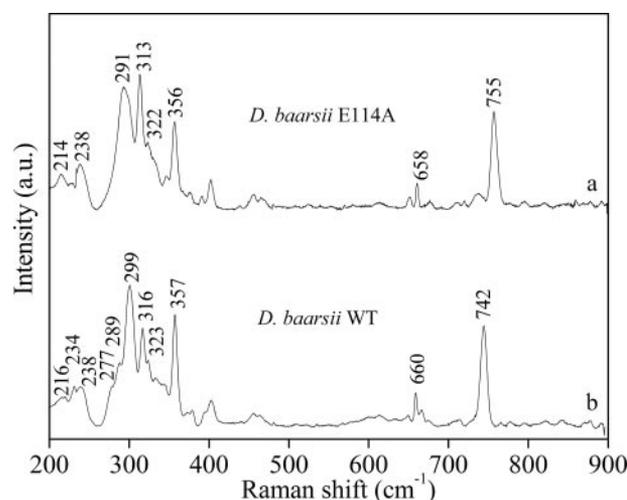
## Function of the Cysteine Axial Ligand in SOR Activity



**FIGURE 6. Transient absorption spectra (in a 2-cm path-length cuvette) of the second reaction intermediates formed upon the reaction of the E114A SOR mutant (100  $\mu\text{M}$ ) with  $\text{O}_2^-$  (3  $\mu\text{M}$ ), generated by pulse radiolysis at different pH values.  $\circ$ , pH 9.1, 10 ms after the pulse.  $\bullet$ , pH 7.6, 10 ms after the pulse. The dotted lines show the absorption spectrum of the iron Center II of the E114A mutant (3  $\mu\text{M}$ , pH 7.6) after complete oxidation by 3  $\mu\text{M}$   $\text{O}_2^-$  generated by  $\gamma$ -ray irradiation in the presence of a catalytic amount of catalase, or by reaction with a slight excess of  $\text{K}_2\text{IrCl}_6$ .**

$\text{H}_2\text{O}_2$  and formation of the  $\text{Fe}^{3+}$  active site species. Such a final reaction step is supported by the appearance at the end of the reaction of a UV-visible absorption spectrum characteristic of the oxidized active site (Fig. 6, dotted line), which clearly differs from that of the second reaction intermediate. This final spectrum was obtained from  $\gamma$ -ray irradiation experiments, carried out under the same experimental conditions as pulse radiolysis. This spectrum corresponds to a stoichiometric oxidation of the SOR Center II ( $\epsilon_{630\text{ nm}} = 1,660\text{ mM}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ , at pH 7.6) by  $\text{O}_2^-$ .

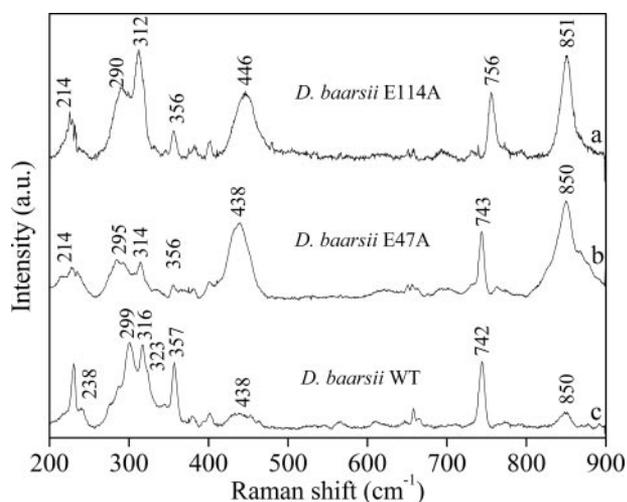
**Resonance Raman Experiments: Stabilization of a  $\text{Fe}^{3+}$ -peroxo Species on the Active Site**—Fig. 7 shows the 15 K RR spectra of the wild-type and E114A mutant oxidized with  $\text{K}_2\text{IrCl}_6$ , excited using a 647.1 nm laser, in resonance with the  $\text{S} \rightarrow \text{Fe}^{3+}$  charge transfer band of the active site (22, 23). The pre-resonance contributions from Center I (the  $\text{Fe}^{3+}$  rubredoxin-like center) have been subtracted, as previously described (23). The active site modes thus enhanced predominantly arise from the  $\text{Fe}^{3+}$ -S(Cys) moiety. The 299/316/323  $\text{cm}^{-1}$  cluster of bands in the *D. baarsii* wild-type spectrum (Fig. 7a) was attributed to primarily  $\text{Fe}^{3+}$ -S(Cys) stretching mode and bending mode contributions (23). Because the 299  $\text{cm}^{-1}$  band is the most intense, it is most likely predominantly  $\text{Fe}^{3+}$ -S(Cys) stretching in character (23). The 742  $\text{cm}^{-1}$  band was assigned to the S- $\text{C}_\beta$  stretching mode of Cys<sup>116</sup> and the weakly enhanced  $\text{Fe}^{3+}$ -N(His) stretching mode bands from the  $\text{Fe}^{3+}$ -coordinating histidine residues are seen at 216, 234, and 238  $\text{cm}^{-1}$  (Ref. 23 and Fig. 7). For the  $\text{K}_2\text{IrCl}_6$ -oxidized proteins (Fig. 7), mutation of the Glu<sup>114</sup> residue significantly perturbs the active site vibrational modes associated with the cysteine ligand, as compared with wild-type. The 299/316/323  $\text{cm}^{-1}$  cluster of bands (wild-type) is shifted to 291/313/323  $\text{cm}^{-1}$  (E114A) indicating a general significant downshift of the Fe-S(Cys) stretching and bending modes for the E114A mutant, corresponding to a significant weakening of the S- $\text{Fe}^{3+}$  bond for this mutant.



**FIGURE 7. Low temperature (15 K) resonance Raman spectra of the SOR active site wild-type and E114A mutant from *D. baarsii* oxidized with 3 eq of  $\text{K}_2\text{IrCl}_6$  excited at 647.1 nm. a, E114A mutant; b, wild-type. SOR concentration was 3 mM in 100 mM Tris-HCl buffer, pH 8.5; laser power was 30 milliwatts at the sample; spectral resolution was  $<3\text{ cm}^{-1}$ . Contribution of the  $\text{Fe}^{3+}$  rubredoxin-like center (Center I) and ice were subtracted from each spectrum (23).**

The  $\text{C}_\beta$ -S stretching frequency is sizably increased from 742 (wild-type) to 755 (E114A)  $\text{cm}^{-1}$  (Fig. 7). These data indicate that the E114A mutation results in an increase in electron density in the S- $\text{C}_\beta$  bond probably from a slight geometry change of the bond angle. The 357  $\text{cm}^{-1}$  band (wild-type), also assigned to a cysteine deformation mode containing significant C-N character (23), is not sizably changed in the mutant E114A spectrum (*i.e.* 356  $\text{cm}^{-1}$ ). However, Fig. 7 indicates some small but significant changes in some of the vibrational frequencies associated with the Fe-N modes of the iron-coordinating histidine residues. For example, the 216  $\text{cm}^{-1}$  frequency in the wild-type spectrum shifts to 214  $\text{cm}^{-1}$ . All the above observations clearly show that the E114A mutation results in localized structural changes primarily associated with Cys<sup>116</sup>, with a notable decrease of the strength of the S-Fe bond.

The treatment of SOR with a slight excess of  $\text{H}_2\text{O}_2$  followed by rapid freezing was previously reported to form a metastable  $\text{Fe}^{3+}$ -peroxo species at the SOR active site, in particular when the oxidized active site sixth ligand was removed (*i.e.* the E47A mutation) (22, 23). These studies allowed a detailed resonance Raman characterization of a particular high-spin  $\text{Fe}^{3+}$ -peroxo species exhibiting  $\nu(\text{Fe}^{3+}-\text{O}_2)$  and  $\nu(\text{O}-\text{O})$  stretching frequencies of 433–438  $\text{cm}^{-1}$  and 850–852  $\text{cm}^{-1}$ , respectively (22, 23). When the E114A mutant was similarly treated with 6 eq of  $\text{H}_2\text{O}_2$  at pH 8.5 and rapidly frozen (less than 5 s), the RR spectrum of the E114A mutant exhibited new bands at 446 and 851  $\text{cm}^{-1}$  (Fig. 8) that were not present in the spectrum of the  $\text{K}_2\text{IrCl}_6$ -oxidized protein (Fig. 7). These band frequencies are consistent with the  $\nu(\text{Fe}-\text{O}_2)$  and  $\nu(\text{O}-\text{O})$  stretching modes, respectively, of a  $\text{Fe}^{3+}$ -peroxo species, as previously verified for the wild-type and E47A mutant of the SOR from *D. baarsii* using <sup>18</sup>O labeling (22, 23). The intensities of these two bands are similar to that of the 756  $\text{cm}^{-1}$  band (C-S stretching mode), a marker for the active site in the  $\text{Fe}^{3+}$  state, as reported for the E47A mutant (at 742  $\text{cm}^{-1}$ ) (Fig. 8). For the wild-type protein, the two RR bands corresponding to the  $\text{Fe}^{3+}$ -peroxo species are



**FIGURE 8. Low temperature (15 K) resonance Raman spectra of the SOR active site wild-type, E47A, and E114A mutants from *D. baarsii* oxidized with 6 eq of  $\text{H}_2\text{O}_2$  excited at 647.1 nm.** *a*, E114A mutant; *b*, E47A mutant; and *c*, wild-type. SOR concentration was 3 mM in 100 mM Tris-HCl buffer, pH 8.5; laser power was 30 milliwatts at the sample; spectral resolution was  $<3\text{ cm}^{-1}$ . Contribution of the  $\text{Fe}^{3+}$  rubredoxin-like center (Center I) and the ice were subtracted from each spectrum (23). The  $230\text{ cm}^{-1}$  band is due to ice contributions.

very weak compared with the  $742\text{ cm}^{-1}$  band (Fig. 8 and Ref. 23), indicating that this species is trapped to a lesser degree.<sup>5</sup> In contrast, for the E114A mutant, the intensities of the peroxo bands indicate that when treated with  $\text{H}_2\text{O}_2$ , this mutant trapped and stabilized by rapid freezing a significant population of the  $\text{Fe}^{3+}$ -peroxo species at the active site, as was observed for the *D. baarsii* E47A mutant (22, 23). However, in the case of the E114A mutant, the  $\nu(\text{Fe}-\text{O}_2)$  stretching mode is observed at a significantly higher frequency compared with the E47A mutant ( $446\text{ cm}^{-1}$  compared with  $438\text{ cm}^{-1}$ , respectively), whereas the  $\nu(\text{O}-\text{O})$  stretching mode remains comparable ( $851\text{ cm}^{-1}$  for the E114A and  $850\text{ cm}^{-1}$  for the E47A). These observations indicate that the Fe-O bond is stronger for the Glu<sup>114</sup> mutant than it is for wild-type and E47A.

The low temperature EPR spectrum of a rapidly frozen solution of E114A mixed with  $\text{H}_2\text{O}_2$  in conditions comparable with those of the RR samples corresponding to Fig. 8, exhibits a feature at  $g = 4.3$ , similar to that observed for the  $\text{K}_2\text{IrCl}_6$ -oxidized protein (Fig. 3). Except those for the iron corresponding to Center I, which remained unchanged, no other signals were observed. This indicates that the peroxo species formed in these conditions is associated with a high spin rhombic ferric ion.

Altogether these results indicate that, like the E47A mutant, the E114A mutation strongly stabilizes a high spin  $\text{Fe}^{3+}$ -peroxo species in its active site. However, the Fe-O bond of the peroxo is significantly strengthened in the E114A mutant.

**Effects of the E114A Mutation on the Cellular Activity of SOR—**Turnovers of SOR with  $\text{O}_2^-$  have been described using

<sup>5</sup> This has been quantitatively confirmed using Mossbauer spectroscopy (24). Thus, despite variations in the UV-visible absorption band maxima of the wild-type, E47A, and E114A SORs, the relative intensities of the RR bands corresponding to the  $\text{Fe}^{3+}$ -peroxo species qualitatively reflect the degree of trapping of this species.

**TABLE 1**

**Aerobic survival of superoxide dismutase-deficient *E. coli* cells depending on their production of wild-type or E114A mutant of SOR**

Anaerobic cultures of *sodA sodB recA E. coli* mutant QC 2375 transformed with pJF119EH, pMJ25, or pCWE114A were plated on LB medium plus  $5\text{ }\mu\text{M}$  or  $1\text{ mM}$  IPTG, under anaerobic and aerobic conditions. Colonies were counted and after 24 h incubation at  $37\text{ }^\circ\text{C}$ .

Plasmid	Aerobic survival <sup>a</sup>	
	$5\text{ }\mu\text{M}$ IPTG	$1\text{ mM}$ IPTG
	%	
pJF119EH (control vector)	0.003	ND <sup>b</sup>
pMJ25 (SOR wild-type)	$42 \pm 5$	$78 \pm 6$
pCWE114A (SOR E114A)	$23 \pm 3$	$58 \pm 3$

<sup>a</sup> Survival was calculated as the ratio of the number of colonies under aerobic conditions to those under anaerobic conditions. Values are the means of five experiments. 100% corresponds to  $1.8\text{--}2.3 \times 10^6$  colonies.

<sup>b</sup> ND, not determined.

NADPH reductase as a source of electrons to regenerate the active SOR ferrous state and xanthine oxidase as a source of  $\text{O}_2^-$  (31). Using the NADPH flavodoxin reductase from *E. coli* (Fpr) as a source of electron, we have observed oxidation of NADPH specifically associated with turnovers of SOR with  $\text{O}_2^-$  (supplemental data Fig. S1). An NADPH:superoxide oxidoreductase activity for the wild-type SOR of  $9\text{ }\mu\text{M}$  NADPH<sub>ox</sub>/min was determined. The E114A mutation does not modify the NADPH:superoxide oxidoreductase activity of the protein (supplemental data Fig. S1). As shown previously (31), under these conditions, the  $\text{O}_2^-$  flux is the rate-limiting process for NADPH consumption. Consequently this test does not provide additional information on the effects of the E114A mutation on the subsequent steps after  $\text{O}_2^-$  binding at the SOR active site. However, it demonstrates that turnovers still occur with this mutant.

The ability of the SOR E114A mutant protein to complement *E. coli* superoxide dismutase deficiency was tested as described in Ref. 16. The *E. coli sodA sodB recA* mutant cannot grow in the presence of oxygen because of the combined lack of superoxide dismutase activity (*sodA sodB*) and the DNA strand break repair activity (*recA*) that results in lethal DNA oxidative damage. As shown in Table 1, at low IPTG concentration, the production of the E114A mutant SOR protein restored only 23% of the aerobic growth of *sodA sodB recA* mutant, whereas the wild-type SOR protein restored 42%. At higher IPTG concentration, 58% of anaerobically growing *E. coli* cells producing the E114A SOR were able to grow aerobically compared with 78% for those producing wild-type SOR. These data indicate that production of E114A SOR can compensate for superoxide dismutase deficiency in *E. coli*, but with significantly less efficiency than the wild-type SOR.

## DISCUSSION

The presence of a cysteine axial ligand in the SOR iron active site has long been proposed to be an essential feature in the reactivity of the enzyme with superoxide (5, 8). For heme-thiolate proteins like cytochrome P450 and for [Fe-S] cluster proteins (27–29), it has been proposed that H-bonds on the cysteine ligand would change the strength of the S-Fe bond and therefore modulate the chemistry of these proteins. A similar situation is expected for SOR where such changes in the S-Fe bond should play some role in modulating the reactivity of SOR

## Function of the Cysteine Axial Ligand in SOR Activity

with superoxide. Because it is *trans* to the superoxide binding site, the cysteine ligand should play a critical role in donating electron density to the iron metal center so as to promote  $\text{Fe}^{2+} \rightarrow$  superoxide electron transfer, or  $\text{H}_2\text{O}_2$  dissociation from high-spin  $\text{Fe}^{3+}$ , or both. In particular for SOR, in the well conserved tetrapeptide Cys<sup>116</sup>-Asn<sup>117</sup>-Leu/Ile<sup>118</sup>-His<sup>119</sup>, two peptide NH groups from the Leu/Ile<sup>118</sup> and His<sup>119</sup> are within H-bonding distance of the Cys<sup>116</sup> ligand sulfur (Fig. 1) (14). Furthermore, for the *D. baarsii* enzyme, as previously suggested (26) and confirmed here by FTIR measurements, the carboxylic group of the Glu<sup>114</sup> side chain, which directly faces the S-Fe bond at about 5–6 Å from both atoms, is in interaction with the iron atom in the active site (Fig. 1). Glu<sup>114</sup> is well conserved in the two-iron SORs, whereas it is replaced by a Ser residue in the one-iron type of SORs, such as the *P. furiosus* enzyme (7).

In this work, we have mutated the Glu<sup>114</sup> residue of the SOR from *D. baarsii*, into alanine. The data reveal that the presence of the Glu<sup>114</sup> carboxylic group allows a fine tuning of the S-Fe bond strength, which appears to be a determining factor in the rate of formation and release of the reaction product,  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

The pulse radiolysis experiments presented here showed that the E114A mutation does not change the overall reaction mechanism of SOR with superoxide (Scheme 1) and still reacts very rapidly with superoxide. Although with our pulse radiolysis apparatus we were not able to kinetically characterize the final step of the catalytic cycle (formation of  $\text{H}_2\text{O}_2$  and the resting ferric active site), this final step does exist for the E114A mutant (Fig. 6), as it does for wild-type and other mutants we have studied (16, 19).

However, we have observed that the mutation specifically decreases by a factor of 10 the rate constant for the protonation process of the  $\text{Fe}^{3+}$ -peroxo intermediate species, to form the  $\text{Fe}^{3+}$ -hydroperoxo intermediate species. An interpretation for this very specific effect is not obvious at first glance. In fact, because the Glu<sup>114</sup> is located on the opposite side to the intermediate peroxo adducts (Fig. 1) and that, as seen here by FTIR spectroscopy, the E114A mutation does not induce marked global structural changes in the protein, the decrease of the protonation rate of the peroxo species is not expected to result from structural constraints that could appear in the active site. Also, the mutation does not apparently modify the proton source, because as in the wild-type protein, the proton is still provided directly by the bulk solvent (Fig. 5). Consequently, this slower protonation process could be associated with some changes in the intrinsic properties of the  $\text{Fe}^{3+}$ -peroxo intermediate species. Interestingly, the E114A mutation removes the dipolar interaction with Cys<sup>116</sup> (Fig. 4) as well as potentially removing an H-bond with the backbone C=O group of His<sup>49</sup> whose side chain is ligated to the iron atom (Fig. 1). All these factors could affect the local electrostatics around the Cys-Fe moiety as well as slightly altering its bonding geometry, distance, and therefore the bond strength. Several arguments reported here are in agreement with the above proposals.

First, we previously reported that the wild-type protein exhibits an alkaline transition of the  $\text{S} \rightarrow \text{Fe}^{3+}$  charge transfer UV-visible absorption (644 to 560 nm,  $\Delta = 84$  nm,  $\text{p}K_a = 9.0$ ), which has been attributed to the displacement of the Glu<sup>47</sup> ligand by  $\text{OH}^-$  at basic pH values (8, 24). This results in an

increase in the electron density at the  $\text{Fe}^{3+}$  site (25). The E114A mutant exhibits a similar alkaline transition with similar  $\text{p}K_a$  and magnitude values ( $\text{p}K_a = 8.8$  and  $\Delta = 85$  nm). However, the mutation induces spectral blue-shifts of 12–13 nm for both the  $\text{Fe}^{3+}$ -Glu<sup>47</sup> and  $\text{Fe}^{3+}$ -OH ligated states (632 to 547 nm, respectively). The significantly different  $\text{S} \rightarrow \text{Fe}^{3+}$  charge transfer absorption maxima of the E114A indicates localized changes at the active site that affect electron density at the high spin  $\text{Fe}^{3+}$  atom (8).

Second, the RR spectra show that the E114A mutation has very specific effects on the cysteine ligand (Fig. 7). When compared with the wild-type and the E47A proteins, the E114A mutation induces a significant weakening of the S- $\text{Fe}^{3+}$  bond (299/316/323 to 291/313/311  $\text{cm}^{-1}$ ) and a concomitant strengthening of the C-S bond (743 to 756  $\text{cm}^{-1}$ ) of the cysteine ligand. These localized structural changes are compatible with the observed blue shift (12–13 nm) of the  $\text{S} \rightarrow \text{Fe}^{3+}$  charge transfer band of the oxidized iron site in the E114A mutant.

From these data, one can conclude that the carboxylic side chain of Glu<sup>114</sup>, which faces directly the S-Fe bond at about 5–6 Å distances of both atoms, allows a fine tuning of the strength of the S-Fe bond. In particular it induces a strengthening of the S-Fe bond.

Such an effect should have consequences on the bonding of the  $\text{Fe}^{3+}$ -peroxo intermediates that form during the reaction with superoxide. Up to now, the reaction of SOR with  $\text{H}_2\text{O}_2$  is the only way that has been reported to allow a detailed characterization by resonance Raman of a  $\text{Fe}^{3+}$ -peroxo species in the active site of SOR (23, 24). Although it is not known yet if such a peroxo species is identical to the ones formed during the reaction of the protein with superoxide, the characterization of a  $\text{Fe}^{3+}$ -peroxo species here and elsewhere in SORs by resonance Raman are most likely informative with respect to the properties of the intermediates species formed in the reaction with superoxide. In support of that, it has been recently reported that the iron complex SOR mimic  $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{cyclam})\text{-PrS}]^+$ , when reacted with superoxide, and forms a high-spin iron peroxo intermediate with Fe-O and O-O resonance Raman bands (32) very similar to those observed for the SOR protein treated with  $\text{H}_2\text{O}_2$  (23, 24).

When the E114A mutant is reacted with a slight excess of hydrogen peroxide, we showed that it stabilizes an iron peroxo species at its active site, which can be freeze-trapped and characterized by resonance Raman spectroscopy. The RR spectrum exhibits intense  $\nu(\text{Fe}-\text{O}_2)$  and  $\nu(\text{O}-\text{O})$  mode bands, at 446 and 851  $\text{cm}^{-1}$ , respectively, characteristic of the ferric iron peroxo species similarly trapped in other SORs and which has been assigned to a side-on high-spin  $\text{Fe}^{3+}$ -peroxo species (22, 23). EPR experiments presented here show that the peroxo species in the E114A mutant is also associated with a high-spin ferric iron site.

Such a high-spin iron-peroxo species was readily trapped and characterized in another *D. baarsii* SOR variant, the E47A mutant protein (22, 23). In the wild-type protein, a similar peroxo species, with RR band frequencies identical to those of the E47A mutant, was also observed but was trapped to a much lesser degree. This is consistent with the fact that the wild-type SOR active site accommodates such species only transiently

because the Glu<sup>47</sup> residue binds to the sixth coordination position of the Center II ferric site, facilitating H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> release by a ligand exchange mechanism (23). Thus, for the E47A mutant, the stabilization of the peroxo species was associated with the presence of the alanine residue incapable of ligating to the ferric iron (23). Accordingly, in the E47A mutant, the Fe–O and O–O stretching modes exhibited identical vibrational frequencies as those of the wild-type protein (Fig. 8 and Refs. 22 and 23). Interestingly, the  $\nu(\text{Fe–O})$  band of the iron-peroxo species in the E114A mutant is shifted to higher frequency (446 compared with 438 cm<sup>-1</sup> in the wild-type and E47A proteins), whereas the  $\nu(\text{O–O})$  bands exhibit comparable frequencies (850–851 cm<sup>-1</sup>). This indicates that the Fe–O bond is stronger in the E114A mutant than in the E47A and wild-type proteins. A stronger Fe–O bond is in good agreement with stabilization of the peroxo species in the E114A mutant protein. Thus, the mechanism by which the E47A and E114A mutants induce a stabilization of the peroxo species appears to be fundamentally different.

For the E114A mutant, strengthening of the Fe–O bond correlates well with the observed weakening of the S–Fe bond that indicates a decreased electron donation from the cysteine ligand to the iron. For a high-spin Fe<sup>3+</sup>-peroxo end-on or side-on bonding situation, the in-plane  $\pi^*$  orbital of the peroxo ligand overlaps with the Fe<sup>3+</sup>  $d_{xz}$  orbital (Refs. 23 and references therein). Thus any electron density donation to the filled  $\pi^*$  orbital, from the iron center and originating from the cysteine ligand in the *trans* position, is expected to weaken the Fe–O<sub>2</sub> bond. The weaker S–Fe<sup>3+</sup> bond in the E114A mutant (compared with wild-type) indicates decreased cysteine electron donating power to the iron and the peroxo  $\pi^*$  orbital, and therefore a stronger Fe–O<sub>2</sub> bond (compared with wild-type) is expected, and indeed observed. Such *trans* ligand donation effects have been observed for Fe<sup>3+</sup>-alkylperoxo species in SOR model complexes for which decreased Lewis basicity (*i.e.* decreased electron density donation from the *trans* ligand) was correlated with increased Fe–O bond strength and stability (33).

The strengthening of the Fe–O bond of the Fe<sup>3+</sup>-peroxo species observed in the E114A mutant, with no modification of the strength of the O–O bond is expected to change the acidity of the peroxo species, most likely increasing it. Interestingly, the Brønsted catalysis equation predicts that among a series of bases, the logarithm of the rate constant of protonation of a species is directly proportional to its pK<sub>a</sub> value. This appears to be in very good agreement with the decrease of the rate of the protonation of the Fe<sup>3+</sup>-peroxo species intermediate observed in the reaction of the E114A mutant with superoxide (Fig. 5, decreases of  $k_2$  value, Scheme 1). Thus, the properties of the peroxo species characterized by RR from the reaction of SOR with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> account well for the specific effect of the E114A mutation on the protonation rate of the first reaction intermediate during the reaction with superoxide. Thus, we propose that the decrease of this protonation rate can be directly associated with a decrease of the pK<sub>a</sub> value of the peroxo intermediate, which as discussed above, originates from the strengthening of the Fe–O (peroxo) bond in that mutant.

Using the Fpr reductase from *E. coli* as a source of electrons for SOR, we showed that the E114A mutation did not inhibit

turnovers with O<sub>2</sub><sup>-</sup>. However, in cellular conditions, the complementation of an *E. coli sod* mutant strain with the *D. baarsii sod* gene was significantly impaired by the E114A mutation. Altogether with our previous conclusions that the E114A mutant stabilizes a peroxide intermediate in its active site, these data suggest that an efficient release of the peroxide intermediate to form H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is important for the SOR detoxification activity.

In conclusion, these data highlight a functional role for the carboxylic side chain of Glu<sup>114</sup> in the SOR from *D. baarsii*. This carboxylic group, which is in interaction with the S–Fe bond, directly contributes to a fine tuning of the S–Fe strength. The data obtained with the E114A mutant allow to gauge the importance of the strength of the S–Fe bond in the reaction with superoxide, which appear to directly affect both the strength of the Fe–O bond and the pK<sub>a</sub> values of the iron-peroxo intermediate that is formed during catalysis. Both factors are essential in the formation of the reaction product H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, which in SOR arises from protonations of the peroxo intermediate and cleavage of the Fe–O bond. One should note that a strengthening of the Fe–O bond in the E114A mutant should also markedly affect the last step of the reaction cycle with superoxide. This final step involves a second protonation process at the level of the Fe<sup>3+</sup>-hydroperoxide intermediate together with the cleavage of the Fe–O bond to form and release H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Scheme 1). Further works are needed to specify this point.

P450 enzymes like SOR form Fe<sup>3+</sup> peroxide intermediate species with a *trans* cysteinate ligand during their catalytic cycles. However, at the difference of the P450 enzymes that favor the heterolytic cleavage of the O–O bond of the peroxide intermediate to form the high valent iron oxo species (34), our previous RR experiments demonstrated that the SOR active site can accommodate unusual Fe<sup>3+</sup>-peroxo species with particularly weak Fe–O bond and strong O–O bond, which, in addition to the spin state of the iron (33), clearly favors the Fe–O bond cleavage to form its reaction product H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Our present work further shows that the strength of the S–Fe bond, which is finely tuned by the cysteine environment, significantly contributes to this unusual weak Fe–O bond in SOR.

Very recently, the stabilization of the peroxide intermediate in the E114A mutant has allowed the determination of a high resolution structure of three slightly different conformations of high-spin iron peroxide intermediates in the SOR active site with end-on coordination (35). It should be noted that previously, based on the  $\nu(\text{Fe–O})$ - $\nu(\text{O–O})$  frequency comparisons with high-spin peroxo-iron complexes and D<sub>2</sub>O exchange experiments, a side-on peroxo conformation was proposed for SOR (22, 23). It is possible that a side-on species could correspond to an early deprotonated peroxo state rapidly trapped in solution by flash-freezing at 77 K in Refs. 22 and 23 and in this work, but which was not trapped in the crystal under different experimental conditions (35). Further studies are needed to specify this point, but we stress that the arguments we make in this paper apply for both an end-on or side-on Fe<sup>3+</sup>-peroxo configurations.

These crystallographic studies highlight a specific protonation mechanism of the Fe–OOH on the proximal oxygen to

## Function of the Cysteine Axial Ligand in SOR Activity

release H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (35). This provides additional important data that account for the differences in the evolution of the Fe<sup>3+</sup>-peroxide species between SOR and P450 enzymes.

*Acknowledgments*—We acknowledge Dr. Vincent Favaudon for assistance with pulse radiolysis experiments, Dr. Stéphane Ménage for assistance with EPR spectroscopy, and Dr. Danièle Touati for help in *E. coli* complementation tests.

### REFERENCES

1. Jenney, F. E., Jr., Verhagen, M. F., Cui, X., and Adams, M. W. W. (1999) *Science* **286**, 306–309
2. Lombard, M., Fontecave, M., Touati, D., and Nivière, V. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 115–121
3. Nivière, V., and Fontecave, M. (2004) *J. Biol. Inorg. Chem.* **9**, 119–123
4. Kurtz, D. M., Jr. (2004) *Acc. Chem. Res.* **37**, 902–908
5. Brines, L. M., and Kovacs, J. A. (2007) *Eur. J. Inorg. Chem.* **1**, 29–38
6. Valentine, J. S., Wertz, D. L., Lyons, T. J., Liou, L. L., Goto, J. J., and Gralla, E. B. (1998) *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2**, 253–262
7. Andrew, P. Y., Hu, Y., Jenney, F. E., Jr., Adams, M. W. W., and Rees, D. C. (2000) *Biochemistry* **39**, 2499–2508
8. Clay, M. D., Jenney, F. E., Jr., Hagedoorn, P. L., George, G. N., Adams, M. W. W., and Johnson, M. K. (2002) *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 788–805
9. Lombard, M., Touati, D., Fontecave, M., and Nivière, V. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 27021–27026
10. Jovanovic, T., Ascenso, C., Hazlett, K. R. O., Sikkink, R., Krebs, C., Litwiller, R., Benson, L. M., Moura, I., Moura, J. J. G., Radolf, J. D., Huynh, B. H., Naylor, S., and Rusnak, F. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 28439–28448
11. Abreu, I. A., Saraiva, L. M., Carita, J., Huber, H., Stetter, K. O., Cabelli, D. E., and Teixeira, M. (2000) *Mol. Microb.* **38**, 322–334
12. Santos-Silva, T., Trincao, J., Carvalho, A. L., Bonifacio, C., Auchère, F., Raleiras, P., Moura, I., Moura, J. J. G., and Romao, J. (2006) *J. Biol. Inorg. Chem.* **11**, 548–558
13. Coelho, A., Matias, P., Fülöp, V., Thompson, A., Gonzalez, A., and Carondo, M. A. (1997) *J. Biol. Inorg. Chem.* **2**, 680–689
14. Adams, V., Royant, A., Nivière, V., Molina-Heredia, F. P., and Bourgeois, D. (2004) *Structure* **12**, 1729–1740
15. Emerson, J. P., Cabelli, D. E., and Kurtz, D. M., Jr. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 3802–3807
16. Lombard, M., Houée-Levin, C., Touati, D., Fontecave, M., and Nivière, V. (2001) *Biochemistry* **40**, 5032–5040
17. Nivière, V., Lombard, M., Fontecave, M., and Houée-Levin, C. (2001) *FEBS Lett.* **497**, 171–173
18. Emerson, J. P., Coulter, E. D., Cabelli, D. E., Phillips, R. S., and Kurtz, D. M., Jr. (2002) *Biochemistry* **41**, 4348–4357
19. Nivière, V., Asso, M., Weill, C. O., Lombard, M., Guigliarelli, B., Favaudon, V., and Houée-Levin, C. (2004) *Biochemistry* **43**, 808–818
20. Rodrigues, J. V., Abreu, I. A., Cabelli, D., and Teixeira, M. (2006) *Biochemistry* **45**, 9266–9278
21. Rodrigues, J. V., Saraiva, L. M., Abreu, I. A., Teixeira, M., and Cabelli, D. E. (2007) *J. Biol. Inorg. Chem.* **12**, 248–256
22. Mathé, C., Mattioli, T. A., Horner, O., Lombard, M., Latour, J. M., Fontecave, M., and Nivière, V. (2002) *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 4966–4967
23. Mathé, C., Nivière, V., and Mattioli, T. A. (2006) *Biophys. Chem.* **119**, 38–48
24. Horner, O., Mouesca, J. M., Oddou, J. L., Jeandey, C., Nivière, V., Mattioli, T. A., Mathé, C., Fontecave, M., Maldivi, P., Bonville, P., Halfen, J. A., and Latour, J. M. (2004) *Biochemistry* **43**, 8815–8825
25. Mathé, C., Nivière, V., and Mattioli, T. A. (2005) *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 16436–16441
26. Berthomieu, C., Dupeyrat, F., Fontecave, M., Verméglio, A., and Nivière, V. (2002) *Biochemistry* **41**, 10360–10368
27. Poulos, T. L. (1996) *J. Biol. Inorg. Chem.* **1**, 356–359
28. Dey, A., Okamura, T., Ueyama, N., Hedman, B., Hodgson, K. O., and Solomon, E. I. (2005) *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 12046–12053
29. Lin, I.-J., Gebel, E. B., Machonkin, T. E., Westler, W. M., and Markley, J. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 14581–14586
30. Clay, M. D., Emerson, J. P., Coulter, E. D., Kurtz, D. M., Jr., and Johnson, M. K. (2003) *J. Biol. Inorg. Chem.* **8**, 671–682
31. Emerson, J. P., Coulter, E. D., Phillips, R. S., and Kurtz, D. M., Jr. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 39662–39668
32. Kitagawa, T., Dey, A., Lugo-Mas, P., Benedict, J. B., Kaminsky, W., Solomon, E., and Kovacs, J. A. (2006) *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 14448–14449
33. Bukowski, M. R., Halfen, H. L., van den Berg, T. A., Halfen, J. A., and Que, L. (2005) *Angew. Chem. Int. Ed.* **44**, 5483–5484
34. Denisov, I. G., Makris, T. M., Sligar, S. G., and Schlichting, I. (2005) *Chem. Rev.* **105**, 2253–2277
35. Katona, G., Carpentier, P., Nivière, V., Amara, P., Adam, V., Ohana, J., Tsanov, N., and Bourgeois, D. (2007) *Science* **316**, 449–453

# *Bibliographie*



## A

- Abreu, I. A., L. M. Saraiva, J. Carita, H. Huber, K. O. Stetter, D. Cabelli & M. Teixeira (2000) Oxygen detoxification in the strict anaerobic archaeon *Archaeoglobus fulgidus*: superoxide scavenging by Neelaredoxin. *Molecular Microbiology*, 38, 322-334.
- Adam, V., A. Royant, V. Niviere, F. P. Molina-Heredia & D. Bourgeois (2004) Structure of superoxide reductase bound to ferrocyanide and active site expansion upon X-ray-induced photo-reduction. *Structure*, 12, 1729-1740.
- Afonso, V., R. Champy, D. Mitrovic, P. Collin & A. Lomri (2007) Reactive oxygen species and superoxide dismutases: Role in joint diseases. *Joint Bone Spine*, 74, 324-329.

## B

- Baldacchino, G., V. Trupin-Wasselin, S. Bouffard, E. Balanzat, M. Gardes-Albert, Z. Abedinzadeh, D. Jore, S. Deycard & B. Hickel (2001) Production of superoxide radicals by linear-energy-transfer pulse radiolysis of water. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 79, 180-183.
- Beck, B. W., Q. Xie & T. Ichiye (2001) Sequence determination of reduction potentials by cysteinyl hydrogen bonds and peptide dipoles in [4Fe-4S] ferredoxins. *Biophysical Journal*, 81, 601-613.
- Bendich, A. & L. Langseth (1989) Safety of vitamine A. *American Journal of Clinical Nutrition*, 49, 358-371.
- Berthomieu, C., F. Dupeyrat, M. Fontecave, A. Vermeglio & V. Niviere (2002) Redox-dependent structural changes in the superoxide reductase from *Desulfoarculus baarsii* and *Treponema pallidum*: A FTIR study. *Biochemistry*, 41, 10360-10368.
- Bindoli, A., J. M. Fukuto & H. J. Forman (2008) Thiol chemistry in peroxidase catalysis and redox signaling. *Antioxidants & Redox Signaling*, 10, 1549-1564.
- Boehme, D. E., K. Vincent & O. R. Brown (1976) Oxygen and toxicity inhibition of amino-acid biosynthesis. *Nature*, 262, 418-420.
- Bolwell, G. P. & P. Wojtaszek (1997) Mechanisms for the generation of reactive oxygen species in plant defence - a broad perspective. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 51, 347-366.
- Bonnot Florence, Houée.-Levin Chantal., Favaudon Vincent, Nivière Vincent, (2009). Photochemical processes associated with the intermediates formed during the reaction of superoxide reductase from *Desulfoarculus baarsii* with superoxide. *En soumission*.
- Bradford, M. M. (1976) Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye-binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.

- 
- Bruckdorfer, K. (1998) Lipid oxidation products and vascular function. *Free Radic Res*, 28, 573-81.
- Bsat, N., L. Chen & J. D. Helmann (1996) Mutation of the *Bacillus subtilis* alkyl hydroperoxide reductase (ahpCF) operon reveals compensatory interactions among hydrogen peroxide stress genes. *Journal of Bacteriology*, 178, 6579-6586.
- Bsat, N., A. Herbig, L. Casillas-Martinez, P. Setlow & J. D. Helmann (1998) *Bacillus subtilis* contains multiple Fur homologues: identification of the iron uptake (Fur) and peroxide regulon (PerR) repressors. *Molecular Microbiology*, 29, 189-198.

## C

- Cadenas, E. & K. J. A. Davies (2000) Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radical Biology and Medicine*, 29, 222-230.
- Cadet, J., T. Delatour, T. Douki, D. Gasparutto, J. P. Pouget, J. L. Ravanat & S. Sauvaigo (1999) Hydroxyl radicals and DNA base damage. *Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 424, 9-21.
- Calderón, J., A. Fernández & A. María de Jesús (2008) Atherosclerosis, oxidative stress and physical activity. Review. *Invest Clin*, 49, 397-410.
- Carlioz, A. & D. Touati (1986) Isolation of superoxide-dismutase mutants in *Escherichia coli* - is superoxide dismutase necessary for aerobic life. *Embo Journal*, 5, 623-630.
- Chae, Y. K. (2002) Expression, purification, and characterization of the oligomeric states of rubredoxin oxidoreductase from *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *Molecules and Cells*, 13, 259-263.
- Chelikani, P., I. Fita & P. C. Loewen (2004) Diversity of structures and properties among catalases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 61, 192-208.
- Chen, L. A., P. Sharma, J. Legall, A. M. Mariano, M. Teixeira & A. V. Xavier (1994) A blue nonheme iron protein from *Deulfovibrio gigas*. *European Journal of Biochemistry*, 226, 613-618.
- Clay, M. D., J. P. Emerson, E. D. Coulter, D. M. Kurtz & M. K. Johnson (2003) Spectroscopic characterization of the [Fe(His)<sub>4</sub>(Cys)] site in 2Fe-superoxide reductase from *Desulfovibrio vulgaris*. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 8, 671-682.
- Clay, M. D., F. E. Jenney, P. L. Hagedoorn, G. N. George, M. W. W. Adams & M. K. Johnson (2002a) Spectroscopic studies of *Pyrococcus furiosus* superoxide reductase: Implications for active-site structures and the catalytic mechanism. *Journal of the American Chemical Society*, 124, 788-805.

- Clay, M. D., F. E. Jenney, H. J. Noh, P. L. Hagedoorn, M. W. W. Adams & M. K. Johnson (2002b) Resonance Raman characterization of the mononuclear iron active-site vibrations and putative electron transport pathways in *Pyrococcus furiosus* superoxide reductase. *Biochemistry*, 41, 9833-9841.
- Coelho, A. V., P. Matias, V. Fulop, A. Thompson, A. Gonzalez & M. A. Carrondo (1997) Desulfoferrodoxin structure determined by MAD phasing and refinement to 1.9-angstrom resolution reveals a unique combination of a tetrahedral FeS<sub>4</sub> centre with a square pyramidal FeSN<sub>4</sub> centre. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 2, 680-689.
- Coulter, E. D., J. P. Emerson, D. M. Kurtz & D. E. Cabelli (2000) Superoxide reactivity of rubredoxin oxidoreductase (desulfoferrodoxin) from *Desulfovibrio vulgaris*: A pulse radiolysis study. *Journal of the American Chemical Society*, 122, 11555-11556.
- Coulter, E. D. & D. M. Kurtz (2001) A role for rubredoxin in oxidative stress protection in *Desulfovibrio vulgaris*: Catalytic electron transfer to rubrerythrin and two-iron superoxide reductase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 394, 76-86.
- Couture, M., S. Adak, D. J. Stuehr & D. L. Rousseau (2001) Regulation of the properties of the heme-NO complexes in nitric-oxide synthase by hydrogen bonding to the proximal cysteine. *Journal of Biological Chemistry*, 276, 38280-38288.

## D

- D'Autreaux, B. & M. B. Toledano (2007) ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8, 813-824.
- Davies, K., S. Lin & R. Pacifici (1987) Protein damage and degradation by oxygen radicals. IV. Degradation of denatured protein. *J Biol Chem*, 262, 9914-20.
- De Minicis, S. & D. Brenner (2008) Oxidative stress in alcoholic liver disease: role of NADPH oxidase complex. *J Gastroenterol Hepatol*, 23 Suppl 1, S98-103.
- De Vries, S. & I. Schroder. (2002). Comparison between the nitric oxide reductase family and its aerobic relatives, the cytochrome oxidases. In *Colloquium on Tetrapyrroles - Their Life, Birth and Death*, 662-667. Edinburgh, Scotland.
- DeCoursey, T. E. & E. Ligeti (2005) Regulation and termination of NADPH oxidase activity. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62, 2173-2193.
- Delaunay, A., A. D. Isnard & M. B. Toledano (2000) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sensing through oxidation of the Yap1 transcription factor. *Embo Journal*, 19, 5157-5166.
- Denisov, I. G., T. M. Makris, S. G. Sligar & I. Schlichting (2005) Structure and chemistry of cytochrome P450. *Chemical Reviews*, 105, 2253-2277.

- Dey, A., F. E. Jenney, M. W. W. Adams, M. K. Johnson, K. O. Hodgson, B. Hedman & E. I. Solomon (2007) Sulfur K-edge X-ray absorption Spectroscopy and density functional theory calculations on superoxide reductase: Role of the axial thiolate in reactivity. *Journal of the American Chemical Society*, 129, 12418-12431.
- Dey, A., C. L. Roche, M. A. Walters, K. O. Hodgson, B. Hedman & E. I. Solomon (2005) Sulfur K-edge XAS and DFT calculations on  $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{(2+)}$  clusters: Effects of H-bonding and structural distortion on covalency and spin topology. *Inorganic Chemistry*, 44, 8349-8354.
- Dolla, A., M. Fournier & Z. Dermoun. (2006). Oxygen defense in sulfate-reducing bacteria. 87-100.

## E

- Eisenstein, R. S. & K. L. Ross. (2002). Novel roles for iron regulatory proteins in the adaptive response to iron deficiency. In *11th International Symposium on Trace Elements in Man and Animals*, 1510S-1516S. Berkeley, California.
- Emerson, J. P., D. E. Cabelli & D. M. Kurtz (2003a) An engineered two-iron superoxide reductase lacking the  $[\text{Fe}(\text{S}_{\text{CYS}})_4]$  site retains its catalytic properties in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100, 3802-3807.
- Emerson, J. P., D. E. Cabelli & D. M. Kurtz (2003b) Bioinorganic Chemistry Special Feature: An engineered two-iron superoxide reductase lacking the  $[\text{Fe}(\text{S}_{\text{CYS}})_4]$  site retains its catalytic properties in vitro and in vivo (vol 100, pg 3802, 2003). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100, 9102-9102.
- Emerson, J. P., E. D. Coulter, R. S. Phillips & D. M. Kurtz (2003c) Kinetics of the superoxide reductase catalytic cycle. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 39662-39668.

## F

- Farr, S. B., R. Dari & D. Touati (1986) Oxygen dependent mutagenesis in *Escherichia coli* lacking superoxide dismutase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83, 8268-8272.
- Favaudon, V., H. Tourbez, C. Houeelevin & J. M. Lhoste (1990)  $\text{CO}_2^-$  Radical induced cleavage of disulfide bonds in proteins - A gamma-ray and pulse-radiolysis mechanistic investigation. *Biochemistry*, 29, 10978-10989.
- Finkel, T. (2000) Redox-dependent signal transduction. *Febs Letters*, 476, 52-54.
- Flint, D., J. Tuminello & M. Emptage (1993) The inactivation of Fe-S cluster containing hydro-lyases by superoxide. *J Biol Chem*, 268, 22369-76.

- Fournier, M., Y. Zhang, J. D. Wildschut, A. Dolla, J. K. Voordouw, D. C. Schriemer & G. Voordouw (2003) Function of oxygen resistance proteins in the anaerobic, sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough. *Journal of Bacteriology*, 185, 71-79.
- Fraser, C. M., S. J. Norris, C. M. Weinstock, O. White, G. G. Sutton, R. Dodson, M. Gwinn, E. K. Hickey, R. Clayton, K. A. Ketchum, E. Sodergren, J. M. Hardham, M. P. McLeod, S. Salzberg, J. Peterson, H. Khalak, D. Richardson, J. K. Howell, M. Chidambaram, T. Utterback, L. McDonald, P. Artiach, C. Bowman, M. D. Cotton, C. Fujii, S. Garland, B. Hatch, K. Horst, K. Roberts, M. Sandusky, J. Weidman, H. O. Smith & J. C. Venter (1998) Complete genome sequence of *Treponema pallidum*, the syphilis spirochete. *Science*, 281, 375-388.
- Fridovich, I. (1986) Superoxide dismutase. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*, 58, 61-97.
- Fridovich, I. (1997) Superoxide anion radical ( $O_2^-$  radical anion), superoxide dismutases, and related matters. *Journal of Biological Chemistry*, 272, 18515-18517.

## G

- Girerd, J. J., F. Banse & A. J. Simaan. (2000). Characterization and properties of non-heme iron peroxo complexes. In *Metal-Oxo and Metal-Peroxo Species in Catalytic Oxidations*, 145-177.
- Greenberg, J. T., P. Monach, J. H. Chou, P. D. Josephy & B. Dimple (1990) Positive control of a global antioxidant defense regulon activated by superoxide generating agents in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87, 6181-6185.
- Groce, S. L. & J. D. Lipscomb (2005) Aromatic ring cleavage by homoprotocatechuate 2,3-dioxygenase: Role of His200 in the kinetics of interconversion of reaction cycle intermediates. *Biochemistry*, 44, 7175-7188.
- Gutteridge, J. M. C. & B. Halliwell. (2000). Free radicals and antioxidants in the year 2000 - A historical look to the future. *ed. C. C. Chiueh*, 136-147.

## H

- Hampton, M. B., A. J. Kettle & C. C. Winterbourn (1998) Inside the neutrophil phagosome: Oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood*, 92, 3007-3017.
- Hayashi, M. (2009) Oxidative stress in developmental brain disorders. *Neuropathology*, 29, 1-8.
- Henle, E. S. & S. Linn (1997) Formation, prevention, and repair of DNA damage by iron hydrogen peroxide. *Journal of Biological Chemistry*, 272, 19095-19098.

Huang, V. W., J. P. Emerson & D. M. Kurtz (2007) Reaction of *Desulfovibrio vulgaris* two-iron superoxide reductase with superoxide: Insights from stopped-flow spectrophotometry. *Biochemistry*, 46, 11342-11351.

I

Imlay, J. A. (2002) What biological purpose is served by superoxide reductase? *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 7, 659-663.

Imlay, J. A. (2003) Pathways of oxidative damage. *Annual Review of Microbiology*, 57, 395-418.

Imlay, J. A. (2006) Iron-sulphur clusters and the problem with oxygen. *Molecular Microbiology*, 59, 1073-1082.

Imlay, J. A. (2008) Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide. *Annual Review of Biochemistry*, 77, 755-776.

J

Jenney, F. E., M. Verhagen, X. Y. Cui & M. W. W. Adams (1999) Anaerobic microbes: Oxygen detoxification without superoxide dismutase. *Science*, 286, 306-309.

Jovanovic, T., C. Ascenso, K. R. O. Hazlett, R. Sikkink, C. Krebs, R. Litwiller, L. M. Benson, I. Moura, J. J. G. Moura, J. D. Radolf, B. H. Huynh, S. Naylor & F. Rusnak (2000) Neelaredoxin, an iron-binding protein from the syphilis spirochete, *Treponema pallidum*, is a superoxide reductase. *Journal of Biological Chemistry*, 275, 28439-28448.

K

Kang, J. H., N. R. Cook, J. E. Manson, J. E. Buring, C. M. Albert & F. Grodstein (2009) Vitamin E, Vitamin C, Beta Carotene, and Cognitive Function Among Women With or at Risk of Cardiovascular Disease The Women's Antioxidant and Cardiovascular Study. *Circulation*, 119, 2772-2780.

Katona, G., P. Carpentier, V. Niviere, P. Amara, V. Adam, J. Ohana, N. Tsanov & D. Bourgeois (2007) Raman-assisted crystallography reveals end-on peroxide intermediates in a nonheme iron enzyme. *Science*, 316, 449-453.

Keyer, K. & J. A. Imlay (1996) Superoxide accelerates DNA damage by elevating free-iron levels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93, 13635-13640.

- Kitagawa, T., A. Dey, P. Lugo-Mas, J. B. Benedict, W. Kaminsky, E. Solomon & J. A. Kovacs (2006) A functional model for the cysteinylated non-heme iron enzyme superoxide reductase (SOR). *Journal of the American Chemical Society*, 128, 14448-14449.
- Kolling, D. J., J. S. Brunzelle, S. Lhee, A. R. Crofts & S. K. Nair (2007) Atomic resolution structures of Rieske iron-sulfur protein: Role of hydrogen bonds in tuning the redox potential of iron-sulfur clusters. *Structure*, 15, 29-38.
- Kovaleva, E., M. Neibergall, S. Chakrabarty & J. Lipscomb (2007) Finding intermediates in the O<sub>2</sub> activation pathways of non-heme iron oxygenases. *Acc Chem Res*, 40, 475-83.
- Kovaleva, E. G. & J. D. Lipscomb (2007) Crystal structures of Fe<sup>2+</sup> dioxygenase superoxo, alkylperoxo, and bound product intermediates. *Science*, 316, 453-457.
- Kuge, S., N. Jones & A. Nomoto (1997) Regulation of yAP-1 nuclear localization in response to oxidative stress. *Embo Journal*, 16, 1710-1720.
- Kullik, I., M. B. Toledano, L. A. Tartaglia & G. Storz (1995) Mutational analysis of the redox-sensitive transcriptional regulator OxyR-regions important for oxidation and transcriptional activation. *Journal of Bacteriology*, 177, 1275-1284.
- Kurtz, D. M. (2006) Avoiding high-valent iron intermediates: Superoxide reductase and rubrerythrin. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 100, 679-693.

## L

- Latifi, A., M. Ruiz & C. C. Zhang (2009) Oxidative stress in cyanobacteria. *Fems Microbiology Reviews*, 33, 258-278.
- Laulhere, J. P., A. M. Laboure & J. F. Briat (1989) Mechanism of the transition from plant ferritin to phytosiderin. *Journal of Biological Chemistry*, 264, 3629-3635.
- Lee, J. W. & J. D. Helmann. (2006). Functional specialization within the Fur family of metalloregulators. In *5th International Biometals Symposium (Biometals 2006)*, 485-499. Welches, OR.
- Lehnert, N., R. Y. N. Ho, L. Que & E. I. Solomon (2001) Spectroscopic properties and electronic structure of low-spin Fe(III)-alkylperoxo complexes: Homolytic cleavage of the O-O bond. *Journal of the American Chemical Society*, 123, 8271-8290.
- Lehnert, N., F. Neese, R. Y. N. Ho, L. Que & E. I. Solomon (2002) Electronic structure and reactivity of low-spin Fe(III)-hydroperoxo complexes: Comparison to activated bleomycin. *Journal of the American Chemical Society*, 124, 10810-10822.
- Lemaignan, C. (2004). *Science des matériaux pour le nucléaire Génie atomique Collection Génie atomique*.

- Lin, I. J., E. B. Gebel, T. E. Machonkin, W. M. Westler & J. L. Markley (2005) Changes in hydrogen-bond strengths explain reduction potentials in 10 rubredoxin variants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 14581-14586.
- Loft, S. & H. Poulsen (1996) Cancer risk and oxidative DNA damage in man. *J Mol Med*, 74, 297-312.
- Lombard, M. Thèse (2001). Activité superoxyde réductase : mise en évidence d'une nouvelle activité enzymatique impliquée dans la lutte contre le stress superoxyde.
- Lombard, M., M. Fontecave, D. Touati & V. Niviere (2000a) Reaction of the desulfoferrodoxin from *Desulfoarculus baarsii* with superoxide anion - Evidence for a superoxide reductase activity. *Journal of Biological Chemistry*, 275, 115-121.
- Lombard, M., C. Houee-Levin, D. Touati, M. Fontecave & V. Niviere (2001) Superoxide reductase from *Desulfoarculus baarsii*: Reaction mechanism and role of glutamate 47 and lysine 48 in catalysis. *Biochemistry*, 40, 5032-5040.
- Lombard, M., D. Touati, M. Fontecave & V. Niviere (2000b) Superoxide reductase as a unique defense system against superoxide stress in the microaerophile *Treponema pallidum*. *Journal of Biological Chemistry*, 275, 27021-27026.

## M

- Mantele, W. (1993) Reaction-induced infrared difference spectroscopy for the study of protein function and reaction-mechanisms. *Trends in Biochemical Sciences*, 18, 197-202.
- Martin, G., S. Austad & T. Johnson (1996) Genetic analysis of ageing: role of oxidative damage and environmental stresses. *Nat Genet*, 13, 25-34.
- Massey, V. (2000). The reactivity of oxygen with flavoproteins. In *3rd International Conference on Oxygen and Life*, eds. Y. Ishimura, M. Nozaki, S. Yamamoto, T. Shimizu, S. Narumiya & F. Mitani, 3-11. Kyoto, Japan.
- Mathe, C., T. A. Mattioli, O. Horner, M. Lombard, J. M. Latour, M. Fontecave & V. Niviere (2002) Identification of iron(III) peroxy species in the active site of the superoxide reductase SOR from *Desulfoarculus baarsii*. *Journal of the American Chemical Society*, 124, 4966-4967.
- Mathe, C., V. Niviere, C. Houee-Levin & T. A. Mattioli (2006) Fe<sup>3+</sup>-eta(2)-peroxy species in superoxide reductase from *Treponema pallidum*. Comparison with *Desulfoarculus baarsii*. *Biophysical Chemistry*, 119, 38-48.
- Mathe, C., V. Niviere & T. A. Mattioli (2005) Fe<sup>3+</sup>-Hydroxide ligation in the superoxide reductase from *Desulfoarculus baarsii* is associated with pH dependent spectral changes. *Journal of the American Chemical Society*, 127, 16436-16441.

- Mathe, C., C. O. Weill, T. A. Mattioli, C. Berthomieu, C. Houee-Levin, E. Tremey & V. Niviere (2007) Assessing the role of the active-site cysteine ligand in the superoxide reductase from *Desulfoarculus baarsii*. *Journal of Biological Chemistry*, 282, 22207-22216.
- Mathé, C. Thèse (2005). Etude structure-fonction des superoxyde réductases: mise en évidence de nouvelles espèces intermédiaires au niveau du site actif. *Paris: Université Paris V- René Descarte*.
- McIver, L., C. Leadbeater, D. J. Campopiano, R. L. Baxter, S. N. Daff, S. K. Chapman & A. W. Munro (1998) Characterisation of flavodoxin NADP<sup>(+)</sup> oxidoreductase and flavodoxin; key components of electron transfer in *Escherichia coli*. *European Journal of Biochemistry*, 257, 577-585.
- Metzler, C. M. (2001). *Biochemistry: the chemical reactions of living cells, Volume 2 Biochemistry: The Chemical Reactions of Living Cells, Carol M. Metzler, ISBN 012492543X, 9780124925434*. Academic Press, 2001.
- Meunier, B., S. P. de Visser & S. Shaik (2004) Mechanism of oxidation reactions catalyzed by cytochrome P450 enzymes. *Chemical Reviews*, 104, 3947-3980.
- Mirshafiey, A. & M. Mohsenzadegan (2008) The role of reactive oxygen species in immunopathogenesis of rheumatoid arthritis. *Iran J Allergy Asthma Immunol*, 7, 195-202.
- Moura, I., P. Tavares, J. J. G. Moura, N. Ravi, B. H. Huynh, M. Y. Liu & J. Legall (1990) Purification and characterization of Desulfoferrodoxin - A novel protein from *Desulfovibrio desulfuricans* (ATCC-27774) and from *Desulfovibrio vulgaris* (strain Hildenborough) that contains a distorted rubredoxin center and a mononuclear ferrous center. *Journal of Biological Chemistry*, 265, 21596-21602.
- Moyerowley, W. S., K. D. Harshman & C. S. Parker (1989) Yeast Yap1 encodes a novel form of the jun family of transcriptional activator proteins. *Genes & Development*, 3, 283-292.

## N

- Niviere, V., M. Asso, C. O. Weill, M. Lombard, B. Guigliarelli, V. Favaudon & C. Houee-Levin (2004) Superoxide reductase from *Desulfoarculus baarsii*: Identification of protonation steps in the enzymatic mechanism. *Biochemistry*, 43, 808-818.

## O

- Onodera, T., A. Sakudo, G. Wu & K. Saeki (2006) Bovine spongiform encephalopathy in Japan: history and recent studies on oxidative stress in prion diseases. *Microbiol Immunol*, 50, 565-78.

## P

- Petsko Gregory A., Sanlaville D. R., Chrystelle, Charmot-Bensimon Dominique. (2008). *Structure et fonction des protéines Biologie cellulaire et moléculaire*. Dominique Charmot-Bensimon.
- Pianzola, M. J., M. Soubes & D. Touati (1996) Overproduction of the rbo gene product from *Desulfovibrio* species suppresses all deleterious effects of lack of superoxide dismutase in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 178, 6736-6742.
- Pierre, J. L. & M. Fontecave (1999) Iron and activated oxygen species in biology: The basic chemistry. *Biometals*, 12, 195-199.
- Piskiewicz, D. (1977). *Kinetics of chemical and enzyme-catalysed reactions*. oxford university press.
- Prescott, L. M. A. H., John P.. Auteur Klein, Donald A. (2003). Auteur Bacq-Calberg, Claire-Michelle. Traduction Dusart, Jean. Traduction. DL 2003. *Microbiologie [Texte imprimé] / Lansing M. Prescott,... John P. Harley,... Donald A. Klein,... ; traduction de la 5e édition américaine par Claire-Michelle Bacq-Calberg et Jean Dusart,... - 2e édition française*. Belgique: Bruxelles : De Boeck, DL 2003.
- Pryor, W. A., K. N. Houk, C. S. Foote, J. M. Fukuto, L. J. Ignarro, G. L. Squadrito & K. J. A. Davies (2006) Free radical biology and medicine: it's a gas, man! *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 291, R491-R511.

## R

- Radi, R., G. Peluffo, M. Alvarez, M. Naviliat & A. Cayota (2001) Unraveling peroxy-nitrite formation in biological systems. *Free Radic Biol Med*, 30, 463-88.
- Rodrigues, J., B. Victor, H. Huber, L. Saraiva, C. Soares, D. Cabelli & M. Teixeira (2008) Superoxide reduction by *Nanoarchaeum equitans* neelaredoxin, an enzyme lacking the highly conserved glutamate iron ligand. *J Biol Inorg Chem*, 13, 219-28.
- Rodrigues, J. V., I. A. Abreu, D. Cabelli & M. Teixeira (2006) Superoxide reduction mechanism of *Archaeoglobus fulgidus* one-iron superoxide reductase. *Biochemistry*, 45, 9266-9278.
- Rodrigues, J. V., L. M. Saraiva, I. A. Abreu, M. Teixeira & D. E. Cabelli (2007) Superoxide reduction by *Archaeoglobus fulgidus* desulfoferrodoxin: comparison with neelaredoxin. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 12, 248-256.
- Rohde, J. U., J. H. In, M. H. Lim, W. W. Brennessel, M. R. Bukowski, A. Stubna, E. Munck, W. Nam & L. Que (2003) Crystallographic and spectroscopic characterization of a nonheme Fe(IV)=O complex. *Science*, 299, 1037-1039.

## S

- Salvemini, D., C. Muscoli, D. Riley & S. Cuzzocrea (2002) Superoxide dismutase mimetics. *Pulm Pharmacol Ther*, 15, 439-47.
- Santos-Silva, T., J. Trincao, A. L. Carvalho, C. Bonifacio, F. Auchere, P. Raleiras, I. Moura, J. J. G. Moura & M. J. Romao (2006) The first crystal structure of class III superoxide reductase from *Treponema pallidum*. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 11, 548-558.
- Sawyer, D. T. & J. S. Valentine (1981) How super is superoxide.. *Accounts of Chemical Research*, 14, 393-400.
- Scandalios, J. G. (2005) Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 38, 995-1014.
- Schafer, F. Q., H. P. Wang, E. E. Kelley, K. L. Cueno, S. M. Martin & G. R. Buettner (2002) Comparing beta-carotene, vitamin E and nitric oxide as membrane antioxidants. *Biological Chemistry*, 383, 671-681.
- Schuler, R. H., L. K. Patterson & E. Janata (1980) Yield for the scavenging of OH radicals in the radiolysis of N<sub>2</sub>O-saturated aqueous-solutions. *Journal of Physical Chemistry*, 84, 2088-2089.
- Seo, M. S., S. W. Kang, K. Kim, I. C. Baines, T. H. Lee & S. G. Rhee (2000) Identification of a new type of mammalian peroxiredoxin that forms an intramolecular disulfide as a reaction intermediate. *Journal of Biological Chemistry*, 275, 20346-20354.
- Shearer, J., R. C. Scarrow & J. A. Kovacs (2002) Synthetic models for the cysteinylated non-heme iron enzyme superoxide reductase: Observation and structural characterization by XAS of an Fe-III-OOH intermediate. *Journal of the American Chemical Society*, 124, 11709-11717.
- Silva, G., J. LeGall, A. V. Xavier, M. Teixeira & C. Rodrigues-Pousada (2001) Molecular characterization of *Desulfovibrio gigas* neelaredoxin, a protein involved in oxygen detoxification in anaerobes. *Journal of Bacteriology*, 183, 4413-4420.
- Silva, G., S. Oliveira, C. M. Gomes, I. Pacheco, M. Y. Liu, A. V. Xavier, M. Teixeira, J. LeGall & C. Rodrigues-Pousada (1999) *Desulfovibrio gigas* neelaredoxin - A novel superoxide dismutase integrated in a putative oxygen sensory operon of an anaerobe. *European Journal of Biochemistry*, 259, 235-243.
- Spiro, T. G. & R. S. Czernuszewicz. (1995). Resonance Raman-spectroscopy of metalloproteins. In *Biochemical Spectroscopy*, 416-460.
- Storz, G. & J. A. Imlay (1999) Oxidative stress. *Current Opinion in Microbiology*, 2, 188-194.

Storz, G., L. A. Tartaglia & B. N. Ames (1990) Transcriptional regulator of oxidative stress-inducible genes - direct activation by oxidation. *Science*, 248, 189-194.

T

Tavares, P., N. Ravi, J. J. G. Moura, J. Legall, Y. H. Huang, B. R. Crouse, M. K. Johnson, B. H. Huynh & I. Moura (1994) Spectroscopic properties of desulfoferrodoxin from *Desulfovibrio desulfuricans* (ATCC-27774). *Journal of Biological Chemistry*, 269, 10504-10510.

Theisen, R. M. & J. A. Kovacs (2005) Role of protons in superoxide reduction by a superoxide reductase analogue. *Inorganic Chemistry*, 44, 1169-1171.

Toledano, M. B., A. Delaunay, L. Monceau & F. Tacnet (2004) Microbial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sensors as archetypical redox signaling modules. *Trends in Biochemical Sciences*, 29, 351-357.

Tsaneva, I. R. & B. Weiss (1990) SoxR, A locus governing a superoxide response regulon in *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology*, 172, 4197-4205.

U

Ursini, F., M. Maiorino, R. Brigeliusflohe, K. D. Aumann, A. Roveri, D. Schomburg & L. Flohe. (1995). Diversity of glutathione peroxidases. In *Biothiols, Pt B*, 38-53.

V

Valentine, J. S. & A. B. Curtis (1975) Convenient preparation of solutions of superoxide anion and reaction of superoxide anion with a copper (II) complex. *Journal of the American Chemical Society*, 97, 224-226.

Valko, M., C. Rhodes, J. Moncol, M. Izakovic & M. Mazur (2006) Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact*, 160, 1-40.

W

Wandersman, C. & P. Delepelaire (2004) Bacterial iron sources: From siderophores to hemophores. *Annual Review of Microbiology*, 58, 611-647.

Winterbourn, C. C. (2008) Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. *Nature Chemical Biology*, 4, 278-286.

Wood, Z. A., L. B. Poole, R. R. Hantgan & P. A. Karplus (2002) Dimers to doughnuts: Redox-sensitive oligomerization of 2-cysteine peroxiredoxins. *Biochemistry*, 41, 5493-5504.

Wood, Z. A., E. Schroder, J. R. Harris & L. B. Poole (2003) Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends in Biochemical Sciences*, 28, 32-40.

Woodmansee, A. N. & J. A. Imlay (2002) Reduced flavins promote oxidative DNA damage in non-respiring *Escherichia coli* by delivering electrons to intracellular free iron. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 34055-34066.

Y

Yeh, A. P., Y. L. Hu, F. E. Jenney, M. W. W. Adams & D. C. Rees (2000) Structures of the superoxide reductase from *Pyrococcus furiosus* in the oxidized and reduced states. *Biochemistry*, 39, 2499-2508.

Youdim, M. & P. Riederer (1997) Understanding Parkinson's disease. *Sci Am*, 276, 52-9.

Z

Zana, M., Z. Janka & J. Kálmán (2007) Oxidative stress: a bridge between Down's syndrome and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, 28, 648-76.

Zhang, R. G., Y. Kim, T. Skarina, S. Beasley, R. Laskowski, C. Arrowsmith, A. Edwards, A. Joachimiak & A. Savchenko (2002) Crystal structure of *Thermotoga maritima* 0065, a member of the IclR transcriptional factor family. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 19183-19190.

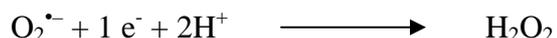
Zheng, M., F. Aslund & G. Storz (1998) Activation of the OxyR transcription factor by reversible disulfide bond formation. *Science*, 279, 1718-1721.

Zhou, C., Y. Huang & S. Przedborski (2008) Oxidative stress in Parkinson's disease: a mechanism of pathogenic and therapeutic significance. *Ann N Y Acad Sci*, 1147, 93-104.





La superoxyde réductase (SOR) est une enzyme de détoxification présente uniquement chez certain types de microorganismes. Elle élimine le radical superoxyde en le réduisant pour donner du peroxyde d'hydrogène sans formation d'oxygène moléculaire.



Le site actif de la SOR est constitué d'un centre mononucléaire de fer ferreux chélaté par 4 histidines en positions équatoriales et une cystéine en position axiale. La présence et le positionnement de cette cystéine au sein du site actif est tout à fait atypique et pourrait être à l'origine de cette réactivité particulière avec le superoxyde.

Différentes structures de SOR ont montré l'existence de liaisons hydrogènes entre le soufre de cette cystéine et des NH de liaisons peptidiques de certains acides aminés dont l'isoleucine 118 sur laquelle nous avons centré notre travail. Quatre mutants de l'isoleucine 118 ont été construits et purifiés. Les caractérisations par spectroscopies UV-visible, FTIR, Résonance Raman, par la détermination du pKa et du potentiel redox du fer du site actif ont montré que les mutations sur cette position induisent un renforcement de la liaison S-Fe. Ceci a pu être associé à un affaiblissement de la liaison hydrogène entre le NH peptidique des mutants de l'isoleucine 118 et le soufre de la cystéine.

Les études de cinétique rapide par radiolyse pulsée ont permis de montrer que les mutations facilitent la protonation des intermédiaires réactionnels de type  $\text{Fe}^{3+}$ -peroxo et  $\text{Fe}^{3+}$ -hydroxo. Ces résultats sont en accord avec l'augmentation de densité électronique autour du fer du site actif, qui induit une basicité plus importante de ces intermédiaires réactionnels.

Ainsi, nous avons pu montrer que le renforcement de la liaison S-Fe a pour conséquence l'accélération de la réaction de la SOR avec le superoxyde. Le ligand axial cystéine a donc pour rôle de contrôler la densité électronique autour du fer du site actif et ainsi d'influer sur la réduction du superoxyde.